

Energieforschungsprogramm

Publizierbarer Endbericht

Programmsteuerung:

Klima- und Energiefonds

Programmabwicklung:

Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft mbH (FFG)

Endbericht

erstellt am

09.03.2022

PTLiquid

Entwicklung eines Verfahrens zur mikrobiologischen Nutzung von CO₂ und H₂ zur
Gewinnung von Ethanol

Projektnummer:

865091

Ausschreibung	4. Ausschreibung Energieforschungsprogramm
Projektstart	01/07/2018
Projektende	31/12/2021
Gesamtprojektdauer (in Monaten)	42 Monate
ProjektnehmerIn (Institution)	Universität für Bodenkultur Wien - Dep. f. Agrarbiotechnologie Tulln, Institut für Umweltbiotechnologie
AnsprechpartnerIn	DI Dr. Günther Bochmann
Postadresse	Konrad Lorenz Strasse 20 3430 Tulln
Telefon	0676 832 80514
Fax	
E-mail	Guenther.bochmann@boku.ac.at
Website	www.boku.ac.at

PTLiquid -

Entwicklung eines Verfahrens zur mikrobiologischen Nutzung von CO₂ und H₂ zur Gewinnung von Ethanol

AutorInnen:

Günther Bochmann, BOKU

Franziska Steger, BOKU

Doris Ribitsch, BOKU

Johanna Reich, BOKU

Werner Fuchs, BOKU

Mario Pichler, TU Wien

Barbara Weiß, TU Wien

Michael Harasek, TU Wien

Christian Jordan, TU Wien

Bernhard Drosch, BEST

Marceli Marzynski, BEST

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	5
2	Einleitung	6
3	Inhaltliche Darstellung.....	7
4	Ergebnisse und Schlussfolgerungen	13
4.1	Auswahl	13
4.2	Gene Design	14
4.3	Exprimierung	16
4.4	Reinigung	17
4.5	Charakterisierung.....	20
4.5.1	Aktivitäten	20
4.5.2	Optimaler pH-Wert und Temperatur für die Enzymaktivität.....	22
4.6	Optimierung.....	24
4.6.1	AwCA Spaltung	24
4.6.2	SsCA Reinigung.....	25
4.6.3	Metalloenzym	26
4.6.4	Zugabe von Carboanhydrase zur Acetogenese.....	35
4.7	Homoacetogenese	37
4.7.1	Auswahl	37
4.7.2	Screening.....	40
4.7.3	Zugabe von Carboanhydrase zur Acetogenese.....	51
5	Ausblick und Empfehlungen.....	77
6	Literaturverzeichnis	78
7	Anhang	79
8	Kontaktdaten.....	80

2 Einleitung

Gemäß der Roadmap der Europäischen Kommission für eine „low-carbon-economy“ sollen bis 2050 80 bis 95 % der derzeitigen Treibhausgasemissionen eingespart werden. Zur Zielerreichung wird eine umfassende Transformation des Energiesystems erforderlich werden, die u.a. mit dem Einsatz effizienter Umwandlungstechnologien einhergehen muss. Gleichzeitig sind alle Potenziale erneuerbarer Energien zu erschließen, ohne die Versorgungssicherheit zu gefährden. Auf Grund der Verfügbarkeit von Strom aus Wind und Sonne sowie vorhandener Nutzungsprofile ist eine Flexibilisierung und Umwandlung in bspw. Sekundärenergieträger unumgänglich. Eine Flexibilisierung der Energienetze sowie die wichtigsten Konversions- bzw. Koppelungspfade die im Zusammenhang mit Hybridnetzen stehen, können durch die Technologien wie Power to Gas (P2G) beschrieben werden. Ein neuerer Ansatz ist Power to Liquid (P2L), d.h. die Umwandlung von (Überschuss-)Strom in flüssige Kraftstoffe. Neben dem Ziel der „low-carbon-economy“ hat sich die EU vorgenommen, bei den Biokraftstoffen eine Beimischungsmenge von 10% im Verkehrssektor bis 2020 zu erreichen (Erneuerbare-Energien-Richtlinie (2009/28/EC)). Biokraftstoffe der 1. Generation (Bioethanol, Biodiesel) konnten einen ersten Anstoß zur Substitution fossiler Energieträger erwirken, jedoch ist das CO₂-Einsparpotenzial gering. Die 2. Generation, die Nutzung von Reststoffen, steht in den Startlöchern. Die 3. Generation, auf Basis von Algen, wird intensiv beforscht. Nun steht die 4. Generation, die mikrobiologische Nutzung von CO₂ als Kohlenstoffquelle, zur Diskussion. Bisherige Verfahren zur Nutzung von CO₂ und H₂ gehen in Richtung Methanbildung zur gasförmigen Nutzung neben direkter H₂ Einspeisung ins Erdgasnetz. Ziel des vorliegenden Forschungsprojektes ist die Entwicklung eines mehrstufigen Prozesses zur Gewinnung von flüssigen Sekundärenergieträgern aus CO₂ und H₂. Somit sollen verschiedene CO₂ Ströme zur Bereitstellung von flüssigen Energieträgern genutzt werden und somit u.a. zum Ziel der Reduzierung der Emissionen im Verkehrssektor beitragen. Der Prozess setzt sich aus einer Homoacetogenese, der mikrobiologischen Umwandlung von CO₂ und H₂ zu Acetat. Zur Erweiterung des Spektrums an CO₂ Quellen wird eine Carboanhydrase genutzt, um eine enzymatische CO₂ Abtrennung durchzuführen. Das Acetat wird in einem zweiten Schritt, einer Solventogenese, zu Ethanol verstoffwechselt. Unterstützt werden soll die Solventogenese mit einem elektrochemischen Prozess. Nach Erfassung der Reaktionskinetiken der einzelnen Prozessschritte wird eine detaillierte Modellierung als Basis für die Entwicklung eines zweistufigen Reaktorsystems durchgeführt. Hierbei soll neben einem optimierten Reaktorsystem auch ein zielgerichtetes Upscaling des Reaktors anhand einer Modellierung durchgeführt werden. Abgeschlossen wird das Projekt mit einer LCA und einer wirtschaftlichen Evaluierung des Prozesses.

3 Inhaltliche Darstellung

Carboanhydrasen

Die Carboanhydrase ist eines der schnellsten Enzyme der Welt und katalysiert die Umwandlung von CO₂ in Hydrogencarbonate. Carboanhydrasen sind daher hochinteressante Enzyme zur Abscheidung von CO₂, das aus Abfallströmen gewonnen werden kann und somit zur Reduzierung der gesamten CO₂-Emissionen beiträgt.

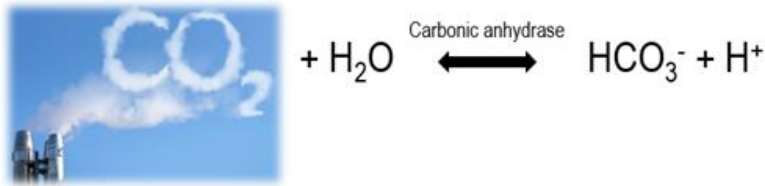


Abbildung 1. Reversible Reaktion der Carboanhydrase.

Der durch Carboanhydrase gebundene Kohlenstoff wird im Projekt als Kohlenstoffquelle für die Acetatproduktion und anschließende Ethanolbildung bereitgestellt. Um Kohlenstoff als ersten Schritt des Projekts abzutrennen, beschäftigt sich dieser Teil hauptsächlich mit Carboanhydrase von der Auswahl der Carboanhydrase-Sequenzen bis zur Kohlendioxidhydratation. Die folgende Abbildung (Abbildung 2) zeigt die Prozessübersicht des Arbeitspakets 2.

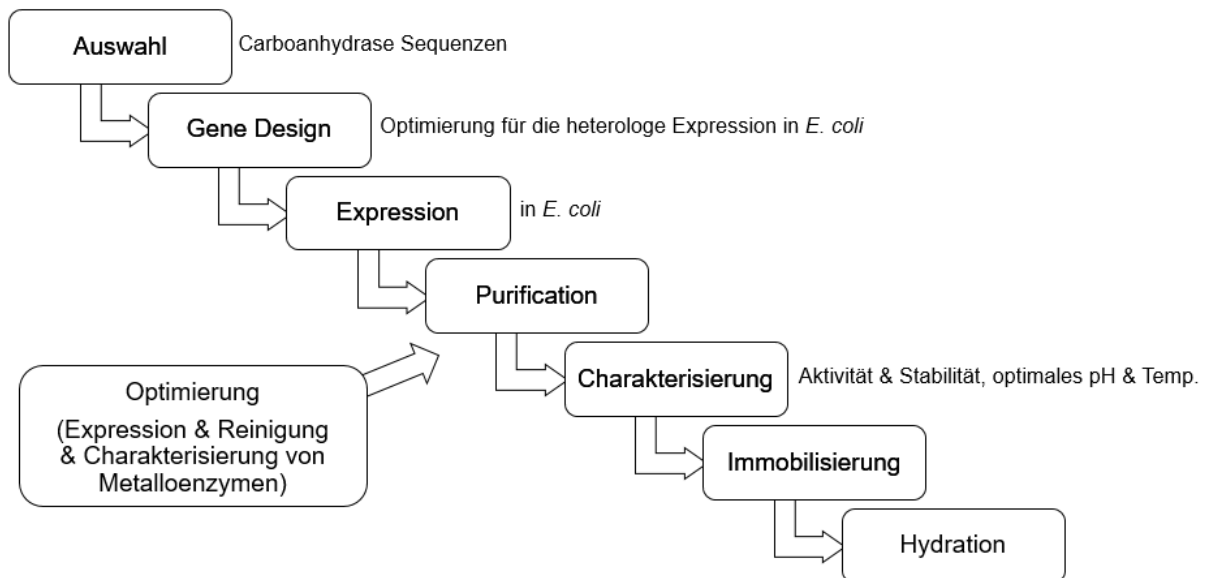


Abbildung 2. Prozessübersicht des Arbeitspakets 2.

Mikrobiologische Prozesse/Prozesskinetiken

Die Klimagasemissionen, meist CO₂, sind in den letzten Jahrzehnten durch menschliche Aktivitäten kontinuierlich gestiegen (EPA, 2018; Bhagat *et al.*, 2018). Die Anhäufung von Klimagasen in der Atmosphäre verursacht negative Auswirkungen auf die Umwelt, nämlich die Phänomene des Klimawandels (EPA, 2018; Kupriyanova *et al.*, 2007). In der Folge ist

der Bedarf an neuen ressourcenschonenden Verfahren entstanden, die Roh- und Brennstoffe nachhaltig und mit geringem Energieverbrauch bereitstellen.

Im Mittelpunkt dieses Projekts steht die Entwicklung eines mehrstufigen biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung von flüssigen Biokraftstoffen der vierten Generation aus CO_2 und H_2 . Es ist geplant, verschiedene CO_2 -Ströme zu nutzen, damit das Verfahren zur Emissionsreduzierung beitragen kann.

In dem zweistufigen Prozess werden ein Mischphasenreaktor, ein Festbettreaktor und ein kontinuierlicher Rührkesselreaktor eingesetzt (Abbildung 3). Eine elektrochemische Einheit wird auf ein Bioreaktorsystem zur Lösungsmittelbildung aufgebracht. Das im ersten Schritt erhaltene Acetat wird als Kohlenstoffquelle für den zweiten Schritt verwendet. Da dies zu einem Elektronenmangel führt, wird eine elektrochemische Einheit eingeführt, die den Prozess der Lösungsmittelentwicklung ermöglicht und wirtschaftlich macht. Basierend auf den Daten aus Fermentationen wird ein Bioreaktorsystem für den zweistufigen Prozess ressourcenschonend entwickelt.

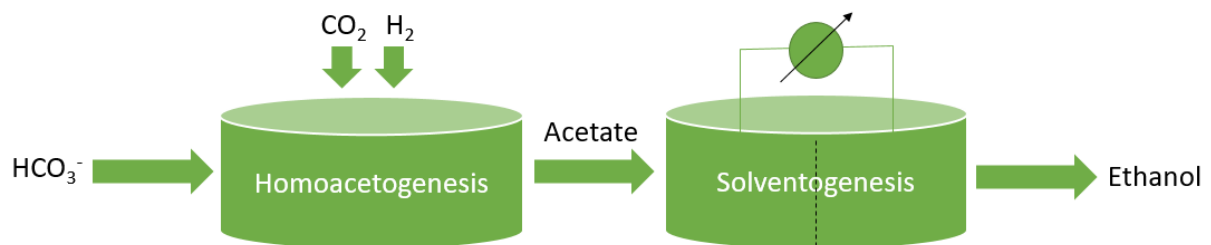


Abbildung 3. 2-stufiges mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von Acetat und Ethanol.

Hydrogencarbonat aus Arbeitspaket 2 wird als Kohlenstoffquelle für die Acetatherstellung verwendet, gefolgt von der Ethanolbildung. Als Erstes sollen acetogene und solvetogene Bakterien gescreent werden und jeweils zwei Stämme mit der höchsten Ausbeute näher untersucht werden. Nach dem Bestimmen der Reaktionskinetik jedes Schrittes wird der Prozess modelliert. Dies ist die Grundlage für die Entwicklung eines 2-stufigen Reaktorsystems, das dann sowohl optimiert als auch hochskaliert wird. Die folgende Abbildung (Abbildung 4) zeigt die Prozessübersicht des Arbeitspakets 3.

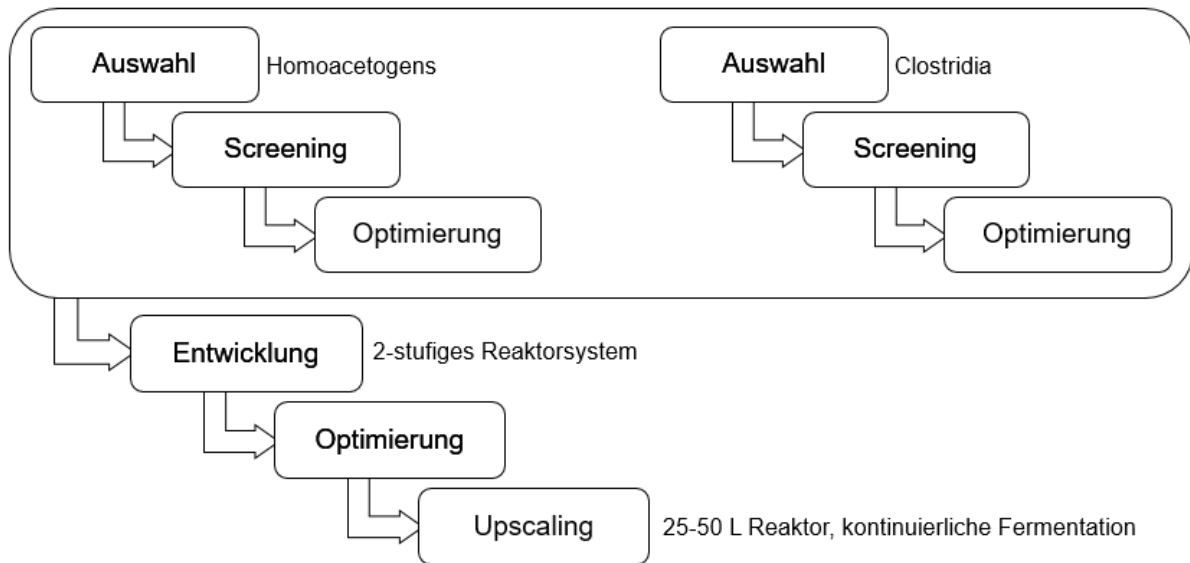


Abbildung 4. Prozessübersicht des Arbeitspakets 3.

Bioreaktoren & Modellierung

Zur Vorbereitung der Strömungssimulationsrechnungen (CFD) sind umfangreiche Maßnahmen getroffen worden. CFD-Simulationen erfordern eine repräsentative Beschreibung der physikalischen, chemischen und hydrodynamischen Vorgänge im beobachteten System. Für dieses Projekt wird der quelloffene CFD-Code „OpenFOAM“ verwendet. Ein wichtiger Vorbereitungsschritt umfasst daher die Auswahl bzw. Adaptierung von geeigneten CFD-Solvern aus diesem Paket. Da in der Originalversion von OpenFOAM keine speziellen Solver für reaktive biologisch-chemische Mehrphasenströmungen bzw. Rieselbetten verfügbar sind, werden abgeleitete bzw. modifizierte Versionen programmiert und entwickelt.

Weitere Vorbereitungen umfassen insbesondere auch das Sammeln und die Analyse der geometrischen Daten für das Simulationsmodell, sowie das Aufbereiten der typischen Prozess- und Betriebsbedingungen für die modellierten Reaktoren, entsprechend der dort ablaufenden Reaktionen. Wichtige Voraussetzung ist, dass die Betriebsbedingungen so gut wie möglich den Laborexperimenten entsprechen, die in den anderen Arbeitspaketen durchgeführt werden.

Wie erwähnt, erfordert die Durchführung von CFD-Simulationen folgende Inputs:

1. Geometriedaten

Zur Durchführung von detaillierten Strömungssimulationen von den betrachteten biologisch-chemischen Systemen ist eine umfassende geometrische Beschreibung der durchströmten Bereiche (Innenraum) eine wesentliche Voraussetzung. Im Projekt werden für die wesentlichen Schritte zwei Bioreaktoren eingesetzt, die simuliert werden. Beide Reaktoren (siehe Abbildung 1 – a) Acetat-Reaktor und b) Ethanol-

Reaktor) wurden vom Unternehmenspartner SpinTEC entworfen und gezeichnet.

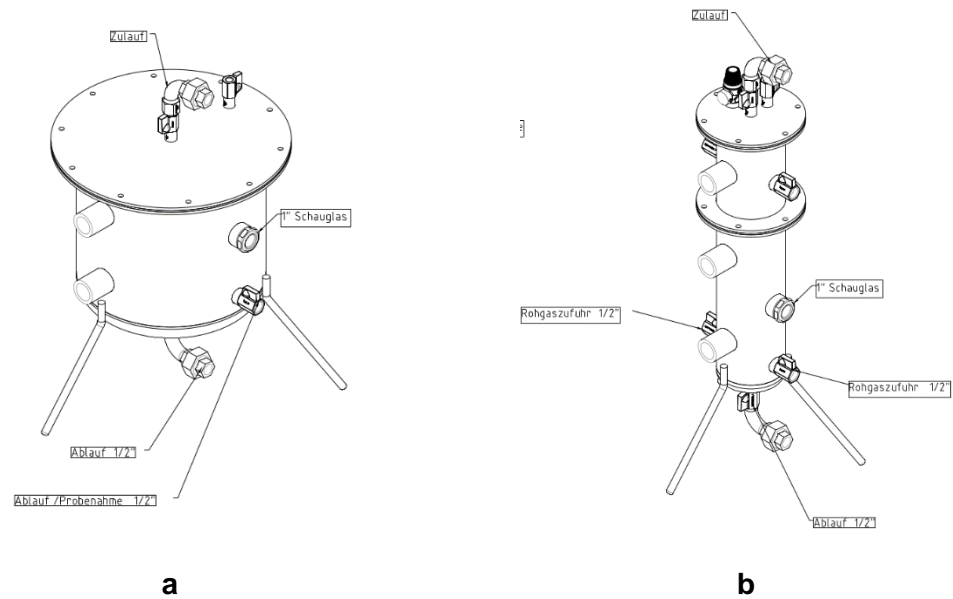


Abbildung 5: a) Acetat-Reaktor, b) Ethanol Reaktor

Die CAD-Zeichnungen wurden im STEP-Format bereitgestellt, um den Import der Geometrie in das CFD-Programm OpenFOAM vorzubereiten. Dazu wurden die 3D-Geometrien bereinigt (Entfernung nicht zu simulierender Teile wie Schrauben, Anschluss-Stutzen...) und mit den notwendigen Randbedingungenzonen (z. B. Inlet, Outlet) versehen. Geometriebereiche, die eine höhere geometrische Auflösung (Mesh-Diskretisierung) erfordern (z. B. Einströmzonen in den Reaktor) wurden als „refinement regions“ für eine höhere Gitterdichte markiert.

2. Betriebs- und Randbedingungen

Neben der Simulationsgeometrie müssen für die Grenzen des Simulationsgebietes entsprechende Randbedingungen in Form von Prozessparametern festgelegt werden. Um die Vorgangsweise zu strukturieren, wurde eine Tabelle (in Excel-Format) zusammengestellt, welche die Schlüsselparameter für die Simulation umfasst. Die Tabelle wurde den Projektpartnern bereitgestellt, damit diese die Betriebsbedingungen wie z. B. Reaktordruck, Medientemperatur, Durchflussraten und Fluidzusammensetzungen und die beobachteten biologischen bzw. chemischen Umwandlungen eintragen können.

3. Fluid- und Stoffdaten

Ergänzend zu den Randbedingungen ist die Charakterisierung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Stoffströme im System erforderlich. Dazu fanden ausführliche Besprechungen mit den Projektpartnern statt, um einen Basisdatensatz zur Durchführung der CFD-Simulation bereitzustellen.

Ökonomische und ökologische Evaluierung

Für die ökologische Bewertung wurde eine Lebenszyklusanalyse (LCA) durchgeführt. Die LCA verfolgte einen „Cradle to gate“-Ansatz. Die LCA wurde im Tool GaBi durchgeführt. Der Prozess wurde hinsichtlich des Einflussfaktors „Global Warming Potential“ (GWP) mit der Einheit kg CO₂-Eq pro kg Produkt bewertet (CML2001 - Aug. 2016, Global Warming Potential (GWP 100 years)). Die LCA wurde mit dem Hintergrund erstellt den Prozess in eine Biogasanlage zu integrieren. Das benötigte CO₂ wird dem Abgas der Biogasanlage entzogen. Da bei der Biogasanlage Bruck an der Leitha das CO₂ in ausreichend reiner Form anfällt, muss keine weitere Aufbereitung des CO₂ berücksichtigt werden.

Die LCA umfasst den Energiebedarf wie in Tabelle 23 zusammengefasst. Des Weiteren ist der Einsatz von NaOH und dessen Herstellungsprozess berücksichtigt, sowie der Einsatz von H₂ und dessen Herstellung mittels Elektrolyse.

Folgende verfügbare „Cradle to gate“ Datensätze kamen für die LCA zum Einsatz:

- Thermische Energie aus Biogas:
 - Datensatz für Österreich
 - Technologiemix
 - Annahme im Datensatz: 100 % Effizienz
- Elektrizität aus Biogas:
 - Datensatz für Österreich
 - Technologiemix
 - Mix aus Kraft-Wärme-Kopplung-Systeme und direkter Wärme
- NaOH-Produktion
 - Datensatz aus internationalem Produktionsprozesses, angepasst für Deutschland
- H₂ aus Elektrolyse
 - Datensatz für Europa

Nicht berücksichtigt ist der Anlagenbau gemäß abgebildeten Flowsheet, der Transport von Bedarfsmaterialien, sowie des Produkts, die Flächennutzung und die mögliche Versiegelung und die Produktion der Komponenten im Nährstoffmedium.

Weiters wurde angenommen, dass das Abwasser aus der Aufkonzentrierung ohne Aufbereitung in den Prozess zurückgeführt werden kann (Abbildung 6).

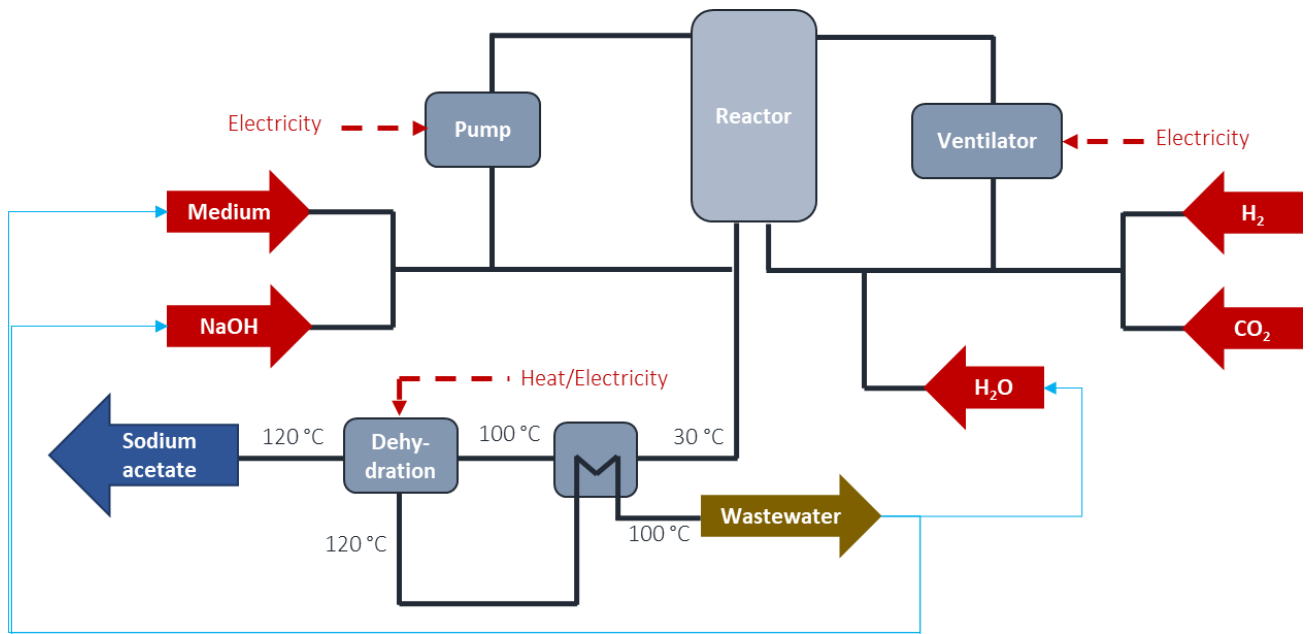


Abbildung 6 Prozessflowsheet mit Wasserrückführung

4 Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Carboanhydrasen

4.1 Auswahl

Tabelle 1 zeigt die Eigenschaften von aus der Literatur gewonnenen Carboanhydrasen.

Drei Carboanhydrasen wurden aufgrund der hohen Hydrataseaktivität ausgewählt: *Acetobacterium woodii*, *Persephonella Marina*, *Sulphurihydrogenibium yellowstone*. *Acetobacterium woodii* DSM 1030 ist ein stabförmiges, grampositives, anaerobes, nicht sporenbildendes acetogenes Bakterium. Die aus *Acetobacterium woodii* extrahierte Carboanhydrase gehört zur β -Klasse und ihre Hydratase-Aktivität blieb nach mehrwöchiger Lagerung bei 4°C erhalten. (Braus-Stromeyer et al., 1997)

Persephonella marina EX-H1 ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium. Sie ist Mitglied des Stammes der Aquificae, die in rauer Umgebung leben. Heterologe exprimierte Carboanhydrase wird über einen weiten pH-Bereich (pH 4-10) aktiv beobachtet und ist hoch thermostabil. (Kanth et al., 2014)

Sulphurihydrogenibium yellowstone ist ein thermophiles, schwefeloxidierendes gramnegatives Bakterium. Die Hydratase-Aktivität der überexprimierten Carboanhydrase in *E. coli* stieg auf bis zu 95°C. Darüber hinaus war diese Aktivität sogar 180 Minuten lang bei 100 °C stabil. (Capasso et al., 2012; Nakagawa et al., 2005)

Tabelle 1. Carbohydrasekandidaten.

(Reference: 1. Faridi and Satyanarayana, 2016; 2. Ramanan *et al.*, 2009; 3. Braus-Stromeyer *et al.*, 1997; 4. Capasso *et al.*, 2012; 5. Kanth *et al.*, 2014; 6. Ki *et al.*, 2013; 7. Sharma *et al.*, 2009; 8. Jun *et al.*, 2017; 9. Kanth *et al.*, 2012; 10. Oviya *et al.*, 2012; 11. Smith and Ferry, 1999; 12. Sundaram and Thakur, 2018; 13. Jo *et al.*, 2014)

Mikroorganismus	Klasse	Hydratase Aktivität [WAU/mg protein]	Stabilität (Temp. / pH)	
<i>Bacillus halodurans</i> TSLV1 ¹	α	3425	40°C für 24min	-
<i>Bacillus subtilis</i> SA3 ²	β	1140	-	pH 8.3
<i>Acetobacterium woodii</i> DSM 1030 ³	β	5236	-	-
<i>Sulphurihydrogenibium yellowstonense</i> YO3AOP1 ⁴	α	7254	40-100°C für 1h	-
<i>Persephonella marina</i> EX-H1 ⁵	α	4960	30-100°C für 15min	pH 7.5
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396 ⁶	α	478	0-35°C für 10min	pH 6-10 for 10min
<i>Pseudomonas fragi</i> ⁷	α	11.03	35-45°C für 1h	pH 7-8.5
<i>Aliivibrio salmonicida</i> ⁸	α	42.5-52.4	10-60°C für 15min	pH 6-11 for 15min
<i>Dunaliella salina</i> ⁹	α	712	15-35°C für 1h	pH 7.6 & 10
<i>Bacillus subtilis</i> VSG-4 ¹⁰	-	54.21	37°C für 2h	pH 8.2
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ¹¹	β	38.5	75°C für 15min	-
<i>Bacillus sp.</i> ISTDS2 ¹²	-	481.66	60°C	pH 8
<i>Thermovibrio ammonificans</i> HB-1 ¹³	α	-	60-100°C für 15min	-

4.2 Gene Design

Die Sequenzen von drei ausgewählten Carboanhydrasen wurden von einem externen Unternehmen für die bessere heterologe Expression in *Escherichia coli* optimiert. Um

Enzyme im zytoplasmatischen Bereich zu exprimieren, wurde das Signalpeptid für α -Carboanhydrasen entfernt. Die Carboanhydrase ist ein metallhaltiges Enzym und die meisten CAs benötigen ein einzelnes Zn^{2+} -Ion für die katalytische Aktivität. Eine Anmerkung ist, dass α -Class-CAs, die bekanntermaßen die umgekehrte Hydrolyse von Estern katalysieren, keine Esteraseaktivität für β -CAs haben (Eminoğlu *et al.*, 2016; Lotlikar *et al.*, 2013).

Tabelle 2. Ausgewählte Carboanhydrasen.

(Reference: 1. Braus-Stromeyer *et al.*, 1997; 2. Kanth *et al.*, 2014; 3. Capasso *et al.*, 2012)

	<i>Acetobacterium woodii</i> DSM 1030 ¹	<i>Persephonella marina</i> EX-H1 ²	<i>Sulphurihydrogenibium yellowstonense</i> YO3AOP1 ³
Name	AwCA	PmCA	SsCA
Klasse	β	α	α
Größe	21 kDa	26 kDa	26 kDa
Enzym	Intrazellulär	Intrazellulär	Intrazellulär
Expression	Zytoplasmatisch	Zytoplasmatisch	Zytoplasmatisch
Genlänge	615 bp	711 bp	717 bp
Klonierungsvektor	pET26b(+)	pET26b(+)	pET26b(+)
Klonierungsstrategie	NdeI / HindIII	NdeI / HindIII	NdeI / HindIII
Resistenz	Kanamycin	Kanamycin	Kanamycin
Andere	1 N-glycosylation (NWS) C-terminal strep tag	1 N-glycosylation (NQS) C-terminal strep tag	1 N-glycosylation (NQS) C-terminal strep tag

4.3 Exprimierung

Es wurde eine heterologe Expression der ausgewählten Enzyme in *Escherichia coli* durchgeführt. Die Expression wurde in 1 L Erlenmeyerkolben mit 300 mL Arbeitsvolumen durchgeführt. Luria-Bertani (LB) Medium mit 40 µg/mL Kanamycin und 0,5 mM ZnCl₂ wurde verwendet. Kanamycin ist eine Resistenzkomponente (Antibiotikum) und Zn wurde dem Medium zur besseren Expression zugesetzt, da die Carboanhydrase ein zinkhaltiges Enzym ist. Zunächst wurde die Kultur bei 37 °C mit 150 rpm für das Wachstum von *E. coli* inkubiert. Sobald die optische Dichte von 0,6 erreicht war, wurde die Inkubationstemperatur auf 20°C reduziert und 0,1 mM IPTG zur Induktion der Carboanhydrase Expression hinzugefügt. Da die Plasmide für die Expression in einem zytoplasmatischen Bereich konzipiert wurden, wurde nur Zellpellet für weitere Prozesse (d.h. Enzymexpressionsintensität, Reinigung und Charakterisierung) gesammelt. Die folgende Abbildung zeigt AwCA, PmCA und SsCA bei unterschiedlichen Zeitpunkten: 0, 2, 4 und 20 h. Im Laufe der Zeit hatte sich die Intensität der Expression erhöht.

