

Basisversuche zur Gewinnung von Ethanol und Wasserstoff mit einem fotosynthetisch-fermentativen Verbundsystem aus Algen, Hefen und Bakterien

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte
Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Peer Ismar
aus Saarbrücken

Berichter: Universitätsprofessor Dr.-Ing. Winfried Hartmeier
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Klaus Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

1	EINLEITUNG	5
1.1	Das Energieproblem	5
1.2	Biogene Brennstoffe	6
1.3	Das geplante Verbundsystem	8
1.4	Stand des Wissens	9
1.5	Problemstellung	11
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Mikroorganismen	13
2.2	Medien und Stammhaltung	15
2.3	Bioreaktoren	17
2.4	Analytik	19
2.4.1	Gase	19
2.4.2	Gelöste Stoffe	20
2.4.3	Wachstumskenngößen	21
2.5	Versuchsaufbauten und -durchführung	22
2.5.1	Versuche mit Grünalgen	22
2.5.2	Versuche mit Hefen	23
2.5.3	Kombination aus alkoholischer Gärung und Fotosynthese	26
2.5.4	Versuche mit Clostridien	26
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Versuche zur Zuckerproduktion im Fotobioreaktor	31
3.1.1	Auswahl und Wachstumsansprüche der Grünalge	31
3.1.2	Wachstum und Zuckerproduktion von <i>Ch. sp. SAG 241.80</i> im Säulenreaktor	32
3.1.3	Wachstum und Zuckerproduktion von <i>Ch. sp. SAG 241.80</i> im Rührreaktor	36
3.1.4	Biomasse-spezifische Zuckerexkretion	39

3.1.5	Sauerstoffkonzentration im Fotobioreaktor -----	42
3.1.6	Lichtabsorption der Grünalgenkultur -----	43
3.2	Versuche zur alkoholischen Gärung-----	44
3.2.1	Auswahl und Wachstumsansprüche der Hefe-----	44
3.2.2	Biomasse-spezifischer Sauerstoffverbrauch -----	46
3.2.3	Einfluss des Atmungsdefektes auf das pH-Optimum von <i>S. cerevisiae</i> -----	47
3.2.4	Biomasse-spezifische Ethanolbildung -----	49
3.2.5	Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Ethanolproduktion -----	51
3.2.6	Schutz vor erhöhter Sauerstoffkonzentration durch Immobilisierung -----	54
3.2.7	Einfluss der Sauerstoffkonzentrationen auf das Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> ----	56
3.3	Kombination aus Fotosynthese und alkoholischer Gärung im Fotobioreaktor --	58
3.3.1	Simulation -----	58
3.3.2	Cokultivierung von Grünalgen und Hefen -----	59
3.4	Versuche zur Wasserstoff- und Säureproduktion -----	62
3.4.1	Auswahl der Clostridienstämme -----	62
3.4.2	Wachstum von <i>C. saccharobutylicum</i> und <i>C. butyricum</i> auf Vollmedium -----	64
3.4.3	Wachstum von <i>C. saccharobutylicum</i> und <i>C. butyricum</i> auf Molke-----	67
3.4.4	Gasbildung durch <i>C. butyricum</i> -----	70
3.4.5	Immobilisierung von <i>C. butyricum</i> -----	71
3.4.6	Einsatz von immobilisiertem <i>C. butyricum</i> in Molke-----	72
3.4.7	Kontinuierliche Molkefermentation mit <i>C. butyricum</i> -----	73
4	DISKUSSION -----	77
4.1	Zuckerproduktion-----	77
4.1.1	Fotobioreaktor-----	77
4.1.2	Zuckerausscheidung bei Algen -----	78
4.1.3	Auswahl des Algenstammes-----	79
4.1.4	Wachstum und Zuckerausscheidung von <i>Ch. sp.</i> SAG 241.80-----	81
4.2	Alkoholische Gärung -----	84
4.2.1	Hefestämme -----	84
4.2.2	Atmungsdefekte Mutanten von <i>S. cerevisiae</i> -----	84

4.2.3	Einfluss des Atmungsdefektes auf das Substratspektrum -----	85
4.2.4	Einfluss des Atmungsdefektes auf das Wachstum -----	88
4.2.5	Spezifische Ethanolbildung von <i>S. cerevisiae</i> -----	89
4.2.6	Vitalitätsverlust bei <i>S. cerevisiae</i> durch hohe Sauerstoffkonzentrationen -----	91
4.2.7	Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> bei Begasung mit Sauerstoff-----	92
4.3	Ethanolproduktion im Fotobioreaktor-----	93
4.3.1	Simulation -----	93
4.3.2	Verbundprozess mit Algen und Hefen -----	94
4.4	Säure- und Wasserstoffproduktion durch Clostridien -----	95
4.4.1	Methodik -----	95
4.4.2	Gärungsprodukte von Clostridien -----	97
4.4.3	Clostridienstämme -----	99
4.4.4	Produktionsraten in ansatzweiser Kultur -----	100
4.4.5	Anwendung von immobilisierten Clostridien -----	101
4.4.6	Kontinuierliche Fermentation und stöchiometrische Bilanzierung -----	102
4.5	Wasserstoffproduktion mit Purpurbakterien -----	104
4.6	Verbundprozess aus anoxigener Fotosynthese und anaerober Gärung-----	105
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick -----	107
5	ZUSAMMENFASSUNG-----	109
6	LITERATUR-----	111
7	ABKÜRZUNGEN -----	121

1 Einleitung

1.1 Das Energieproblem

Die Verknappung der fossilen Brennstoffe sowie der Kohlendioxidanstieg in der Erdatmosphäre mit der globalen Folge des Treibhauseffektes fordern neue Lösungsansätze zur Deckung des Energiebedarfs der Menschheit. Der Weltenergieverbrauch lag im Jahr 2003 bei ca. $4,46 \cdot 10^{14}$ MJ, und bis zum Jahr 2030 wird ein Anstieg auf bis zu $6,91 \cdot 10^{14}$ MJ angenommen (ANONYM 2004). Die Anteile der verschiedenen Energieformen am Weltjahresverbrauch sind in Abb. 1 wiedergegeben. Sollte der Verbrauch der fossilen Energieträger konstant bleiben, so werden die weltweit vermuteten Ressourcen an Kohle ($2,36 \cdot 10^{16}$ MJ) in 218 Jahren, die an Erdöl ($0,63 \cdot 10^{16}$ MJ) in 41 Jahren und die an Erdgas ($0,6 \cdot 10^{16}$ MJ) in 62 Jahren aufgebraucht sein (ANONYM 2004). Wie ergiebig die Kernenergie zukünftig sein wird, ist unklar, denn durch den Einsatz neuer Techniken in Kernkraftwerken sind Effizienzsteigerungen möglich. Jedoch ist auch das in der Kernenergie benötigte Uran ein endlicher Energieträger.

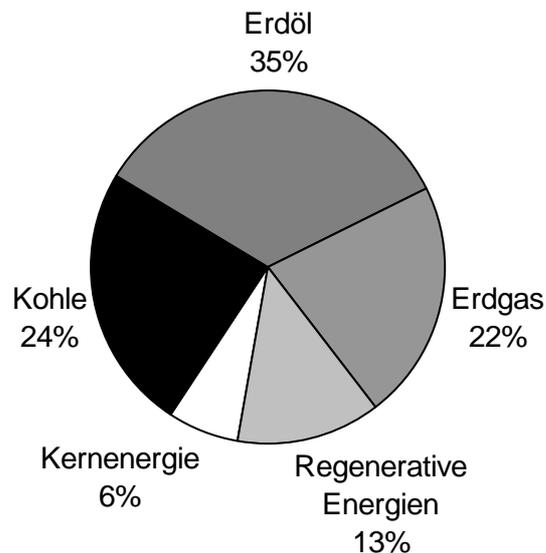


Abb. 1: Zusammensetzung des weltweiten Energieverbrauchs (ANONYM 2004)

Zu den regenerativen Energien zählen, neben Wind-, Wasserkraft und Fotovoltaik auch biologisch nachwachsende, und damit Kohlendioxid-neutrale, Brennstoffe. Durch den durch das Zusatzprotokoll zur Ausgestaltung der Klima-Rahmenkonvention (United Nations Framework Convention on Climate Change, UNFCCC) ermöglichten Handel mit Emissionsrechten (MASOOD 1997) besitzt die Verwendung von Kohlendioxid-neutralen Energien neben der ökologischen Bedeutung großes wirtschaftliches Potential.

1.2 Biogene Brennstoffe

Der Endlichkeit von Gas, Kohle, Öl und Uran steht die Unendlichkeit der Sonnenstrahlung gegenüber. Der Einfall an Strahlungsenergie in die Biosphäre der Erde beträgt bis zu $4000 \text{ kcal m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (ODUM 1983), welches $0,70 \text{ MJ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ entspricht. Es treffen somit innerhalb einer Stunde $1,02 * 10^{14} \text{ MJ}$ Sonnenenergie auf die $1,45 * 10^8 \text{ km}^2$ Landfläche der Erde. Dies ist ungefähr ein Fünftel des Weltjahresverbrauch an Energie durch die Erdbevölkerung.

Eine unmittelbare Gewinnung von Energieträgern aus dieser Strahlungsenergie findet in der Fotosynthese der Pflanzen und bestimmter Bakterienarten statt. So erscheint die Erprobung einer direkten technischen Nutzung fotobiologischer Systeme zur Energiegewinnung sinnvoll. Die Verwendung biogener Festbrennstoffe (z.B. Holz) oder die Nutzung der beim fermentativen Abbau von Pflanzenmaterial entstehenden Biogase und Alkohole sind Beispiele für bereits etablierte Kohlendioxid-neutrale Techniken, die auf der Fotosyntheseleistung der Pflanzen basieren (CHUM ET AL. 2002, GOLDEMBERG ET AL. 2004). Allerdings bleibt ihre Effizienz durch aufwendige Prozessschritte und Transportwege begrenzt. Weiter ist die Verwendung von fotobiologisch synthetisiertem Wasserstoff ein sehr viel versprechender und in zahlreichen Forschungsvorhaben beschrittener Weg (DAS UND VEZIROĞLU 2001, KOKU ET AL. 2002, LEVIN ET AL. 2004a, 2004b). Trotz vieler Erfolge auf diesem Gebiet ist es angebracht, nach weiteren Wegen zur fotobiologischen Energieträgerproduktion zu suchen.

Die Erhaltung der individuellen Mobilität ist trotz des Treibhauseffektes und der Endlichkeit der fossilen Brennstoffe ein unumstrittenes gesellschaftliches Ziel. So kommen den biogenen Energieträgern als Kraftstoffe in Fahrzeugantrieben eine besondere Bedeutung zu. Die in der vorliegenden Studie aus Licht und Abfallstoffen synthetisierten Brennstoffe sind Ethanol und Wasserstoff. Um die hier gemessenen und die in der Literatur dokumentierte Produktionsraten und Produktmengen an Ethanol und Wasserstoff im Bezug auf die Anwendung in Kraftfahrzeugen sinnvoll beurteilen zu können, ist deren Verbrauch auf einer Fahrtstrecke von

100 km mit heute gängigen Antriebssystemen in Tab. 1 dem Verbrauch an konventionellem Treibstoff (Benzin) gegenüber gestellt. Die mittlerweile gängige Anwendung von Ethanol in Verbrennungsmotoren wird hier nicht berücksichtigt, da direkt vergleichbare Verbrauchsraten in der verwendeten Referenz fehlten (ANONYM 2002). Der Verbrauch an Kraftstoffen in den verschiedenen Antriebssystemen variiert in den verschiedenen Studien, abhängig von den gewählten Messbedingungen, liegt jedoch meist in der gleichen Größenordnung. So decken sich die Angaben hinsichtlich des Verbrauchs an Benzin und Wasserstoff im Brennstoffzellenantrieb aus der Studie von der L-B-Systemtechnik GmbH (ANONYM 2002), welche in Zusammenarbeit mit General Motors, BP, Exxonmobil, Shell und TotalFinaElf durchgeführt wurde, in etwa mit denen aus einer Studie des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt (CARPETIS 2000).

Tab. 1: Verbrauch von Kraftstoffen in Fahrzeugen (* nach ANONYM 2002)

Kraftstoff	Heizwert (H_i) MJ kg ⁻¹	Antrieb	Kraftstoffverbrauch *	
			MJ km ⁻¹	kg (100 km) ⁻¹
Benzin	38	Verbrennungsmotor	2,44	6,42
		Brennstoffzelle	1,77	4,66
Ethanol	27	Brennstoffzelle	1,68	6,22
Wasserstoff	120	Verbrennungsmotor	2,03	1,69
		Brennstoffzelle	1,12	0,93

In den Produktionsraten der vorliegenden Studie ist die Menge an gebildetem Ethanol in Milligramm oder Gramm und die Menge an gebildetem Wasserstoff in Litern angegeben. Aus den Dichten der Kraftstoffe und den Daten in Tab. 1 ergibt sich, dass man bei Brennstoffzellenantrieb mit einem Liter Wasserstoff in etwa genauso weit fahren kann wie mit 0,6 g Ethanol bzw. 0,4 g Benzin. Für die Berechnung der verwendeten Wasserstoffdichte wurde die gleiche Temperatur und der gleiche Druck wie bei den Messungen in der vorliegenden Studie angenommen (standard ambient temperature and pressure, SATP). Als Energiegehalt der Kraftstoffe wurde der untere Heizwert (H_i) eingesetzt, die bei der Verbrennung im Wasserdampf enthaltene Energie wurde somit nicht berücksichtigt.

1.3 Das geplante Verbundsystem

Das von HARTMEIER UND ISMAR (2004) geplante und auf der „Second World Biomass Conference“ in Rom vorgestellte Verbundsystem zur fotosynthetisch-fermentativen Herstellung von Treibstoffen integriert vier verschiedene Organismen: Grünalgen, Purpurbakterien, Clostridien und Hefe. Die Grünalgen produzieren auf der dem Sonnenlicht zugewandten Seite des Verbundsystems fotosynthetisch Zucker. Dieser Zucker wird auf der dem Sonnenlicht abgewandten Seite durch die alkoholische Gärung von Hefen in Ethanol umgesetzt. Die äußere Grünalgenkultur soll außerdem den in einem inneren Kompartiment des Verbundsystems kultivierten Purpurbakterien als Lichtfilter dienen, indem sie das für Purpurbakterien schädliche, kurzwellige Licht eliminiert. Die Purpurbakterien produzieren Wasserstoff aus organischen Säuren, welche durch Clostridien zur Verfügung gestellt werden. Die Clostridien sind ebenfalls auf der lichtabgewandten Seite positioniert. Diese vergären Abfallstoffe, wie Molke, zu organischen Säuren (Abb. 2). Durch die Kombination der verschiedenen Organismen bzw. Stoffwechselwege wird eine gegenüber den Einzelprozessen gesteigerte Effizienz des Gesamtsystems erwartet. Das heißt, die Ausbeute an gewonnenen Energieträgern pro sonnenbestrahlter Flächeneinheit soll erhöht werden.

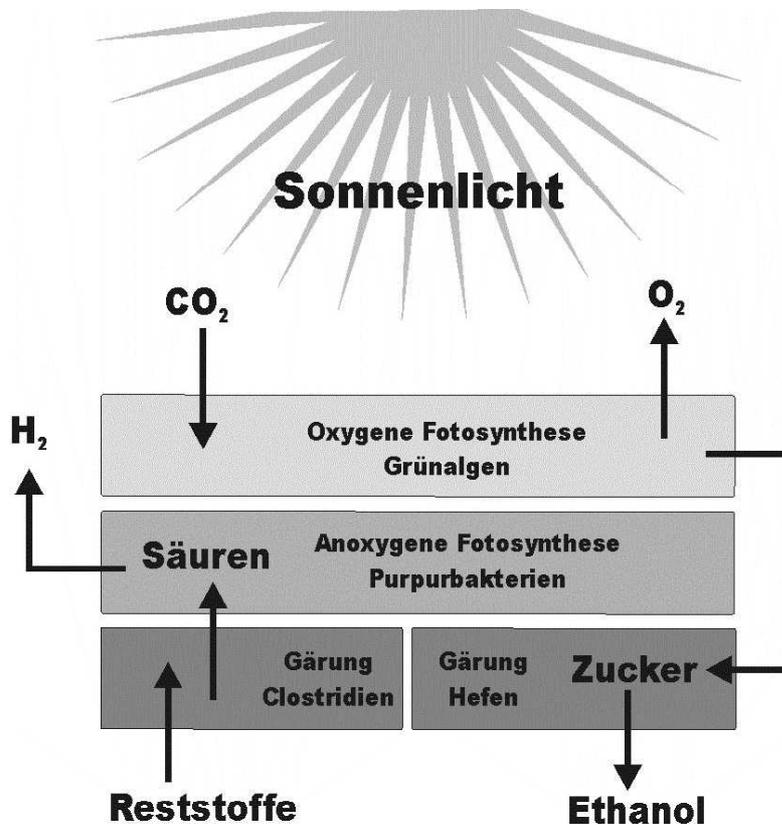


Abb. 2: Geplantes Verbundsystem zur fotobiologischen Produktion von Ethanol und Wasserstoff aus Kohlendioxid und Reststoffen

1.4 Stand des Wissens

Grünalgen und Hefen

Die Exkretion von langkettigen Kohlenhydraten durch Algen ist eine in der Natur häufig beobachtete Eigenschaft. Die Exkretion von kurzkettigen und somit vergärbaren Zuckern ist jedoch sehr selten und beschränkt sich auf im natürlichen Habitat endosymbiotisch vorkommende Grünalgen. Diese haben die Eigenschaft, während ihrer Kultivierung Glucose und Maltose in das Medium abzugeben (KESSLER ET AL. 1991). Im natürlichen Habitat dienen ihnen tierische Organismen, wie *Paramecium*, *Hydra* oder *Sponge*, als Wirt (MUSCATINE ET AL. 1967, CERNICHIARI ET AL. 1969, REISSER 1976A, 1976B). Von KESSLER ET AL. (1991) sind 38 Stämme der Gattung *Chlorella* untersucht und als zuckerausscheidend beschrieben worden. Der Stamm *Chlorella* sp. SAG 241.80 gehört dabei zu den Stämmen mit der höchsten Zuckerproduktion. Auch die in der Literatur dokumentierten technischen Anwendungen der Zuckerexkretion von Grünalgen verwenden ausschließlich den Stamm *Chlorella* sp. SAG 241.80 (BRÉCHIGNAC UND SCHILLER 1992, BRÉCHIGNAC UND WOLF 1994a, 1994b, WOLF 1996, 1997), bzw. messen bei diesem die höchsten Zuckerproduktionsraten (MÜCKE 1985). WOLF (1996) beschreibt für *Chlorella* sp. SAG 241.80 eine Zuckerproduktionsrate von 2,5 g Maltose pro g Trockenbiomasse und Tag bei einer Biomassekonzentration von 0,25 g Trockengewicht pro l Reaktorvolumen. Die hier dokumentierten Untersuchungen ergänzen die Basisversuche zur Ethanolproduktion aus CO₂ und Licht von MÜCKE (1985), welche grundlegend für die Entwicklung des geplanten Systems sind. MÜCKE (1985) konnte bei der Kultivierung von *Chlorella* sp. SAG 241.80 auf vitamin- und peptonhaltigen Nährsalzmedien Zuckerexkretionsraten von bis zu 2,5 g Maltose pro l Reaktorvolumen und Tag messen.

Während der Kultivierung von fotosynthetisch aktiven Grünalgen kommt es in Fotobioreaktoren zu erhöhten Sauerstoffpartialdrücken. Die verwendete Hefe sollte einen Atmungsdefekt aufweisen, da sonst der Sauerstoff die alkoholische Gärung zugunsten verstärkter Zellbiosynthese unterdrücken würde. Die mitochondriale DNA von Hefewildstämmen lässt sich durch Kultivierung in Gegenwart bestimmter Mutagene ganz oder teilweise entfernen (SLONIMISKI ET AL. 1968). Weiter gibt es die Möglichkeit, durch den Einbau so genannter Deletionsboxen ins Kerngenom (WINZELER ET AL. 1999) bestimmte Atmungskettenenzym-codierende Gene aus dem Hefegenom zu entfernen. Diese Verluste von Erbgut führen zur Einschränkung der Atmungsaktivität bis hin zum totalen Atmungsdefekt.

Bei einer theoretischen Umsetzung des durch die Algen produzierten Zuckers in der alkoholischen Gärung von *Saccharomyces cerevisiae* könnten Ethanolbildungsraten von $14 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (basierend auf Daten von WOLF 1996) bis zu $56 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (basierend auf Daten von MÜCKE 1985) erreicht werden. Der von MÜCKE (1985) verwendete Fotobioreaktor hatte ein Verhältnis zwischen bestrahlter Oberfläche und Volumen von $1,18 \text{ cm}^{-1}$. Daraus ergibt sich eine theoretische flächenbezogene Ethanolproduktionsrate von $475 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, welche einer Energieträgerproduktion (berechnet mit H_2) von $13 \text{ kJ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ entspricht. Weiter besteht die Möglichkeit einer direkten Reduktion der CO_2 -Emission durch die Verwendung von Industrieabgasen zum Kohlenstoffeintrag in die Algenkultur (HANAGATA ET AL. 1992, WATANABE ET AL. 1992).

Clostridien und Purpurbakterien

Die Produktion organischer Säuren aus Abfall- und Reststoffen (z.B. Molke oder Melasse) durch Clostridiengärung ist prinzipiell möglich und in der Literatur beschrieben (ENNIS UND MADDOX 1987, VANDÁK ET AL. 1995a, 1995b). Um die Betriebskosten gering zu halten, müssen die Clostridien die in den Abfallstoffen befindlichen Zucker möglichst ohne Additive, wie Hefeextrakt oder Vitamine, zu organischen Säuren umsetzen können. Die bei der Gärung von *Clostridium butyricum* entstehenden Säuren sind größtenteils Butter- und Essigsäure. Milchsäure entsteht auch, doch meist in deutlich geringeren Mengen (VANDÁK ET AL. 1995a).

In dem geplanten System können Butter- und Essigsäure als reduzierende Substrate für die anoxygene Fotosynthese der Purpurbakterien dienen. Meistens wurde in Versuchen zur Wasserstoffproduktion mit Purpurbakterien Milchsäure oder Äpfelsäure als Wasserstoffdonator für die anoxygene Fotosynthese verwendet (KIM ET AL. 1987, TSYGANKOV ET AL. 1998, HACKETHAL 1999, KOKU ET AL. 2002), aber auch die Verwendung von Butter- und Essigsäure ist möglich (MIYAKE ET AL. 1984, YOKOI ET AL. 1998b, KOKU ET AL. 2002). In vorangehenden Untersuchungen am Lehrstuhl für Biotechnologie (HACKETHAL 1999) wurden mit *Rhodospirillum rubrum* flächenbezogene Wasserstoffproduktionsraten bis zu $21 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ erreicht, was einer Energieträgerproduktion von etwa $20 \text{ kJ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ entspricht.

Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur technischen Nutzung bakterieller Wasserstoffproduktion (TRAMM-WERNER ET AL. 1996, ASADA UND MIYAKE 1999, AKKERMAN ET AL. 2002), und auch die Kombination von Clostridien und Purpurbakterien zur Wasserstoffgewinnung findet sich in der Literatur (MIYAKE ET AL. 1984, YOKOI ET AL. 1998b). Das Verfahren wurde bereits 1985 in Japan patentiert (MIYAKE ET AL. 1985).

1.5 Problemstellung

Hinsichtlich einer Anwendung im fotosynthetisch-fermentativen Verbundsystem soll die Möglichkeit einer technischen Nutzung der Zuckerexkretion endosymbiotischer Grünalgen untersucht werden. Dabei soll, wenn möglich, auf kostenintensive Medienbestandteile, wie Proteine oder Vitamine, verzichtet werden, um die Wirtschaftlichkeit des Prozesses zu steigern.

Der Einsatz von atmungsdefekten Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* zur aeroben Ethanolproduktion unter Zuckerlimitierung und in Gegenwart sehr hoher Sauerstoffkonzentrationen soll einen Schwerpunkt dieser Arbeit bilden. Dabei sollen verschieden geartete Atmungsdefekte bei *S. cerevisiae* berücksichtigt und Cokultivierungen von Algen und atmungsdefekten Hefen in Pilotversuchen im Labormaßstab durchgeführt werden.

Wasserstoffproduktionsraten und Säureanteile an den Produkten der Umsetzung von Molke durch Clostridien sollen erfasst und die Verwendbarkeit der verschiedenen Säuren als Elektronendonator bei der anoxygenen Fotosynthese von Purpurbakterien anhand von Literaturdaten diskutiert werden.

Die Untersuchungen sollen Chancen, aber auch mögliche Grenzen einer zukünftigen Kombination der Einzelprozesse aufzeigen.

2 Material und Methoden

Chemikalien

Alginat (Kelco, Hamburg)

Anaerocult A (Merck, Darmstadt)

Antischaummittel, Plurafac LF 1300 (BASF, Ludwigshafen)

Hefeextrakt (DHW, Hamburg)

Kohlenstoffdioxid 2.5 (Westfalen AG, Münster)

Pepton, tryptisch verdaut (Roth, Karlsruhe)

Reinforced Clostridial Media, RCM (Merck, Darmstadt)

Sauerstoff 2.5 (Westfalen AG, Münster)

Stickstoff 2.8 (Westfalen AG, Münster)

Stickstoff 5.0 (Westfalen AG, Münster)

Süßmolke (Borculo Whey Products, Borculo, NL)

Wasserstoff 5.0 (Messergriesheim GmbH, Krefeld)

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Fluka (Neu-Ulm) in der Reinheitsstufe „pro analysi“ (p.a.) bezogen.

2.1 Mikroorganismen

Algenstämme

Die verwendeten Algenstämme gehörten alle der Gattung *Chlorella* an und stammten aus der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften).

Tab. 2: Verwendete Algenstämme der Gattung *Chlorella*

Art	Stamm	Eigenschaft
<i>Ch. sp.</i>	SAG 241.80	Endosymbiont aus <i>Paramecium bursaria</i>
<i>Ch. sorokiniana</i>	SAG 211-40c	Endosymbiont aus <i>Spongilla fluviatilis</i>
<i>Ch. mirabilis</i>	SAG 211-11r	Freilebende Alge
<i>Ch. sphaerica</i>	SAG 11.88	Phycobiont aus <i>Pseudocryphellaria carpoloma</i>
<i>Ch. sp.</i>	SAG 211-6	Endosymbiont aus <i>Paramecium bursaria</i>

Hefestämme

Die Stämme *S. cerevisiae* DSMZ 1333 und *S. cerevisiae* CBS 1172 wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bzw. von dem Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, NL) bezogen. Der zu *S. cerevisiae* S288c isogene Stamm *S. cerevisiae* BY4741 (BRACHMANN ET AL. 1998) und die verschiedenen Mutanten von *S. cerevisiae* BY4741 mit Kerndeletionen (Tab. 3) wurden von EUROSCARF (Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt, Institut für Mikrobiologie) bezogen. ρ^0 -Mutanten der Wildtypen wurden nach der Methode von SLONIMSKI ET AL. (1968) hergestellt. Das Fehlen von mitochondrialer DNA in den ρ^0 -Mutanten wurde durch DAPI-Färbung nach der Methode von WILLIAMSON UND FENNELL (1979) bestätigt.

Tab. 3: Verwendete Hefestämme der Gattung *Saccharomyces*

Hefe	Stamm	Eigenschaft
<i>S. cerevisiae</i>	DSMZ 1333	Brennereihefe
<i>S. cerevisiae</i>	DSMZ 1333 ρ^0	Ethidiumbromid-Mutante
<i>S. cerevisiae</i>	CBS 1172	Bäckerhefe
<i>S. cerevisiae</i>	CBS 1172 ρ^0	Ethidiumbromid-Mutante
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741	Haploider Laborstamm
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741 ρ^0	Ethidiumbromid-Mutante
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741 Δcox7	Mutante mit spez. Gendeletion
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741 Δcox5a	Mutante mit spez. Gendeletion
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741 Δmba1	Mutante mit spez. Gendeletion

Clostridienstämme

Die verwendeten Clostridienstämme *C. acetobutylicum* DSMZ 792, *C. butyricum* DSMZ 10702, *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 und *C. thermobutyricum* DSMZ 4928 wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

2.2 Medien und Stammhaltung

Algen

Zur Algenanzucht und zur Aufnahme von Wachstumskurven wurde Nährsalzmedium (NM) nach KÜHL (1962) (Tab. 4) verwendet. Gegebenenfalls wurden Vitamine (NMV) und tryptisch verdautes Pepton (NMVP) in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

Tab. 4: Zusammensetzung der Algenmedien NM, NMV, NMVP und EM

Nährsalze:	mg l ⁻¹	mol l ⁻¹	NM	NMV	NMVP	EM
KCl	745,5	1,0 * 10 ⁻²	-	-	-	+
KNO ₃	1011,0	1,0 * 10 ⁻²	+	+	+	-
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	621,0	4,5 * 10 ⁻³	+	+	+	+
Na ₂ HPO ₄	71,0	0,5 * 10 ⁻³	+	+	+	+
MgSO ₄ 7H ₂ O	246,5	1,0 * 10 ⁻³	+	+	+	+
CaCl ₂	12,6	1,0 * 10 ⁻⁴	+	+	+	+
FeSO ₄ 7H ₂ O	7,0	2,5 * 10 ⁻⁵	+	+	+	+
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	9,3	2,5 * 10 ⁻⁵	+	+	+	+
Spurenelemente:						
H ₃ BO ₃	0,061	1 * 10 ⁻⁶	+	+	+	+
MnSO ₄ H ₂ O	0,169	1 * 10 ⁻⁶	+	+	+	+
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,287	1 * 10 ⁻⁶	+	+	+	+
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,003	1 * 10 ⁻⁸	+	+	+	+
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,012	1 * 10 ⁻⁸	+	+	+	+
Sonstige Additive:						
Vitamin B ₁	0,5		-	+	+	+
Vitamin B ₁₂	0,005		-	+	+	+
Pepton	1000		-	-	+	-

Die Erfassung der Biomasse-spezifischen Stoffwechselraten erfolgte in stickstofffreiem Exkretionsmedium (EM). In einigen Versuchen wurde NMV-Medium mit zehnfach erhöhtem NaH₂PO₄- und Na₂HPO₄-Anteil verwendet. Der pH-Wert des eingesetzten Mediums betrug immer pH 6,0. Stammhaltung und Wachstumstests erfolgten auf Schrägagar bzw. Agarplatten mit 3 % bzw. 1,5 % Agar. Die Medien wurden 20 Minuten lang bei 120 °C autoklaviert. Die Vitaminzugabe zum Medium erfolgte nach dessen Abkühlung durch einen Sterilfilter.

Hefen

Die Stammhaltung der Hefestämme erfolgte auf Schrägagarröhrchen mit YE-Medium (2 % Hefeextrakt, 3 % Glucose, 3 % Agar). Die Wachstumstests erfolgten auf Agarplatten mit YE-Medium (2 % Hefeextrakt, 3 % Kohlenstoffquelle, 1,5 % Agar) mit qualitativ unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Zur Bestimmung von Wachstumsraten und zur Hefemassegewinnung (für den Einsatz in weiterführenden Versuchen) wurde flüssiges YE-Medium mit 0,5 % bis 1 % Hefeextrakt und quantitativ und qualitativ variierenden Kohlenstoffquellen verwendet. Die Medien wurden 20 Minuten lang bei 120 °C autoklaviert.

Clostridien

Die Stammhaltung der Clostridien erfolgte in wässriger Sporensuspension (siehe 2.5.4). Wachstum und Produktbildung wurden auf synthetischem Vollmedium nach MONOT ET AL. (1982) (Monot), auf einem durch Hefeextrakt- und Peptonzugabe verstärktem Monot-Medium (Monot⁺) und auf 6 %iger Süßmolke (Molke) untersucht. In einigen Versuchen wurde der Molke Hefeextrakt zugesetzt, oder es wurde auf die Zugabe von Hefeextrakt zum Monot⁺-Medium verzichtet. Im Monot⁺-Medium wurde wahlweise Glucose oder Lactose als Kohlenhydratquelle eingesetzt. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tab. 5 wiedergegeben.

Tab. 5: Zusammensetzung der Clostridienmedien

Medium	Zusammensetzung
Monot	45 g l ⁻¹ Glucose oder Lactose 2,2 g l ⁻¹ Ammoniumacetat 0,5 g l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0,5 g l ⁻¹ K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O 0,2 g l ⁻¹ MgSO ₄ 7H ₂ O 0,01 g l ⁻¹ FeSO ₄ 7H ₂ O 0,01 g l ⁻¹ MnSO ₄ H ₂ O 0,01 mg l ⁻¹ Biotin 1,00 mg l ⁻¹ p-Aminobenzoensäure
Monot ⁺	wie Monot mit Zusatz von 10 g l ⁻¹ Hefeextrakt 10 g l ⁻¹ Pepton
Molke	60 g l ⁻¹ Süßmolke
RCM	33 g l ⁻¹ Reinforced Clostridial Media

Die Medien hatten einen pH-Wert von pH 6,5 und wurden 20 Minuten lang bei 120 °C autoklaviert. Medien in Reagenzgläsern und Steilhalsflaschen wurden nach dem Autoklavieren in einem Anaerobentopf unter Stickstoffatmosphäre abgekühlt. Rührreaktoren wurden direkt nach dem Autoklavieren verschlossen, um einen niedrigen Sauerstoffgehalt im Medium zu erreichen. Die Zugabe von sterilgefilterten Biotin- und p-Aminobenzoesäure-Lösungen erfolgte erst kurz vor dem Animpfen.

2.3 Bioreaktoren

Fotobioreaktoren zur Algenkultivierung

Zur autotrophen Kultivierung von Mikroorganismen wurden die in Tab. 6 genannten und in Abb. 3 skizzierten zylindrischen Fotobioreaktoren aus Glas verwendet. Das zur Begasung verwendete Luftgemisch wurde mit 2 % CO₂ (Flowmeter SHO-Rate II 1355 Series, Firma Brooks, Veenendaal, NL) angereichert und durch einen Sterilfilter in den Bioreaktor geleitet.

Tab. 6: Verwendete Fotobioreaktoren

	Füllvolumen (ml)	Mantelfläche (cm ²)	Durchmesser (cm)	Begasung (l h ⁻¹)	Rührerdrehzahl (1 min ⁻¹)
Säulenreaktor	10	27	1,5	3	-
Säulenreaktor	400	458	3,5	12,5	-
Rührreaktor	800	376	8,5	12,5	100

Die Fotobioreaktoren wurden von einer Seite mit Leuchtstoffröhren aus einer Entfernung von 12 cm dauerbeleuchtet (3 x TLD 18W/965, Royal Philips Electronics, Amsterdam, NL). Die Beleuchtungsstärke auf der Reaktoroberfläche wurde mit einem Luxmeter (LX-107, Lutron Electronics Ent. Co., Taipeh, TW) überwacht. Sie betrug bei allen Versuchen 10000 lx. Da die Bioreaktoren nur einseitig beleuchtet wurden, war nur die Hälfte der Reaktormantelfläche dem Licht ausgesetzt. Der pH-Wert im Rührreaktor wurde mit einer pH-Elektrode überwacht und durch automatische Zugabe von 1 M HCl gesteuert. Die Temperierung auf 25 °C erfolgte über die Umgebungsluft im Thermokonstantraum.

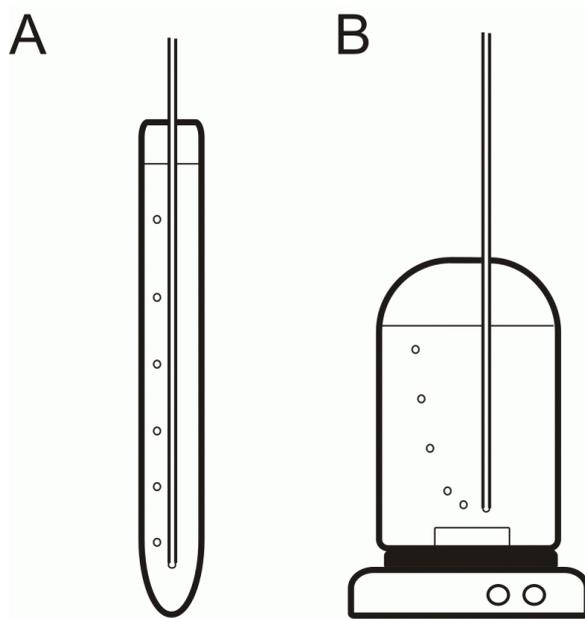


Abb. 3: Verwendete Reaktortypen (A: Säulenreaktor; B: Rührreaktor)

Bioreaktor zur Hefekultivierung

Zur Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselraten der Hefen wurde ein Rührreaktor (Füllvolumen 1 l) aus Glas verwendet (Abb. 3). Die Rührerdrehzahl betrug 100 min^{-1} . Wahlweise wurde mit Luft oder reinem Sauerstoff mit einer Durchsatzrate von $12,5 \text{ l h}^{-1}$ begast. Der pH-Wert wurde mit einer pH-Elektrode überwacht. Der Sauerstoffgehalt wurde während der Kultivierung mit einer an der Innenseite des Bioreaktors angebrachten Sensormembran (siehe 2.4.1) optisch gemessen. Für kontinuierliche Fermentationen konnte Substratlösung mit einer Pumpe gleichmäßig in den Bioreaktor gegeben werden. Die Temperierung des Bioreaktors erfolgte mit einem wasserdurchfluteten Aluminiumdoppelmantel.

Bioreaktor zur Clostridienkultivierung

Zur Bestimmung von Wachstums- und Produktionsraten der Clostridien wurde ein Rührreaktor (Füllvolumen 1 l) aus Glas verwendet (Abb. 3). Die Rührerdrehzahl betrug 100 min^{-1} . Der pH-Wert wurde mit einer pH-Elektrode überwacht und konnte durch automatische Zugabe von 3 M NaOH gesteuert werden. Für kontinuierliche Fermentationen konnte Substratlösung mit einer Pumpe durch den Bioreaktor geleitet werden, wobei die Zu- und Abpumprate gleich war. Die Gasbildung der Clostridien wurde mit einer Gasfalle ermittelt (Abb. 4). Teilweise erfolgte die Dokumentation der Gasbildung über einen

Messrechner (Software: Flexpro Version 2, Weisang AG, St. Ingbert), welcher an die Waage angeschlossen war. Die Temperierung des Bioreaktors auf 37 °C erfolgte mit einem wasserdurchfluteten Aluminiumdoppelmantel.

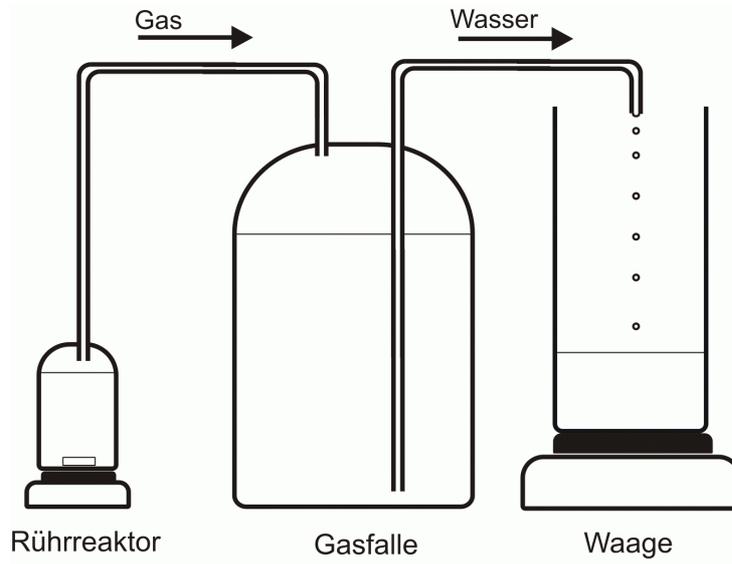


Abb. 4: Gasfalle zur Bestimmung der Gasproduktion

2.4 Analytik

2.4.1 Gase

Sauerstoff

Die Methode zur optischen Messung von gelöstem Sauerstoff basiert auf der Messung der Abnahme der Lumineszenz einer Sensormembran verursacht durch die Gegenwart von molekularem Sauerstoff. Die Anregung der Membran und die Messung der Lumineszenz erfolgte computergesteuert über ein Glasfaserkabel. PSt3-Sensormembran, Fibox 3 (Messgerät) und die Software (Oxyview-PSt3-V5.20) stammten von der Firma PreSens (Regensburg).

Wasserstoff

Die Wasserstoffkonzentration im Gärgas wurde mit einem Gaschromatographen (Hewlett-Packard 5890 series II, Waldbronn), ausgestattet mit einem TC-Detektor und einer 0.32-Carboxen-1010-Säule (Supelco, Bellefonte, US), unter Verwendung von Stickstoff (1 ml min^{-1}) als Trägergas bestimmt. Die Ofentemperatur betrug 40 °C, die Injektor- und

Detektortemperatur jeweils 230 °C. Die Kalibrierung erfolgte durch Injektion unterschiedlicher Mengen Wasserstoff.

2.4.2 Gelöste Stoffe

Zucker

Glucose-, Lactose- und Maltosekonzentrationen wurden mit einer HPLC-Dionex DX 500 (Dionex, Sunnyvale, US), ausgestattet mit einem PAD-ED 40 und einer Carbowac PA-1-Säule, bestimmt. Die Flussrate betrug 1 ml min⁻¹. Als interner Standard diente Saccharose. In dieser Arbeit werden häufig verschiedene aus Glucose aufgebaute Zucker zusammengefasst. Die angegebene Zuckermenge entspricht dann der Menge an Glucose, die zur Synthese der verschiedenen Zucker theoretisch notwendig war.

Alkohole, Ketone und Säuren

Die Konzentrationen an Aceton, Buttersäure, 1-Butanol, 2-Butanol, Essigsäure und Ethanol wurden mit einem Gaschromatographen (Hewlett-Packard 5890 series II, Waldbronn), ausgestattet mit einem FI-Detektor und einer 0.25-TS-FFAP-CB-Säule (CS GmbH, Langerwehe), unter Verwendung von Stickstoff (1 ml min⁻¹) als Trägergas bestimmt. Die Ofen-, Injektor- und Detektortemperatur betrug 70 bis 200, 220 bzw. 220 °C. Zur Messung der Ethanolkonzentration wurde 1-Butanol als interner Standard verwendet. Zur Quantifizierung von Aceton, Buttersäure, 1-Butanol, 2-Butanol und Essigsäure wurde 2-Pentanol als interner Standard verwendet. Die Proben wurden mit Ameisensäure angesäuert (2 % im Messansatz), um die Butter- und Essigsäure in ihre freie Form zu überführen.

Salze

Nitrat

Die fotometrische Bestimmung des Nitratgehaltes während der Kultivierung der Grünalgen erfolgte über die Bildung von orangefarbenem 4-Nitro-2,6-dimethylphenol aus Nitrat und 2,6-Dimethylphenol in schwefel- und phosphorsaurer Lösung. Die Durchführung, die verwendeten Konzentrationen und die Verhältnisse der verwendeten Lösungen zueinander entsprachen der DIN 38405-9 (Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Anionen (Gruppe D); Bestimmung des Nitrat-Ions (D9), Ausgabe: 1979-05). Um das verwendete Probenvolumen zu verringern, wurde die Analytik mit einem

gegenüber der DIN-Methode verkleinerten Gesamtvolumen von 1,9 ml im Eppendorfgefäß durchgeführt.

Phosphat

Die Phosphatkonzentration während der Kultivierung der Grünalgen wurde nach der Methode von TAUSSKY UND SHORR (1953) ermittelt. An Stelle eines Farbabgleichs im Kolorimeter wurde die Extinktion der Messlösungen bei 740 nm im Fotometer zur Quantifizierung verwendet.

2.4.3 Wachstumskenngrößen

Optische Dichte

Als Maß für die Zelldichte und zur Dokumentation des Zellzuwachses wurde während der Kultivierung der Mikroorganismen die Optische Dichte (OD) bei 1 cm Schichtdicke gemessen. In den Versuchen mit Grünalgen geschah dies bei einer Wellenlänge von 660 nm, bei den Versuchen mit Hefen und Clostridien bei einer Wellenlänge von 620 nm.

Sporen- und Zelldichte

Die Sporen- bzw. Zellzahl pro Milliliter wurde durch Auszählen von geeigneten Verdünnungsstufen in einer Neubauer-Kammer bestimmt.