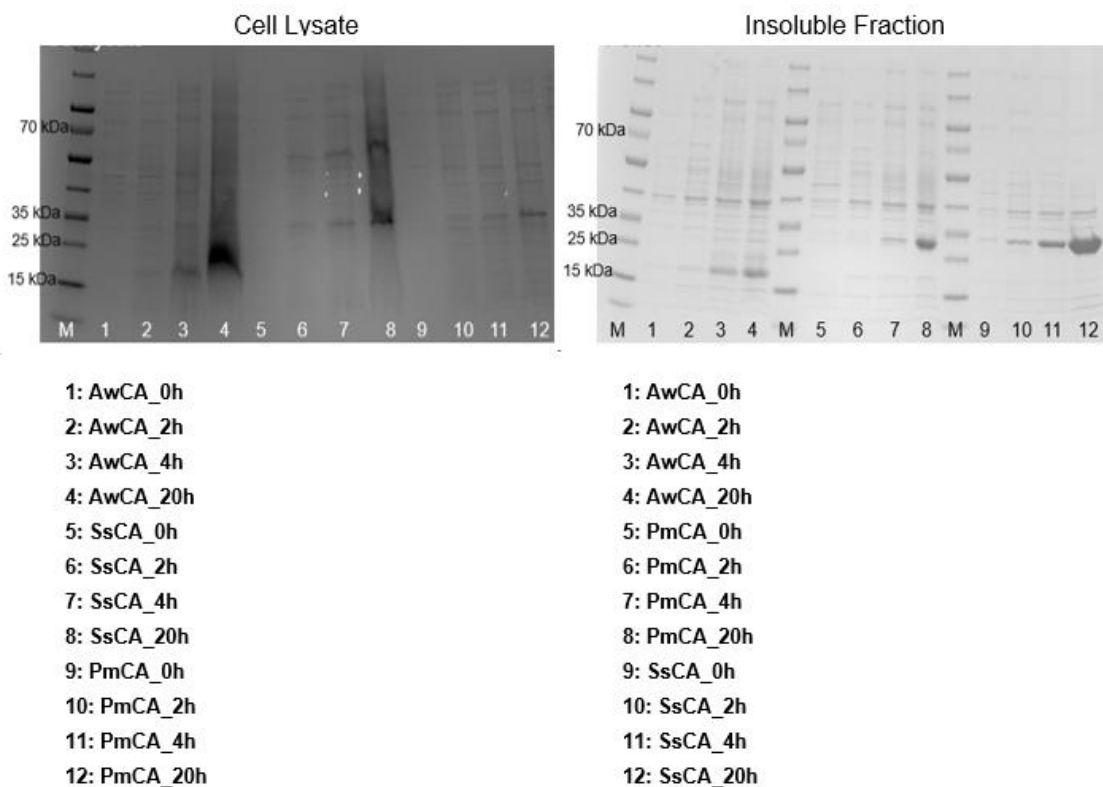


Abbildung 7. SDS-PAGE der AwCA, PmCA und SsCA exprimiert in *E. coli*.

Die Abbildung zeigt zum einen das „Cell Lysate“ und zum anderen die „Insoluble Fractions“, bei den „Insoluble Fractions“ handelt es sich um sogenannte Inclusion Bodies. Diese entstehen durch falsch oder nicht vollständig gefaltete Proteine.

Für den weiteren Prozess der Aufreinigung wurde nur das Lysate verwendet, jedoch sollte das Auftreten der Inclusion Bodies für das weitere Upscaling berücksichtigt werden.

Für die Produktion von größeren Mengen Carboanhydrase wurden bisher drei Fermentationseinheiten zu jeweils drei bis vier Infors-Fermentationen gestartet. Es wurden die Carboanhydrasen AwCa und PmCa hergestellt. Für alle Fermentationen wurden 1 L

Fermentoren des Inforssystems verwendet. Am Ende der Fermentationen wurde die Zellsuspension abzentrifugiert und das Pellet zur Aufreinigung des Enzyms verwendet, da das Enzym intrazellulär in *Escherichia coli* gelagert wird. Das jeweilige Plasmid wurde vor der Fermentation in *E. coli* transformiert und diese Schüttelkolbenkulturen als Inokulum verwendet. Dem Medium wurde $ZnSO_4$ beigemischt, da die Enzyme Zink benötigen. In der ersten Fermentationseinheit wurde die Temperatur anfangs auf 37 °C eingestellt und die Schikanen im Reaktor eingebaut. Nach der Induktion mit IPTG wurde auf 20 °C abgekühlt. Das exprimierte Enzym war die Carboanhydrase Pm. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression auf LB Medium höher war als auf einem Medium, das 2 g/L Hefeextrakt enthielt und ansonsten chemisch definiert war. Außerdem war durch eine fehlerhafte Temperaturumstellung sichtbar, dass mit durchgehend 37 °C fermentiert werden kann. Die Expression war nach 9 Stunden ausreichend (insgesamt wurden 20 Stunden evaluiert).

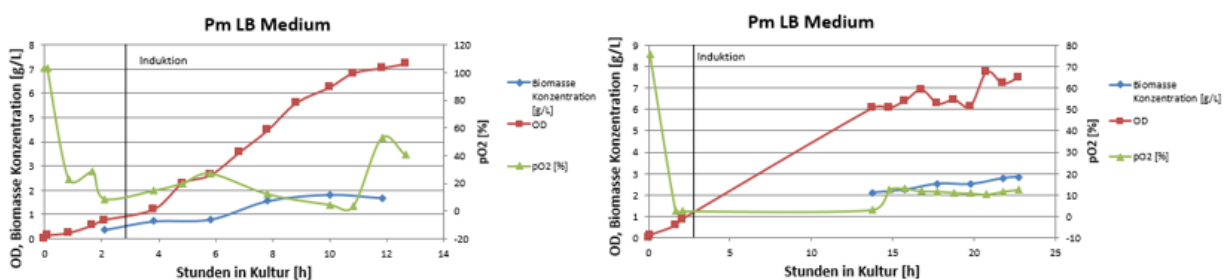


Abbildung 8: PmCa auf LB Medium (blau: Biomasse-Konzentration [g/L], rot: OD₆₀₀, grün: pO₂ [%]); links: Stunde 0-10; rechts: Stunde 11-20).

4.4 Reinigung

Zur Charakterisierung (d.h. Aktivität und Stabilität) wurden Enzyme gereinigt. Strep-tag wurde mit dem C-Terminal aller drei Enzyme fusioniert. Dieser Strep-Tag wurde zur Reinigung verwendet.

Grundlage für das Strep-Tag-System ist die bekannte Bindung von Biotin an Streptavidin. Wenn das mit Strep-Tag fusionierte Enzym in das System geladen wird, wird dieses Enzym an die mit Streptavidin beschichtete Säule gebunden. Biotin hat eine höhere Affinität zu Streptavidin als Strep-Tag. Daher wird das Enzym eluiert, wenn die Lösung mit Biotin in das System geladen wird.

In der folgenden Abbildung ist zu sehen, dass AwCA sich in zwei Banden aufspaltet, es ist zu überprüfen um welche Sequenzen es sich hierbei handelt. Bei der PmCA-Reinigung wurde nichts Ungewöhnliches gefunden. SsCA scheint nicht an die Säule gebunden zu sein, was zu einer niedrigeren Enzymkonzentration führt (Tabelle 3). Der Grund dafür könnte das Falten des SsCA sein. Das heißt, SsCA wird gefaltet, sodass der Strep-Tag nicht erkennbar ist, da sich dieser Tag irgendwie im Enzym befindet bzw. nicht frei zugänglich ist. Um die SsCA-Aufreinigung zu verbessern, wurde eine Schwerkraftsäule verwendet (Abbildung 10). Die Reinigung der Schwerkraftkolonne erfolgte bei Raumtemperatur und der Durchfluss durch die Kolonne erfolgte durch Schwerkraft. Es wird davon ausgegangen, dass die höhere Temperatur und die unterschiedliche Strömungsgeschwindigkeit der Proteine die Proteinfaltung und eine bessere Affinität zur Säule unterstützen können.

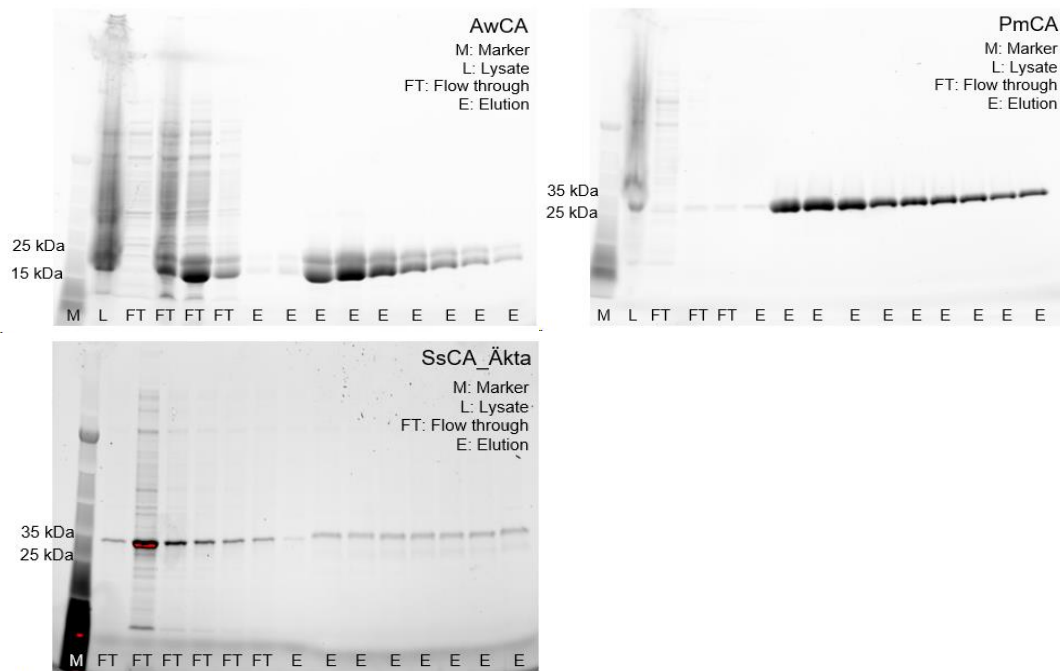


Abbildung 9. Entnommene Proben während der Reinigung: AwCA (21 kDa), PmCA (26 kDa) und SsCA (26 kDa).

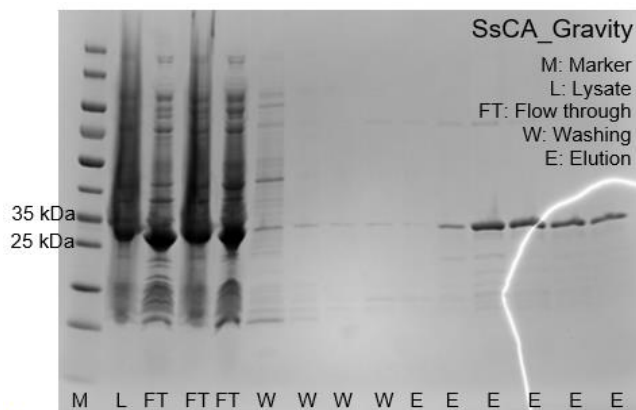


Abbildung 10. Entnommene Proben während der Reinigung: SsCA (26 kDa).

Die Konzentration von SsCA nach der Schwerkraftreinigung ist höher als die von SsCA, dass mit Äkta gereinigt wurde. Die Konzentration ist jedoch im Vergleich zu AwCA und PmCA noch geringer (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3. Konzentration der gereinigten Enzyme.

	<i>AwCA</i>	<i>PmCA</i>	<i>SsCA</i>	<i>SsCA_gravity</i>
Gereinigte Enzymkonzentration [mg/mL]	2	2	0.059	0.1
Gereinigtes Enzymvolumen	8.4	8.8	3.5	3.5

[mL]

Tabelle 4 zeigt die geschätzte Produktivität von drei Enzymen basierend auf den Ergebnissen der Reinigung.

Tabelle 4. Enzyme productivity.

	<i>AwCA</i>	<i>PmCA</i>	<i>SsCA</i>
Kulturvolumen [mL]	1000	1000	1000
Zellpellet [g]	8.00	8.07	9.07
Gereinigtes Enzymvolumen [mL]	56.00	41.07	23.33
Gereinigte Enzymkonzentration [mg/mL]	2.00	2.17	0.14

Reinigung der Lysate der Infors-Fermentationen:

Die Aufreinigungen ergaben für AwCa in den verschiedenen Fermentationen ähnliche Werte für Aktivität, Konzentration oder Produkt pro Biomasse. Auch die PmCa Aufreinigungen waren sehr ähnlich. Dabei zeigte PmCa die höhere Aktivität während AwCa eine höhere Produktausbeute pro Biomasse ergab. Aufreinigung von Enzym aus dem Schüttelkolben ergaben Werte von 14 mg Enzym/g Biomasse für Aw, was in den Inforsfermentationen mindestens erreicht wird. In der Fermentation vom 05.07.2019 wurde dieser Wert sogar weit überschritten (siehe Tabelle 6). Für PmCa wurde im Schüttelkolben 6.7 mg Enzym pro g Biomasse erreicht. Auch hier war die Ausbeute im Infors Fermenter gering höher (siehe Tabelle 5 und Tabelle 6).

Tabelle 5. Reinigung des Enzyms aus Pellets der zweiten Fermentationseinheit.

<i>Enzym</i>	<i>Pellet [g]</i>	<i>Konzentration [mg/mL]</i>	<i>Enzymvolumen [mL]</i>	<i>Spezifische Aktivität [U/mg]</i>	<i>Produkt pro Biomasse [mg/g]</i>
AwCA	2,99	2,5	18,68	0,0018	15,6
AwCA	4,51	2,5	24,9	0,0017	13,8
PmCA	4,77	2,5	14,9	0,011	7,8
PmCA	2,91	2,5	11,4	0,0099	9,8

Tabelle 6. Reinigung des Enzyms aus Pellets der dritten Fermentationseinheit.

<i>Enzym</i>	<i>Pellet [g]</i>	<i>Konzentration [mg/mL]</i>	<i>Enzymvolumen [mL]</i>	<i>Spezifische Aktivität [U/mg]</i>	<i>Produkt pro Biomasse [mg/g]</i>
AwCA	2,17	2,5	22,28	0,0002	25,6
PmCA	2,33	3,2	7,0	0,0083	9,6

4.5 Charakterisierung

4.5.1 Aktivitäten

Die Carboanhydrase reagiert als Hydratase und Esterase. Für beide Reaktionen spielt das Zn^{2+} -Ion eine wichtige Rolle (Abbildung 11). Das an das Zn^{2+} -Ion gebundene Wassermolekül verliert Wasserstoff und das Hydroxidion wird aktiviert, um Kohlendioxid oder Ester zu katalysieren. Die Hydratase-Aktivität ist für die Zwecke dieses Projekts wichtig, da Kohlendioxid durch diese Aktivität abgetrennt werden kann. Daher wurde zunächst die Hydrataseaktivität gemessen.

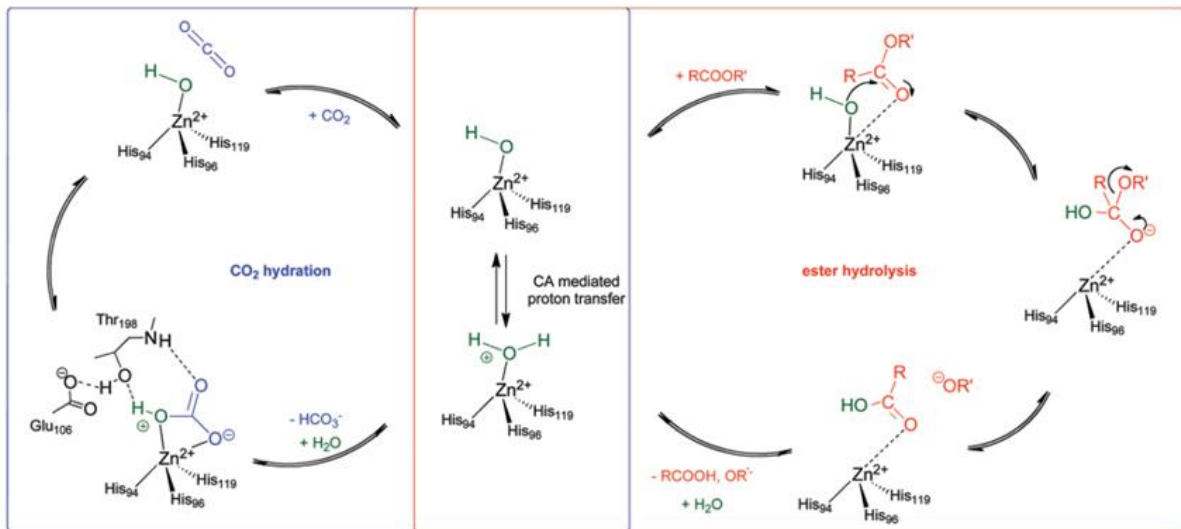


Abbildung 11. Darstellung des katalytischen Zyklus für die katalysierte Carboanhydrase. Links: Hydratation von CO_2 zu HCO_3^- und H^+ , Rechts: Esterhydrolyse zu Carbonsäure und Alkoxid (Lopez *et al.*, 2011).

4.5.1.1 Hydratase

Die Aktivität der Carboanhydrase Hydratase wurde mit einer kolorimetrischen Methode mit einem pH-Indikator (Bromthymolblau, Übergangspunkt pH 6-7,6) gemessen. Die Zeit, die benötigt wurde, um die Farbe von blau auf gelb zu ändern (pH 8,3 auf 6,3), wurde überwacht und diese Daten wurden für die Berechnung der Enzymaktivität verwendet.

Methodenbeschreibung:

Die enzymatische Aktivität der Carboanhydrase wird durch eine Modifikation der Wilbur-Anderson-Methode bestimmt (Wilbur and Anderson, 1948).

Die Aktivität wird durch Messung von pH-Änderungen während der Reaktion mit einem Farbstoffindikationsverfahren bestimmt.

Berechnung:

$$\text{Aktivität [WAU/mg protein]} = \frac{T_0 - T}{T} \frac{d_f}{\text{mg protein}}$$

T_0 und T : Zeiten, die benötigt werden, damit sich der pH-Wert von 8,3 auf 6,3 im Kontrollpuffer und in der enzymkatalysierten Reaktion ändert.

d_f : Verdünnungsfaktor zur Anpassung der experimentellen Differenz der Aktivitätsbestimmung mit der Standardaktivität von handelsüblicher Rinderkohlenstoffanhydrase

Anmerkung: Die Gesamtproteinkonzentration muss mit einem Bradford-Assay (Bio-Rad) mit Rinderserumalbumin als Proteinstandard bestimmt werden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt. AwCA zeigte die höchste Hydrataseaktivität unter drei Enzymen. Mit SsCA wurde eine relativ hohe Hydrataseaktivität beobachtet.

Tabelle 7. Spezifische Hydratase-Aktivität von Carboanhydrasen.

	Experimentelle Daten [WAU/mg protein]	Literaturdaten [WAU/mg protein]	Source
AwCA	2730	5236	Braus-Stromeier <i>et al.</i> , 1997
PmCA	106	4960	Kanth <i>et al.</i> , 2014
SsCA	1908	7254	Capasso <i>et al.</i> , 2012
Bovine CA	2030	> 3500	Sigma-Aldrich

Die Messung der Hydratase-Aktivität ist zeitaufwendig, da die Aktivität nur einzeln gemessen werden kann. Darüber hinaus ist das Auftreten von Fehlern hoch, da es sich um eine visuelle Messung handelt und die Handhabung des Substrats (kohlendioxidgesättigtes Wasser) aufgrund des Gleichgewichts von Kohlendioxid schwierig ist.

Die Messung der Esteraseaktivität der Carboanhydrase kann mit einem Spektrophotometer durchgeführt werden. Als Substrat wird para-Nitrophenylacetat verwendet. Der Vorteil der Messung der Esterase-Aktivität besteht darin, dass mehrere strukturelle, funktionelle und mutationelle Studien gezeigt haben, dass die Hydratase-Aktivität und die Esterase-Aktivität der Carboanhydrase einen ähnlichen Mechanismus aufweisen. Wichtig ist zu wissen, dass es sich um die gleiche katalytische Tasche handelt, dies bedeutet wiederum, dass die Esterase-Aktivität ein Indikator für die Hydratase-Aktivität ist. (Stenner-Liewen *et al.*, 2015)

4.5.1.2 Esterase

Die Carboanhydrase als Esteraseaktivität wurde mit einem Spektralphotometer (Tecan Reader) gemessen. Als Substrat wurde para-Nitrophenylacetat verwendet. Da dieses Substrat in para-Nitrophenol umgewandelt wird, das in Gegenwart von Carboanhydrasen gelblich ist, es wird die Intensität der Lösung gemessen und diese Daten werden zur Berechnung der Enzymaktivität verwendet. (Verpoorte *et al.*, 1967)

Methodenbeschreibung:

Die Aktivität wird mit einem photometrischen Assay mit p-Nitrophenylacetat gemessen, das während der Hydrolyse ein Chromophor (p-Nitrophenolat) freisetzt, das spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen werden kann.

Berechnung:

Time [m] - Abs: Linear ansteigend (Steigung wird für die Berechnung verwendet)

$$\begin{aligned} & \text{Volumetrische Aktivität [U/mL]} \\ & = (\text{Abs} * \text{Vd fin} * \text{df}) / (\epsilon * \text{d} * \text{Vd enzyme}) \\ & \text{Abs [min}^{-1}\text{]} \\ & \text{Vd fin and Vd enzyme [\mu L]} \\ & \text{d}_f \\ & \epsilon [\text{mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}] \\ & \text{d [cm]} \\ & \text{U [\mu mol} * \text{min}^{-1}\text{]} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Spezifische Aktivität [U/mg]} \\ & = \text{Volumetrische Aktivität} / \text{Proteinkonzentration} \end{aligned}$$

Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. SsCA zeigte die höchste Esteraseaktivität unter diesen drei Enzymen. Allerdings waren die Esteraseaktivitäten im Vergleich zu Literaturdaten im Allgemeinen viel geringer. Die niedrigere Esterase-Aktivität von AwCA wurde erwartet, da für alle β -Klassen-CAs keine Esterase-Aktivität gemeldet wurde (Eminoğlu *et al.*, 2016; Lotlikar *et al.*, 2013).

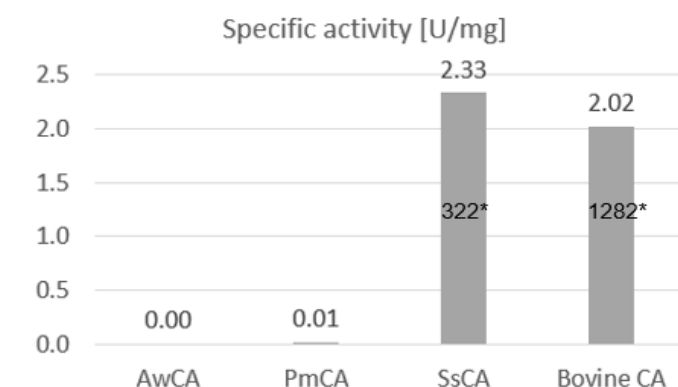


Abbildung 12. Spezifische Esterase-Aktivität von Carboanhydrasen (*Literaturdaten: Capasso *et al.*, 2012).

4.5.2 Optimaler pH-Wert und Temperatur für die Enzymaktivität

Der optimale pH-Wert wurde unter Verwendung von Kaliumphosphatpuffer mit einem pH-Bereich von 6 - 8 bestimmt. Zusätzlich wurde auch Tris-SO₄-Puffer (pH 8) getestet. Die höchste Aktivität zeigten die drei Enzyme mit Tris-SO₄-Puffer (Abbildung 13).

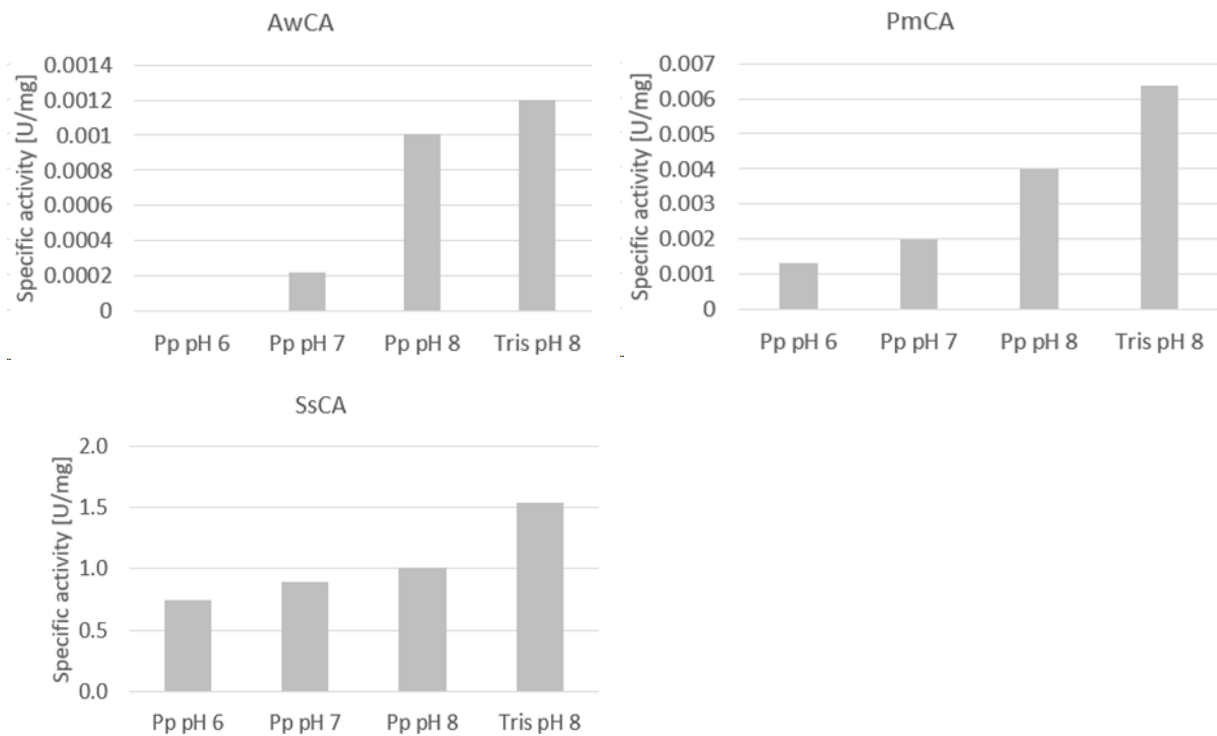


Abbildung 13. Spezifische Aktivität von Carboxylesterasen mit unterschiedlichen pH-Werten.

Um die optimale Temperatur für die Enzymaktivität zu ermitteln, wurde der Test bei 30 °C und 37 °C durchgeführt. Da die Enzyme bei höheren Temperaturen aktiver sind, wurde der Test auch bei 60 °C durchgeführt (Abbildung 14). Tris-SO₄-Puffer (pH 8), der die höchste Aktivität zeigte, wurde verwendet.

Die Aktivität von AwCA ist bei 30 – 37 °C höher, während die Aktivität von PmCA und SsCA bei 60 °C verbessert wurde, verglichen mit der von 3 °C, 2-fach bzw. 100-fach. Man kann sagen, dass PmCA und SsCA thermophil sind.

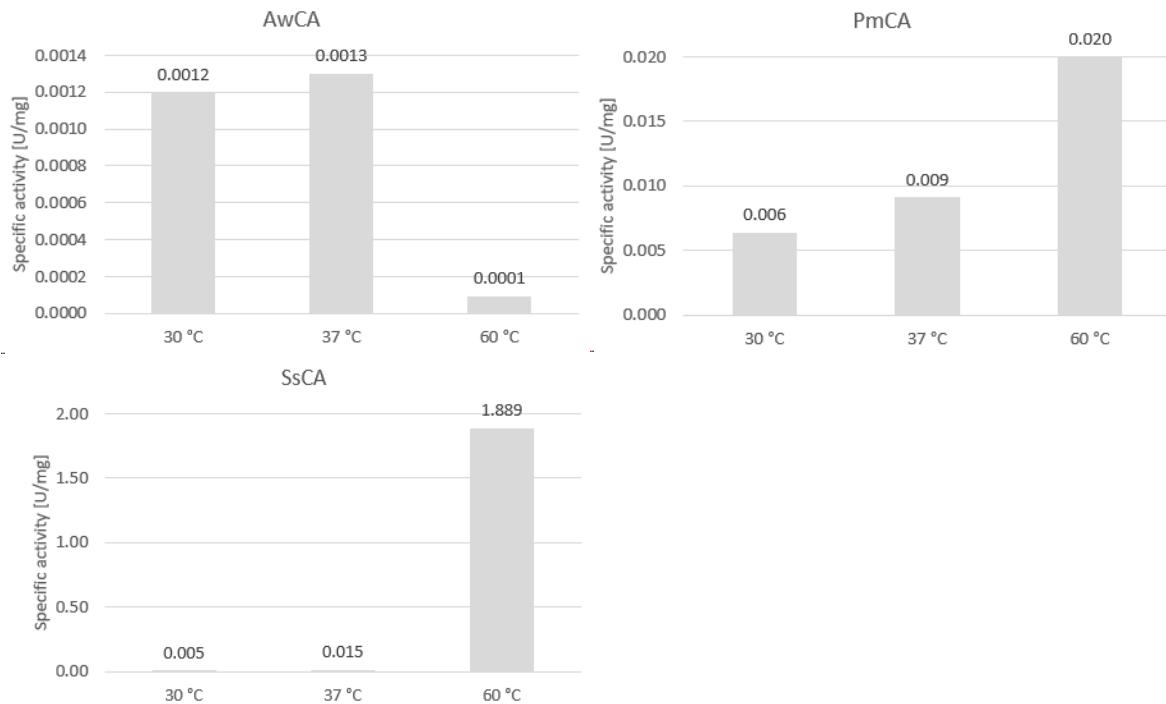


Abbildung 14. Spezifische Aktivität von Carboanhydrasen bei verschiedenen Temperaturen.

4.6 Optimierung

4.6.1 AwCA Spaltung

Nach der Reinigung von AwCA wurden verschiedene Bandenrößen von AwCA auf dem Gel gezeigt. Es wird davon ausgegangen, dass AwCA auf verschiedene Weise gefaltet wurde, was zu unterschiedlichen Größen während der Reinigung oder der Expression führte. Um zu überprüfen, wann diese Teilung beginnt, wurde AwCA exprimiert und es wurden alle 1 oder 2 Stunden Proben entnommen. Wie im rechten Gelbild von Abbildung 15 zu sehen ist, wurde nur eine Bande während der gesamten Expressionsperiode deutlich beobachtet, was bedeutet, dass die Teilung erst während der Reinigung erfolgte.

Um zu sehen, ob es eine signifikante Behinderung durch die Spaltung gibt, wurden die Aktivitäten von gereinigtem AwCA und Zelllysat verglichen. Das Ergebnis zeigte, dass die Zelllysataktivität viel höher war als die des gereinigten AwCA (Abbildung 16).

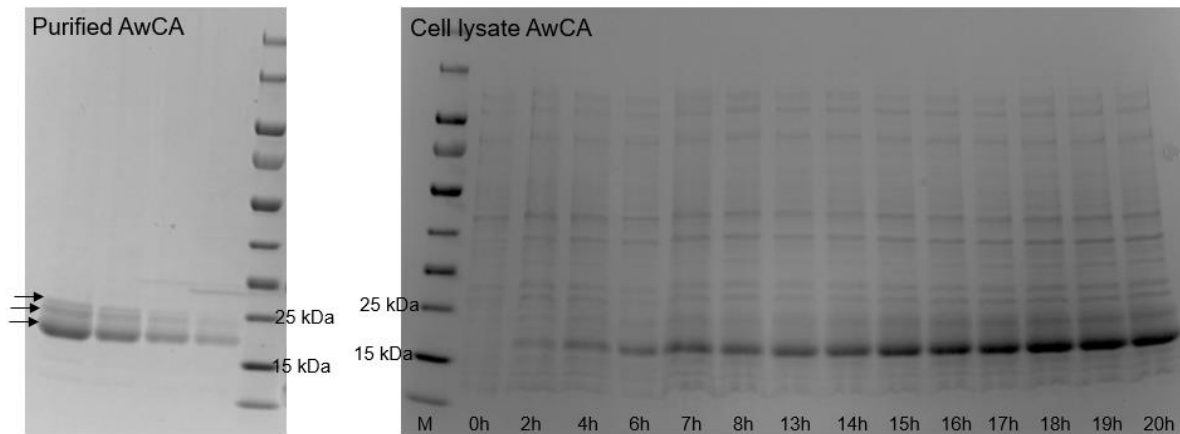


Abbildung 15. SDS-PAGE des gereinigten AwCA (links) und Zelllysate des AwCA (rechts).

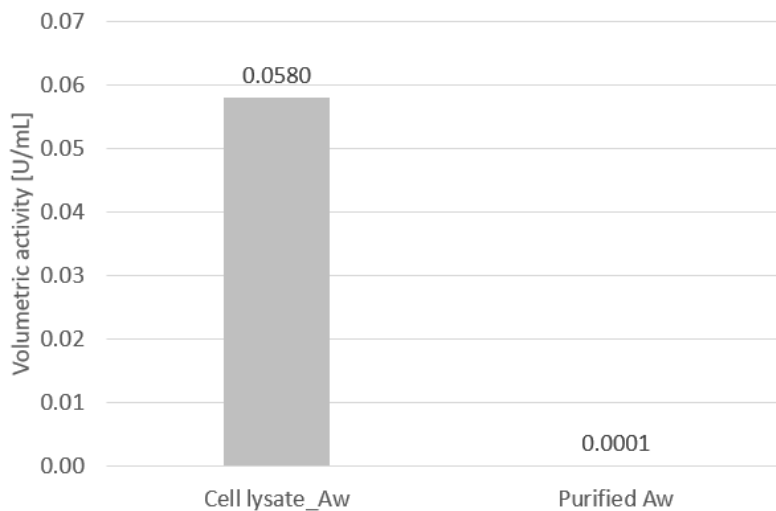


Abbildung 16. Volumetrische Aktivitäten von Zelllysate und gereinigtem AwCA.

Um den Unterschied zwischen diesen beiden Banden herauszufinden, wurden diese separat gesammelt und an den Partner geschickt, wo ihre Sequenzen bestimmt wurden. Dabei stellte sich heraus, es handelt sich um ein und dasselbe Enzyme, vermutlich bilden sich aufgrund der Denaturierung und der entstehenden Wärme während der SDS-PAGE zwei Banden aus.

4.6.2 SsCA Reinigung

Die gereinigte SsCA hat eine niedrigere Konzentration als die beiden anderen Enzyme, was bedeutet, dass SsCA nicht an die Säule bindet und dadurch nicht gut gereinigt werden kann. Darüber hinaus hat diese schlechte Reinigung einen Einfluss auf die Variation der Aktivität von SsCA.

Abbildung 17 zeigt die Banden von Elution und Flow through Fraktionen, die während der Reinigung gesammelt wurden. Die Aktivitäten der Elution und des Flow through wurden verglichen. Der Flow through wies eine 3-9 mal höhere Aktivität auf (Abbildung 17). Um die Reinigung zu verbessern, kann der Strep-Tag an das N-Terminal fusioniert werden. Das aktuelle Enzym hat einen Strep-Tag auf der C-terminalen Seite. Ein weiterer Ansatz wäre die Reinigung des Enzyms durch Ionenaustauschchromatographie. Diese Reinigung verwendet den isoelektrischen Punkt des Enzyms anstelle der Affinität des Strep-Tags zur Säule.

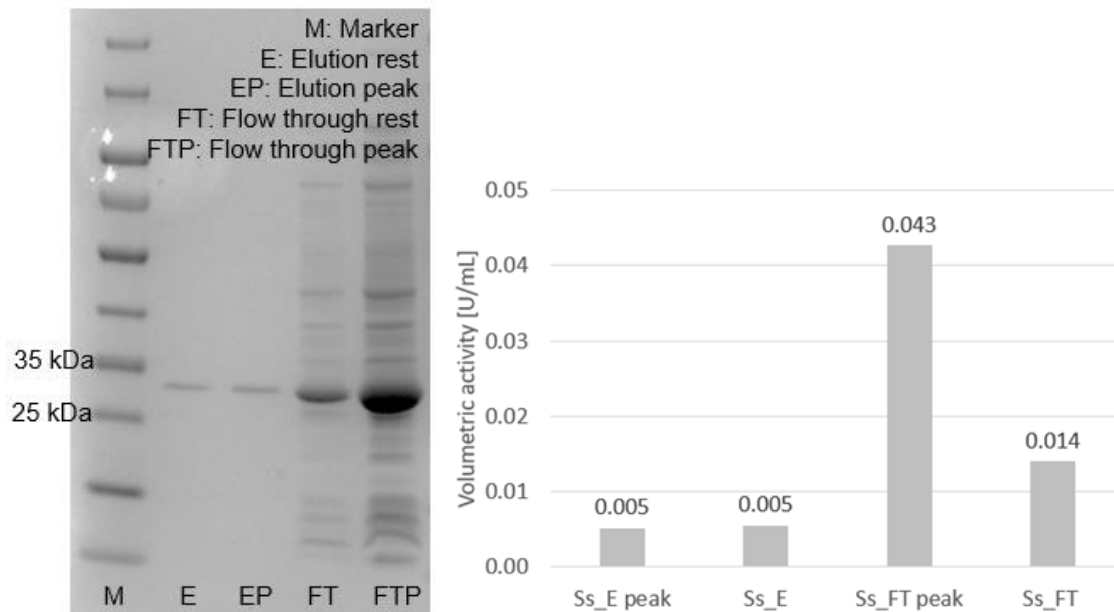


Abbildung 17. SDS-PAGE von SsCA gesammelt aus Elution und Flow through Fraktionen (links), volumetrische Aktivität der Elution und Flow through Proben (rechts).

4.6.3 Metalloenzym

Die Carboanhydrase ist ein zinkhaltiges Metalloenzym. Um die Wirkung verschiedener Zinkquellen und unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf die Expression von Carboanhydrasen zu untersuchen, wurden folgende Experimente durchgeführt: zwei verschiedene Zinkquellen ($ZnCl_2$ und $ZnSO_4$) mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 0,5, 1 und 2 mM). Wenn dem Medium 2 mM $ZnCl_2$ zugesetzt wurden, konnte *E. coli* nicht wachsen. Daher wurden die Daten nur von 0 bis 1 mM der Zn-Konzentrationen beobachtet. Es wird angenommen, dass das Vorhandensein von mehr als 2 mM Zn im Medium das Wachstum von *E. coli* hemmt bzw. toxisch auf den Organismus wirkt.

Es gibt keinen visuellen Unterschied in der Expressionsintensität zwischen verschiedenen $ZnCl_2$ - und $ZnSO_4$ -Konzentrationen. Ohne Zusatz von Zn wurden etwas dickere Banden gezeigt (Abbildung 18 und Abbildung 19).

Zum weiteren Vergleich der Auswirkungen der unterschiedlichen $ZnCl_2$ - und $ZnSO_4$ -Konzentrationen wurden Aktivitätstests durchgeführt. Dabei zeigte sich für PmCA wurde die

größte Aktivität bei 0,5 mM $ZnCl_2$ Zugabe gemessen. Bei SsCA wurde die größte Aktivität bei keiner Zink Zugabe und bei AwCA bei einer 0,5 mM Zugabe von $ZnSO_4$ gemessen. Abschließend ist jedoch zu sagen, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen 0 mM/0,5 mM $ZnCl_2$ und $ZnSO_4$. Daher wurde für das weitere Upscaling eine Zugabe von 0,5 mM $ZnSO_4$ bevorzugt.

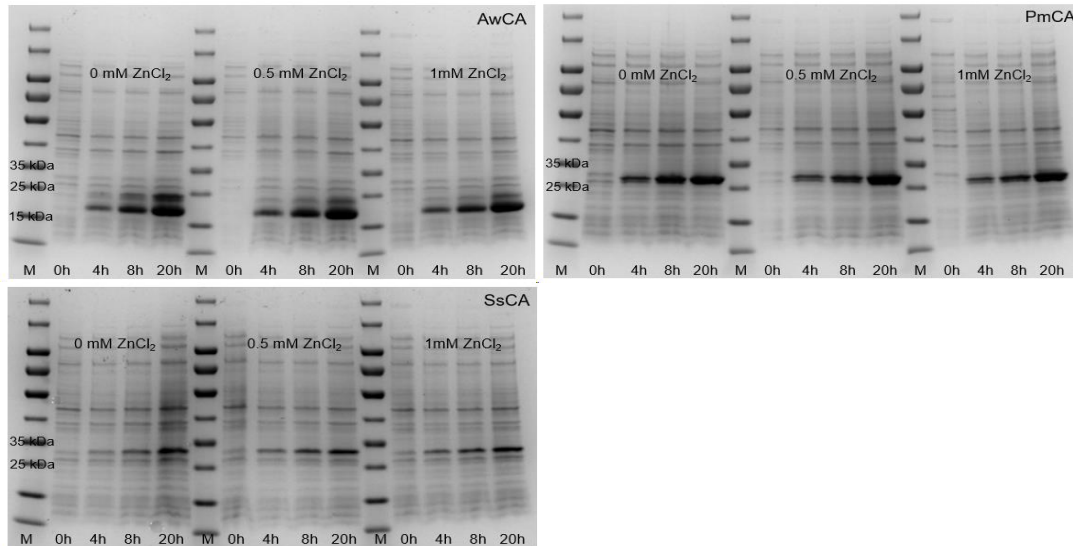


Abbildung 18. Expression von Carboanhydrase mit unterschiedlichen $ZnCl_2$ -Konzentrationen.

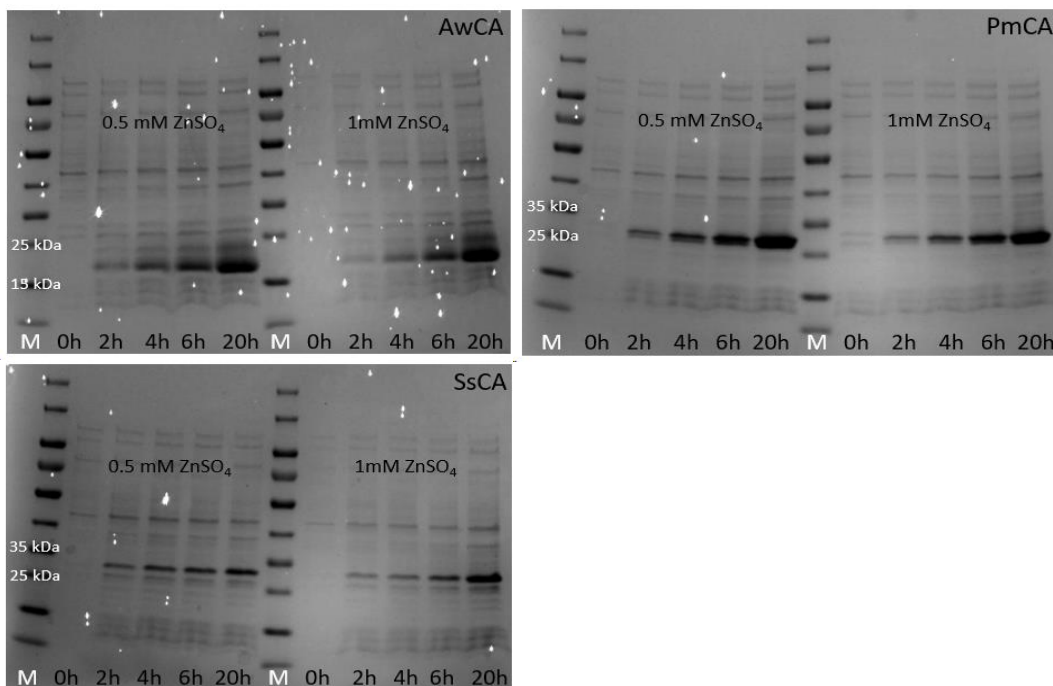


Abbildung 19. Expression von Carboanhydrase mit unterschiedlichen $ZnSO_4$ -Konzentrationen.

Zur weiteren Charakterisierung der Enzyme muss die Stabilität gemessen werden, um genauere Voraussagen für die weiteren Prozesse treffen zu können. Des Weiteren wird SsCA mit einem N-terminalen Strep-tag getestet werden, um eine höhere Aufreinigungsrate zu erzielen.

Für die weiteren Prozesse muss die Hydratase Aktivität bestimmt werden, hierzu wird nach geeigneten Methoden gesucht bzw. vorhandene Assays adaptiert.

Arbeitspaket 2 - Carboanhydrase

Kohlenstoff kann durch die Hydrataseaktivität der Carboanhydrase gebunden werden. Dieser gebundene Kohlenstoff wiederum kann für die weitere Acetat- und Ethanolproduktion verwendet werden. In diesem Arbeitspaket dreht sich alles um die Carboanhydrase, vom Gendesign über die Expression, bis hin zur Aufreinigung und Charakterisierung des Enzyms. Die Arbeiten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die drei folgenden Carboanhydrasen wurden aufgrund ihrer hohen Hydrataseaktivität ausgewählt: *Acetobacterium woodii*, *Persephonella marina* und *Sulphurihydrogeibium yellowstone*. Diese wurden exprimiert, zuerst in Schüttelkolben und im Anschluss in großen Fermentationseinheiten (Infors), SsCA wurde jedoch nur im Schüttelkolben exprimiert. Darüber hinaus wurden sie mittels dem Proteinaufreinigungssystem ÄKTA aufgereinigt. Die aufgereinigten Enzyme wurden charakterisiert und ihr optimaler pH-Wert und optimale Temperatur wurden bestimmt.

Zu Beginn gab es zwei kritische Punkte, die zu überwinden waren:

Zum einen konnte zwar die Carboanhydrase von *S. yellowstone* erfolgreich exprimiert, jedoch nicht aufgereinigt werden. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass der Tag (Protein-Tag), den das Enzym zum Binden an die Säule benötigt, in unserem Falle ein Strep-tag nicht frei zugänglich war und somit nicht an das passende Gegenstück in der Säule binden konnte. Daraufhin wurde dieselbe Carboanhydrase-Sequenz am anderen Ende (N-terminalen) mit dem Strep-tag designed, um den Tag eventuell zugänglicher für die Säule zu machen.

Zusätzlich wurde eine weitere Carboanhydrase ausgewählt und designed. Dabei handelt es sich um die Carboanhydrase von *Methanobacterium thermoautotrophicum*, ein methanogener Stamm mit einer hohen Thermostabilität. Zum anderen war ein weiterer kritischer Punkt, die Bestimmung der Hydrataseaktivität bzw. die Messung dafür. Die bestehenden Protokolle führen die Messungen bei 0°C durch, diese Temperatur ist für Enzyme nicht geeignet, weiters liegt sie deutlich unter der Arbeitstemperatur, in denen die Enzyme eingesetzt werden sollen. Deshalb wurde ein Protokoll entwickelt, um bei höheren Temperaturen die Aktivität bestimmen zu können.

Auswahl

Die Sequenzen von *Sulphurihydrogenibium yellowstone* und *Methanobacterium thermoautotrophicum* wurden von einem externen Unternehmen für die heterologe Expression in *Escherichia coli* optimiert.

Strep-tag wurde verwendet, um die Enzyme aufzureinigen zu können. *M. thermoautotrophicum* besitzt den Tag am C-terminalen Ende und *S. yellowstone* am N-terminalen Ende.

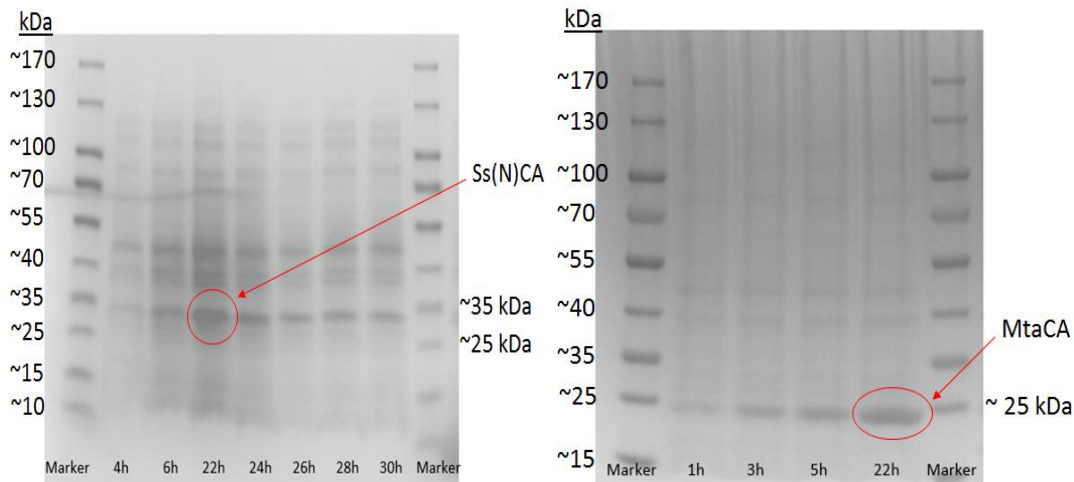
Tabelle 8:Ausgewählte Carboanhydrasen

(Reference: 1. Capasso et al., 2012; 2. Smith & Ferry, 1999)

	<i>Sulphurihydrogenibium yellowstonense</i> YO3AOP1 ¹	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ²
Name	Ss(N)CA	MtaCA
Klasse	α	β
Größe	26 kDa	19 kDa
Enzym	Intrazellulär	Intrazellulär
Expression	Zytoplasmatisch	Zytoplasmatisch
Klonierungsvektor	pET16b(+)	pET26b(+)
Klonierungsstrategie	NdeI / HindIII	NdeI / HindIII
Resistenz	Ampicilin	Kanamycin
Andere	N-terminal strep tag	C-terminal strep tag

Exprimierung

Es wurde eine heterologe Expression der ausgewählten Enzyme in *E. coli* durchgeführt. Die Expression wurde in 1 L Erlenmeyerkolben mit 300 mL Arbeitsvolumen durchgeführt. Luria-Bertani (LB) Medium mit 0,5 mM ZnSO₄ und dem jeweiligen Antibiotikum, für *M. thermoautotrophicum* 40 µg/mL Kanamycin und 100 µg/mL Ampicillin für *S. yellowstonense*. Zink wurde dem Medium zugeführt, um eine bessere Expression zu erhalten, da die Carboanhydrase ein zinkhaltiges Enzym ist. Die Kultur wurde bei 37 °C mit 150 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 inkubiert und im Anschluss wurde die Inkubationstemperatur auf 20 °C reduziert und 0,1 mM IPTG zur Induktion der Expression zugefügt. Für die weiteren Prozessschritte wurde nur das Zellpellet gesammelt. Die folgende Abbildung zeigt Ss(N)CA und MtaCA mit unterschiedlichen Zeitpunkten. Im Laufe der Zeit hatte sich die Intensität der Expression erhöht und im Zuge dessen wurde sowohl für Ss(N)CA, als auch für Mta(CA) eine Inkubationszeit von 22 h festgelegt.



Auf große Fermentationseinheiten mittels Infors II Reaktorsystem wurde verzichtet, da es ein erheblicher Mehraufwand bedeutet und nicht immer zum gewünschten Ergebnis führte. Auf Grund dessen wurden für Ss(N)CA und MtaCA nur Schüttelkolben zur Exprimierung verwendet.

Aufreinigung

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Carboanhydrasen mittels Proteinaufreinigungssystem ÄKTA und dem bereitgestellten Strep-tag aufgereinigt. Grundlage für das Strep-tag System ist die Bindung von Biotin an Streptavidin. Wenn das getagte Enzym in das System geladen wird, bindet es an die mit Streptavidin beschichtete Säule. Da Biotin eine höhere Affinität besitzt, löst es so das Enzym und bindet an die Säule. Das Enzym wird eluiert und kann zur weiteren Aufkonzentrierung genutzt werden.

Tabelle 9: Konzentration der gereinigten Enzyme

	Ss(N)CA	MtaCA
Gereinigte Enzymkonzentration [mg/mL]	0.33	3
Gereinigtes Enzymvolumen [mL]	3.5	6.8

Charakterisierung

Eine größere Hürde bezüglich Carboanhydrase ist die Bestimmung der Hydratase-Aktivität. Daher wurden die bisherigen Assays weiter modifiziert und adaptiert, um zum einen die Aktivität schneller und reproduzierbarer und zum anderen bei deutlich höheren Temperaturen messen zu können. Durch die automatische Aufzeichnung der Daten von Temperatur und pH-Wert können vergleichbarere Aussagen getroffen werden.

Eigener etablierter Hydratase-Aktivitätstest

Die enzymatische Aktivität der Carboanhydrase wird durch eine Modifikation der Wilbur-Anderson-Methode bestimmt (WILBUR & ANDERSON, 1948).

Die Aktivität wird durch die Messung der pH-Wert Änderung über die Zeit bestimmt. Der entwickelte Assay wird bei 25 °C durchgeführt, als Puffer wurde 0,1 M Tris-SO₄ Puffer mit 0,02 % Bromthymolblau verwendet, die Begasung mit CO₂ (0,5 mL/min) fand über eine Nadel statt. Dabei wird der pH-Abfall aufgezeichnet. Je schneller dieser fällt bzw. die Kurve sich wieder stabilisiert (pH 6,3 ± 0,1) und nach links verschiebt, desto höher ist die Hydratase Aktivität. Das Endvolumen der Lösung in der gemessen wird beträgt 40 mL, die aufgereinigten und aufkonzentrierten Carboanhydrasen wurden zugesetzt. Auf Grundlage dieser Methode wurden die folgenden Messungen durchgeführt.

Lagerstabilität

Um die Lagerstabilität von AwCA zu bestimmen, wurden drei Temperaturen gewählt: 22 °C, 4 °C und -20 °C. Die Aktivität wurde nach 1, 7, 14, 21 und 28 Tagen gemessen. Die Ergebnisse zeigten nach 28 Tagen noch eine hohe Aktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zu einem späteren Zeitpunkt ein Langzeitversuch gestartet.

Thermostabilität

Für die Messung der Thermostabilität wurde AwCA bei 40 °C, 50 °C und 60 °C für bis zu 48 Stunden inkubiert und im Anschluss die Aktivität bestimmt. Des Weiteren wurden Versuche bei 80 °C/90 °C durchgeführt, bei diesen hohen Temperaturen konnte nach 15 min keine Aktivität mehr festgestellt werden. Nichtsdestotrotz lassen sich thermophile Eigenschaften erkennen.

Tabelle 10: Überblick der bisherigen Messungen

Versuch	Ergebnis
Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen von AwCA	Sehr gute Aktivität, auch nach mehrmaligem (6x) auftauen. AwCA verliert kaum an Aktivität
Unterschiedliche Messtemperaturen	Beste Messtemperatur bei 25 °C
Verhalten von gelöstem CO ₂ nach Beenden der Begasung, mit und ohne AwCA	Carboanhydrase kann CO ₂ nicht in Lösung halten
Aktivität von AwCA mit und ohne Bromthymolblau im Puffer (hat Bromthymolblau einen Einfluss auf die Aktivität von AwCA)	Bessere Aktivität ohne Bromthymolblau→keine Indikatorzugabe mehr beim Puffer

Die Methode und das Set-up wurden ständig verbessert und vereinfacht, um einen möglichst einfachen, schnellen und reproduzierbaren Assay zu erhalten. Deshalb wurde zum einen dem Puffer kein Bromthymolblau mehr zugegeben und zum anderen wurde anstelle der Nadel eine Fritte zur Begasung verwendet. Dadurch konnte der CO₂ Eintrag deutlich

verbessert werden und es kam zu einer natürlichen Durchmischung der Lösung und somit konnte der Magnetrührer entfernt werden. Die folgenden Versuche wurden mit der Fritte durchgeführt.

Lagerstabilität

Wie schon erwähnt wurde ein Langzeitversuch zur Lagerstabilität durchgeführt. AwCA wurde über sechs Monate bei 4 °C und 22 °C inkubiert. Die Kurve ist im folgenden Graph deutlich nach links verschoben, was auf eine hohe Aktivität schließen lässt. Darüber hinaus hat AwCA über Monate kaum an Aktivität verloren, was es zu einer überaus interessanten Carboanhydrase macht, aufgrund der Stabilität über einen derart langen Zeitraum.

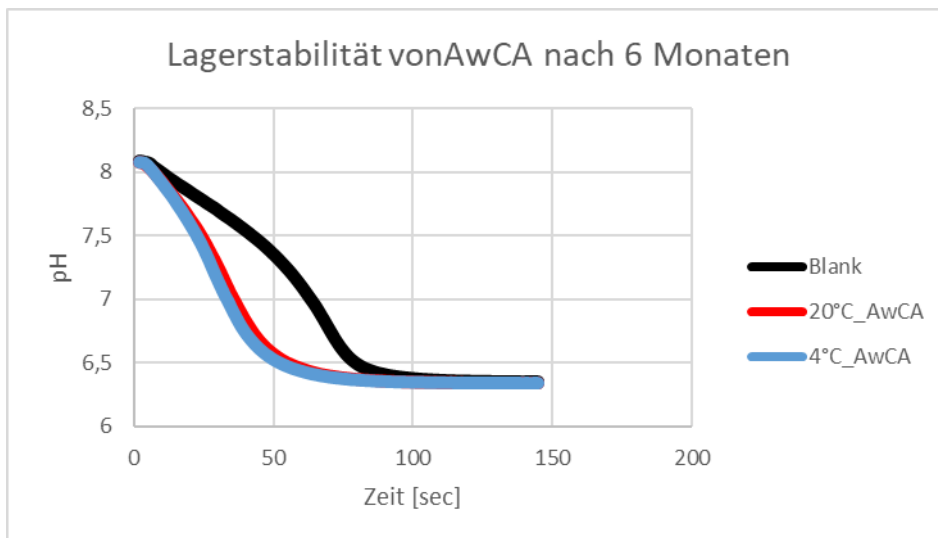


Abbildung 20: Aktivitätsmessung der carbonischen Anhydrase

Reproduzierbarkeit der Messungen

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, war es von großer Bedeutung, dass die entwickelte Methode reproduzierbare Ergebnisse liefert. Hierfür wurden die gleichen Versuche über mehrere Wochen immer wieder durchgeführt und miteinander verglichen. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich sagen, die Methode liefert reproduzierbare Ergebnisse, die sich miteinander vergleichen lassen.

Hydratasen im Vergleich

Die bisherigen Versuche wurden überwiegend nur mit AwCA durchgeführt. Um auch über PmCA und MtaCA Aussagen treffen zu können, wurden AwCA, PmCA und MtaCA an mehreren Tagen nacheinander gemessen und wieder eingefroren. PmCA verhält sich ähnlich wie AwCA, hohe Aktivität und mehrmaliges einfrieren und auftauen hatte kaum Einfluss auf die Aktivität. MtaCA hingegen zeigte eine deutlich geringere Aktivität als die beiden anderen Carboanhydrasen und nach mehrfachem auftauen zeigte sich keine Aktivität mehr. Ein möglicher Grund für die geringe Aktivität von MtaCA könnte die niedrige Messtemperatur sein, da *M. thermoautotrophicum* thermophile Eigenschaften besitzt.

Durchflussregler – MFC

Um die Methode noch weiter zu verbessern und die Begasung weiter zu stabilisieren wurde ein Durchflussregler „Mass-Flow-Controller“ installiert. Erste Versuche zeigten vielversprechende Ergebnisse. Die Messungen zeigten weniger Schwankungen aufgrund eines konstanteren Flows. Der Einsatz des MFC standardisiert die Methode weiter.

Arbeitspaket 3 - Mikrobiologische Prozesse – Homoacetogenese

Screening und Adaption auf H₂/CO₂

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse des Screenings und der Adaption auf H₂/CO₂ der neun ausgewählten homoacetogenen Clostridien-Stämme. Erfolgreich auf Substratgas adaptiert wurden *Acetobacterium woodii*, *Moorella thermoacetica* und *Sporomusa ovata*. Aufgrund der ähnlichen Wachstumsbedingungen (pH 7, 30°C) wurden *A. woodii* und *S. ovata* für die folgenden Experimente ausgewählt, da somit beide Stämme direkt miteinander verglichen werden konnten. *A. woodii* ist ein sehr gut untersuchter Clostridien Stamm. Über *S. ovata* existieren hauptsächlich Studien, die sich mit mikrobieller Elektrosynthese beschäftigen. Die Studien über *S. ovata* weisen noch Lücken auf, zum Beispiel wenn es um die Frage geht welche Kationen der Stamm zum Aufbau des chemiosmotischen Gradienten zur ATP-Generierung verwendet.

Tabelle 11: Übersicht über die Adaption auf H₂/CO₂ von den ausgewählten homoacetogenen Clostridien-Stämmen

Mikroorganismus	Anfangs-Kohlenstoffquelle*	Max. Acetat-Ausbeute mit H₂/CO₂ im Batch [g/L]**	Kryokultur?	Adaptionserfolg?
<i>Acetobacterium woodii</i> ¹⁻⁶	Fructose	3,9	Nein, lässt sich nicht auftauen	Ja; Adaptiert auf H ₂ /CO ₂
<i>Alkalibaculum bacchi</i> ^{12,13}	Glukose	-	Nein, wegen Kontamination	Nein; Kontamination
<i>Blautia producta</i> ¹⁶	Glukose	-	Ja	Adaptierung im Gange, bisher kein Gasverbrauch
<i>Clostridium autoethanogenum</i> ⁸⁻¹¹	Glukose	-	Ja	Adaptierung im Gange, bisher minimaler Gasverbrauch
<i>Fuchsiella alkaliacetigena</i> ¹⁴	Ethanol	-	Nein, ist nicht angewachsen	Wächst sehr langsam, keine Acetatproduktion
<i>Moorella</i>	Glukose	1,5***	Ja	Ja; Adaptiert auf H ₂ /CO ₂

*thermoacetica*⁶

<i>Sporomusa ovata</i> ¹⁵	Betain	1,7	Ja	Ja; Adaptiert auf H ₂ /CO ₂
<i>Terrisporobacter mayombei</i> ¹⁵	Trypton	-	Ja	Nein, verwendet kein H ₂ /CO ₂
<i>Thermoanaerobacter kivui</i> ⁷	Glukose	-	Nein	Nein; Gehemmt durch H ₂ /CO ₂ ?

*Zusätzlich wurden unterschiedliche Mengen von komplexen Medienbestandteilen zugesetzt

**Zusätzlich wurden 0,5 g/L Hefeextrakt zugesetzt

***bei 60°C mit 0,25 g/L Hefeextrakt

In drei CSTR Batch Fermentationen wurden die Acetatproduktionen von *S. ovata* (2x) und *Terrisporobacter mayombei* (1x) bei kontrollierten Bedingungen (30°C, pH 7) und konstanter Gaszugabe (70 mL/min, Tag 1-7 H₂/CO₂ (80/20), Tag 7-19 H₂/CO₂/N₂ (40/10/50)) ermittelt. Die Hefeextrakt-Konzentration war in allen drei Fermentationen bei 0,5 g/L. *S. ovata* setzte erfolgreich das Substratgas zu Acetat um. In den ersten acht Tagen stieg die OD600 kontinuierlich an und verblieb danach auf einem Plateau von ca. 1,3. Nach 19 Tagen wurde eine maximale Acetatkonzentration von 21,93 ± 0,17 g/L erreicht, wobei die Kurve noch im Steigen war (siehe Abbildung 21). Bei längerer Fermentationsdauer kann womöglich eine höhere maximale Acetatkonzentration erwartet werden. Die volumetrische Produktivität erreichte ihr Maximum an Tag 5 mit 2,08 ± 0,06 g/L pro Tag und sank kontinuierlich bis zum Ende der Fermentation auf 1,14 ± 0,01 g/L pro Tag. *T. mayombei* zeigte nach anfänglichem Wachstum bis zur maximalen OD600 0,3 an Tag 4 kein weiteres Wachstum. Die Acetatproduktion flachte nach Tag 6 stark ab und die Acetatkonzentration am Ende der Fermentation betrug 4,56 g/L. Die volumetrische Produktivität war an Tag 5 am höchsten (0,60 g/L pro Tag) und nahm anschließend ab bis zu einem Wert von 0,24 g/L pro Tag am Ende der Fermentation. Aus dem Vergleich der Fermentationen in Abbildung 21 wird ersichtlich, dass *S. ovata* sich erfolgreich auf H₂/CO₂ adaptierte, während *T. mayombei* das Substratgas so gut wie nicht verstoffwechselte. Die anfängliche Acetatproduktion von *T. mayombei* wird auf die Zugabe von 0,5 g/L Hefeextrakt zurückgeführt.