Chlorophyllgehalt

Die Chlorophyllkonzentration während der Kultivierung der Grünalgen wurde fotometrisch nach der Methode von HOLDEN (1965) ermittelt.

Biomasse

Als Maß für die Biomasse diente das Zelltrockengewicht. Zur Bestimmung des Zelltrockengewichts wurde die Kulturbrühe über einen Celluloseazetatfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm abgenutscht. Der Rückstand wurde bis zur Gewichtskonstanz bei 100°C getrocknet und anschließend gewogen.

2.5 Versuchsaufbauten und -durchführung

Die nachfolgenden Versuche wurden alle unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das bedeutet, dass das Animpfen von Kulturen und die Immobilisierung von Mikroorganismen stets an der Sterilbank durchgeführt wurde und dass ausschließlich sterilisierte Geräte und autoklavierte Medien und Lösungen verwendet wurden. Die Besonderheiten bei den Versuchen mit Clostridien hinsichtlich der Anwendung einer Schutzatmosphäre aus Stickstoff und die Verwendung von sauerstoffarmen Medien, werden an entsprechender Stelle extra erwähnt.

2.5.1 Versuche mit Grünalgen

Wachstumsansprüche

Um die Ansprüche an das Nährmedium bei autotropher Kultivierung zu untersuchen, wurden die Algenstämme auf Schrägagarröhrchen mit NM-, NMV-, und NMVP-Medium ausgestrichen (siehe 2.2). Nach sechs Tagen Inkubation unter Dauerlicht bei 25 °C im Thermokonstantraum wurde das Wachstum überprüft.

Wachstumsraten

Zur Bestimmung von Wachstums- und Zuckerproduktionsraten wurden Vorkulturen im 10-ml-Säulenreaktor mit NMV-Medium angeimpft. Nach fünf Tagen wurde mit der Vorkultur ein 400-ml-Säulenreaktor bzw. ein 800-ml-Rührreaktor mit NMV-Medium angeimpft. Die anfängliche OD 660 betrug zwischen 0,15 und 0,25. Die Messung der OD 660 zur Bestimmung der maximalen Wachstumsrate (μ_{\max}) und die Probenahme zur Bestimmung des Trockengewichts, der Zelldichte sowie der Zucker-, Chlorophyll-, Nitrat- und Phosphatkonzentration erfolgten zehn Tage lang alle 48 Stunden. Der pH-Wert wurde im Säulenreaktor extern gemessen.

Biomasse-spezifische Zuckerekkretion

Zur Untersuchung der Biomasse-spezifischen Zuckerekkretion der Grünalgen wurde Algenbiomasse zehn Tage lang, wie oben beschrieben, im 400-ml-Säulenreaktor auf NMV-Medium vorkultiviert. Die Algenbiomasse wurde durch Zentrifugation (6800 g, 20 min) geerntet und zweimal mit steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen. Das Algenpellet wurde in 400 ml oder 800 ml sterilem EM-Medium suspendiert und in einen sterilen Säulenreaktor (400 ml) bzw. Rührreaktor (800 ml) gegeben. Die Messung der OD 660 und

die Probenahmen zur Bestimmung der Zucker-, Chlorophyll- und Phosphatkonzentration sowie der Zelldichte erfolgten zehn Tage lang alle 48 Stunden. Der pH-Wert wurde bei der Anwendung des Säulenreaktors extern gemessen. Nach zehn Tagen wurde das Trockengewicht der Algenbiomasse bestimmt. In einer anderen Versuchsvariante wurde die Algenbiomasse vor dem Einsatz in EM-Medium in Alginatkugeln immobilisiert. Die Immobilisierung erfolgte nach dem zweiten Waschen durch eine Suspension der Algenmasse in 2 %iger Alginatlösung und Eintropfen der Suspension in eine 2 %ige CaCl₂-Lösung. Die entstandenen Kugeln wurden zur Aushärtung über Nacht in 0,5 %iger CaCl₂-Lösung bei 4 °C gelagert.

Sauerstoffkonzentration im Fotobioreaktor

Zur Untersuchung der Sauerstoffkonzentration im Fotobioreaktor wurde Algenbiomasse, wie oben beschrieben, im 400-ml-Säulenreaktor herangezogen. Nach Erreichen einer OD 660 von 10 wurde 30 Minuten lang die Begasung abgeschaltet und die Zunahme der Sauerstoffkonzentration bestimmt. Unmittelbar nach der Messung wurde das Trockengewicht der Algenkultur ermittelt.

2.5.2 Versuche mit Hefen

Wachstumsansprüche

Zur Untersuchung der Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen durch die getesteten Hefestämme wurden diese auf Agarplatten mit YE-Medium mit Glucose, Galactose, Maltose, Saccharose, Raffinose oder Glycerin als jeweils einziger Kohlenstoffquelle ausgestrichen und sowohl aerob als auch anaerob bei 30 °C inkubiert. Anaerobe Verhältnisse wurden durch Inkubation in einem Anaerobentopf unter Zusatz von Anaerocult A erzeugt. Nach drei Tagen wurde das Wachstum überprüft.

Wachstumsraten

Zur Bestimmung der Wachstumsraten wurden 5 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 30 °C stehend inkubiert. Mit diesen wurden 100 ml Hauptkultur, in 1-l-Erlenmeyerkolben, angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Messung der OD 620 zur Bestimmung der maximalen Wachstumsrate (μ_{\max}) sowie die Probenahme zur Bestimmung der Zucker- und Ethanolkonzentration erfolgte zehn Stunden lang alle 60 Minuten. Die Vor- und Hauptkultur enthielt 1 % Glucose bzw. Maltose und 0,5 % Hefeextrakt.

Einfluss verschiedener Gase auf das Wachstum

Zur Untersuchung des Hefewachstums während der Begasung mit Luft bzw. Sauerstoff wurden die Hefestämme in 100-ml-Schüttelkultur auf YE-Medium (1 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt) aerob bei 30°C angezogen. Nach Erreichen der maximalen Zelldichte wurden damit 900 ml YE-Medium (1 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt) im 1-l-Rührreaktor angeimpft und bei 30 °C inkubiert. Die Messung der OD 620 zur Bestimmung von μ_{\max} sowie die Probenahme zur Bestimmung der Zucker- und Ethanolkonzentration erfolgte zehn Stunden lang alle 60 Minuten. Durch Wiederholung des Versuches mit Luft- und Sauerstoffbegasung wurde der Einfluss der verschiedenen Gase auf das Hefewachstum untersucht.

Biomasse-spezifischer Sauerstoffverbrauch

Zur Bestimmung der Biomasse-spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate wurde, wie bei der Aufnahme der Wachstumsrate, die Hefe in 100-ml-Schüttelkultur (1 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt) aerob bei 30 °C angezogen. Nach Erreichen der maximalen Zelldichte wurden 5 ml Kulturbrühe zentrifugiert (3800 g, 20 min) und das Pellet zweimal mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen. Die Hefemasse wurde in 70 ml 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,5) mit 0,1 % Glucose resuspendiert und in eine geschlossene temperierbare Messzelle gegeben. Dort wurde unter leichtem Rühren bei 30 °C die Sauerstoffabnahme (siehe 2.4.1) bestimmt. Anschließend wurde das Trockengewicht des Messansatzes bestimmt.

Biomasse-spezifische Ethanolbildung

Zur Bestimmung der Biomasse-spezifischen Ethanolbildungsrate wurde die Hefe in 100-ml-Schüttelkultur (1 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt) aerob bei 30 °C angezogen. Nach Erreichen der maximalen Zelldichte wurden 50 ml der Kulturbrühe zentrifugiert (3800 g, 20 min) und das Pellet zweimal mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen. Das Pellet wurde in 100 ml 0,01 M Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,5) mit 0,2 % Glucose resuspendiert. Die Hefesuspension wurde steril in einen 1-l-Erlenmeyerkolben gegeben und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Eine Probenahme zur Bestimmung der Zucker- und Ethanolkonzentration erfolgte fünf Stunden lang alle 60 Minuten. Anschließend wurde das Hefetrockengewicht der Messansätze bestimmt. Mit dem Stamm *S. cerevisiae* DSMZ 1333 (Wildtyp und ρ^0 -Mutante) wurde der Versuch mit der doppelten Menge an Biomasse (Pellet aus 100 ml) bei Glucosekonzentrationen von 0,2 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 % und 7 % sowohl in 100-ml-Schüttelkulturen (1-l-Erlenmeyerkolben) als auch in stehenden 100-ml-Kulturen (100-ml-Steilhalsflaschen) wiederholt.

Ethanolbildung bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Zur Untersuchung des Einflusses der Sauerstoffkonzentration auf die alkoholische Gärung wurden die Hefestämme in 100-ml-Schüttelkultur (1 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt) aerob bei 30 °C angezogen. Nach Erreichen der maximalen Zelldichte wurde die Kulturbrühe zentrifugiert (3800 g, 20 min), das Pellet zweimal mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und in 1 l 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,5) mit 1 % Glucose resuspendiert. Die Hefesuspensionen wurden in den 1-l-Rührreaktor gegeben und bei 30 °C ohne Begasung inkubiert. Die Sauerstoffkonzentration im Medium wurde dokumentiert. Die Probenahme zur Bestimmung der Ethanol- und Zuckerkonzentration erfolgte sechs Stunden lang alle 60 Minuten. Die durchschnittlichen Ethanolbildungsraten von Zweistundenintervallen wurden berechnet. Anschließend wurde das Hefetrockengewicht des Messansatzes bestimmt. Durch Wiederholung des Versuches mit Luft- und Sauerstoffbegasung konnte der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die alkoholische Gärung ermittelt werden.

Einsatz von Hefeimmobilisaten bei erhöhten Sauerstoffkonzentrationen

Es wurde weitgehend wie beim Versuchsaufbau „Ethanolbildung bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen“ (siehe oben) verfahren. Die Immobilisierung erfolgte nach dem zweiten Waschen durch Suspension der Hefemasse in 2 %iger Alginatlösung und Eintropfen der Suspension in eine 2 %ige CaCl₂-Lösung. Die entstandenen Immobilisatkügelchen wurden zur Aushärtung über Nacht in 0,5 %iger CaCl₂-Lösung kühl gelagert. Der Parallelansatz mit nativer Hefemasse wurde ohne vorangehende Immobilisierung ebenfalls in 0,5 %iger CaCl₂-Lösung über Nacht gekühlt. Die Messung erfolgte wie unter „Ethanolbildung bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen“ (siehe oben) beschrieben, mit den Unterschieden, dass ausschließlich mit Sauerstoffbegasung gearbeitet wurde, dass 0,01 M Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,5) mit 1 % Glucose verwendet wurde und dass der Versuchszeitraum auf acht Stunden ausgedehnt wurde.

pH-Optimum der Hefen

Zur Bestimmung der Wachstumsraten bei verschiedenen pH-Werten wurde weitgehend wie beim Versuchsaufbau „Wachstumsraten“ (siehe oben) vorgegangen. Das Medium der Hauptkultur wurde jedoch mit 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer mit pH-Werten von pH 3 bis pH 7 angesetzt. Zur Bestimmung der Ethanolbildung bei verschiedenen pH-Werten wurde weitgehend wie beim Versuchsaufbau „Biomasse-spezifische Ethanolbildung“ (siehe oben)

verfahren. Die Messungen erfolgten jedoch in 100 ml 0,01 M Citrat-Phosphat-Puffer mit 0,2 % Glucose bei pH-Werten von pH 3 bis pH 7.

2.5.3 Kombination aus alkoholischer Gärung und Fotosynthese

Alkoholische Gärung im simulierten Fotobioreaktor

Zur Simulation eines Fotobioreaktors wurde die Hefe in 250-ml-Schüttelkultur (2 % Maltose, 1 % Hefeextrakt) aerob bei 30 °C angezogen. Nach Erreichen der maximalen Zelldichte wurde die Kulturbrühe zentrifugiert (6800 g, 20 min) und das Pellet zweimal mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen. Das Pellet wurde in 900 ml NMV-Medium resuspendiert, in den Rührreaktor überführt und bei 25 °C mit Luftbegasung inkubiert. Die Zuckerexkretion der Grünalgen wurde durch einen kontinuierlichen Substratzulauf simuliert. Der Zulauf betrug 13 ml EM-Medium mit 20 % Maltose pro Tag. Die Probenahme zur Bestimmung der Ethanol- und Zuckerkonzentration erfolgte acht Tage lang alle 48 Stunden.

Cokultivierung von Algen und Hefen im Fotobioreaktor

Zum Aufbau eines Reaktionssystems aus Algen und Hefen wurde Algenbiomasse zehn Tage lang im 400-ml-Säulenreaktor auf NMV-Medium vorkultiviert (siehe „Wachstumsraten“ 2.5.1). Die Algenbiomasse wurde durch Zentrifugation (6800 g, 20 min) geerntet und zweimal mit steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen. Das Algenpellet wurde in EM-Medium suspendiert und in einen sterilen 400-ml-Fotosäulenreaktor gegeben. Die Hefe wurde in 100-ml-Schüttelkultur auf YE-Medium (1 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt) aerob bei 30 °C angezogen, zweimal mit steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und in 100 ml Kochsalzlösung suspendiert. 16 Stunden nach Umsetzung der Algenbiomasse in den Fotobioreaktor wurden 5 ml der Hefesuspension zugegeben. Die Messung der OD 660 und die Probenahme zur Bestimmung der Zucker-, Nitrat-, Phosphat- und Ethanolkonzentration sowie der Zelldichte erfolgten 80 Stunden lang mindestens alle zwölf Stunden. In einer zweiten Variante wurden 10 ml Hefesuspension direkt mit der Algensuspension in den Fotobioreaktor gegeben.

2.5.4 Versuche mit Clostridien

Der Versuch zur „Verwertbarkeit von Molke durch die Clostridienstämme“ wurde vollständig unter einer Schutzatmosphäre aus Stickstoff durchgeführt (Anaerobierbank). Alle übrigen Versuche wurden mit sauerstoffarmen Medien durchgeführt (siehe 2.2.) Die Inokulationen

erfolgten an der Luft. Durch Abdichten der Kapsenberg-Kappen auf den 5-ml-Reagenzgläsern bzw. auf den 100-ml-Steilhalsflaschen mit Parafilm entstand durch die Gasbildung während des Wachstums eine sauerstofffreie Atmosphäre in den Kulturgefäßen. Die Umrechnung von Gasvolumina in Molmengen erfolgte nach dem Gesetz für ideale Gase unter der Annahme einer konstanten Raumtemperatur von 25 °C und einem konstanten Luftdruck von 1 bar (standard ambient temperature and pressure, SATP).

Verwertbarkeit von Molke durch die Clostridienstämme

Zur Untersuchung der Verwertbarkeit von Molke durch die verschiedenen Stämme wurden 5-ml-RCM-Kulturen mit Sporenyophilisat aus der DSMZ angeimpft. Die Kulturen wurden einem Hitzeschock (20 min, 80 °C) mit anschließender Kühlung auf Eis unterworfen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden mit je 100 µl der Kulturen 5-ml-Kulturen mit Molke-, Monot- und Monot⁺-Medium angeimpft. Als Kohlehydratquelle diente immer Lactose. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde mögliches Wachstum anhand der Gas- bzw. Schaumbildung überprüft. Im Falle von Wachstum auf Molke wurde die Kultur zum Animpfen einer 100-ml-Kultur mit Molke verwendet. Aus diesen bei 37 °C stehend inkubierten Kulturen wurden drei Tage lang Proben zur Bestimmung des Säure- und Lösungsmittelgehaltes gezogen.

Herstellung der Sporensuspension

Zur Stammhaltung und zur Inokulation der ersten Vorkultur für die Wachstumsversuche mit Clostridien wurden Sporensuspensionen der jeweiligen Stämme verwendet. Zur Gewinnung der Sporen wurden stehende 5-ml-Kulturen mit sauerstoffarmem RCM mit lyophilisierten Sporen aus der DSMZ angeimpft. Die Kulturen wurden einem Hitzeschock (20 min, 80 °C) ausgesetzt und nach Abkühlen (auf Eis) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese erste Vorkultur diente zur Inokulation einer zweiten stehenden 100-ml-Kultur mit Monot⁺-Medium (mit Glucose). Nach erneuter Inkubation über Nacht bei 37 °C erfolgte die Inokulation von 900 ml Hauptkultur (Monot⁺ mit Glucose) in einer 1-l-Schottflasche. Spätestens nach drei Tagen Inkubation mit nicht festgedrehtem Deckel bei 37 °C war es zur Sporulation gekommen. Die Sporen wurden zentrifugiert (6800 g, 20 min) und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Das gewaschene Sporenpellet wurde in destilliertem Wasser suspendiert und die Sporendichte wurde bestimmt. Die Lagerung der Suspension erfolgte bei 4 °C. *C. thermobutyricum* DSMZ 4928 konnte in den eigenen Versuchen nicht zur Sporulation gebracht werden.

Wachstum und Produktbildung im Rührreaktor

Mit 100 µl Sporensuspension wurden 5 ml Vorkultur angeimpft. Diese wurde zum Animpfen einer zweiten 100-ml-Vorkultur verwendet, welche wiederum zu 900 ml Hauptkultur in den 1-l-Rührreaktor (siehe 2.3) gegeben wurde. Die Inkubationen der Vorkulturen erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die erste Vorkultur wurde vor der Inkubation, wie oben beschrieben, hitzegeschockt. Die Zusammensetzung des Mediums in den Vorkulturen und in der Hauptkultur war immer gleich. Während der Hauptfermentation wurden Proben zur Bestimmung der Optischen Dichte sowie der Säure-, Lösungsmittel und Zuckerkonzentration genommen. Der pH-Wert und die gebildete Menge an Gas wurden dokumentiert. Gegebenenfalls wurde Antischaummittel zugesetzt. Die Versuchsdauer und die Zeitpunkte der Probenahme hingen vom Versuchsverlauf ab. In einer besonderen Versuchsvariante wurde die Gasbildung indirekt über die Gewichtsabnahme der Hauptkultur dokumentiert. Die Inkubationstemperatur betrug immer 37 °C.

Immobilisierung der Clostridien

Die Immobilisierung der Clostridien in Alginat erfolgte durch Mischen von 50 ml Sporensuspension und 150 ml 4 %iger Alginatlösung und Eintropfen der Suspension in eine 2 %ige CaCl₂-Lösung. Die Immobilisierung in Pektin erfolgte durch Mischen von 30 ml Sporensuspension und 120 ml 6,25 %iger Pektin-N-lösung und Eintropfen der Suspension in eine 2 %ige CaCl₂-Lösung. Die entstandenen Kugeln aus Alginat und Pektin wurden zur Aushärtung über Nacht in 0,5 %iger CaCl₂-Lösung kühl gelagert. Zur Herstellung von Immobilisaten aus PVA wurden 10 g Polyvinylalkohol mit 10 g PEG-1000 in 90 ml destilliertem Wasser bei 90°C gelöst. Nach Abkühlen wurde 1 ml 30 %ige NaOH unter Rühren zugegeben. Nach 30 Minuten Rühren wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt. Es wurden 4 ml Sporensuspension eingerührt und diese Präpolymerlösung wurde zur Aushärtung in -70° C kaltes Siliconöl eingetropft. Zur Überprüfung der Keimungsfähigkeit der immobilisierten Clostridiensporen wurden je 50 Kugeln der verschiedenen Immobilisattypen in 5-ml-Kulturen mit verschiedenen Medien bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der bei der Keimung von nativen Sporen angewandte Hitzeschock musste wegen der Temperaturinstabilität der Immobilisate ausfallen. Eine Keimung der immobilisierten Sporen konnte durch das Aufsteigen der Immobilisate aufgrund der Gasbildung festgestellt werden.

Einsatz von immobilisierten Clostridien

Die Herstellung der eingesetzten Alginatimmobilisate erfolgte wie zuvor unter „Immobilisierung der Clostridien“ beschrieben. Nach dem Aushärten wurden 100 g (Abtropfgewicht) Immobilisat in eine 1-l-Schottflasche mit 900 ml Monot⁺-Medium überführt. Der Ansatz wurde stehend ohne pH-Steuerung bei 37 °C inkubiert. Durch eine Gasaustrittsöffnung im Deckel der Schottflasche konnte wie beim Betrieb des Rührreaktors (siehe 2.3) die Gasentwicklung gemessen werden. Nach 18 Stunden wurden die Immobilisate durch ein Sieb abgossen und in einen 1-l-Rührreaktor mit 800 ml Molke überführt. Die Fermentation erfolgte bei 37 °C unter pH-Steuerung (pH 6,5). Es wurden Proben zur Bestimmung der Säure-, Lösungsmittel und Zuckerkonzentration genommen und die gebildete Menge an Gas wurde dokumentiert. Soweit erforderlich, wurde Antischaummittel zugesetzt. Die Versuchsdauer und die Zeitpunkte der Probenahme hingen vom Versuchsverlauf ab. In einer ansatzweisen Variante dieses Versuches wurde der Molke bei einer Stagnation der Gasbildung nachträglich 0,9 g gelöster Hefeextrakt sterilfiltriert zugegeben. In einem anderen kontinuierlichen Versuchsansatz besaß die Molke von Beginn an einen Hefeextraktanteil von 0,5 %. Nachdem die Lactose zu über 90 % verbraucht war, wurde Molke mit 0,5 % Hefeextrakt kontinuierlich durch den Reaktor gepumpt.

3 Ergebnisse

3.1 Versuche zur Zuckerproduktion im Fotobioreaktor

3.1.1 Auswahl und Wachstumsansprüche der Grünalge

Die Wachstumsansprüche an das Nährmedium der in Tab. 2 genannten Algenstämme wurden durch deren Kultivierung auf Mineralsalzmedien mit verschiedenen Zusätzen ermittelt. Weiter wurde die Möglichkeit der Anzucht der Stämme in homogenen Flüssigkulturen unter kontinuierlicher Begasung in 10-ml-Säulen überprüft (Tab. 7).

Tab. 7: Wachstumsansprüche der getesteten Algenstämme an das Nährmedium (Tab. 2)

	NMVP Agar	NMV Agar	NM Agar	NMV Flüssig
<i>Ch. sp.</i> SAG 241.80	+	+	-	+
<i>Ch. sorokiniana</i> SAG 211-40c	+	+	-	+
<i>Ch. mirabilis</i> SAG 211-11r	+	+	-	+
<i>Ch. sphaerica</i> SAG 11.88	(+)	(+)	-	(+)
<i>Ch. sp.</i> SAG 211-6	+	-	-	-

Keiner der untersuchten Algenstämme ließ sich ohne Vitaminzusatz kultivieren. Ohne Peptonzusatz wuchsen alle Stämme bis auf *Ch. sp.* SAG 211-6. *Ch. sphaerica* SAG 11.88 zeigte nur sehr schwaches Wachstum. Nur die Stämme *Ch. sp.* SAG 241.80, *Ch. sorokiniana* SAG 211-40c und *Ch. mirabilis* SAG 211-11r wuchsen in homogener Flüssigkultur auf Mineralsalzmedium mit Vitaminzusatz. Zur Bestimmung der maximalen Wachstumsrate und zum Nachweis von extrazellulärem Zucker wurden die drei Stämme in 400 ml Mineralsalzmedium (Säulenreaktor) unter Zusatz von Vitamin (NMV) angezogen. Die maximalen Wachstumsraten und die Zuckerkonzentrationen im Medium nach acht Tagen Wachstum sind in Tab. 8 aufgelistet. Aufgrund der gemessenen Zuckerkonzentrationen wurde in den folgenden Untersuchungen nur der Stamm *Ch. sp.* SAG 241.80 verwendet.

Tab. 8: Maximale Wachstumsraten (μ_{\max}) und nach 8 Tagen erreichte Zuckerkonzentrationen im Medium der untersuchten Algenstämme.

	<i>Ch. sp.</i> SAG 241.80	<i>Ch. sorokiniana</i> SAG 211-40c	<i>Ch. mirabilis</i> SAG 211-11r
μ_{\max} (d ⁻¹)	1,06	1,10	0,71
max. Zuckerkonz.(mg l ⁻¹)	1587	-	17

3.1.2 Wachstum und Zuckerproduktion von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Säulenreaktor

Das Wachstum von *Ch. sp.* SAG 241.80 in einem 400-ml-Fotosäulenreaktor auf Mineralsalzmedium mit Vitaminzusatz (NMV) ist in Abb. 5 dokumentiert.

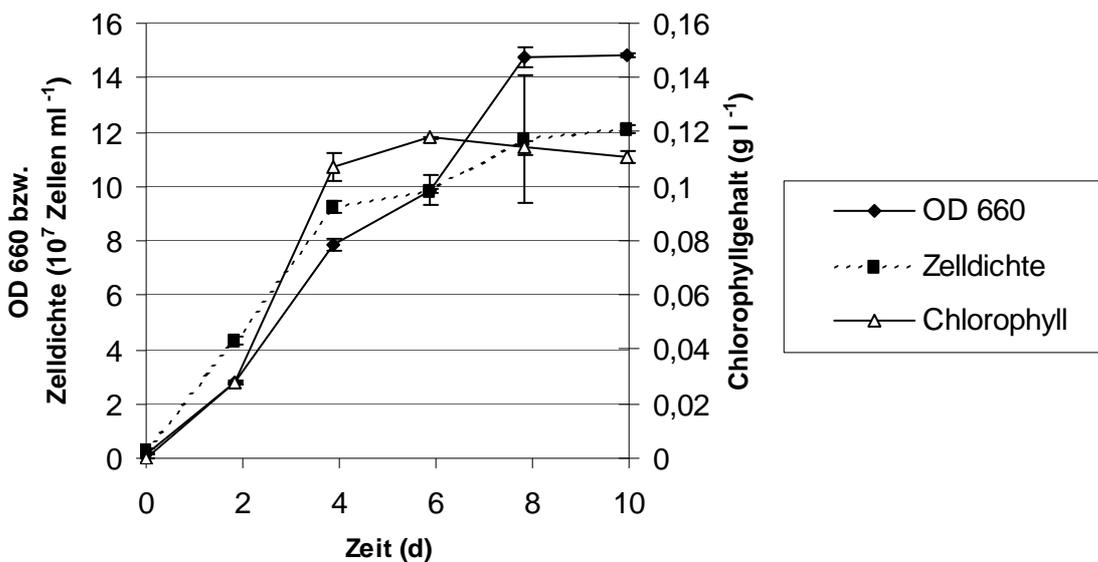


Abb. 5: Wachstum von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotosäulenreaktor

Bis zum vierten Tag wuchs die Kultur exponentiell mit μ_{\max} von 1,06 (+/- 0,01) d⁻¹. Danach schwächte sich das Wachstum ab und die Chlorophyllkonzentration stagnierte. Die Ursache war eine Stickstofflimitierung des Wachstums. Bereits nach vier Tagen war das Nitrat weitgehend aufgebraucht. Aufgrund der Nitratreduktion durch die Algen stieg der pH-Wert in den vier Tagen von anfänglich pH 6 auf pH 7,5 (Abb. 6). Trotz der Stagnation des Wachstums gegen Versuchsende sank der Phosphatgehalt kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum.

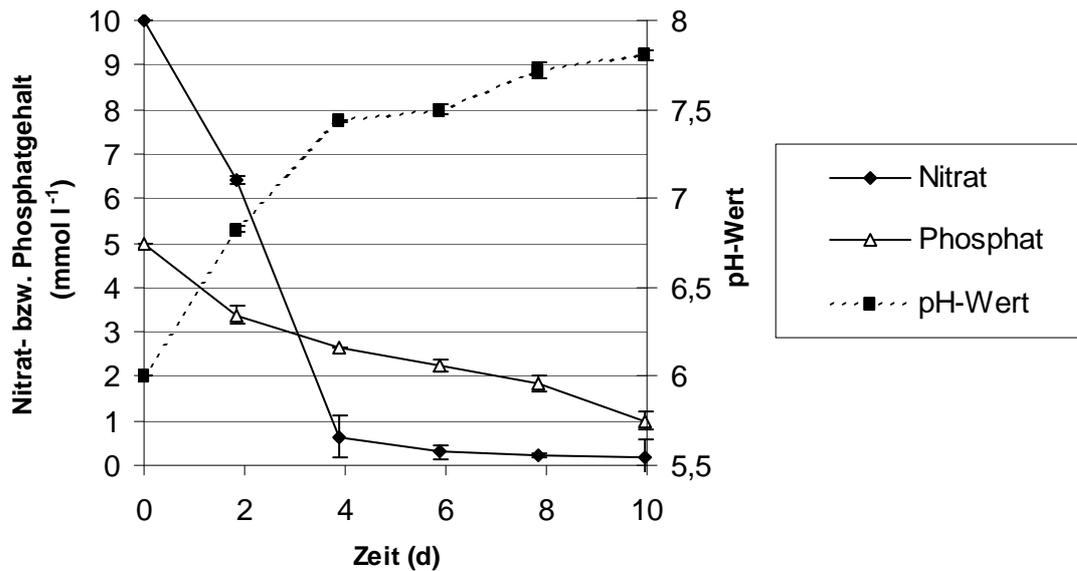


Abb. 6: Nitrat- und Phosphatgehalt sowie pH-Wert während des Wachstums von *Ch. sp. SAG 241.80* im Fotosäulenreaktor

Die maximale Zelldichte mit $1,20 (+/- 0,16) \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ bei einer OD 660 von $14,7 (+/- 0,4)$ und einer Biomassekonzentration von $2,9 (+/- 0,1) \text{ g l}^{-1}$ war nach acht Tagen erreicht. Die Zelldichte korrelierte weitgehend mit der Optischen Dichte und dem Chlorophyllgehalt. Der Versuch erfolgte im Doppelansatz.

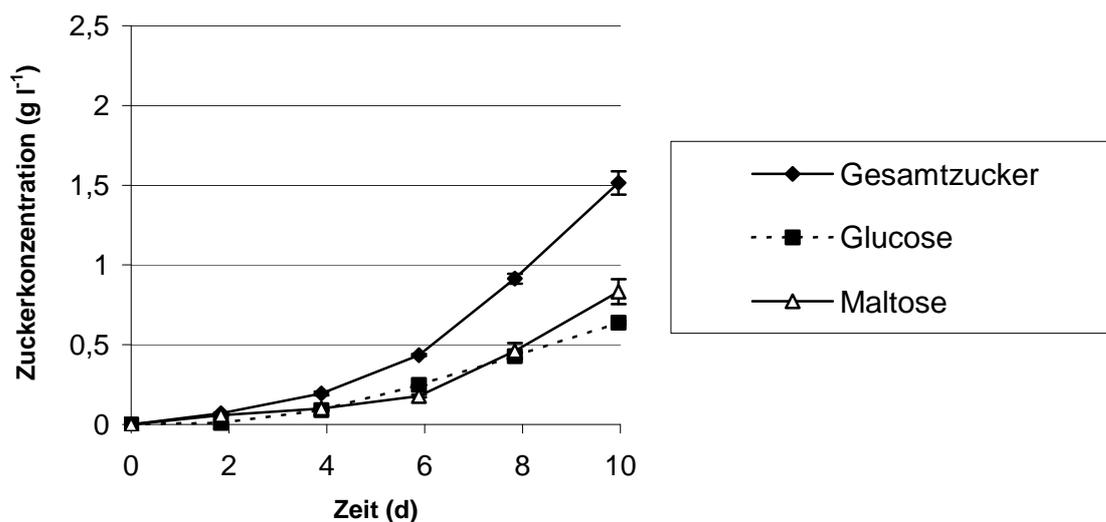


Abb. 7: Zuckerkonzentration während des Wachstums von *Ch. sp. SAG 241.80* im Fotosäulenreaktor

Die Konzentrationen an extrazellulärem Zucker in der wachsenden Algenkultur (Abb. 5) sind in Abb. 7 dargestellt. Die volumetrische Zuckerexkretionsrate stieg mit zunehmender Zelldichte. Ihr Maximum lag bei $284 (+/- 20) \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Glucose und Maltose wurden zu etwa gleichen Anteilen gebildet. Es konnten Spuren von C3- und C4- Maltoseoligomeren nachgewiesen werden, welche quantitativ jedoch nicht von Bedeutung waren. Die Kultur war bis zum Versuchsende mikroskopisch frei von mikrobiellen Kontaminationen.

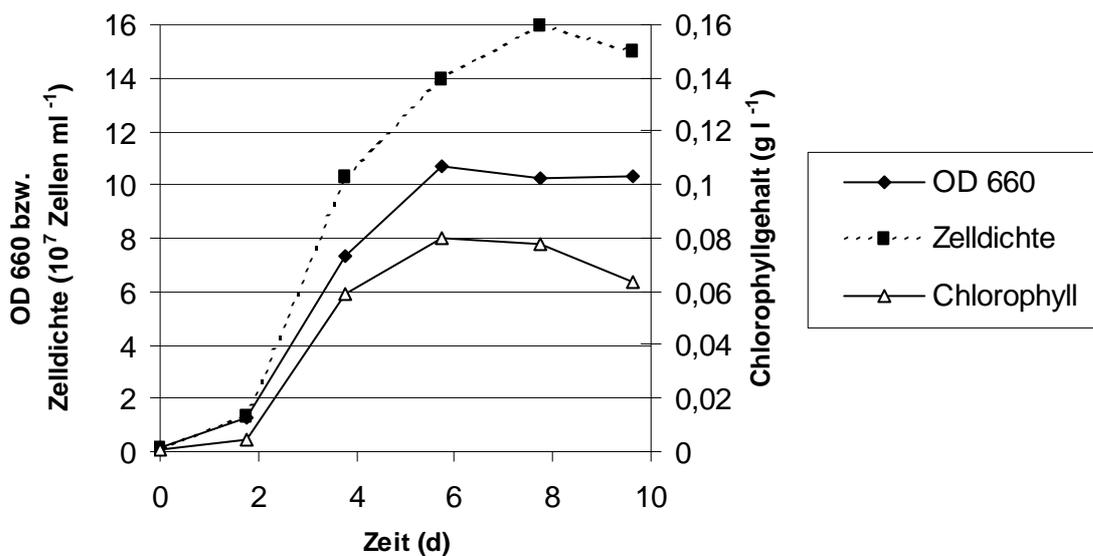


Abb. 8: Wachstum von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotosäulenreaktor mit stark gepuffertem Medium

Um einen Anstieg des pH-Wertes während des Wachstums (Abb. 6) zu verhindern, wurde in einem weiteren Versuch NMV-Medium mit einem zehnfach erhöhten NaH_2PO_4 - und Na_2HPO_4 -Anteil verwendet. Abb. 8 zeigt die resultierende Wachstumskurve. Bis zum vierten Tag wuchs die Kultur, ähnlich wie im schwach gepufferten Medium, exponentiell mit $\mu_{\text{max}} = 1,08 \text{ d}^{-1}$. Danach schwächte Stickstoffmangel das Wachstum und die Zunahme der Chlorophyllkonzentration ab. Das Nitrat war bis zum vierten Tag weitgehend abgebaut. Allerdings blieb der pH-Wert trotz Nitratreduktion annähernd konstant. Durch die hohe Pufferkonzentration im Medium stieg er in den ersten vier Tagen lediglich von pH 6 auf pH 6,5. Trotz zehnfach erhöhten Phosphatgehalts entsprach der Phosphatverbrauch etwa dem des schwach gepufferten Ansatzes (Abb. 9). Die maximale Zelldichte mit $1,6 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ bei einer OD 660 von 10,2 und einer Biomassekonzentration von $2,1 \text{ g l}^{-1}$ war nach acht Tagen erreicht. So wurde bei starker Pufferung (Abb. 8) des Mediums eine geringere Optische Dichte,

Biomassekonzentration und Chlorophyllkonzentration als bei einer schwachen Pufferung bzw. bei einem starken Anstieg des pH-Wertes erreicht (Abb. 5). Die maximale Zelldichte und die Zuckerexkretion wurden jedoch durch die stärkere Pufferung erhöht. Die höchste volumetrische Zuckerexkretionsrate wurde zwischen Tag vier und Tag sechs erreicht. Sie lag bei $476 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Es wurde verstärkt Maltose gebildet (Abb. 10). Ein konstanter pH-Wert von maximal pH 6,6 steigert die Maltoseexkretion von *Ch. sp.* SAG 241.80 während des Wachstums.

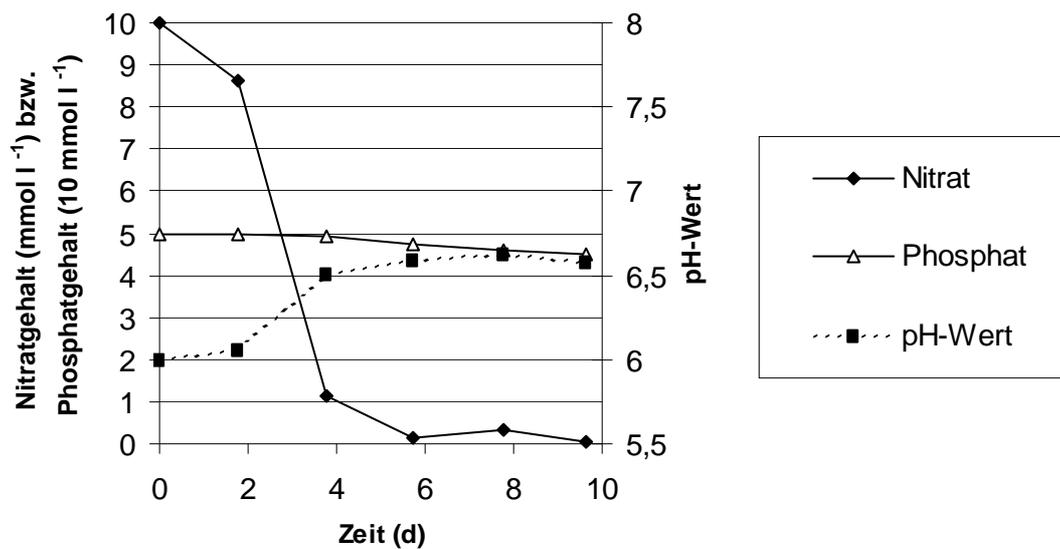


Abb. 9: Nitrat und Phosphatgehalt sowie pH-Wert während des Wachstums von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotosäulenreaktor mit stark gepuffertem Medium

Die Kultur war bis zum Versuchsende frei von mikroskopisch erkennbaren mikrobiellen Kontaminationen. Nach dem Ende des exponentiellen Wachstums von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotosäulenreaktor, also bei einer OD 660 von ca. 8 bzw. nach ca. vier Tagen nahm das Verhältnis von gebildetem Zucker zu gebildeter Biomasse zu. Im stark gepufferten Ansatz war dieser Anstieg so deutlich, dass der Massenanteil des nach zehn Tagen im Medium gelösten Zuckers den der suspendierten Biomasse überstieg (Abb. 11). Obwohl sich die Verhältnisse von Zucker zu Biomasse in den beiden unterschiedlich gepufferten Ansätzen stark unterschieden, war die Gesamtkonzentration der Fotosyntheseprodukte (Zucker und Biomasse) im Medium nach zehn Tagen gleich.

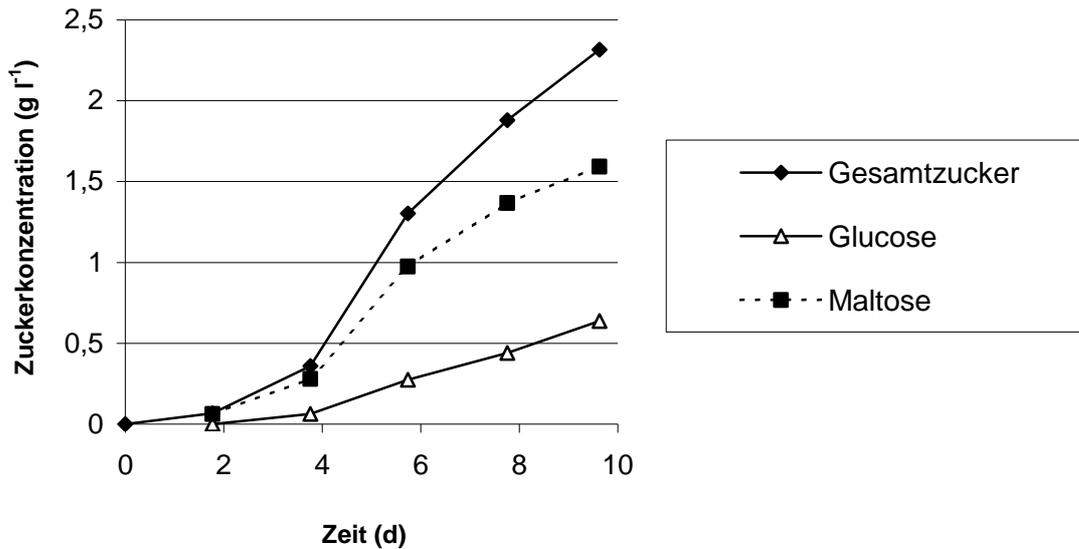
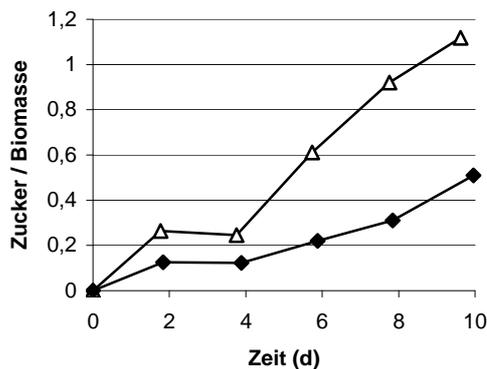


Abb. 10: Zuckerkonzentration während des Wachstums von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotosäulenreaktor mit stark gepuffertem Medium

A



B

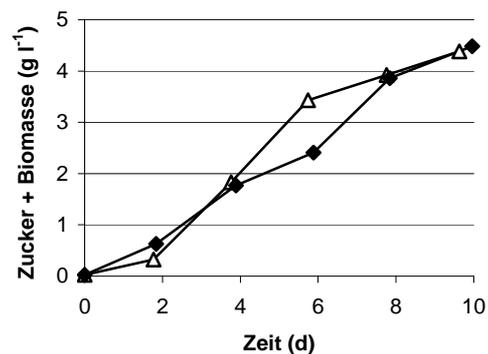


Abb. 11: Verhältnis (A) und Summe (B) aus gebildetem Zucker und Zelltrockenmasse in einer Kultur von *Ch. sp.* SAG 241.80 (--Δ-- stark gepuffert, --◆-- schwach gepuffert)

3.1.3 Wachstum und Zuckerproduktion von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Rührreaktor

Neben dem Wachstum von *Ch. sp.* SAG 241.80 im 400-ml-Fotosäulereaktor wurde auch das Wachstumsverhalten in einem 800-ml-Fotorührreaktor untersucht. Auch hier wurde Mineralsalzmedium mit Vitaminzusatz (NMV) verwendet. Auf eine starke Pufferung des Mediums konnte wegen der pH-Steuerung durch Säurezugabe (1 M HCl) verzichtet werden. Die Zunahme der Optischen Dichte und der Chlorophyllkonzentration über die Zeit ist in

Abb. 12 dargestellt. In den ersten Tagen wuchs die Kultur exponentiell mit einer μ_{\max} von nur 0,91 (+/- 0,03) d^{-1} . Danach schwächte sich das Wachstum und die Zunahme der Chlorophyllkonzentration aufgrund der einsetzenden Stickstofflimitierung weiter ab. Nach acht Tagen war das Nitrat vollständig abgebaut (Abb. 13).