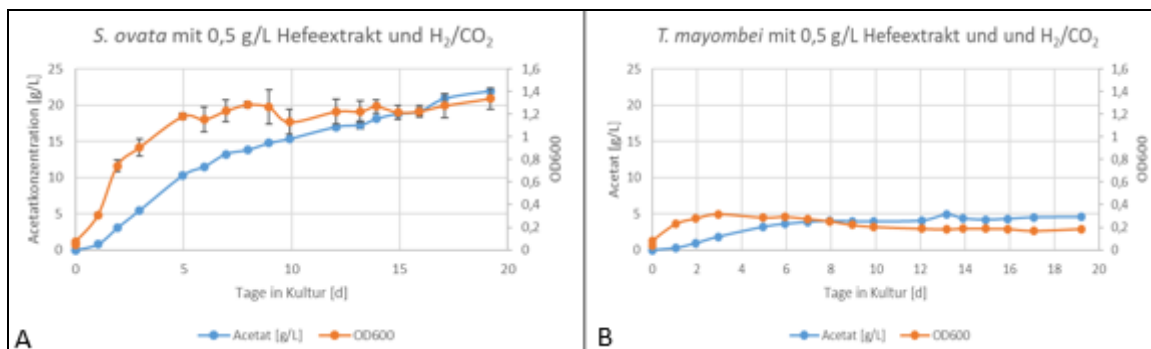


Abbildung 21: Verlauf der Acetatkonzentrationen (blau) und OD600 (orange) in CSTR Batch Fermentationen von *S. ovata* (A: Mittelwerte aus zwei Fermentationen) und *T. mayombei* (B) mit

0,5 g/L Hefeextrakt Zugabe am Anfang der Fermentation und konstanter H₂/CO₂ Begasung (70 mL/min)

4.6.4 Zugabe von Carboanhydrase zur Acetogenese

Wie in Arbeitspaket 2 beschrieben, katalysiert das Enzym Carboanhydrase (CA) die Reaktion von CO₂ zu Hydrogencarbonat und zurück, je nachdem welcher der beiden Stoffe im Überschuss vorliegt. Der Einfluss der Zugabe von verschiedenen CA-Konzentrationen auf die Acetatproduktion von *A. woodii* und *S. ovata* wurde untersucht. Die Hefeextraktzugabe betrug in allen Experimenten 0,5 g/L, um die Lag-Phase zu verkürzen. Die verwendete CA stammte von *A. woodii* und wurde in AP2 exprimiert und untersucht. In zwei Experimenten wurden einmal *A. woodii* und danach *S. ovata* mit dem Substratgas H₂/CO₂/N₂ (40/10/50) (1,5 bar Überdruck) mit CA-Konzentrationen von 0 mg/mL, 0,015 mg/mL, 0,03 mg/mL und 0,06 mg/mL versetzt. Beide Stämme zeigten eine signifikante Hemmung der Acetatproduktion mit steigender Enzymkonzentration. *A. woodii* produzierte ohne Enzym 1,49 ± 0,1 g Acetat/L und mit 0,06 g CA/mL 1,29 ± 0,02 g Acetat/L. *S. ovata* produzierte ohne Enzym 1,68 ± 0,02 g Acetat/L und mit 0,06 g CA/mL 1,58 ± 0,01 g Acetat/L. In einem dritten Experiment wurde *A. woodii* mit NaHCO₃ statt CO₂ Zugabe untersucht. Auch hier diente H₂ als Elektronendonator. Das 100% H₂ Gas wurde mit einem Überdruck von 1 bar angelegt, um die geringe Löslichkeit von H₂ in Wasser zu verbessern. HCO₃⁻ wurde im Überschuss bereitgestellt, um eine Substratlimitierung auszuschließen. Die Acetat-Ausbeute war in allen Ansätzen mit HCO₃⁻ als Kohlenstoffquelle deutlich geringer als mit CO₂. Das deutet darauf hin, dass die Mikroorganismen gelöstes CO₂ besser aufnehmen als HCO₃⁻. Auch hier wurde die Acetatproduktion mit steigender Enzymkonzentration signifikant gehemmt (0,82 ± 0,01 g Acetat/L ohne CA und 0,69 ± 0,03 g Acetat/L mit 0,1 mg CA/mL). Der Unterschied war in diesem Experiment deutlicher sichtbar, da höhere Enzymkonzentrationen (0,05 und 0,1 mg CA/mL) verwendet wurden. In allen drei Experimenten wirkte sich die Zugabe von CA negativ auf die Acetatproduktion aus. Das weist daraufhin, dass die CA eine Konkurrenz für die Mikroorganismen um CO₂ bzw. HCO₃⁻ darstellt. Höchstwahrscheinlich bindet die CA einen Anteil an CO₂ bzw. HCO₃⁻, der dann unzugänglich für die Clostridien ist. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Experimente mit Mischkultur und 0,025 mg CA/mL durchgeführt. Im ersten Experiment wurde mit H₂/CO₂/N₂ (40/10/50) begast (1,5 bar Überdruck). Im zweiten Experiment wurde mit 100% H₂ (2,5 bar Überdruck) und das CO₂ durch NaHCO₃ ersetzt. Die Experimente fanden zeitgleich statt und wurden mit der gleichen Mischkultur inokuliert. Das Medium enthielt in beiden Experimenten 0,25 g/L Hefeextrakt und mindestens 3 g/L NaHCO₃. Die maximalen Acetatkonzentrationen sind in Tabelle 12 aufgeführt. In beiden Experimenten hatte das Enzym CA weder positive noch signifikant negative Auswirkungen auf die Acetatproduktion. In den Ansätzen mit NaHCO₃ und H₂ wurde eine höhere Acetatkonzentration erreicht, was auf den höheren Druck und damit die erhöhte Lösung von H₂ zurückgeführt wird.

Tabelle 12. Überblick der maximalen Acetatkonzentrationen in Mischkulturexperimenten mit CA

Max. Acetatkonzentration [g/L]

Experiment 1	Inokulum + H ₂ /CO ₂	1,76 ± 0,16
	Inokulum + CA + H ₂ /CO ₂	1,51 ± 0,20
	CA + H ₂ /CO ₂	0,24 ± 0,05
	Inokulum + CA + N ₂	0,56 ± 0,01
Experiment 2	Inokulum + H ₂ + NaHCO ₃	2,84 ± 0,09
	Inokulum + CA + H ₂ + NaHCO ₃	2,70 ± 0,09
	CA + H ₂ + NaHCO ₃	0,04 ± 0,01
	CA + N ₂	0,65 ± 0,02

Da in den Reinkulturexperimenten höhere Enzymkonzentrationen verwendet wurden und diese zu einer verringerten Acetatproduktion geführt haben, wird davon ausgegangen, dass auch in Mischkulturexperimenten die Acetatproduktion durch höhere Enzymkonzentrationen gehemmt werden würde.

Medienoptimierung für *A. woodii* und *S. ovata*

Im Folgenden ist eine Auswahl an Ergebnisse dargestellt. Alle Experimente fanden im Batch in 30 mL Ansätzen statt.

Acetobacterium woodii

pH-Test:

Im pH-Test wurde *A. woodii* bei drei verschiedenen Anfangs-pH-Werten (7, 8, 9) und mit jeweils zwei unterschiedlichen Begasungen (H₂/CO₂/N₂ (40/10/50) oder 100% H₂) untersucht. Alle Ansätze enthielten 3 g/L NaHCO₃. Für die Versuche mit H₂/CO₂/N₂ (40/10/50) lieferte das Medium mit Start-pH 9,5 die besten Ergebnisse. Das ist darauf zurückzuführen, dass der pH-Wert bei gleicher Acetatproduktion langsamer bis zum Inhibierungs-pH-Wert sank. Die Versuche mit H₂ lieferten 7x weniger Acetat, da der pH-Wert schnell anstieg, was auf die Freisetzung von OH⁻ bei der Umwandlung von NaHCO₃ zu Acetat zurückgeführt wird.

NaHCO₃ vs. NaCl als Na⁺-Quelle:

A. woodii benötigt indirekt Na⁺-Ionen für die Energiegewinnung über den Aufbau eines chemiosmotischen Gradienten. Für kommende Experimente in denen der Einfluss von HCO₃⁻ evaluiert werden soll, wurde die alternative Na⁺-Quelle NaCl getestet. Alle Ansätze wurden mit H₂/CO₂/N₂ (40/10/50) begast. Die Versuche mit NaCl an Stelle von NaHCO₃ lieferten weitaus schlechtere Ergebnisse, da der pH-Wert innerhalb kürzester Zeit auf unter 6 absank und *A. woodii* inhibierte. NaHCO₃ hat gemeinsam mit CO₂ eine Pufferwirkung, die in den Ansätzen mit NaCl fehlte. In einem weiteren Experiment wurde NaCl als Na⁺-Quelle mit einer höheren Kaliumphosphatpuffer-Konzentration (10mM) getestet. Diese lieferte weitaus bessere Ergebnisse.

Verschiedene NaCl-Konzentrationen:

Um den Einfluss der Salzkonzentration auf *A. woodii* zu evaluieren wurden dem ursprünglichen Medium mit 3 g/L NaHCO₃ verschiedene Mengen an NaCl beigegeben (0,

20, 50, 100 mM). Begast wurde mit H₂/CO₂/N₂ (40/10/50). Bei steigender Zugabe von NaCl wurde etwas weniger Acetat produziert. Es handelt sich bei der Zugabe von 100 mM NaCl um einen Verlust von ca. 0,1 g Acetat/L bei ca. 2,6 g Acetat/L mit 0 mM Zugabe von NaCl.

Sporomusa ovata

NaHCO₃ vs NaCl als Na⁺-Quelle:

Der Aufbau und die Ergebnisse waren ähnlich zu den Versuchen mit *A. woodii* (s.o.).

Evaluierung der Abhängigkeit von Na⁺-Ionen:

In dem Basis-Medium des Experiments wurden alle Na⁺-Quellen auf unter 0,1 mM reduziert. Anschließend wurden unterschiedliche Mengen an Na⁺ hinzugefügt (0, 9, 38, 47 mM). Die erreichten Acetatkonzentrationen in allen Ansätzen wiesen signifikant keine Unterschiede auf, was auf eine Na⁺-Unabhängigkeit von *S. ovata* schließen lässt. Zum Vergleich: in der Literatur wird aufgeführt, dass *A. woodii* ab Na⁺-Konzentrationen von 6,5 mM abwärts limitiert wird (Heise et al., 1989).

Mikrobiologische Prozesse/Prozesskinetiken

4.7 Homoacetogenese

4.7.1 Auswahl

Um herauszufinden, welche Mikroorganismen die Herstellung von Acetat aus Hydrogencarbonat versprechen, wurden Homoacetogene anhand der Literatur ausgewählt und im Folgenden nach der Acetatproduktion aus H₂/CO₂ gescreent (Tabelle 13).

Tabelle 13. Ausgewählte 9 Homoacetogene.

(Reference: 1. Balch *et al.*, 1997; 2. Genthner and Bryant, 1982; 3. Bache and Pfennig, 1981; 4. Schink and Stieb, 1983; 5. Cheng *et al.*, 2018; 6. Steger *et al.*, 2017; 7. Weghoff and Müller, 2016; 8. Takemori *et al.*, 2018; 9. Xu *et al.*, 2017; 10. Abubackar *et al.*, 2016b; 11. Abubackar *et al.*, 2016a; 12. Bengelsdorf *et al.*, 2018; 13. Allen *et al.*, 2010; 14. Zavarzin *et al.*, 2011; 15. Groher and Weuster-Botz, 2016; 16. Lorowitz and Bryant, 1984)

Mikroorganismus	Strain	Substrat	Temperature [°C]	pH	Acetat- konzentration [g/L]	Bemerkung
<i>Acetobacterium woodii</i> ¹⁻⁶	DSM 1030	CO ₂ , H ₂	30	7.6	59	Na ⁺ -abhängige ATPase, die ATP produziert
<i>Moorella thermoacetica</i> ⁶	DSM 2955	CO ₂ , H ₂ , CO	55	6.9	-	Moderater Thermophil, unabhängig von Na ⁺ -Ionen im Medium
<i>Thermoanaerobacter kivui</i> ⁷	DSM 2030	CO ₂ , H ₂ , CO	66	6.4	-	Thermophil, unabhängig von Na ⁺ -Ionen im Medium
<i>Clostridium autoethanogenum</i> ⁸⁻¹¹	DSM 10061	CO ₂ , H ₂ , CO	37	5.8-6	-	ABE Fermentation
<i>Alkalibaculum bacchi</i> ^{12,13}	DSM 22112	CO ₂ , H ₂ , CO	37	8	-	
<i>Fuchsiella alkaliacetigene</i> ¹⁴	DSM 24880	CO ₂ , H ₂	35	9.2	11.8	Benötigt hohe Salzkonzentration 90 g/L NaHCO ₃ , 70 g/L NaCl
<i>Sporomusa ovata</i> ¹⁵	DSM 2662	CO ₂ , H ₂	30	7	18	
<i>Blautia producta</i> ¹⁶	DSM 2950	CO ₂ , H ₂	35-39	8	3.2	

*Terrisporobacter mayombe*¹⁵

DSM 6539

CO₂, H₂

30

7

12

Erhöhte Rührgeschwindigkeiten >>
Formiatproduktion, keine
Acetatproduktion

4.7.2 Screening

Die von DSMZ erhaltenen Stämme wurden zuerst auf einem Medium für heterotrophes Wachstum angesetzt. Die Substrate waren hierbei flüssig (Glucose, Fructose oder Ethanol). In mehreren Adaptionsschritten wurden die flüssigen Substrate reduziert und gleichzeitig mit Substratgas (10%CO₂/40%H₂/50%N₂) begast. Das Ziel war autotrophes Wachstum und Acetatproduktion allein mit CO₂ als Kohlenstoffquelle. Am Ende der Adaptionsversuche sollen zwei Stämme mit der höchsten Acetatproduktion ausgewählt und in Kombination mit der Carboanhydrase getestet werden. Bis jetzt wurde *M. thermoacetica* erfolgreich auf die Gase adaptiert. *Thermoanaerobacter kivui* und *A. woodii* befinden sich in der Adaption und sind vielversprechend. *Fuchsiella alkaliacetigena* und *A. bacchi* zeigten keine Acetatproduktion bzw. waren kontaminiert. Die restlichen Stämme werden in naher Zukunft gescreent.

Alle Stämme wurden in Zweifach- oder Dreifachansätzen in 100 ml Anaerobflaschen und einem Arbeitsvolumen von 40 ml kultiviert. Das Handling der Flaschen erfolgte nach der Hungate Technik. Eine anaerobe Atmosphäre wurde mit N₂ oder Substratgas (10% CO₂/40% H₂/50%N₂) hergestellt. Die Bakterien werden als Reinkulturen geführt und steril behandelt. Proben wurden alle ein bis sieben Tage gezogen je nach Wachstumsrate der Bakterien. Von jeder Probenahme wurden die OD₆₀₀ sowie die Acetatkonzentration, die Konzentration von flüssigen Substraten (Glucose, Fructose, Ethanol) und Nebenprodukten bestimmt. Der Konsum des Substratgases wurde durch Messung des Druckabfalls bestimmt. Das Substratgas wurde mit einem Überdruck von einem Bar gefüttert. An einigen Probenahme-Zeitpunkten wurden Mikroskopie-Bilder erstellt um Kontaminationen auszuschließen und den Phenotyp der Zellen zu bestimmen. Außerdem wurde an einigen Probenahmen der pH gemessen, um zu bestimmen ab welchem pH eine Produktinhibierung durch das Acetat eintritt. Kryokulturen wurden mit 35 % Glycerol versetzt und zu je 2 mL Aliquoten bei – 80 °C eingefroren. Im Moment gibt es Kryokulturen von *M. thermoacetica* und *T. kivui*. Die *A. bacchi* Kultur wurde ebenfalls kryokonserviert, jedoch stellte sich heraus, dass die Kultur mit *Bacillus subtilis* kontaminiert wurde.

4.7.2.1 *Thermoanaerobacter kivui*

Thermoanaerobacter kivui wurde von DSMZ als Lebendkultur bestellt und in einer chemisch definierten Medium-Basis mit variierenden Glucose- und Hefeextrakt-Konzentrationen für das heterotrophe Wachstum kultiviert. Die Inkubationsbedingungen waren 60 °C und 150 rpm. Zuerst wurden die Zellen mit 4., g/L Glucose und 2 g/L Hefeextrakt angesetzt. Während der Adaption auf CO₂/H₂ wurden die Flüssigsubstrat-Konzentrationen zuerst reduziert auf 2.25 g/l Glucose and 1 g/l Hefeextrakt und dann weiter auf 1,125 g/l Glucose und 0,5 g/l Hefeextrakt. Während diesen Reduzierungen wurde mit 10% CO₂/40% H₂/50% N₂ begast.

Bevor mit der Adaption gestartet wurde, wurde eine Kryokultur von *T. kivui* angelegt, die auf 4,5 g/L Glucose und 2 g/L Hefeextrakt wuchs. Diese konnte erfolgreich wieder aufgetaut werden und dient als Arbeitszellbank für folgende Experimente.

Abbildung 22 zeigt, dass die Zellen nach einer Lag-Phase von einem Tag in die exponentielle Wachstumsphase übergangen und am dritten Tag eine maximale OD₆₀₀ von ca. 0,8 erreichten. Die maximal produzierte Acetatkonzentration waren ca. 2 g/L, wobei von der Glucose nicht ganz 2,5 g/L verbraucht wurden. Für folgende Ansätze kann eine geringere Glucose-Konzentration (2,5 g/L) am

Anfang gewählt werden. Der pH-Wert am Ende des Experiments betrug 4,7. Dann war der pH-Wert für die Zellen zu niedrig, um weiter wachsen zu können.

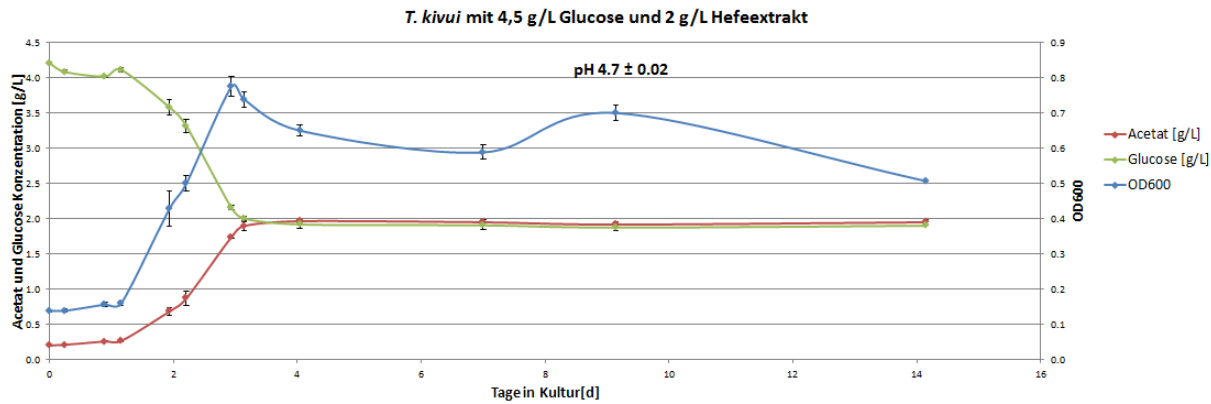


Abbildung 22: Thermoanaerobacter kivui auf 4,5 g/l Glucose und 2 g/l Hefeextrakt (rot: Acetat, grün: Glucose, blau: OD₆₀₀).

Als die maximale OD₆₀₀ erreicht war, wurde *T. kivui* auf 2.25 g/L Glukose und 1 g/L Hefeextrakt passagiert (siehe Abbildung 23). Die Kultur wurde zusätzlich mit 10% CO₂/40% H₂/50% N₂ begast, um die Bakterien an das Substratgas zu gewöhnen. Die Zellen brauchten dann länger (7 Tage), um auf die maximale OD₆₀₀ von 0,4 anzuwachsen. Die maximal produzierte Acetatkonzentration war 1 g/L. Es wurde insgesamt weniger Glucose verbraucht (1 g Glucose/L) als beim vorhergehenden Adaptionsschritt.

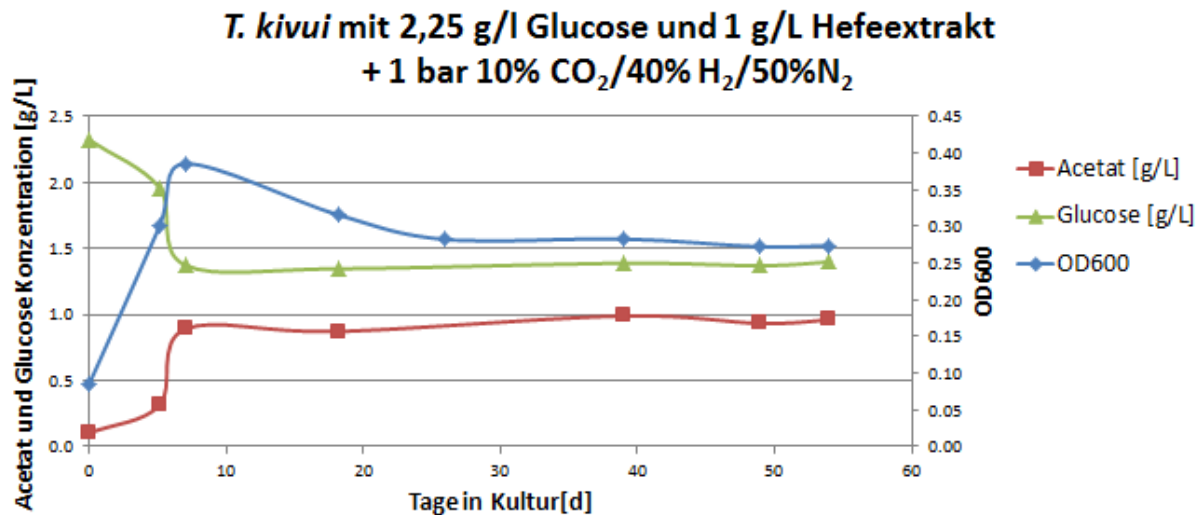


Abbildung 23: Thermoanaerobacter kivui auf 2,25 g/l Glucose und 1 g/l Hefeextrakt + 1 bar 10% CO₂/40% H₂/50%N₂ (rot: Acetat, grün: Glucose, blau: OD₆₀₀).

Im nächsten Adaptionsschritt wurde mit 1,125 g/l Glukose, 0,5 g/L Hefeextrakt und 1 bar Überdruck 10% CO₂/40% H₂/50% N₂ gefüttert. Es war kein Anstieg der OD₆₀₀ beobachtbar und nur eine sehr geringe Acetatproduktion bzw. Glukoseverbrauch (siehe Abbildung 24). Nach 42 Tagen wurden 2 g/L Hefeextrakt zugegeben, um zu überprüfen, ob das Wachstum dadurch gestartet werden kann. Ergebnisse dazu werden folgen.

T. kivui mit 1.125 g/l Glucose und 0,5 g/l Hefeextrakt + 1 bar 10% CO₂/40% H₂/50%N₂

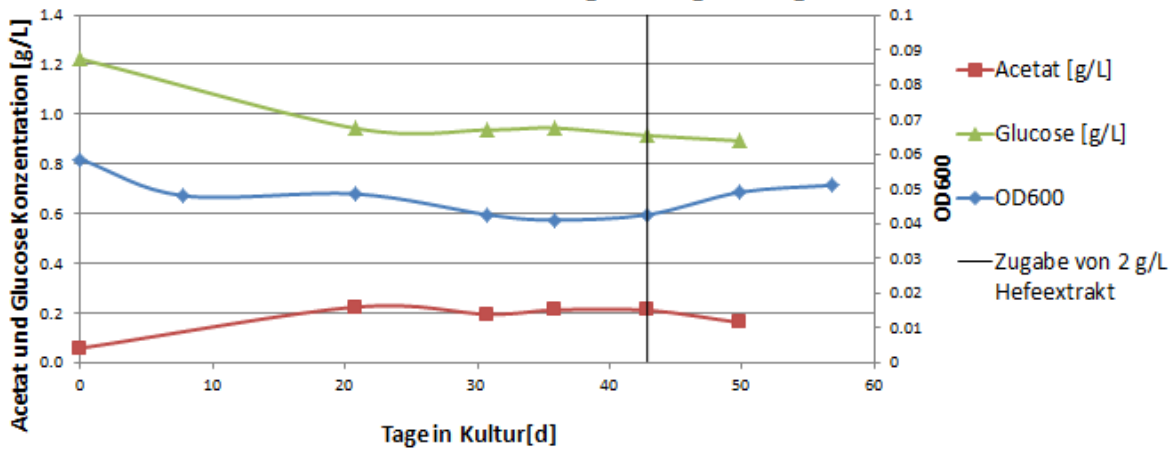


Abbildung 24: *Thermoanaerobacter kivui* auf 1,135 g/l Glucose und 0,5 g/l Hefeextrakt + 1 bar 10% CO₂/40% H₂/50%N₂ (rot: Acetat, grün: Glucose, blau: OD₆₀₀).

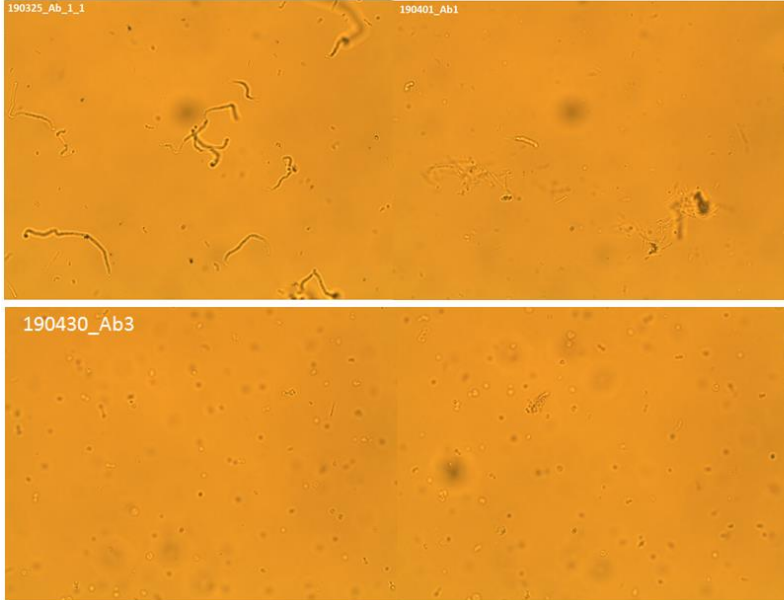
Alles in allem scheinen die Zellen mit abnehmender Glukose- und Hefeextraktkonzentration langsamer zu wachsen und Acetat zu produzieren. Die Adaption wird gerade mit einer Kultur aus der Arbeitszellbank wiederholt. Die Hefeextraktkonzentration wird dabei bei allen Adaptionsschritten auf 2 g/L gehalten, um auszuschließen, dass das Wachstum durch fehlenden Hefeextrakt gehemmt wurde. Dadurch kann besser festgestellt werden, ob das Wachstum eventuell durch die Zugabe von Substratgas (10% CO₂/40% H₂/50% N₂) gehemmt wurde.

4.7.2.2 *Alkalibaculum bacchi*

Alkalibaculum bacchi wurde von DSMZ als gefriergetrocknete Kultur bestellt. Das gefriergetrocknete Pellet wurde in einem komplexen Medium resuspendiert das 17 g/l Peptone aus Casein, 3 g/l Trypton aus Sojamehl und 2.5 g/l Glucose enthielt. Ein chemisch definiertes Medium wurde für die Adaption auf Substratgas hergestellt. Die Adaption erfolgte in mehreren Schritten wobei der Gehalt an komplexem Medium jeweils halbiert wurde und gleichzeitig mit Substratgas (10% CO₂/40% H₂/50% N₂) begast wurde. Die Kultivierungstemperatur war 35 °C und die Rührgeschwindigkeit ca. 150 rpm.

Eine Adaption von komplexem Medium auf Substratgas (10% CO₂/40% H₂/50% N₂) wurde für die *A. bacchi* Kultur durchgeführt. Vorangehend wurde eine Kryokultur angelegt. Auf dem komplexen Medium wuchsen die *A. bacchi* Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von ca 0,6. Die maximale Acetatkonzentration im Medium war jedoch gering mit 0,12 g/L. Im ersten Adaptionsschritt wurde 50 % komplexes Medium mit 50 % Minimal-Medium ohne Kohlenstoffquelle vermischt und mit 10% CO₂/40% H₂/50% N₂ auf ein Bar Überdruck begast. Die maximale OD₆₀₀ war 0,4 und die maximale Acetatkonzentration 0,27 g/L. Im nächsten Adaptionsschritt wurde nur mehr 25 % komplexes Medium zum Minimal-Medium gemischt und mit 10% CO₂/40% H₂/50% N₂ auf ein Bar Überdruck begast. Hierbei wurde eine maximale OD₆₀₀ von 0,2 und eine maximale Acetatkonzentration von 0,16 g/L erreicht. Im letzten Adaptionsschritt wurde die Kultur in reinem Minimal-Medium angesetzt und mit 10% CO₂/40% H₂/50% N₂ auf ein Bar Überdruck begast. Dann waren weder Wachstum noch Acetatproduktion beobachtbar. Mikroskopiebilder (siehe Abbildung 25) zeigten neben kurzen Stäbchen lange fadenförmige Zellen, die eine Kontamination vermuten ließen. Eine Probe der Kryokultur wurde zum Sanger Sequencing geschickt, die ergab, dass in

der Kultur eine *Bacillus subtilis* Kontamination vorlag. Dieses Ergebnis wurde dadurch unterstrichen, dass in den Kulturen eine hohe Laktatproduktion vorlag (bis zu 1,5 g/L). Das ist typisch für *B. subtilis* Zellen, die in Abwesenheit von Sauerstoff Nitrat Ammonifikation zum Wachstum benutzen (Ramos et al., 2000). Im Minimal-Medium war weder Nitrat noch eine Kohlenstoffquelle (bis auf CO₂ im Substratgas) vorhanden, was das geringere werdende Wachstum über die Adaptionsschritte hinweg erklärt.



100 % rich medium
(substrate: Glucose)

50 % rich medium + 50 %
minimal medium (substrates:
glucose + CO₂/H₂)

Abbildung 25: Mikroskopiebilder von *A. bacchi* Zellen in komplexem Medium 60 x vergrößert.

4.7.2.3 *Moorella thermoacetica*

Moorella thermoacetica wurde aus der Stammhaltung des Institut für Umweltbiotechnologie (Tulln) entnommen und auf einer chemisch definierten Medium-Basis mit über die Adaption abnehmenden Glucose- und Hefeextrakt-Konzentrationen kultiviert. Die Startkonzentrationen waren 3 g/L Glucose und 1 g/L Hefeextrakt. Diese wurde von Passage zu Passage halbiert und gleichzeitig wurde mit Substratgas (10% CO₂/40% H₂/50% N₂) begast bis die Zellen ohne Glucose und Hefeextrakt autotroph wuchsen. Die Inkubationstemperatur war anfangs 55 °C. Dann wurde sie aufgrund von einem defekten Inkubator auf 60 °C geändert, um gemeinsam mit *T. kivui* inkubieren zu können. Die Rührgeschwindigkeit betrug 150 rpm.