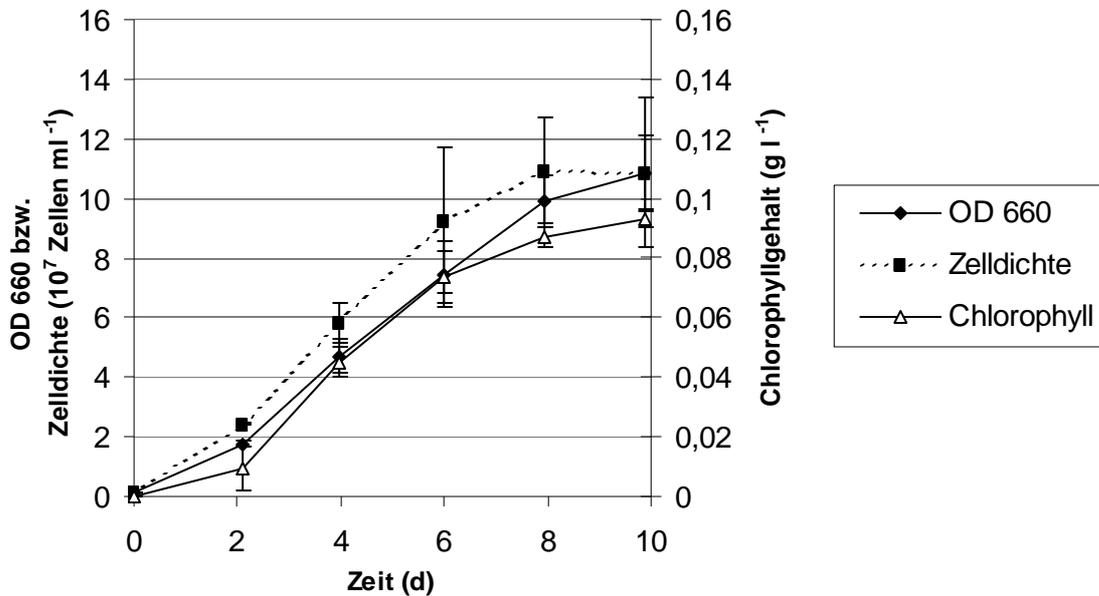


Abb. 12: Wachstum von *Ch. sp.* SAG 241.80 im pH-gesteuerten Fotorührreaktor

Eine stationäre Phase mit konstanter Chlorophyllkonzentration und Optischer Dichte wurde nicht erreicht. Lediglich die Zelldichte stagnierte in den letzten zwei Versuchstagen. Dennoch korrelierten Chlorophyllgehalt, Optische Dichte und Zelldichte weitgehend über den gesamten Versuchsverlauf. Die in zehn Tagen maximal erreichte Zelldichte betrug $1,09 (+/- 0,25) \cdot 10^8\ ml^{-1}$ bei einer OD 660 von $10,9 (+/- 1,3)$ und einer Biomassekonzentration von $2,2 (+/- 0,3)\ g\ l^{-1}$. Sowohl die maximale Wachstumsrate als auch die nach zehn Tagen erreichte maximale Optische Dichte war im Rührreaktor niedriger als im Säulenreaktor (vergleiche Abb. 5 und Abb. 12). Dem entsprechend geringer war auch der Phosphatverbrauch (Abb. 9 und Abb. 13).

Neben den unterschiedlichen Volumina und Begasungsraten unterschieden sich die beiden Reaktoren in der Gefäßform. Bei gleicher Lichtintensität auf der Reaktoroberfläche ist im Säulenreaktor deutlich mehr Algenbiomasse dem Licht ausgesetzt als im Rührreaktor. Dies wird als Ursache für das unterschiedlich starke Wachstum der Algen in den beiden Reaktortypen angesehen. Auch die volumetrische Zuckerexkretionsrate war während des Wachstums im Rührreaktor im Vergleich zum Säulenreaktor deutlich verringert (Abb. 10 und

Abb. 14). Trotz konstantem pH-Wert von pH 6 betrug die maximale volumetrische Zuckerkonzentrationsrate nur 258 (+/- 86) mg l⁻¹ d⁻¹. Es wurde überwiegend Maltose gebildet. Die Kultur war bis zum Versuchsende frei von mikroskopisch erkennbaren mikrobiellen Kontaminationen. Der Versuch erfolgte im Doppelansatz.

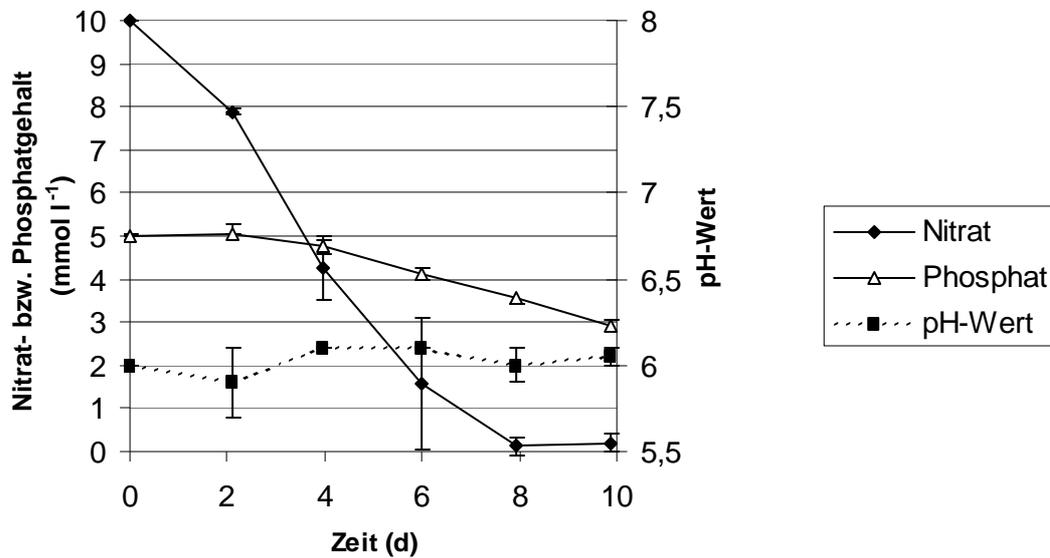


Abb. 13: Nitrat und Phosphatgehalt sowie pH-Wert während des Wachstums von *Ch. sp. SAG 241.80* im pH-gesteuerten Fotorührreaktor

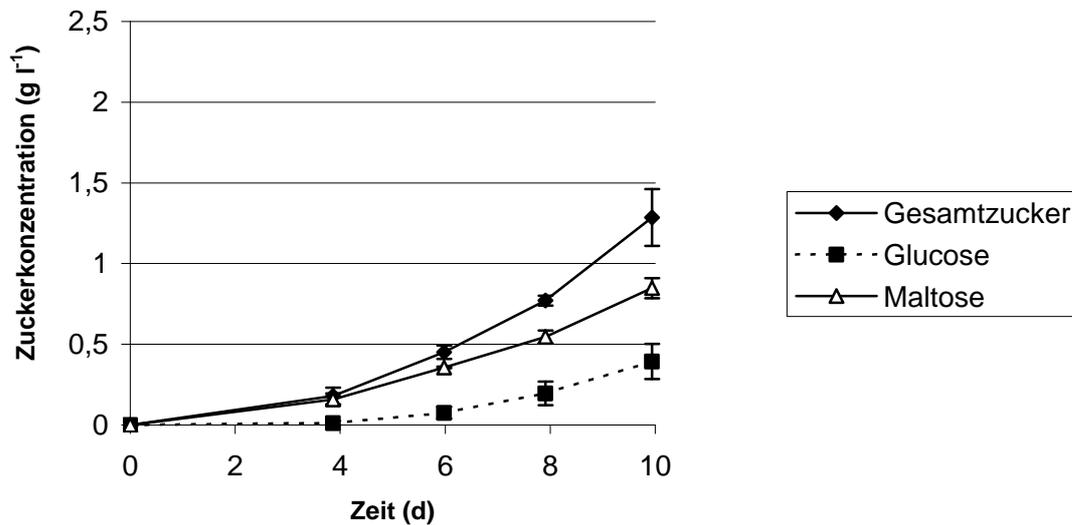


Abb. 14: Zuckerkonzentration während des Wachstums von *Ch. sp. SAG 241.80* im pH-gesteuerten Fotorührreaktor

Auffallend in den vorangehenden Untersuchungen war der unterschiedliche Anteil von Glucose am gebildeten Gesamtzucker. Wurde im Säulenreaktor ohne pH-Kontrolle Glucose und Maltose in etwa gleichen Mengen gebildet, so wurde im Rührreaktor mit pH-Kontrolle und im Säulenreaktor mit stark gepuffertem Medium überwiegend Maltose nachgewiesen. Obwohl die Kulturen mikroskopisch axenisch wuchsen, wurde eine Wachstumskurve im Rührreaktor unter Streptomycinzusatz von 25 mg l^{-1} aufgenommen, um ein Auftreten von Glucose durch eventuelle Maltaseaktivität einer bakteriellen Kontamination weitgehend auszuschließen (ohne Abb.). Anfänglich wuchs auch diese Kultur exponentiell mit μ_{max} von $0,76 \text{ d}^{-1}$. Danach schwächte sich das Wachstum und die Zunahme der Chlorophyllkonzentration sehr stark ab. Die in zehn Tagen maximal erreichte Zelldichte war nur $0,68 * 10^8 \text{ ml}^{-1}$ bei einer OD 660 von 5,5 und einer Biomassekonzentration von $1,1 \text{ g l}^{-1}$. Sowohl die maximale Wachstumsrate als auch die nach zehn Tagen erreichte Optische Dichte wurde durch den Zusatz von Streptomycin deutlich gesenkt. Aber auch die volumetrische Zuckerekkretionsrate während des Wachstums wurde durch das Antibiotikum deutlich verringert (ohne Abb.). Die maximale volumetrische Zuckerekkretionsrate betrug nur 100 mg l d^{-1} und lag damit bei 39 % der Zuckerekkretion ohne Antibiotikum. Es wurde überwiegend Maltose gebildet, der Anteil Glucose am Gesamtzucker lag bei Versuchsende bei 29 %. Es konnte keine bakterielle Kontamination nachgewiesen werden, weder mikroskopisch noch durch Ausplattieren auf YE-Medium. Es ist festzuhalten, dass Glucose von *Ch. sp.* SAG 241.80 ausgeschieden wird und nicht aufgrund kontaminationsbedingter Maltaseaktivität im Medium nachweisbar ist.

3.1.4 Biomasse-spezifische Zuckerekkretion

Zur Bestimmung von Biomasse-spezifischen Zuckerekkretionsraten wurde Zellmasse in Fotosäulenreaktoren über zehn Tage angezogen und in stickstofffreies Mineralsalzmedium (EM) überführt. Unter diesen Bedingungen wurde die Zuckerekkretion bei weitgehend konstanter Zellmassekonzentration im Fotosäulenreaktor über einen längeren Zeitraum beobachtet. Die anfängliche Zelldichte betrug $1,04 (+/- 0,02) * 10^8 \text{ ml}^{-1}$ bei einer OD 660 von 11,9 (+/- 0,05) und einer Biomassekonzentration von $2,4 (+/- 0,1) \text{ g l}^{-1}$. Während der Versuchsdauer blieben die Algenzellen unter dem Mikroskop intakt und die Zellzahl konstant. Die Abnahme der Chlorophyllkonzentration und der Optischen Dichte zeigte jedoch einen Vitalitätsverlust der Algen (Abb. 15). Nach zehn Tagen betrug die Zelldichte $1,03 (+/- 0,05) * 10^8 \text{ ml}^{-1}$ bei einer OD 660 von 10,4 (+/- 0,4) und einer Biomassekonzentration von $2,1 (+/- 0,1) \text{ g l}^{-1}$. Der Phosphatgehalt sank während des

Versuches von anfänglich $5,0 (+/- 0,0)$ mmol l^{-1} auf $2,1 (+/- 0,1)$ mmol l^{-1} (ohne Abb.). Der Versuch erfolgte im Doppelansatz.

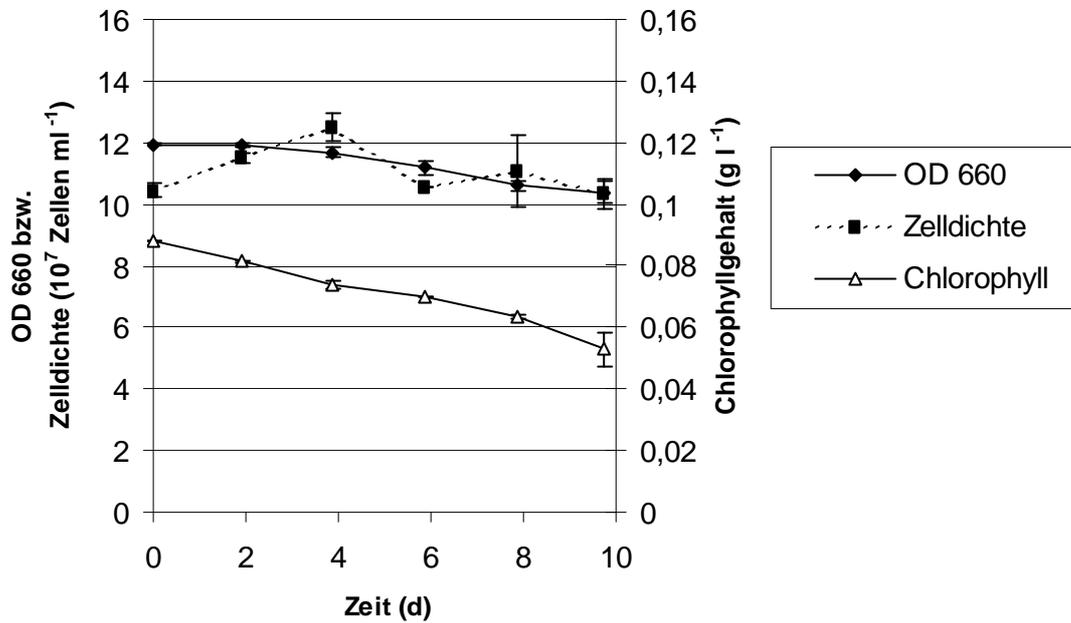


Abb. 15: Statische Kultur von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotosäulenreaktor mit stickstofffreiem Medium

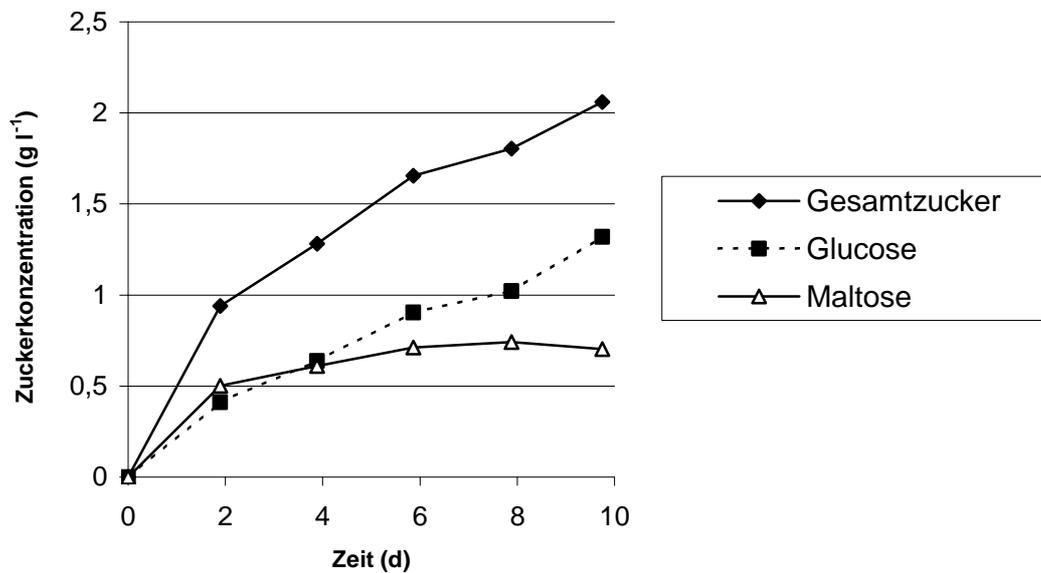


Abb. 16: Zuckerkonzentration in statischer Kultur von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotosäulenreaktor mit stickstofffreiem Medium

Die Zuckerekkretionsrate sank mit zunehmender Versuchsdauer (Abb. 16). So wurde die höchste volumetrische Zuckerekkretion von $429 (+/- 66) \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ innerhalb der ersten 48 Stunden im Fotosäulenreaktor gemessen. Bezogen auf die eingesetzte Biomasse ergibt dies eine maximale spezifische Zuckerekkretion von $180 (+/- 26) \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Nach acht Tagen bzw. 192 Stunden waren bakterielle Kontaminationen mikroskopisch nachweisbar. Deutlich wird das auch durch die leichte Abnahme der Maltosekonzentration zum Versuchsende hin. Diese Kontaminationen werden zusammen mit dem oben erwähnten Vitalitätsverlust der Algen als Ursache für die Abnahme der Biomasse-spezifischen Zuckerproduktionsrate mit zunehmender Inkubationsdauer gesehen. Der Aktivitätsverlust ist in Abb. 17 grafisch dargestellt.

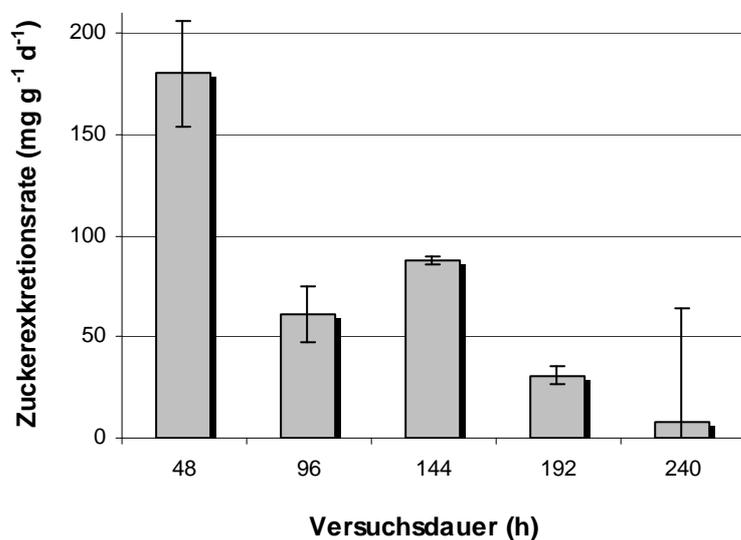


Abb. 17: Biomasse-spezifische Zuckerekkretionsraten einer statischen Kultur von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotosäulenreaktor mit stickstofffreiem Medium nach unterschiedlicher Versuchsdauer (Mittelwerte aus zweitägigen Messintervallen)

Besonders erwähnenswert ist der Aktivitätsanstieg nach 96 Stunden und die starke Abweichung der Doppelansätze in ihrer Aktivität nach 240 Stunden, die wahrscheinlich durch unterschiedlich ausgeprägte Kontaminationen hervorgerufen wurde. In einem ähnlichen Versuch wurde Algenbiomasse in stickstofffreies Mineralsalzmedium (EM) überführt und im Fotorührreaktor 96 Stunden inkubiert. Die anfängliche Zelldichte betrug $2,00 \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$ bei einer OD 660 von 1,8 und einer Biomassekonzentration von $0,4 \text{ g l}^{-1}$. Parallel wurde die gleiche Menge an Biomasse in 2 %igen Alginatkugeln immobilisiert und ebenfalls 96 Stunden lang im Fotorührreaktor in stickstofffreiem Mineralsalzmedium (EM) inkubiert. Es kam in den ersten 48 Stunden zum Aktivitätsanstieg, tendenziell nahm die Aktivität mit

zunehmender Inkubationsdauer jedoch ab. Diese Abnahme war beim Einsatz von immobilisierten Algen weniger ausgeprägt. So waren nach 96 Stunden im immobilisierten Ansatz noch 85 % der anfänglichen Aktivität vorhanden, im nativen Ansatz waren dies lediglich 31 % (Abb. 18). Der beobachtete Vitalitätsverlust der Algen bei Langzeitinkubation unter Dauerlicht in stickstofffreiem Medium lässt sich also durch Immobilisierung der Grünalgen verringern.

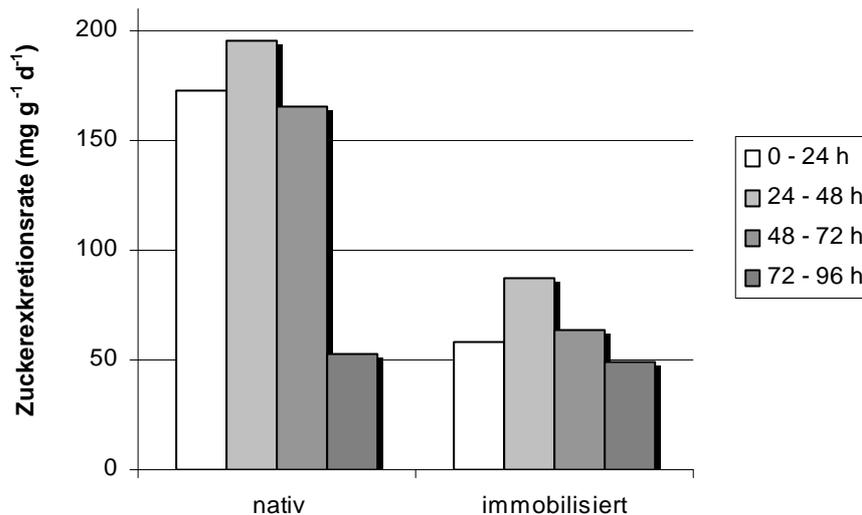


Abb. 18: Biomasse-spezifische Zuckerexkretionsraten von nativen und immobilisierten Zellen von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotorührreaktor mit stickstofffreiem Medium nach unterschiedlicher Versuchsdauer (Mittelwerte aus eintägigen Messintervallen)

3.1.5 Sauerstoffkonzentration im Fotobioreaktor

Durch die kontinuierliche Begasung der Bioreaktoren konnte eine Anreicherung des Fotosyntheseproduktes Sauerstoff verhindert werden. Erst nach Abschalten der Begasung wurde die Fotosyntheseleistung der Algenkultur durch die Zunahme der Sauerstoffkonzentration sichtbar (Abb. 19). Bei einer Zelldichte von $1,0 (+/- 0,01) \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ bzw. bei einer OD 660 von 10,3 (+/- 0,1) und einer Biomassekonzentration von 2,1 (+/- 0,0) g l⁻¹ betrug die volumetrische Sauerstoffproduktionsrate 1050 (+/- 104) mg l⁻¹ d⁻¹. Dies ergibt eine spezifische Sauerstoffproduktionsrate von 508 (+/- 50) mg g⁻¹ d⁻¹. Der Versuch erfolgte im Doppelansatz.

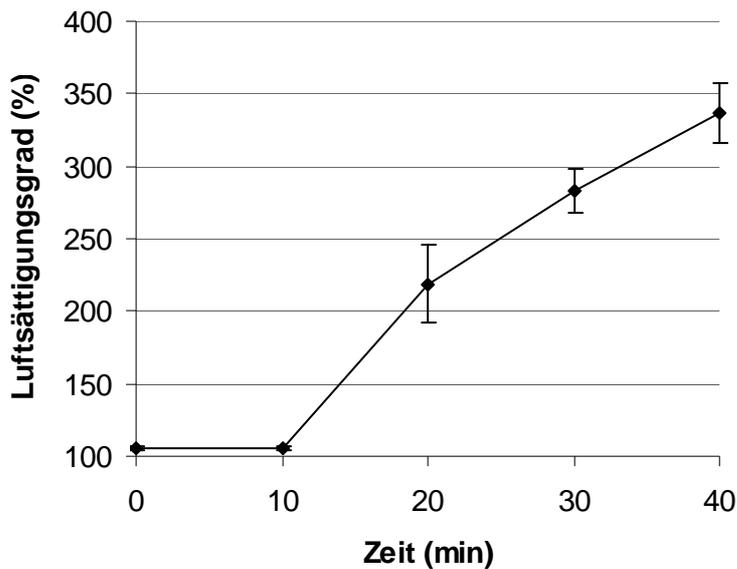


Abb. 19: Sauerstoffkonzentration in Algenkultur von *Ch. sp.* SAG 241.80 (Fotosäulenreaktor). Abschaltung der Begasung nach zehn Minuten

3.1.6 Lichtabsorption der Grünalgenkultur

Die Restintensität des monochromatischen Lichtes verschiedener Wellenlänge nach Durchgang durch eine Kultur von *Ch. sp.* SAG 241.80 ist in Abb. 20 dargestellt. Die Biomassekonzentration betrug $0,25 \text{ g l}^{-1}$.

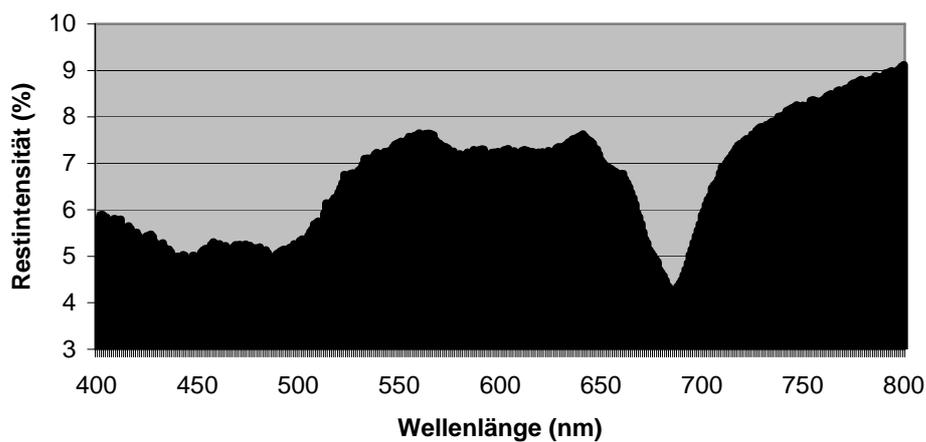


Abb. 20: Restintensität von monochromatischem Licht verschiedener Wellenlängen nach Durchgang durch eine Kultur von *Ch. sp.* SAG 241.80 mit 1 cm Schichtdicke und einem Biomassegehalt von ca. $0,25 \text{ g l}^{-1}$.

Im Absorptionsbereich der Blattfarbstoffe bei 680 nm bzw. im Bereich von 400 bis 500 nm betrug die Restintensität des Lichtes unter 5,5 % der Ausgangsintensität. Durch die Absorption der Biomasse und des Mediums wurde auch mit den anderen hier gemessenen Wellenlängen keine Restintensität über 10 % erreicht. Tendenziell nimmt die Restintensität des Lichtes in dem für das Verbundsystem mit Purpurbakterien (siehe Einleitung) energetisch wichtigen langwelligen Bereich zu.

3.2 Versuche zur alkoholischen Gärung

3.2.1 Auswahl und Wachstumsansprüche der Hefe

Die Untersuchung der Verwertbarkeit von verschiedenen Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle erfolgte auf festen Nährböden. Alle Stämme wuchsen aerob auf Glucose, Saccharose und Raffinose. Unter aeroben Bedingungen wuchsen auf dem dreiwertigen Alkohol Glycerin mit Ausnahme von *S. cerevisiae* BY4741 Δ mba1 nur die Wildstämme. Alle anderen Mutanten waren zum aeroben Wachstum auf Glycerin nicht fähig. Auf Galactose wuchsen aerob nur die Wildstämme. Bis auf die Mutanten *S. cerevisiae* BY4741 ρ^0 und Δ cox5a wuchsen alle Stämme aerob auf Maltose.

Tab. 9: Wachstum von *S. cerevisiae* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (n.u. = nicht untersucht)

Stamm	Glucose	Galactose	Maltose	Saccharose	Raffinose	Glycerin
	aerob / anaerob					
DSMZ 1333	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +	+ / -
DSMZ 1333 ρ^0	+ / +	- / -	+ / +	+ / +	+ / +	- / -
CBS 1172	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +	+ / -
CBS 1172 ρ^0	+ / +	- / -	+ / +	+ / +	+ / +	- / -
BY4741	+ / +	+ / -	+ / -	+ / +	+ / +	+ / -
BY4741 ρ^0	+ / +	- / -	- / -	+ / +	+ / +	- / -
BY4741 Δ cox5a	+ / +	n.u.	+ / -	+ / +	+ / +	- / -
BY4741 Δ cox7	+ / +	n.u.	- / -	+ / +	+ / +	- / -
BY4741 Δ mba1	+ / +	n.u.	+ / -	+ / +	+ / +	+ / -

Alle Stämme wuchsen anaerob auf Glucose, Saccharose und Raffinose. Auf Galactose und dem nicht vergärbaren Glycerin wuchs kein Stamm unter anaeroben Bedingungen. Sowohl der Wildstamm von *S. cerevisiae* BY4741 als auch alle von diesem abgeleiteten Mutanten zeigten unter anaeroben Bedingungen kein Wachstum auf Maltose (Tab. 9). Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C. Eventuelles, sehr langsames Wachstum konnte bei dieser Untersuchung nicht erkannt werden.

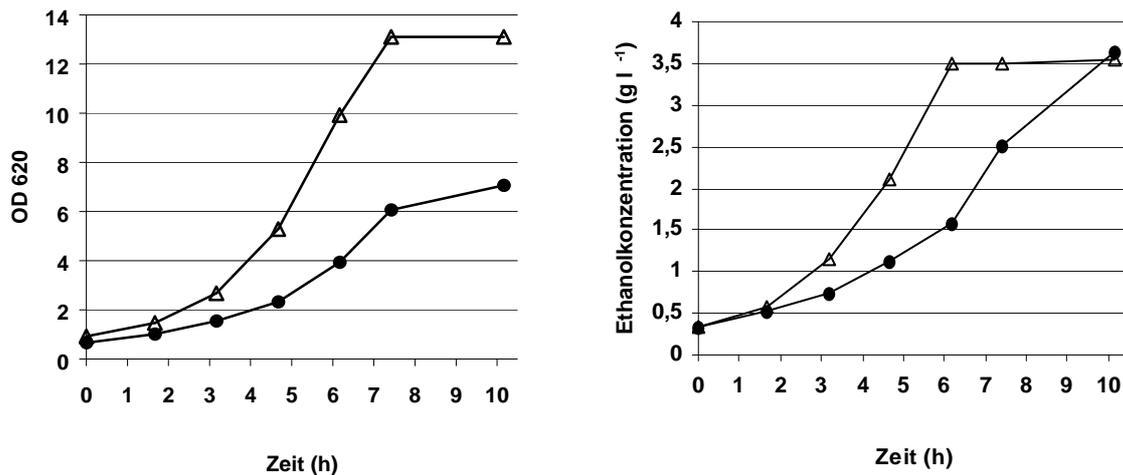


Abb. 21: Optische Dichte und Ethanolkonzentration bei aerobem Wachstum von *S. cerevisiae* BY4741 auf Glucose (WT --Δ-- und ρ^0 --●--)

Die maximalen Wachstumsraten (μ_{\max}) verschiedener Hefestämme auf Glucose und auf Maltose wurden in 100-ml-Schüttelkulturen mit einer Kohlenhydratkonzentration von 1 % bestimmt. Während die atmenden Stämme unter diesen Versuchsbedingungen aerob gärten, zeigten die atmungsdefekten Stämme reine anaerobe Gärung. Dies wird am Verlauf der optischen Dichte und der Ethanolkonzentrationen während des Wachstums deutlich. Beispielhaft ist das Auftreten von aerober und anaerober Gärung für den Wildtyp und die ρ^0 -Mutante von *S. cerevisiae* BY4741 in Abb. 21 dargestellt.

Trotz annähernd gleicher Ethanolausbeute blieb die Zellausbeute bei der reinen anaeroben Gärung der Mutante deutlich hinter der Zellausbeute bei der aeroben Gärung des Wildtyps zurück. Bei allen drei Stämmen zeigten die Wildtypen, soweit untersucht, höhere Wachstumsraten als die jeweiligen ρ^0 -Mutanten (Tab. 10). Auch die Wachstumsraten der Mutanten mit spezifischer Gendelektion waren gegenüber dem Wildtyp verringert. Die maximale Wachstumsrate sowohl vom *S. cerevisiae* DSMZ 1333 Wildtyp als auch von der ρ^0 -Mutante waren auf Maltose gegenüber Glucose stark verringert. Das verringerte Wachstum

auf Maltose zeigte sich auch bei den Mutanten mit spezifischer Gendeletion von *S. cerevisiae* BY4741, sofern sie überhaupt auf Maltose wuchsen. So war das Wachstum auf Maltose von *S. cerevisiae* BY4741 Δcox5a und Δmba1 deutlich langsamer als beim Wildstamm.

Tab. 10: μ_{max} (h^{-1}) von *S. cerevisiae* in Schüttelkultur

Stamm	Glucose	Maltose
DSMZ 1333	0,48	0,37
DSMZ 1333 ρ^0	0,39	0,31
CBS 1172	0,40	n.u.
CBS 1172 ρ^0	0,32	n.u.
BY4741	0,42	0,17
BY4741 ρ^0	0,35	0,00
BY4741 Δcox5a	0,41	0,03
BY4741 Δcox7	0,35	0,00
BY4741 Δmba1	0,39	0,12

3.2.2 Biomasse-spezifischer Sauerstoffverbrauch

Zur Bestimmung der Biomasse-spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate wurden gleiche Mengen Hefebiomasse der verschiedenen Stämme in 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer mit 0,1 % Glucose suspendiert und die Sauerstoffabnahme gemessen. Hohe Sauerstoffverbrauchsrate zeigten die Wildtypen. Die ermittelten Sauerstoffverbrauchsrate von *S. cerevisiae* DSMZ 1333, CBS 1172 und BY4741 betragen 3348, 2419 bzw. 1718 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Der Unterschied im gewichtsspezifischen Sauerstoffverbrauch der Wildtypen zeigt die deutlich höhere Stoffwechsellistung der Brennereihefe gegenüber der Bäckerhefe und dem Laborstamm (Abb. 22). Die ρ^0 -Mutanten der untersuchten Hefen und der Stamm *S. cerevisiae* BY4741 Δcox7 hatten mit weniger als 240 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ den geringsten Sauerstoffverbrauch. Die Stämme *S. cerevisiae* BY4741 Δmba1 und Δcox5a hatten einen spezifischen Sauerstoffverbrauch von 1459 bzw. 330 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ und verbrauchten damit deutlich mehr Sauerstoff als die anderen Mutanten. Der Stamm *S. cerevisiae* BY4741 Δmba1 erreichte somit 85 % von dem Sauerstoffverbrauch des Wildtyps. Dies belegt eine vorhandene Restatmung, welche sich für diesen Stamm aufgrund des aeroben Wachstums auf Glycerin in den vorangegangenen Untersuchungen bereits abzeichnete (Tab. 9).

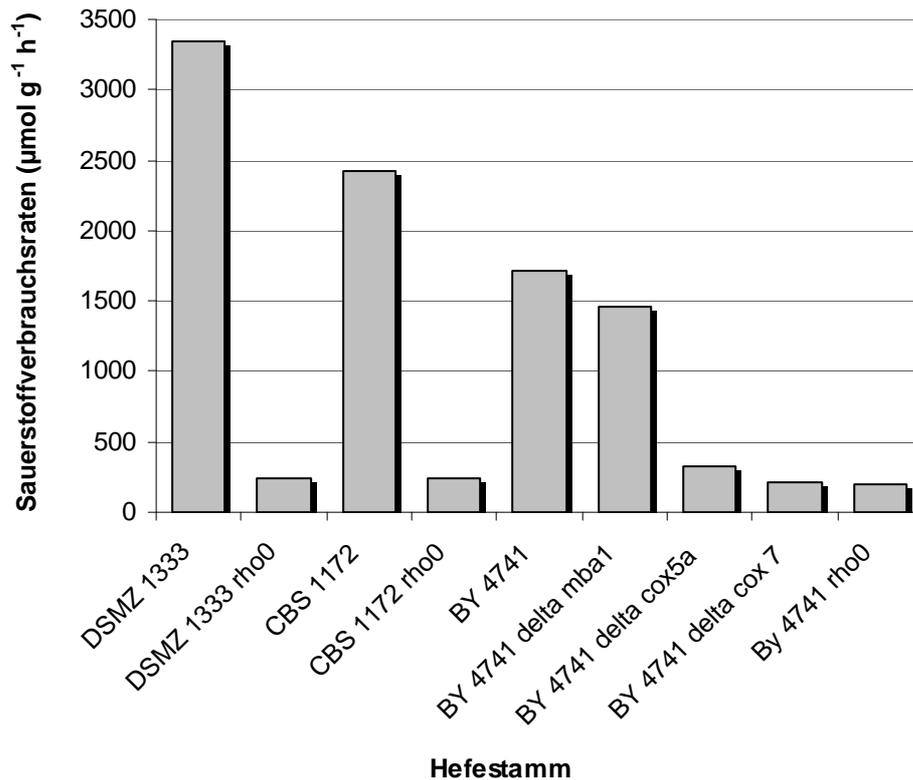


Abb. 22: Biomasse-spezifische Sauerstoffverbrauchsrate verschiedener Hefestämme

3.2.3 Einfluss des Atmungsdefektes auf das pH-Optimum von *S. cerevisiae*

Abb. 23 zeigt die in Abhängigkeit vom pH-Wert maximal erreichbaren Wachstumsraten für die Stämme *S. cerevisiae* DSMZ 1333 und CBS 1172 sowohl für die Wildtypen als auch für die entsprechenden ρ^0 -Mutanten. Die Messung erfolgte in Schüttelkultur mit 1 % Glucose und 0,5 % Hefeextrakt bei 30 °C. Eine Veränderung der pH-Optima für das Wachstum durch einen Atmungsdefekt ließ sich bei den beiden getesteten Hefestämmen nicht erkennen. Die vier Stämme unterschieden sich deutlich in der maximalen Wachstumsrate, jedoch nur unbedeutend in der Lage der pH-Optima. Das beste Wachstum zeigten die getesteten Stämme zwischen pH 4 und pH 5 (Abb. 23). In Abb. 24 sind die in Abhängigkeit vom pH-Wert maximal erreichbaren Biomasse-spezifischen Ethanolbildungsrate für den Stamm *S. cerevisiae* DSMZ 1333, sowohl für den Wildtyp als auch für die ρ^0 -Mutante, dargestellt. Die Messung erfolgte mit einer geschüttelten Hefesuspension bei 30 °C in 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer mit 1 % Glucose. Das pH-Optimum für die alkoholische Gärung lag bei der ρ^0 -Mutante von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ähnlich wie das Wachstumsoptimum (Abb. 23) bei pH 5 (Abb. 24). Beim Wildtyp war das pH-Optimum der aeroben Gärung gegenüber dem

Wachstumsoptimum leicht ins Alkalische nach pH 6 verschoben. Die gemessenen Gärraten der reinen alkoholischen Gärung der ρ^0 -Mutante lagen deutlich über denen der aeroben Gärung des Wildtyps. Die Gärung hing jedoch nicht in gleichem Maße vom pH-Wert ab, wie es zuvor für das Wachstum beobachtet worden war. Bei Erhöhung des pH-Wertes von pH 5 auf pH 7 sank die maximale Wachstumsrate um über 50 %, wohingegen die Gärung lediglich um ca. 20 % eingeschränkt wurde. Die Messung erfolgte im Doppelansatz.

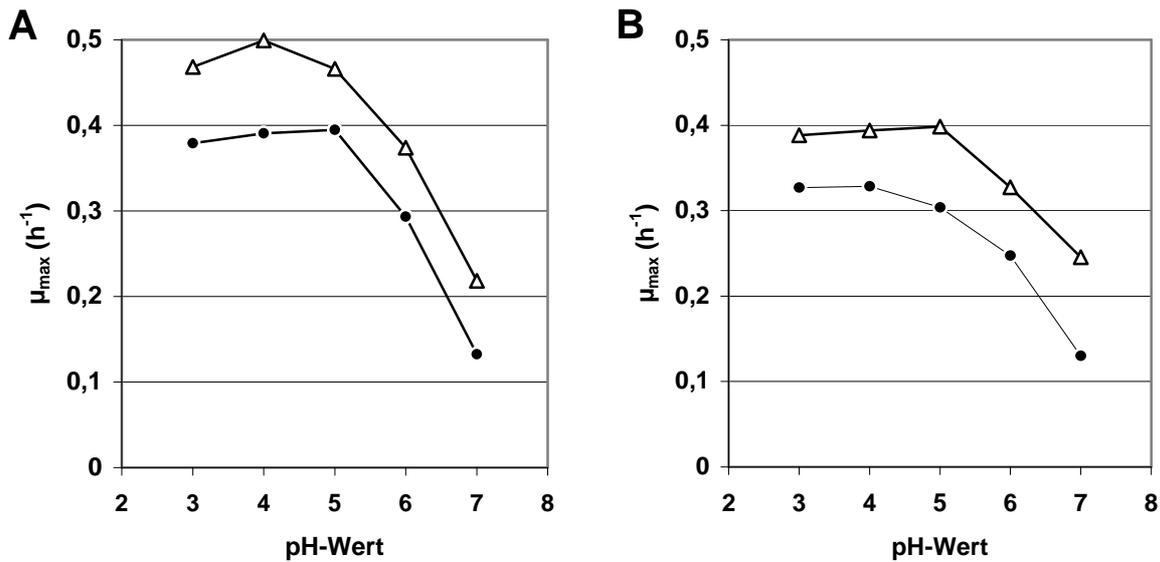


Abb. 23: pH-Optimum für das Wachstum von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 (A) und *S. cerevisiae* CBS 1172 (B) (--Δ-- Wildtyp, --●-- ρ^0 -Mutante)

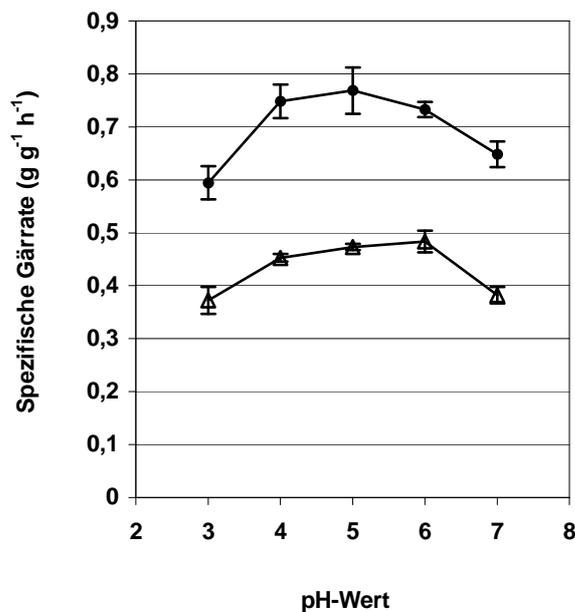


Abb. 24: pH-Optimum für die Ethanolproduktion durch *S. cerevisiae* DSMZ 1333 (--Δ-- Wildtyp, --●-- ρ^0 -Mutante)

3.2.4 Biomasse-spezifische Ethanolbildung

Zur Bestimmung der Biomasse-spezifischen Ethanolbildungsraten unter aeroben Verhältnissen und in Gegenwart niedriger Zuckerkonzentrationen wurden gleiche Mengen Hefebiomasse in Puffer mit 0,2 % Glucose suspendiert und aerob bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die gemessene Zunahme der Ethanolkonzentration wurde auf das Hefetrockengewicht bezogen. Die zur Atmung befähigten Wildtypen blieben in den Ethanolbildungsraten hinter den getesteten Stämmen mit defekter und eingeschränkter Atmung zurück (Abb. 25).

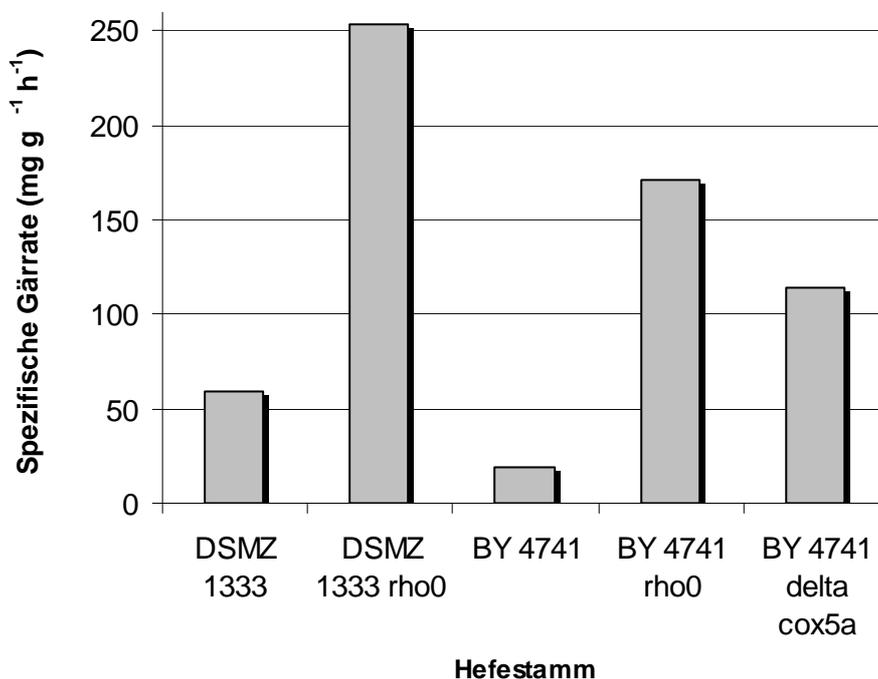


Abb. 25: Biomasse-spezifische Ethanolbildungsraten verschiedener Stämme von *S. cerevisiae* bei einer Substratkonzentration von 0,2 % Glucose

S. cerevisiae DSMZ 1333 ρ^0 zeigte die höchste Ethanolbildungsrate mit 254 mg g⁻¹ h⁻¹. Die Ethanolbildungsrate des atmungsdefekten Laborstammes *S. cerevisiae* BY4741 ρ^0 war deutlich niedriger. Auch hier zeigte sich die höhere Stoffwechselaktivität der Brennereihefe. Beim Stamm *S. cerevisiae* BY4741 Δ cox5a machte sich die vorhandene Restatmung (Abb. 22) negativ bei der Ethanolbildung bemerkbar. Dieser Stamm lag mit einer Ethanolbildungsrate von 114 mg g⁻¹ h⁻¹ zwischen entsprechendem Wildtyp und atmungsdefekter ρ^0 -Mutante.

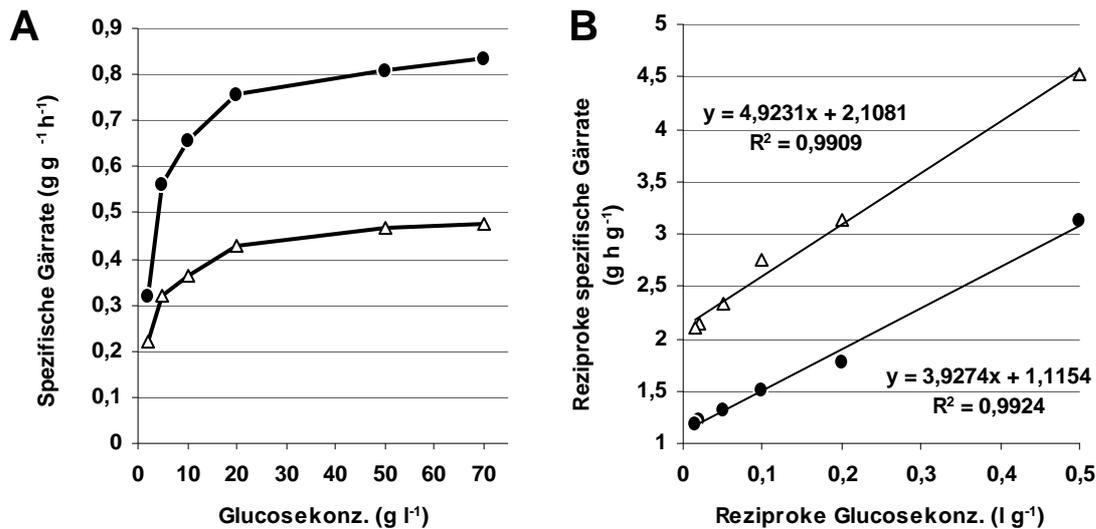


Abb. 26: Ethanolbildungsrate unter aeroben Bedingungen von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 (--Δ-- Wildtyp, --●-- ρ⁰-Mutante) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Substratsättigungskurve (A); Darstellung nach Lineweaver und Burk (B))

Zur Untersuchung der maximal erreichbaren spezifischen Gäraktivität von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 wurden die Glucosekonzentrationen in verschiedenen Ansätzen schrittweise erhöht und die Substratsättigungskurve aufgenommen. Dies erfolgte mit Schüttelkulturen in Erlenmeyerkolben, bzw. zur anaeroben Kultivierung in stehenden Kulturflaschen bei 30 °C (Abb. 26 und Abb. 27). Unter aeroben Bedingungen trat bei einer Glucosekonzentration von 7 % weitgehende Substratsättigung bei einer spezifischen Ethanolbildungsrate von 0,48 g g⁻¹ h⁻¹ beim Wildtyp bzw. 0,81 g g⁻¹ h⁻¹ bei der ρ⁰-Mutante ein (Abb. 26 A).

Die Gärrate als Funktion der Glucosekonzentration folgt der Michaelis-Menten-Kinetik. Dies wird durch die Substratsättigungskurve sowie durch die Darstellung nach Lineweaver und Burk (Abb. 26 B) deutlich. Der aus Abb. 26 B für die Gärung des Wildtyps unter aeroben Bedingungen berechnete K_m-Wert beträgt 2,3 g l⁻¹ Glucose. Für die ρ⁰-Mutante ergibt sich ein K_m-Wert für Glucose von 3,5 g l⁻¹. Auch unter anaeroben Bedingungen war die Substratsättigung der Gäraktivität bei einer Glucosekonzentration von 7 % weitgehend erreicht. Die maximale Ethanolbildungsrate des Wildstammes war mit 0,74 g g⁻¹ h⁻¹ fast genauso hoch wie die maximal erreichte Gärrate der ρ⁰-Mutante mit 0,83 g g⁻¹ h⁻¹. Der Verlauf der Substratsättigungskurve blieb bei der ρ⁰-Mutante durch die Kultivierungsform (aerob geschüttelt oder anaerob stehend) weitgehend unbeeinflusst. Die etwas geringere Gäraktivität des Wildstammes lässt sich durch den Eintritt von Luft in die anaerobe Kultur bei

der Probenahme erklären (Abb. 27 A). Der K_m -Wert für die alkoholische Gärung auf Glucose unter anaeroben Bedingungen beträgt $1,8 \text{ g l}^{-1}$ für den Wildtyp bzw. $3,1 \text{ g l}^{-1}$ für die ρ^0 -Mutante. Somit zeigte der Wildtyp hinsichtlich der alkoholischen Gärung unabhängig von den Kulturbedingungen eine geringfügig höhere Affinität gegenüber Glucose.

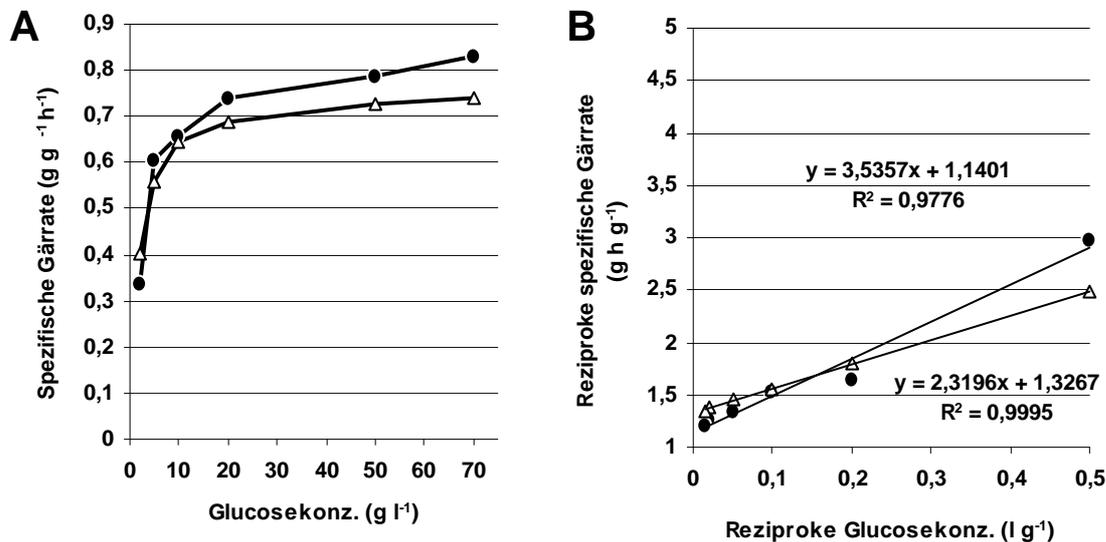


Abb. 27: Ethanolbildungsraten unter anaeroben Bedingungen von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 (-- Δ -- Wildtyp, -- \bullet -- ρ^0 -Mutante) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Substratsättigungskurve (A); Darstellung nach Lineweaver und Burk (B))

3.2.5 Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Ethanolproduktion

Zur Ermittlung des Einflusses der Sauerstoffkonzentration auf die Biomasse-spezifische Ethanolbildungsrate von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 Wildtyp und entsprechender ρ^0 -Mutante wurde vorgezogene Hefebiomasse in $0,1 \text{ M}$ Citrat-Phosphat-Puffer mit 1% Glucose suspendiert und bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Neben einem anaeroben Ansatz, bei dem der Restsauerstoff durch vorherige Begasung mit Stickstoff aus dem Medium entfernt wurde, wurde ein Ansatz mit Luft und ein weiterer mit reinem Sauerstoff begast. Die Zunahme der Ethanolkonzentration in den verschiedenen Ansätzen ist in Abb. 28 dargestellt. Trotz der geringen Menge an eingesetzter Biomasse wurde durch den hohen Sauerstoffverbrauch des Wildtyps von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 in den drei Ansätzen nicht die gasspezifische Sauerstoffsättigung des Mediums erreicht. Im mit Luft begasten Ansatz stellte sich eine Sauerstoffkonzentration von ca. 50% , im Sauerstoff-begasten eine Sauerstoffkonzentration von ca. 400% Luftsättigung ein.

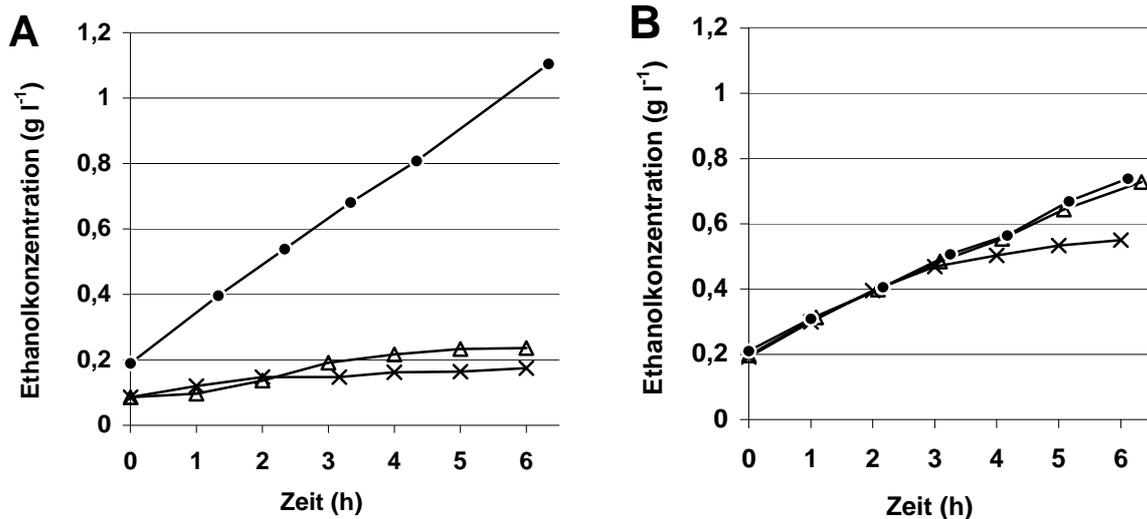


Abb. 28: Ethanolkonzentration in statischer Kultur von *S. cerevisiae* DSMZ 1333, Wildtyp (A) ρ^0 -Mutante (B) (---●--- anaerob, ---Δ--- Luftbegasung, ---x--- Sauerstoffbegasung)

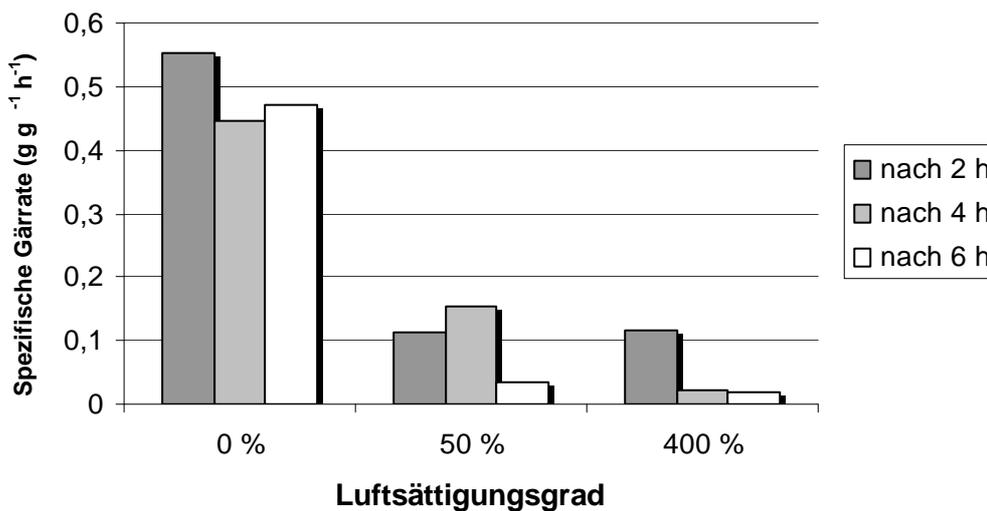


Abb. 29: Biomasse-spezifische Ethanolbildungsraten von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (1 % Glucose)

Die Gäraktivität unter anaeroben Bedingungen war deutlich höher als in den Luft- oder Sauerstoff-begasteten Ansätzen. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich bei der Ethanolbildung in den aeroben Ansätzen um aerobe Gärung handelte und somit die Messwerte mit denen unter anaeroben Kulturbedingungen bzw. mit denen von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 nicht vergleichbar sind. Im Ansatz mit 50 % Luftsättigung kam es in den ersten vier Stunden zu keinem Verlust an Gäraktivität. Nach sechs Stunden war die Gäraktivität jedoch deutlich reduziert. Bei einem Sauerstoffgehalt von 400 % Luftsättigung zeigte *S. cerevisiae* DSMZ

1333 Wildtyp in den ersten zwei Stunden die gleiche Gäraktivität wie bei 50 % Luftsättigung. Allerdings war bereits nach vier Stunden Inkubation nur noch 16 % Restaktivität messbar (Abb. 29). Zur Untersuchung des Einflusses der Sauerstoffkonzentration auf die Biomasse-spezifische Ethanolbildungsrate von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 wurde genauso wie beim Wildtyp verfahren. Aufgrund der geringen Menge an eingesetzter Biomasse und dem sehr geringen Sauerstoffverbrauch stellten sich bei dem Ansatz mit *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 die bei Normaldruck maximal erreichbaren Sauerstoffsättigungen ein, abhängig vom verwendeten Gas (Abb. 30).

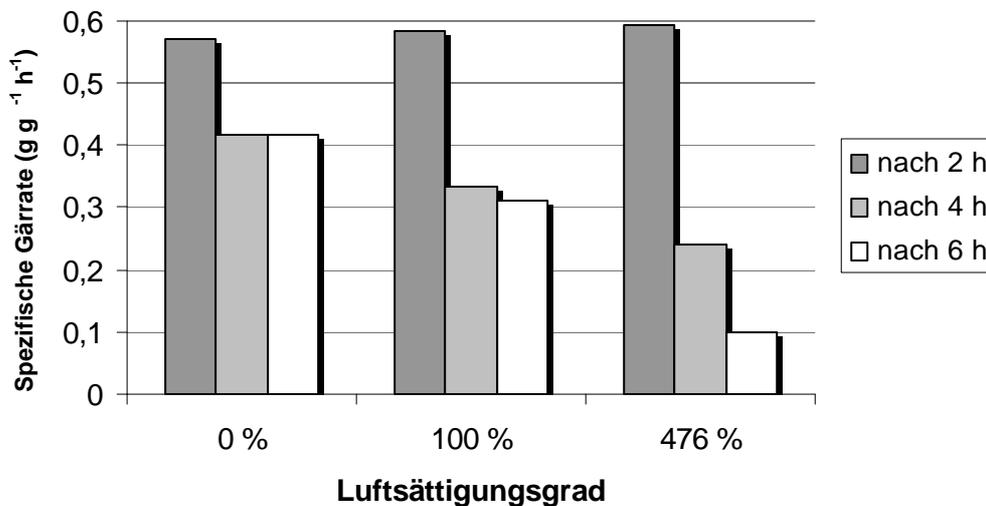


Abb. 30: Biomasse-spezifische Ethanolbildungsraten von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (1 % Glucose, siehe 2.6.2)

Die durchschnittliche Ethanolbildungsrate in den ersten zwei Stunden der Inkubation war bei *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 in allen drei Ansätzen nahezu identisch und entsprach der des Wildtyps unter anaeroben Bedingungen. Allerdings war der Gäraktivitätsverlust mit fortschreitender Versuchsdauer stärker ausgeprägt als beim Wildtyp. Die durchschnittliche Ethanolbildungsrate aus der dritten und vierten Stunde nach Beginn der Inkubation war in allen Ansätzen verringert. Es kam mit fortschreitender Versuchsdauer zum Aktivitätsverlust der Hefen. Das Ausmaß des Aktivitätsverlustes nahm mit steigendem Sauerstoffgehalt im Medium zu. Der anaerobe Ansatz zeigte nach den ersten zwei Stunden keinen weiteren Verlust der Gäraktivität, wohingegen der Ansatz mit einem Sauerstoffgehalt von 476 % Luftsättigung weiterhin deutlich an Gäraktivität verlor. Nach 6 Stunden Inkubation waren in diesem Ansatz nur noch 17 % der Anfangsaktivität vorhanden. Im Ansatz mit 100 %

Luftsättigung waren nach vier Stunden noch 57 % und nach sechs Stunden noch 54 % Restaktivität zu finden. Zu einem weiteren Verlust an Gäraktivität nach den ersten zwei Stunden Inkubation kam es in diesem Ansatz kaum. Eine Abnahme der Gäraktivität durch zunehmende Zuckerlimitierung konnte durch den Versuchsaufbau ausgeschlossen werden, da die Abnahme der Glucosekonzentration während des Versuchs im Verhältnis zur vorgelegten Glucosekonzentration sehr gering war.

Durch eine Steigerung des Sauerstoffgehaltes von 50 auf 400 % Luftsättigung kam es beim Wildtyp nicht zur verstärkten Unterdrückung der Gärung, jedoch zu einer verminderten Langzeitstabilität der Gäraktivität. Bei in 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer suspendiertem *S. cerevisiae* DSMZ 1333 Wildtyp und ρ^0 -Mutante kommt es mit fortschreitender Versuchsdauer zum Verlust von Gäraktivität. Durch Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Medium wird dieser Aktivitätsverlust stark beschleunigt. Diese Beobachtung gilt sowohl für die rein anaerobe alkoholische Gärung von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 als auch für die aerobe Gärung von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 und ist vermutlich durch einen generellen Vitalitätsverlust der Hefen begründet.

3.2.6 Schutz vor erhöhter Sauerstoffkonzentration durch Immobilisierung

Ähnlich wie in den vorangehend beschriebenen Versuchen wurde zur Prüfung des Immobilisierungseinflusses eine definierte Menge Biomasse von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 in stickstofffreier 1 %iger Glucoselösung suspendiert und die Zunahme der Ethanolkonzentration bei 30 °C unter Sauerstoffsättigung (476 % Luftsättigung) acht Stunden lang gemessen. Dies geschah auch mit in 2 %igem Alginat immobilisierter Hefemasse. Beide Versuche erfolgten im Doppelansatz. Obwohl die Ansätze wegen der Instabilität von Alginatmatrices gegenüber einwertigen Ionen schwächer gepuffert waren als in den vorangehenden Versuchen (0,01 Citrat-Phosphat-Puffer), blieb der pH-Wert während der Messung konstant. Die Zunahme der Ethanolkonzentration pro eingesetzter Hefemasse mit fortschreitender Versuchsdauer ist in Abb. 31 wiedergegeben.

Beim Einsatz nativer Hefemasse kam es bereits nach drei Stunden Inkubation zur Abnahme der Gäraktivität. Nach fünf Stunden Inkubation blieb die Ethanolkonzentration weitgehend konstant. Es kam zum fast vollständigen Verlust der Gäraktivität. In den Ansätzen mit immobilisierter Hefemasse erfolgte diese Einschränkung deutlich langsamer und bis zum Versuchsende nahm die Ethanolkonzentration zu. Um die unterschiedliche Einschränkung der Gäraktivität von nativer und immobilisierter *S. cerevisiae* DSM 1333 ρ^0 zu verdeutlichen,

sind für beide Ansätze die zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorhandenen Ethanolbildungsraten vergleichend in Abb. 32 dargestellt. Die Gäraktivität der Immobilisate betrug zu Versuchsbeginn nur 78 % der Aktivität der nativen Hefe. Im Ansatz mit nativer Hefe sind jedoch nach sechs Stunden nur noch 23 % der Anfangsaktivität vorhanden. Beim Einsatz von Immobilisaten sind es zum gleichen Zeitpunkt noch 76 %. Nach acht Stunden waren dies bei nativen Zellen nur noch 5 % und bei immobilisierten Zellen 50 %. Es konnte gezeigt werden, dass eine Immobilisierung von Hefe zu einer höheren Stabilität der Gäraktivität gegenüber erhöhten Sauerstoffkonzentrationen führen kann.

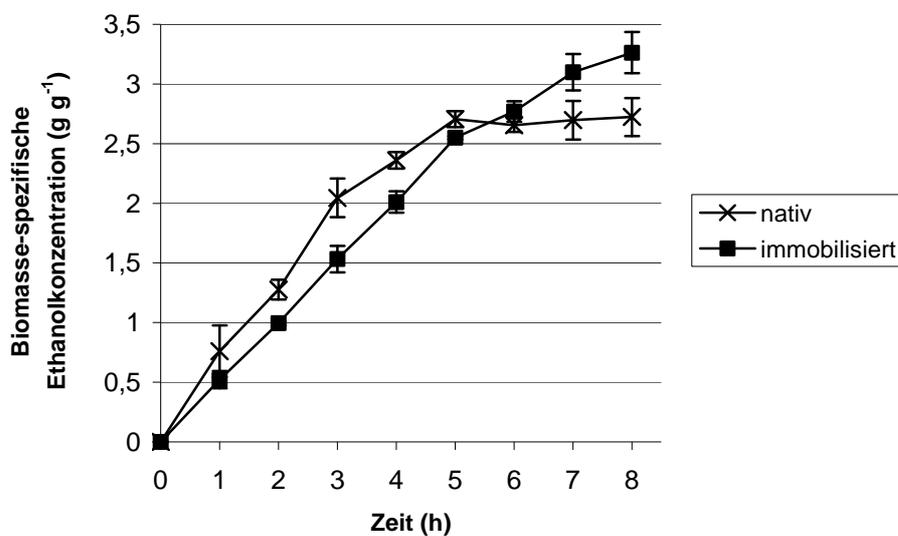


Abb. 31: Biomasse-spezifische Ethanolkonzentration in statischer Kultur von nativen und Alginat-eingehüllten Zellen von *S. cerevisiae* DSM 1333 ρ^0 bei 476 % Luftsättigung

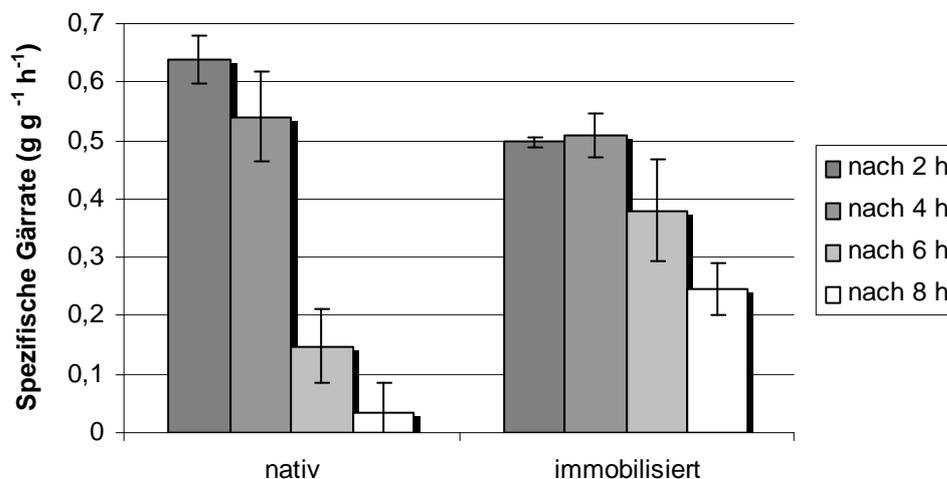


Abb. 32: Biomasse-spezifische Ethanolbildungsraten von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 in nativer und immobilisierter Form bei 476 % Luftsättigung (1 % Glucose)

3.2.7 Einfluss der Sauerstoffkonzentrationen auf das Wachstum von *S. cerevisiae*

Zur Ermittlung des Sauerstoff-Einflusses auf das Wachstum von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 und *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 wurde die OD 620 im Rührreaktor ohne Begasung, mit Luftbegasung und mit Sauerstoffbegasung aufgenommen. Die Zunahme der Optischen Dichte und der Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Medium unter Begasung mit reinem Sauerstoff ist in Abb. 33 dargestellt. Trotz kontinuierlicher Begasung mit reinem Sauerstoff sank die Sauerstoffkonzentration im Medium während des Wachstums von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 Wildtyp, so dass nach fünf Stunden annähernd anaerobe Verhältnisse in der Kulturbrühe vorlagen. Deutlich zeigte sich die Diauxie beim Wachstum des Wildstammes auf Glucose, verursacht durch die zeitlich versetzte Assimilation des während der aeroben Gärung entstandenen Ethanols.

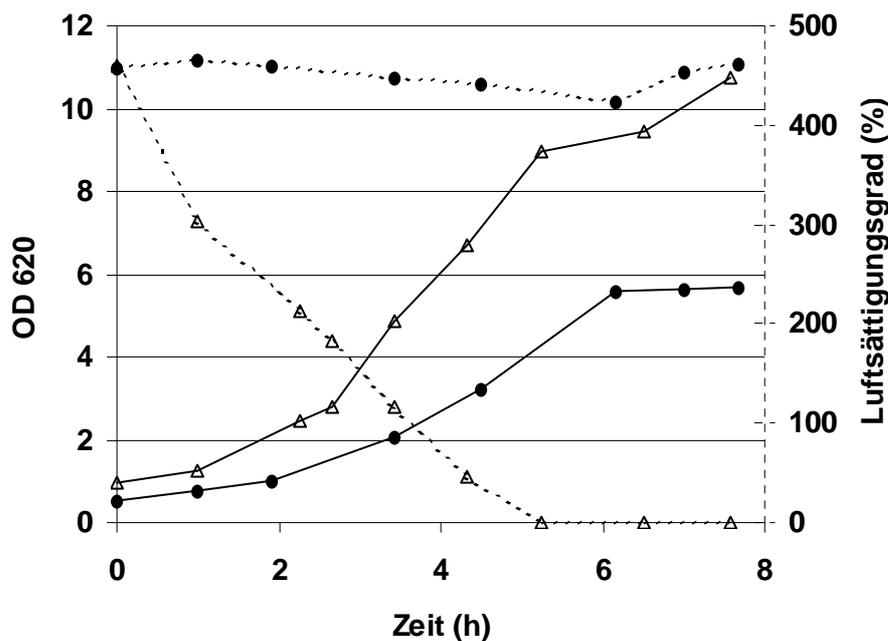


Abb. 33: Wachstum von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 (WT --Δ-- und ρ^0 --●--) und Sauerstoffkonzentration im Medium während der Begasung mit reinem Sauerstoff

Während des exponentiellen Wachstums von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 kam es trotz des geringen Sauerstoffverbrauchs (Abb. 22) und kontinuierlicher Begasung mit reinem Sauerstoff zur leichten Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Medium. Ursache kann neben atmungsunabhängigen sauerstoffverbrauchenden Enzymreaktionen die Kohlendioxid-

produktion der Hefekultur sein, die zur Herabsetzung der Löslichkeit anderer Gase im Medium führt. Für die während des Wachstums vorliegenden Sauerstoffkonzentrationen können keine absoluten Werte angegeben werden. Die in Tab. 11 genannten Luftsättigungsgrade sind Mindestwerte, welche über den gesamten Versuch eingehalten wurden. Das Wachstum von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 blieb durch die Begasung mit Luft unbeeinflusst. Die maximal erreichte Wachstumsrate entsprach der unter anaeroben Bedingungen. Durch die Begasung mit reinem Sauerstoff wurde das Wachstum der ρ^0 -Mutante jedoch eingeschränkt, und die Wachstumsrate des obligaten Gärers sank. Der Wildtyp von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 zeigte hingegen keinen Unterschied in den ermittelten Wachstumsraten für das Wachstum unter Luft- und Sauerstoffbegasung. Dies ist begründet in den niedrigen Sauerstoffkonzentrationen, die trotz Begasung während des Wachstums des Wildtyps in der Kulturbrühe vorlagen. Lediglich die totale Abwesenheit von Sauerstoff während der anaeroben Kultivierung führte zu einem Absinken der Wachstumsrate auf das Niveau der atmungsdefekten ρ^0 -Mutante.

Deutliche Unterschiede zeigten sich bei den Zellausbeuten des Wildtyps unter den verschiedenen Kulturbedingungen. Während diese bei der ρ^0 -Mutante durch die verschiedenen Begasungsformen nicht beeinflusst wurden, stiegen sie beim Wildtyp rapide mit dem zunehmenden Sauerstoffeintrag in die Kultur. Grund war die verstärkte Atmung und die damit gegenüber der Gärung erhöhte Biomasseproduktion. Dadurch sank beim Wildtyp auch die Ethanolausbeute (Tab. 11).

Tab. 11: Gemessene Kenngrößen für das Wachstums von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 bei der Verwendung verschiedener Gase (Normaldruck, $0,5 \text{ vv}^{-1} \text{ min}^{-1}$) bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ in Vollmedium (1 % Glucose, 0,5 % YE), ermittelt nach 6 Stunden Inkubation

Verwendetes Gas (Normaldruck)	Sauerstoff		Luft		anaerob	
	Wildtyp	ρ^0	Wildtyp	ρ^0	Wildtyp	ρ^0
Mindestluftsättigung (%)	0	> 400	0	> 80	0	0
μ_{max} (h^{-1})	0,54	0,43	0,54	0,48	0,48	0,48
Zellausbeute (g g^{-1})	0,29	0,13	0,20	0,13	0,14	0,13
Max. Ethanolproduktion ($\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	1,37	1,28	2,01	1,63	1,48	1,36
Ethanolausbeute (g g^{-1})	0,39	0,49	0,42	0,47	0,47	0,50

3.3 Kombination aus Fotosynthese und alkoholischer Gärung im Fotobioreaktor

3.3.1 Simulation

Im Folgenden sind die Ergebnisse einer Simulation der Ethanolproduktion aus fotosynthetisiertem Zucker beschrieben. Der fotosynthetisch aktive Part wird durch Maltosezugabe in das System simuliert. Die höchste in dieser Arbeit über einen mehrtägigen Zeitraum gemessene volumetrische Zuckerexkretionsrate von *Ch. sp.* SAG 241.80 betrug $429 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, dennoch wurde hier eine deutlich höhere Zuckerexkretion simuliert. Es wurde Maltose mit einem Zulauf von $120 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ kontinuierlich in einen 1-Liter-Rührreaktor gegeben. Dies entspräche einer Zuckerexkretion von $3031 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Um die Bedingungen im Fotobioreaktor nachzuahmen, wurde Hefebiomasse von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 in NMV Medium suspendiert. Die anfängliche Biomassekonzentration betrug $0,5 \text{ g l}^{-1}$. Die Inkubationstemperatur betrug, wie bei den Versuchen mit Grünalgen, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und durch kontinuierliche Begasung mit Luft wurden aerobe Verhältnisse im System aufrecht erhalten. Der Versuch erfolgte im Doppelansatz.

Abb. 34 zeigt den Verlauf der Ethanol- und Maltosekonzentration im Bioreaktor. Weiter ist die Ethanolkonzentration angegeben, welche bei einer vollständigen Vergärung der Maltose entstanden wäre (max. EtOH). Zur Berechnung wurde die aus einer theoretischen Vergärung der akkumulierten Maltose stöchiometrisch maximal mögliche Ethanolmenge ($0,54 \text{ g Ethanol}$ aus 1 g Maltose) mit der gemessenen Ethanolkonzentration aufaddiert (Abb. 34). Während der ersten 50 Stunden kam es zur vollständigen Umsetzung der kontinuierlich zulaufenden Maltose. Danach erfolgte aufgrund nachlassender Gäraktivität der Hefe eine verstärkte Akkumulation von Maltose im System. Die fortan geringere Zunahme der Ethanolkonzentration ist jedoch nicht ausschließlich darauf zurückzuführen. Auch bei einer theoretischen Umsetzung der akkumulierten Maltose nimmt die Steigung der Ethanolkonzentration (max. EtOH) mit fortlaufender Versuchsdauer im Medium ab. Da nach Versuchsende durch Wachstumstest auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen keine respiratorisch aktiven Kontaminationen nachgewiesen werden konnten, ist die beschriebene Abweichung nur durch Evaporation des entstandenen Ethanols aufgrund der kontinuierlichen Belüftung zu erklären.

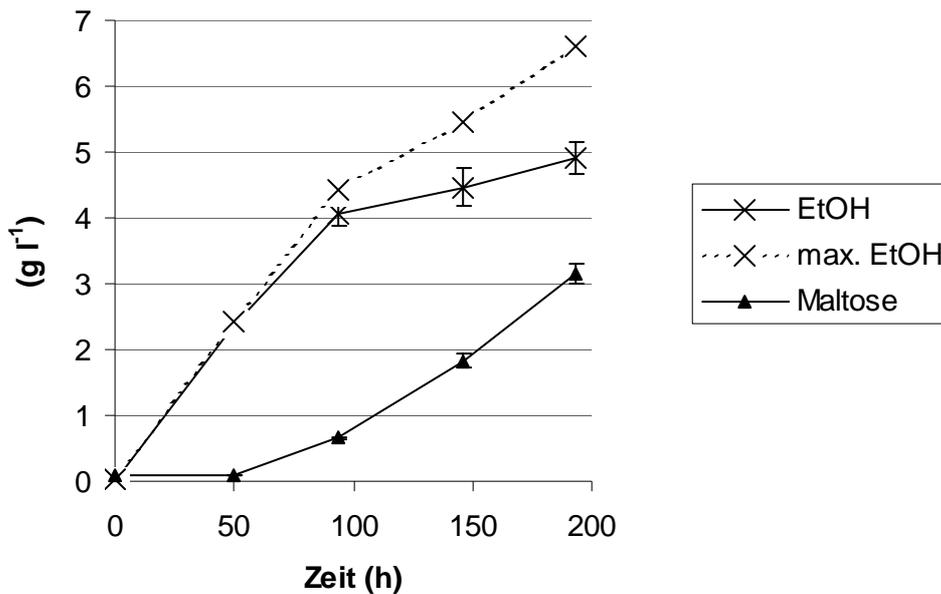


Abb. 34: Ethanolproduktion von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 in NMV-Medium unter Zuckerlimitierung ($0,12 \text{ g Maltose l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

3.3.2 Cokultivierung von Grünalgen und Hefen

Für die Versuche zur Ethanolproduktion aus Kohlendioxid und Licht wurden die Organismen *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 und *Ch. sp.* SAG 241.80 verwendet. Die Mikroorganismen wurden vorgezogen und in EM in einem 400-ml-Säulenreaktor suspendiert. Die Zelldichte der Grünalgen im Versuchsansatz betrug zu Versuchsbeginn 10^8 ml^{-1} . Dieser Versuch wurde in zwei verschiedenen Varianten durchgeführt (Abb. 35 und Abb. 36). Jede Versuchsvariante wurde im dreifachen Parallelansatz erstellt und die Messergebnisse wurden gemittelt. Die beiden Varianten unterschieden sich in der Menge der verwendeten Hefebiomasse und im Zeitpunkt der Hefezugabe. In Variante 1 wurden die Hefen 16 Stunden nach Versuchsbeginn zugegeben und hatten im Fotobioreaktor eine Zelldichte von $5 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$. In Variante 2 wurden die Hefezellen zusammen mit den Grünalgen zu Beginn des Versuchs in EM suspendiert. In dieser Variante lag die Hefezelldichte bei 10^6 ml^{-1} . Abb. 35 zeigt die Messergebnisse aus Variante 1. Die Zuckerproduktionsrate in den ersten 16 Stunden, d.h. vor Zugabe der Hefe, betrug $668 (\pm 198) \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die Maltosekonzentration stieg auch noch nach Hefezugabe (trotz eintretender Ethanolproduktion) bis zur 30. Stunde. Danach sank sie, was verdeutlicht, dass die Gäraktivität der eingesetzten Hefen dann die Zuckerproduktion der Algen überstieg. Die Ethanolkonzentration im Medium nahm bis zum Versuchsende

kontinuierlich zu. Zwischen der 30. und 65. Stunde war im Medium auch das Zuckermonomer Glucose nachweisbar. Dies kann als Zwischenprodukt beim Maltoseabbau durch die Hefe angesehen werden. Allerdings lässt sich eine Veränderung der Exkretionseigenschaften der Grünalge mit fortschreitender Versuchsdauer nicht ausschließen. Die maximale Ethanolbildungsrate in Variante 1 betrug $412 (+/- 23) \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Der Phosphatgehalt sank während des Versuches von 5 mmol l^{-1} auf $4,28 (+/- 0,19) \text{ mmol l}^{-1}$ (ohne Abb.).

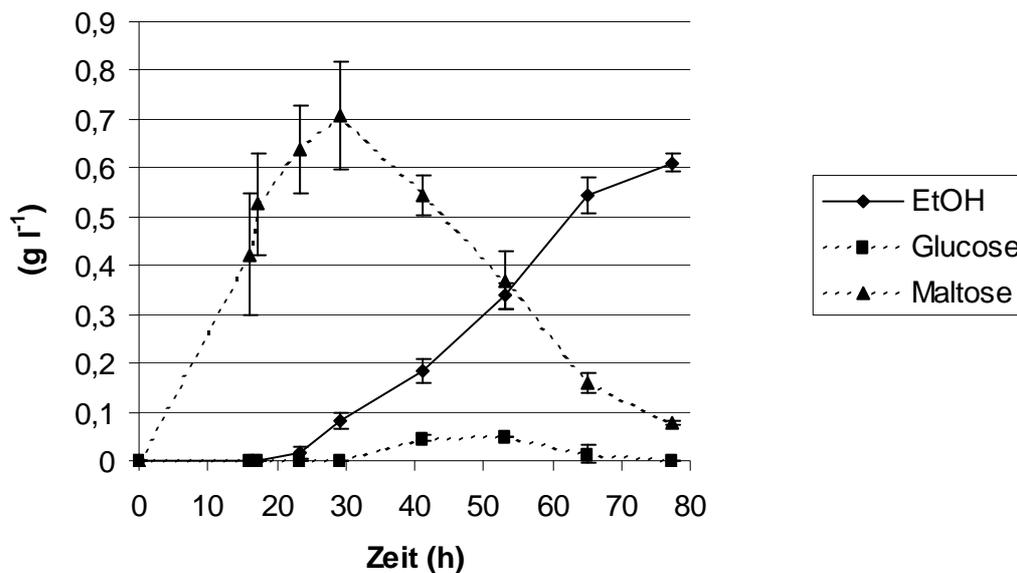


Abb. 35: Variante 1 zur Ethanolproduktion durch Cokultivierung von *Ch. sp.* SAG 241.80 (10^8 Zellen pro ml) und *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 ($5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml) in EM-Medium unter Dauerlicht; Hefezugabe nach 16 Stunden

Die Messergebnisse aus Variante 2 sind in Abb. 36 wiedergegeben. Die durchschnittliche Zuckerproduktion in den ersten zwölf Stunden, d.h. im ersten Messintervall, betrug $1018 (+/- 30) \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Dies ist die höchste volumetrische Zuckeraussekretionsrate von *Ch. sp.* 241.80, die in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde. Trotz Zugabe der Hefe bei Versuchsbeginn konnte erst nach dem zweiten Messintervall, also nach 23,5 Stunden, Ethanol im Medium nachgewiesen werden. Die Ethanolkonzentration stieg bis zur 60. Stunde kontinuierlich an. Die maximale volumetrische Ethanolproduktion lag bei $421 (+/- 39) \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Freie Glucose war nur zu einem Messzeitpunkt in sehr geringer Konzentration nachweisbar. Der Phosphatgehalt sank während des Versuches von 5 mmol l^{-1} auf $4,24 (+/- 0,27) \text{ mmol l}^{-1}$ (ohne Abb.).

Es konnte also gezeigt werden, dass Ethanolproduktion aus Kohlendioxid und Licht mit den gewählten Mikroorganismen und dem verwendeten Versuchsaufbau möglich ist. Aus Abb. 35 und Abb. 36 wird allerdings nicht deutlich, ob es sich bei diesem Prozess um einen kontinuierlichen oder um einen in verschiedenen Stufen unterteilbaren Prozess handelt. Es bleibt unklar, ob über den gesamten Zeitraum Kohlenstoff aus der Zuluft fixiert und Kohlenhydrate aufgebaut bzw. zu Ethanol vergoren wurde, oder ob es erst zur Anhäufung von Maltose kam, an die sich ohne weitere Fotosyntheseleistung der Grünalge die alkoholische Gärung anschloss.

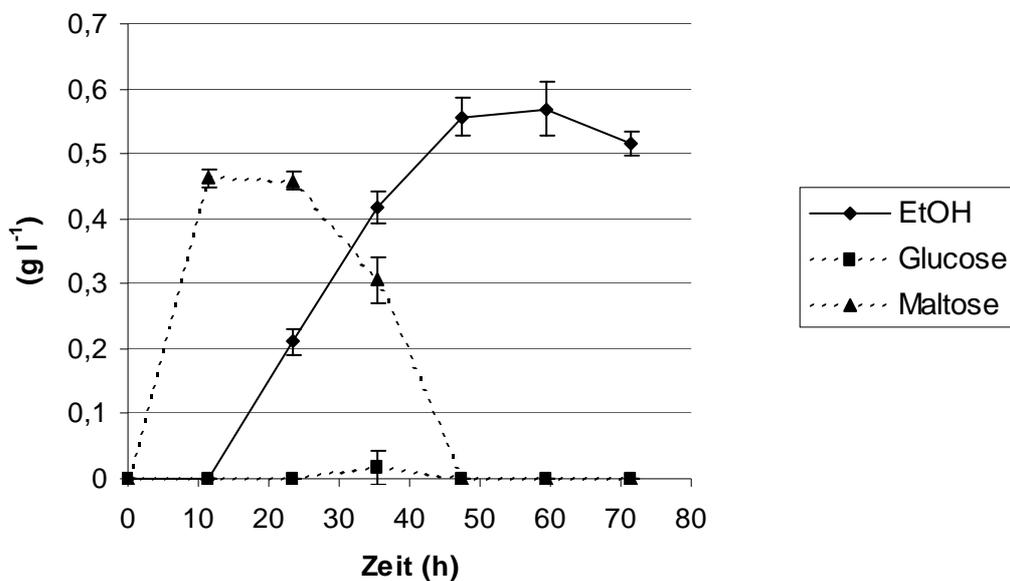


Abb. 36: Variante 2 zur Ethanolproduktion durch Cokultivierung von *Ch. sp.* SAG 241.80 (10^8 Zellen pro ml) und *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 (10^6 Zellen pro ml) in EM-Medium unter Dauerlicht

Um zu klären, ob bis zum Versuchsende Fotosynthese stattfand, wurde in Abb. 37 für beide Varianten für jeden Messzeitpunkt die zur Synthese der gemessenen Zucker (1 mol Maltose = 2 mol Glucose) und des gemessenen Ethanols (1 mol Ethanol = 0,5 mol Glucose) theoretisch notwendige Menge an Glucose aufgetragen. Somit handelt es sich nicht um ein kalorimetrisches, sondern um ein stöchiometrisches Äquivalent. In Variante 1 wird in den ersten 24 Stunden eine theoretische Glucoseproduktion von 724 (+/- 120) mg l⁻¹ d⁻¹ erreicht. Ab der 30. Stunde sinkt die Produktionsrate. Die theoretische Konzentration an Glucose steigt jedoch bis zum Versuchsende. In Variante 2 liegt in den ersten 24 Stunden eine theoretische Glucoseproduktion von 914 (+/- 24) mg l⁻¹ d⁻¹ vor. Nach 35,5 Stunden sinkt jedoch der Gehalt

an Produkten im Medium. Da zu diesem Zeitpunkt nur Ethanol im Medium gelöst vorlag, ist eine Abnahme durch Evaporation denkbar, jedoch kann ein Verbrauch dieser Kohlenstoffquelle durch mikrobielle Kontamination nicht ausgeschlossen werden.