Moorella thermoacetica wurde aus der Kryokultur angesetzt mit 3 g/L Glucose und 1 g/L Hefeextrakt. Innerhalb von drei Adaptionsschritten wurde ein Wachstum ohne Glucose mit nur Substratgas (10% CO₂/40% H₂/50% N₂) als Kohlenstoffquelle erreicht. Wenn dem Medium noch 0,25 g/L Hefeextrakt zugesetzt wurden, kam die Acetatkonzentration auf 1,5 g/L. Ohne Hefeextrakt wurde eine Acetatkonzentration von 1 g/L erreicht. Die maximal erreichte OD₆₀₀ im autotrophen Wachstum war 0,2. *Moorella thermoacetica* ist derzeit erfolgreich auf Substratgas (10% CO₂/40% H₂/50% N₂) adaptiert und steht für weitere Experimente mit der Carboanhydrase bereit. Für folgende Experimente wird mit einer Hefeextrakt-Konzentration von 2 g/L gearbeitet werden, um Wachstum und Acetatproduktion zu fördern. Die Inkubationstemperatur für die Medienadaption war 60 °C, da *M. thermoacetica* wegen einem defekten Inkubator gemeinsam mit *T. kivui* inkubiert werden musste. Jetzt ist der Inkubator wieder funktionstüchtig und es wird getestet, ob die *M. thermoacetica* Zellen bei dem in der Literatur

beschriebenen Temperaturoptimum (siehe Tabelle 6) von 55 °C besser wachsen und Acetat produzieren.

4.7.2.4 *Fuchsiella alkaliacetigena*

Die Medium-Basis für *Fuchsiella alkaliacetigena* wurde chemisch definiert hergestellt mit hohen Salzkonzentrationen (60 g/L NaCl und 38 g/L NaHCO₃). Die von DSMZ erhaltene Lebkultur wurde anfangs mit 5 mL/L 96 % Ethanol als Substrat versetzt. Die Adaption auf Substratgas (10% CO₂/40% H₂/50% N₂) erfolgte in nur zwei Schritten (2,5 mL/L Ethanol, 0 mL/L Ethanol) in denen Substratgas zugeführt wurde. Die Kultivierungsbedingungen waren 35 °C und 150 rpm.

Für *F. alkaliacetigena* konnte bisher noch keine Acetatproduktion festgestellt. Neben Ethanol und Substratgas (10% CO₂/40% H₂/50% N₂) wurden auch Glucose und Fructose als Substrate getestet. Wenn nur Ethanol gefüttert wurde, war ein geringer Substratverbrauch feststellbar. Das Wachstum war langsam. Die OD₆₀₀ stieg innerhalb von zwei Wochen von 0,1 auf 0,17 an. Wenn Ethanol zusammen mit Substratgas gefüttert wurde, war der Ethanol-Verbrauch nicht eindeutig feststellbar, da die Werte in der HPLC stark schwankten. Ein geringes Wachstum war feststellbar. Innerhalb von einem Monat stieg die OD₆₀₀ von 0,1 auf 0,14 an. In den Ansätzen mit Glukose, sank die Substratkonzentration langsam ab. Jedoch war ein nur sehr langsames Wachstum beobachtbar. Die OD₆₀₀ stieg innerhalb von vier Wochen von 0,05 auf 0,08. Auch bei den Ansätzen mit Fructose war ein Substratverbrauch sichtbar. Die Zellen wuchsen etwas schneller als mit Glucose innerhalb von zwei Wochen von einer OD₆₀₀ von 0,05 auf 0,1 an. Bis jetzt konnten noch keine Haupt- und Nebenprodukte festgestellt werden. Die Zellen scheinen auch keine Gase zu produzieren, da der Druck in den Fläschchen nicht zunimmt. Die Ansätze werden derzeit weiter beobachtet und es wird untersucht, welches Hauptprodukt die Zellen bilden.

4.7.2.5 *Acetobacterium woodii*

Acetobacterium woodii wurde als gefriergetrocknete Kultur von DSMZ erhalten. Die Medien-Basis enthielt 2 g/l Hefeextrakt war jedoch ansonsten chemisch definiert. Zum Anwachsen des gefriergetrockneten Pellets wurden 10 g/L Fructose beigegeben. Die Kultivierungsbedingungen waren 30 °C bei 130 rpm.

Acetobacterium woodii wurde zu Anfang mit 10 g/L Fructose und 2 g/L Hefeextrakt ohne Substratgas angesetzt. Die Zellen wuchsen innerhalb von vier Tagen auf eine OD₆₀₀ von 0,6 an und produzierten dabei ca. 3 g/L Acetat. Im Moment läuft die Adaption auf Substratgas (10% CO₂/40% H₂/50% N₂).

Task 3.1 Homoacetogenese

Umsatzraten für Mischkonsortien bestimmt; DoE zur Optimierung der Medienkomponenten; Evaluierung alternativer C-Quellen (CO₂/H₂, Syngas); Aufbau kontinuierliche Homoacetogenese gestartet;

Um wichtige Parameter für die Essigsäureproduktion mittels Homoacetogenese zu erschließen wurde eine Medienoptimierung im Labormaßstab angesetzt. Mit statistischer Versuchsplanung (Design of Experiment, DoE) wurde eine Medienoptimierung zur Produktivitätssteigerung für Essigsäure durchgeführt. Hierzu wurde ein teilfaktorieller Versuchsplan mit 4 Faktoren (2⁴⁻¹) und 3 Zentralpunkten (Z) erstellt. Die Faktoren waren pH, Ammonium-, Hefeextrakt- und BES-Konzentration als Methanogenesehemmer. Die Zielgrößen des Versuchsplans waren Essigsäurekonzentration im Medium und verbrauchte Substratmenge.

Tabelle 14: Versuchsplan für DoE 1 & 2. Ansatz Z stellt den Zentralpunkt dar, Minimalkonzentrationen sind hell hinterlegt, Maximalkonzentrationen sind dunkel hinterlegt

Medien-bezeichnung	pH	Ammonium [mM]	Hefeextrakt [g L ⁻¹]	BES [mM]
A	4	10	0	0
B	4	10	2	30
C	4	100	0	30
D	4	100	2	0
E	6,8	10	0	30
F	6,8	10	2	0
G	6,8	100	0	0
H	6,8	100	2	30
Z	5,4	55	1	15

Die Versuche wurden in Serumflaschen durchgeführt, wobei das Gesamt-Flüssigkeitsvolumen 50 mL betrug. Es wurde mit 10% (v/v) inokuliert. Die verschlossenen Serumflaschen wurden mit einer Gasmischung aus H₂ und CO₂ im Verhältnis 80:20 gespült und auf etwa 1500 mbar Überdruck begast. Die Flaschen wurden in einem Schüttelinkubator bei 30°C und 100 rpm kultiviert.

DoE 1: Design of Experiment 1 - Auswirkung diverser Einflussparameter auf die Homoacetogenese (ohne Spurenelementen)

Bei DoE 1 wurde das Inokulum I anstatt des Zentrifugationsschrittes durch ein Metallsieb filtriert, um Partikel abzutrennen. Somit sollte eine größere Zelldichte im Inokulum erreicht werden da während des Zentrifugierens ein Teil der Bakterienbiomasse im Pellet verloren geht. Außerdem wurden die Ansätze mit einem Trägermaterial befüllt, um die Ausbildung eines Biofilms zu ermöglichen und die dadurch entstehenden Auswirkungen auf die Essigsäureproduktion zu beobachten.

Es wurden Vitamine, jedoch keine Spurenelemente zugesetzt .

Energieforschungsprogramm - 4. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

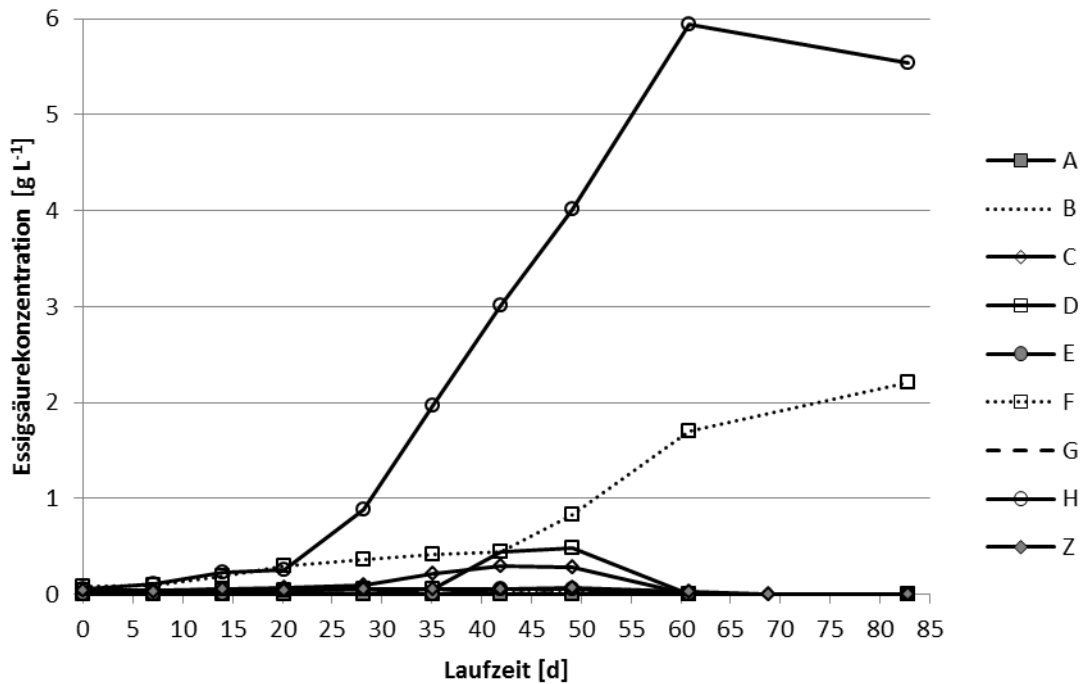


Abbildung 26: Verlauf der Essigsäurekonzentration im DoE 1

Es ist ersichtlich, dass Medien F (2,21 g L⁻¹) und H (5,54 g L⁻¹) die besten Essigsäureasbeuten lieferten. Beide Ansätze hatten einen pH von 6,8 und enthielten die Maximalkonzentration Hefeextrakt. Die restlichen Ansätze produzierten keine, bzw. keine nennenswerten Essigsäuremengen.

In **Abbildung 27** sieht man die statistische Auswertung des Design of Experiment mit dem Programm Minitab. Es gibt keine signifikanten Effekte der Versuchsparameter.

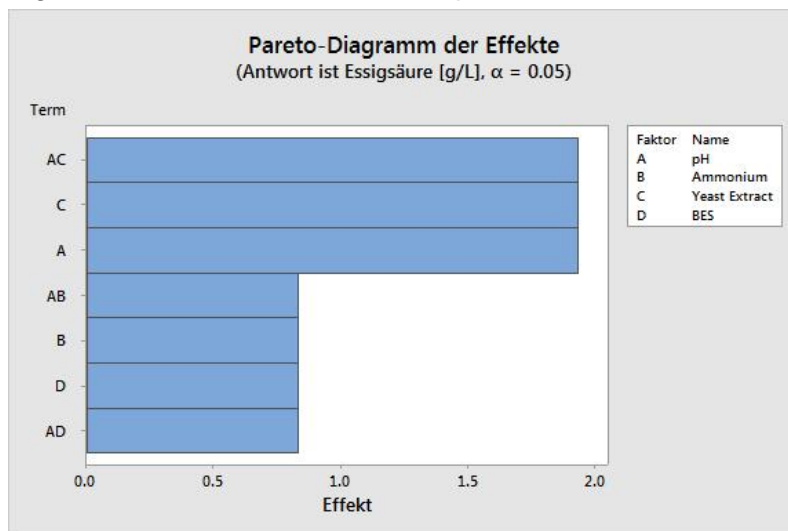


Abbildung 27: Pareto-Diagramm der Effekte aus DoE 1.

DoE 2: Design of Experiment 2 - Auswirkung diverser Einflussparameter auf die Homoacetogenese (mit Spurenelementen)

Da in dem Ansatz DoE1 die drei Zentralpunkte in ihrem Druckkonsum und ihrer OD voneinander abwichen, wurde derselbe Versuchsaufbau in Triplikaten in der DoE2 wiederholt, um Ausreißer besser erkennen zu können. Bei diesem Versuch wurden Spurenelemente verwendet. Es wurde bei diesem Versuch das Inokulum III verwendet, so wie in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** beschrieben wird.

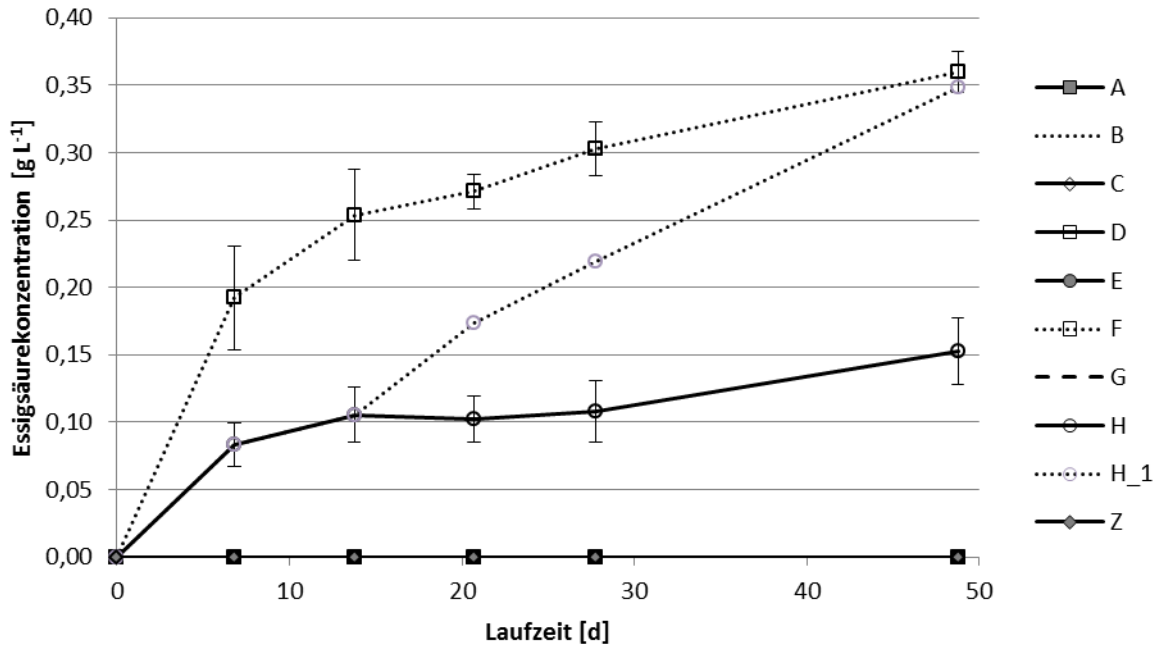


Abbildung 28: Zeitverlauf der Essigsäureproduktion der DoE2. Ein Ansatz des Triplikates mit Medium H weicht eindeutig von den anderen zwei Ansätzen ab und wurde deshalb separat gezeigt.

Der zeitliche Verlauf der Essigsäureproduktion in der DoE2 in **Abbildung 28** zeigt, dass die beiden Medien F und H ab der ersten Woche Essigsäure produzieren. Der Trend, dass F eine höhere Produktion hat als H, setzt sich fort. Jedoch zeigt ein Ansatz des Triplikats mit dem Medium H ab der dritten Woche (21 Tage) eine signifikante Produktionssteigerung und erreicht zum Ende des Versuches nach 49 Tagen ähnliche Essigsäurekonzentrationen wie die Triplikate des Mediums F. Dieser Effekt wird durch den geteilten Verlauf der Linie H graphisch veranschaulicht und dieser Ansatz wird H_1 genannt. Nach 49 Tagen Kultivierungsdauer wurde mit Medium F eine Essigsäurekonzentration von $0,36 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$, und mit Medium H eine Konzentration von $0,15 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $0,35 \text{ g L}^{-1}$ bei H_1, erreicht. Die Ergebnisse zeigen, dass ein hoher pH um 6.8 und hohe Hefeextrakt-Konzentrationen (2 g L^{-1}) die Essigsäureproduktion positiv zu beeinflussen scheinen. Dieser Effekt wurde auch bei DoE1 beobachtet, konnte allerdings nicht statistisch unterlegt werden. Diese Medienzusammensetzungen wurden deshalb später für den Versuchsansatz mit Rauchgas verwendet.

Eine Auswertung der DoE2 mit dem Statistikprogramm MODDE (Umetrics, v 12.0) war nicht möglich, da die Werte der einzelnen Triplikate zu sehr streuen. Minitab 18.1 konnte, obwohl Warnungen zur Streuung einzelner Triplikate ausgegeben wurden, dennoch eine Aussage zur Signifikanz einzelner Faktoren zu Essigsäureproduktion liefern. Wie in **Abbildung 29** zu sehen ist, sind die Faktoren pH, Hefeextrakt und die Wechselwirkung aus Hefeextrakt und pH für die Essigsäureproduktion signifikant. Diese Faktoren und die Wechselwirkung haben einen positiven Einfluss auf die Essigsäureproduktion.

Eine lineare Gleichung mit Koeffizienten zu den einzelnen Faktoren wird bewusst nicht angegeben, da die Triplikate sich nicht homogen verhalten und keine eindeutige Aussage in Form eines mathematischen Modells zu treffen ist. Außerdem zeigen die Zentralpunkte keine Essigsäureproduktion, wodurch kein linearer Einfluss der einzelnen Faktoren auf die Gleichung angenommen werden kann.

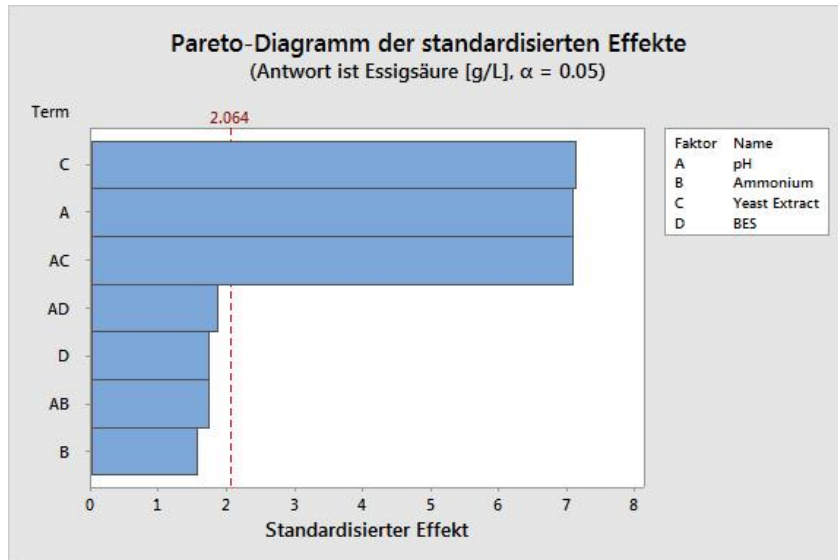
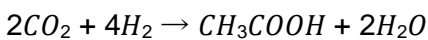


Abbildung 29: Pareto-Diagramm aus der DoE2 Auswertung mit Minitab. Die Faktoren Hefeextrakt (C), pH (A) und die Wechselwirkung aus pH und Hefeextrakt (AC) haben einen signifikanten Einfluss auf die Essigsäureproduktion.

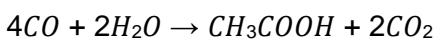
Für den verbrauchten Gasdruck, also konsumiertes CO₂ und H₂ aus dem Kopfraum der Serumflaschen zu Essigsäureproduktion, konnten keine signifikanten Faktoren mit Minitab ermittelt werden. Über den verbrauchten Gasdruck wurde die theoretisch maximal mögliche Menge an Essigsäure mit der allgemeinen Gasgleichung und der Reaktionsgleichung der Homoacetogenese (siehe Formel 1 und 2) berechnet.

Die Umsetzung sowohl von CO₂ als auch von CO (aus z.B. Rauchgasen) ist in Formel 11 und 12 dargestellt.

Reaktionsgleichung der Homoacetogenese: [1]



Acetogene Umsetzung von Kohlenmonoxid: [2]



Es wurde eine Temperatur von 25 °C und eine durchschnittliches Kopfraumvolumen von 70 mL angenommen. Aus diesen Daten wurde die Essigsäureausbeute in % bezogen auf den gemessenen Gasverbrauch ermittelt. Dies ist in **Abbildung 30** dargestellt.

Die vom Triplikat des Medium F produzierte Menge Essigsäure (0,36 g L⁻¹) stimmt mit der aus dem Gasverbrauch berechneten theoretischen Maximum an Essigsäure (0,36 g L⁻¹) überein. Bei dem Ansatz H_1 liegt eine Übereinstimmung von 81 % vor. Es wurden 0,35 g L⁻¹ Essigsäure produziert und aus dem Gasverbrauch wären theoretisch 0,43 g L⁻¹ möglich gewesen. Die anderen beiden Ansätze mit dem

Medium H haben mit 0,15 g L⁻¹ nur 27 % der aus dem Gasverbrauch theoretisch möglichen Menge Essigsäure (0,56 g L⁻¹) produziert.

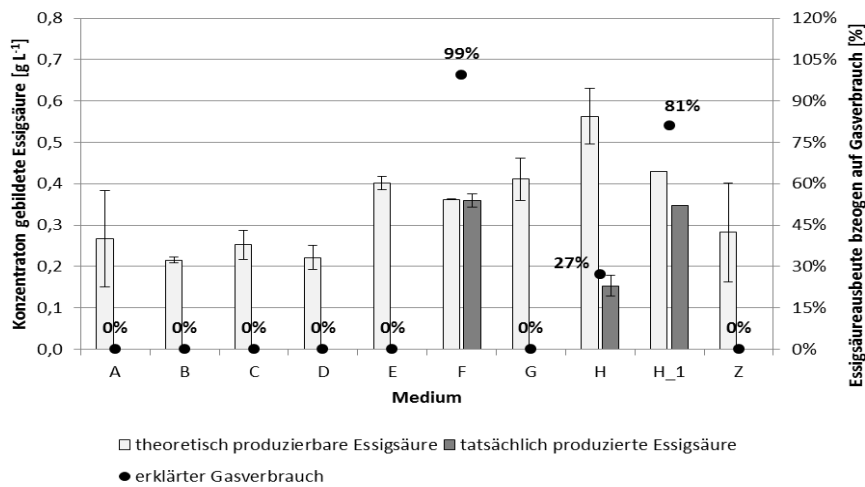


Abbildung 30: Vergleich der Tatsächlichen mit der aus dem Gasverbrauch berechneten theoretisch möglichen Essigsäureproduktion der einzelnen Medien. Der Ansatz H_1 wird aufgrund seiner starken Abweichung zu den anderen Ansätzen des Triplikats separat behandelt.

Da auch in den Ansätzen Gas verbraucht wurde ohne jedoch Essigsäure zu produzieren, hat sich die Frage gestellt, was aus dem bis jetzt nicht erklärten Gasverbrauch gebildet wurde. Eine stichprobenartige GC-Analyse des Kopfraumgases zeigte, dass in keinem der Ansätze Methan gebildet wurde, unabhängig davon ob der Methanogenese-Inhibitor BES zugesetzt wurde oder nicht.

Arbeitspaket 3 - Mikrobiologische Prozesse – Homoacetogenese

Screening und Adaption auf H₂/CO₂

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse des Screenings und der Adaption auf H₂/CO₂ der neun ausgewählten homoacetogenen Clostridien-Stämme. Erfolgreich auf Substratgas adaptiert wurden *Acetobacterium woodii*, *Moorella thermoacetica* und *Sporomusa ovata*. Aufgrund der ähnlichen Wachstumsbedingungen (pH 7, 30°C) wurden *A. woodii* und *S. ovata* für die folgenden Experimente ausgewählt, da somit beide Stämme direkt miteinander verglichen werden konnten. *A. woodii* ist ein sehr gut untersuchter Clostridien Stamm. Über *S. ovata* existieren hauptsächlich Studien, die sich mit mikrobieller Elektrosynthese beschäftigen. Die Studien über *S. ovata* weisen noch Lücken auf, zum Beispiel wenn es um die Frage geht welche Kationen der Stamm zum Aufbau des chemiosmotischen Gradienten zur ATP-Generierung verwendet.

Tabelle 15: Übersicht über die Adaption auf H₂/CO₂ von den ausgewählten homoacetogenen Clostridien-Stämmen

Mikroorganismus	Anfangs-Kohlenstoffquelle*	Max. Acetat-Ausbeute mit H₂/CO₂ im Batch [g/L]**	Kryokultur?	Adaptionserfolg?
<i>Acetobacterium woodii</i> ¹⁻⁶	Fructose	3,9	Nein, lässt sich nicht auftauen	Ja; Adaptiert auf H ₂ /CO ₂
<i>Alkalibaculum bacchi</i> ^{12,13}	Glukose	-	Nein, wegen Kontamination	Nein; Kontamination
<i>Blautia producta</i> ¹⁶	Glukose	-	Ja	Adaptierung im Gange, bisher kein Gasverbrauch
<i>Clostridium autoethanogenum</i> ⁸⁻¹¹	Glukose	-	Ja	Adaptierung im Gange, bisher minimaler Gasverbrauch
<i>Fuchsiella alkaliacetigena</i> ¹⁴	Ethanol	-	Nein, ist nicht angewachsen	Wächst sehr langsam, keine Acetatproduktion
<i>Moorella thermoacetica</i> ⁶	Glukose	1,5***	Ja	Ja; Adaptiert auf H ₂ /CO ₂
<i>Sporomusa ovata</i> ¹⁵	Betain	1,7	Ja	Ja; Adaptiert auf H ₂ /CO ₂
<i>Terrisporobacter mayombei</i> ¹⁵	Trypton	-	Ja	Nein, verwendet kein H ₂ /CO ₂
<i>Thermoanaerobacter kivui</i> ⁷	Glukose	-	Nein	Nein; Gehemmt durch H ₂ /CO ₂ ?

*Zusätzlich wurden unterschiedliche Mengen von komplexen Medienbestandteilen zugesetzt

**Zusätzlich wurden 0,5 g/L Hefeextrakt zugesetzt

***bei 60°C mit 0,25 g/L Hefeextrakt

In drei CSTR Batch Fermentationen wurden die Acetatproduktionen von *S. ovata* (2x) und *Terrisporobacter mayombei* (1x) bei kontrollierten Bedingungen (30°C, pH 7) und konstanter Gaszugabe (70 mL/min, Tag 1-7 H₂/CO₂ (80/20), Tag 7-19 H₂/CO₂/N₂ (40/10/50)) ermittelt. Die Hefeextrakt-Konzentration war in allen drei Fermentationen bei 0,5 g/L. *S. ovata* setzte erfolgreich das Substratgas zu Acetat um. In den ersten acht Tagen stieg die OD₆₀₀ kontinuierlich an und verblieb danach auf einem Plateau von ca. 1,3. Nach 19 Tagen wurde eine maximale Acetatkonzentration von 21,93 ± 0,17

g/L erreicht, wobei die Kurve noch im Steigen war (siehe Abbildung 21). Bei längerer Fermentationsdauer kann womöglich eine höhere maximale Acetatkonzentration erwartet werden. Die volumetrische Produktivität erreichte ihr Maximum an Tag 5 mit $2,08 \pm 0,06$ g/L pro Tag und sank kontinuierlich bis zum Ende der Fermentation auf $1,14 \pm 0,01$ g/L pro Tag. *T. mayombei* zeigte nach anfänglichem Wachstum bis zur maximalen OD600 0,3 an Tag 4 kein weiteres Wachstum. Die Acetatproduktion flachte nach Tag 6 stark ab und die Acetatkonzentration am Ende der Fermentation betrug 4,56 g/L. Die volumetrische Produktivität war an Tag 5 am höchsten (0,60 g/L pro Tag) und nahm anschließend ab bis zu einem Wert von 0,24 g/L pro Tag am Ende der Fermentation. Aus dem Vergleich der Fermentationen in Abbildung 21 wird ersichtlich, dass *S. ovata* sich erfolgreich auf H_2/CO_2 adaptierte, während *T. mayombei* das Substratgas so gut wie nicht verstoffwechselte. Die anfängliche Acetatproduktion von *T. mayombei* wird auf die Zugabe von 0,5 g/L Hefeextrakt zurückgeführt.

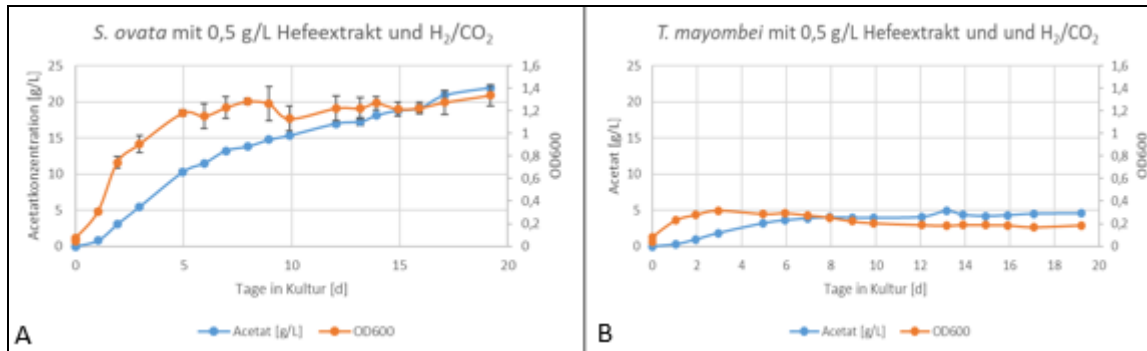


Abbildung 31: Verlauf der Acetatkonzentrationen (blau) und OD600 (orange) in CSTR Batch Fermentationen von *S. ovata* (A: Mittelwerte aus zwei Fermentationen) und *T. mayombei* (B) mit 0,5 g/L Hefeextrakt Zugabe am Anfang der Fermentation und konstanter H_2/CO_2 Begasung (70 mL/min)

4.7.3 Zugabe von Carboanhydrase zur Acetogenese

Wie in Arbeitspaket 2 beschrieben, katalysiert das Enzym Carboanhydrase (CA) die Reaktion von CO_2 zu Hydrogencarbonat und zurück, je nachdem welcher der beiden Stoffe im Überschuss vorliegt. Der Einfluss der Zugabe von verschiedenen CA-Konzentrationen auf die Acetatproduktion von *A. woodii* und *S. ovata* wurde untersucht. Die Hefeextraktzugabe betrug in allen Experimenten 0,5 g/L, um die Lag-Phase zu verkürzen. Die verwendete CA stammte von *A. woodii* und wurde in AP2 exprimiert und untersucht. In zwei Experimenten wurden einmal *A. woodii* und danach *S. ovata* mit dem Substratgas $H_2/CO_2/N_2$ (40/10/50) (1,5 bar Überdruck) mit CA-Konzentrationen von 0 mg/mL, 0,015 mg/mL, 0,03 mg/mL und 0,06 mg/mL versetzt. Beide Stämme zeigten eine signifikante Hemmung der Acetatproduktion mit steigender Enzymkonzentration. *A. woodii* produzierte ohne Enzym $1,49 \pm 0,1$ g Acetat/L und mit 0,06 g CA/mL $1,29 \pm 0,02$ g Acetat/L. *S. ovata* produzierte ohne Enzym $1,68 \pm 0,02$ g Acetat/L und mit 0,06 g CA/mL $1,58 \pm 0,01$ g Acetat/L. In einem dritten Experiment wurde *A. woodii* mit $NaHCO_3$ statt CO_2 Zugabe untersucht. Auch hier diente H_2 als Elektronendonator. Das 100% H_2 Gas wurde mit einem Überdruck von 1 bar angelegt, um die geringe Löslichkeit von H_2 in Wasser zu verbessern. HCO_3^- wurde im Überschuss bereitgestellt, um eine Substratlimitierung auszuschließen. Die Acetat-Ausbeute war in allen Ansätzen mit HCO_3^- als Kohlenstoffquelle deutlich geringer als mit CO_2 . Das deutet darauf hin, dass die Mikroorganismen gelöstes CO_2 besser aufnehmen als HCO_3^- . Auch hier wurde die Acetatproduktion mit steigender Enzymkonzentration signifikant gehemmt ($0,82 \pm 0,01$ g

Acetat/L ohne CA und $0,69 \pm 0,03$ g Acetat/L mit $0,1$ mg CA/mL). Der Unterschied war in diesem Experiment deutlicher sichtbar, da höhere Enzymkonzentrationen ($0,05$ und $0,1$ mg CA/mL) verwendet wurden. In allen drei Experimenten wirkte sich die Zugabe von CA negativ auf die Acetatproduktion aus. Das weist daraufhin, dass die CA eine Konkurrenz für die Mikroorganismen um CO_2 bzw. HCO_3^- darstellt. Höchstwahrscheinlich bindet die CA einen Anteil an CO_2 bzw. HCO_3^- , der dann unzugänglich für die Clostridien ist.

Zusätzlich wurden zwei verschiedene Experimente mit Mischkultur und $0,025$ mg CA/mL durchgeführt. Im ersten Experiment wurde mit $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{N}_2$ (40/10/50) begast ($1,5$ bar Überdruck). Im zweiten Experiment wurde mit 100% H_2 ($2,5$ bar Überdruck) und das CO_2 durch NaHCO_3 ersetzt. Die Experimente fanden zeitgleich statt und wurden mit der gleichen Mischkultur inokuliert. Das Medium enthielt in beiden Experimenten $0,25$ g/L Hefeextrakt und mindestens 3 g/L NaHCO_3 . Die maximalen Acetatkonzentrationen sind in Tabelle 12 aufgeführt. In beiden Experimenten hatte das Enzym CA weder positive noch signifikant negative Auswirkungen auf die Acetatproduktion. In den Ansätzen mit NaHCO_3 und H_2 wurde eine höhere Acetatkonzentration erreicht, was auf den höheren Druck und damit die erhöhte Lösung von H_2 zurückgeführt wird.

Tabelle 16. Überblick der maximalen Acetatkonzentrationen in Mischkulturexperimenten mit CA

		Max. Acetatkonzentration [g/L]
Experiment 1	Inokulum + H_2/CO_2	$1,76 \pm 0,16$
	Inokulum + CA + H_2/CO_2	$1,51 \pm 0,20$
	CA + H_2/CO_2	$0,24 \pm 0,05$
	Inokulum + CA + N_2	$0,56 \pm 0,01$
Experiment 2	Inokulum + H_2 + NaHCO_3	$2,84 \pm 0,09$
	Inokulum + CA + H_2 + NaHCO_3	$2,70 \pm 0,09$
	CA + H_2 + NaHCO_3	$0,04 \pm 0,01$
	CA + N_2	$0,65 \pm 0,02$

Da in den Reinkulturexperimenten höhere Enzymkonzentrationen verwendet wurden und diese zu einer verringerten Acetatproduktion geführt haben, wird davon ausgegangen, dass auch in Mischkulturexperimenten die Acetatproduktion durch höhere Enzymkonzentrationen gehemmt werden würde.

Medienoptimierung für *A. woodii* und *S. ovata*

Im Folgenden ist eine Auswahl an Ergebnisse dargestellt. Alle Experimente fanden im Batch in 30 mL Ansätzen statt.

Acetobacterium woodii

pH-Test:

Im pH-Test wurde *A. woodii* bei drei verschiedenen Anfangs-pH-Werten (7 , 8 , 9) und mit jeweils zwei unterschiedlichen Begasungen ($\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{N}_2$ (40/10/50) oder 100% H_2) untersucht. Alle Ansätze enthielten 3 g/L NaHCO_3 . Für die Versuche mit $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{N}_2$ (40/10/50) lieferte das Medium mit Start-pH $9,5$ die

besten Ergebnisse. Das ist darauf zurückzuführen, dass der pH-Wert bei gleicher Acetatproduktion langsamer bis zum Inhibierungs-pH-Wert sank. Die Versuche mit H₂ lieferten 7x weniger Acetat, da der pH-Wert schnell anstieg, was auf die Freisetzung von OH⁻ bei der Umwandlung von NaHCO₃ zu Acetat zurückgeführt wird.

NaHCO₃ vs. NaCl als Na⁺-Quelle:

A. woodii benötigt indirekt Na⁺-Ionen für die Energiegewinnung über den Aufbau eines chemiosmotischen Gradienten. Für kommende Experimente in denen der Einfluss von HCO₃⁻ evaluiert werden soll, wurde die alternative Na⁺-Quelle NaCl getestet. Alle Ansätze wurden mit H₂/CO₂/N₂ (40/10/50) begast. Die Versuche mit NaCl an Stelle von NaHCO₃ lieferten weitaus schlechtere Ergebnisse, da der pH-Wert innerhalb kürzester Zeit auf unter 6 absank und *A. woodii* inhibierte. NaHCO₃ hat gemeinsam mit CO₂ eine Pufferwirkung, die in den Ansätzen mit NaCl fehlte. In einem weiteren Experiment wurde NaCl als Na⁺-Quelle mit einer höheren Kaliumphosphatpuffer-Konzentration (10mM) getestet. Diese lieferte weitaus bessere Ergebnisse.

Verschiedene NaCl-Konzentrationen:

Um den Einfluss der Salzkonzentration auf *A. woodii* zu evaluieren wurden dem ursprünglichen Medium mit 3 g/L NaHCO₃ verschiedene Mengen an NaCl beigegeben (0, 20, 50, 100 mM). Begast wurde mit H₂/CO₂/N₂ (40/10/50). Bei steigender Zugabe von NaCl wurde etwas weniger Acetat produziert. Es handelt sich bei der Zugabe von 100 mM NaCl um einen Verlust von ca. 0,1 g Acetat/L bei ca. 2,6 g Acetat/L mit 0 mM Zugabe von NaCl.

Sporomusa ovata

NaHCO₃ vs NaCl als Na⁺-Quelle:

Der Aufbau und die Ergebnisse waren ähnlich zu den Versuchen mit *A. woodii* (s.o.).

Evaluierung der Abhängigkeit von Na⁺-Ionen:

In dem Basis-Medium des Experiments wurden alle Na⁺-Quellen auf unter 0,1 mM reduziert.

Anschließend wurden unterschiedliche Mengen an Na⁺ hinzugefügt (0, 9, 38, 47 mM). Die erreichten Acetatkonzentrationen in allen Ansätzen wiesen signifikant keine Unterschiede auf, was auf eine Na⁺-Unabhängigkeit von *S. ovata* schließen lässt. Zum Vergleich: in der Literatur wird aufgeführt, dass *A. woodii* ab Na⁺-Konzentrationen von 6,5 mM abwärts limitiert wird (Heise et al., 1989).

Trickle-Bed Fermentationen

Drei Trickle-Bed Reaktoren befinden sich im Abzug, um eine Fermentation mit H₂/CO₂ zu ermöglichen. Die Temperaturkontrolle erfolgt händisch über Heizmäntel. Digital aufgezeichnet werden: pH-Wert, Gas-Flussrate (gesteuert über Massflow Controller) und Temperatur. Es wurden drei Säulen so umgebaut, dass sie einzeln mit Medium und mit Gas rezirkuliert werden können (siehe Abbildung 32). Bisher wurden zusätzlich Kalibrierungen und Dichttheits tests des Systems vorgenommen. Geplant ist die Fermentation mit einer acetogenen Mischkultur. Das Füllmaterial der Säulen wird in einem Vorversuch auf Immobilisierungspotential untersucht. Der Versuchsplan für die Trickle-Bed Fermentationen wurde erstellt.

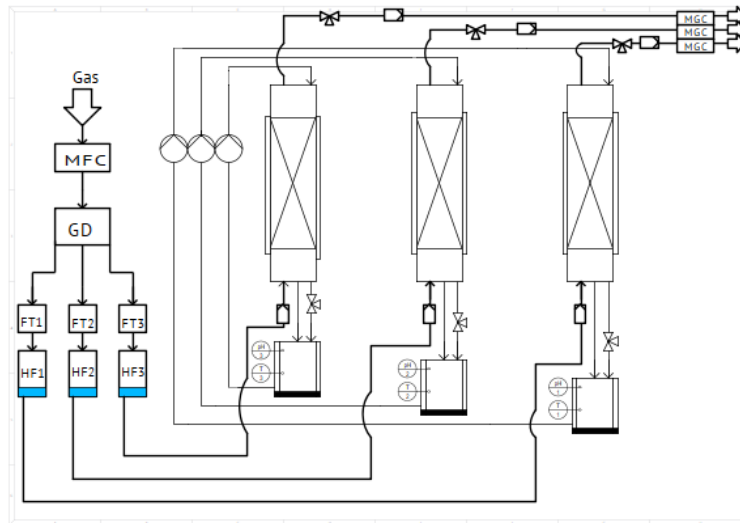


Abbildung 32: RI-Fließbild des Aufbaus der drei parallel geschalteten Trickle-Bed Reaktoren.

Arbeitspaket 3 - Mikrobiologische Prozesse – Solventogenese

Der zweite Schritt des mikrobiologischen Verfahrens zur Herstellung eines flüssigen Biokraftstoffes ist die Umwandlung von Acetat in Ethanol. Betrachtet man den biochemischen Stoffwechselweg, ist zu beachten, dass den Mikroorganismen Elektronen für diese Reaktion fehlen. Um diesen Prozess der Lösungsmittelentwicklung zu ermöglichen, wird versucht, eine elektrochemische Einheit zu integrieren, welche den Organismen die benötigten Elektronen liefert und das Gleichgewicht in Richtung Ethanol Herstellung verschiebt.

Aufbau und Durchführung der einzellige mikrobiellen Elektrosynthese

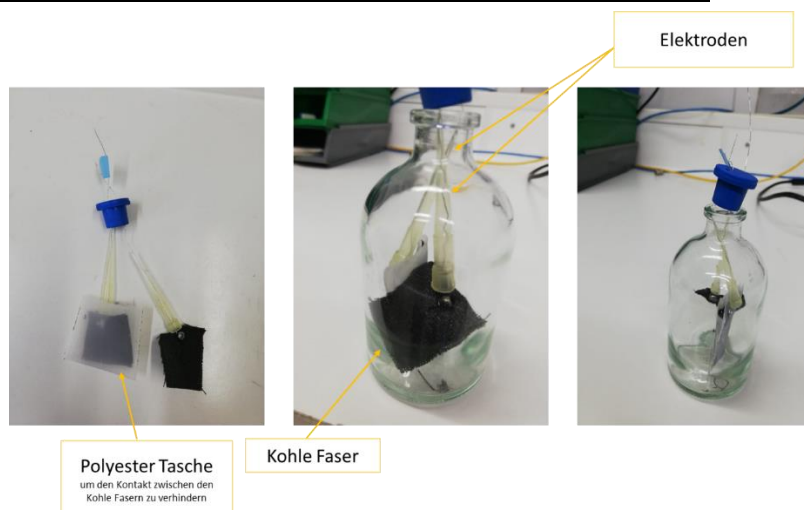


Abbildung 33: Versuchsaufbau der mikrobiellen Elektrosynthese

Eine Anode (Minuspol) und eine Kathode (Pluspol) wurden in die Serumflasche eingebaut und 0,8 Volt angelegt (Abbildung 33). Für den ersten Versuch wurde *Clostridium autoethanogenum* mit den Substraten Acetate, Butyrate und Glucose untersucht. Änderungen der Stromstärke, OD, Flüssigkeitszusammensetzung und des pH-Werts werden laufend gemessen und interpretiert. Betrachtet man den pH-Verlauf über die gesamte Zeit, **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, gibt es keine aussagekräftigen Veränderungen. Auch die HPLC Analyse ergab keine Produktion von flüssigen Lösungsmitteln, wie Ethanol oder auch Butanol. Da *C. autoethanogenum* nur in dem Ansatz ohne Stromzufuhr angewachsen ist, wird daraus geschlossen, dass der Stamm entweder durch Stromzufuhr generell oder durch die angelegte Stromstärke gehemmt wird. Deshalb sind nächste Versuche mit einer geringeren Stromstärke, 0,4 Volt, und einem anderen Mikroorganismus, *C. beijerinckii* geplant.

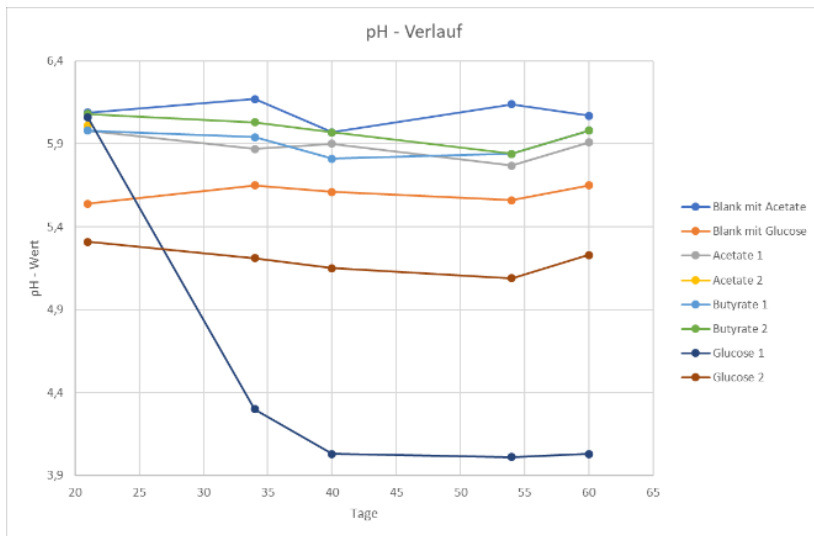


Abbildung 34: pH-Verlauf der mikrobiellen Elektrosynthese mit *C. autoethanogenum*

Des Weiteren wurde getestet, ob mit Hilfe von Wasserstoff mit 0,5 bar Überdruck, die Reaktion von Substraten wie Acetate, Butyrate und auch Glucose hin zum Alkohol stattfindet. Es wurde erneut *C. autoethanogenum* getestet und dieselben Analysen (pH – Wert, OD, HPLC) durchgeführt. Jedoch wurde auch hier keine Produktion von Alkoholen festgestellt.

Durchgeführt	Organismus	Zufuhr von Elektronen	Temperatur	Dauer
✓	<i>Clostridium autoethanogenum</i>	Strom als Elektron Donor	37°C	60 Tage
✓	<i>Clostridium autoethanogenum</i>	H2 als Elektron Donor	37°C	48 Tage
✓	<i>Clostridium beijerinckii</i>	H2 als Elektron Donor	37°C	andauernd
Geplant				
✗	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Strom als Elektron Donor	37°C	
✗	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	Strom als Elektron Donor	37°C	

x	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	H2 als Elektron Donor	37°C	
---	--------------------------------	-----------------------	------	--

Bioreaktoren & Modellierung

Arbeitspaket 4 - Modellierung

Zur Modellierung und Simulation der Mehrphasenströmung im Reaktor stehen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl. Die sogenannte „Volume of Fluid“ (VoF)-Methode ermöglicht eine voll aufgelöste Simulation der Strömung im Reaktor. Dabei sind sowohl Füllkörper (Raschig-Ringe) als auch die Phasengrenzflächen zwischen Gas und Flüssigkeit dargestellt. Zur Abbildung von Phasengrenzen und der Benetzbarkeit von Schüttung und Reaktorwänden sind dafür entsprechende Modelle notwendig. In der vorliegenden Simulation wird zur Berechnung der Gas-Flüssig-Grenzfläche die Oberflächenspannung der Flüssigkeit benötigt, die Benetzbarkeit von Oberflächen wird durch den Kontaktwinkel dargestellt. Die VoF-Methode bietet durch die vollständige Darstellung der Schüttung die Möglichkeit einen sehr detaillierten Einblick in die fluiddynamischen Vorgänge im Reaktor (z.B. Flüssigkeits-Hold-Up, Channeling) zu erhalten. Allerdings ist dabei eine feine räumliche Diskretisierung (hohe Zellzahl) und eine entsprechend lange Simulationszeit notwendig.

Eine weitere Möglichkeit den Prozess mittels CFD-Simulation darzustellen, ist Gas, Flüssigkeit und Feststoff als Euler'sche-Phasen darzustellen. Dabei wird, im Gegensatz zur VoF-Methode, für jede Phase ein entsprechendes Set von beschreibenden Gleichungen gelöst. Die Interaktion zwischen den Phasen erfolgt durch Interaktionsmodelle (z.B. Druckverlust, Wärme- und Stoffübergang). Diese Modelle benötigen eine sorgfältige Kalibrierung und Validierung. Die Schüttung und die Phasengrenzflächen sind mit diesem Ansatz nicht aufgelöst dargestellt. Dadurch ist eine wesentlich geringere Zellanzahl im Vergleich zur VoF-Methode notwendig.

Im Folgenden wird, nach der Ermittlung der notwendigen Rechengitterauflösung, die VoF-Methode benutzt, um den Flüssigkeits-Hold-Up im Versuchsreaktor zu Bestimmen. In einer anschließenden Simulation mit der Euler-Methode, werden Phaseninteraktionsmodelle durch Parametervariation und Vergleich des Flüssigkeits-Hold-Up kalibriert und mit entsprechender Literatur verglichen. Abbildung 35 zeigt die Darstellung des Reaktors mittels VoF und Euler-Methode.

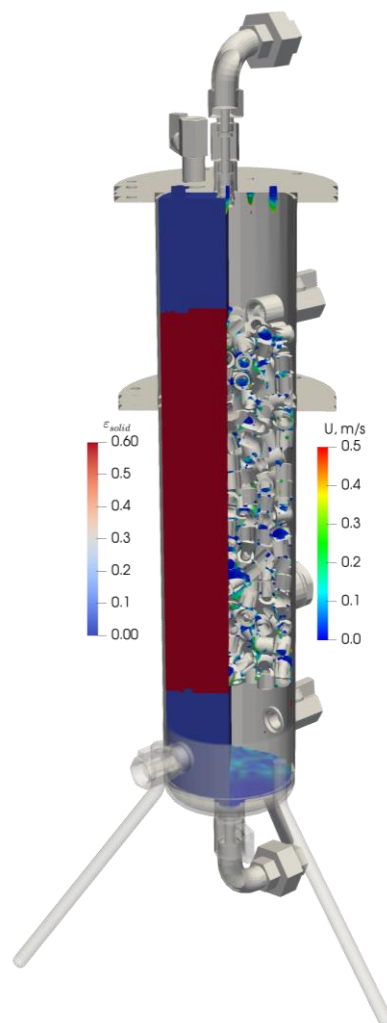


Abbildung 35: Simulative Abbildung des Reaktors. Links: Euler-Methode, Rechts: voll aufgelöste VoF-Methode.

Innenraumgeometrie

Der zu modellierende Reaktor ist mit Hohlzylindern (Raschig-Ringen, $d_o \times d_i \times H = 15 \times 9 \times 15$ mm) gefüllt. Das Modell dieser Füllkörperschüttung wurde mit Hilfe der diskreten Element Methode (DEM) erstellt. Partikel- und Wandeigenschaften wurden definiert und im DEM-Code implementiert. Die zur Erstellung des Rechengitters benötigten Schritte (Befüllen, Anpassung der Füllhöhe und Erzeugen der STL-Oberfläche) ist in Abbildung 36 dargestellt. Die in Abbildung 36 (c) gezeigte Schüttung besteht aus 734 Raschig-Ringen und hat eine mittlere Porosität (ϵ) von 0.586. Das radiale Porositätsprofil ist in Abbildung 37 dargestellt.

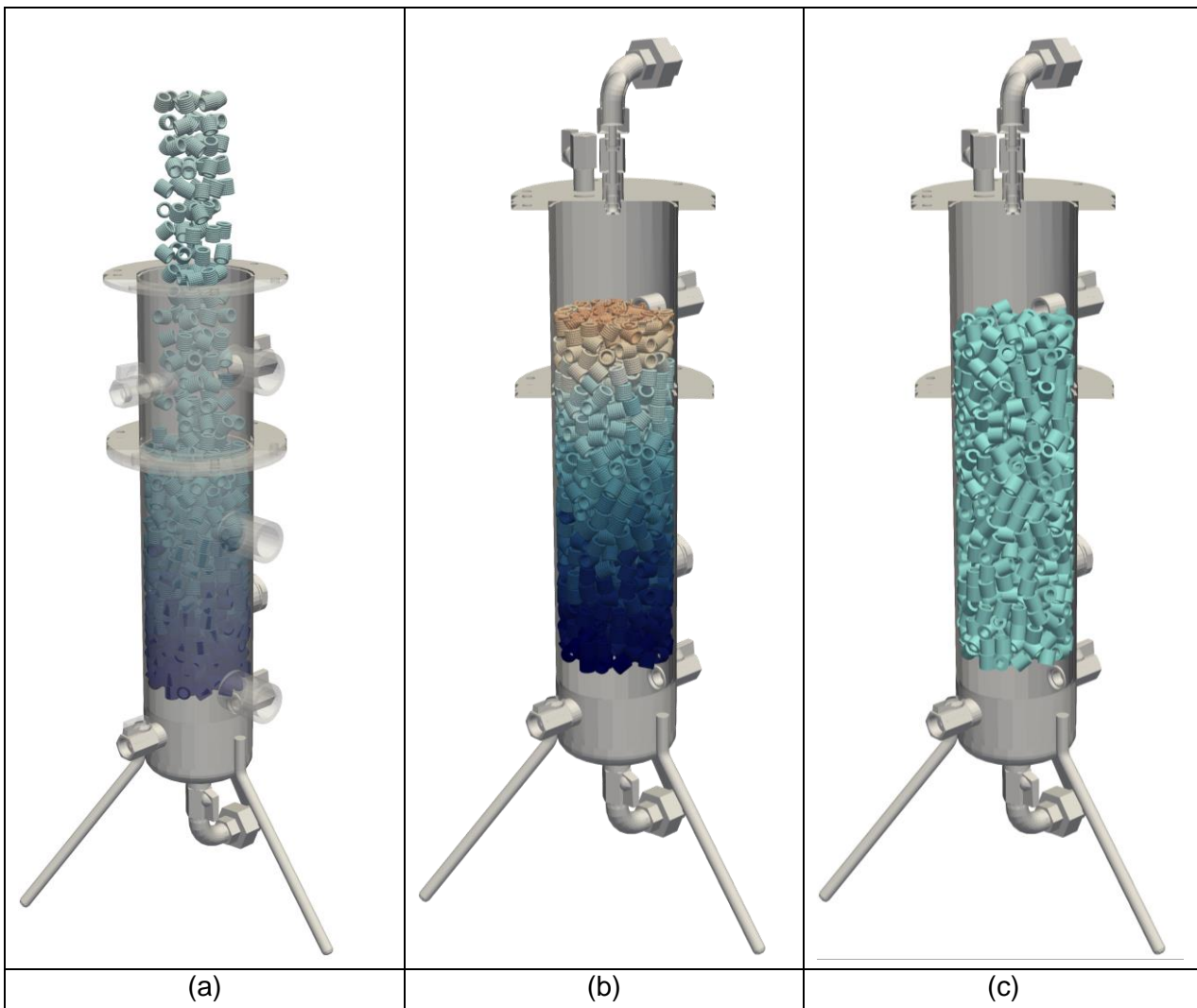


Abbildung 36: Schritte zur Erzeugung der STL-Oberfläche der Schüttung. (a) Erstellen der Schüttung mittels DEM, (b) Anpassung der Füllhöhe, (c) fertige STL-Oberfläche

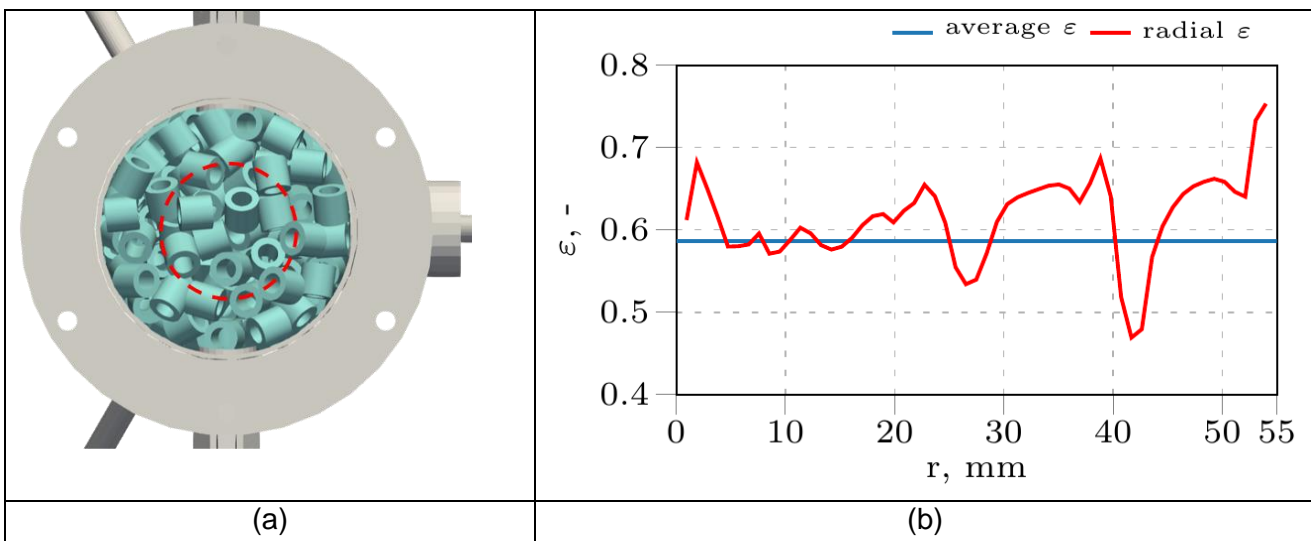


Abbildung 37: (a) Zylinderschnitt (rote, gestrichelte Linie) zur Ermittlung des radialen Porositätsprofils. (b) radiales Porositätsprofil und mittlere Porosität der erstellten Schüttung.

Mesh

Um eine Meshunabhängigkeit der Lösung der CFD-Simulation zu erreichen, wurde ein Viertel des Reaktors mit unterschiedlichen Auflösungen diskretisiert. Das Mesh wurde mit Hilfe des Tools snappyHexMesh aus dem Solver-Paket OpenFoam erstellt. Abbildung 38 zeigt links die drei erstellten Rechengitter, die jeweils eine unterschiedliche Zellenanzahl und Zellengröße aufweisen. Die Rechengitter ref1, ref2 und ref3 enthalten 0.43, 1.378 und 7.473 Millionen Zelle.

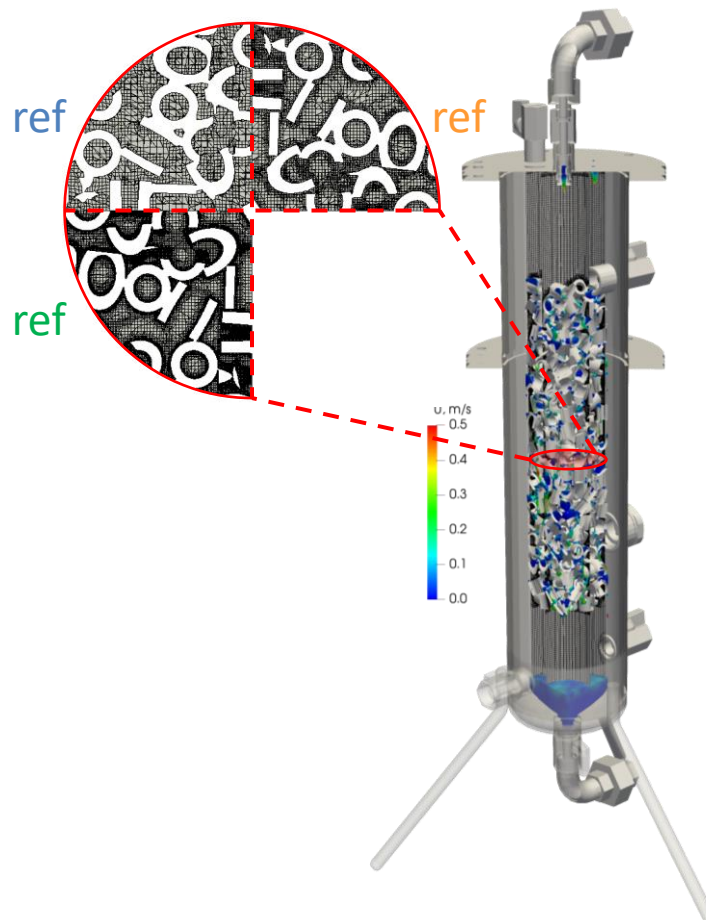


Abbildung 38: Mesh mit drei Meshzonen unterschiedlicher Auflösung.

Berechnung des Hold-Up (VoF)

VoF-Simulationen wurden mit dem OpenFoam Solver interFoam durchgeführt. Die Gasphase entspricht dabei einem Gas mit der Zusammensetzung 70 vol% H₂ und 30 vol% CO₂ und strömt von unten durch in den Reaktor. Die Flüssigkeit wurde in ihren Eigenschaften durch Wasser angenähert und tritt von oben in den Reaktor ein. Die Volumenströme wurden über die Eintrittsgeschwindigkeiten auf 252.5 l/h Gas und 10.5 l/h Flüssigkeit festgelegt. Die Berechnung beruht auf den Annahmen laminarer Strömung, Inkompressibilität, nicht mischbaren Phasen und isothermen Verhalten. Abbildung 39 (a) zeigt den Flüssigkeits-Hold-Up ($H=V_L/((1-\epsilon) V)$) mit dem Flüssigkeitsvolumen (V_L) und dem Gesamtvolumen (V) nach 15 simulierten Sekunden. Es ist ersichtlich, dass mit Rechengitter ref2 eine Mesh-Unabhängigkeit der Lösung gewährleistet ist. Die Simulation wurde für dieses Mesh fortgesetzt, um eine stationäre

Lösung zu erhalten (Abbildung 39 (b)). Der stationäre Hold-Up (2.1 %, bzw. 9.44 g Flüssigkeit in einem Viertel der Packung) wurde nach ca. 40 Sekunden erreicht.

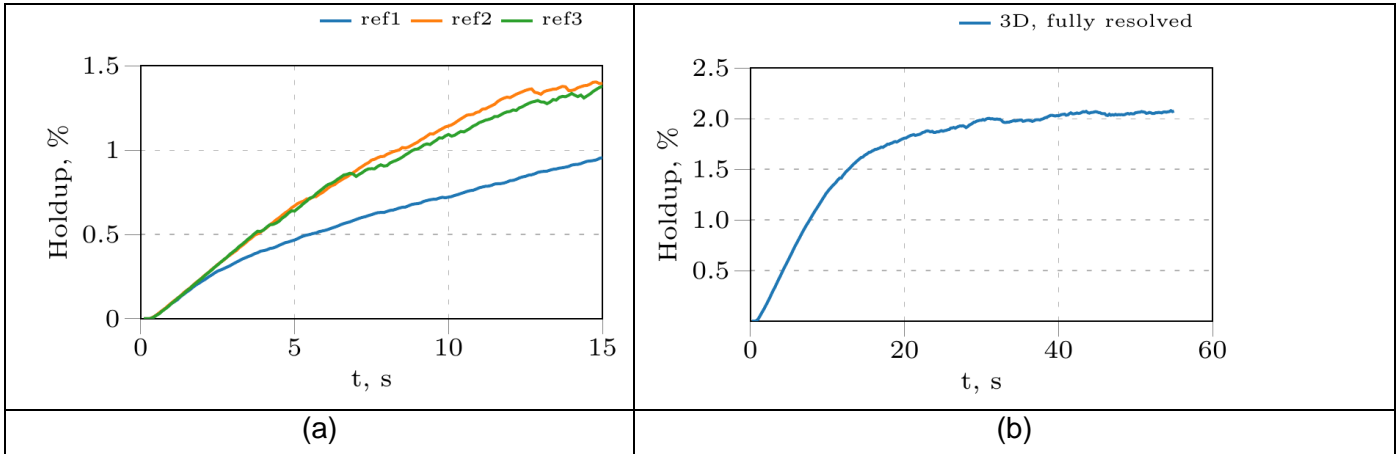


Abbildung 39: Simulierter Flüssigkeits-Hold-Up nach (a) 15 simulierten Sekunden für die drei Mesh Auflösungen und (b) 55 simulierten Sekunden für Mesh ref2.