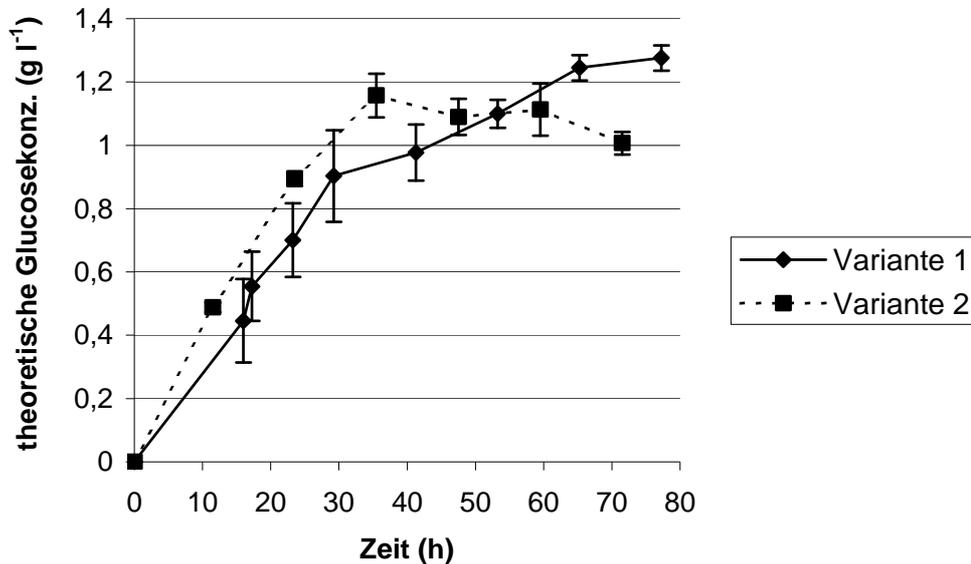


Abb. 37: Für die Synthese der in Variante 1 und 2 (Abb. 35 und Abb. 36) gemessenen Produktkonzentrationen theoretisch notwendige Konzentration an fotosynthetisch erzeugter Glucose (1 mol Maltose = 2 mol Glucose bzw. 1 mol Ethanol = 0,5 mol Glucose)

3.4 Versuche zur Wasserstoff- und Säureproduktion

3.4.1 Auswahl der Clostridienstämme

Die Fähigkeit zum Wachstum auf verschiedenen Medien wurde mit vier Clostridienstämmen untersucht. Dies erfolgte in 5-ml-Flüssigkulturen nach vorangehendem Hitzeschock. Als Inkubationstemperaturen der Kulturen wurden die stammspezifischen Vorgaben der DSMZ verwendet.

Tab. 12: Verwendete Inkubationstemperaturen und Ergebnisse des Wachstumstests der Clostridienstämme auf verschiedenen Medien in stehenden 5-ml-Kulturen.

Stamm	T (°C)	RCM	6 %ige Molke	Monot (mit Lactose)	Monot ⁺ (mit Lactose)
<i>C. saccharobutylicum</i> DSMZ 13864	37	+	+	+	+
<i>C. butyricum</i> DSMZ 10702	37	+	+	(+)	+
<i>C. acetobutylicum</i> DSMZ 792	37	+	+	+	+
<i>C. thermobutyricum</i> DSMZ 4928	55	+	-	-	-

Auf RCM zeigten alle getesteten Stämme gutes Wachstum. Auf reiner Molke sowie auf den Vollmedien mit Lactose als Kohlenhydratquelle wuchs *C. thermobutyricum* DSMZ 4928 nicht. Alle anderen Stämme zeigten Wachstum auf Molke und den beiden Vollmedien Monot und Monot⁺. Allerdings war das Wachstum von *C. butyricum* DSMZ 10702 auf dem rein synthetischem Vollmedium (Monot) ohne Hefeextrakt- und Peptonzusatz mit Lactose als Kohlenhydratquelle sehr schwach (Tab. 12).

Tab. 13: Fermentationsprodukte (mindestens 100 mg l⁻¹) verschiedener Clostridienstämme nach dreitägigem Wachstum auf Molke (6 %) in stehenden Kulturen bei 37 °C

Stamm	Fermentationsprodukte
<i>C. saccharobutylicum</i> DSMZ 13864	Buttersäure, 1-Butanol, Essigsäure, Aceton
<i>C. butyricum</i> DSMZ 10702	Buttersäure, Essigsäure
<i>C. acetobutylicum</i> DSMZ 792	1-Butanol, Buttersäure, Essigsäure, Aceton

Da der Stamm *C. thermobutyricum* DSMZ 4928 auf reiner Molke nicht wuchs, erfolgten keine weiteren Untersuchungen mit diesem Stamm. Bei den anderen Stämmen wurde die Produktbildung in stehenden 100-ml-Kulturen mit 6 %iger Molke untersucht. Tab. 13 zeigt die nach drei Tagen Inkubation auf 6 %iger Molke nachgewiesenen Gärungsprodukte, sofern die gemessene Konzentrationen über 100 mg l⁻¹ lagen. Bei der Vergärung von Molke durch *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 und *C. acetobutylicum* DSMZ 792 konnten Spuren von Ethanol und 2-Butanol nachgewiesen werden, welche jedoch nicht quantifiziert wurden. *C. butyricum* DSMZ 10702 war der einzige Stamm, bei dem ausschließlich die Produktion von kurzkettigen Carbonsäuren und keine Lösungsmittelproduktion nachgewiesen werden konnte.

Auch der zeitliche Verlauf der Buttersäure- und 1-Butanolkonzentrationen in den stehenden 100-ml-Kulturen mit 6%iger Molke (Abb. 38) zeigt, dass es bei *C. butyricum* DSMZ 10702 auch bei höheren Buttersäurekonzentrationen nicht zur Bildung von 1-Butanol kam. Wohingegen bei *C. acetobutylicum* DSMZ 792 nach 30 Stunden Inkubation die 1-Butanolkonzentration die Buttersäurekonzentration im Medium überstieg und es nach 43 Stunden sogar zu einem Rückgang der Buttersäurekonzentration, aufgrund der Reduktion der Buttersäure zu 1-Butanol kam. Auch beim Stamm *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 lag eine deutliche 1-Butanolproduktion vor, jedoch waren die erreichten Buttersäurekonzentrationen durchaus mit denen von *C. butyricum* DSMZ 10702 vergleichbar, so dass im Folgenden diese beiden Stämme weiter untersucht wurden.

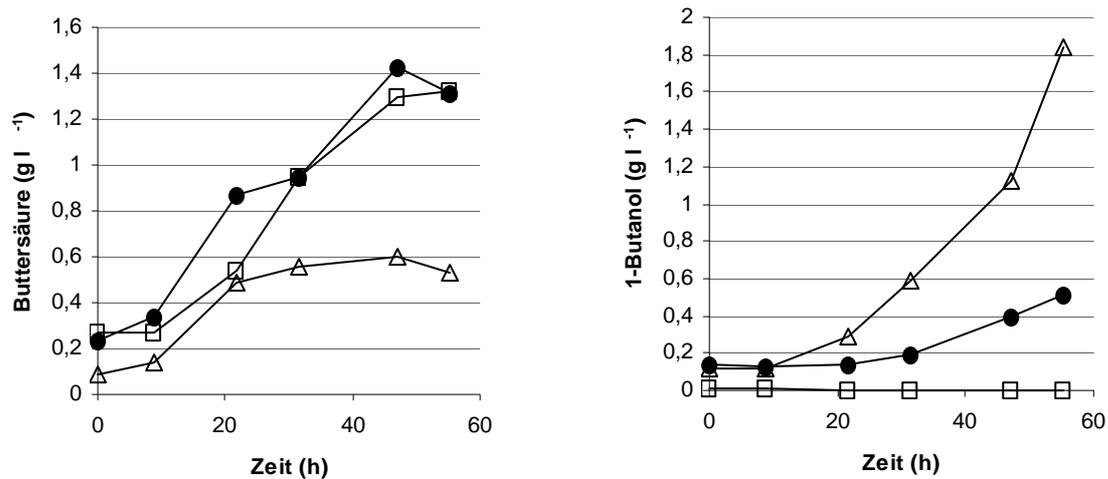


Abb. 38: Buttersäure- und 1-Butanolkonzentration in stehenden Clostridienkulturen mit 6 %iger Molke (DSMZ 10702 --□--, DSMZ 792 --△--, DSMZ 13864 --●--)

3.4.2 Wachstum von *C. saccharobutylicum* und *C. butyricum* auf Vollmedium

Die im Folgenden beschriebenen Wachstumsversuche wurden alle in einer 1-l-Kultur im Rührreaktor unter einer selbstgenerierten anaeroben Atmosphäre durchgeführt. Die Inokulation der 900-ml-Hauptkultur erfolgte mit über Nacht stehend inkubierten Vorkulturen gleichen Mediums. In Tab. 14 sind Wachstumsraten und Produktionsraten von *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 und *C. butyricum* DSMZ 10702 auf Vollmedium mit Lactose als Kohlenstoffquelle wiedergegeben. Neben dem nicht pH-gesteuerten Ansatz unter Zusatz von Hefeextrakt wurde bei *C. butyricum* DSMZ 10702 ein Ansatz ohne Hefeextraktzusatz und einer mit pH-Steuerung (pH 6,5) durchgeführt. Die Kenngrößen in Tab. 14 stammen aus den ersten zehn Stunden der Wachstumsversuche.

Die vorhandene Essigsäureproduktion ist in Tab. 14 nicht wiedergegeben, da die Quantifizierung der produzierten Essigsäure durch den hohen Acetatgehalt des Vollmediums sehr ungenau war. Die ermittelten Zuwächse an Essigsäure waren zudem noch sehr gering, so dass von einer Produktinhibierung der Essigsäureproduktion ausgegangen werden kann.

Exemplarisch ist die Optische Dichte und die Lactosekonzentration in Abb. 39 und die Buttersäurekonzentration und Gasbildung während des Wachstums von *C. butyricum* DSMZ 10702 auf Vollmedium (Monot⁺) mit Lactose als Kohlenstoffquelle sowohl mit als auch ohne pH-Steuerung (pH 6,5) in Abb. 40 dargestellt. Das Wachstum und der Zuckerverbrauch ist in den beiden Ansätzen in den ersten sechs Stunden ähnlich, danach führt jedoch die

Ansäuerung des Mediums durch die Säureproduktion im Ansatz ohne pH-Steuerung zu einem starken Rückgang des Wachstums und des Zuckerverbrauchs. Der pH-Wert sank innerhalb von zehn Stunden von anfänglich pH 6,5 auf pH 4,6 (Abb. 39).

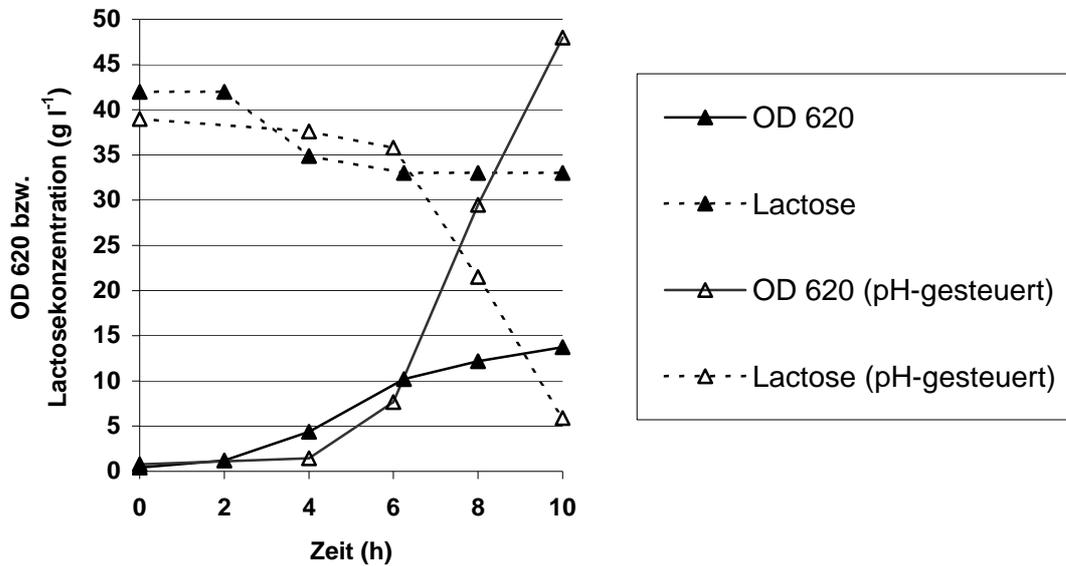


Abb. 39: Optische Dichte und Lactosekonzentration während des Wachstums von *C. butyricum* DSMZ 10702 auf Vollmedium (Monot⁺) ohne und mit pH-Steuerung (pH 6,5)

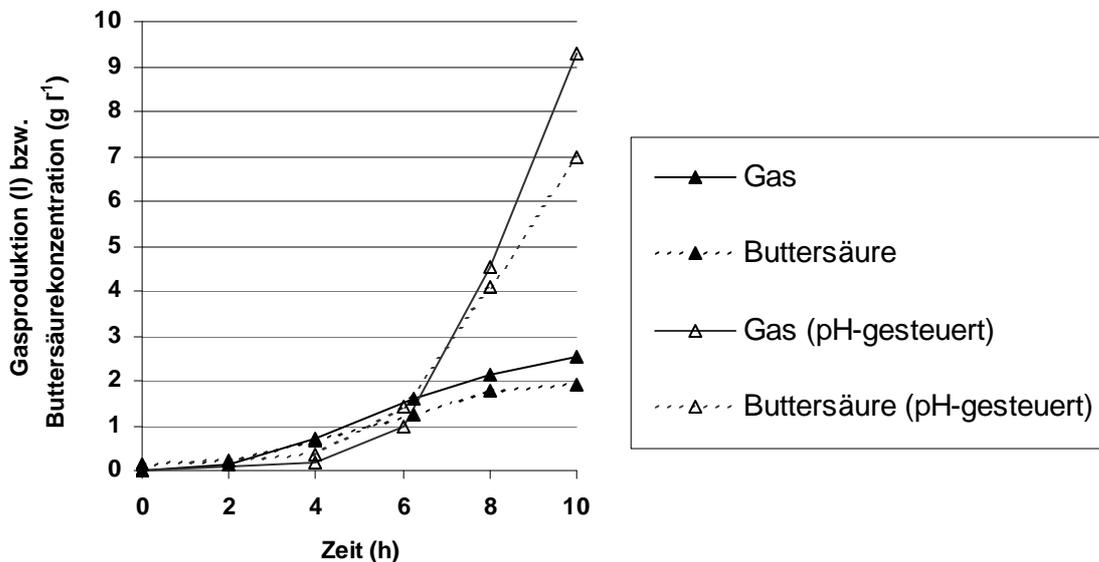


Abb. 40: Gasproduktion und Buttersäurekonzentration während des Wachstums von *C. butyricum* DSMZ 10702 ohne und mit pH-Steuerung (pH 6,5) auf Vollmedium (Monot⁺) mit Lactose

Ein ähnliches Bild wie beim Wachstum ergab sich bei der Produktbildung. Die nach sechs Stunden im pH-gesteuerten Ansatz beobachtete starke Gas- und Säurebildung blieb im nicht gesteuerten Ansatz aus (Abb. 40). Es waren nach zehn Stunden lediglich 26,5 % der Lactose verbraucht. Eine hohe Säure- und Gasproduktion war ohne pH-Steuerung nicht möglich. Das in den ersten zehn Stunden entstandene Gas hatte beim Ansatz mit pH-Steuerung einen Wasserstoffgehalt von 67 %. Der Verzicht auf Hefeextraktzusatz führte bei *C. butyricum* DSMZ 10702 zu einem Rückgang der Wachstums- und Produktionsraten, so dass nach zehn Stunden nur 7,1 % der Lactose aufgebraucht waren.

Im Vergleich von *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 und *C. butyricum* DSMZ 10702 zeigte *C. butyricum* eine höhere maximale Wachstumsrate bei geringerer Produktbildung während des Wachstums ohne pH-Steuerung auf Vollmedium mit Lactose und Hefextrakt (Tab. 14). Die gemessenen durchschnittlichen Produktionsraten lagen deutlich unter den angegebenen maximalen Raten. Zum Beispiel lag die durchschnittliche Produktionsrate während des Wachstums von *C. butyricum* DSMZ 10702 in der pH-gesteuerten Kultur im zehnstündigen Mittel für Buttersäure bei $0,70 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ bzw. für Gas bei $0,93 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Tab. 14: Kenngrößen des Wachstums und der Produktbildung von *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 und *C. butyricum* DSMZ 10702 auf Vollmedium (Monot⁺) mit 4,5 % Lactose. Teilweise wurde auf den Hefeextraktzusatz verzichtet bzw. der pH-Wert gesteuert. Die Auswertung der Versuche erfolgte nach zehn Stunden Inkubation.

DSMZ-Nr.	13864	10702		
Hefeextraktzusatz (1 %)	+	-	+	+
pH-gesteuert (pH 6,5)	-	-	-	+
Wachstumsrate μ_{\max} (h^{-1})	0,47	0,43	0,65	0,83
Buttersäureproduktion p_{\max} ($\text{g l}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,35	0,16	0,27	1,33
Gasproduktion p_{\max} ($\text{l l}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,44	0,14	0,40	2,38
Unverbrauchte Lactose (g l^{-1})	31,81	41,8	33,09	5,92

In Tab. 15 sind Wachstumsraten und Produktionsraten von *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 und *C. butyricum* DSMZ 10702 auf Vollmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle wiedergegeben.

Tab. 15: Kenngrößen des Wachstums und der Produktbildung von *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 und *C. butyricum* DSMZ 10702 auf Vollmedium (Monot⁺) mit 4,5 % Glucose und 1 % Hefeextrakt. Der pH-Wert wurde nicht gesteuert. Die Auswertung der Versuche erfolgte nach zehn Stunden Inkubation.

DSMZ-Nr.	13864	10702
Wachstumsrate μ_{\max} (h ⁻¹)	0,55	0,68
Buttersäureproduktion p_{\max} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	0,39	0,27
Gasproduktion p_{\max} (l l ⁻¹ h ⁻¹)	0,83	0,60
Unverbrauchte Glucose (g l ⁻¹)	29,6	31,9

Auch beim Wachstum auf Glucose zeigt *C. butyricum* DSMZ 10702 im Vergleich mit *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 eine höhere maximale Wachstumsrate bei geringerer Produktbildung. Die Wachstums- und Produktionsraten waren bei beiden Stämmen auf Glucose höher als auf Lactose (Tab. 14 und Tab. 15). Nicht unerwähnt bleiben sollte die 1-Butanol- und Acetonproduktion von *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864, welche, z.B. beim Wachstum auf Glucose, mit 0,23 g 1-Butanol l⁻¹h⁻¹ nicht unbedeutend war (ohne Tab.). Bei *C. butyricum* DSMZ 10702 konnte wie in den in Abb. 38 dokumentierten Versuchen in keiner Versuchsvariante eine Lösungsmittelproduktion nachgewiesen werden. Nähere Informationen über die Zusammensetzung des Gärgases von *C. butyricum* DSMZ 10702 während des Wachstums auf Vollmedium mit Glucose finden sich im Kapitel 3.4.4.

3.4.3 Wachstum von *C. saccharobutylicum* und *C. butyricum* auf Molke

In Tab. 16 sind Wachstumsraten und Produktionsraten von *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 und *C. butyricum* DSMZ 10702 auf 6 %iger Molke mit Lactose als Kohlenstoffquelle wiedergegeben. Die Versuche wurden sowohl ohne als auch mit pH-Steuerung (pH 6,5) durchgeführt. Mit *C. butyricum* DSMZ 10702 gab es zusätzlich noch einen pH-gesteuerten Ansatz mit Hefeextraktzusatz. Die Kenngrößen in Tab. 16 stammen aus den ersten zehn Stunden der Wachstumsversuche. Auf die Bestimmung der Wachstumsraten über die Optische Dichte musste wegen der sehr starken Eigentrübung der Molke verzichtet werden.

Eine pH-Steuerung führte bei beiden Stämmen zu keiner eindeutigen Steigerung der maximalen Produktionsraten. Erst der Zusatz von 0,1 % Hefeextrakt führte bei *C. butyricum* DSMZ 10702 zu einer deutlichen Steigerung. Die in den ersten zehn Stunden durch den Hefeextraktzusatz verstärkte Gasproduktion während des Wachstums von *C. butyricum* DSMZ 10702 auf Molke (Tab. 16) schwächte jedoch mit zunehmender Versuchsdauer immer

mehr ab und nach 24 Stunden waren die Gasproduktionsraten der beiden Ansätze nahezu gleich (Abb. 41). Dennoch zeigte sich auch in den durchschnittlichen Produktionsraten aus den ersten 24 Stunden eine deutliche Steigerung durch die Zugabe des Hefeextraktes. Die durchschnittliche Buttersäurebildungsrate wurde von 0,09 auf 0,24 g l⁻¹h⁻¹, die durchschnittliche Essigsäurebildungsrate von 0,04 auf 0,13 g l⁻¹h⁻¹ und die durchschnittliche Gasbildungsrate von 0,05 auf 0,16 l l⁻¹h⁻¹ angehoben. Durch elektronische Datenaufzeichnung konnte die aktuelle Gasproduktionsrate im Ansatz mit Hefeextraktzusatz bis zur vollständigen Vergärung der Lactose lückenlos dokumentiert werden (Abb. 42).

Tab. 16: Kenngrößen des Wachstums und der Produktbildung von *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 und *C. butyricum* DSMZ 10702 auf 6 %iger Molke mit 4,5 % Lactose. Teilweise wurde Hefeextrakt zugesetzt bzw. der pH-Wert gesteuert. Die Auswertung der Versuche erfolgte nach zehn Stunden Inkubation.

DSMZ-Nr.	13864		10702		
Hefeextraktzusatz (0,1 %)	-	-	-	-	+
pH-gesteuert (pH 6,5)	-	+	-	+	+
Buttersäureproduktion p _{max} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	0,19	0,13	0,16	0,21	0,30
Essigsäureproduktion p _{max} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	0,08	0,10	0,08	0,08	0,16
Gasproduktion p _{max} (l l ⁻¹ h ⁻¹)	0,10	0,08	0,15	0,08	0,49
Unverbrauchte Lactose (g l ⁻¹)	40,01	41,03	35,40	38,89	29,58

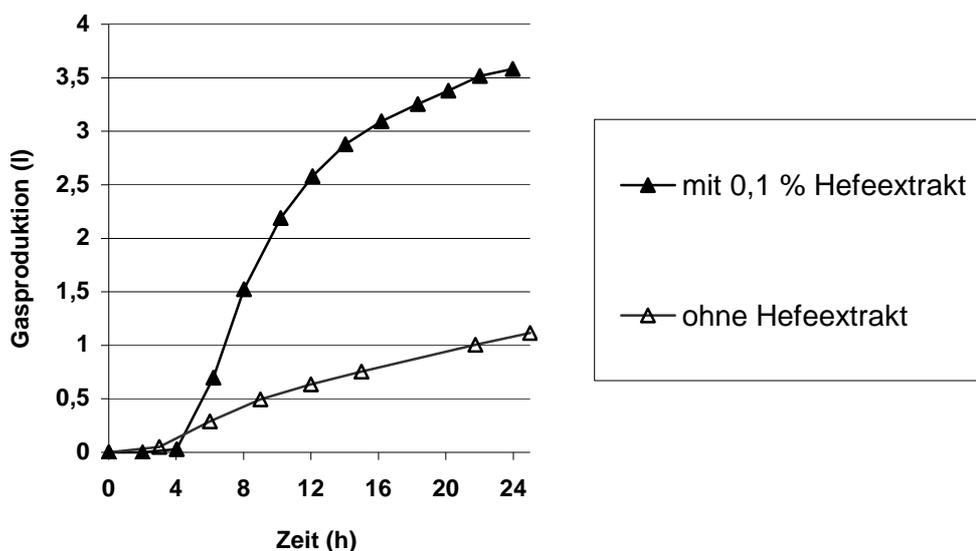


Abb. 41: Gasproduktion von *C. butyricum* DSMZ 10702 während des Wachstums auf 6 %iger Molke mit pH-Steuerung (pH 6,5).

Der sich durch den sigmoiden Verlauf der Gasproduktionskurve in Abb. 41 bereits abzeichnende Rückgang der Gasproduktion ist in Abb. 42 noch deutlicher zu erkennen. Trotz konstantem pH-Wert von pH 6,5 und einer Lactosekonzentration von 20 g l^{-1} sank die Gasproduktionsrate nach 25 Stunden unter $0,1 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Erst nach einer erneuten Hefeextraktzugabe wurde die maximale Gasproduktionsrate von fast $0,5 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ innerhalb weniger Stunden wieder erreicht. Doch bereits nach weiteren 25 Stunden war die Gasproduktion wieder so gering, dass nochmals Hefeextrakt zugegeben werden musste. Nach 71 Stunden war die Lactose vollständig aufgebraucht. Es wurde für eine hohe Gasproduktionsrate bzw. für eine rasche Vergärung der 4,5 % Lactose in Molke insgesamt ein Hefeextraktzusatz von 0,3 % benötigt.

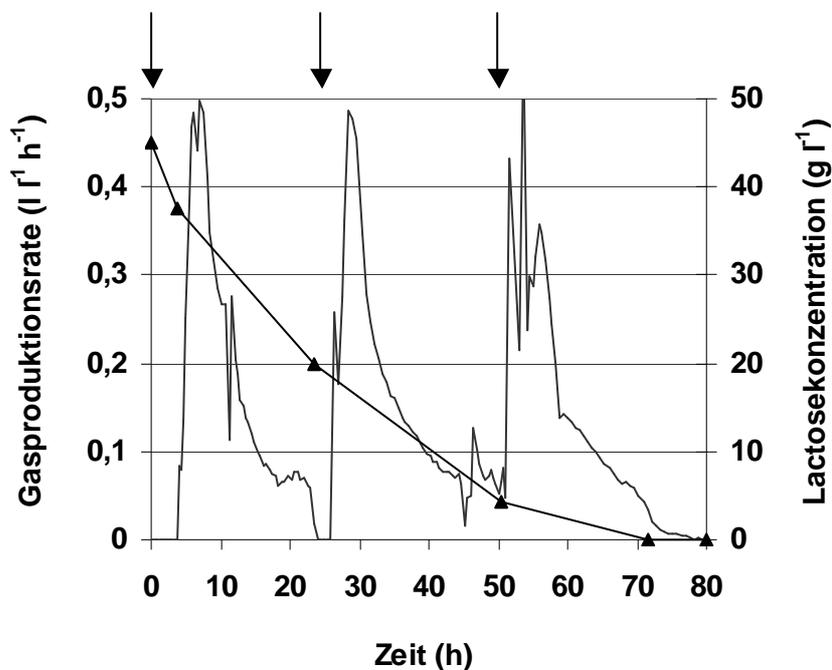


Abb. 42: Gasproduktionsrate (—) und Zuckerkonzentration (-▲-) von *C. butyricum* DSMZ 10702 während des Wachstums auf 6 %iger Molke mit pH-Steuerung (pH 6,5). Die Pfeile markieren die Zugabe von je 0,1 % Hefeextrakt.

Die nach dem Einbrechen der Gäraktivität erreichten Talsohlen der Gasproduktionsrate (Abb. 42) nach 18, 42, und 68 Stunden lagen mit ca. $0,08 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in der gleichen Größenordnung wie die maximale Gasproduktionsrate im Ansatz ohne Hefeextraktzusatz (Tab. 16). Die in Abb. 42 sichtbaren kurzzeitigen Einbrüche der Gasproduktionsrate sind durch Gasdruckabfällen im System hervorgerufene Messfehler. Diese wurden meist durch Probennahme oder Antischaummittelzugabe verursacht.

3.4.4 Gasbildung durch *C. butyricum*

Um nähere Informationen über die Gasbildung von *C. butyricum* DSMZ 10702 während des Wachstums zu erhalten, wurde in zwei gleichen Ansätzen die Gasbildung unterschiedlich überwacht. In einem wurde die Gasbildung wie in den vorangegangenen Versuchen volumetrisch gemessen und zu bestimmten Versuchszeitpunkten der Wasserstoffgehalt des aufgefangenen Gases bestimmt. Die daraus berechnete absolute Menge an gebildetem Wasserstoff ist in Abb. 43 gezeigt. Im zweiten Ansatz wurde lediglich die Gewichtsabnahme der Kultur während des Wachstums gemessen (Abb. 44). Abb. 44 zeigt auch die theoretische Gewichtsabnahme des ersten Ansatzes, welche unter der Annahme berechnet wurde, dass das übrige Gas Kohlendioxid war. Die beiden Kurven kommen fast vollständig zur Deckung. Zur Überwachung der Gäraktivität von nicht pH-gesteuerten Kulturen von *C. butyricum* DSMZ 10702 kann neben der Volumenzunahme des entstandenen Gases auch die Gewichtsabnahme durch die Gasbildung dienen. Der hohe gemessene Wasserstoffanteil im gebildeten Gas konnte durch die Gewichtsabnahme, welche aufgrund der geringen Dichte von Wasserstoff fast ausschließlich durch das restliche Gas verursacht wurde, indirekt bestätigt werden.

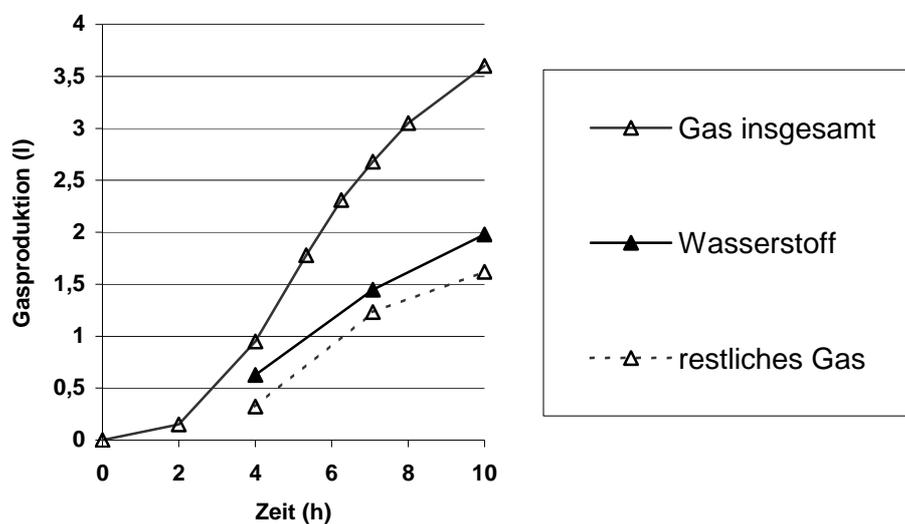


Abb. 43: Gasproduktion während des Wachstums von *C. butyricum* DSMZ 10702 auf Vollmedium (Monot⁺) mit Glucose als Kohlenhydratquelle. Es wurde zu drei Zeitpunkten der Wasserstoffanteil des bis dahin aufgefangenen Gases ermittelt.

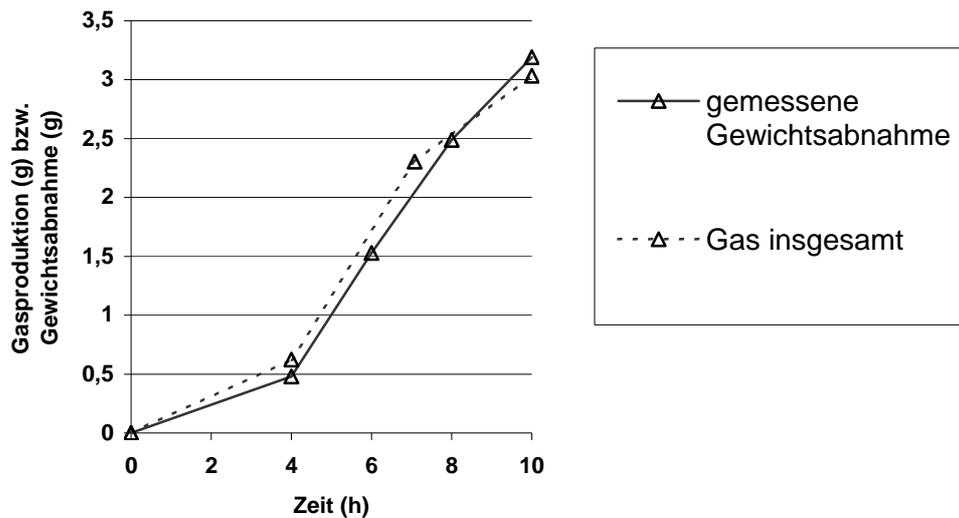


Abb. 44: Gasproduktion (angegeben in g) während des Wachstums von *C. butyricum* DSMZ 10702 auf Vollmedium (Monot⁺) mit Glucose als Kohlenhydratquelle (berechnet aus Abb. 43 unter der Annahme, dass außer Wasserstoff nur Kohlendioxid gebildet wurde) sowie die tatsächlich gemessene Gewichtsabnahme.

3.4.5 Immobilisierung von *C. butyricum*

Die Clostridien wurden in Form von Sporen immobilisiert. Dadurch konnte umgangen werden, dass aktiv wachsende Clostridien während der Immobilisierung durch Luftsauerstoff oder durch das Immobilisierungsverfahren geschädigt wurden. Bei der Immobilisierung handelte es sich um eine Einhüllung der Sporen in Matrices wie Alginat, Pektin und PVA. Die Immobilisate besaßen vor der Keimung der Sporen eine Sporendichte von $6,25 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$, bezogen auf die eingesetzte 3 %ige Alginatlösung, bzw. $5,00 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$, bezogen auf die eingesetzte 5 %ige Pektinlösung. Bei den PVA-Immobilisaten war die anfängliche Sporendichte 10^8 ml^{-1} , bezogen auf die eingesetzte PVA-PEG-Lösung. Einen möglichen Anstieg oder eine Abnahme der Sporendichte in den Immobilisaten durch Flüssigkeitsverlust oder Flüssigkeitsaufnahme während des Immobilisierungsprozesses konnte nicht ausgeschlossen werden. Die immobilisierten Sporen von *C. butyricum* DSMZ 10702 keimten über Nacht unabhängig von der verwendeten Matrix in Monot⁺-Medium. Auf reiner Molke zeigten sie, genauso wie native Sporen von *C. butyricum* DSMZ 10702, keine Keimung.

3.4.6 Einsatz von immobilisiertem *C. butyricum* in Molke

Vor dem Einsatz in Molke wurden die in Alginat immobilisierten Sporen in Monot⁺-Medium in stehender Kultur zur Keimung gebracht. Die Vorinkubation dauerte 18 Stunden, wobei insgesamt eine Gasentwicklung von 1,2 l Gas zu verzeichnen war. Das Abtropfgewicht der eingesetzten Immobilisate betrug 100 g mit einem theoretischen Alginatanteil von 3 %. Die nach der Keimung vorhandene Zelldichte in den Immobilisaten blieb unbekannt. In Abb. 45 ist der Einsatz von in Alginat immobilisiertem *C. butyricum* DSMZ 10702 im Batchverfahren auf 6 %iger Molke mit pH-Kontrolle (pH 6,5) gezeigt. Wenige Stunden nach Beginn der Fermentation konnte eine starke Gasproduktion und eine starke Zunahme der Säurekonzentrationen beobachtet werden (Abb. 45).

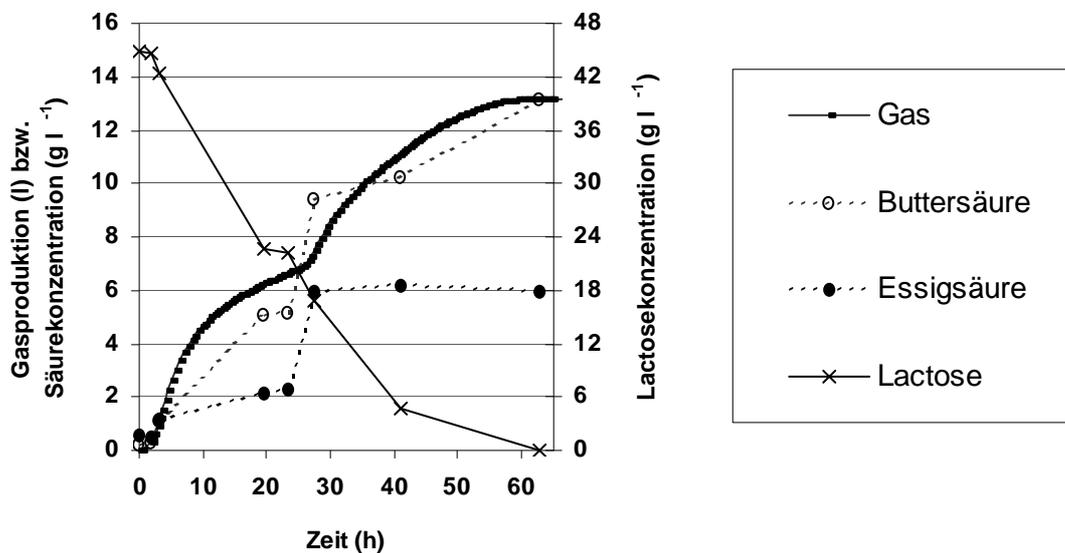


Abb. 45: Gas- und Säureproduktion von immobilisiertem *C. butyricum* DSMZ 10702 auf 6 %iger Molke. Einmalige Zugabe von Hefeextrakt (0,1 %) nach 25 h.

Bestandteile des Vollmediums (Monot⁺), in dem die immobilisierten Sporen zuvor gekeimt waren, scheinen beim Umsetzen der Immobilisate in die Molke mit verschleppt worden zu sein. Denn die gemessenen maximalen Produktionsraten an Buttersäure von $0,71 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$, an Essigsäure von $0,57 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ und an Gas von $0,72 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$ überschritten bei weitem die Raten, die zuvor beim Wachstum auf reiner Molke, ohne Zusatz von Hefeextrakt, dokumentiert worden waren (Tab. 16). Die für eine rasche Umsetzung des Substrates nötigen Bestandteile des Hefeextraktes waren jedoch nach 20 Stunden aufgebraucht. Der Lactoseverbrauch sowie die Gas- und Säureproduktion kam fast zum Erliegen. Erst nach einer Zugabe von Hefeextrakt

nach 25 Stunden kam es wieder zu einer raschen Umsetzung der Lactose, und die ermittelten maximalen Säureproduktionsraten überschritten mit $1,08 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ für Buttersäure und $0,92 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ für Essigsäure sogar die zu Anfang der Fermentation gemessenen Werte.

Eine rasche Umsetzung der in 6 %iger Molke befindlicher Lactose durch *C. butyricum* DSMZ 10702 war, auch beim Einsatz bereits vorgezogener immobilisierter Biomasse, ohne Zusatz von Hefeextrakt nicht möglich.

3.4.7 Kontinuierliche Molkefermentation mit *C. butyricum*

Für eine Vergärung von Molke durch *C. butyricum* DSMZ 10702 im kontinuierlichen Verfahren wurde zunächst eine dem vorangehenden Versuch ähnliche Batchfermentation durchgeführt. Diese wurde später auf kontinuierlichen Betrieb umgeschaltet. Wie im Versuch im Kapitel 3.4.6 wurden die in Alginate immobilisierten Sporen innerhalb von 18 Stunden in Monot^+ -Medium zur Keimung gebracht. Allerdings wurden nach der Keimung die immobilisierten Clostridien in 6 %ige Molke mit 0,5 % Hefeextraktzusatz überführt. Die Säure- und Lactosekonzentrationen während der Fermentation sind in Abb. 46 wiedergegeben.

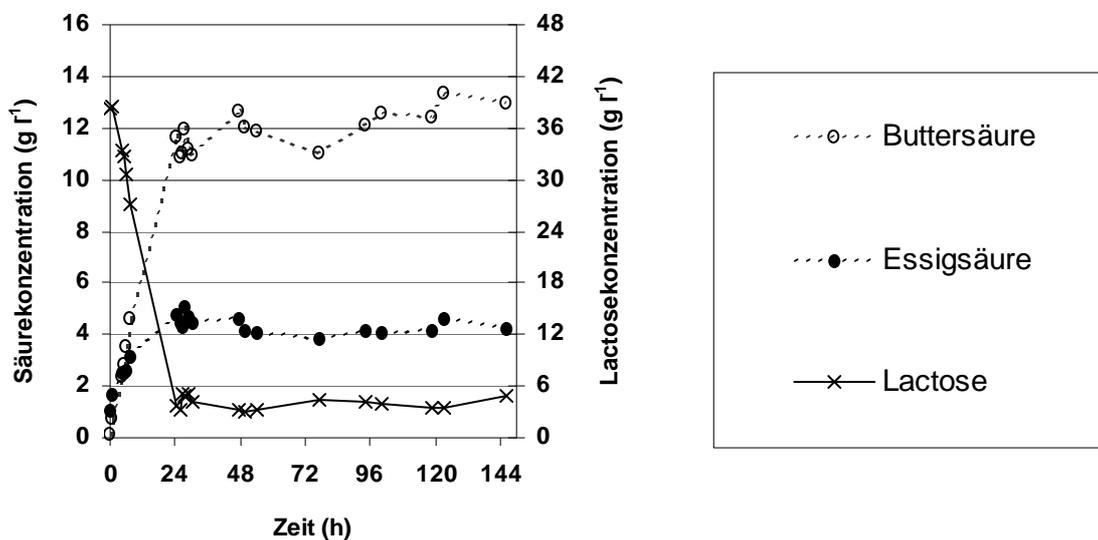


Abb. 46: Säure- und Lactosekonzentration in einer Batchfermentation in 6 %iger Molke mit 0,5 % Hefeextrakt mit immobilisiertem *C. butyricum* DSMZ 10702 mit anschließender kontinuierlicher Fermentation (Umstellung auf kontinuierlichen Betrieb nach 24 h)

Nach 24 Stunden war die in der Molke befindlichen Lactose zu über 90 % abgebaut, und es wurde auf den kontinuierlichen Betrieb umgestellt. Die Zusammensetzung des verwendeten

Mediums war identisch mit der Vorlage und wurde mit einer Durchflussrate von $0,015 \text{ h}^{-1}$ durch den Reaktor geleitet. Die maximalen Produktionsraten der initialen Batchfermentation betragen $1,18 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an Buttersäure, $0,54 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an Essigsäure und $0,84 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an Gas. Nach Umstellung auf kontinuierlichen Betrieb blieben die Säure- und Lactosekonzentrationen über die gesamte Versuchsdauer weitgehend konstant (Abb. 46).

In Abb. 47 ist die Gasproduktion und die während der kontinuierlichen Fermentation verbrauchte Menge an Medium wiedergegeben. Es wird deutlich, dass eine gleichmäßige und stetige Gasbildung und damit Umsetzung der Lactose über den gesamten Versuchszeitraum vorlag. Die konstanten Produktionsraten während der kontinuierlichen Fermentation betragen $0,18 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an Buttersäure, $0,06 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an Essigsäure und $0,26 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an Gas. Im Vergleich mit den maximalen Produktionsraten aus der vorangegangenen Batchfermentation wird deutlich, dass der kontinuierliche Prozess substratlimitiert war und dass eine höhere Durchflussrate sicherlich zu einer Steigerung der Produktionsraten geführt hätte.