Berechnung des Hold-Up (Euler)

Zur Berechnung des Hold-Ups mittels Euler-Methode werden Modelle für den Strömungswiderstand für jede Phasen-Kombination benötigt. Für von einem Fluid durchströmte Packung kann der Druckverlust pro Länge nach Ergun (1952) (Gleichung (1)) verwendet werden. Neben den Ergun-Konstanten (E_1, E_2), der Porosität der Packung (ϵ_G), der Fluidgeschwindigkeit (U_G) und der Dichte (ρ_G) und Viskosität (μ_G) des Fluids, wird dafür der charakteristische Durchmesser (d_{ij}) benötigt. Dieser ist für die Kombination von Fluid und Packung als Sauter-Durchmesser der Füllkörper definiert. Für den aus drei Komponenten zusammengesetzten Widerstand von Flüssigkeit/Gas/Packung ist dieser Durchmesser aber nur schwer zugänglich.

$$\frac{-\Delta P}{L} = E_1 \mu_g \frac{(1-\epsilon_G)^2 U_G}{\epsilon_G^3 d_{ij}^2} + E_2 \rho_g \frac{(1-\epsilon_G) U_G^2}{\epsilon_G^3 d_{ij}^2} \quad (1)$$

Attou und Ferschneider (1999) schlagen ein Modell (Gleichungen (2a)-(2c)) vor bei dem nur der charakteristische Durchmesser der Füllkörper benötigt wird.

$F_{GL} = \epsilon_G \left(\frac{E_1 \mu_G (1-\epsilon_G)^2}{\epsilon_G^2 d_p^2} \left[\frac{\epsilon_S}{(1-\epsilon_G)} \right]^{0.667} + \frac{E_2 \rho_G (U_G - U_L) (1-\epsilon_G)}{\epsilon_G d_p} \left[\frac{\epsilon_S}{(1-\epsilon_G)} \right]^{0.333} \right)$	(2a)
$F_{GS} = \epsilon_G \left(\frac{E_1 \mu_G (1-\epsilon_G)^2}{\epsilon_G^2 d_p^2} \left[\frac{\epsilon_S}{(1-\epsilon_G)} \right]^{0.667} + \frac{E_2 \rho_G U_G (1-\epsilon_G)}{\epsilon_G d_p} \left[\frac{\epsilon_S}{(1-\epsilon_G)} \right]^{0.333} \right)$	(2b)
$F_{LS} = \epsilon_L \left(\frac{E_1 \mu_L \epsilon_S^2}{\epsilon_L^2 d_p^2} + \frac{E_2 \rho_L U_G \epsilon_S}{\epsilon_L d_p} \right)$	(2c)

Um die Form der Füllkörper und den effektiv durchströmbaren Volumensanteil der Raschig-Ringe zu berücksichtigen können die modifizierten Ergun-Konstanten nach Nemeč (2005) (Gleichungen (3a) und (3b)) verwendet werden. Hier sind V_{fc} und S_{fc} das Volumen und die Oberfläche eines Zylinders mit dem selben äußeren Durchmesser (d_o) und Höhe (H) wie die Füllkörper, V_i und S_i das Volumen und die Oberfläche eines Zylinders mit dem selben inneren Durchmesser (d_i) und Höhe (H) wie die Füllkörper, V_p das Volumen eines Füllkörpers und d_e der Sauter-Durchmesser eines Füllkörpers. Der effektiv durchströmbare Anteil der Raschig-Ringe wird durch eine Konstante (m) festgelegt. Sonntag (1960) schlägt einen Wert von $m = 0.2$ vor. Damit sind die für die Berechnung des Druckverlustes des Drei-Phasen Systems benötigten Parameter reduziert auf die Ermittlung des a priori noch unbekanntem Faktors m .

$E_1 = 150 \left[\frac{\varepsilon^3}{(1 - (1 - \varepsilon)(V_{fc} - mV_i)/V_p)^3} \right] \left(\frac{S_{fc} + m S_i d_e}{V_p \cdot 6} \right)$	(3a)
$E_2 = 1.75 \left[\frac{\varepsilon^3}{(1 - (1 - \varepsilon)(V_{fc} - mV_i)/V_p)^3} \right] \left(\frac{S_{fc} + m S_i d_e}{V_p \cdot 6} \right)^2$	(3b)

Zur Ermittlung von m wurde der Flüssigkeits-Hold-Up mittels Euler-Methode, dem Widerstandsmodell nach Attou und Ferschneider (1999) und den Modifizierten Ergun-Konstanten nach Nemeč (2005) für unterschiedliche Werte von m in einer 2D-Simulation des Reaktors ermittelt. Der Vergleich des Hold-Ups über m ist in Abbildung 40 (a) dargestellt. Es ist ersichtlich, dass der Hold-Up simuliert mittels Euler-Methode (2d, EE) für $m = 0.2$ mit dem Hold-Up aus der voll aufgelösten VoF-Simulation (3D, VoF) übereinstimmt. $m = 0.2$ deckt sich auch mit dem von Sonntag (1960) vorgeschlagenen Wert. Abbildung 40 (b) zeigt verschiedene Gas- ($m = 1, m = 0$) und Flüssigkeitspfade (Channeling) durch die durchströmte Schüttung.

Die hier gezeigte Methode kann verwendet werden, um Druckverlust und Hold-Up im Reaktor zu berechnen und ein Scale-Up in Richtung industrieller Maßstab zu betreiben.

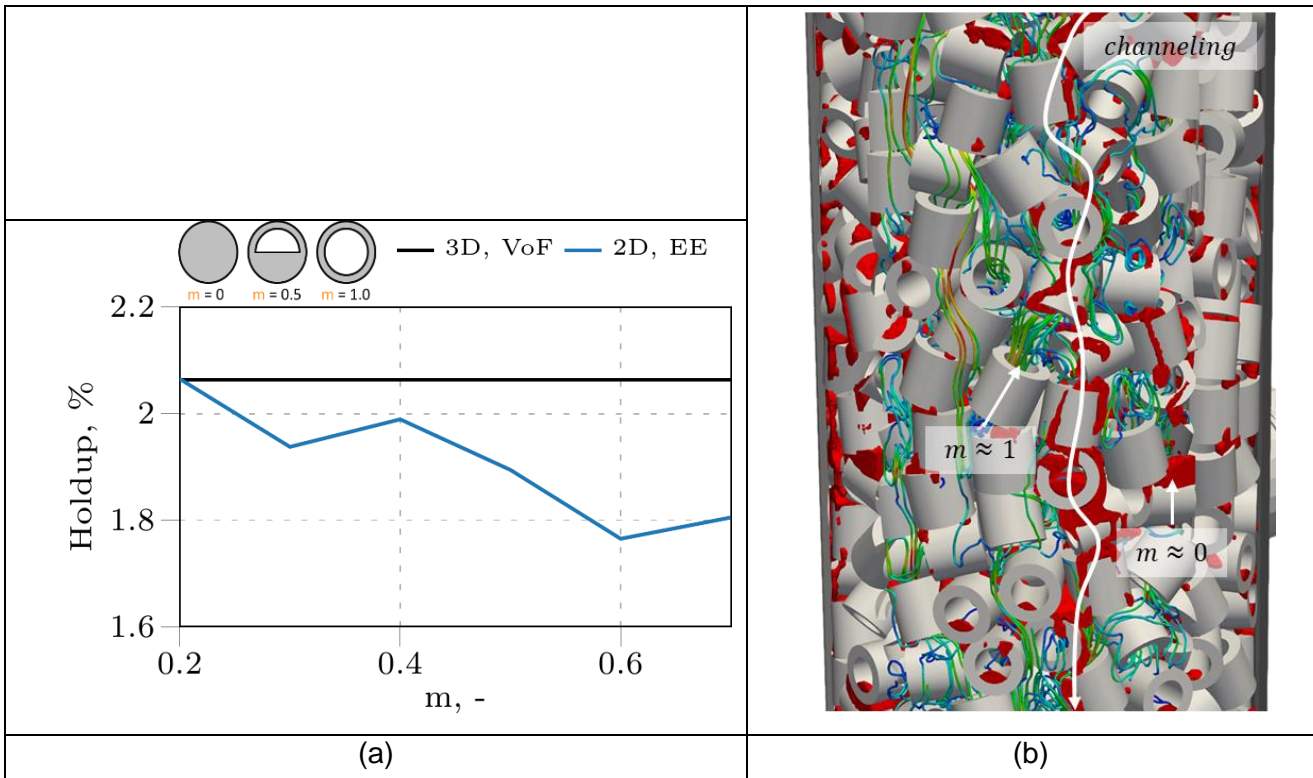


Abbildung 40: (a) Simulierter Flüssigkeits-Hold-Up für unterschiedliche Konstanten m . (b) VoF-simulierte Gas- (Stromlinien) und Flüssigkeitspfade (rot) durch die Schüttung.

Ökonomische und ökologische Evaluierung

Arbeitspaket 6 – Ökonomische und Ökologische Bewertung

AP6 umfasste die Aufgaben 6.1, 6.2 und 6.3, die im Folgenden näher beschrieben sind.

Abbildung des Gesamtprozesses mittels Prozesssimulation und Optimierung

Der Aufgabenbereich 6.1 umfasste folgende Schritte:

1. Entwicklung eines Modells zur korrekten Abbildung des Prozesses
 - a. Auswahl eines thermodynamischen Modells zur Abbildung des Systems
 - b. Übersetzen der Reaktorparameter in Modellreaktor
 - c. Aufbau des Prozessflowsheets in AspenPlus
 - d. Auswertung des Modells anhand von Messdaten vom Laborreaktor von BEST GmbH
2. Upscaling des Prozesses mittels Prozesssimulation
3. Erweiterung des Flowsheets, um verkauffähiges Produkt zu erzeugen
4. Berechnung verschiedener Szenarien und Ergebnisauswertung

Im Folgenden wird erst das entwickelte Modell vorgestellt. Im Anschluss werden die Ergebnisse aus den Punkten 2. bis 4. vorgestellt.

Entwicklung eines Modells zur korrekten Abbildung des Prozesses

a) Thermodynamisches Modell

Zur Korrekten Abbildung des Prozesses der Homoacetogenese muss die ausgewählte thermodynamische Methode das Elektrolytsystem NaOH-H₂O-CO₂ korrekt abbilden können. Die Löslichkeit von CO₂ ist stark abhängig von den Elektrolytreaktionen im System (Abbildung 41).

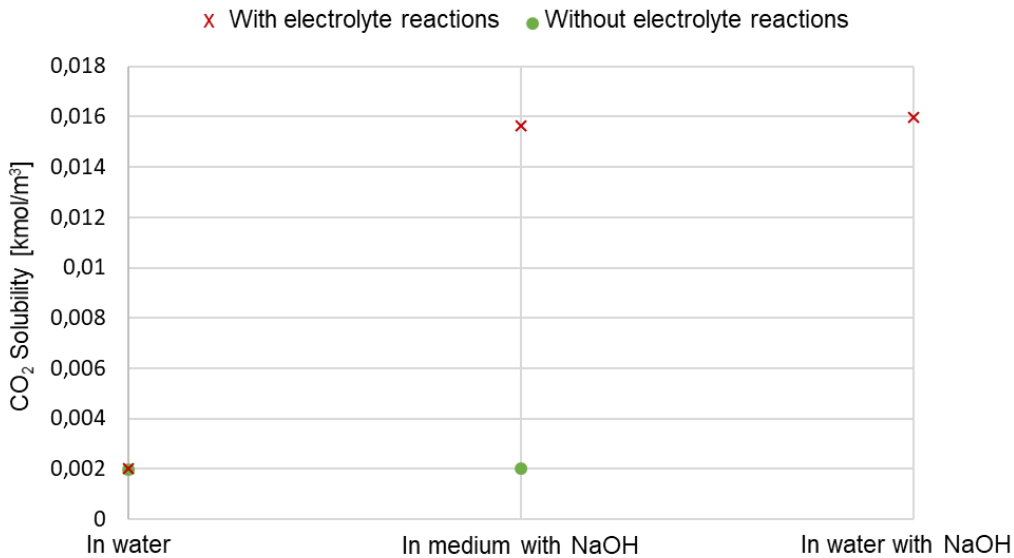


Abbildung 41: Berechnete CO₂ Löslichkeit in AspenPlus mit und ohne Berücksichtigung von Elektrolytreaktionen (T=30 °C, p=1,013 bar, Gaszusammensetzung: H₂=4m%, CO₂=21 m%, N₂=70 m%, H₂O=5 m%)

Die berechnete Löslichkeit von CO₂ ist unter Berücksichtigung von Elektrolytreaktionen 8-mal höher als ohne Berücksichtigung der Reaktionen. Zur korrekten Abbildung des Systems müssen folglich die Elektrolytreaktionen im Modell berücksichtigt werden. Das implementierte Elektrolytsystem ist in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: In AspenPlus implementiertes Elektrolytsystem

Reaction	Type	Calculation of chemical equilibrium
$2 \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{OH}^- + \text{H}_3\text{O}^+$	Equilibrium	build-in coefficients for K_{eq}
$2 \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{HCO}_3^-$	Equilibrium	build-in coefficients for K_{eq}
$\text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{CO}_3^{2-}$	Equilibrium	build-in coefficients for K_{eq}
$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_3\text{O}^+$	Equilibrium	Gibbs free energy calculation
$\text{NaOH} \rightarrow \text{OH}^- + \text{Na}^+$	Dissociation	

Das Modell in AspenPlus ist ein Gleichgewichtsmodell und nimmt in den einzelnen Units chemisches und thermodynamisches Gleichgewicht zwischen Gas- und Flüssigphase an. Als thermodynamisches Modell wurde das Aktivitätskoeffizientenmodell „Electrolyte NRTL“ gewählt. Die Eigenschaften der

Gasphase werden anhand der Redlich-Kwong Zustandsgleichung berechnet. CO₂, H₂ und N₂ wurde als Henry-Komponenten definiert.

b) Übersetzen der Reaktorparameter in Modellreaktor

Im Reaktor findet die Umsetzung von CO₂ und H₂ zu CH₃COOH statt. Charakteristischer Kennwert des Reaktors ist hierbei die volumetrische Produktivität (g/(l*d)). Darüber hinaus stellt sich ein Phasengleichgewicht zwischen Gas- und Flüssigphase im Reaktor ein. In AspenPlus wurde der Reaktor als stöchiometrischer Reaktor mit nachfolgender Flashunit umgesetzt (Abbildung 42).

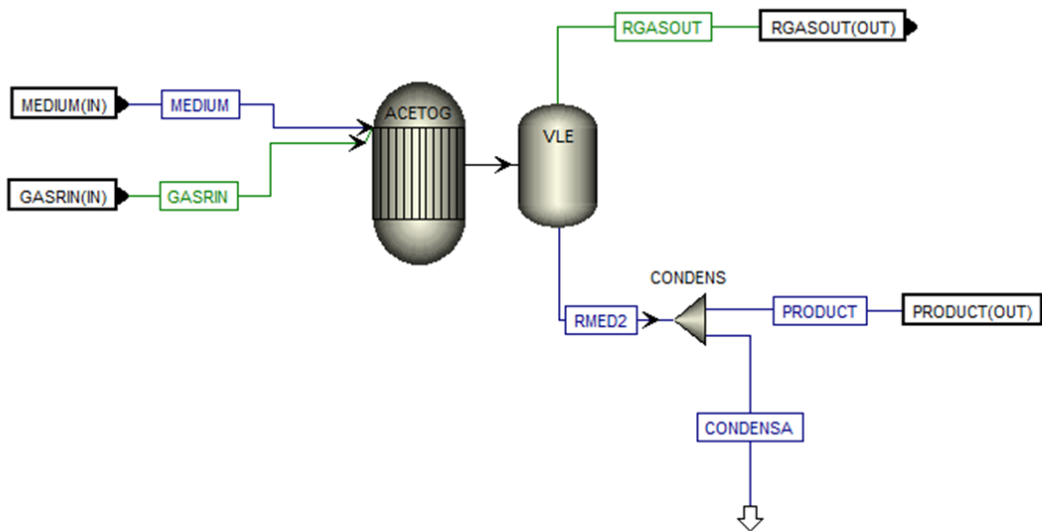


Abbildung 42: Homoacetogenesisreaktor umgesetzt in AspenPlus

Die Flashunit berechnet das Phasengleichgewicht zwischen Gas- und Flüssigphase. Im Reaktor sind folgende stöchiometrische Reaktion implementiert:



Das ist zum einen die gewünschte Hauptreaktion. Zum anderen wurde die Reaktion zu CH₄ implementiert, um die in manchen Laborversuchen beobachtete Methanbildung mit berücksichtigen zu können. Die molare Umsetzung wird in AspenPlus in kmol/d definiert. Diese molare Umsetzung wurde anhand folgender Gleichung von Versuchsergebnissen abgeleitet:

$$\text{Molar extent} \left(\frac{\text{kmol}}{\text{d}} \right) = \frac{V_{\text{liquid in reactor}} (l) \cdot \text{Volumetric productivity} \left(\frac{\text{g}}{\text{l} \cdot \text{d}} \right)}{M_{\text{Product}} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \cdot 1000}$$

c) Aufbau des Prozessflowsheets in AspenPlus

Als Basis für das Prozessflowsheet diente der Versuchsaufbau von BEST GmbH. Das Flowsheet ist in Abbildung 43 schematisch dargestellt.

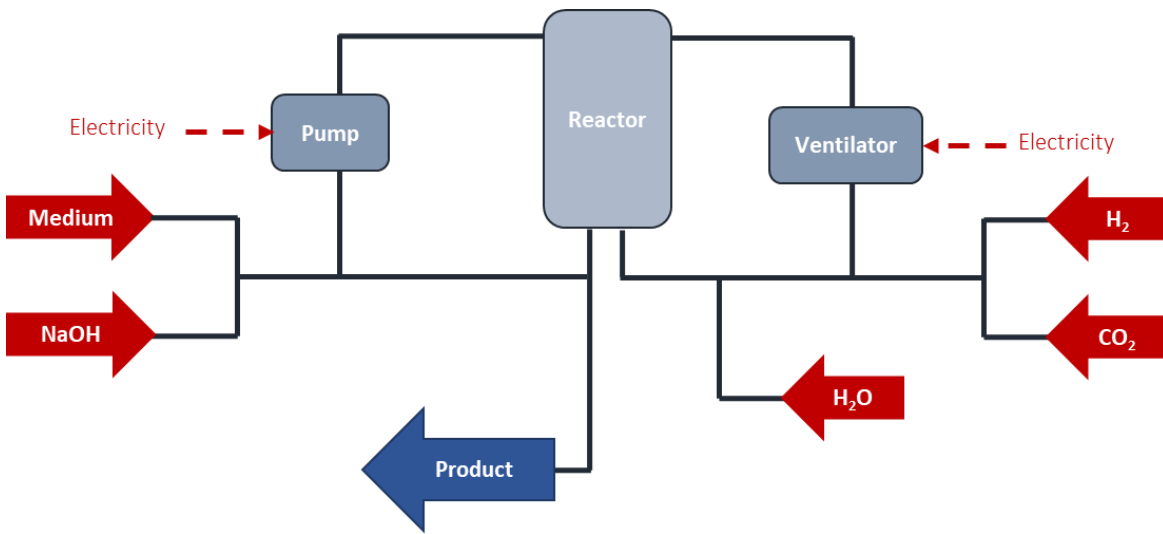


Abbildung 43: Schematische Darstellung des Prozessflowsheets basierend auf Laborreaktor von BEST GmbH

Die NaOH Zufuhr ist im Flowsheet durch einen festsetzbaren pH-Wert geregelt. Bevor das Gas in den Reaktor gelangt, wird es durch einen Wassertank geführt, um zu gewährleisten, dass das Gas für Eintritt in den Reaktor gesättigt ist. Die Gassättigung wurde im Prozessmodell als Flashunit umgesetzt. Das Gas und das Medium wird rezirkuliert. Das Gas/Flüssigverhältnis im Reaktor ist festgelegt. Dem Medium wird ein Produktstrom entnommen.

d) Auswertung des Modells anhand von Messdaten vom Laborreaktor von BEST GmbH

Das Prozessmodell wurde anhand von gemessenen Daten ausgewertet. Dafür wurden die Betriebsbedingungen des Laborreaktors im Prozessmodell eingestellt. Folgende Betriebsparameter wurden im Referenzprozess eingestellt:

Tabelle 18: Betriebsparameter Referenzprozess

Parameter	Einheit	Referenzprozess
pH		4,95
Gasinputzusammensetzung	vol% (Norm, trocken)	H ₂ =40, N ₂ =50, CO ₂ =10
T	°C	30
p	bar	1,013
Gas-/Flüssigverhältnis	m ₃ /m ₃	24,5

Unter diesen Bedingungen wurde eine volumetrische Produktivität von 0.5 g/(ld) CH₃COOH erreicht. Tabelle 19 fasst die Ergebnisse des Prozessmodell und die gemessenen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 19: Gemessene und berechnete Ergebnisse Gaszusammensetzung nach Reaktor

	Einheit	Laborversuch	Prozesssimulation
CO₂	vol% (Norm, trocken)	7.24	7.49
H₂	vol% (Norm, trocken)	34.65	33.26
CH₄	vol% (Norm, trocken)	1.97	1.89

Die Ergebnisse zeigen, dass das Prozessmodell den realen Prozess sehr gut abbildet.

Upscaling des Prozesses mittels Prozesssimulation

Da im Laufe des Projektes neue Erkenntnisse zu optimierten Prozesseinstellungen gefunden wurden, wurden nach der Validierung die Betriebsparameter im Modell angepasst, um das optimierte Verfahren abzubilden. Das Modell mit den optimierten Betriebseinstellungen diente als Basis für ein Upscaling und für die Szenarienbetrachtung. Folgende Prozesseinstellungen wurden für das Upscaling und die ökonomische und ökologische Bewertung im Prozessmodell in Abstimmung mit BEST GmbH und BOKU festgelegt:

Tabelle 20: Festgelegte Betriebsbedingungen optimierter Prozess

Parameter	Einheit	Referenzprozess
pH		7
Gasinputzusammensetzung	mol% (trocken)	H ₂ =70, CO ₂ =30
T	°C	30
p	bar	1,013
Gas-/Flüssigverhältnis		24,5

Für die weiteren Berechnungen wurden die Prozessbedingungen des Verfahrens unter Einsatz von 2-bromoethanesulfonate (BES) gewählt. Durch den Einsatz von BES konnte im Modell davon ausgegangen werden, dass die Methanbildung gänzlich unterdrückt wird. Unter diesen Bedingungen wurde in den Versuchen eine volumetrische Produktivität von 2 g/(ld) CH₃COOH erreicht.

Das Upscaling erfolgte, um den Faktor 4500. Im Upscaling blieben alle Betriebsbedingungen aus Tabelle 20 gleich. Des Weiteren ist angenommen, dass die Geometrieverhältnisse des Reaktors gleichbleiben. Tabelle 21 stellt den Laborreaktor und den Upscaling.Reaktor gegenüber.

Tabelle 21: Upscaling Reaktor

	Einheit	Laborreaktor	Upscaling-Reaktor
Mediuminput in Reaktor	l/h	10	49,5
Gasinput in Reaktor	Nm ³ /h	0,244	1100
Reaktorvolumen	l	4,66	20 970
Reaktormaße	mm	D=110 H=490	D=1817 H=8086

Erweiterung des Flowsheets, um verkaufsfähiges Produkt zu erzeugen

Das Produkt des Laborversuches ist eine Mischung aus Acetat (0,5 gew%), Wasser (99,15 gew%), NaOH (0,25 gew%) und gelöstes CO₂ (0,1 gew%). Um ein verkaufsfähiges Produkt zu erzeugen, ist eine Aufkonzentrierung notwendig. Diese Aufkonzentrierung ist im Prozessmodell mittels einer Dehydration umgesetzt. Dabei wird das Produkt auf 120 °C erhitzt und das Wasser abgeschieden. Nach der Erhitzung bleibt als Produkt Natriumacetat Trihydrat (C₂H₃NaO₂*3H₂O) und Natriumcarbonat (Na₂CO₃) als Feststoff. Abbildung 44 zeigt das Prozessflowsheet erweitert um die Aufkonzentrierung.

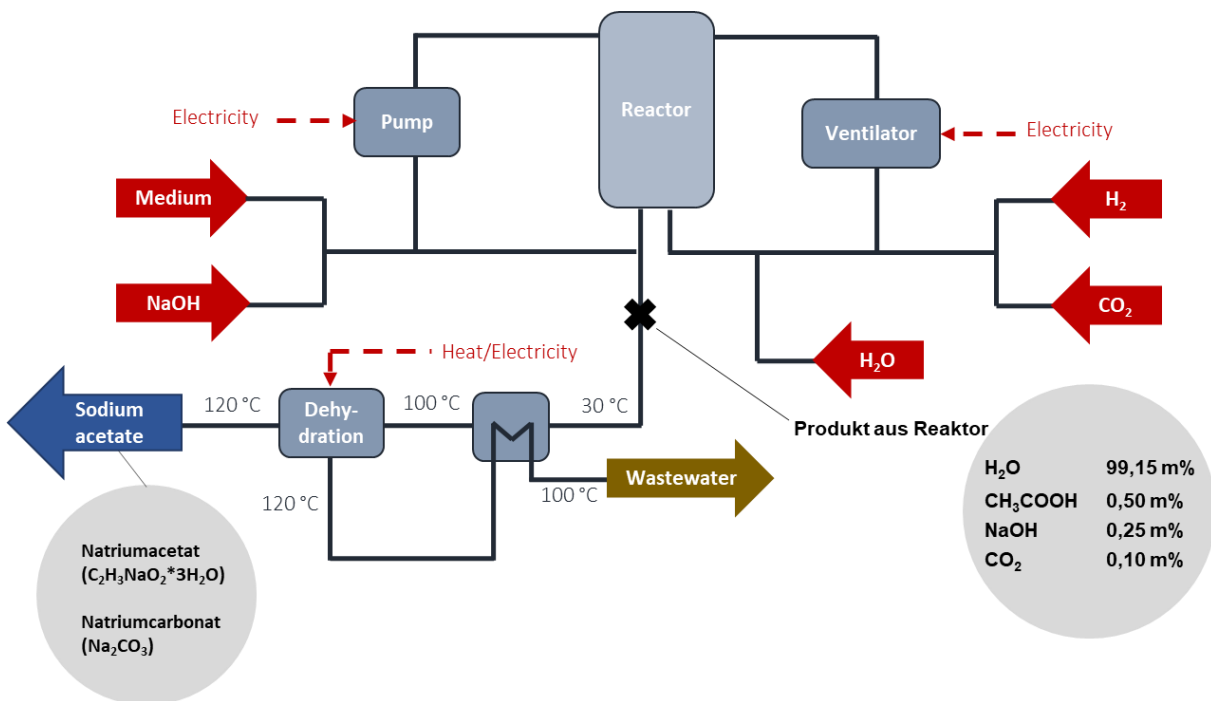


Abbildung 44: schematisches Prozessflowsheet erweitert um Produktaufkonzentrierung

Der Wärmebedarf für die Erhitzung wurde durch eine erste, noch sehr einfache Wärmeintegration reduziert.

Berechnung verschiedener Szenarien und Ergebnisauswertung

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Prozesssimulation ausgeführt. Es wurden 4 Szenarien mit unterschiedlichen volumetrischen Produktivitäten (VP) betrachtet.

In den Versuchen konnte eine stabile VP von 2 g/(ld) erreicht werden. Es ist zu erwarten, dass unter den betrachteten Bedingungen bei einer optimierten Prozessführung eine stabile VP von 5 g/(ld) erreicht werden kann. Als Zukunftsszenarien wurde zusätzlich eine VP von 25 und 100 g/(ld) betrachtet. Diese Szenarien geben einen Ausblick, wie der Prozess aussehen könnte, wenn durch voranschreitende Forschung hohe VP erreicht werden. In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Prozesssimulation zusammengefasst.

Tabelle 22: Ergebnisse der Prozesssimulation für verschiedene volumetrische Produktivitäten (VP)

	Unit	VP100	VP25	VP5	VP2
Input					
CO ₂	kg/h	45,34	11,69	2,64	1,14
H ₂	kg/h	4,11	1,03	0,20	0,09
Wasser gesamt	kg/h	516	239	135	118
NaOH	kg/h	20,44	5,43	1,29	0,64
Produkt					
Menge	kg/h	69,31	17,73	3,76	1,66
Na-Acetat	m%	100	97	90	80
Na ₂ CO ₃	m%	0	3	10	20
Abwasser					
Menge	kg/h	617	240	135	118
CO ₂	mg/kg	249	1047	1298	1290
CH ₃ COOH	mg/kg	48	208	232	230

Der berücksichtigte Energiebedarf setzt sich aus dem Energiebedarf der Pumpe, des Ventilators und der Aufkonzentrierung zusammen. Der Energiebedarf des Ventilators wurde anhand des geförderten Volumenstroms und der notwendigen Druckdifferenz auf 1 kW abgeschätzt. Der Energiebedarf der Pumpe wurde wie folgt abgeschätzt:

$$P_{Motor} = \frac{P_{Pumpe}}{n_{Motor} \cdot n_{Pumpe}} = \frac{\dot{m} \cdot g \cdot h}{n_{Motor} \cdot n_{Pumpe}} = \frac{13,9 \frac{kg}{s} \cdot 9,81 m/s^2 \cdot 11 m}{0,7 \cdot 0,7} = 3061 W = 3 kW$$

Der Energiebedarf der Aufkonzentrierung wurde im Prozessmodell unter Berücksichtigung der in Abbildung 44 dargestellten Wärmeintegration berechnet. Die Ergebnisse des Energiebedarfs sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Berechneter Energiebedarf in kW

	VP100	VP25	VP5	VP2
Ventilator	1	1	1	1
Pumpe	3	3	3	3
Produktaufkonzentrierung	389	151	83	71
Gesamtenergiebedarf	393	155	87	75

Ökonomische Bewertung

Die ökonomische Bewertung besteht aus der Berechnung der Betriebskosten sowie der Investitionskosten für den Anlagenbau und des zu erzielenden Gewinns. Auf Basis dessen wurde der Prozess durch die Berechnung des Return of Investments (ROI) bewertet.

Betriebskosten

Die Betriebskosten setzen sich wie folgt zusammen:

- Energiekosten
- Kosten für Chemikalien: NaOH, Nährstoffe im Medium
- Kosten für Wasserstoff

Die betrachteten Betriebskosten berücksichtigen keine Personalkosten und keine Abwassergebühren. Die Betriebskosten wurden für den Fall berechnet, dass das Wasser ohne Aufbereitung zurückgeführt werden kann. Folgende Preisspanne wurde für die Betriebskosten berücksichtigt:

- Grüner Wasserstoff: 4 €/kg – 6 €/kg
- NaOH: 0,2 €/kg – 0,5 €/kg
- Medium Nährstoffe: 0,1 €/kg - 0,2 €/kg
- Strompreis: 0,15 €/kW - 0,2 €/kW
- Wärmepreis: 0,03 €/kW - 0,05 €/kW

Der Energiebedarf für die Produktaufkonzentrierung wird durch Wärme gedeckt. Der Energiebedarf für Pumpe und Ventilator durch Strom. Die Betriebskosten ergeben sich unter Berücksichtigung der Preisspanne und der in 6.1 zusammengefassten Ergebnisse für die verschiedenen Szenarien.

Tabelle 24 fasst die Betriebskosten für das untere und das obere Preislimit zusammen.

Tabelle 24: Betriebskosten pro Stunde

	Preis min.	VP100	VP25	VP5	VP2	Preis max.	VP100	VP25	VP5	VP2
Input	€/kg	€/h	€/h	€/h	€/h	€/kg	€/h	€/h	€/h	€/h
CO ₂	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00
H ₂	4	-16,44	-4,12	-0,80	-0,36	6	-24,66	-6,18	-1,20	-0,54
NaOH	0,2	-4,09	-1,09	-0,26	-0,13	0,5	-10,22	-2,72	-0,65	-0,32
Medium Nährstoffe	0,1	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	0,2	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02
Energiebedarf	€/kW					€/kW				
Ventilator	0,15	-0,15	-0,15	-0,15	-0,15	0,2	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20

Energieforschungsprogramm - 4. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Pumpe	0,15	-0,45	-0,45	-0,45	-0,45	0,2	-0,60	-0,60	-0,60	-0,60
Produktaufkonzentrierung	0,03	-11,67	-4,53	-2,49	-2,13	0,05	-19,45	-7,55	-4,15	-3,55
Gesamtkosten		-32,81	-10,34	-4,16	-3,23		-55,15	-17,26	-6,81	-5,23
Anteil an Gesamtkosten		%	%	%	%		%	%	%	%
Energiekosten		37	50	74	85		37	48	73	83
H ₂ Kosten		50	40	19	11		45	36	18	10
NaOH Kosten		12	10	6	4		19	16	9	6
Medium Kosten		0	0	0	0		0	0	0	0

Während bei geringer VP die Energiekosten den größten Anteil der Betriebskosten ausmachen, ist der Wasserstoffpreis bei hohen VP ein starker Einflussparameter.