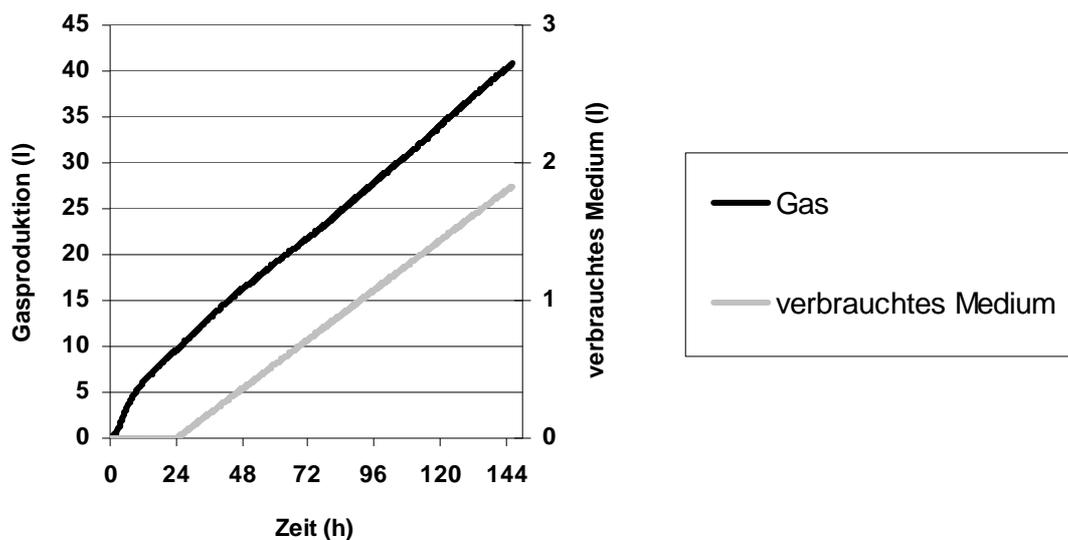


Abb. 47: Gasproduktion von immobilisiertem *C. butyricum* DSMZ 10702 während der Gärung auf 6 %iger Molke mit 0,5 % Hefeextrakt, sowie Mediumverbrauch nach Umstellung auf kontinuierlichem Betrieb nach 24 h

In Abb. 48 sind die zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten vorliegenden Produktmengen bzw. die verbrauchte Zuckermenge in Mol wiedergegeben. Die konstanten Steigungen der Geraden zeigen, dass das Mengenverhältnis der Produkte zueinander sowie das Mengenverhältnis zwischen Edukt und Produkten über 120 Stunden konstant blieb. Aus diesen Daten wurde folgende Umsatzgleichung ermittelt:

0,183 Lactose → 0,254 Buttersäure + 0,128 Essigsäure + 1,262 Gas

bzw.

1 Lactose → 1,387 Buttersäure + 0,699 Essigsäure + 6,896 Gas

Diese während der mehrtägigen kontinuierlichen Fermentation ermittelte Gleichung beschreibt in der vorliegenden Arbeit wohl am genauesten die Umsetzung der in Molke befindlichen Lactose durch *C. butyricum* DSMZ 10702.

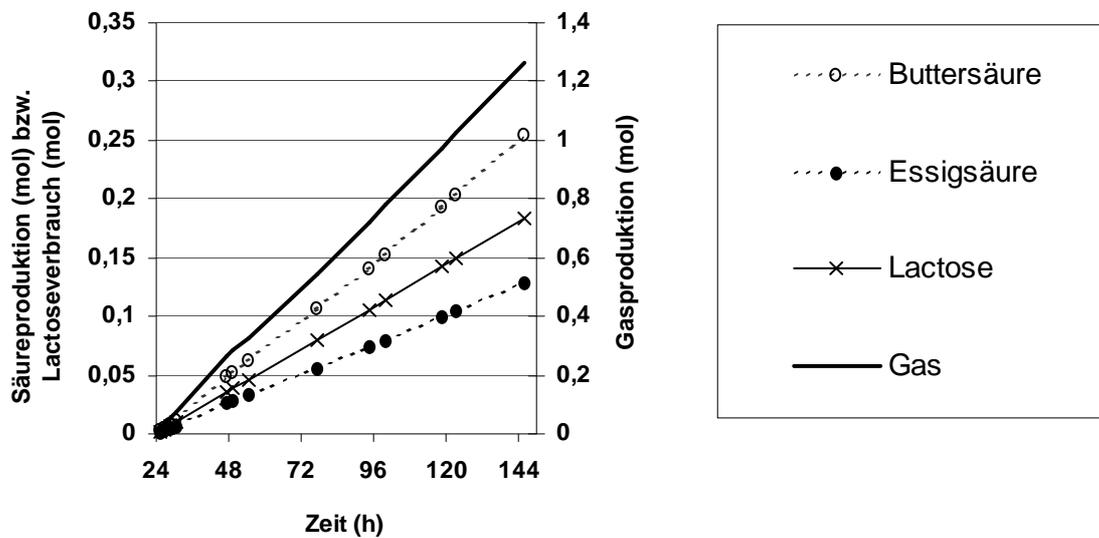


Abb. 48: Gesamtproduktion an Säure und Gas, sowie Lactoseverbrauch während der kontinuierlichen Fermentation mit immobilisiertem *C. butyricum* DSMZ 10702

4 Diskussion

4.1 Zuckerproduktion

4.1.1 Fotobioreaktor

Die in der vorliegenden Untersuchung zur Kultivierung der Grünalgen verwendeten Fotobioreaktoren sind durch die einfache Handhabbarkeit, z.B. sichere Sterilisation durch Autoklavieren, gut für den Laboreinsatz geeignet. Sie entsprechen in Größe und Form jedoch nicht dem Fotobioreaktortyp, der im geplanten mehrschichtigen Verbundsystem zur Wasserstoff- und Ethanolproduktion (HARTMEIER UND ISMAR 2004) Anwendung finden soll. Dieser muss, da er als Lichtfilter bei der Bestrahlung von Purpurbakterienkulturen eingesetzt werden soll, eine deutlich geringere Schichtdicke aufweisen, damit das Licht nicht zu stark abgeschwächt wird. Der verwendete Fotosäulenreaktor besitzt ein Verhältnis von beleuchteter Oberfläche zu Bioreaktorvolumen von $0,57 \text{ cm}^{-1}$, der Rührreaktor von $0,24 \text{ cm}^{-1}$. Fotobioreaktoren, die bereits technisch genutzt werden, erreichen Verhältnisse von bis zu $0,80 \text{ cm}^{-1}$ (PULZ 2001). Durch allseitige Beleuchtung bzw. durch den Einsatz von Lichtreflektoren können im Labormaßstab jedoch noch deutlich höhere Oberflächen/Volumen-Verhältnisse erreicht werden (MÜCKE 1985).

Es werden in der Literatur auch trichterförmige bzw. konisch geformte Fotobioreaktoren beschrieben, deren Oberflächen/Volumen-Verhältnis über 1 cm^{-1} liegt, deren tatsächlicher Vorteil jedoch in der großen Oberflächenausbeute im Verhältnis zur Grundfläche liegt. So erreicht die dem Licht ausgesetzte Oberfläche bei diesen Bioreaktoren das 2,6-fache der belegten Grundfläche (WATANABE UND HALL 1996). Es gibt einen direkten Zusammenhang zwischen Oberfläche/Volumen-Verhältnis und Produktionsrate an Biomasse. Dies zeigte sich auch an den in dieser Studie gemessenen Wachstumsraten. Aufgrund des schlechteren Verhältnisses beim Rührreaktor im Vergleich zum Säulenreaktor werden während des anfänglich exponentiellen Wachstums nur 86 % von μ_{max} erreicht und nach acht Tagen nur 68 % der Biomasse.

Die Biomasse-spezifische Produktionsrate von Syntheseprodukten wird neben dem Oberflächen/Volumen-Verhältnis stark durch die eingesetzte Biomassekonzentration beeinflusst. Es kommt mit zunehmender Biomassekonzentration zur Abschirmung der Zellen untereinander. So erreicht BRÉCHIGNAC (1994) mit *Ch. sp.* 241.80 unter ähnlichen

Versuchsbedingungen wie in dieser Studie mit einer Biomassekonzentration von nur 10 % der hier verwendeten das 15-fache der Biomasse-spezifischen Zuckerproduktionsrate, allerdings nur das 1,5-fache der hier gemessenen volumetrischen Zuckerproduktionsrate. Daraus kann geschlossen werden, dass die volumenbezogene Zuckerproduktionsrate weniger von der eingesetzten Biomasse, sondern viel mehr von der Bioreaktorform, bzw. von der Lichtexposition der Algenzellen abhängig ist. SUNG ET AL. (1999) beschreiben auch eine grundsätzlich vorhandene Lichtlimitierung in Fotobioreaktoren, erkennbar durch einen weitgehend linearen Verlauf der Wachstumskurve. Das Wachstum in der hier vorgestellten Arbeit erfolgt nur anfänglich exponentiell. Bereits nach wenigen Tagen schwächt sich das Wachstum deutlich ab und die Wachstumskurve verläuft linear. Die vorhandene Limitierung des Wachstums wird besonders im Fotosäulenreaktor (Abb. 5) durch die fortan gleichbleibende Chlorophyllkonzentration im System deutlich. Neben einer Stickstofflimitierung (Abb. 6) wird sicherlich auch eine Lichtlimitierung vorgelegen haben.

Der verminderten Lichtexposition durch gegenseitige Abschirmung der Zellen muss in Hinblick auf das geplante Mehrschichtensystem (HARTMEIER UND ISMAR 2004) besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Auch wenn Grünalgen langwelliges Licht (über 700 nm) energetisch nicht nutzen, so kommt es doch zur Absorption. Zum Beispiel zeigt monochromatisches Licht mit der Wellenlänge von 800 nm nach Durchgang durch eine 1 cm dicke Schicht einer *Ch. sp. SAG 241.80* Kultur mit einer Biomassekonzentration von $0,25 \text{ g l}^{-1}$ nur noch 9 % der Ausgangsintensität (Abb. 20). In einer Chlorellakultur mit einem Biomassegehalt von $4,00 \text{ g l}^{-1}$ werden bereits 90 % des Lichtes in den äußeren 4 mm absorbiert (WOLF 1997).

4.1.2 Zuckerausscheidung bei Algen

Zahlreiche im Wasser lebende wirbellose Tiere, wie *Paramecium bursaria*, *Hydra viridis* oder auch verschiedene Stämme von *Spongilla* sp., werden in ihrem Wachstum durch endosymbiotische Grünalgen gefördert. Diese sind an ihre endosymbiotische Lebensform angepasst, indem sie Fotosyntheseprodukte ausscheiden, welche durch den Wirtsorganismus verstoffwechselt werden (BROWN UND NIELSEN 1974; TRENCH 1979). Diese endosymbiotischen Grünalgen unterscheiden sich von freilebenden sowohl in der Quantität als auch in der Qualität der ausgeschiedenen Fotosyntheseprodukte. Freilebende Algen scheiden nur geringe Mengen vieler verschiedener organischer Verbindungen aus (FOGG 1966), wohingegen endosymbiotische Grünalgen große Mengen von bestimmten

Syntheseprodukten abgeben. Endosymbiotische Chlorellen geben bis zu 86,7 % der Fotosyntheseprodukte in Form von Maltose und / oder Glucose an den Wirt ab (MUSCATINE ET AL. 1967). Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Kohlenstoff von ZIESENISZ ET AL. (1981) an einer endosymbiotischen *Chlorella* aus *Paramecium bursaria* zeigen, dass die im Licht ausgeschiedene Maltose direkt aus Produkten des Calvinzyklus synthetisiert wird, wohingegen die Maltoseausscheidung im Dunkeln auf Stärkeabbau in der Zelle zurückzuführen ist.

Eine vergleichende Studie hinsichtlich der Zuckerexkretion von 38 verschiedenen Grünalgen, sowohl freilebenden als auch endosymbiotischem Ursprungs, wurde von KESSLER ET AL. (1991) durchgeführt. Dort zeigten sich deutliche Unterschiede in der Höhe der Zuckerexkretionsrate zwischen den verschiedenen Stämmen und eine deutliche pH-Abhängigkeit der zuckerausscheidenden Aktivität. So sind die pH-Optima der Zuckerausscheidung gegenüber den pH-Optima für das Zellwachstum meist deutlich ins Saure verschoben, teilweise in pH-Bereiche, in denen kein Wachstum mehr stattfindet. Ein Vergleich von Zuckerexkretionsraten von bestimmten Algenstämmen aus verschiedenen Studien ist äußerst problematisch. Die Versuchsparemeter, insbesondere Medium, Bioreaktortyp und Beleuchtungsstärke, sind meist individuell gewählt und die Messergebnisse sind somit nicht direkt vergleichbar.

4.1.3 Auswahl des Algenstammes

Die vorliegende Studie baut auf Ergebnissen von MÜCKE (1985) auf, welcher in der Arbeit „Basisversuche zur Ethanolproduktion aus CO₂ und Licht“ grundlegende Untersuchungen zur Umsetzung des geplanten Verbundsystems aus Algen und Hefen durchführte. MÜCKE (1985) bemerkt zusammenfassend, dass das nächste Ziel weiterführender Arbeiten neben der Selektion von Algen mit besonders hohen Zuckerausscheidungsraten die Anwendung von autotrophen Stämmen sei, besonders in Bezug auf die Peptonbedürftigkeit, um die hohe Infektionsanfälligkeit des Systems zu vermindern. In den Untersuchungen von MÜCKE (1985) wurden die im natürlichen Habitat endosymbiotisch vorkommenden Grünalgen für physiologische Messungen stets auf peptonhaltigem Medium kultiviert. Nicht nur hinsichtlich der Kontaminationsgefahr, sondern auch im Hinblick auf ein möglichst kostengünstiges und effizientes System zur Herstellung von Ethanol sollte auf wertvolle Zusätze, wie Pepton, aber auch Vitamine, wenn möglich verzichtet werden.

Bis auf einen Stamm vermochten alle hier untersuchten Stämme auf Nährsalzmedium mit Vitaminen, aber ohne Peptonzusatz axenisch zu wachsen. Der Stamm *Ch. sp.* SAG 241.80 zeigte bei MÜCKE (1985) die höchsten Zuckerekkretionsraten der untersuchten Stämme. Dieser Stamm wird auch durch KESSLER ET AL. (1991) als stark Zucker ausscheidend beschrieben und war von 1992 bis 1997 Forschungsschwerpunkt bei der Konstruktion eines „Life Support System“ für die bemannte Raumfahrt, welche im Auftrag der European Space Agency (ESA) durchgeführt wurde (BRÉCHIGNAC UND SCHILLER 1992, BRÉCHIGNAC UND WOLF 1994a, 1994b, WOLF 1996, 1997). Die mit *Ch. sp.* SAG 241.80 im Rahmen des ESA-Projektes durchgeführten Untersuchungen können als die umfangreichsten Studien angesehen werden, die jemals zur technischen Nutzung der Zuckerekkretion von Grünalgen durchgeführt wurden.

In der hier vorliegenden Studie konnte zur Kultivierung von *Ch. sp.* SAG 241.80 auf den Vitaminzusatz nicht verzichtet werden (Tab. 7). Der Stamm *Ch. sorokiniana* SAG 211-40c, dem FISCHER ET AL. (1989) und MÜCKE (1985) eine Zuckerekkretion attestieren, ist nach den jetzt vorgenommenen Untersuchungen nicht zum Wachstum auf vitaminfreiem Medium befähigt. Dies gilt auch für *Ch. mirabilis* SAG 211-11r, welcher durch KESSLER ET AL. (1991) als zuckerausscheidend beschrieben ist. Für den Stamm *Ch. sphaerica* SAG 11.88, ein Phycobiont aus der Flechte *Pseudocyphellaria carpoloma*, sind zwar keine zuckerausscheidenden Eigenschaften in der Literatur zu finden, sein symbiotisches Vorkommen lässt jedoch solche vermuten. Dieser Phycobiont ließ sich jedoch trotz Zusatz von Pepton und Vitaminen nur sehr schlecht axenisch kultivieren. Der Stamm *Ch. sp.* SAG 211-6, der bei MÜCKE (1985) und KESSLER ET AL. (1991) auf peptonfreiem Medium wuchs und Zuckerekkretion zeigte, wuchs in der vorliegenden Studie ohne den Zusatz von Pepton nicht.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Eigenschaften hinsichtlich des Vorkommens von extrazellulärem Zucker und den in dieser Arbeit ermittelten Wachstumsansprüchen wurden *Ch. sp.* SAG 241.80, *Ch. sorokiniana* SAG 211-40c und *Ch. mirabilis* SAG 211-11r ausgewählt. Sie wurden in Flüssigmedium angezogen und ihre maximalen Wachstumsraten und die maximalen Konzentrationen an extrazellulärem Zucker wurden ermittelt (Tab. 8). Bei *Ch. sorokiniana* SAG 211-40c konnte kein extrazellulärer Zucker nachgewiesen werden, obwohl FISCHER ET AL. (1989) für diesen Stamm eine Exkretion von bis zu 15 % des fixierten Kohlenstoffs in Form von Glucose beschrieben. Allerdings weist auch MÜCKE (1985) bei *Ch. sorokiniana* SAG 211-40c nur Spuren an extrazellulärer Glucose nach. *Ch. mirabilis*

SAG 211-11r zeigt in den vorliegenden Untersuchungen, wie bei KESSLER ET AL. (1991), eine deutliche Exkretion von Maltose, jedoch bleibt diese weit hinter der Exkretion von *Ch. sp.* SAG 241.80 zurück. So wurde *Ch. sp.* SAG 241.80, genauso wie bei MÜCKE (1985) und beim Forschungsprojekt der ESA (BRÉCHIGNAC UND SCHILLER 1992, BRÉCHIGNAC UND WOLF 1994a, 1994b, WOLF 1996, 1997), für weitere Untersuchungen verwendet. Es konnte also auf den Zusatz von Vitaminen bei der Kultivierung der verwendeten Grünalge nicht verzichtet werden, jedoch erfolgten alle in dieser Arbeit vorgenommenen physiologischen Messungen von *Ch. sp.* SAG 241.80 in peptonfreiem Medium.

4.1.4 Wachstum und Zuckerausscheidung von *Ch. sp.* SAG 241.80

Die Wachstumsraten von *Ch. sp.* SAG 241.80, die in dieser Studie gemessen wurden, beziehen sich ausschließlich auf das Wachstum in den ersten Tagen der Kultivierung. Da es mit fortschreitender Versuchsdauer zur Stickstofflimitierung, bzw. Nitratmangel kommt und die Selbstabschirmung der Zellen zunimmt, konnte in den verschiedenen Versuchsansätzen spätestens ab einer OD 660 von 8 kein exponentieller Kurvenverlauf mehr beobachtet werden. WOLF (1996) beschreibt eine Lichtlimitierung des Wachstums von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotobioreaktor bereits ab einer Biomassekonzentration von $0,4 \text{ g l}^{-1}$ was einer OD 660 von ca. 2 entspricht. Obwohl diese Werte stark vom Bioreaktortyp abhängig sind, kann davon ausgegangen werden, dass die hier ermittelten Wachstumsraten bereits unter dem Einfluss von Lichtlimitierung entstanden sind. Eine Verkürzung der Messintervalle auf die ersten Stunden würde zu höheren Wachstumsraten führen, jedoch würden diese das Wachstum der Grünalge im Fotobioreaktor nur unzulänglich beschreiben.

Die Wachstumsrate von *Ch. sp.* SAG 241.80 ist pH-abhängig. Die untere Grenze des Wachstums liegt bei pH 5 (MÜCKE 1985, WOLF 1996), das Wachstumsmaximum bei pH 8,5 (WOLF 1996). Die Einschränkung des Wachstums durch einen niedrigen pH-Wert zeigt sich auch in den eigenen Ergebnissen. Kommt es während des Wachstums durch unzureichende Pufferung des Mediums oder durch fehlende externe pH-Kontrolle zur Verschiebung des anfänglichen pH-Wertes von pH 6 auf pH 8, so wird eine OD 660 von über 14 erreicht (Abb. 5). Bei konstant niedrigem pH-Wert von ca. pH 6 beträgt diese OD maximal 11 (Abb. 8). Die Biomasseproduktion geht mit steigendem pH-Wert zugunsten der Zuckerauscheidung zurück. Für das Wachstum von *Ch. sp.* SAG 241.80 im Fotosäulenreaktor auf peptonfreiem Medium bei pH 6 und KNO_3 als Stickstoffquelle wurde in dieser Studie eine maximale Wachstumsrate von $1,06 \text{ d}^{-1}$ ermittelt. WOLF (1996) misst bei pH 6 mit dem gleichen Medium eine

Wachstumsrate von $1,20 \text{ d}^{-1}$, allerdings mit einem anderen Versuchsaufbau bzw. Bioreaktortyp. MÜCKE (1985) misst bei pH 6 unter Peptonzusatz und Harnstoff als Stickstoffquelle eine Wachstumsrate von $1,65 \text{ d}^{-1}$. Die höchste für *Ch. sp. SAG 241.80* dokumentierte Wachstumsrate beträgt $2,34 \text{ d}^{-1}$ bei pH 7 auf Medium mit Peptonzusatz und Harnstoff als Stickstoffquelle (MÜCKE 1985).

Auch die Zuckerekkretion von *Ch. sp. SAG 241.80* ist sowohl qualitativ als auch quantitativ durch den pH-Wert beeinflusst. Das pH-Optimum für die Zuckerekkretion liegt laut MÜCKE (1985) und KESSLER ET AL. (1991) zwischen pH 5 und pH 6. WOLF (1996) gibt dieses für pH 6 bis 6,5 an. Die verstärkte Bildung von Maltose (KESSLER ET AL. 1991) oder sogar Maltoseoligomeren (MÜCKE 1985) bei pH-Werten unterhalb und eine verstärkte Ausscheidung von Glucosemonomeren bei pH-Werten oberhalb des pH-Optimums (MÜCKE 1985, KESSLER ET AL. 1991) zeigte sich auch in den hier vorgelegten Ergebnissen. Sowohl die Zuckerekkretionsrate als auch der Anteil von Maltose waren bei konstantem pH-Wert von pH 6 gegenüber Versuchen mit steigendem pH-Wert deutlich erhöht (Abb. 7 und Abb. 10). Obwohl WOLF (1996) kein Vorkommen von extrazellulärer Glucose beschreibt, konnte diese in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass diese mit hoher Sicherheit nicht auf die Maltaseaktivität von kryptischen mikrobiellen Kontaminationen zurückzuführen ist.

Während der Kultivierung von *Ch. sp. SAG 241.80* kommt es nach Beendigung des exponentiellen Wachstums, wahrscheinlich als Folge zunehmender Stickstofflimitierung, zur verstärkten Zuckerekkretion (Abb. 9 und Abb. 10). Die über mehrere Tage messbaren maximalen Gesamtzuckerproduktionsraten bei pH 6 in peptonfreiem Medium betragen $476 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ während des Wachstums bzw. $429 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in statischer Kultur unter Stickstoffmangel. Dies sind nur 20 % bzw. 17 % der entsprechenden Zuckerproduktionsraten, welche MÜCKE (1985) auf peptonhaltigem Medium unter Verwendung eines Fotobioreaktors mit höherem Oberflächen/Volumen-Verhältnis ermittelte. Allerdings entspricht die gemessene volumetrische Zuckerproduktionsrate der statischen Kultur 68 % der von WOLF (1996) ermittelten. Die gemessene Biomasse-spezifische Zuckerekkretionsrate von $180 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ beträgt nur 7 % der von WOLF (1996) beschriebenen. Dies liegt an der unterschiedlich starken Selbstabschirmung der Algen, bzw. an den unterschiedlichen Biomassekonzentrationen, die während der Messung eingesetzt wurden (siehe dazu auch die Diskussion unter 4.1.1). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass durch Verkürzung des

Messintervalls auf die ersten Stunden eine deutlich höhere Zuckerproduktion in statischer Kultur gemessen werden kann (siehe Ergebnisse unter 3.3.2 und Diskussion unter 4.3.2).

Aus Abb. 16 und Abb. 17 ist zu entnehmen, dass die Zuckerexkretionsrate der Algen mit zunehmender Inkubationsdauer in stickstofffreiem Medium abnimmt. Bereits nach vier Tagen sind nur noch 34 % der Ausgangsaktivität vorhanden, die hohe von WOLF (1996) ermittelte Langzeitstabilität mit einer Restaktivität von ca. 44 % nach zehn Tagen Inkubation wird nicht erreicht. Überraschend ist, dass das Maximum der Zuckerexkretionsrate in der statischen Kultur im Fotorrührreaktor (Abb. 18) erst nach 24 Stunden bzw. im zweiten Messintervall erreicht wird. Der Einsatz der Algen in immobilisierter Form (Abb. 18) verringerte die anfängliche Zuckerexkretionsrate um 66 %, verglichen mit dem nativen Einsatz, wohl aufgrund der Licht- und Kohlendioxidlimitierung in den Alginatkugeln (ROBINSON ET AL. 1986, TREVAN UND MAK 1988). Dennoch scheint die Immobilisierung zu einer Steigerung der Langzeitstabilität zu führen, denn die nach 96 Stunden gemessene Zuckerexkretionsrate ist bei den Immobilisaten nur noch um 8 % gegenüber dem nativen Einsatz verringert. Die Anwendung von Alginat als Immobilisierungsmatrix für Algen ist gängig und vielfach in der Literatur beschrieben (DAINTY ET AL. 1986, ROBINSON ET AL. 1986, TREVAN UND MAK 1988, CHETSUMON ET AL. 1993).

Die von BRÉCHIGNAC UND WOLF (1994) bei *Ch. sp.* SAG 241.80 gemessene Biomasse-spezifische Sauerstoffproduktionsrate von 1,84 bis 8,29 g g⁻¹ d⁻¹ überschreitet bei weitem die hier ermittelte Rate von 0,51 g g⁻¹ d⁻¹. Auch dies ist durch den Einsatz von sehr hohen Biomassekonzentrationen und die dadurch erhöhte Selbstabschirmung im Fotobioreaktor zu erklären. Sauerstoffproduktionsraten, die bei hohen Zelldichten von schnell wachsenden Algen während der Biomasseproduktion in Fotobioreaktoren gemessen wurden, liegen mit 0,67 bis 2,88 g g⁻¹ d⁻¹ (PULZ 2001) näher an den hier ermittelten Produktionsraten der endosymbiotischen Grünalge.

Aus Abb. 19 wird deutlich, dass bei unzureichender Belüftung der Fotobioreaktoren innerhalb von Minuten Sauerstoffkonzentrationen auftreten können, welche die Luftsättigung um ein Vielfaches überschreiten. Aufgrund der sehr ähnlichen volumetrischen Zuckerproduktionsraten in peptonfreiem Medium, die trotz sehr unterschiedlicher Zelldichten bei WOLF (1996) und in dieser Studie gemessen wurde, muss davon ausgegangen werden, dass die Zuckerproduktion im Bioreaktor lichtlimitiert ist und durch eine verbesserte Lichtexposition der Zellen, bzw. durch eine Verbesserung des Oberflächen/Volumen-Verhältnis gesteigert werden könnte.

4.2 Alkoholische Gärung

4.2.1 Hefestämme

Die verwendete Hefe sollte sehr robust sein, da die geplante Ethanolgewinnung aus fotosynthetisiertem Zucker eine hohe Langzeitstabilität erfordert. Die Hefe sollte besonders als statische Kultur, d.h. bei Stickstoffmangel, eine hohe Stabilität aufweisen. Sie muss gegenüber den in Fotobioreaktoren möglichen hohen Sauerstoffkonzentrationen unempfindlich sein. Außerdem sollte sie Maltose vergären können, wenn *Ch. sp.* SAG 241.80 als Zuckerlieferant in Betracht gezogen wird. Aber die wichtigste erwünschte Eigenschaft ist die Unfähigkeit zur Atmung, damit es trotz geringer Zucker- und hoher Sauerstoffkonzentration, d.h. bei fehlendem Crabtree-Effekt, zur maximal möglichen Ethanolausbeute aus dem fotosynthetisierten Zucker kommt.

In den Untersuchungen war das Hauptaugenmerk auf eine atmungsdefekte Ethidiumbromidmutante einer Brennereihefe aus der Ethanolgewinnung gerichtet (*S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0). Für vergleichende Studien wurde der zur Atmung befähigte Wildtyp von *S. cerevisiae* DSMZ 1333, die Bäckerhefe *S. cerevisiae* CBS 1172, als Wildtyp und als ρ^0 -Mutante und der Laborstamm *S. cerevisiae* BY4741 sowohl als Wildtyp als auch in Form von verschieden gearteten atmungsdefekten Mutanten hinzugezogen. Neben dem *S. cerevisiae* BY4741 ρ^0 Typ waren dies Mutanten mit Kerndeletionen von Genen, welche Atmungskettenenzyme kodieren: *S. cerevisiae* BY4741 Δcox5a , Δcox7 , und Δmba1 . *S. cerevisiae* BY4741 ist ein zu *S. cerevisiae* S288c isogener Stamm (BRACHMANN ET AL. 1998), welcher im *Saccharomyces*-Deletionsprojekt verwendet wurde (WINZELER ET AL. 1999).

4.2.2 Atmungsdefekte Mutanten von *S. cerevisiae*

Erstmals untersucht wurden atmungsdefekte Hefemutanten durch Ephrussi und Mitarbeiter am Pasteurinstitut in Paris. Diesen waren auf Nähragarböden, neben den gewöhnlichen Hefekolonien einer Bäckerhefe, kleine (frz.: petite) Kolonien aufgefallen. Nach Untersuchungen zeigte sich, dass die Atmung bei diesen petite-Mutanten mangelhaft war, manche besaßen z.B. die Cytochrome a und/oder b nicht (SLONIMSKI 1949; SLONIMSKI UND EPHRUSSI 1949), und das Wachstum war verlangsamt (TAVLITZKI 1949). Ein cytoplasmatischer Erbfaktor hatte sich bei petite-Mutanten verändert oder war verloren gegangen (EPHRUSSI ET AL. 1949a, 1949b). Die Rate von Spontanmutationen zum petite-

Phänotyp von 0,2 % – 1 % je Generation überstieg bei weitem die von „Mendelgenen“ bekannte Mutationsrate.

Heute weiß man, dass es neben obligatorisch gärenden Hefearten, wie *Candida slooffii* oder *Torulopsis pintolopesii* (WATSON ET AL. 1980), auch Hefen gibt, welche die Fähigkeit zur Atmung verlieren können. Der Verlust der Atmungsfähigkeit kann durch eine von Ephrussi und Mitarbeiter bei *S. cerevisiae* beobachtete Spontanmutation eintreten. Dabei handelt es sich meist nur um einen teilweisen Verlust mitochondrialer DNA. Man spricht dann von ρ^- -Mutanten. Der Atmungsdefekt kann jedoch auch durch einen totalen Verlust der mtDNA hervorgerufen werden. Die Applikation von DNA-angreifenden Agenzien, wie Ethidiumbromid (SLONIMSKI ET AL. 1968) oder Euflavin (MARCOVICH 1951) führt zu diesem Totalverlust (GOLDRING ET AL. 1970; NAGLEY UND LINNANE 1970), und die entstehenden Mutanten werden als ρ^0 bezeichnet. Die Fähigkeit, lebensfähige ρ^0 -Mutanten zu bilden, ist vom Hefestamm abhängig und wird durch das Kerngenom beeinflusst (CHEN UND CLARK-WALKER 1999).

Es gibt auch atmungsdefekte Hefemutanten, deren Defekt direkt auf eine Kernmutation zurückzuführen ist, da zahlreiche Kerngene für die Atmung und die Biogenese der Mitochondrien verantwortlich sind (SHERMAN UND EPHRUSSI 1962, SHERMAN 1963, SHERMAN UND SLONIMSKI 1964). Solch ein Atmungsdefekt vererbt sich, da er chromosomal veranlagt ist, bei sexueller Fortpflanzung rezessiv und die Mutanten werden als „nuclear-petite“ oder als pet-Mutanten bezeichnet. Es war davon auszugehen, dass die in dieser Studie nach der Methode von SLONIMSKI ET AL. 1968 hergestellten Teststämme mit mitochondrialem Atmungsdefekt ρ^0 -Mutanten sind (GOLDRING ET AL. 1970; NAGLEY UND LINNANE 1970). Durch das Anfärben der Hefe-DNA mit 4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) nach der Methode von WILLIAMSON UND FENNELL (1979) konnte die Abwesenheit mitochondrialer DNA bestätigt werden. Von dem Laborstamm *S. cerevisiae* BY4741 wurden zusätzlich „nuclear-petite“ Mutanten mit Kerndeletionen verschiedener Atmungskettenenzym-codierender Gene im untersucht.

4.2.3 Einfluss des Atmungsdefektes auf das Substratspektrum

Sowohl die ρ^0 -Mutanten als auch die meisten „nuclear-petite“ wuchsen nicht auf Nähragarböden mit Glycerin. Nur der Stamm *S. cerevisiae* BY4741 Δ mba1 zeigte Wachstum auf dieser nicht vergärbaren Kohlenstoffquelle. Messungen des Biomasse-spezifischen Sauerstoffverbrauchs der Teststämme bestätigten, dass *S. cerevisiae* BY47141 trotz Deletion

von MBA1 zur Atmung befähigt war. Er hatte noch 85 % des beim Wildtyp gemessenen Sauerstoffverbrauchs. Die ρ^0 -Stämme und *S. cerevisiae* BY4741 Δcox7 zeigten in den Messungen noch ca. 14 % Sauerstoffverbrauch, verglichen mit dem jeweiligem Wildtyp, wahrscheinlich aufgrund von atmungsunabhängigen sauerstoffverbrauchenden Enzymreaktionen.

Auch die Verdrängung des gelösten Sauerstoffs aus der Lösung durch das während der Gärung entstehende Kohlendioxid kann zur Messung eines scheinbaren Sauerstoffverbrauchs führen. Mit 19 % Restverbrauch hob sich *S. cerevisiae* BY4741 Δcox5a von Δcox7 und ρ^0 ab. Die verringerte Atmungsaktivität reichte aber nicht zum Wachstum auf Glycerin aus. Dies bestätigt die Ergebnisse von HUTTER UND OLIVER (1998), welche bei einem anderen Δcox5a *S. cerevisiae* Stamm noch 15 % Restatmung nachwiesen. Sie führten diese Sauerstoffaufnahme auf die Existenz und Funktion von COX5b zurück (CUMSKY ET AL. 1985). So stand für vergleichende Versuche der Stamm *S. cerevisiae* BY4741 als Wildtyp und als Deletionsmutante mit unterschiedlich stark eingeschränkter Atmung bis hin zum totalen Defekt zur Verfügung. Weitere Untersuchungen mit diesen Stämmen zeigten, dass Maltose von *S. cerevisiae* BY4741 nicht vergoren werden kann. Der Wildtyp von *S. cerevisiae* BY4741 zeigte im anaerobem Milieu kein Wachstum auf maltosehaltigem Nährboden. Mit zunehmender Einschränkung der Atmung durch die verschiedenen Gendelektionen sank die maximale Wachstumsrate von *S. cerevisiae* BY4741 in aerober Schüttelkultur mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 49 dargestellt.

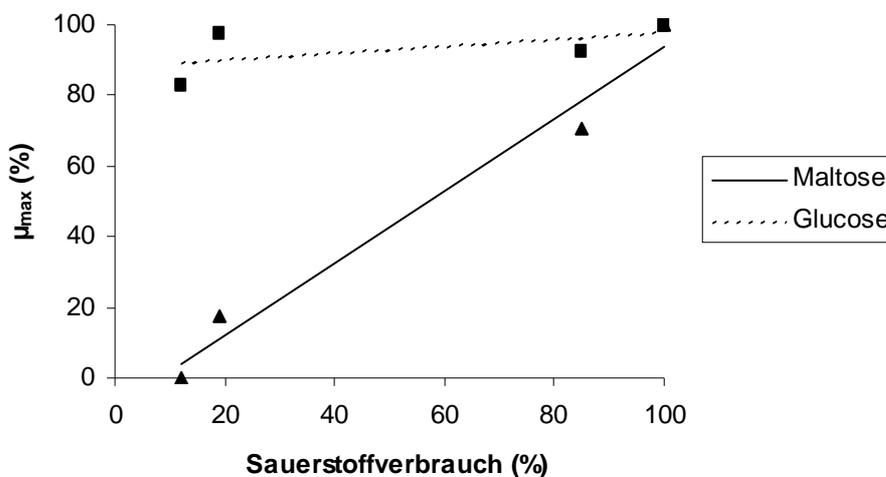


Abb. 49: Maximale Wachstumsraten auf Maltose und Glucose als Funktion der Atmungsaktivität verschiedener Mutanten von *S. cerevisiae* BY4741.

In der Literatur findet man für andere, zu *S. cerevisiae* S288c isogene, Stämme die in Abb. 49 gezeigte Abhängigkeit nicht. So werden von CARLSON ET AL. (1981) ρ^0 -Mutanten von *S. cerevisiae* S288c als zum Wachstum auf Maltose befähigt beschrieben. FEUERMANN ET AL. (1995) hingegen wiesen in *S. cerevisiae* S288c die Existenz von MAL1- und MAL3-Loci nach, beschrieben sie jedoch wegen des Mal⁻-Phänotyps als defekt. Die Existenz von nicht funktionierenden MAL-Loci und der Mal⁻-Phänotyp bei *S. cerevisiae* S288c wird auch von WINZELER ET AL. (1999) und BELL ET AL. (2001) erwähnt. Inwieweit unterschiedliche Stammvarietäten von *S. cerevisiae* S288c und verschiedene Versuchsbedingungen, wie unzureichende Sauerstoffversorgung, für diesen Widerspruch verantwortlich sind, lässt sich nicht klären.

Generell existiert ein Zusammenhang zwischen Verwertbarkeit von Zuckern und mitochondrialer Aktivität bei Hefen. Die Eigenschaft, Zuckerdimere, wie Saccharose, Lactose oder Maltose, zwar respiratorisch, aber nicht fermentativ nutzen zu können, ist unter Hefen, z.B. der Gattung *Kluyveromyces*, weit verbreitet und wird als Kluyvereffekt bezeichnet (FUKUHARA 2003). *S. cerevisiae* wurde lange als generell Kluyvereffekt-negativ angesehen. Aber MALLUTA ET AL. (2000) beschreiben in einer Studie einen Kluyvereffekt bei *S. cerevisiae* hinsichtlich der Verwertung von Trehalose und bemerken, dass aufgrund von irreführenden Ergebnissen aus Wachstumstests in Durham-Röhrchen (VAN DIJKEN ET AL. 1986) eine große Zahl an Kluyvereffekten bei *S. cerevisiae*-Stämmen hinsichtlich verschiedener Zucker unerkant geblieben sein könnte. Hinweise darauf gibt es jedoch auch schon in früherer Literatur. So postulieren EVANS UND WILKIE (1976) aufgrund von Versuchen mit „petite“-Hefemutanten von *S. cerevisiae*, dass die Nutzbarkeit von verschiedenen Oligosacchariden teilweise durch mitochondriale DNA (mtDNA) kontrolliert wird. Dies wurde jedoch bereits 1977 von der gleichen Arbeitsgruppe (MAHLER UND WILKIE 1978) widerlegt. Es zeigte sich, dass zwar manchen Hefestämmen durch Verlust von mtDNA die Fähigkeit zum Wachstum auf Zuckern wie Galactose, Maltose und alpha-Methylglucoside verloren geht, dass dies aber auch bereits mit geringfügigen Deletionen in der mitochondrialen Atmungskette erreicht werden kann. Eine Kontrolle der Zuckerverwertung durch mitochondriale Gene erschien daher ausgeschlossen, und eine Abhängigkeit mitochondrialer Atmungsaktivität von der Expression von Kerngenen, verantwortlich für Zuckertransportsysteme in der Plasmamembran, wurde diskutiert. Nicht unerwähnt sollte in diesem Zusammenhang SPENCER ET AL. (1983) bleiben, welche bei *S. cerevisiae*-Stämmen die Eigenschaft beobachteten, α -Methylglucoside nur im aeroben Milieu und als petite-Phänotyp gar nicht zu verwerten.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie ähneln denen von MAHLER UND WILKIE (1978): Die Verwertbarkeit von Maltose durch *S. cerevisiae* BY4741 setzt respiratorische Aktivität der Mitochondrien voraus. Je stärker die Atmung durch Gendefekte eingeschränkt wird, desto mehr sinkt die Wachstumsrate des Stammes auf Maltose. Ähnlich wie die bei *S. cerevisiae* BY4741 beobachtete Unfähigkeit Maltose zu vergären, waren alle in dieser Studie untersuchten Hefestämme unfähig, unter anaeroben Bedingungen bzw. als atmungsdefekte ρ^0 -Mutante das Monomer Galactose zu vergären (Tab. 9). Solch eine Abhängigkeit der Verwertbarkeit von Galactose von der Atmungsaktivität der Hefestämme ist in der Literatur beschrieben und es ist bekannt, dass zu *S. cerevisiae* S288c isogene Stämme generell $gal2^-$ sind (HAMPSEY 1997). Das Gen GAL2 codiert den Galactosetransporter bei *S. cerevisiae*. Ob der GAL^- Phänotyp der Stämme *S. cerevisiae* DSMZ 1333 und *S. cerevisiae* CBS 1172 unter anaeroben Bedingungen auch durch einen $gal2^-$ Genotyp begründet ist, bleibt Spekulation.

S. cerevisiae DSMZ 1333 und *S. cerevisiae* CBS 1172 können aerob und anaerob Maltose als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen und atmungsdefekte ρ^0 -Mutanten von DSMZ 1333 vergären, sowohl aerob als auch anaerob, Maltose zu Ethanol. Dies gilt auch für alle getesteten Stämme hinsichtlich des Disaccharids Saccharose und des Trisaccharids Raffinose. Da *Ch. sp.* SAG 241.80 vorwiegend Maltose synthetisiert, scheiden atmungsdefekte Mutanten von *S. cerevisiae* BY4741 für die Anwendung in dem geplanten Verbundsystem aus.

4.2.4 Einfluss des Atmungsdefektes auf das Wachstum

BACILA UND HORII (1979) berichten über atmungsdefekte Mutanten von *S. uvarum*, bei denen der Zellertrag niedriger, die Ethanolausbeute jedoch doppelt so hoch wie beim Wildtyp ist. Die Experimente erfolgten bei 2 % Glucosegehalt unter aeroben Bedingungen. Die nach BACILA UND HORII (1979) doppelt so hohe Ethanolausbeute bei Atmungsdefekt ist wahrscheinlich durch die Zeitpunkte der Probenahme begründet. Genauer gesagt wurde die Diauxie im Wachstum des Wildstammes nicht berücksichtigt, so dass der maximal erreichbare Ethanolertrag bei der Kultivierung des Wildtyps nicht ermittelt wurde.

Unter anaeroben Bedingungen zeigten MOULIN ET AL. (1981), dass die Wachstumsrate für ρ -Mutanten von *Candida pseudotropicalis* höher ist als die des Wildstammes und dass die Inhibition durch Ethanol und sehr hohen Zuckergehalt bei den Mutanten geringer ist. Später zeigten MOULIN ET AL. (1982), dass bei Crabtree-negativen Hefen die Ethanolproduktion der ρ -Mutanten unter aeroben Bedingungen in jeder Hinsicht der der Wildtypen überlegen ist. Demgegenüber berichteten ESSER ET AL. (1982), dass durch den Crabtree-Effekt unter

aeroben Bedingungen die ρ -Mutanten von *S. cerevisiae* die Ethanolproduktionsraten der Wildtypen nicht erreichen. Andere wiederum (ALEXANDER UND DETROY 1983) fanden keinen Unterschied in Wachstum, Ethanolproduktionsrate und Ethanolertrag zwischen ρ -Mutanten und Wildtyp von *S. cerevisiae*. Auch JOHANSSON UND SJÖSTRÖM (1984) fanden bei hohen Zuckerkonzentrationen keinen Unterschied im Wachstum zwischen Wildtyp und ρ -Mutanten. Bei niedrigen Zuckerkonzentrationen von 10-20 g l⁻¹ Saccharose wuchsen die Mutanten jedoch deutlich langsamer.

Bei BROWN ET AL. (1984) bleiben die ρ -Mutanten auch unter anaeroben Bedingungen in der Ethanol- und Biomasseproduktion hinter den Wildstämmen zurück. HUTTER UND OLIVER (1998) beobachteten bei einer Glucosekonzentration von 5 % unter aeroben Bedingungen eine leicht eingeschränkte Wachstumsrate, aber eine deutlich erhöhte Ethanolbildungsrate bei „nuclear-petite“-Hefestämmen mit totalem Atmungsdefekt. Überraschenderweise beobachteten HUTTER UND OLIVER (1998) bei ρ -Mutanten unter aeroben Bedingungen eine geringere Ethanolbildungsrate als beim Wildtyp.

Die in der vorliegenden Studie gemessenen maximalen Wachstumsraten der atmungsdefekten Mutanten bei aerober Kultivierung auf Medium mit 1 % Glucose war gegenüber dem entsprechenden Wildtypen verringert. Dies ist begründet durch die unterschiedlichen Gärungsformen. Die aerobe Gärung des Wildtyps führt zu höheren Wachstumsraten und Zellausbeuten als die alkoholische Gärung ohne gleichzeitige Atmung der atmungsdefekten Mutanten. Die Ethanolausbeute beim Wachstum auf Medium mit 1 % Glucose ist bei den atmungsdefekten Stämmen nur geringfügig erhöht (Abb. 21, Tab. 11). Die Ethanolproduktionsrate während des Wachstums ist, trotz vorhandener Atmung, zumindest beim Wildtyp von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 höher (Tab. 11).

Es bleibt festzuhalten, dass bei *S. cerevisiae* DSMZ 1333 während des aeroben Wachstums bei einer Glucosekonzentration von 1 % ein deutlicher Unterschied zwischen atmungsdefektem und atmendem Phänotyp in der Wachstumsgeschwindigkeit, jedoch nicht in der Ethanolproduktion zu beobachten ist.

4.2.5 Spezifische Ethanolbildung von *S. cerevisiae*

Wie bereits im vorangehenden Kapitel erwähnt, zeigen die atmungsdefekten Hefen beim Wachstum in Anwesenheit von Sauerstoff keine höheren Ethanolbildungsraten als die atmenden Wildtypen. Daher ist für eine hohe Ethanolproduktion mit wachsenden Hefekulturen der Einsatz von atmungsdefekten Hefen nicht notwendig. Zur effizienten

aeroben Ethanolproduktion mit nicht-wachsenden Hefekulturen ist der Einsatz von atmungsdefekten Hefen jedoch essentiell.

Bei der Messung in Schüttelkultur mit stickstofffreiem Puffer bei einer Glucosekonzentration von 0,2 % erreichen die getesteten Wildtypen nur zwischen 11 und 23 % der Biomasse-spezifischen Ethanolbildungsraten der atmungsdefekten Mutanten (Abb. 25). Der Wildtyp des Laborstammes *S. cerevisiae* BY4741 bleibt aufgrund seiner geringeren Stoffwechselleistung beim Sauerstoffverbrauch hinter der Brennereihefe *S. cerevisiae* DSMZ 1333 zurück (Abb. 22), und auch die Gäraktivität der atmungsdefekten ρ^0 -Mutante von *S. cerevisiae* BY4741 ist deutlich niedriger als bei *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 (Abb. 25). Die vorhandene Restatmung des „nuclear-petite“-Stammes *S. cerevisiae* BY4741 Δcox5a von 19 % (Abb. 22) macht sich bei der Ethanolproduktion negativ bemerkbar (Abb. 25).

Die Biomasse-spezifische Ethanolbildungsrate nimmt mit zunehmender Substratkonzentration zu. Eine Substratsättigung der alkoholischen Gärung ist sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen beim *S. cerevisiae* DSMZ 1333 Wildtyp und bei der ρ^0 -Mutante ab einer Konzentration von 7 % Glucose weitgehend erreicht. Die Substratsättigung der Gäraktivität folgt der Michaelis-Menten-Kinetik. Unter aeroben Bedingungen konnte ein K_m -Wert von 0,23 % Glucose für den Wildtyp und 0,35 % für die ρ^0 -Mutante und unter anaeroben Bedingungen ein K_m -Wert von 0,18 % Glucose für den Wildtyp und 0,31 % für die ρ^0 -Mutante ermittelt werden.

Die im vorangegangenen Kapitel genannten Literaturquellen und auch die eigenen Ergebnisse zeigen keine großen Unterschiede in der Ethanolbildung während des aeroben Wachstums von atmungsdefekter und atmender *S. cerevisiae* bei Glucosekonzentrationen von 1 %. Dies ist nicht nur durch den bei dieser Konzentration noch wirkenden Crabtree-Effekt bedingt, sondern vielmehr durch die sehr niedrige Sauerstoffkonzentration, die trotz aerober Kultivierung in der Kultur vorliegt (Tab. 11). Arbeitet man, wie bei der Bestimmung des K_m -Wertes geschehen, mit geringen Biomassekonzentrationen in gepufferten Zuckerlösungen, so kann bei aerober Kultivierung auch beim Wildtyp eine signifikante Sauerstoffkonzentration im Ansatz erreicht werden, und Biomasse-spezifische Ethanolbildungsraten können bestimmt werden.

Auch bei einer Zuckerkonzentration von 7 % blieb die Gärung des Wildtyps unter aeroben Bedingungen weit hinter jener der ρ^0 -Mutante zurück (Abb. 26). Bei ähnlichen Versuchen im Rührreaktor erreichte der Wildstamm von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 bei einer

Sauerstoffkonzentration von 50 % Luftsättigung trotz einer Zuckerkonzentration von 1 % nur 20 % der in Sauerstoffabwesenheit ermittelten Ethanolbildungsrate. Eine weitere Steigerung der Sauerstoffkonzentration auf 400 % Luftsättigung führte jedoch nicht zu einer weiteren Unterdrückung der alkoholischen Gärung (Abb. 29). Bei *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 blieb die Ethanolbildungsrate durch die im Medium herrschende Sauerstoffkonzentration im Kurzzeitexperiment vollkommen unbeeinflusst (Abb. 30). Erhöhte Sauerstoffkonzentrationen führten jedoch bei Wildtyp und Mutante unter den gewählten Versuchsbedingungen zu einer verringerten Langzeitstabilität der Gäraktivität (Abb. 29 und Abb. 30).

4.2.6 Vitalitätsverlust bei *S. cerevisiae* durch hohe Sauerstoffkonzentrationen

Wie bereits erwähnt, führt eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration von 50 auf 400 % Luftsättigung anfangs nicht zu einer stärkeren Unterdrückung der Gärung bei *S. cerevisiae* DSMZ 1333. Allerdings sind nach vier Stunden Inkubation mit 400 % Luftsättigung nur noch 20 % der anfänglichen Gäraktivität vorhanden. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 50 % Luftsättigung kommt es nach dieser Zeit zu keiner Abnahme der Gäraktivität (Abb. 29). Ähnlich sieht dies bei der reinen Gärung von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 aus. Anaerob sind nach sechs Stunden noch 73 % der anfänglichen Gäraktivität vorhanden, bei Luftsättigung sind es hingegen nur noch 53 % und bei 4,76-facher Luftsättigung lediglich noch 17 % der anfänglichen Gäraktivität (Abb. 30).

Für den Vitalitätsverlust durch die Gegenwart von Sauerstoff, der bis zur Apoptosis führen kann, werden sehr reaktive, und damit toxische, Sauerstoffarten, wie Superoxidanionen oder Hydroxyradikale, verantwortlich gemacht. Sie entstehen durch eine univalente Reduktion des Sauerstoffs und führen zur Schädigung von Enzymen, Nukleinsäuren und Lipiden. Als Schutz bilden aerobe Organismen Enzyme, wie Superoxiddismutase, Glutathionreduktase oder Katalase, welche diese reaktiven Formen des Sauerstoffs in nicht-reaktive Formen transformieren (ONKEN UND LIEFKE, 1990; GILLE UND SIGLER 1995). Dass reaktive Sauerstoff-Formen als obligatorische Nebenprodukte in der Atmungskette von respiratorisch aktiven Organismen auftreten, ist eine weit verbreitete Ansicht (HARMAN, 1988). NOHL ET AL. (2003) konnten jedoch in intakten aktiven Mitochondrien, isoliert aus Rattenherzen, keine Bildung von Superoxidanionen nachweisen. Sie zeigten hingegen, dass es durch Beeinträchtigung der Elektronenaufspaltung bei Übertragung der Elektronen von Ubiquinol zum Cytochrom bc_1 -Komplex, durch Antimycin A oder durch Veränderung der Mitochondrienmembran, zur Superoxidproduktion kommt. Führt also der Verlust jeglicher

mitochondrialer DNA zum Verlust verschiedener Atmungskettenenzyme und damit zur Unterbrechung der energieliefernden Ablaufs der Atmungskette, so schließt dies eine fortlaufende Superoxidproduktion nicht grundsätzlich aus, da viele Atmungskettenenzyme kerncodiert sind. Theoretisch wäre durch eine teilweise geschädigte Atmungskette sogar eine erhöhte Superoxidproduktion denkbar. So könnte die in der vorliegenden Studie auch bei respiratorisch nicht aktiven Hefemutanten beobachtete schädigende Wirkung des Sauerstoffs erklärt werden.

Die gäraktivitätsschädigende Wirkung von Sauerstoff kann durch die Immobilisierung der Hefe, d.h. durch Einbettung in eine Alginatmatrix, deutlich verringert werden (Abb. 31). Die anfängliche Gäraktivität ist zwar durch die Immobilisierung im Vergleich mit dem nativem Einsatz um 22 % verringert, die nach acht Stunden Inkubation bei 4,76-facher Luftsättigung verbleibende Restaktivität beträgt jedoch immer noch 50 % der anfänglichen Aktivität. Beim Einsatz von nativer Hefe sind dies lediglich 5 % (Abb. 32). Da ein direkter Einfluss der Immobilisierung auf die in der Atmungskette ablaufenden Enzymreaktionen auszuschließen ist, könnte eine verringerte Löslichkeit des Sauerstoffs in den Immobilisaten, z.B. aufgrund der Kohlendioxidproduktion, eine mögliche Ursache sein. Eine Verringerung der Konzentration in den Immobilisaten durch atmungsunabhängige Enzymreaktionen ist jedoch ebenfalls denkbar.

4.2.7 Wachstum von *S. cerevisiae* bei Begasung mit Sauerstoff

Die Kultivierung von Hefen bei einem Luftdruck von bis zu 6 bar bzw. bei einem Sauerstoffpartialdruck von bis zu 1,2 bar fördert das Zellwachstum von *S. cerevisiae* (BELO ET AL. 2003). Eine weitere Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks führt jedoch zu einer starken Einschränkung des Wachstums (bei 3 bar) bis hin zur totalen Unterdrückung des Wachstums (bei 6 bar) (CAMPELO UND BELO, 2004). PINHEIRO ET AL. (1997) konnten allerdings bereits bei einem Luftdruck von 3 bar einen Rückgang der Wachstumsrate bei *S. cerevisiae* beobachten und HARTMEIER (1972) wies bei rein respiratorisch wachsenden Hefen eine schädigende Wirkung des Sauerstoffs schon bei einer geringen Überschreitung des in der Luft vorhandenen Sauerstoffpartialdrucks von 0,21 bar nach. Diese unterschiedlichen Ergebnisse zeigen, dass der über der Kultur herrschende Sauerstoffpartialdruck nicht im direkten Zusammenhang mit den in der Kultur bestehenden Bedingungen steht. So haben z.B. der Sauerstoffverbrauch und die CO₂-Produktion im bzw. die CO₂-Entfernung aus dem System

oder auch die Rührerdrehzahl des Fermenters einen maßgeblichen Einfluss auf die in der Kultur vorhandenen Sauerstoffkonzentrationen.

In der vorliegenden Studie wurden die Bioreaktoren mit Normaldruck (1 bar) begast. Bei der Begasung mit reinem Sauerstoff würde der Sauerstoffpartialdruck dem eines Luftdrucks von 4,76 bar entsprechen. Die in der Kultur vorliegenden Sauerstoffkonzentrationen nehmen beim Wildtyp von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 trotz kontinuierlicher Begasung während des Wachstums ab (Abb. 33), so dass spätestens nach Beendigung des exponentiellen Wachstums weitgehend anaerobe Verhältnisse vorliegen. Eine Förderung des Wachstums durch die Begasung mit Sauerstoff lässt sich nicht beobachten, die Wachstumsrate bleibt konstant (Tab. 11). Ein Anstieg der Wachstumsrate war auch nicht zu erwarten, da eine verstärkte Atmung der Hefe die hohe Wachstumsrate während der aeroben Gärung verringert. Für eine verstärkte Atmung spricht auch die wesentlich höhere Zellausbeute während der Begasung mit Sauerstoff an Stelle von Luft (Tab. 11).

Beim Einsatz der atmungsdefekten *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 haben Sauerstoffkonzentrationen von über 80 % Luftsättigung keine Wirkung auf Wachstumsrate und Zellausbeute. Bei mehr als 4-facher Luftsättigung zeigt sich jedoch ein Rückgang der Wachstumsrate (Tab. 11). Da *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 nicht zur Atmung fähig ist, kann dieser Effekt nicht durch eine Stoffwechsellumstellung verursacht sein. Er ist vielmehr auf den hemmenden, d.h. toxischen Einfluss des Sauerstoffs zurückzuführen.

4.3 Ethanolproduktion im Fotobioreaktor

4.3.1 Simulation

Um die Langzeitstabilität der alkoholischen Gärung von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 unter in Fotobioreaktoren vorhandenen Verhältnissen zu simulieren, wurde Hefebiomasse in stickstofffreiem Mineralsalzmedium (EM) suspendiert. Der Ansatz wurde mit Luft begast und Maltose wurde kontinuierlich zugegeben. Aufgrund des geringen Sauerstoffverbrauchs von *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 (Abb. 22) kann davon ausgegangen werden, dass das System zu 100 % luftgesättigt war. In den ersten 100 Stunden wird nochmals deutlich, dass *S. cerevisiae* DSMZ 1333 ρ^0 obligatorisch gärt, da die im System vorhandene Zuckerkonzentration zur Unterdrückung der Atmung nicht ausreichen würde und es dennoch zur fast vollständigen Umsetzung der Maltose zu Ethanol kommt. Mit zunehmender Versuchsdauer zeichnet sich jedoch, genauso wie im Kurzeitexperiment (Abb. 30), ein Verlust an Gäraktivität ab (Abb.

34) und es kommt zur Akkumulation von Maltose. Bei diesem Versuch wird ein weiteres Problem deutlich, welches sich bei der Ethanolproduktion im Fotobioreaktor ergibt: Selbst wenn die Maltose vollständig zu Ethanol umgesetzt würde, würde die entsprechende Ethanolkonzentration im Bioreaktor nie erreicht, da die kontinuierliche Begasung zur Evaporation des Ethanols führt.

4.3.2 Verbundprozess mit Algen und Hefen

Der Aktivitätsverlust, der sich in den Versuchen mit Algen und Hefen (Abb. 35 und Abb. 36) spätestens nach 70 Stunden durch die Stagnation weiterer Ethanolbildung abzeichnet, kann kaum auf eine eingeschränkte Gäraktivität zurückgeführt werden, da es zum Versuchsende hin nicht zur Akkumulation von Zucker im System kommt. Vermutlich ist der Aktivitätsverlust durch nachlassende Zuckerexkretion der Grünalgen, durch mikrobielle Kontaminationen, teilweise aber auch durch Evaporation des Ethanols verursacht. Die Stabilität der untersuchten Systeme bleibt zurück hinter der, die bei der Anwendung von peptonhaltigen Medien mit Harnstoff als Stickstoffquelle ermittelt wurde. MÜCKE (1985) erreichte damit Ethanolbildungsraten von ca. $1000 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ und eine kontinuierliche Zunahme der Ethanolkonzentration über 240 Stunden.

Die in der vorliegenden Studie ermittelten Ethanolbildungsraten lagen zwischen $412 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Variante 1 in Abb. 35) und $421 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Variante 2 in Abb. 36). Addiert man den zur Produktion des im System vorhandenen Ethanols notwendigen Zucker zu dem im System vorhandenen Zucker, so erhält man die theoretische Glucosemenge als Maß für den ausgeschiedenen Zucker (Abb. 37). Die so in den ersten 24 Stunden ermittelten Glucoseproduktionsraten von $724 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Variante 1) und $914 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Variante 2) übersteigen die in dieser Studie nach 48 Stunden ermittelten Produktionsraten (siehe Ergebnisse unter 3.1.4 und Diskussion unter 4.1.4). Dies bedeutet, dass es nach dem Umsetzen der Algenkultur in stickstofffreies Medium anfänglich zu einer verstärkten Zuckerausscheidung kommt.

Außer den dieser Studie vorangehenden Untersuchungen von MÜCKE (1985) gibt es in der Literatur keine Beispiele, die diesen oder einen ähnlichen Weg zur direkten Ethanolgewinnung aus CO_2 und Licht verfolgen. HIRANO ET AL. (1997) zeigten, dass eine Ethanolgewinnung mit Hilfe von Mikroalgen auch ohne den Einsatz von Hefen möglich ist. Sie erreichten 30 – 40 % Umsetzung der intrazellulären Stärkereserven bei *Chlamydomonas reinhardtii* zu Ethanol allein durch die Gäraktivität der Alge in Dunkelheit unter anaeroben

Bedingungen. HIRAYAMA ET AL. (1998) konnten sogar mit *Chlamydomonas* sp. eine flächenbezogene Biomasse-Produktionsrate von $30 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ erreichen, wobei 30 % des Trockengewichts aus Stärke bestand, die dann, nach Abernten der Biomasse, mit einer Ausbeute von 50 % in Dunkelheit unter Sauerstoffabwesenheit zu Ethanol umgesetzt wurde.

Das Potential der avisierten fotosynthetisch-fermentativen Ethanolgewinnung lässt sich schwer abschätzen. Obwohl theoretisch die Bildung von Zuckern einen geringeren Energieaufwand für die Grünalgen bedeutet als die Bildung von Biomasse, war die Summe aus gelösten Zuckern und Biomasse auch bei unterschiedlichen Mengenverhältnissen in verschiedenen Kulturen von *Ch.* sp. SAG 241.80 nach gleicher Inkubationszeit fast identisch (Abb. 11). Verwendet man somit Biomasseproduktionsraten zur Abschätzung des Potentials des hier untersuchten Systems, so ergeben sich aus den oben genannten Literaturdaten (HIRAYAMA ET AL. 1998) unter der Annahme einer ausschließlichen Produktion von Zuckern an Stelle von stärkehaltiger Biomasse theoretische Ethanolbildungsraten von ca. $625 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

4.4 Säure- und Wasserstoffproduktion durch Clostridien

4.4.1 Methodik

Da Clostridien im Allgemeinen als sehr sauerstoffsensitiv gelten, wurden in dieser Arbeit anfänglich die Inokulationen der Kulturen unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Auf den Einsatz der Anaerobierbank wurde im Laufe dieser Arbeit jedoch verzichtet, da die Dauerformen (Sporen) der Clostridien sauerstoffstabil waren. Mit diesen konnten Flüssigkulturen, soweit die Sporengewinnung mit den verschiedenen Stämmen gelang, an der Luft angeimpft werden. Die Inokulation und Kultivierung von Oberflächenkulturen ohne die Anwendung einer Schutzatmosphäre war nicht möglich. Auf eine Begasung der Flüssigkulturen mit Stickstoff oder Kohlendioxid wurde in dieser Arbeit verzichtet. Das luftdichte Verschließen der Reaktoren unmittelbar nach dem Autoklavieren, bzw. das Abkühlen der Vorkulturmedien nach dem Autoklavieren unter einer Stickstoffatmosphäre reichte, ähnlich wie bei (MONOT ET AL. 1982), für die notwendige Sauerstoffarmut des Mediums aus. Anaerobe Bedingungen während der Kultivierung garantierte die eigene Gasproduktion der Clostridien. Der Einsatz solch einer selbstgenerierten sauerstofffreien Gasatmosphäre ist in der industriellen Anwendung von anaeroben Mikroorganismen üblich, bildet im Labormaßstab jedoch eher die Ausnahme (VAN ANDEL ET AL. 1985). Die

Anwendung einer kontinuierlichen Begasung während der Kultivierung schied in der vorliegenden Arbeit aufgrund der gewünschten Quantifizierung der Gasproduktion grundsätzlich aus.

Eine weitere Möglichkeit sauerstofffreie Medien zu erhalten, ist der Zusatz einer reduzierenden Agens, wie L-Cystein. Aus Kostengründen postulierten YOKOI ET AL. (1998a) eine Cokultivierung von Clostridien mit sauerstoffverbrauchenden fakultativen Anaerobiern um auf den Zusatz von teurem L-Cystein zu verzichten. Eine sehr lange lag-Phase von über zwölf Stunden bei der Kultivierung von *C. butyricum* DSMZ 10702 ohne Zusatz von L-Cystein konnte jedoch in dieser Studie im Gegensatz zu YOKOI ET AL. 1998 nicht beobachtet werden. Die initiale lag-Phase war spätestens nach vier Stunden beendet und es konnten deutliches Wachstum und Produktbildung beobachtet werden (z.B. Abb. 39 und Abb. 40).

Die Gewinnung von Clostridiensporen erfolgte in dieser Arbeit immer auf Vollmedium mit Pepton und Hefeextraktzusatz, auch wenn für den Stamm *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 (identisch mit *C. acetobutylicum* P262) und *C. acetobutylicum* DSMZ 792 (ATCC 824) die Fähigkeit zur Sporulation auf definiertem Minimalmedien in der Literatur beschrieben ist (LONG ET AL. 1983). Nach der Inokulation der ersten Vorkultur mit der Sporensuspension, wurde stets ein Hitzeschock bei 80 °C von 20 Minuten durchgeführt. Ein Hitzeschock stimuliert die Sporenkeimung (SPIVEY 1978) und schließt eine Kontamination durch nicht sporenbildende Mikroorganismen effektiv aus.

Trotz der anaeroben Kultivierung der Clostridien wurden Ansätze zur Bestimmung des Wachstums und der Produktbildung immer gerührt, um ein gleichmäßiges Ausstrippen der Gärgase, eine homogene Verteilung der Biomasse bei der Probenahme und eine schnelle Verteilung der Lauge bei einer Steuerung des pH-Wertes zu gewährleisten. Die hier verwendete Methode zur quantitativen Bestimmung der Gasbildung (Abb. 4) ist mit Fehlern behaftet. Die hohe Löslichkeit von Kohlendioxid im Wasserreservoir der Gasfalle kann sowohl zu einer Verfälschung der gemessenen Gesamtmenge als auch, wegen der deutlich geringeren Löslichkeit von Wasserstoff, zu einer verfälschten Messung der Gaszusammensetzung führen. Allerdings kommt es auch zur Sättigung des Wasserreservoirs mit den Gärgasen, so dass der Fehler bei anhaltender Gasproduktion mit zunehmender Versuchsdauer immer geringer wird. Stöchiometrische Aussagen über die Umsetzung von Zuckern zu Gärgasen erfolgten deshalb nur nach lang anhaltender gleichmäßiger Gasproduktion.

Bei der Berechnung von Molmengen aus Gasvolumina wurden immer die SATP angenommen. Wetterabhängige Abweichungen der Raumtemperatur und des Luftdrucks von der SATP wurden nicht berücksichtigt. Auch der etwas erhöhte Druck in der Gasfalle durch die maximal 0,5 m hohe Wassersäule im Überlauf und die geringen Abweichungen der Eigenschaften von Kohlendioxid gegenüber den Eigenschaften eines idealen Gases blieben in der Auswertung unberücksichtigt.

4.4.2 Gärungsprodukte von Clostridien

Die industrielle Anwendung der Gärung durch Clostridien beschränkte sich in der Vergangenheit auf die sogenannte ABE-Fermentation von *C. acetobutylicum*, das heißt auf die fermentative Herstellung der Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol (SPIVEY 1978, LONZ UND MOREIRA 1980). Die ABE-Fermentation von *C. acetobutylicum* ist ein zweiphasiger Prozess, bestehend aus einer anfänglichen säurebildenden Phase, an die sich eine lösungsmittelbildende Phase anschließt. Wachstum und Zellteilung findet ausschließlich während der Säurebildung statt. Die Lösungsmittel werden bei konstanter Zelldichte gebildet, wobei es mit fortlaufender Fermentationsdauer zur Endosporenbildung kommt. Wird das durch die Säureproduktion verursachte Absinken des pH-Wertes auf unter pH 6 durch eine pH-Steuerung verhindert, so kann die Lösungsmittelproduktion zugunsten einer verstärkten Säureproduktion weitgehend unterdrückt werden (ENNIS UND MADDOX 1987). Bei *C. butyricum* bleibt die lösungsmittelbildende Phase generell aus.

Da für die Anwendung im fotosynthetisch-fermentativen Verbundsystem ausschließlich die Bildung von kurzkettigen Carbonsäuren und Wasserstoff von Interesse ist, wurden die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit darauf beschränkt. In Abb. 50 sind die Stoffwechselwege wiedergegeben, welche bei Clostridien zur Bildung von Buttersäure, Essigsäure und Wasserstoff aus Lactose führen. Wenn keine Buttersäure gebildet wird, können theoretisch aus 1 Mol Lactose 4 Mol Essigsäure entstehen, wobei 8 Mol Wasserstoff frei werden. Entsteht ausschließlich Buttersäure, so werden die zuvor gebildeten 4 Mol NADH₂ zur Reduktion des Acetacetyl-CoA benötigt und es entstehen lediglich 4 Mol Wasserstoff. Je höher der Essigsäureanteil an den gebildeten Säuren ist, desto höher ist der zu erwartende Wasserstoffanteil der Gärgase. Die Bildung von ATP variiert theoretisch zwischen 6 Mol ATP aus 1 Mol Lactose bei ausschließlicher Entstehung von Buttersäure und 8 Mol ATP, falls nur Essigsäure gebildet wird. So wird nach VAN ANDEL ET AL. (1985) während starkem Wachstum von *C. butyricum* wegen des höheren Energiebedarfs verstärkt

Essigsäure und bei eingeschränktem Wachstum, durch z.B. niedrigem pH-Wert oder Zuckerlimitierung, verstärkt Buttersäure gebildet.

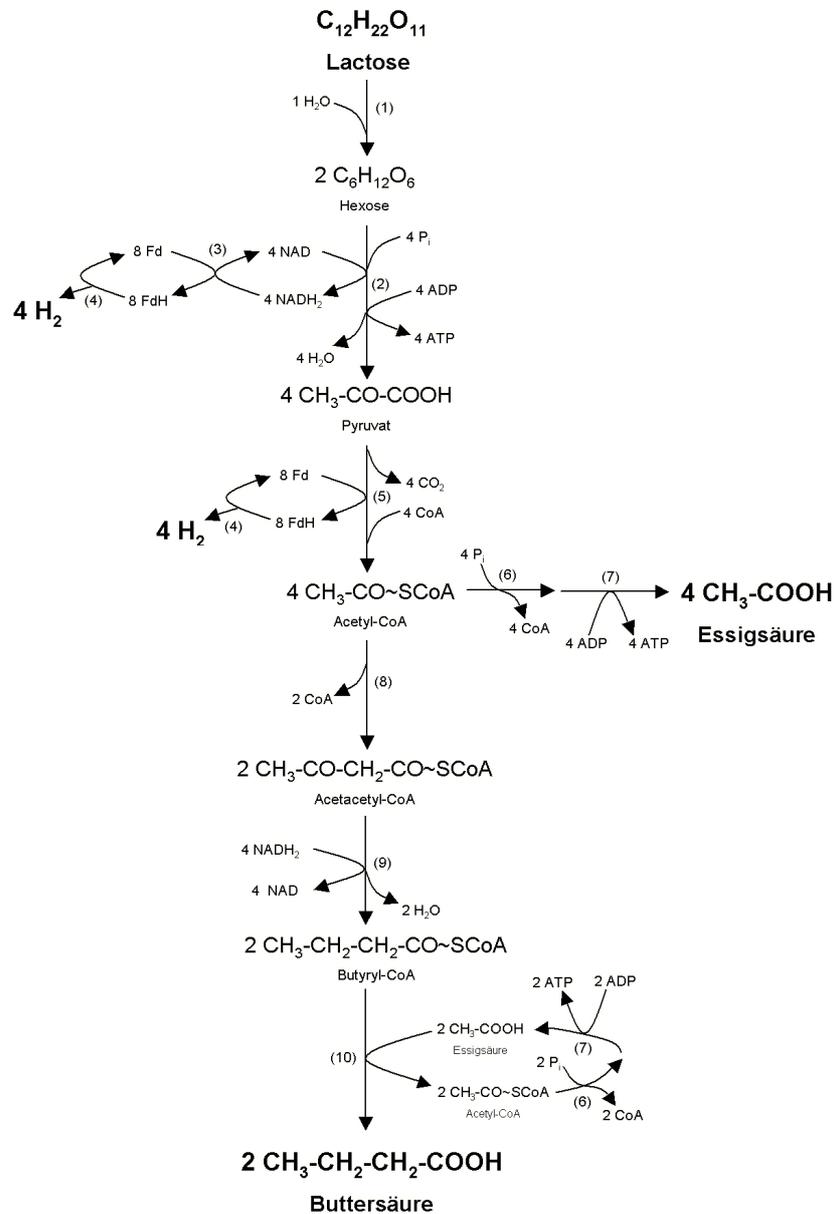


Abb. 50: Buttersäure-, Essigsäure- und Wasserstoffbildung aus Lactose durch *C. butyricum* ((1) β -Galactosidase; (2) Glycolyse; (3) $NADH_2$:Ferredoxin-Oxidoreductase; (4) Ferredoxin: H_2 -Oxidoreductase; (5) Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreductase; (6) Phosphotransacetylase; (7) Acetat-Kinase; (8) Thiolase; (9) β -Hydroxy-butryl-CoA-DH, Crotonase, Butyryl-CoA-DH; (10) CoA-Transferase) nach SCHLEGEL UND ZABOROSCH (1992).

4.4.3 Clostridienstämme

Dem thermophilen Clostridienstamm *C. thermobutyricum*, attestierten WIEGEL ET AL. (1989) Wachstum auf Maltose und Cellobiose, jedoch keines auf Saccharose. In den vorliegenden Untersuchungen zeigte *C. thermobutyricum* DSMZ 4928 kein Wachstum auf Lactose (Tab. 12). Damit schied er für die geplante Anwendung auf Molke aus. *C. acetobutylicum* DSMZ 792 (ATCC 824) wurde schon öfter im Zusammenhang mit der ABE-Fermentation untersucht (MONOT ET AL. 1982, LAI UND TRAXLER 1994) und zeigte in dieser Studie im Vergleich zum ebenfalls lösungsmittelbildenden *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 eine sehr früh einsetzende lösungsmittelbildende Phase (Abb. 38). Deshalb wurden keine weiterführenden Untersuchungen mit *C. acetobutylicum* DSMZ 792 durchgeführt. *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 ist mit dem gut untersuchten und häufig in der Literatur beschriebenen Stamm *C. acetobutylicum* P262 identisch.

Industriestämme von *C. acetobutylicum*, die mittlerweile unter *C. saccharobutylicum* sp. zusammengefasst werden, hießen ursprünglich *C. saccharo-butyl-aceticum-liquefaciens* und ihre Anwendung zur Lösungsmittelproduktion wurde bereits 1938 patentiert (JONES UND KEIS 1995, KEIS ET AL. 2001). Die Abgrenzung von *C. saccharobutylicum* von *C. acetobutylicum* erfolgte auf der Basis von 16S rRNA Gensequenzierung und DNA-DNA-Hybridisierung durch KEIS ET AL. (2001). Große phäno- und genotypische Unterschiede innerhalb der Spezies *C. acetobutylicum* sind jedoch bereits zuvor zahlreich beschrieben worden (LONG ET AL. 1983, WILKINSON ET AL. 1995).

Wegen der in der vorliegenden Untersuchung beobachteten sehr langen säurebildenden Phase von *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 (Abb. 38) und wegen der sehr geringen Lösungsmittelproduktion bei konstantem pH-Wert von pH 6 (ENNIS UND MADDOX 1987) wurde *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 für weiterführende, vergleichende Studien mit *C. butyricum* ausgewählt. Da ausschließlich die Bildung von kurzkettigen Carbonsäuren erwünscht war, war die Spezies *C. butyricum*, da sie keinerlei Lösungsmittel bildet, für die geplante Anwendung prädestiniert. In dieser Studie wurde die Säure- und Wasserstoffbildung von *C. butyricum* DSMZ 10702 exemplarisch untersucht.

Verschiedenste Studien zur technischen Anwendung der Säure- und Wasserstoffbildung von *C. butyricum* sp. finden sich in der Literatur (KARUBE ET AL. 1982, VANDÁK ET AL. 1995b, ZIGOVÁ ET AL. 1999). Auch die Verwendung von Molke als Substrat in der Säureproduktion mit Clostridien ist in der Literatur beschrieben (ALAM ET AL. 1988, VANDÁK ET AL. 1995a)

und speziell der Stamm *C. butyricum* DSMZ 10702 (identisch mit IFO 13949) fand schon in mehreren Studien zur Wasserstoffproduktion Anwendung (MIYAKE ET AL. 1984, YOKOI ET AL. 1997, 1998a, 1998b).

4.4.4 Produktionsraten in ansatzweiser Kultur

Die in dieser Studie in den ersten zehn Stunden der Inkubation ermittelten Säure- und Gasproduktionsraten von *C. saccharobutylicum* DSMZ 13864 unterschieden sich trotz einsetzender Lösungsmittelproduktion nicht maßgeblich von denen von *C. butyricum* DSMZ 10702. Die maximalen Produktionsraten von *C. butyricum* DSMZ 10702 konnten durch eine Steuerung des pH-Wertes (pH 6,5) deutlich erhöht werden (Tab. 14). Eine vergleichbar hohe maximale Buttersäureproduktionsrate von $1,33 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$, welche auf Vollmedium mit Lactose, Hefeextraktzusatz und pH-Steuerung mit *C. butyricum* DSMZ 10702 gemessen werden konnte, findet sich in der Literatur nicht. Jedoch lag die durchschnittliche Produktionsrate an Buttersäure mit $0,70 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ unter der, die VANDÁK ET AL. (1995b) ermittelten. Dieser konnte mit *C. butyricum* auf saccharosehaltigem Vollmedium eine durchschnittliche Buttersäureproduktionsrate von $0,90 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ nachweisen, welche auch über der von *C. tyrobutyricum* auf Glucose mit $0,82 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (MICHEL-SAVIN ET AL. 1990) liegt.

Die Säureproduktion auf reiner Molke mit *C. butyricum* DSMZ 10702 war ohne den Zusatz von Hefeextrakt nur sehr eingeschränkt möglich. Zwar betrug die maximal gemessene Buttersäureproduktionsrate auf reiner Molke mit pH-Kontrolle immer noch zwei Drittel von der mit Hefeextrakt (Tab. 16), jedoch lagen die durchschnittlichen Säurebildungsraten nach einer Versuchsdauer von 24 Stunden lediglich zwischen 32 und 36 % von denen mit Hefeextrakt.

Für eine konstant hohe Gasproduktionsrate und somit für eine rasche Umsetzung der 4,5 % Lactose in der Molke war insgesamt ein Zusatz von 0,3 % Hefeextrakt notwendig (Abb. 42). Eine ähnliche Beobachtung machten VANDÁK ET AL (1995a), welche auf reiner Molke eine Buttersäureproduktionsrate von $0,16 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ und unter Zusatz von 0,5 % Hefeextrakt eine Produktionsrate von $0,44 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ dokumentierten. VANDÁK ET AL (1995a) machten aufgrund von Kontrolluntersuchungen das im Hefeextrakt enthaltende Biotin dafür verantwortlich.

Meist wurde in der vorliegenden Studie nur die gesamte Gasproduktion durch die Clostridien dokumentiert. Eine Quantifizierung des gebildeten Wasserstoffs erfolgte nur exemplarisch. So hatte das beim Wachstum von *C. butyricum* DSMZ 10702 auf Vollmedium mit Lactose, Hefeextraktzusatz und pH-Steuerung aufgefangene Gas einen Wasserstoffgehalt von 67 %.

Bei der dabei ermittelten maximalen Gasproduktionsrate von $2,38 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und der durchschnittlichen Gasproduktionsrate von $0,93 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Abb. 39) ergeben sich daraus Wasserstoffproduktionsraten von $1,59$ bzw. $0,62 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Die durch die Gasbildung verursachte Gewichtsabnahme einer nicht pH-gesteuerten Kultur bei gleichzeitiger Bestimmung der Gasproduktion eines ansonsten identischen Parallelansatzes bestätigte indirekt den gaschromatographisch gemessenen Wasserstoffgehalt des entstandenen Gases. Wäre weniger oder kein Wasserstoff entstanden, so hätte aufgrund der deutlich höheren Dichte anderer Gärgase eine starke Gewichtsabnahme beobachtet werden müssen (Abb. 43 und Abb. 44).

4.4.5 Anwendung von immobilisierten Clostridien

Der Einsatz von immobilisierten Clostridien ist in der Literatur zahlreich beschrieben. So wurden zum Beispiel in diversen Matrices eingehüllte Clostridien sowohl in der Lösungsmittelproduktion (KROUWEL ET AL. 1983, LARGIER ET AL. 1985, FRICK ET AL. 1986) als auch in der Wasserstoff- und Säureproduktion (KARUBE ET AL. 1982, YOKOI ET AL. 1997) getestet. Aber auch auf verschiedenen Trägern adsorptiv gebundene Clostridien kamen bereits in der Lösungsmittelproduktion (QURESHI ET AL. 1988, 2000, PARK ET AL. 1990) und in der Wasserstoff- und Säureproduktion (YOKOI ET AL. 1997) zum Einsatz. Meist wurden frische intakte Clostridienzellen (KARUBE ET AL. 1982, LARGIER ET AL. 1985, YOKOI ET AL. 1997) immobilisiert.

Die in dieser Studie angewandte Immobilisierung der Clostridiensporen mit anschließender Keimung findet sich auch in der Literatur (KROUWEL ET AL. 1981). Dieses Verfahren vereinfacht die Immobilisierung, da der Einsatz einer Schutzatmosphäre wegen der Sauerstofftoleranz der Sporen überflüssig ist. Nach Keimung der Sporen konnten die Immobilisate in Gegenwart von Luftsauerstoff in den Fermentationsansatz umgesetzt werden, ohne dass es zum Vitalitätsverlust der Clostridien kam. Die Diffusion des schädlichen Sauerstoffs war durch die Matrix limitiert. *C. butyricum* DSMZ 10702 konnte so erfolgreich in Alginat-, Pektin- und PVA-Matrices immobilisiert werden. Allerdings kam es beim Einsatz der Immobilisate in Molke zur Verschleppung von Medienbestandteilen aus dem zur Keimung verwendeten Vollmedium, so dass die anfänglichen Produktbildungsrate nicht mit denen in reiner Molke vergleichbar waren (vergleiche 3.4.3 und 3.4.6).

In der vorliegenden Studie erforderte der Einsatz frei suspendierter Immobilisate stets ein relativ starkes Rühren der Kultur, da sich sonst die Immobilisate aufgrund der Gasbildung auf

der Kulturoberfläche sammelten und es nicht mehr zu einer optimalen Umströmung mit Medium kam. YOKOI ET AL. (1997) sehen darin einen Vorteil der adsorptiven Bindung der Clostridien auf porösen Glaskugeln, da diese aufgrund ihrer hohen Dichte auch bei starker Gasentwicklung nicht aufschwimmen.

4.4.6 Kontinuierliche Fermentation und stöchiometrische Bilanzierung

Bei der kontinuierlichen Fermentation von Molke mit Hefeextraktzusatz wurden in Alginat immobilisierte Zellen von *C. butyricum* DSMZ 10702 eingesetzt. Die verwendete Durchflussrate von $0,015 \text{ h}^{-1}$ war so gering, dass eine Immobilisierung aufgrund des Wachstums der Clostridien wahrscheinlich nicht notwendig gewesen wäre. So zeigte sich bei YOKOI ET AL. (1998a) bei der Anwendung von nicht immobilisiertem *C. butyricum* DSMZ 10702 während einer kontinuierlichen Fermentation auf Vollmedium mit Glucose erst ab einer Durchflussrate von $0,5 \text{ h}^{-1}$ eine Auswaschung der nicht immobilisierten Zellen.

Die sehr geringe Durchflussrate in der eigenen Studie war durch die hohe Lactosekonzentration (4,5 %) in der verwendeten Molke begründet. Trotz der geringen Durchflussrate hatte die Molke beim Verlassen des Reaktors noch eine Lactosekonzentration von durchschnittlich 0,4 % (Abb. 46). Bei einer Eingangskonzentration von nur 1 % Glucose konnten HEYNDRICKX ET AL. (1986), mit *C. butyricum* L1213t1 auf Vollmedium, bei ähnlichem pH-Wert und einer Durchflussrate von $0,222 \text{ h}^{-1}$, keinen Zucker im Abfluss nachweisen. YOKOI ET AL. (1997) zeigten Ähnliches bei der Verwendung von immobilisiertem *C. butyricum* DSMZ 10702. Bei einer Durchflussrate von 1 h^{-1} und einer Glucosekonzentration von 0,5 % im Medium konnten auch sie keinen Zucker im Ablauf nachweisen.

Bei der kontinuierlichen Fermentation von Molke bei konstantem pH-Wert (pH 6,5) mit immobilisiertem *C. butyricum* DSMZ 10702 entstanden Buttersäure, Essigsäure und Gas über 144 Stunden in stets gleichem Verhältnis (Abb. 48). So konnte für die gegebenen Versuchsbedingungen die stöchiometrische Umsetzung von Lactose sehr genau ermittelt werden. Da die Grundlage für die unten angegebene Reaktion nur die tatsächlich gemessenen Produktmengen sind, ist die Reaktionsgleichung nicht stöchiometrisch ausgeglichen.

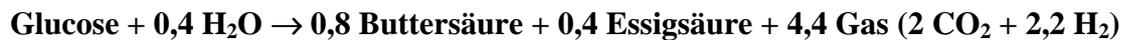
Lactose \rightarrow 1,4 Buttersäure + 0,7 Essigsäure + 6,9 Gas

Es wird deutlich, dass genau doppelt so viel Buttersäure wie Essigsäure entstanden ist. Berücksichtigt man dies bei der Betrachtung der theoretischen Umsetzung von Lactose (bzw.

Glucose) zu Buttersäure und Essigsäure (Abb. 50), so erhält man, geht man von ganzen Molmengen aus, die folgende stöchiometrisch ausgeglichene Reaktionsgleichung.



Bezieht man diese auf 1 Mol Lactose (bzw. Glucose) und fasst man die gebildeten Gase zusammen, ergibt sich daraus:



In dem Versuch wurden somit 88 % der theoretisch möglichen Menge an Säuren und 78 % der theoretisch möglichen Gasproduktion erreicht. Die in Hinblick auf die entstandene Säuremenge nicht ausgeglichene Kohlenstoffbilanz kann durch das Wachstum der Clostridien und damit durch den Einbau des Kohlenstoffs in die Biomasse verursacht sein. Dies gilt auch für die verringerte Menge an produziertem Gas, wobei auch die hohe Löslichkeit des Kohlendioxids, sowohl im Medium als auch im Wasserreservoir der Gasfalle, eine Rolle spielen kann. Unter der Annahme, dass sich das aufgefangene Gas im theoretischen Verhältnis 1:1,1 (CO₂:H₂) zusammensetzt (entspricht einem Wasserstoffanteil von 52,4 %) ergibt sich eine Ausbeute von 1,8 Mol Wasserstoff pro eingesetztem Mol Hexose. Dies entspricht annähernd der Ausbeute an Wasserstoff von 1,9 Mol Wasserstoff pro eingesetztem Mol Glucose, welche YOKOI ET AL. (1998b) für die Vergärung von Stärke durch *C. butyricum* DSMZ 10702 ermittelten. Auch die Beobachtung von JUNGERMANN ET AL. (1973), dass bei der Gärung von *C. butyricum* 2 Mol Wasserstoff pro Mol Säure entstehen, wird bestätigt.

Die eigene stöchiometrische Bilanzierung ähnelt sehr der von HEYNDRIKX ET AL. (1986), welche bei einer kontinuierlichen Fermentation mit *C. butyricum* die Entstehung von 0,77 Mol Buttersäure, 0,47 Mol Essigsäure und 2,3 Mol Wasserstoff aus 1 Mol Glucose nachweisen konnten. Nimmt man für die gemessene Gasproduktionsrate den aus der Stöchiometrie der beobachteten Gärung ermittelten theoretischen Wasserstoffanteil von 52,4 % an (siehe oben), so ist die während der kontinuierlichen Fermentation gemessene maximale Wasserstoffproduktionsrate, verglichen mit Werten aus der Literatur (YOKOI ET AL. 1997, 1998a), sehr gering. Berücksichtigt man jedoch die unterschiedlichen Durchflussraten, Zucker und eingesetzten Zuckerkonzentrationen, so ergibt sich in der vorliegenden Studie eine Wasserstoffproduktionsrate von 5,5 mmol l⁻¹ h⁻¹ (bzw. eine Gasproduktionsrate von 10,5 mmol l⁻¹ h⁻¹) bei einem theoretischen Hexoseeintrag von 3,9 mmol l⁻¹ h⁻¹. Verglichen mit

molaren Produktions- und Verbrauchsdaten, die aus Literaturdaten errechnet wurden, sind dies 12 % der Wasserstoffproduktionsrate bei 14 % des Hexoseeintrages von YOKOI ET AL. (1997). Durch eine hohe Durchflussrate erreichten YOKOI ET AL. (1997) trotz einer geringen Zuckerkonzentration von 0,5 % eine sehr hohe Wasserstoffproduktionsrate von $46 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (entspricht $1,15 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Durch die niedrige Zuckerkonzentration war die Säurekonzentration im Ablauf bei YOKOI ET AL. (1997) sehr gering. Da aber nur eine Optimierung der Wasserstoffproduktionsrate angestrebt wurde, war dies unerheblich und ermöglichte den Verzicht auf eine kostenintensive pH-Steuerung.

4.5 Wasserstoffproduktion mit Purpurbakterien

In der vorliegenden Studie wurden keine Versuche zur Wasserstoffproduktion durch Purpurbakterien unternommen. Aussagen über die Anwendbarkeit von Purpurbakterien im geplanten Verbundsystem (siehe Einleitung), bzw. zur Verwertbarkeit von Säuren aus der Clostridiengärung in der anoxygenen Fotosynthese von Purpurbakterien basieren auf Daten aus vorangegangenen Untersuchungen am Lehrstuhl für Biotechnologie an der RWTH Aachen (HACKETHAL 1999) und auf Literaturdaten.

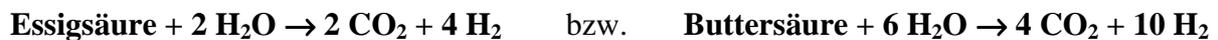
Die Fähigkeit von Purpurbakterien, organisches Material als Elektronendonatoren zu verwenden und im Licht aufgrund einer Nebenreaktion der Nitrogenase Wasserstoff zu produzieren, ist schon lange bekannt (ORMEROD ET AL. 1961). Zahllose Studien zum physiologischen Hintergrund und zur technischen Nutzung der Wasserstoffproduktion durch Purpurbakterien wurden in den letzten 35 Jahren durchgeführt und sind neben anderen Verfahren zur biologischen Wasserstoffgewinnung in verschiedenen Reviews zusammengefasst (NANDI UND SENGUPTA 1998, DAS UND VEZIROĞLU 2001, KOKU ET AL. 2002, LEVIN ET AL. 2004a, 2004b).

Abhängig vom verwendeten Organismus, dem gewählten Substrat, dem Reaktortyp und dem Prozessmaßstab reichen die in Studien über mehrere Tage gemessenen Gasproduktionsraten von z.B. $1,60 \text{ l l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, in einer kontinuierlichen Fermentation mit *Rhodospirillum rubrum* (HACKETHAL 1999) bis zu $15,12 \text{ l l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in einer kontinuierlichen Fermentation mit immobilisiertem *Rhodobacter sphaeroides* (TSYGANKOV ET AL. 1998). In den genannten Studien wurde vorwiegend Milchsäure als Wasserstoffdonator verwendet. Aber auch für die Umsetzung von Essig- und Buttersäure durch Purpurbakterien sind Wasserstoffproduktionsraten bis zu $0,60 \text{ l l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ beschrieben worden (BARBOSA ET AL. 2001). Die Möglichkeit der Umsetzung von Essig- und Buttersäure zu Wasserstoff bildet die

Grundlage für die geplante Kombination der Säureproduktion aus Abfallstoffen durch Clostridien mit der anoxygenen Fotosynthese durch Purpurbakterien zur Wasserstoffproduktion.

4.6 Verbundprozess aus anoxygener Fotosynthese und anaerober Gärung

In den eigenen Versuchen wurden bei der Vergärung von Molke durch *C. butyricum* DSMZ 10702 neben den Gasen ausschließlich Butter- und Essigsäure als Fermentationsprodukte nachgewiesen. Theoretisch könnte die Umsetzung von 1 Mol Essigsäure maximal zur Bildung von 4 Mol Wasserstoff führen. Bei einer vollständigen Umsetzung von einem Mol Buttersäure wären dies 10 Mol Wasserstoff (siehe unten).



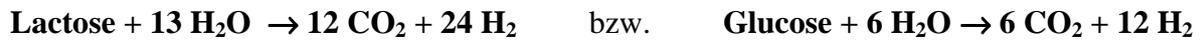
An diesen theoretischen Vorgaben orientieren sich die in der Literatur zu findenden Ausbeuten für die Umsetzung von kurzkettigen Säuren zu Wasserstoff durch Purpurbakterien (Tab. 17).

Tab. 17: Literaturdaten über Wasserstoffausbeuten bei der Umsetzung von Essigsäure und Buttersäure durch Purpurbakterien (Angaben in %).

Stamm	Essigsäure	Buttersäure	Author
<i>Rhodopseudomonas</i> sp. HCC 2037	73	8	BARBOSA ET AL. 2001
<i>Rhodopseudomonas</i> sp RV	40	75	MIYAKE ET AL. 1984
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> R 1	15	n. u.	BARBOSA ET AL. 2001
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> P4	70	n. u.	OH ET AL. 2004
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i> NCIB 8254	66	29	SEGERS UND VERSTRAETE 1983
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i> ATCC 2378	100	80	SEGERS UND VERSTRAETE 1983
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	33	n. u.	SHI UND YU 2005
<i>Rhodopseudomonas</i> (verschiedene Stämme)	50 - 67	54 - 73	MAO ET AL. 1986
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (in Mischkultur)	63	37	FANG ET AL. 2005
<i>Rhodobacter</i> (verschiedene Stämme)	3 - 55	44 - 67	MAO ET AL. 1986

Für die Umsetzung von Essigsäure zu Wasserstoff durch Purpurbakterien finden sich in der Literatur, je nach Stamm und Versuchsbedingungen, Ausbeuten zwischen 3 und 100 %. Die in der Literatur dokumentierten Ausbeuten bei der Umsetzung von Buttersäure zu Wasserstoff liegen zwischen 8 und 80 % (Tab. 17).

Bei einer vollständigen Umsetzung in einem Kombinationsprozess mit Clostridien und Purpurbakterien könnten aus einem Mol Lactose (bzw. Glucose) maximal 24 (bzw. 12) Mol Wasserstoff entstehen.



Die in den eigenen Versuchen zur Gas- und Säurebildung durch Clostridien erreichten 78 bzw. 88 % (siehe 4.4.6) der theoretischen Ausbeute und die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Ausbeuten für die Umsetzung der Säuren durch Purpurbakterien (Tab. 17) lassen jedoch eine geringere Menge an Wasserstoff erwarten. Tatsächlich wurden in bereits realisierten Kombinationsprozessen mit *C. butyricum* DSMZ 10702 (identisch mit IFO 13949) und *Rhodopseudomonas* sp. RV (MIYAKE ET AL. 1984) bzw. *Rhodobacter* sp. M-19 (YOKOI ET AL. 1998) geringere Wasserstoffausbeuten gemessen. In einem zweistufigen Prozess gewannen YOKOI ET AL. (1998) im Gärungsprozess 1,9 Mol Wasserstoff aus einem Mol verbrauchter Glucose und in der zeitlich nachfolgenden anoxygenen Fotosynthese zusätzlich 3,6 Mol pro anfänglich eingesetztem Mol Glucose. Somit erreichten diese in der Gärung, geht man von den gleichen Produktverhältnissen wie in den eigenen Versuchen aus, in der Gärung 86 % und im Gesamtprozess 46 % der stöchiometrisch maximalen Ausbeute an Wasserstoff.

YOKOI ET AL. (1998) konnten in Mischkulturen aus *C. butyricum* DSMZ 10702 und *Rhodobacter* sp. M-19 die Entstehung von insgesamt 6,6 Mol Wasserstoff aus einem Mol verbrauchter Glucose nachweisen und steigerten damit die Ausbeute des Gesamtprozesses auf 55 %. MIYAKE ET AL. (1984) erreichten in einer Mischkultur aus *C. butyricum* DSMZ 10702 und *Rhodopseudomonas* sp. RV mit 7 Mol Wasserstoff pro Mol verbrauchter Glucose eine Ausbeute von 58 %. Da die Mischkultur im Dunkeln jedoch nur 1,1 Mol Wasserstoff pro Mol verbrauchter Glucose produzierte, muss davon ausgegangen werden, dass die Verhältnisse der Zwischenprodukte (Säuren) von denen aus der eigenen Studie und von YOKOI ET AL. (1998) deutlich abweichen.

Genauere Angaben über die gemessenen maximalen Wasserstoffproduktionsraten fehlen bei YOKOI ET AL. (1998) und MIYAKE ET AL. (1984). Aus Einzelangaben über Versuchsdauer, Gesamtmenge an produziertem Wasserstoff und verwendeten Kulturgrößen lassen sich jedoch Wasserstoffproduktionsraten zwischen $0,29 \text{ l l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (MIYAKE ET AL. 1984) und $0,82 \text{ l l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (YOKOI ET AL. 1998) für die Mischkulturen aus Clostridien und Purpurbakterien berechnen.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Um die Kosten und die Kontaminationsgefahr in einer späteren Anwendung gering zu halten, wurde in dieser Arbeit bei den Versuchen zur Zuckerproduktion durch Grünalgen auf den Zusatz von Protein verzichtet. Auch wurden die Fotobioreaktoren nur einseitig mit Licht bestrahlt, wie es einer späteren Anwendung im Freiland entspricht. Dabei konnten über mehrere Tage Zuckerproduktionsraten von bis zu $476 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ gemessen werden. In Versuchen zur Cokultivierung von Algen und Hefen wurden sogar kurzzeitig Zuckerproduktionsraten von bis zu $1018 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ erreicht. Diese Zuckerproduktionsraten bleiben hinter denen von MÜCKE (1985) zurück. Dieser konnte unter Proteinzusatz und mit Reflektoren allseitig beleuchteten Fotobioreaktoren bei der Verwendung des gleichen Grünalgenstammes Maltoseproduktionsraten von bis $2500 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ dokumentieren. Betrachtet man jedoch die flächenbezogenen Zuckerproduktionsraten, so liegen die eigenen Messungen, aufgrund der geringeren beleuchteten Oberfläche im Verhältnis zum Gesamtvolumen des Fotobioreaktors, mit $744 \text{ mg m}^{-2}\text{h}^{-1}$ während der Cokultivierung von Algen und Hefen bei 89 % der Maltoseproduktion von MÜCKE (1985) mit $833 \text{ mg m}^{-2}\text{h}^{-1}$.

Die während der Cokultivierung von Algen und Hefen maximal gemessene Ethanolproduktionsrate lag bei $421 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bzw. $308 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, welches einer Energieträgerproduktion (berechnet mit H_i) von $11,4 \text{ kJ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bzw. $8,3 \text{ kJ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ entspricht. Diese Produktionsraten erscheinen auf den ersten Blick sehr gering, sie sind jedoch von ihrer Größenordnung mit den Produktionsraten anderer mikrobieller fotobiologischer Verfahren zur Energieträgerproduktion vergleichbar. So sind für die fotobiologische Herstellung von Wasserstoff mit Purpurbakterien in Fotobioreaktoren Wasserstoffproduktionsraten von z.B. $15,7 \text{ kJ l}^{-1}\text{d}^{-1}$ (HACKETHAL 1999) oder $18,3 \text{ kJ l}^{-1}\text{d}^{-1}$ (KIM ET AL. 1987) dokumentiert worden (berechnet mit H_i und SATP). Die höchste Wasserstoffproduktionsrate beim Einsatz von Purpurbakterien in Fotobioreaktoren wurde von TSYGANKOV ET AL. (1998) gemessen. Diese betrug $148 \text{ kJ l}^{-1}\text{d}^{-1}$ (berechnet mit H_i und SATP).

Der Vorteil von Wasserstoff als Biokraftstoff liegt auf der Hand: Bei der biologischen Produktion muss er nicht aufwendig aus dem Kulturmedium abgetrennt werden, sondern wird in Form eines Mischgases mit bereits sehr hohem Wasserstoffanteil direkt aufgefangen. Jedoch gibt es bereits bei der biologischen Ethanolproduktion neben der energieintensiven Destillation die Möglichkeit des Einsatzes von Membranverfahren (QURESHI UND MANDERSON 1995) zur Ethanolabtrennung. Weiter darf in diesem Zusammenhang nicht vergessen werden, dass der Einsatz von biologisch unter Normaldruck produziertem

Wasserstoff in Kraftfahrzeugen eine energieaufwendige Verdichtung des Gases erfordert, um die notwendigen Mengen des Energieträgers transportabel zu machen.

Generell ist festzuhalten, dass die Produktionsraten bei der fermentativen Umsetzung agrarwirtschaftlich gewonnener Biomasse, wie bei der Vergärung von Molke durch Clostridien oder Melasse durch Hefe, meist deutlich über den Produktionsraten von Mikroorganismen in Fotobioreaktoren liegen. Dies gilt wohl auch unter Berücksichtigung der vorherigen agrartechnischen Gewinnung der Biomasse, da die maximalen Biomasseproduktionsraten von Kulturpflanzen, wie Mais, über denen von Algen liegen (BECKER 1982). Jedoch besteht angesichts des wachsenden Energieproblems der Menschheit, trotz anderer vielversprechender Lösungswege, die Verpflichtung zur weiteren Erprobung einer direkten fotobiologischen Energieträgergewinnung mit Fotobioreaktoren. Vielleicht bietet die genetische Modifizierung der fotosynthetisch aktiven Mikroorganismen eine Perspektive zur Steigerung der Produktionsrate des Verbundsystems.

5 Zusammenfassung

In Einzeluntersuchungen sollten die Chancen, aber auch die möglichen Grenzen des geplanten fotosynthetisch-fermentativen Verbundsystems, bestehend aus vier verschiedenen Organismenotypen, Grünalgen, Hefen, Clostridien und Purpurbakterien, aufgezeigt werden.

Ergänzend zu den Ergebnissen von MÜCKE (1985) konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die Grünalgenstämme *Chlorella* sp. SAG 241.80 und *Chlorella mirabilis* SAG 211-11r in Fotobioreaktoren unter Laborbedingungen wachsen und Maltose und Glucose produzieren. Ein Proteinzusatz zum Medium war nicht notwendig, aber auf den Zusatz von Vitaminen konnte nicht verzichtet werden. *Ch.* sp. SAG 241.80 zeigte über mehrere Tage Wachstumsraten von bis zu $1,08 \text{ d}^{-1}$ und Zuckerproduktionsraten von bis zu $476 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bei der Kultivierung unter Dauerbeleuchtung in Fotobioreaktoren mit einem Verhältnis aus bestrahlter Reaktoroberfläche und Kulturvolumen von $0,57 \text{ cm}^{-1}$. Bei der Kultivierung in Fotobioreaktoren mit Oberfläche/Volumen-Verhältnissen von $0,24 \text{ cm}^{-1}$ waren dies unter sonst gleichen Bedingungen lediglich $0,91 \text{ d}^{-1}$ bzw. $258 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

In nicht wachsenden Kulturen konnten Biomasse-spezifische Zuckerproduktionsraten von $180 \text{ mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, bezogen auf das Trockengewicht, gemessen werden. Eine Immobilisierung von *Ch.* sp. SAG 241.80 in Alginat führte bei der Kultivierung unter Stickstoffmangel zu einer erhöhten Langzeitstabilität der Zuckerproduktion. Ein Abschalten der Belüftung führte in der Algenkultur in kürzester Zeit zu einer Sauerstoffkonzentration, welche die Luftsättigung um ein Vielfaches überschritt.

Unter anaeroben Bedingungen konnte kein Unterschied im Wachstum und in der Gäraktivität von atmungsdefekten Mutanten und Wildtypen von *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden. Unter aeroben Bedingungen blieben die Wildtypen in ihrer Gäraktivität jedoch weit hinter den atmungsdefekten Stämmen zurück. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion verschiedener Atmungskettenenzym-codierender Kerngene die Atmungsaktivität von *S. cerevisiae* unterschiedlich stark einschränkt. Durch den Verlust der Atmungsfähigkeit wurde bei mehreren Stämmen auch unter aeroben Bedingungen eine atmungsabhängige Nutzung verschiedener Zucker deutlich.

Auch um ein Vielfaches der Luftsättigung erhöhte Sauerstoffkonzentrationen führten bei atmungsdefekten Mutanten zu keiner direkten Beeinträchtigung der Gäraktivität, aber zu einer Verringerung der Langzeitstabilität in nicht wachsenden Kulturen. Dies konnte jedoch durch

Immobilisierung in Alginat verringert werden. Die Begasung von wachsenden Hefekulturen mit Sauerstoff an Stelle von Luft führte bei den Wildtypen zu einem erhöhten Zellertrag bei gleichbleibender Wachstumsrate. Bei atmungsdefekten Mutanten führte sie zu sinkenden Wachstumsraten, wobei der Zellertrag unbeeinflusst blieb.

In autotrophen Mischkulturen aus Grünalgen und Hefen konnten in Fotobioreaktoren unter Laborbedingungen kurzzeitig Zuckerproduktionsraten von bis zu $1,02 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und Ethanolbildungsraten bis zu $421 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gemessen werden. Dies entspricht einer flächenbezogenen Ethanolproduktion von $308 \text{ mg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

Die Säurebildung aus reiner Molke war mit *Clostridium saccharobutylicum* und *Clostridium butyricum* nur sehr eingeschränkt möglich. Unter Zusatz von Hefeextrakt konnten jedoch Produktbildungsraten von bis $0,30 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an Buttersäure, $0,16 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an Essigsäure und $0,49 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an Gas gemessen werden. Das aufgefangene Gas hatte einen Wasserstoffgehalt von bis zu 67 %. Die Keimung von immobilisierten Clostridiensporen gelang problemlos mit verschiedenen Matrices. In einer kontinuierlichen Fermentation wurden mit immobilisiertem *C. butyricum* über 144 Stunden ein stets gleichbleibendes Produktverhältnis bei der Vergärung von Molke gemessen. Aus 1 Mol Lactose entstanden dabei 1,4 Mol Buttersäure, 0,7 Mol Essigsäure und 6,9 Mol Gas. Butter- und Essigsäure sind, laut Literaturdaten, problemlos als Elektronendonator zur Wasserstoffproduktion in der anoxygenen Photosynthese von Purpurbakterien einsetzbar.

6 Literatur

AKKERMAN I, JANSSEN M, ROCHA J, WIJFFELS R H (2002): Biological hydrogen production: chemical efficiency and bioreactor design. *Int. J. Hydrogen Energy* 27: 1195-1208

ALAM S, STEVENS D, BAJPAI R (1988): Production of butyric acid by batch fermentation of cheese whey with *Clostridium beijerinckii*. *J. Ind. Microbiol.* 2: 359-364

ALEXANDER N J, DETROY R W (1983): Alcohol production by mitochondrial mutants and wild type. *Biotechnol. Lett.* 5: 165-168

ANONYM (2002): GM well-to-wheel analysis of energy use and greenhouse gas emissions of advanced fuel/vehicle systems – a european study. L-B-Systemtechnik GmbH, Report

ANONYM (2004): Steinkohle 2004 – Sichere Energie: wichtiger denn je. Gesamtverband des deutschen Steinkohlenbergbaus, Jahresbericht

ASADA Y, MIYAKE J (1999): Photobiological hydrogen production. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 1-6

BACILA M, HORII J (1979): Improving the efficiency of alcohol production with respiration-deficient yeast mutants. *TIBS* 9: 59-61

BARBOSA M J, ROCHA J M S, TRAMPER J, WIJFFELS R H (2001): Acetate as carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *J. Biotechnol.* 85: 25-33

BECKER E W (1982): Ernährung, Wachstumsleistung, Ertrag und Konkurrenzfähigkeit von Algenmassenkulturen. *Kali-Briefe (Büntehof)* 16: 249-269

BELL P J L, HIGGINS V J, ATTFIELD P V (2001): Comparison of fermentative capacities of industrial baking and wild-type yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in different sugar media. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 224-229

BELO I, PINHEIRO R, MOTA M (2003): Fed-batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in a hyperbaric bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 19: 665-671

BRACHMANN C B, DAVIES A, COST G J, CAPUTO E, LI J, HIETER P, BOEKE J D (1998): Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* BY4741: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14: 115-132

BRÉCHIGNAC F, SCHILLER P (1992): Pilot CELSS based on a maltose excreting *Chlorella*: Concept and overview on the technological developments. *Adv. Space Res.* 12: 533-536

BRÉCHIGNAC F, WOLF L (1994a): “Symbiose” system for microgravity bioregenerative support of experiments. *Adv. Space Res.* 14: 1179-1188

BRÉCHIGNAC F, WOLF L (1994b): “Symbiose”: a precursor model tested for integrated bioregeneration in space, preliminary experiments with atmosphere closure. In: Proceedings 5th Eur. Symp. on “Life Science Research in Space”. ESA sp-366: 245-248

BROWN J A, NIELSEN P J (1974): Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic chlorellae to *Paramecium bursaria*. Protzool. 21: 569-570

BROWN S W, SUGDEN D A, OLIVER S G (1984): Ethanol production and tolerance in grande and petite yeasts. J. Chem. Tech. Biotechnol. 34B: 116-120

CAMPELO A F, BELO I (2004): Fermentative capacity of baker’s yeast exposed to hyperbaric stress. Biotechnol. Lett. 26: 1237-1240

CARLSON M, OSMOND B C, BOTSTEIN D (1981): Mutants of yeast defective in sucrose utilization. Genetics 98: 25-40

CARPETIS C (2000): Globale Umweltvorteile bei Nutzung von Elektroantrieben mit Brennstoffzellen und/oder Batterien im Vergleich zu Antrieben mit Verbrennungsmotor. Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e. V., DLR-IB-200044417400

CERNICHIARI E, MUSCATINE L, SMITH D C (1969): Maltose excretion by the symbiotic algae of *Hydra viridis*. P. Roy. Soc. Lond. B. Bio. 173: 557-576

CHEN X J, CLARK-WALKER G D (1999): The petite mutation in yeast: 50 years on. Int. Rev. Cytol. 194: 197-238

CHETSUMON A, MIYAMOTO K, HIRATA K, MIURA Y, IKUTA Y, HAMASAKI A (1993): Factors affecting antibiotic production in bioreactors with immobilized algal cells. Appl. Biochem. Biotech. 39/40: 573-586

CHUM H L, OVEREND R P (2002): Biomass and renewable fuels. Fuel Processing Technol. 71: 187-195

CUMSKY M G, KO C, TRUEBLOOD C E, POYTON R O (1985): Two nonidentical forms of subunit V are functional in yeast chromosome c oxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2235-2239

DAINTY A L, GOULDING K H, ROBINSON P K, SIMPKINS I, TREVAN M D (1986): Stability of alginate-immobilized algal cells. Biotechnol. Bioeng. 28: 210-216

DAS D, VEZIROĞLU T N (2001): Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. Int. J. Hydrogen Energ. 26: 13-28

ENNIS B M, MADDOX I S (1987): The effect of pH and lactose concentration on solvent production from whey permeate using *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnol. Bioeng. 29: 329-334

EPHRUSSI B, HOTTINGUER H, CHIMENES A-M (1949a): Action de l’acriflavine sur les levures. I. La mutation « petite colonie ». Ann. I. Pasteur 76: 351-367

EPHRUSSI B, HOTTINGUER H, TAVLITZKI J (1949b): Action de l'acriflavine sur les levures. II. Etude génétique du mutant « petite colonie ». Ann. I. Pasteur 76: 419-450

ESSER K, SCHMIDT U, STAHL U (1982): Ethanol and biomass production of wild strains and respiratory deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic and aerobic conditions. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16: 161-164

EVANS I H, WILKIE D (1976): Mitochondrial factors in the utilization of sugars in *Saccharomyces cerevisiae*. Genet. Res. Camb. 27: 89-93

FANG H H P, LIU H, ZHANG T (2005): Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. Int. J. Hydrogen Energ. 30: 785-793

FEUERMANN M, CHARBONNEL L, DE MONTIGNY J, BLOCH J-C, POTIER S, SOUCIET J-L (1995) : Sequence of a 9.8 kb segment of yeast chromosome II including the three genes of the MAL3 locus and three unidentified open reading frames. Yeast 11: 667-672

FISCHER A, MEINDL D, LOOS E (1989): Glucose excretion by the symbiotic *Chlorella* of *Spongilla fluviatilis*. Planta 179: 251-256

FOGG G E (1966): The extracellular products of algae. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 4: 195-212

FRICK C, SCHÜGERL K (1986): Continuous acetone-butanol production with free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 186-193

FUKUHARA H (2003): Minireview: The Kluver effect revisited. FEMS Yeast Res. 3: 327-331

GILLE G, SIGLER K (1995): Oxidative stress and living cells. Folia Microbiol. 40: 131-152

GOLDEMBERG J, COELHO S T, NASTARI P M, LUCON O (2004): Ethanol learning curve – the Brazilian experience. Biomass Bioenergy 26: 301-304

GOLDRING E S, GROSSMAN L I, KRUPNICK D, CRYER D R, MARMUR J (1970): The petite mutation in yeast: Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. J. Mol. Biol. 52: 323-335

HACKETHAL M (1999): Physiologische Aspekte der photobiologischen Wasserstoffgewinnung mit Purpurbakterien unter Berücksichtigung eines Einsatzes im technischen Maßstab. Dissertation, RWTH-Aachen

HAMPSEY M (1997): A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 13: 1099-1133

HANAGATA N, TAKEUCHI T, FUKUJU Y, BARNES D J, KARUBE I (1992): Tolerance of microalgae to high CO₂ and high temperature. Phytochemistry 31: 3345-3348

HARMAN D (1988): Free radicals in aging. Mol. Cell. Biochem. 84: 155-161

HARTMEIER W (1972): Untersuchungen über die Kinetik der mikrobiellen Sauerstoff-Aufnahme und den Einfluss des Sauerstoff-Partialdruckes auf den Stoffwechsel von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, TU-Berlin

HARTMEIER W, ISMAR P (2004): Bioenergy from sunlight, CO₂ and other sources: concept of an integrated process using algae, bacteria and yeasts. In: Van Swaaij, Fjällström, Helm, Grassi (eds.) 2nd World Biomass Conference, Rome, Vol. 2: 1574-1576

HEYNDRIX M, VANSTEENBEECK A, DE VOS P, DE LEY J, (1986): Hydrogen gas production from continuous fermentation of glucose in a minimal medium with *Clostridium butyricum* LMG 1213t1. System. Appl. Microbiol. 8: 239-244

HIRANO A, UEDA R, HIRAYAMA S, OGUSHI Y (1997): CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. Energy 22: 137-142

HIRAYAMA S, UEDA R, OGUSHI Y, HIRANO A, SAMEJIMA Y, HON-NAMI K, KUNITO S (1998): Ethanol production from carbon dioxide by fermentative microalgae. Stud. Surf. Sci. Catal. 114: 657-660

HOLDEN M (1965): Chlorophylls. In: Goodwin (eds) Chemistry and biochemistry of plant pigments, Academic Press, London, pp. 461-481

HUTTER A, OLIVER S G (1998): Ethanol production using nuclear petite yeast mutants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 511-516

JOHANSSON M, SJÖSTRÖM J-E (1984): Ethanol and glycerol production under aerobic conditions by wild-type, respiratory-deficient mutants and fusion product of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 105-110

JONES D T, KEIS S (1995): Origins and relationships of industrial solvent-producing clostridial strains. FEMS Microbiol. Rev. 17:223-232

JUNGERMANN K, THAUER P K, LEIMENSTOLL G, DECKER K (1973): Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductase in saccharolytic clostridia. Biochim. Biophys. Acta 305: 268-280

KARUBE I, URANO N, MATSUNAGA T, SUZUKI S (1982): Hydrogen production from glucose by immobilized growing cells of *Clostridium butyricum*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16: 5-9

KEIS S, SHAHEEN R, JONES D T (2001): Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii* and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Micr. 51: 2095-2103

KESSLER E, KAUER G, RAHAT M (1991): Excretion of sugars by *Chlorella* species capable and incapable of symbiosis with *Hydra viridis*. Bot. Acta 104: 58-63

KIM J S, ITO K, IZAKI K, TAKAHASHI H (1987): Production of molecular hydrogen by a continuous culture under laboratory conditions. Agric. Biol. Chem. 51: 2591-2593

KOKU H, EROĞLU I, GÜNDÜZ U, YÜCEL M, TÜRKER L (2002): Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. Int. J. Hydrogen Energ. 27: 1315-1329

KROUWEL P G, GROOT W J, KOSSEN N W F, VAN DER LAAN W F M (1983): Continuous isopropanol-butanol-ethanol fermentation by immobilized *Clostridium beijerinckii* cells in a packed bed fermenter. Enzyme Microb. Technol. 5: 46-54

KROUWEL P G, VAN DER LAAN W F M, KOSSEN N W F (1981): A method for starting a fermentor with immobilized spores of the genus *Clostridium* aseptically. Biotechnol. Lett. 3: 158-159

KUHL A (1962): Zur Physiologie der Speicherung kondensierter anorganischer Phosphate in Chlorella. In: Deutsche Botanische Gesellschaft (eds) Beiträge zur Physiologie und Morphologie der Algen, Fischer Verlag, Stuttgart, pp.157-166

LAI M-C, TRAXLER R W (1994): A coupled two-stage continuous fermentation for solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. Enzyme Microb. Technol. 16: 1021-1025

LARGIER S T, LONG S, SANTANGELO J D, JONES D T, WOODS D R (1985): Immobilized *Clostridium acetobutylicum* P262 Mutants for solvent production. Appl. Environ. Microbiol. 50: 477-481

LEVIN D B (2004b): Letter to the editor. Re: Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application - Erratum. Int. J. Hydrogen Energ. 29: 1425-1426

LEVIN D B, PITT L, LOVE M (2004a): Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. Int. J. Hydrogen Energ. 29: 173-185

LONG S, JONES D T, WOODS D R (1983): Sporulation of *Clostridium acetobutylicum* P262 in a defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1389-1393

LONZ T G, MOREIRA A R (1980): Economic evaluation of the acetone-butanol fermentation. Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev. 19: 478-483

MAHLER H R, WILKIE D (1978): Mitochondrial control of sugar utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. Plasmid 1: 125-133

MALLUTA E F, DECKER P, STAMBUK B U (2000): The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Basic Microbiol. 40: 199-205

MAO X Y, MIYAKE J, KAWAMURA S (1986): Screening photosynthetic bacteria for hydrogen production from organic acids. J. Ferment. Technol. 64: 245-249

MARCOVICH H (1951): Action de l'acri flavine sur les levures. VIII. Détermination du composant actif et étude de l'euflavine. Ann. I. Pasteur 81: 452-468

MASOOD E (1997): Kyoto agreement creates new agenda for climate research. Nature 390: 649-650

MICHEL-SAVIN D, MARCHAL R, VANDECASTEELE J P (1990): Control of the selectivity of butyric acid production and improvement of fermentation performance with *Clostridium tyrobutyricum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 387-392

MIYAKE A, KAWAMURA S, SATO A (1985): Production of hydrogen by microorganism. Patent. JP 6007528 AA

MIYAKE J, MAO X Y, KAWAMURA S (1984): Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. J. Ferment. Technol 62: 531-535

MONOT F, MARTIN J R, PETITDEMANGE H, GAY R (1982): Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. Environ. Microbiol. 44: 1318-1324

MONOT F, MARTIN J-R, PETITDEMANGE H, GAY R (1982): Acetone and butanol production by *Clostridium butyricum* in a synthetic medium. Appl. Environ. Microbiol. 44: 1318-1324

MOULIN G, BOZE H, GALZY P (1981): A comparative study of the inhibitory effect of ethanol and substrates on the fermentation rate of parent and a respiratory-deficient mutant. Biotechnol. Lett. 3: 351-356

MOULIN G, BOZE H, GALZY P (1982): Utilization of a respiratory-deficient mutant for alcohol production. J. Ferment. Technol. 60: 25-29

MÜCKE I (1985): Basisversuche zur Ethanolproduktion aus Kohlendioxid und Licht. Dissertation, RWTH-Aachen

MUSCATINE L, KARAKASHIAN S J, KARAKASHIAN M W (1967): Soluble extracellular products of algae symbiotic with a ciliate, a sponge and a mutant *Hydra*. Comp. Biochem. Physiol. 20: 1-12

NAGLEY P, LINNANE A W (1970): Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39: 989-996

NANDI R, SENGUPTA S (1998): Microbial production of hydrogen: an overview. Crit. Rev. Microbiol. 24: 61-84

NOHL H, KOZLOV A V, GILLE L, STANIEK K (2003): Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. Biochem. Soc. T. 31: 1308-1311

ODUM E P (1983): Grundlagen der Ökologie. Thieme Verlag Stuttgart

OH Y-K, SEOL E-H, KIM M-S, PARK S (2004): Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4. Int. J. Hydrogen Energ. 29: 1115-1121

ONKEN U, LIEFKE E (1990): Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 40: 137-169

ORMEROD J G, ORMEROD K S, GEST H (1961): Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria, relationships with nitrogen metabolism. Arch. Biochem. Biophys. 94: 449-463

PARK C H, OKOS M R, WANKAT P C (1990): Characterization of an immobilized cell, trickle bed reactor during long term butanol (ABE) fermentation. Biotechnol. Bioeng. 36: 207-217

PINHEIRO R, BELO I, MOTA M (1997): Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* under increased air and oxygen pressures. Biotechnol. Lett. 19: 703-708

PULZ O (2001): Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 287-293

QURESHI N, MADDOX I S (1988): Reactor design for the ABE fermentation using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar. Bioprocess Eng. 3: 69-72

QURESHI N, MANDERSON G J (1995): Bioconversion of renewable resources into ethanol: an economic evaluation of selected hydrolysis, fermentation and membrane technologies. Energy Sources 17: 241-265

QURESHI N, SCHRIPSEMA J, LIENHARDT J, BLASCHEK H P (2000): Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA 101 immobilized by adsorption onto brick. World J. Microb. Biot. 16: 377-382

REISSER W (1976A): Die stoffwechselphysiologische Beziehung zwischen *Paramecium bursaria* Ehrbg. und *Chlorella spec.* in der *Paramecium bursaria* – Symbiose I. Der Stickstoff- und der Kohlenstoff- Stoffwechsel. Arch. Microbiol. 107: 357-360

REISSER W. (1976B): Die stoffwechselphysiologische Beziehung zwischen *Paramecium bursaria* Ehrbg. und *Chlorella spec.* in der *Paramecium bursaria* – Symbiose II. Symbiose spezifische Merkmale der Stoffwechselphysiologie und der Cytologie des Symbioseverbandes und ihre Regulation. Arch. Microbiol. 111: 161-170

ROBINSON P K, MAK A L, TREVAN M D (1986): Immobilized algae: a review. Process Biochem. 21: 122-127

SCHLEGEL H G, ZABOROSCH C (1992): Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag Stuttgart

SEGERS L, VERSTRAETE W (1983): Conversion of organic acids to H₂ by *Rhodospirillaceae* grown with glutamate or dinitrogen as nitrogen source. Biotechnol. Bioeng. 25: 2843-2853

SHERMAN F (1963): Respiratory deficient mutants of yeast I. Genetics 48: 375-385

SHERMAN F, EPHRUSSI B (1962): The relationship between respiratory deficiency and suppressiveness in yeast as determined with segregational mutants. Genetics 47: 695-700

SHERMAN F, SLONIMSKI P P (1964): Respiratory deficient mutants of yeast II Biochemistry. Biochim. Biophys. Acta 90: 1-15

SHI X-Y, YU H-Q (2005): Response surface analysis on the effect of cell concentration and light intensity on hydrogen production by *Rhodospseudomonas capsulata*. *Process Biochem.* 40: 2475-2481

SLONIMSKI P P (1949): Action de l'acriflavine sur les levures. IV. Mode d'utilisation du glucose par les mutants « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur* 76: 510-530

SLONIMSKI P P, EPHRUSSI B (1949): Action de l'acriflavine sur les levures. V. Le système des cytochromes des mutants « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur* 77: 47-63

SLONIMSKI P P, PERRODIN G, CROFT J H (1968): Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: Complete transformation of cells into respiratory deficient nonchromosomal "petites". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30: 232-239

SPENCER J F T, SPENCER D M, MILLER R (1983): Inability of petite mutants of industrial yeasts to utilize various sugars, and a comparison with the ability of the parent strains to ferment the same sugars microaerophilically. *Z. Naturforsch.* 38c: 405-407

SPIVEY M J (1978): The acetone/butanol/ethanol fermentation. *Process Biochem.* 13: 2-5

SUNG K-D, LEE J-S, SHIN C-S, PARK S-C, CHOI M-J (1999): CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. *Bioresource Technol.* 68: 269-273

TAUSSKY H H, SHORR E, (1953): A microcolorimeter method for the determination of inorganic phosphorous. *J. Biol. Chem.* 202: 675-685

TAVLITZKI J (1949): Action de l'acriflavine sur les levures. III. Etude de la croissance des mutants "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur* 76: 498-509

TRAMM-WERNER S, WENG M, HARTMEIER W, MODIGELL M (1996): Photobiological hydrogen production using immobilized rhodobacteria: biofilm formation in a loop reactor. In: Chartiers, Ferrero, Henius, Hultberg, Sachau, Wiinblad (eds) *Biomass for Energy and the Environment* (3), Pergamon, Oxford: 1674-1679.

TRENCH R K (1979): The cell biology of plant-animal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30: 485-531

TREVAN M D, MAK A L (1988): Immobilized algae and their potential for use as biocatalysts. *TIBTECH* 6: 68-73

TSYGANKOV A A, FEDOROV A S, TALIPOVA I V, LAURINAVICHENE T V, MIYAKE J, GOGOTOV I N (1998): Use of immobilized phototrophic microorganisms for waste water treatment and simultaneous production of hydrogen. *Appl. Biochem. Microbiol.* 34: 398-402

VAN ANDEL J G, ZOUTBERG G R, CRABBENDAM P M, BREURE A M (1985): Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under self generated gas atmosphere in chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 21-26

VAN DIJKEN J P, VAN DEN BOSCH J J, HERMANS L, DE MIRANDA R, SCHEFFERS W A (1986): Alcoholic fermentation by "non-fermenting" yeasts. *Yeast* 2: 123-127

VANDÁK D, TELGARSÝ M, ŠTURDIK E (1995b): Influence of growth factor supplements on butyric acid production from sucrose by *Clostridium butyricum*. Folia Microbiol. 40: 669-672

VANDÁK D, TOMÁŠKA M, ZIGOVÁ J, ŠTURDIK E (1995a): Short note: Effect of growth supplements and whey pretreatment on butyric acid production by *Clostridium butyricum*. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 363

WATANABE Y, HALL D O (1996): Photosynthetic CO₂ conversion technologies using a photobioreactor incorporating microalgae – energy and material balances. Energ. Convers. Manage. 37: 1321–1326

WATANABE Y., OHMURA N., SAIKI H. (1992): Isolation and determination of cultural characteristics of microalgae, which functions under CO₂ enriched atmosphere. Energy Conversion Management 33: 545-552

WATSON K, ARTHUR H, BLAKEY M (1980): Biochemical correlations among the thermophilic enteric yeasts *Torulopsis bovina*, *Torulopsis pintolopesii*, *Saccharomyces telluris*, and *Candida slooffii*. J. Bacteriol. 143: 693-702

WIEGEL J, KUK S-U, KOHRING G W (1989): *Clostridium thermobutyricum* sp. nov., a moderate thermophile isolated from cellulolytic culture, that produces butyrate as the major product. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 199-204

WILKINSON S R, YOUNG M, GOODACRE R, MORRIS J G, FARROW J A E, COLLINS M D (1995): Phenotypic and genotypic differences between certain strains of *Clostridium acetobutylicum*. FEMS Microbiol. Lett. 125: 199-204

WILLIAMSON D H, FENNEL D J (1979): Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain “DAPI”. Methods Enzymol. 56: 728-733

WINZELER E A, LEE B, MCCUSKER J H, DAVIS R W (1999): Whole genome genetic-typing in yeast using high-density oligonucleotide arrays. Parasitology 118: 73-80

WINZELER E A, SHOEMAKER D D, ASTROMOFF A, LIANG H, ANDERSON K, ANDRE B, BANGHAM R, BENITO R, BOEKE J D, BUSSEY H, CHU A M, CONNELLY C, DAVIS K, DIETRICH F, WHELEN DOW S, EL BAKKOURY M, FOURY F, FRIEND S H, GENTALLEN E, GIAEVER G, HEGEMANN J H, JONES T, LAUB M, LIAO H, LIEBUNDGUTH N, LOCKHART D J, LUCAU-DANILA A, LUSSIER M, M'RABET N, MENARD P, MITTMANN M, PAI C, REBISCHUNG C, REVUELTA J L, RILES L, ROBERTS C J, ROSS-MACDONALD P, SCHERENS B, SNYDER M, SOOKHAI-MAHADEO S, STORMS R K, VÉRONNEAU S, VOET M, VOLCKAERT G, WARD T R, WYSOCKI R, YEN G S, YU K, ZIMMERMANN K, PHILIPPSSEN P, JOHNSTON M, DAVIS R W (1999): Functional Characterization of the *S. cerevisiae* genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. Science 285: 901-906

WOLF L (1996): Bioregeneration in space. Adv. Space Biol. Med. 5: 341-356

WOLF L (1997): Bioregeneration with maltose excreting Chlorella: System concept, technological development, and experiments. Adv. Space Biol. Med. 6: 255-274

YOKOI H, MAEDA Y, HIROSE J, HAYASHI S, TAKASAKI Y (1997): H₂ production by immobilized cells of *Clostridium butyricum* on porous glass beads. *Biotechnol. Tech.* 11: 431-433

YOKOI H, MORI S, HIROSE J, HAYASHI S, TAKASAKI Y (1998b): H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter* sp. M-19. *Biotechnol. Lett.* 20: 895-899

YOKOI H, TOKUSHIGE T, HIROSE J, HAYASHI S, TAKASAKI Y (1998a): H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol. Lett.* 20: 143-147

ZIESENISZ E, REISSER W, WIESSNER W (1981): Evidence of de novo synthesis of maltose excreted by the endosymbiotic *Chlorella* from *Paramecium bursaria*. *Planta* 153: 481-485

ZIGOVÁ J, ŠTURDIK E, VANDÁK D, SCHLOSSER Š (1999): Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction. *Proc. Biochem.* 34: 835-84

7 Abkürzungen

<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
<i>Ch.</i>	<i>Chlorella</i>
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EM	Stickstofffreies Exkretionsmedium (Tab. 4)
H _i	Heizwert (früher bezeichnet als unterer Heizwert H _u)
HPLC	high performance liquid chromatography
JP	Japan
μ _{max}	maximale Wachstumsrate
n.u.	„nicht untersucht“
NI	Niederlande
NM	Stickstoffhaltiges Mineralsalzmedium (Tab. 4)
NMV	NM mit Vitaminzusatz (Tab. 4)
NMVP	NM mit Vitamin- u. Peptonzusatz (Tab. 4)
OD 620	Optische Dichte bei 620 nm
OD 660	Optische Dichte bei 660 nm
p.a.	“pro analysi”
PEG	Polyethylen-Glycol
PVA	Polyvinyl-Alkohol
RCM	reinforced clostridial medium
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SAG	Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen
SATP	standard ambient temperature and pressure (25 °C, 1 bar)
sp.	species (lat.)
TW	Taiwan
US	Vereinigte Staaten von Amerika
WT	Wildtyp
YE	Hefeextrakt

Danksagung

Herrn Professor Dr. W. Hartmeier danke ich für die Überlassung des Themas und seine mir stets gewährte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. K. Wolf danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Wolfgang Gloy danke ich für die hervorragende technische Assistenz und Sebastian Scheer für die engagierte Mitarbeit.

Frau Dr. M. Reiss, Tanja Hischer, Kathrin Schmale, Uli Wilkening und ganz besonders Uwe Jäntges danke ich für die fachliche und moralische Unterstützung während meiner Promotion.

Für die stete Hilfsbereitschaft danke ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhles für Biotechnologie und der mechanischen Werkstatt der biologischen Institute.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Lebensgefährtin Nele, ohne deren Unterstützung mein Bildungs- und beruflicher Werdegang in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Peer Ismar

geboren am 05/08/1975 in Saarbrücken

seit 10/2001

Wissenschaftliche Mitarbeit und Promotion am
Lehrstuhl für Biotechnologie an der RWTH Aachen

08/2001

Diplom-Hauptprüfung im Fach Biologie

10/2000 – 04/2001

Auslandspraktikum am TNO Nutrition and Food
Research Institute (Zeist, NL)

04/1998 – 08/2001

Hauptstudium an der RWTH Aachen

04/1998

Diplom-Vorprüfung im Fach Biologie

10/1995 – 04/1998

Grundstudium an der Universität des Saarlandes

08/1994 – 10/1995

Zivildienst

06/1994

Abitur

1991 – 1994

Besuch des Wirtschaftswissenschaftlichen Gymnasiums
in Saarbrücken

1985 – 1991

Besuch des Gymnasiums am Rotenbühl in Saarbrücken

1981 – 1985

Besuch der Grundschule Saarbrücken-Scheidt

Aachen, im Dezember 2005