Gewinn

Na-Acetat Trihydrat und Na₂CO₃ können als Produkt verkauft werden. Für das Produkt wurde jeweils eine Preisspanne von 0,3 €/kg bis 1 €/kg angenommen. Tabelle 25 fasst die Einnahmen pro Stunde zusammen.

Tabelle 25: Einnahmen pro Stunde

	Preis min.	VP100	VP25	VP5	VP2	Preis max.	VP100	VP25	VP5	VP2
Produkt	€/kg	€/h	€/h	€/h	€/h	€/kg	€/h	€/h	€/h	€/h
Na-Acetat	0,3	20,79	5,16	1,01	0,40	1	69,31	17,2	3,38	1,33
Trihydrate										
Na ₂ CO ₃	0,3	0,00	0,16	0,11	0,10	1	0	0,53	0,38	0,33
Gesamtgewinn		20,79	5,32	1,12	0,5		69,31	17,73	3,76	1,66

Werden die Betriebskosten mit den Einnahmen verrechnet ergibt sich für die betrachteten Szenarien folgende Bilanzen im Worstcase-Szenario (Betriebskosten am höheren Limit, Produktverkaufspreis am unteren Limit) und im Bestcase-Szenario (Betriebskosten am unteren Limit, Produktverkaufspreis am oberen Limit):

Energieforschungsprogramm - 4. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

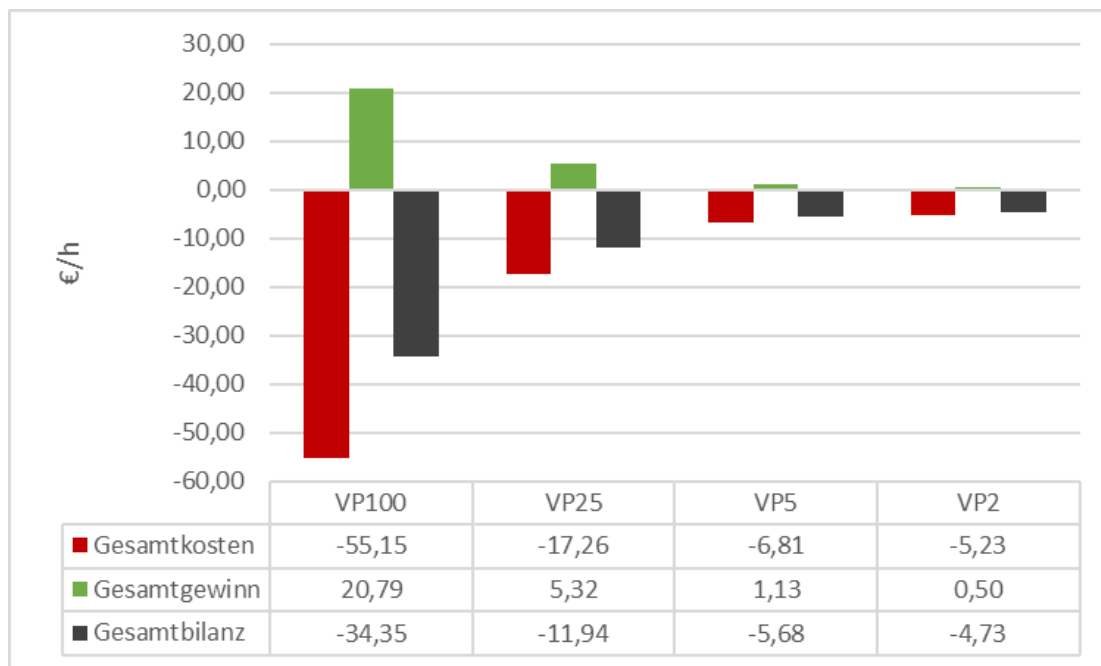


Abbildung 45: Bilanz im Worstcase Szenario (hohe Betriebskosten, niedriger Produktpreis)

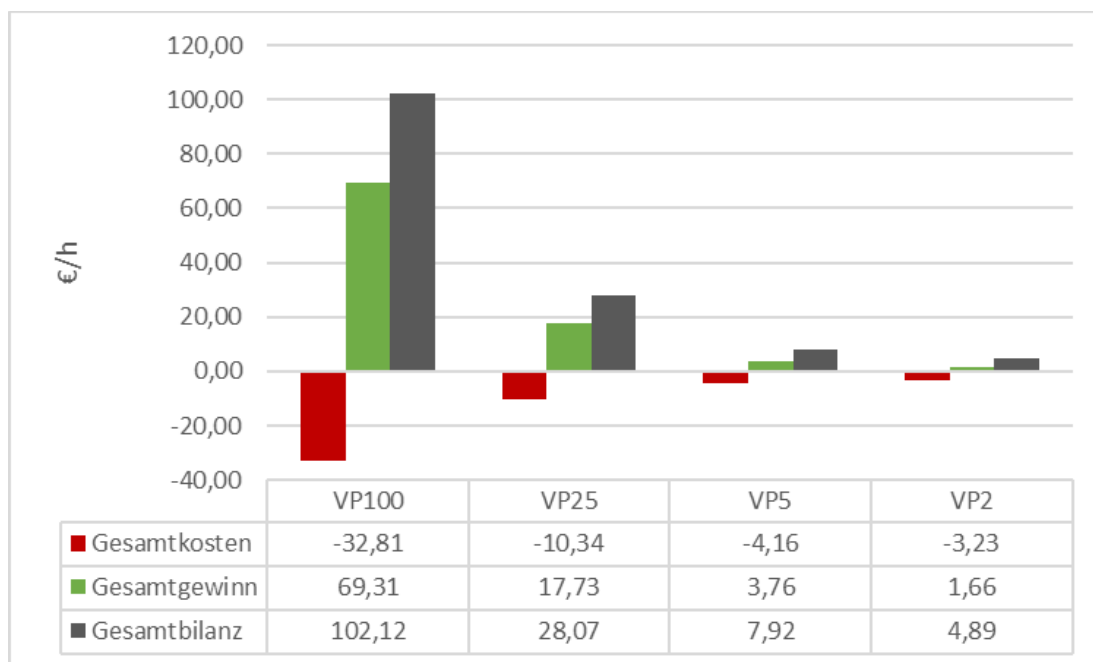


Abbildung 46 Bilanz im Bestcase Szenario (niedrige Betriebskosten, hoher Produktpreis)

Investitionskosten

Im Worstcase Szenario erreicht der Prozess nicht einmal bei sehr hoher VP eine positive Bilanz. Im Bestcase Szenario dagegen können schon bei niedriger VP positive Bilanzen erreicht werden. Die Szenarioberechnung zeigt, dass die ökonomische Bewertung stark von den schwankenden Preisen beeinflusst ist. Für eine genaue Bewertung ist besonders die erzielbare Qualität des Produktes relevant. Um die Qualität des Produktes bewerten zu können, müsste die Aufkonzentrierung experimentell

durchgeführt werden. Eine Prozesssimulation alleine, kann noch keine belastbare Aussage zur Qualität des Produktes liefern.

Investitionskosten:

Die Investitionskosten setzen sich aus Anschaffungskosten und Installation- und Inbetriebnahmekosten zusammen. Tabelle 26 fasst die abgeschätzten Anschaffungskosten für den Bau der Anlage zusammen.

Tabelle 26: Anschaffungskosten

Regelungstechnik & Messtechnik	100 000€
Pumpe	6 000€
Ventilator	10 000€
Reaktor mit Füllung	100 000€
Rohrleitungen	15 000€
Produktaufkonzentrierung	100 000€
Gesamtkosten	331 000€

Die Kosten für die Installation und die Inbetriebnahme setzen sich aus Personalkosten und Materialkosten zusammen. Folgende Annahmen sind für die Berechnung der Personalkosten getroffen worden:

- 12 Personenmonate mit einem Gehalt von 3000 €/Monat
- 1 Personenmonat mit einem Gehalt von 5000 €/Monat

Darüber hinaus entstehen Materialkosten für die Anfahrtzeit der Anlage. Bis die Anlage auf den gewünschten Volumenstrom hochgefahren ist, müssen H₂, NaOH und Nährstoffmedium eingesetzt werden. Diese Kosten werden mit 2000 € abgeschätzt. Damit ergeben sich 42 000 € Installations- und Inbetriebnahmekosten. Aus den Anschaffungskosten und den Installations- und Inbetriebnahmekosten ergeben sich Gesamtkosten von 373 000 €. Nach einem Sicherheitsaufschlag von 20 % wird von einer Gesamtinvestition von 447 600 € ausgegangen. Berechnung des Return of Investment (ROI):

Der Berechnung des ROI liegen folgende Annahmen zu Grunde:

- Nutzungsdauer n = 10 Jahre
- Kalkulationszinssatz i = 0,06
- Jährliche Produktionsstunden: 8256 h/a (3 Wochen Stillstand pro Jahr)
- Jährliche Zahlungen z aus Bilanz für Bestcase Szenario (Abbildung 25)

Der Kapitalwert wurde wie folgt berechnet:

$$C = -I_0 + \frac{q^n - 1}{q^n \cdot i} \cdot z$$

Der ROI stellt das Verhältnis aus Kapitalwert C und Investitionskosten I₀ dar. In Tabelle 27 sind die Ergebnisse zum Kapitalwert und zum ROI zusammengefasst.

Tabelle 27: Kapitalwert und ROI

	Einheit	VP2	VP5	VP25	VP100
Kapitalwert	€	-150703	33415	1258313	5757466
ROI	%	0	0	3	13

In einem Betrachtungszeitraum von 10 Jahren wird für das Szenario VP2 kein positiver Kapitalwert erzielt. Im Szenario VP2 wird erst ab einem Betrachtungszeitraum von > 18 Jahren ein positiver Kapitalwert erzielt.

6.1 Ökologische Bewertung

Für die ökologische Bewertung wurde eine Lebenszyklusanalyse (LCA) durchgeführt. Die LCA verfolgte einen „Cradle to gate“-Ansatz. Die LCA wurde im Tool GaBi durchgeführt. Der Prozess wurde hinsichtlich des Einflussfaktors „Global Warming Potential“ (GWP) mit der Einheit kg CO₂-Eq pro kg Produkt bewertet (CML2001 - Aug. 2016, Global Warming Potential (GWP 100 years)). Die LCA wurde mit dem Hintergrund erstellt den Prozess in eine Biogasanlage zu integrieren. Das benötigte CO₂ wird dem Abgas der Biogasanlage entzogen. Da bei der Biogasanlage Bruck an der Leitha das CO₂ in ausreichend reiner Form anfällt, muss keine weitere Aufbereitung des CO₂ berücksichtigt werden. Die LCA umfasst den Energiebedarf wie in Tabelle 23 zusammengefasst. Des Weiteren ist der Einsatz von NaOH und dessen Herstellungsprozess berücksichtigt, sowie der Einsatz von H₂ und dessen Herstellung mittels Elektrolyse.

Folgende verfügbare „Cradle to gate“ Datensätze kamen für die LCA zum Einsatz:

- Thermische Energie aus Biogas:
 - Datensatz für Österreich
 - Technologiemic
 - Annahme im Datensatz: 100 % Effizienz
- Elektrizität aus Biogas:
 - Datensatz für Österreich
 - Technologiemic
 - Mix aus Kraft-Wärme-Kopplung-Systeme und direkter Wärme
- NaOH-Produktion
 - Datensatz aus internationalem Produktionsprozesses, angepasst für Deutschland
- H₂ aus Elektrolyse
 - Datensatz für Europa

Nicht berücksichtigt ist der Anlagenbau gemäß abgebildeten Flowsheet in Abbildung 47, der Transport von Bedarfsmaterialien, sowie des Produkts, die Flächennutzung und die mögliche Versiegelung und die Produktion der Komponenten im Nährstoffmedium.

Weiters wurde angenommen, dass das Abwasser aus der Aufkonzentrierung ohne Aufbereitung in den Prozess zurückgeführt werden kann.

Energieforschungsprogramm - 4. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

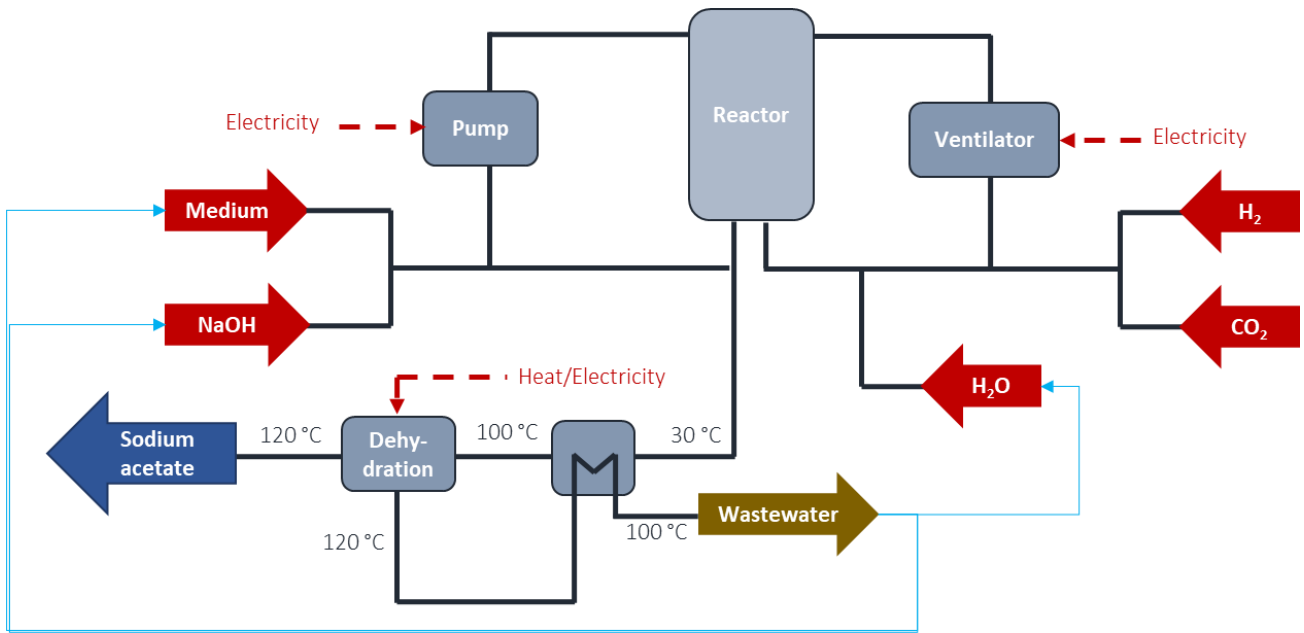


Abbildung 47: Prozessflowsheet mit Wasserrückführung

Die Ergebnisse der LCA wurden auf 1 kg Produkt (Na-Acetat + Na₂CO₃) bezogen. Das GWP wurde einmal für den Fall berechnet, dass der Energiebedarf für die Aufkonzentrierung durch thermische Energie aus Biogas gedeckt wird und einmal für den Fall, dass der Energiebedarf mit Elektrizität aus Biogas gedeckt wird. Die Ergebnisse der Bewertung des Gesamtprozesses sind in Abbildung 48 dargestellt.

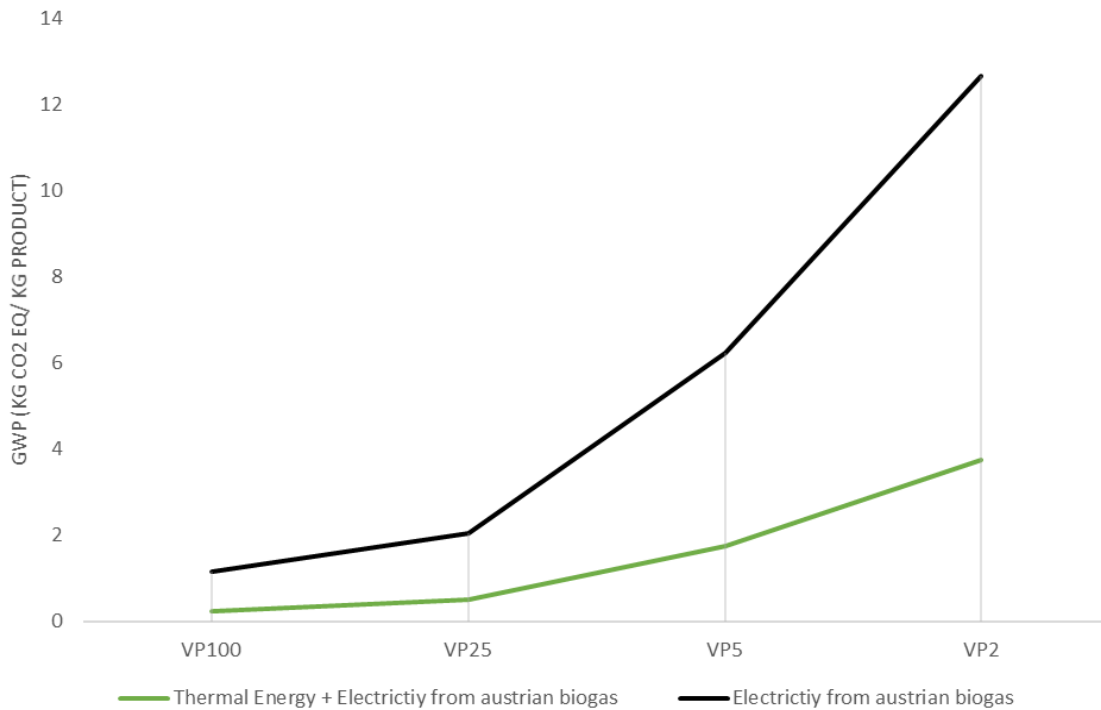


Abbildung 48: GWP des Gesamtprozesses für die Verschiedenen Szenarien (VP100, VP25, VP5 und VP2)

Das GWP ist wesentlich geringer, wenn für die Aufkonzentrierung thermische Energie aus Biogas zum Einsatz kommt. Trotzdem erreicht der Prozess für keines der Szenarien CO₂ Neutralität. Das Szenario

Energieforschungsprogramm - 4. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

mit einer VP von 5 g/(ld) kommt zu einem GWP von 1,75 kg CO₂-Eq/kg Produkt. Eine mögliche Verbesserung der VP würde zu einer Reduzierung des GWP führen. Ein VP von 25 g/(ld) würde ein GWP von 0,5 kg CO₂-Eq/kg Produkt aufweisen. In Abbildung 50 und Abbildung 49 ist das GWP der einzelnen Prozessschritte dargestellt.

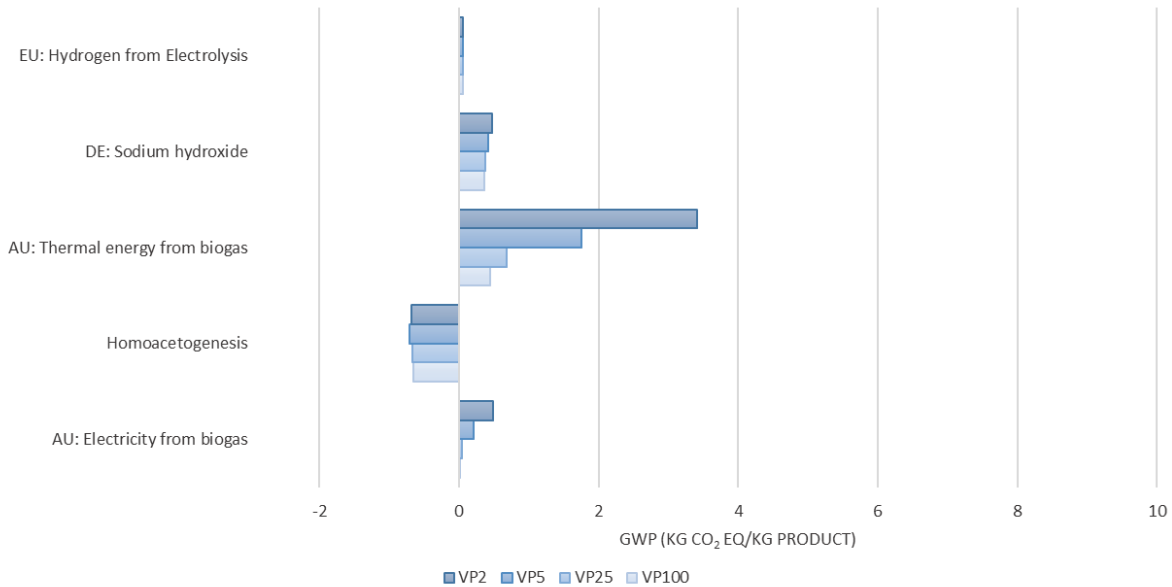
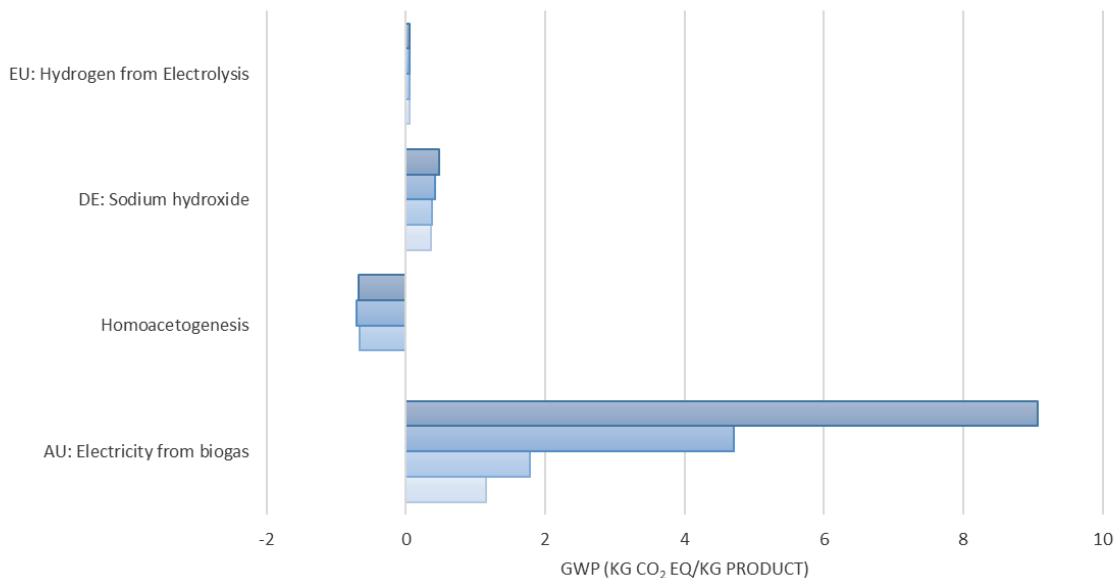


Abbildung 49: GWP der einzelnen Prozessschritte bei thermischer Beheizung in Produktaufkonzentrierung



GWP der einzelnen Prozessschritte bei elektrischer Beheizung in Produktaufkonzentrierung
Abbildung 50: GWP der einzelnen Prozessschritte bei elektrischer Beheizung in Produktaufkonzentrierung

Die Auswertung zeigt, dass die Aufkonzentrierung durch den hohen Energiebedarf den größten Einfluss auf das GWP hat. Eine optimierte Energieintegration kann das GWP des Prozesses verbessern. Auch der Einsatz von NaOH schlägt sich negativ auf das GWP des Gesamtprozesses aus. Dies lässt darauf schließen, dass bei gleichbleibendem VP durch eine Reduzierung des pH-Wertes und ein damit einhergehender reduzierter Einsatz von NaOH zu einer Verbesserung des GWPs führen kann.

Energieforschungsprogramm - 4. Ausschreibung

Klima- und Energiefonds des Bundes – Abwicklung durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft FFG

Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen die oben beschriebenen Einschränkungen berücksichtigt werden. Die Berücksichtigung von Transport und Materialbeschaffung für den Anlagenbau wirken sich negativ auf das GWP aus. In einer Studie von Jungbluth und Nguyen (Jungbluth, Nguyen, 2008) wird für in Europa produziertes Natriumacetat Trihydrate ein GWP von 2,2 kg CO₂-Eq/kg ermittelt. Da das Ergebnis von LCAs sehr von den gewählten Systemgrenzen abhängt, kann der Wert hier nicht direkt verglichen werden, sondern gibt lediglich eine Orientierung für das GWP von herkömmlichen Natriumacetat. So wird in der Studie von Jungbluth und Nguyen beispielsweise der Transport von Materialien zur Anlage mitberücksichtigt. Darüber hinaus, wird in der Studie auf große Unsicherheiten bezüglich Prozessdaten hingewiesen.

5 Ausblick und Empfehlungen

Das Projekt PTLiquid zeigt interessante Ansätze zur biotechnologischen Nutzung von CO₂ mit H₂ und beachtet dabei die essentiellen Aspekte der Skalierbarkeit, Downstreamings und schlussendlich die ökologische und ökonomische Evaluierung des Gesamtprozesses. Auf der biotechnologischen Seite zeigt das Projekt Entwicklungen im Bereich der enzymatischen CO₂ Fixierung und der mikrobiologischen Nutzung über einen mehrstufigen Prozess.

Für den kontinuierlichen Anstieg von CO₂ in der Atmosphäre werden aktuell verschiedene Technologien entwickelt und erprobt, um die Freisetzung von CO₂ zu reduzieren oder wieder einzufangen. Die Technologie zur enzymatischen CO₂ Fixierung und „Verflüssigung“ die im vorliegenden Projekt einwickelt wurde, kann ein Baustein sein, diese Lücke zu füllen. Es konnten stabile und effiziente Enzyme gefunden, aufgereinigt und eingesetzt werden, die die Anforderungen hinsichtlich Temperatur, Stabilität, Konversionsraten etc. erfüllen. Weitere Entwicklungen insbesondere beim Upscaling werden benötigt, um diesen Prozess großtechnisch einsetzen zu können. Das Projekt hat die Funktionalität und eine erste mögliche Anwendung gezeigt. Für die Zukunft und für weitere Entwicklungen kann dieses Projekt als Grundlage dienen, aber es ist auch als Türenöffner neuer Technologien und Entwicklungen zu verstehen.

Die Homoacetogenese, also die Biokonversion von CO₂ und H₂, zu Acetat funktioniert gut. Die untersuchten Bakterien bieten ein großes Repertoire an und decken dabei auch ein großes Spektrum an möglichen Prozessparametern wie pH, Temperatur etc. ab, was wiederum mögliche Einsatzgebiete und Prozessentwicklungen eine gute und breite Basis bietet. Acetat dient als Grundstoff in der chemischen Industrie oder als Intermediat bzw. Precursor für weitere Prozesse und Produkte. Für zukünftige Projekte gibt es umfangreiche Ansätze, die neben den Anwendungen auch weitere Entwicklungen bei der Fermentation inkludieren.

Die elektro-unterstützte Fermentation ist der Prozess im Projekt aus dem schlussendlich das Ethanol aus Acetat gebildet wird. Essentiell ist hierbei, dass die Ausbeuten gesteigert werden und das Upscaling dieses Prozesses erfolgt. Dies ist auch allgemein für die Elektrofermentation anzumerken, was auch eine zentrale Aussage der Webinarreihe biocarboncapture im Jahr 2021 war. Elektrofermentationen können in unterschiedlichen Bereichen eingesetzt werden und bieten eine gute Möglichkeit fermentative Prozesse zu lenken und zu verbessern. PTLiquid zeigt einen Weg auf, doch sind in Zukunft noch weitere möglich. Wichtig ist dabei zu beachten, dass die Ethanolkonzentrationen hoch genug sind, um den Downstreaming Prozess energetisch rechtfertigen zu können.

Als Cross-Technologie ist die Modellierung und Simulation zu sehen. Es konnten sehr gute Ergebnisse gewonnen werden, die in einem nachfolgenden Projekt zum Upscaling genutzt werden können. Dadurch können zeitliche und finanzielle Ressourcen eingespart werden.

Somit lässt sich als konkreter Ausblick die weitere Entwicklung hinsichtlich Upscaling nennen. Zudem sind auch insbesondere auf Grund der guten Ergebnisse die ersten beiden Prozessschritte, Einsatz der carbonischen Anhydrase und der Homoacetogenese, zu nennen. Die ökologischen und ökonomischen Aspekte bei den Prozessen müssen einbezogen werden, um die Nachhaltigkeit zu gewährleisten.

6 Literaturverzeichnis

- Attou, A. & Ferschneider, G. (1999). A two-fluid model for flow regime transition in gas–liquid trickle-bed reactors. *Chemical Engineering Science*, 54, 5031-5037
- Boone, C. D. et al. (2013) 'Carbonic Anhydrase: An Efficient Enzyme with Possible Global Implications', *International Journal of Chemical Engineering*, 2013, pp. 22–27.
- Capasso, C., De Luca, V., Carginale, V., Cannio, R., & Rossi, M. (2012). Biochemical properties of a novel and highly thermostable bacterial α -carbonic anhydrase from *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* YO3AOP1. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.703185>
- Cronk, J. D. et al. (2001) 'Crystal structure of *E. coli* β -carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity', *Protein Science*, 10(5), pp. 911–922.
- Drake, H. L., Gößner, A. S., & Daniel, S. L. (2008). Old acetogens, new light. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 100–128. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.016>
- Dworkin, M. et al. (2006) *The Prokaryotes*. 1. Volume 3. New York: Springer Science + Business Media, LLC.
- Ergun, Sabri (1952). Fluid ow through packed columns. *Chemical Engineering Progress*, 48.2, pp. 89 - 94.
- Esquivel-Elizondo, S., Ilhan, Z. E., Garcia-Peña, E. I., & Krajmalnik-Brown, R. (2017). Insights into Butyrate Production in a Controlled Fermentation System via Gene Predictions. *MSystems*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/msystems.00051-17>
- Fuchs, W., Steger, F., Reich, J., Ribitsch, D., Rittmann, S. K. M. R., & Bochmann, G. (2021). A simple and straightforward method for activity measurement of carbonic anhydrases. *Catalysts*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/catal11070819>
- Jungbluth, N., and Nguyen, B. Life cycle inventory of sodium acetate and expanded graphite: Short report. Switzerland: N. p., 2008. Web.
- Kantzow, C., Mayer, A., & Weuster-Botz, D. (2015). Continuous gas fermentation by *Acetobacterium woodii* in a submerged membrane reactor with full cell retention. *Journal of Biotechnology*, 212, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.07.020>
- Nemec, D. & Levec, J. (2005). Flow through packed bed reactors: 1. Single-phase flow. *Chemical Engineering Science*, 2005, 60, 6947-6957
- Peters, V., Janssen, P. H. and Conrad, R. (1999) 'Transient Production of Formate During Chemolithotrophic Growth of Anaerobic Microorganisms on Hydrogen', *Current Microbiology*, 38(5), pp. 285–289.
- Sakai, S., Nakashimada, Y., Inokuma, K., Kita, M., Okada, H., & Nishio, N. (2005). Acetate and ethanol production from H₂ and CO₂ by *Moorella* sp. using a repeated batch culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(3), 252–258. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.252>
- Smith, K. S., & Ferry, J. G. (1999). A plant-type (β -class) carbonic anhydrase in the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.181.20.6247-6253.1999>
- Sonntag, G. (1960). Einfluß des Lückenvolumens auf den Druckverlust in gasdurchströmten Füllkörpersäulen. *Chemie Ingenieur Technik*, Wiley, 1960, 32, 317-329
- WILBUR, K. M., & ANDERSON, N. G. (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Thieme RÖMPP - Carboanhydrase. Available at: <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-03-00450?searchterm=carboanhydrase&context=search> (Accessed: 13 June 2021).

7 Anhang

8 Kontaktdaten

Prof. DI Dr. Werner Fuchs

Universität für Bodenkultur Wien - Dep. f. Agrarbiotechnologie Tulln, Institut für Umweltbiotechnologie

Konrad Lorenz Strasse 20

3430 Tulln

Werner.fuchs@boku.ac.at

www.boku.ac.at

AAT Abwasser- und Abfalltechnik GmbH

BEST Bioenergy and Sustainable Technologies GmbH

Biogas Bruck/Leitha GmbH & Co KG

EVM Energie Versorgung Margarethen am Moos GmbH

Qualizyme Diagnostics GmbH & Co KG

SPIN Tec GmbH

Technische Universität Wien – Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften