

Schlussbericht

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Thema:

Bioökonomie International 2019: BURPED - Wasserstoffbildung unter Verwendung rekombinanter *Parageobacillus*: Prozessoptimierung und Aufarbeitung

Engl. Titel:

Bioökonomie International 2019: BURPED – Biohydrogenesis Utilising Recombinant *Parageobacillus*, process Engineering and Downstream implementation.

Zuwendungsempfänger:

Karlsruher Institut für Technologie KIT- Technische Biologie

Förderkennzeichen:

031B1056

Laufzeit:

01.10.2020 – 31.05.2024

Monat der Erstellung:

01/2025

Autor

Dr. rer. Nat. Anke Neumann, Magda Ardilla

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen **031B1056** gefördert.

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/Autor.“

Inhaltsverzeichnis

I. Kurzbericht	3
1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie wissenschaftlichen und technischem Standes, an den angeknüpft wurde	3
2. die wesentlichen Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen.....	4
II. Eingehende Darstellung	5
1. Der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit der Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele	5
1.1 Batch- und halbkontinuierliche Fermentation mit <i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> DSM 6285	6
1.2 Die Auswirkungen von Synthesegas-Einsatzstoffen und Sauerstoff-Störungen auf die Wasserstoffproduktion durch <i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i>	11
1.3 Bewertung von Synthesegasen als Substrat für die H ₂ -Produktion mit <i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> DSM 6285.....	15
1.4 Wirkung unterschiedlicher Partialdrücke auf die H ₂ -Produktion mit <i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> DSM 6285.....	18
1.5 Molekularbiologische Arbeiten, die aber noch zu keinem publizierbaren Ergebnis geführt haben:	23
1.6 Genomische Untersuchung der Wasserstoffbildung in <i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i>	23
1.7 Referenzen	28
1.8 Publikationen aus dem Projekt zusammen mit den südafrikanischen Partnern:.....	29

Teil I. Kurzbericht

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung

Wasserstoffgas ist der Schlüssel zu vielen industriellen Prozessen und wird als alternativer Energieträger bevorzugt. Die derzeitigen industriellen Ansätze für die H₂-Produktion sind teuer, nicht nachhaltig und oft umweltschädlich. Biologische Strategien können diese Probleme umgehen. Ein Ansatz besteht im Einsatz anaerober, Kohlenmonoxid oxidierender, wasserstoffbildender Bakterien, die CO in Synthesegas (Syngas) und Abgasen über die Wasser-Gas-Shift (WGS)-Reaktion unter Verwendung des CO-Dehydrogenase-Hydrogenase-Enzymkomplexes (CODH-Hyd) effektiv in H₂ umwandeln. In Zusammenarbeit mit dem langjährigen Projektpartner Prof. Pieter De Maayer von der Witwatersrand-Universität in Südafrika wurde gezeigt, dass der thermophile *Parageobacillus thermoglucosidasius* die WGS-Reaktion nutzt, um H₂ unter äquimolaren Raten des CO-Verbrauchs zu produzieren. Dieses Bakterium ist ein fakultativer Anaerobier und als solcher ein idealer Kandidat für die kommerzielle Wasserstoffproduktion, der ohne die vorherige Entfernung von Restsauerstoff im Substratgas auskommt. Dies ist eine derzeitige Machbarkeitsbeschränkung für Scale-up-Bioreaktoren, die strikt anaerobe CO-oxidierende Wasserstoffbildner verwenden. Wir haben einen Stamm mit guten Wasserstoff-bildenden Eigenschaften identifiziert und die Betriebsparametern (pH-Wert, Gaszusammensetzung, Medium usw.) in Flaschenversuchen optimiert, was zu einer weiteren Erhöhung der Ausbeute und einer reduzierten prähydrogenogenen Verzögerungsphase führt. Das vorgeschlagene Projekt zielt auf die weitere Charakterisierung, Optimierung und Nutzung der Wasserstoff-bildenden Kapazität von *P. thermoglucosidasius* ab. Es soll ein Verfahren zur kontinuierlichen Produktion von Wasserstoff auf Basis von CO-haltigen Abgasen mit genetisch optimierten Stämmen sowie eine zweiphasige mikrobielle Brennstoffzelle entwickelt werden.

2. die wesentlichen Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Die Auswertung des semi-kontinuierlichen Modus mit Fütterung alle 24 Stunden erhöhte die H₂-Ausbeute um 18 % im Vergleich zur Batch-Fermentation, was zu einer längeren H₂-Produktionsdauer führte. Darüber hinaus konnte *P. thermoglucosidasius* H₂ unter Synthesegasatmosphären produzieren, wobei die Produktion nur durch die CO-Verfügbarkeit begrenzt war. Die Kultivierung unter diesen Bedingungen verhinderte jedoch die Ansammlung von Biomasse. Der Schritt zur Vergrößerung auf einen Bioreaktor mit steigendem pCO in einem im Labor definierten Synthesegas zeigte, dass die H₂-Produktion im Vergleich zu dem niedrigeren bewerteten pCO verzögert wurde.

Eine weitere Erhöhung des pCO führte zu einer Verzögerung der H₂-Produktion. Während H₂ nach 24 Stunden in der Fermentation ohne Überdruck begann, führte der Anstieg des pCO auf 2 bar dazu, dass die H₂-Produktion nach 52 Stunden begann. Außerdem führte ein Anstieg des pCO auf 3 bar zu einer Hemmung der Hydrogenogenese. Der Anstieg des pH₂ auf 3 bar hatte keine hemmende Wirkung auf die H₂-Produktion, und die höchste Menge an H₂ (130 mmol) wurde bei einem pH₂ von 3 bar produziert.

Diese Studie beantwortete Fragen zu den Auswirkungen verschiedener Fermentationsarten und der Verwendung von aus Abfällen gewonnenen Substraten wie Synthesegas. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf einem wichtigen Prozessparameter bei der Gasfermentation: den Gaspartialdrücken. Ein tieferes Verständnis dieser Aspekte ist für die Verbesserung der Plattform von entscheidender Bedeutung und hat viele Fragen aufgeworfen, die weiterer Untersuchungen bedürfen. Herausforderungen wie der Gas-Flüssigkeits-Stoffübergang von CO in das flüssige Medium, die Bewertung verschiedener Reaktorkonstruktionen und das Metabolic Engineering des Mikroorganismus sind wesentliche Bereiche, die es für den Fortschritt dieser Forschung zu berücksichtigen gilt.

Teil II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Dieses Projekt befasste sich mit der Untersuchung der mikrobiellen Wasserstoffproduktion durch den thermophilen Organismus *Parageobacillus thermoglucosidasius*. Hier sind die wesentlichen Ergebnisse zusammengefasst. Vertiefend werden diese in den jeweils zitierten Publikationen beschrieben, oder, falls nicht veröffentlicht, in den zitierten Abschlussarbeiten der durch die Projektpartner betreuten Studierenden.

Im Projekt BURPED wurden Protokolle für Fermentationen und Wasserstoffbildung durch *P. thermoglucosidasius* optimiert und für den größeren Maßstab angepasst. Das AP 1 umfasst das Scale-up in einen 2,5L Fed-Batch und die Optimierung der Fermentationsparameter. Im AP2 wurde die Transkriptomsequenzierung vorbereitet und entsprechende Proben gesichert. Die bei der Fermentation entstehenden Metabolite wurden untersucht um den metabolischen und physiologischen Zustand des Bakteriums in den verschiedenen Fermentationsphasen aufzuklären. Limitierungen in der Substratlöslichkeit wurden in AP3 bearbeitet. Die Gaslöslichkeit nimmt bei hohem Druck zu. *P. thermoglucosidasius* wurde daher in verschiedenen Fermentationsgefäßen bei einem Druck bis zu 4 atm kultiviert, um die CO-Bioverfügbarkeit zu erhöhen und die H₂-Produktivität zu verbessern. Außerdem wurde der Einfluss der Gaszusammensetzung und der Partialdrücke der einzelnen Gaskomponenten untersucht.

Die weiteren Arbeitspakete (AP 4 bis 6) sollten hauptsächlich bei den Projektpartnern in Südafrika durchgeführt werden. Aufgrund der Corona-Pandemie, Stromausfällen, Lieferschwierigkeiten und dem Wechsel eines Projektpartners an eine andere Universität konnte dort AP 4 (Metabolic Engineering) nur teilweise, und AP 5 (Membrantechnologie) und AP 6 (Brennstoffzelle) gar nicht durchgeführt werden. Im AP 4 wurden dennoch gentechnische Strategien entwickelt und getestet, um die Hydrogenogenese von *P. thermoglucosidasius* zu verbessern.

Am KIT-Tebi wurde das Projekt im Wesentlichen durch eine wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen ihrer Doktorarbeit und Studierenden im Rahmen ihrer Abschlussarbeit unter Betreuung der Wissenschaftlichen Mitarbeiterin (im Folgenden immer mit WM abgekürzt) und des Projektleiters bearbeitet.

Im Folgenden werden die Projektergebnisse eingehend beschrieben. Gegliedert nach den Publikationen und Manuskripten mit Verweis auf die Arbeitspakete und Meilensteine. Es werden nur die Versuche, die letztendlich zu verwertbaren Ergebnissen führten beschrieben. Vorversuche und weitere Prozessoptimierungen sind nicht aufgeführt.

1.1 Batch- und halbkontinuierliche Fermentation mit *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285

Batch and semi-continuous fermentation with *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285 for H₂ production. Magda S. Ardila, Habibu Aliyu, Pieter de Maayer, Anke Neumann. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* (2025), 18:3. <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02597-z>

In dieser Publikation werden hauptsächlich die Arbeiten zu dem AP 1 : Up-scale: Maßstabsvergrößerung und Optimierung der Fermentation von *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM6285 beschrieben. Meilensteine M1 und M2

1.1.1 Hintergrund und Zielsetzung

Wasserstoff (H₂) gilt als sauberer und nachhaltiger Energieträger mit erheblichem Potenzial, die Abhängigkeit von fossilen Brennstoffen zu verringern und die Treibhausgasemissionen zu reduzieren [1]. Die biologische Erzeugung von Wasserstoff, insbesondere über die Wasser-Gas-Shift-Reaktion (WGS), ist ein aufstrebendes Gebiet von Interesse [2-5]. Bei der WGS-Reaktion werden Kohlenmonoxid (CO) und Wasser verwendet, um Wasserstoff und Kohlendioxid (CO₂) zu erzeugen, katalysiert durch den Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH)-Hydrogenase-Enzymkomplex in carboxydotrophen Mikroorganismen [2-5].

Parageobacillus thermoglucosidasius DSM 6285 ist ein fakultativ anaerober Thermophiler, der die WGS-Reaktion zur Wasserstoffproduktion unter anaeroben Bedingungen nutzt [6-9]. Im Gegensatz zu strikten Anaerobiern toleriert er Luftsauerstoff und schaltet auf anaeroben Stoffwechsel um, wenn der Sauerstoff verbraucht ist [6-9]. Diese Anpassungsfähigkeit macht ihn zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Wasserstoffproduktion im industriellen Maßstab. Ziel der Studie ist es, die Batch-Fermentation mit halbkontinuierlichen Fermentationsstrategien zu vergleichen, um die Wasserstoffausbeute zu optimieren, die Verzögerungsphase zu minimieren und die metabolischen und enzymatischen Grundlagen der Wasserstoffbildung zu erforschen.

1.1.2 Methoden und Experimenteller Aufbau

Mikroorganismus und Medien: Für die Versuche wurde *P. thermoglucosidasius* DSM 6285 verwendet, der in modifiziertem Luria-Bertani-Medium (mLB) und Ammoniumsulfatmedium (mASM) kultiviert wurde. Das mASM enthielt essentielle Nährstoffe und Spurenelemente zur Unterstützung des Wachstums und der Wasserstoffproduktion.

Batch-Fermentation: Durchgeführt in 2,5-Liter-Bioreaktoren bei 55°C, pH 6,8, mit einem kontinuierlichen Fluss von CO. Die Fermentation umfasste eine anfängliche aerobe Phase, gefolgt von einem Gasaustausch, um anaerobe Bedingungen herzustellen.

Semikontinuierliche Fermentation: Ähnlich wie bei der Batch-Fermentation, wobei alle 24 oder 48 Stunden frische glukosehaltige Medien zugeführt werden.

Analytische Methoden: Mit Gaschromatographie wurden H_2 -, CO - und CO_2 -Konzentrationen gemessen. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden die Metaboliten quantifiziert, während die CODH-Aktivität mittels spektrophotometrischer enzymatischer Tests bewertet wurde.

1.1.3 Ergebnisse

Wasserstoffproduktionsraten und -ausbeuten

Batch-Fermentation: Die Wasserstoffproduktion begann am zweiten Tag und erreichte ihren Höhepunkt am vierten Tag mit einer maximalen Wasserstoffproduktionsrate (HPR) von 0,144 mmol/min. Die Produktion ging nach dem vierten Tag aufgrund der Substratverarmung und der Anreicherung von Metaboliten zurück (Abbildung 1A).

24-Stunden-Fütterungsintervall: Die halbkontinuierliche Fütterung führte zu einer stabilen Wasserstoffproduktion über 7 Tage, mit einer Wasserstoffbildungsrate (HPR) von 0,26 mmol/min am siebten Tag, was einer 18%igen Steigerung der Wasserstoffausbeute im Vergleich zur Batch-Fermentation entspricht (Abbildung 1B).

48-stündiges Fütterungsintervall: Die Wasserstoffproduktion erreichte später (am siebten Tag) mit 0,32 mmol/min ihren Höhepunkt, zeigte aber Instabilität, wobei die Schwankungen auf die Schaumbildung zurückzuführen waren, die den Gas-Flüssigkeits-Massentransfer störte (Abbildung 1C).

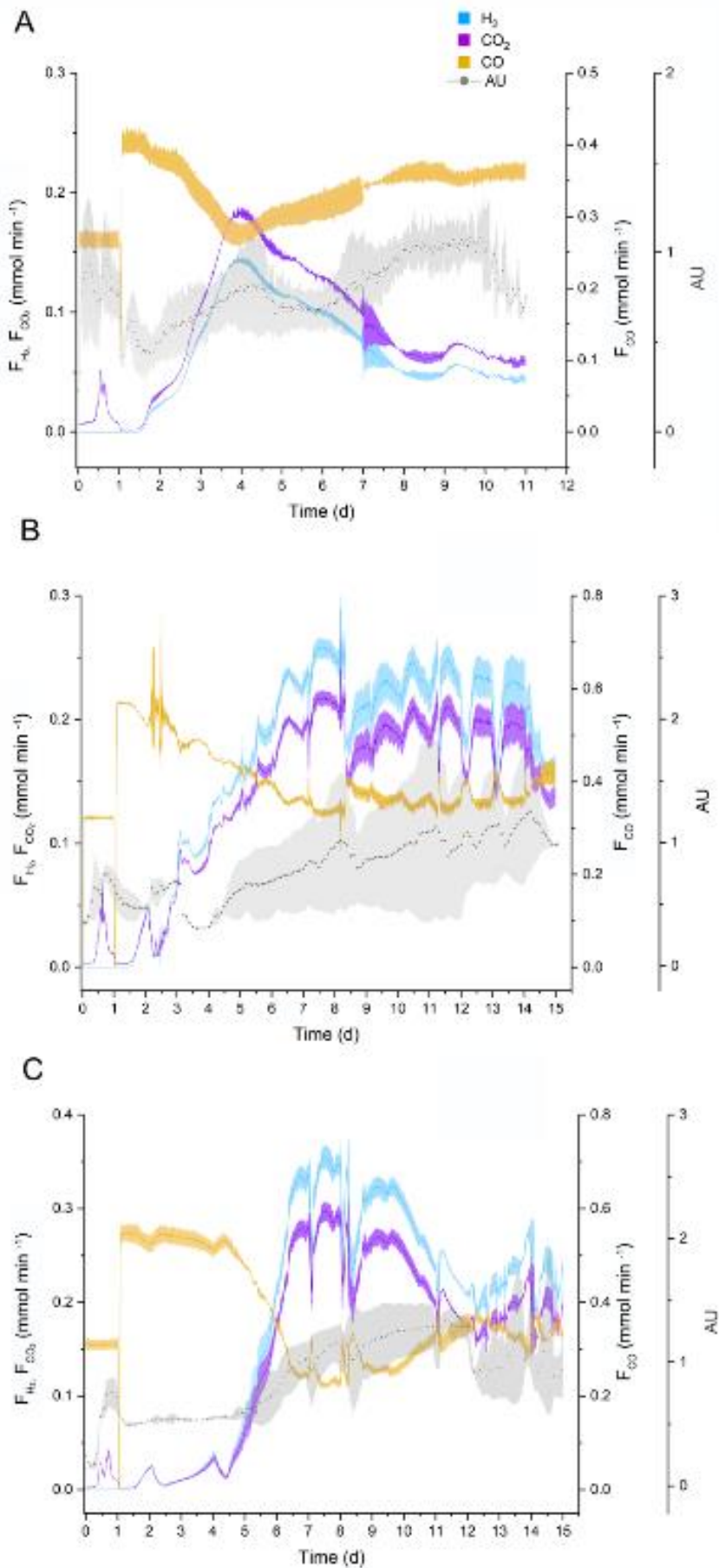


Abbildung 1. Fermentationen in mASM-Medium. *P. thermoglucosidasius* DSM 6285. Die H_2 - und CO_2 -Produktionsrate (mmol min^{-1}) und die CO -Verbrauchsrate (mmol min^{-1}) mit der durch die farbigen Bereiche angegebenen Standardabweichung. Alle Fermentationen in Doppelbestimmung. Die Biomasse, gemessen in Absorptionseinheiten (AU), ist als graue Linie dargestellt. Die aerobe Phase endet nach 24 Stunden mit dem Gasaustausch.

a) Batch-Fermentation über 11 Tage.
 b) Semikontinuierliche Fermentation mit Fütterung alle 24 Stunden, beginnend mit Tag 2.
 c) Semikontinuierliche Fermentation mit Fütterung alle 48 Stunden, beginnend mit Tag 2.

Aktivität der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH)

Die CODH-Aktivität korrelierte stark mit der Wasserstoffproduktion. Bei der Batch-Fermentation fiel die maximale CODH-Aktivität (599 U/mL) mit dem Höhepunkt der Wasserstoffproduktion zusammen. Bei der semikontinuierlichen Fermentation blieb die CODH-Aktivität während des 24-stündigen Fütterungsintervalls stabil, was für eine konstante Wasserstoffproduktion spricht. Im 48-Stunden-Fütterungsintervall schwankte die CODH-Aktivität jedoch, was die Instabilität der Wasserstoffausbeute widerspiegelt (Abbildung 2).

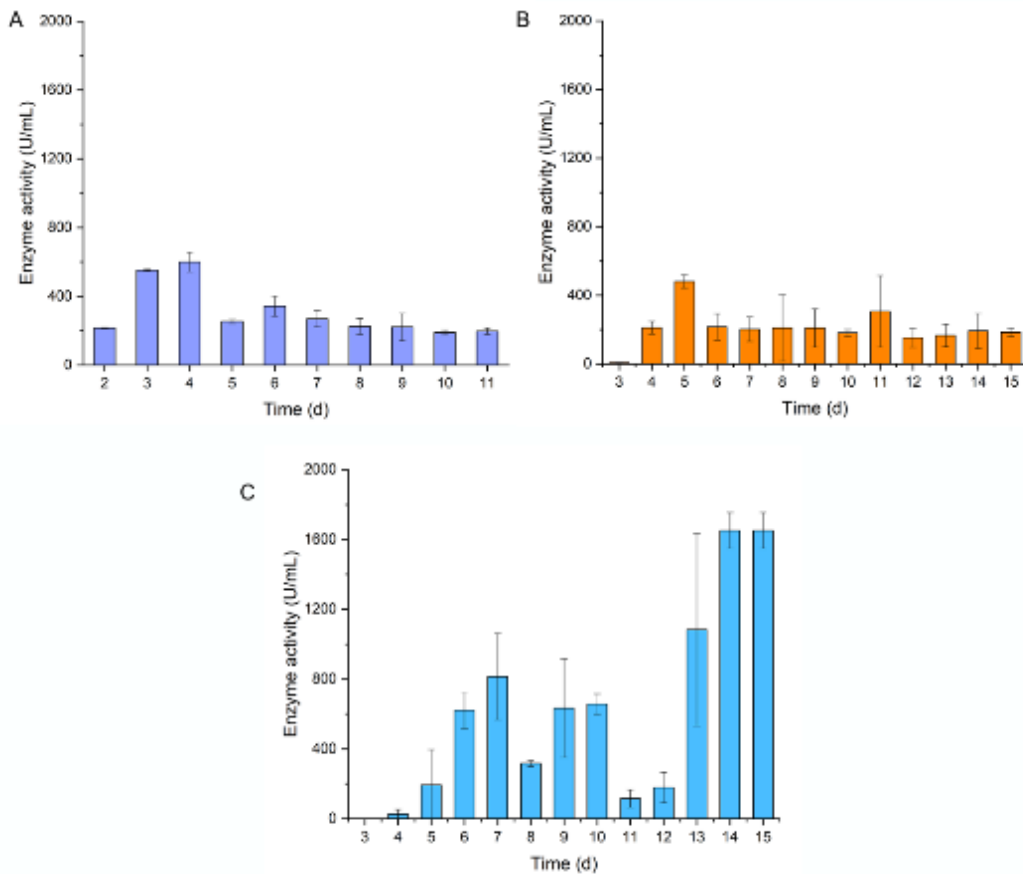


Abbildung 2. CODH-Enzymaktivität für a) Batch-Fermentation, b) Fütterung alle 24 Stunden und c) 48 Stunden. Die Enzymaktivität für die halbkontinuierlichen Fermentationen wurde ab dem dritten Tag der Fermentation gemessen.

Metaboliten-Profile (zu AP 2)

Batch-Fermentation: Formiat und Acetat waren die wichtigsten Stoffwechselprodukte, die Laktatproduktion war minimal.

Semikontinuierliche Fermentation: Die Glukosezufuhr führte zu einer anhaltenden Acetat- und Laktatproduktion. Im 24-Stunden-Intervall wurde mehr Acetat produziert, während sich im 48-Stunden-Intervall mehr Laktat ansammelte. Die verlängerten Fütterungsintervalle führten auch zu einer geringeren Propionatproduktion.

Elektronenfluss

Die Elektronenselektivität verschob sich während der Fermentation. Solange Glukoses vorhanden war

wurde Acetat Produziert. Sobald CO eingeführt wurde, hatte der Elektronenfluss in Richtung Wasserstoffproduktion über die WGS-Reaktion Vorrang.

1.1.4 Diskussion

Batch vs. Halbkontinuierliche Fermentation

Die Batch-Fermentation ist durch Substratlimitierung, Produkthemmung und kürzere Fermentationszeiten begrenzt [10]. Die halbkontinuierliche Fermentation überwindet diese Probleme, indem in regelmäßigen Abständen Nährstoffe nachgegeben und hemmende Stoffwechselprodukte entfernt werden. Die Studie zeigte, dass eine 24-stündige Fütterungsstrategie die Wasserstoffausbeute und die Betriebsstabilität verbesserte, während das 48-Stunden-Intervall Probleme wie Schaumbildung und Schwankungen beim Gastransfer mit sich brachte.

CODH-Aktivität und Enzymstabilität

Die Konstanz der CODH-Aktivität bei der 24-Stunden-Fütterungsstrategie unterstreicht die Bedeutung stabiler Enzymbedingungen für eine effiziente Wasserstoffbildung. Im Gegensatz dazu unterstreicht die Variabilität der CODH-Aktivität bei der 48-Stunden-Fütterung die Empfindlichkeit der Wasserstoffproduktion gegenüber Umwelt- und Betriebsfaktoren. Dies wird durch die Unterschiede in der CODH-Aktivität zwischen den beiden Reaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten belegt, was auf die Empfindlichkeit des CODH-Aktivitätstests gegenüber Sauerstoff zurückzuführen ist [11].

Stoffwechselflexibilität

Die bei der semikontinuierlichen Fermentation beobachteten Stoffwechselverschiebungen spiegeln die Fähigkeit des Organismus wider, sich an die wechselnde Verfügbarkeit von Nährstoffen und Gaszusammensetzungen anzupassen. Als Glukose zur Fütterung hinzugefügt wurde, kam es zu zur Produktion von organischen Säuren, vor allem Acetat, Formiat und Laktat über die Glycolyse[12]. Während die Acetat- und Formiatproduktion dominierte, stieg die Laktatproduktion mit der Glukosezufuhr an und diente wahrscheinlich als Elektronensenke zum Regenerieren der Redoxequivalente.

Operative Herausforderungen

Die Schaumbildung während der 48-stündigen Fütterungsstrategie störte die Wechselwirkungen zwischen Gas und Flüssigkeit und verringerte die Prozesseffizienz [13]. Die Lösung dieses Problems mit Entschäumungsmitteln oder mechanischer Unterbrechung könnte die Leistung verbessern [14]. Alle Fermentationen wurde in Doppelbestimmung parallel gefahren. Die Visibilitäten zwischen den beiden parallellaufenden Prozessen zeigt einen weiteren Bedarf an Optimierung und Standardisierung.

1.1.5 Schlussfolgerungen

Die Studie unterstreicht das Potenzial von *P. thermoglucosidasius* DSM 6285 für die Wasserstoffproduktion im industriellen Maßstab durch die WGS-Reaktion. Die semikontinuierliche Fermentation mit einem Fütterungsintervall von 24 Stunden übertraf die Batch-Fermentation in Bezug auf Wasserstoffausbeute und Stabilität und bietet einen gangbaren Weg für eine nachhaltige Biowasserstoffproduktion.

1.1.6 Wichtigste Ergebnisse

- Das 24-stündige Fütterungsintervall führte zu einer 18%igen Steigerung der Wasserstoffausbeute im Vergleich zur Batch-Fermentation, wobei die Produktion über sieben Tage hinweg stabil blieb.
- Die CODH-Aktivität korrelierte stark mit der Wasserstoffproduktion, was die Bedeutung der enzymatischen Stabilität unterstreicht. Der Enzymtest kann zu einem Schnelltest zur Evaluierung des Fermentationsprozesses weiterentwickelt werden.
- Stoffwechselverschiebungen unter halbkontinuierlichen Bedingungen spiegelten die Anpassungsfähigkeit des Organismus wider, brachten aber auch neue Herausforderungen mit sich, wie z. B. Laktatakkumulation und Schaumbildung.

1.2 Die Auswirkungen von Synthesegas-Einsatzstoffen und Sauerstoff-Störungen auf die Wasserstoffproduktion durch *Parageobacillus thermoglucosidasius*

Publiziert als:

Mol, M., Ardila, M.S., Mol, B.A. *et al.* The effects of synthesis gas feedstocks and oxygen perturbation on hydrogen production by *Parageobacillus thermoglucosidasius*. *Microb Cell Fact* **23**, 125 (2024).

<https://doi.org/10.1186/s12934-024-02391-4>

In dieser Publikation werden die Arbeiten zu dem AP 1: Up-scale: Maßstabsvergrößerung und Optimierung der Fermentation von *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM6285 beschrieben.

Vor einer weiteren Maßstabsvergrößerung war es zunächst notwendig den möglichen Einfluss von realen Substratgasgemischen im kleinen Maßstab, d.h. nicht im Fermenter, sondern in vielen parallelen Versuchen in Flaschen zu evaluieren.

1.2.1 Hintergrund und Zielsetzung

Der fakultative Anaerobier *P. thermoglucosidasius* hat gezeigt, dass er dank seines Enzymkomplexes, der CODH und Hydrogenase umfasst, die WGS-Reaktion durchführen kann [15-17]. Im Gegensatz zu strikten Anaerobiern kann dieses thermophile Bakterium niedrige Sauerstoffgehalte tolerieren, was es zu einem geeigneten Kandidaten für industrielle Anwendungen macht, bei denen Roh-gasgemische oft Verunreinigungen enthalten. Diese Studie erforscht: Die Leistung von *P. thermoglucosidasius* bei der Produktion von Wasserstoff unter verschiedenen Synthesegaszusammensetzungen und die Auswirkungen der von Sauerstoff auf die Hydrogenogenese, insbesondere im Hinblick auf die Flexibilität und Robustheit des Systems.

Wirkung der Sauerstoffstörung

Die Auswirkungen von Sauerstoffzufuhr auf die Wasserstoffproduktion während der Fermentation waren von der Wachstumsphase abhängig: Die frühe Sauerstoffzugabe verzögerte die Wasserstoffproduktion, wahrscheinlich durch Verlängerung des aeroben Stoffwechsels. Die Zufuhr von Sauerstoff während der hydrogenogenen Phase führte zu einer deutlichen Verringerung der Wasserstoffausbeute aufgrund der Umlenkung auf aerobe Atmung. Trotz dieser Unterbrechungen nahm *P. thermoglucosidasius* die Wasserstoffproduktion wieder auf, sobald der Sauerstoff verbraucht war, was die Flexibilität und Robustheit des Systems zeigen (Abbildung 4).

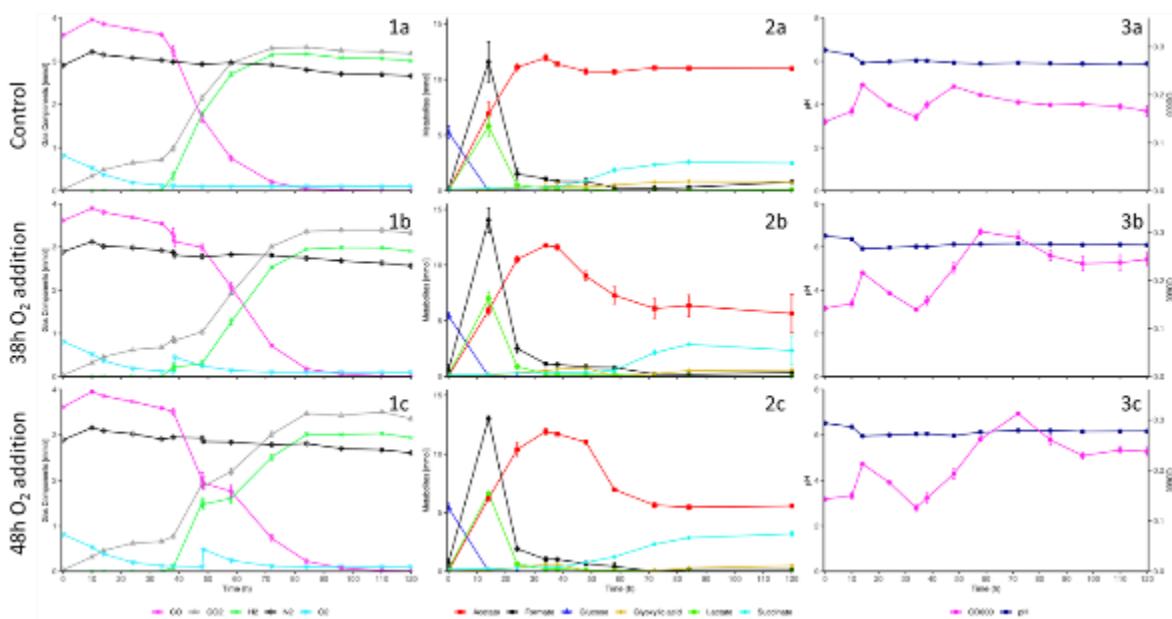


Abbildung 4. Gaszusammensetzung (1), Metaboliten- (2) und Wachstums- und pH-Profile (3) für *P. thermoglucosidasius* DSM 6285, kultiviert unter 50% CO/50% Luft ohne O₂-Zugabe (a), 38h O₂-Zugabe (b) und 48h O₂-Zugabe (c).

Metabolische Verschiebungen

Unter anaeroben Bedingungen waren Acetat, Formiat und Laktat die vorherrschenden Nebenprodukte, die zur pH-Senkung beitrugen. Diese Metaboliten dienen wahrscheinlich als Elektronensenken, um den Redoxzustand während der Gärung auszugleichen. Die Sauerstoffzufuhr führte zu einem raschen Acetatverbrauch, der das Biomassewachstum förderte, aber die Wasserstoffausbeute reduzierte. Auch der Succinatgehalt stieg als Reaktion auf den Sauerstoff an, was darauf hindeutet, dass alternative Stoffwechselwege aktiviert wurden. Das System zeigte die Fähigkeit, je nach Verfügbarkeit von Sauerstoff und Substraten zwischen verschiedenen Stoffwechselwegen zu wechseln, was seine Anpassungsfähigkeit unterstreicht.

Effizienz der WGS-Reaktion

Der Wirkungsgrad der Wasserstoffumwandlung, gemessen als das molare Verhältnis von H₂ zu CO, war unter allen Bedingungen hoch, nahm jedoch mit zunehmendem Sauerstoffgehalt ab.

Synthesegasmischungen mit moderaten CO-Gehalten (z. B. 50 % CO) brachten die Wasserstoffproduktion und das Biomassewachstum besser ins Gleichgewicht als höhere oder niedrigere CO-Konzentrationen.

1.2.4 Diskussion

Die Ergebnisse unterstreichen den Zielkonflikt zwischen der Maximierung der Wasserstoffproduktion und dem Erhalt der aktiven Biomasse. Die Synthesegaszusammensetzung beeinflusst die Stoffwechselwege, wobei anaerobe Bedingungen die Wasserstoffbildung begünstigen, aber das Zellwachstum einschränken. Aus früheren aeroben Studien war das Gegenteil zu erwarten, da Atmosphären mit angereichertem CO-Gehalt produktivere Wachstumsreaktionen und dementsprechend eine größere hydrogenogene Aktivität ermöglichten [7, 12]. Die Fähigkeit von *P. thermoglucosidasius*, die Wasserstoffproduktion nach einer Sauerstoffstörung wieder aufzunehmen, deutet darauf hin, dass es für halbkontinuierliche oder Batch-Betriebe mit industriellen Abgasen geeignet ist.

Sauerstoff stört zwar die Wasserstoffproduktion, fördert aber den Aufbau von Biomasse, indem er den aeroben Stoffwechsel ermöglicht. Die Zugabe von O₂ vor dem Beginn der H₂-Produktion verzögerte die H₂-Produktion stärker als die O₂-Zugabe während der anaeroben Phase, wahrscheinlich durch Verlängerung der energetisch effizienteren aeroben Atmung [18]. Diese Doppelrolle kann strategisch genutzt werden, um Kulturen während längerer Fermentationen aktiv zu halten. Höhere Sauerstoffgehalte beeinträchtigen jedoch die Wasserstoffausbeute erheblich, so dass in der Industrie eine sorgfältige Kontrolle erforderlich ist.

1.2.5 Zukunftsperspektiven

Optimierung des Systems für Anwendungen im großen Maßstab:

- Die Strategien zum Ausgleich der Sauerstoffversorgung und der anaeroben Bedingungen müssen verfeinert werden.
- Genetische Veränderungen, wie das Ausschalten von Wasserstoff verbrauchenden Enzymen, könnten die Wasserstoffausbeute verbessern.
- Die Integration dieses Systems in industrielle Prozesse, die Synthesegas erzeugen, bietet einen Weg zur nachhaltigen Wasserstofferzeugung und verringert die Abhängigkeit von fossilen Brennstoffen.

1.2.6 Schlussfolgerung

P. thermoglucosidasius DSM 6285 weist ein erhebliches Potenzial für die biologische Wasserstoffproduktion über die WGS-Reaktion auf. Seine Flexibilität bei unterschiedlichen Gaszusammensetzungen und Sauerstoffgehalten macht ihn zu einem vielversprechenden Kandidaten für industrielle Anwendungen. Diese Studie liefert wertvolle Einblicke in die Stoffwechselreaktionen des Organismus unter realistischen Bedingungen und ebnet den Weg für die Entwicklung robuster und skalierbarer Biowasserstoffproduktionssysteme. Als nächster Schritt ist die Übertragung in den 2,5 L Bioreaktormaßstab mit kontinuierlicher Begasung mit Synthesegasgemischen notwendig.

1.3 Bewertung von Synthesegasen als Substrat für die H₂-Produktion mit *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285.

In dem folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Fermentationsoptimierung und die Auswirkungen erhöhter CO- und H₂-Partialdrücke (pCO und pH₂) in einem CO-, CO₂- und H₂-haltigen Gasgemisch auf die Hydrogenogenese im Bioreaktormaßstab mit kontinuierlichem Gasfluss und pH-Regulierung beschrieben. Die Arbeiten gehören zu AP1 und AP3.

Wir publizieren als:

Evaluation of lab-defined syngas as a substrate for H₂ production with *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285. Magda S. Ardila, Habibu Aliyu, Pieter de Maayer, Anke Neumann.

Manuscript in preparation.

1.3.1 Hintergrund und Zielsetzung

Das thermophile fakultativ anaerobe Bakterium *Parageobacillus thermoglucosidasius* ist ein vielseitiger biotechnologisch relevanter Mikroorganismus, der die WGS-Reaktion bei niedrigem Sauerstoffgehalt durchführen kann [7, 9, 19]. Innerhalb der Gattung *Parageobacillus* gibt es eine große Vielfalt, darunter fakultativ anaerobe und anaerobe, thermophile Mikroorganismen mit einer breiten Palette von Stoffwechselprodukten [20]. Diese Vielseitigkeit erstreckt sich auch auf die Gassubstrate, was das Potenzial dieser Gattung für biotechnologische und industrielle Anwendungen erhöht [21]. Gasgemische, die CO, H₂ und CO₂ enthalten und gemeinhin als Syngas oder Synthesegas bezeichnet werden, können durch biologische Prozesse wie Acidogenese, Solventogenese und Methanogenese oder Fischer-Tropsch-vermittelte thermochemische Verfahren in Biokraftstoffe umgewandelt werden [22]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen erhöhter CO- und H₂-Partialdrücke (pCO und pH₂) in einem CO, CO₂ und H₂ haltigen Gasgemisch auf die Hydrogenogenese im Bioreaktormaßstab mit kontinuierlichem Gasfluss und pH-Regulierung zu bewerten.

1.3.2 Materialien und Methoden

Mikroorganismen und Medien: Die Vorkulturen von *P. thermoglucosidasius* DSM 6285 erfolgten in modifiziertem Luria-Bertani-Medium (mLB) [7]. Die Fermentationen in Bioreaktoren wurden in modifiziertem Ammoniumsulfatmedium (mASM) durchgeführt [15, 23].

Gasgemische Fermentationen

Jede Fermentation wurde in zwei Bioreaktoren mit einem Fassungsvermögen von 2,5 l und einem Arbeitsvolumen von 1 l durchgeführt. Die Wachstumsbedingungen umfassten eine Rührgeschwindigkeit von 500 U/min, einen pH-Wert von 6,8 und eine Temperatur von 55 °C. Die Fermentationen wurden 96 Stunden lang durchgeführt. Zwei Stunden vor der Zugabe des Inokulums wurde das Gasgemisch mit Hilfe von Massendurchflussreglern mit einer Durchflussrate von 200 ml min⁻¹ und den in Tabelle 1 aufgeführten Gaszusammensetzungen eingestellt.

Tabelle 1. Gasgemische für jede Fermentation, mit zunehmendem CO (1-3) und H₂-Partialdruck (4-6).

	CO			H ₂		
Fermentation	1	2	3	4	5	6
pp (kPa)	9	28	46	5	11	19
H ₂ (%)	15	15	15	5	12	20
CO (%)	10	30	50	20	20	20
CO ₂ (%)	15	15	15	15	15	15
N ₂ (%)	55	35	20	60	53	45

Analytische Methoden: Mit der Gaschromatographie wurden die H₂, CO und CO₂ Konzentrationen gemessen. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden die Metaboliten quantifiziert. Die Elektronenselektivität wurde verwendet, um den Elektronenfluss im Prozess aufzuzeigen. Dieser wurde aus dem Elektronenmol (e⁻mol) jeder Verbindung berechnet.

1.3.3 Ergebnisse

Auswirkungen eines erhöhten CO-Partialdrucks auf die H₂-Produktion

Die Auswirkungen des pCO Wertes auf die Wasserstoffbildungsrate (HPR) zeigten sich von Beginn der Fermentation an. Bei einem CO-Anteil von 50 % im Gasgemisch wurde ein pCO von 46 kPa erreicht, während mit 10 % bzw. 30 % CO Partialdrücke von 9 und 28 kPa erzielt wurden. Die Wasserstoffproduktion setzte bei 46 kPa CO erst 24 Stunden nach der Inokulation ein, und es wurden durchweg niedrigere Wasserstoffproduktionsraten (HPR) erzielt als bei der Zugabe von 10 % bzw. 30 % CO zum Gasgemisch (Abbildung 5A). Die Elektronenbilanz, die H₂ als Hauptprodukt berücksichtigt, zeigte, dass die Erhöhung von pCO den CO-Verbrauch erhöhte.

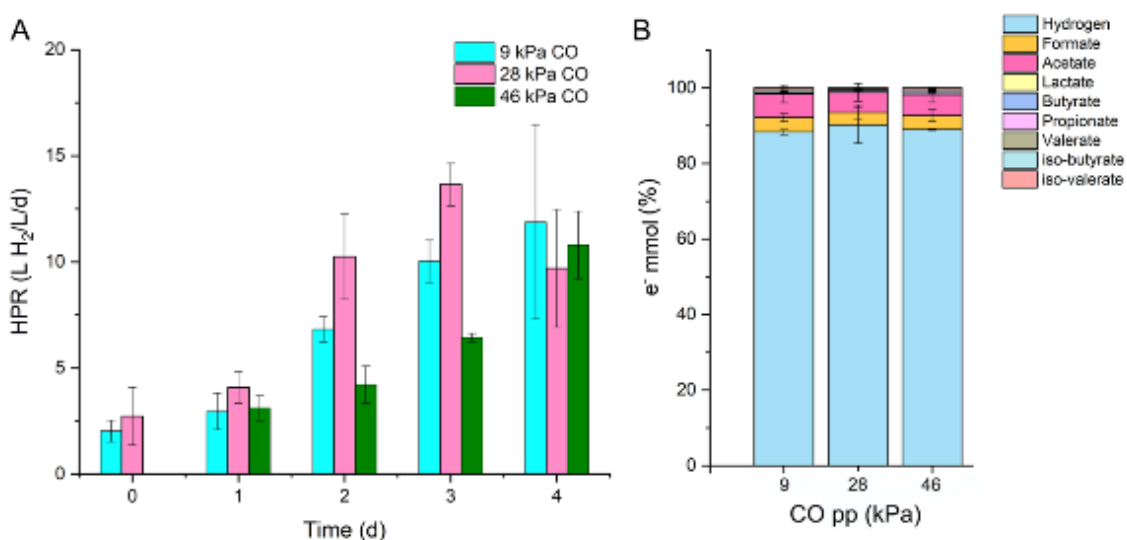


Abbildung 5. A) HPR mit zunehmendem pCO. B) Selektivität des Prozesses in Bezug auf die Elektronenbilanz.

Auswirkungen eines erhöhten H₂-Partialdrucks auf die H₂-Produktion

Die Auswirkung auf die Hydrogenese bei Erhöhung des p_{H₂} wurde untersucht. Es ist zu erwarten, dass ein erhöhter H₂ Anteil im Gas die Wassergasschiftreaktion hemmt. Bei 5 % H₂ im Gasgemisch wurde ein Partialdruck von 5 kPa erreicht, während bei 12 % bzw. 20 % H₂ Partialdrücke von 11 bzw. 19 kPa erzielt wurden. Entgegen den Erwartungen wirkte sich die Erhöhung des p_{H₂} insgesamt positiv auf die Wasserstoffproduktionsrate (HPR) aus.

Wie bei den Experimenten mit steigendem pCO-Wert beobachtet wurde, ging auch bei steigendem H₂ der größte Teil der CO-Elektronen in die H₂-Produktion (Abbildung 6B).

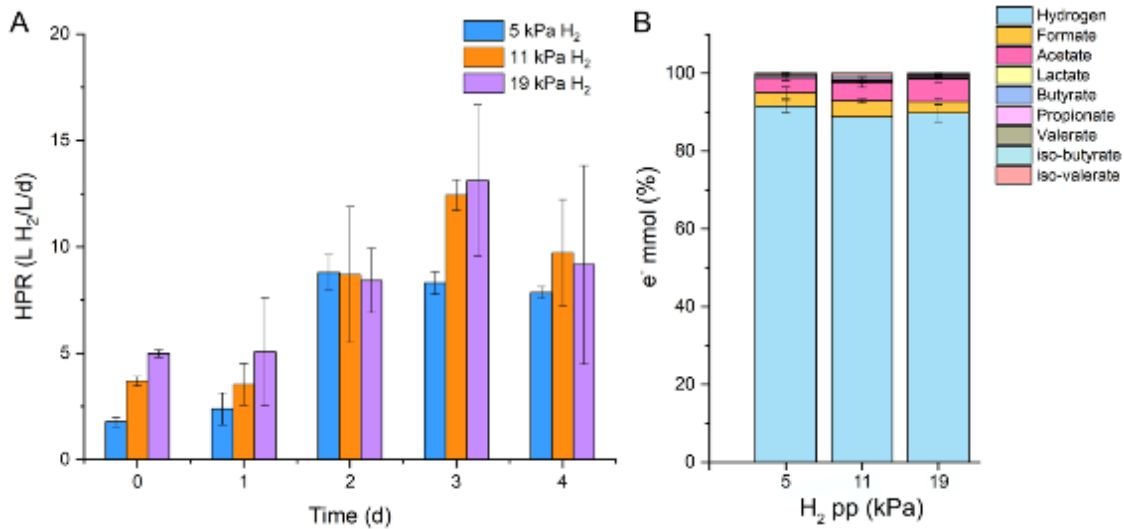


Abbildung 6. A) HPR mit steigendem p_{H₂}. B) Selektivität des Prozesses in Bezug auf die Elektronenbilanz.

1.3.4 Diskussion

Der Anstieg des pCO-Wertes auf bis zu 46 kPa in einem Gasgemisch führte in unserer Studie zu einer Verzögerung des Beginns der H₂-Produktion bei *P. thermoglucosidasius* im Vergleich zu den niedrigeren pCO-Werten. Auch die CO-Aufnahmerate war bei den höheren pCO-Werten geringer. Eine frühere Studie, in der Synthesegas in zwei Zusammensetzungen als Substrat für die H₂-Produktion mit *P. thermoglucosidasius* DSM 6285 untersucht wurde, unterschied sich in ihrem CO-Verbrauch. Die früheste CO-Erschöpfung nach 84 Stunden wurde mit dem Gemisch erreicht, das 17,28 % CO enthielt, während bei dem Experiment mit 38,01 % CO noch 1,06 % CO im Kopfraum verblieben, was die H₂-Produktion nicht einschränkte, aber den Beginn der Hydrogenese verzögerte [19].

Die Erhöhung des p_{H₂} auf 19 kPa in einem CO- und CO₂ haltigen Gasgemisch wirkte sich nicht nachteilig auf die H₂-Produktion aus, die bei diesem p_{H₂} an Tag 3 eine maximale HPR von 13,6 L H₂/L/d erreichte. In einer anderen Studie steigerte eine Erhöhung des p_{H₂} auf bis zu 1,52 bar die Ethanolproduktion und die Wasserstoffaufnahme in einer mit *Clostridium ljungdahlii* durchgeführten Syngasfermentation [24]. Eine weitere Erhöhung des p_{H₂} hatte jedoch negative Auswirkungen, möglicherweise aufgrund der Hemmung einer enzymatischen Reaktion oberhalb einer kritischen Gleichgewichtskonzentration von H₂ in der Flüssigphase [24].

1.3.5 Schlussfolgerung

Die Erhöhung des pCO-Wertes auf 46 kPa führte zu einer Verzögerung der Hydrogenogenese im Vergleich zu 9 und 28 kPa. Andererseits führte eine Erhöhung des pH₂ zu einer höheren HPR am Ende der Fermentation. Für die industrielle Anwendung dieses Systems ist es wichtig, dass Synthesegase mit einem CO Anteil von bis zu 20 % (optimum ca 10 %) eine optimale HPR aufzeigen. Der H₂ Anteil im Synthesegas kann sogar auf bis zu 20 % steigen, ohne dass die HPR wesentlich beeinflusst wird.

Im nächsten Schritt galt es zu klären, ob man den Massentransfer von dem Substratgas CO von der Gasphase in die Flüssigphase und damit auch die Wasserstoffproduktionsrate durch erhöhten Druck optimieren kann. Im Folgenden sind die Arbeiten und Ergebnisse zu AP2 und AP 3 dargestellt. Die Fermentationen erfolgen in speziellen Druck- Flaschen, da die Standard Glasreaktoren nicht druckfest sind.

1.4 Wirkung unterschiedlicher Partialdrücke auf die H₂-Produktion mit *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285.

Publiziert in:

Effect of Different Partial Pressures on H₂ Production with *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285. (2024) Ardila, M. S., Aliyu, H., De Maayer, P., & Neumann. *Fermentation*, 10(11), 592.

<https://doi.org/10.3390/fermentation10110592>

1.4.1 Zielsetzung

Während Faktoren wie Temperatur, Zusammensetzung des Mediums und pH-Wert umfassend untersucht wurden, ist die Auswirkung von Gaspartialdrücken (CO, H₂ und N₂) auf die Wasserstoffproduktion noch nicht ausreichend erforscht. Die vorliegende Studie schließt diese Lücke, indem sie die Wasserstoffproduktion von *P. thermoglucosidasius* bei unterschiedlichen Gasdrücken untersucht.

1.4.2 Materialien und Methoden

Mikroorganismen und Medien

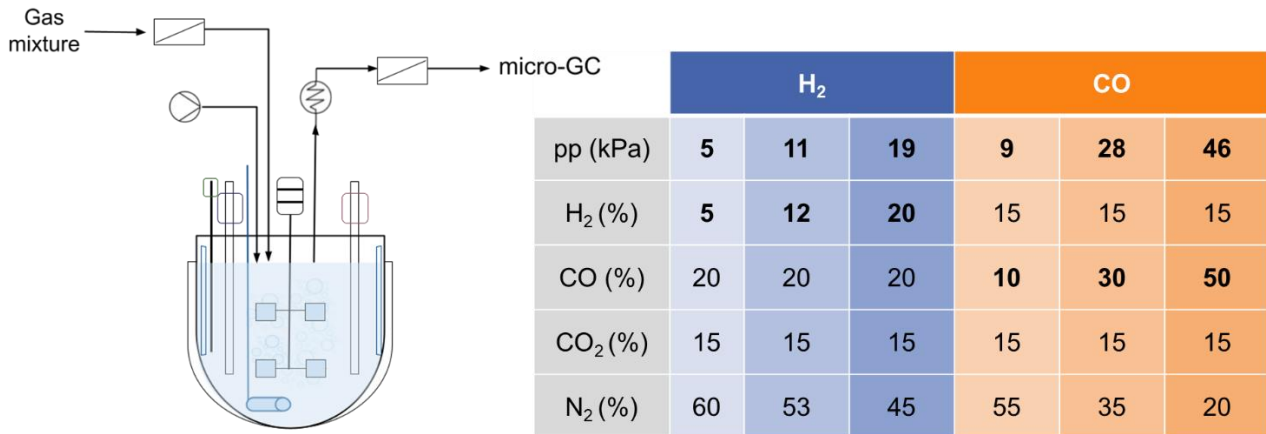
Für die Studie wurde *P. thermoglucosidasius* DSM 6285 verwendet, das aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen stammt. Das Bakterium wurde zur Herstellung des Inokulums in einem modifizierten Luria-Bertani-Medium (mLB) kultiviert und später für die Fermentationsversuche in ein modifiziertes Ammoniumsulfatmedium (mASM) überführt. Beide Medien enthielten essentielle Nährstoffe und Spurenelemente zur Unterstützung des Bakterienwachstums und der Wasserstoffbildung.

Inokulumvorbereitung und Fermentationsaufbau

Die Vorkulturen wurden bei 60 °C und 120 U/min aerob gezüchtet, bevor sie in Fermentationsflaschen aus Edelstahl beimpft wurden. Die Flaschen wurden mit Gasmischungen gefüllt, die unterschiedliche Partialdrücke von CO, H₂ und N₂ enthielten und auf einen Druck von bis zu 3 bar eingestellt waren. Die Fermentation dauerte 168 Stunden bei 60°C und 120 U/min.

Analytische Techniken

Gasproben aus dem Luftraum wurden mittels Gaschromatographie analysiert, um die H₂-, CO- und CO₂-Konzentrationen zu quantifizieren. Flüssige Proben wurden mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf Bakterienwachstum (optische Dichte) und Stoffwechselnebenprodukte (z. B. Acetat, Formiat, Laktat) untersucht.



P. thermoglucosidasius DSM6285 wurde in zwei 1,5 L Bioreaktoren unter anaeroben Bedingungen mit unterschiedlichen Gasgemischen kultiviert.

1.4.3 Ergebnisse

Wirkung eines erhöhten CO-Partialdrucks

Eine Erhöhung des pCO-Wertes verbesserte die Gaslöslichkeit und die Substratverfügbarkeit. Ein zu hoher CO-Gehalt (3 bar) hemmte jedoch sowohl das Bakterienwachstum als auch die Wasserstoffproduktion:

- Bei 1 bar pCO begann die H₂-Produktion nach 48 Stunden und erreichte 63 mmol, wobei Acetat das wichtigste Nebenprodukt war.
- Bei 2 bar pCO verzögerte sich die H₂-Produktion weiter und lieferte nur 26,6 mmol, wobei die Formiatproduktion zunahm.
- Bei 3 bar pCO fand keine nennenswerte H₂-Produktion statt, und Laktat wurde zum Hauptnebenprodukt.

Die hemmende Wirkung eines hohen pCO-Wertes wurde auf die CO-Toxizität zurückgeführt, die die Stoffwechselwege stört und den Elektronenfluss von der Hydrogenogenese ablenkt (Abbildung 7).

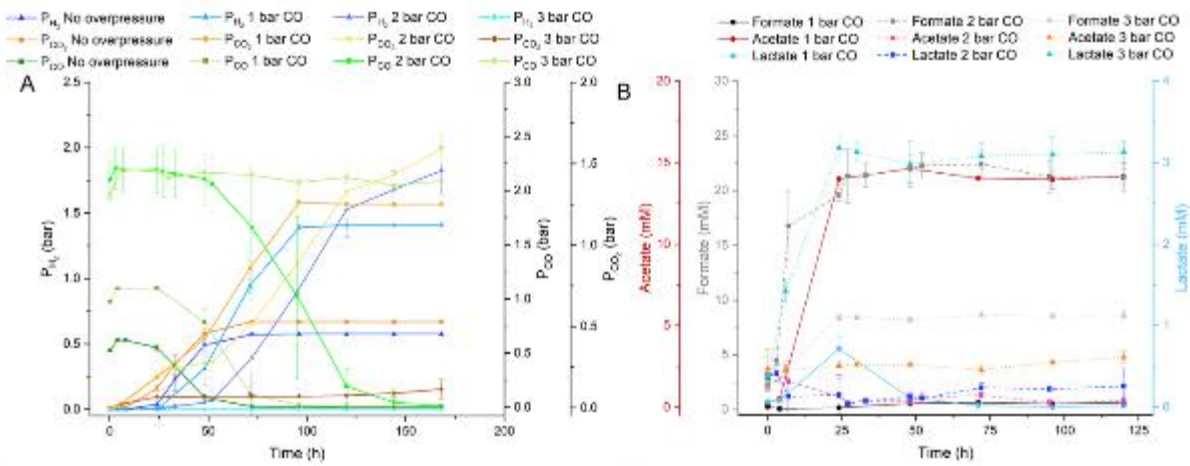


Abbildung 7. A) Gaspartialdrücke während der Fermentationen mit unterschiedlichem p_{CO} . Die blauen Linien zeigen die H_2 -Produktion an, während die grünen und orangen Linien CO und CO_2 darstellen. B) Bildung von Formiat, Acetat und Laktat bei verschiedenen p_{CO} . Formiat, Acetat und Laktat sind in grau, rot bzw. blau dargestellt.

Wirkung eines erhöhten N_2 -Partialdrucks

Ein höherer p_{N_2} hatte nur minimale Auswirkungen auf den gesamten H_2 -Ertrag, beeinflusste jedoch die metabolischen Nebenprodukte:

- Bei 1 bar p_{N_2} erreichte die H_2 -Produktion nach 72 Stunden 22,1 mmol.
- Eine Erhöhung des p_{N_2} auf 3 bar führte zu einem leichten Rückgang der H_2 -Produktion (9,2 mmol), aber zu einem Anstieg der Laktatproduktion.
- Die Acetatproduktion nahm mit steigendem p_{N_2} ab, während die Formiatproduktion zunahm.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass N_2 zwar wie ein inertes Gas wirkt, sein erhöhter Partialdruck jedoch das Gas-Flüssigkeits-Gleichgewicht und den Stoffwechselfluss beeinflusst (Abbildung 8).

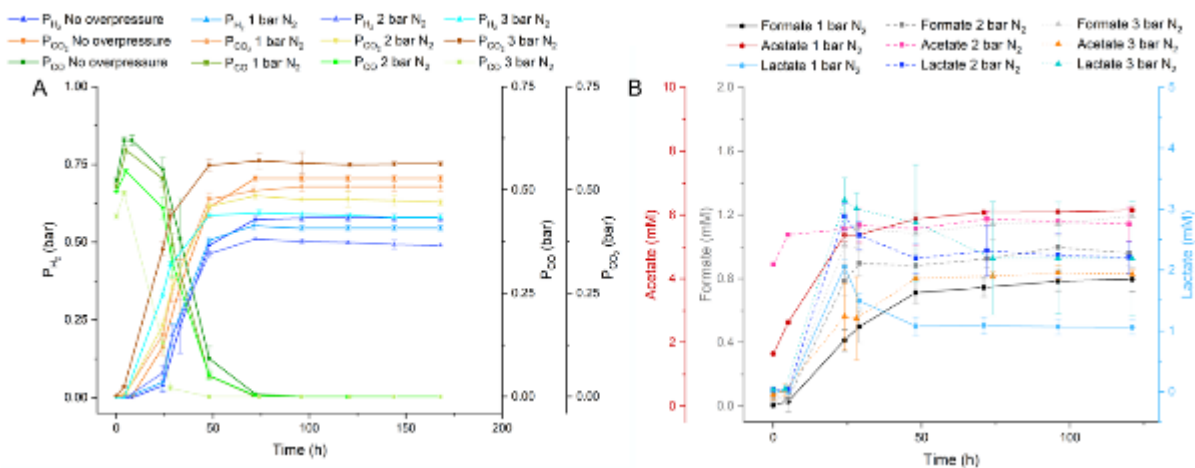


Abbildung 8. A) Gaspartialdrücke während der Fermentationen mit verschiedenen p_{N_2} . Die blauen Linien zeigen die H_2 -Produktion an, während die grünen und orangen Linien CO und CO_2 darstellen. B) Formiat-, Acetat- und Laktatproduktion bei verschiedenen p_{CO} . Formiat, Acetat und Laktat sind in grau, rot bzw. blau dargestellt.

Auswirkung von erhöhtem H_2 -Partialdruck

Die Erhöhung des p_{H_2} auf 3 bar hemmte die Wasserstoffproduktion überraschenderweise nicht:

- Bei 1 bar p_{H_2} begann die H_2 -Produktion innerhalb von 4 Stunden und erreichte nach 24 Stunden mit 46,2 mmol ihren Höhepunkt.
- Bei 3 bar p_{H_2} erreichte die H_2 -Produktion ein Maximum von 130 mmol, was darauf hindeutet, dass *P. thermoglucosidasius* hohe H_2 -Konzentrationen verträgt.

Es wurden metabolische Verschiebungen beobachtet, wobei die Acetat- und Formiatproduktion abnahm und die Laktatbildung zunahm. Diese Verschiebungen deuten darauf hin, dass ein hoher p_{H_2} das Gleichgewicht der reduzierenden Äquivalente verändert und den Elektronenfluss umleitet (Abbildung 9).

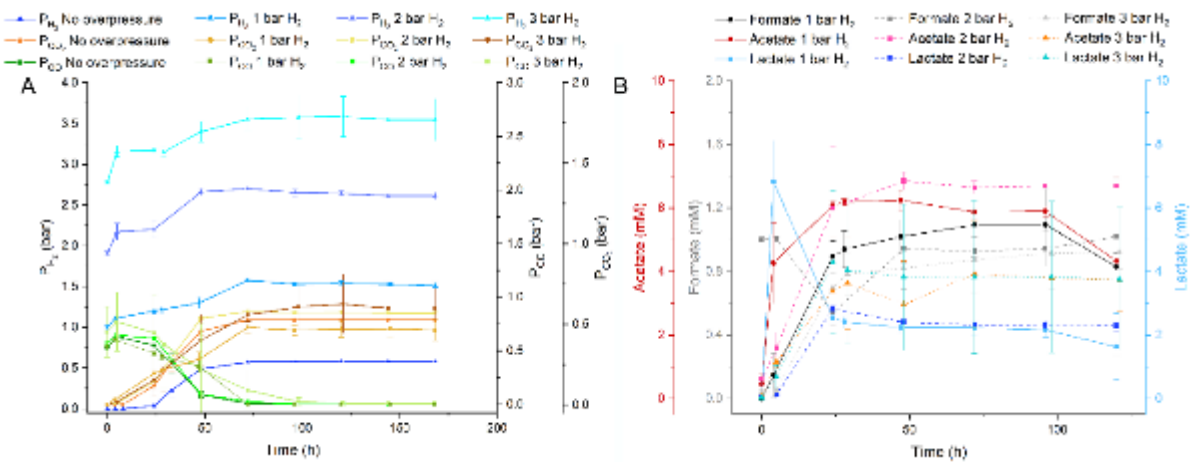


Abbildung 9. A) Gaspartialdrücke bei Fermentationen mit unterschiedlichem p_{H_2} . Die blauen Linien zeigen die H_2 -Produktion an, während die grünen und orangen Linien CO und CO_2 darstellen. B) Bildung von Formiat, Acetat und Laktat bei verschiedenen p_{CO} . Formiat, Acetat und Laktat sind in grau, rot bzw. blau dargestellt.

Elektronenbilanz und Selektivität

Unter allen Bedingungen wies die WGS-Reaktion eine hohe Selektivität für die Wasserstoffproduktion auf, wobei über 95 % der aus CO und Glukose gewonnenen Elektronen in H_2 umgewandelt wurden. Die Ausnahme war bei 3 bar p_{CO} , wo die H_2 -Produktion gehemmt war und die Elektronen zu Formiat, Acetat und Laktat umgeleitet wurden.

1.4.4 Diskussion

CO-Toxizität und Stoffwechselverschiebungen

Die bei 3 bar p_{CO} beobachtete Hemmung unterstreicht die doppelte Rolle von CO als Substrat und als Toxin. Hohe CO-Werte behindern die enzymatische Aktivität, stören den Elektronentransport und verändern die Produktion von Stoffwechselnebenprodukten. Ähnliche Tendenzen wurden bei anderen carboxidotrophen Bakterien wie *Clostridium carboxidivorans* P7^T beobachtet, wo hohe CO-Konzentrationen den Stoffwechsel auf weniger erwünschte Produkte wie Ethanol und Laktat verlagern [26].

Die Rolle von N₂ und H₂

Obwohl N₂ inert ist, wirkt sich sein steigender Partialdruck auf den Gas-Flüssigkeits-Massentransfer und den mikrobiellen Stoffwechsel aus. Ein hoher p_{N_2} kann die Verfügbarkeit anderer Gase verringern und damit indirekt die Stoffwechselwege beeinflussen. Bei anaeroben Bakterien kann die Bildung von Endprodukten durch den p_{H_2} stark beeinflusst werden, wobei sich der Stoffwechsel zu reduzierten Metaboliten wie Ethanol und Laktat verschiebt [27]. Die Toleranz des Organismus gegenüber hohen p_{H_2} Werten zeigt dagegen seine Robustheit und sein Potenzial für eine Ausweitung der Wasserstoffproduktion.

Optimierung der Gasphasenbedingungen

Die Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer präzisen Kontrolle der Gasphasenbedingungen in Bioreaktoren. Die Aufrechterhaltung eines optimalen p_{CO} -Wertes ist entscheidend für die Maximierung der H₂-Ausbeute und Bildungsrate bei gleichzeitiger Vermeidung von CO-Toxizität. Es wurde beobachtet, dass die CO-Umsatzrate durch den Gas-Flüssigkeits-Massentransfer begrenzt wird, wenn hohe Biomassekonzentrationen genutzt werden; außerdem beeinflusst die Konzentration des gelösten CO die spezifische CO-Aufnahme [28]. In ähnlicher Weise kann durch die Einstellung von p_{H_2} und p_{N_2} das Gleichgewicht zwischen Hydrogenogenese und Nebenproduktbildung fein abgestimmt werden.

1.4.5 Zukunftsperspektiven

Experimente mit höherem Druck

Die Erforschung von Drücken jenseits von 3 bar könnte Erkenntnisse über die Grenzen der mikrobiellen Toleranz und die Kinetik der Wasserstoffbildung liefern. Für solche Studien sind Hochdrucksysteme, wie z. B. hochresistente Bioreaktoren, erforderlich.

CO₂-Partialdruck

Die Rolle von CO₂, einer wesentlichen Komponente der WGS-Reaktion, muss weiter untersucht werden. Das Einblasen von CO₂ kann die H₂-Produktion verbessern, indem es die Wechselwirkungen zwischen Gas und Flüssigkeit verstärkt und die Reaktion vorantreibt.

Herausforderungen beim Scale-Up

Die Skalierung des Prozesses für industrielle Anwendungen erfordert die Bewältigung von Herausforderungen wie Gasmischung, Druckregelung und Reaktordesign. Die Optimierung dieser

Parameter könnte *P. thermoglucosidasius* zu einem brauchbaren Kandidaten für die Biowasserstoffproduktion im kommerziellen Maßstab machen.

1.4.6 Schlussfolgerung

Diese Studie demonstriert das Potenzial von *P. thermoglucosidasius* DSM 6285 für die Biowasserstoffproduktion durch die WGS-Reaktion. Zu den wichtigsten Ergebnissen gehören:

1. Ein optimaler pCO-Wert fördert die H₂-Produktion, ein zu hoher CO-Wert hemmt jedoch den mikrobiellen Stoffwechsel.
2. Das Bakterium toleriert einen hohen pH₂ (bis zu 3 bar) und behält eine hohe Selektivität für die H₂-Produktion bei.
3. Die Feinabstimmung der Gasphasenbedingungen kann die Wasserstoffausbeute optimieren und gleichzeitig die Nebenprodukte minimieren.

Bei weiterer Forschung und technologischen Fortschritten könnte *P. thermoglucosidasius* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung nachhaltiger und kohlenstoffneutraler Wasserstoffproduktionssysteme spielen.

1.5 Molekularbiologische Arbeiten, die aber noch zu keinem publizierbaren Ergebnis geführt haben:

Parageobacillus thermoglucosidasius produziert H₂ durch die biologische Wasser-Gas-Shift-Reaktion. Diese Reaktion wird durch einen Komplex aus einer Kohlenmonoxid-Dehydrogenase und einer H₂-bildenden [NiFe]-Hydrogenase vermittelt, die durch ein einziges Operon im Genom codiert wird. Darüber hinaus wurden zwei Operons identifiziert, die für eine [NiFe]-Hydrogenase der Gruppe 1d bzw. Gruppe 2a, Pha bzw. Phb, kodieren und universell in den Genomen aller Taxa der Art vorkommen. Bislang sind die Funktion oder der Einfluss dieser Hydrogenasen auf den H₂-Stoffwechsel von *P. thermoglucosidasius* noch nicht beschrieben worden. In diesem Arbeitspaket wurde die genetische Inaktivierung von Genen, die für die katalytischen Untereinheiten (phaB bzw. phbE) der [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 1d (Pha) und der Gruppe 2a (Phb) kodieren, mit zwei verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Keiner der beiden Ansätze war in der Lage, stabile Mutanten für eines der Zielgene zu erzeugen. Insbesondere wurde nach der Einführung von Transformationsvektoren, die eines der beiden Mutantengene tragen, in *P. thermoglucosidasius* eine erhebliche Verringerung des Wachstums beobachtet. Die Verringerung des Wachstums schien weder von den verwendeten Transformationsvektoren noch von den Fitnesskosten, die mit den von ihnen getragenen Resistenzgenen verbunden sind, beeinflusst zu werden. Das Wildtyp-ähnliche Wachstum der Transformanten setzte nur dann wieder ein, wenn die eingeführten mutierten Gene nicht mehr nachgewiesen werden konnten, was darauf hindeutet, dass die Funktion dieser Gene die Lebensfähigkeit der Zellen beeinflussen kann. Die weitere Untersuchung der wesentlichen Funktionen dieser Hydrogenasen mit Hilfe alternativer gentechnischer Verfahren könnte zur Klärung ihrer funktionellen Bedeutung beitragen.

1.6 Genomische Untersuchung der Wasserstoffbildung in *Parageobacillus thermoglucosidasius*

Publiziert in:

Not All That Glitters Is Gold: The Paradox of CO-dependent Hydrogenogenesis in *Parageobacillus thermoglucosidasius*. Aliyu, H., De Maayer, P., & Neumann, A. (2021). *Frontiers in Microbiology*, 12, 784652. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.784652>

Das thermophile Bakterium *Parageobacillus thermoglucosidasius* hat in letzter Zeit aufgrund seiner Fähigkeit, die Wassergas-Shift-Reaktion zu katalysieren, an Interesse gewonnen. Bei dieser Reaktion wird Kohlenmonoxid (CO) oxidiert und es entsteht Wasserstoffgas (H₂). Dieser Phänotyp ist weitgehend vorhersehbar, da eine Genomregion vorhanden ist, die für eine Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH-Coo) und eine Hydrogenase (Phc) kodiert. In dieser Arbeit wurden sieben bisher nicht charakterisierte Stämme unter einer Atmosphäre aus 50 % CO und 50 % Luft kultiviert. Obwohl die Gene *coo-phc* in allen sieben Stämmen vorhanden waren (Abb. 10), oxidierte nur ein Stamm, Kp1013, CO und erzeugte H₂. Die Genome der H₂-produzierenden Stämme enthalten einzigartige Genomregionen, die Proteine kodieren, die am Nickel-Transport (Abb. 11) und der Entgiftung von Catechol beteiligt sind, einem Nebenprodukt eines Siderophor-vermittelten Eisenaufnahmesystems. In Kombination könnte das Vorhandensein dieser Genomregionen möglicherweise die biologische Wassergas-Shift-Reaktion (WGS) in *P. thermoglucosidasius* antreiben.

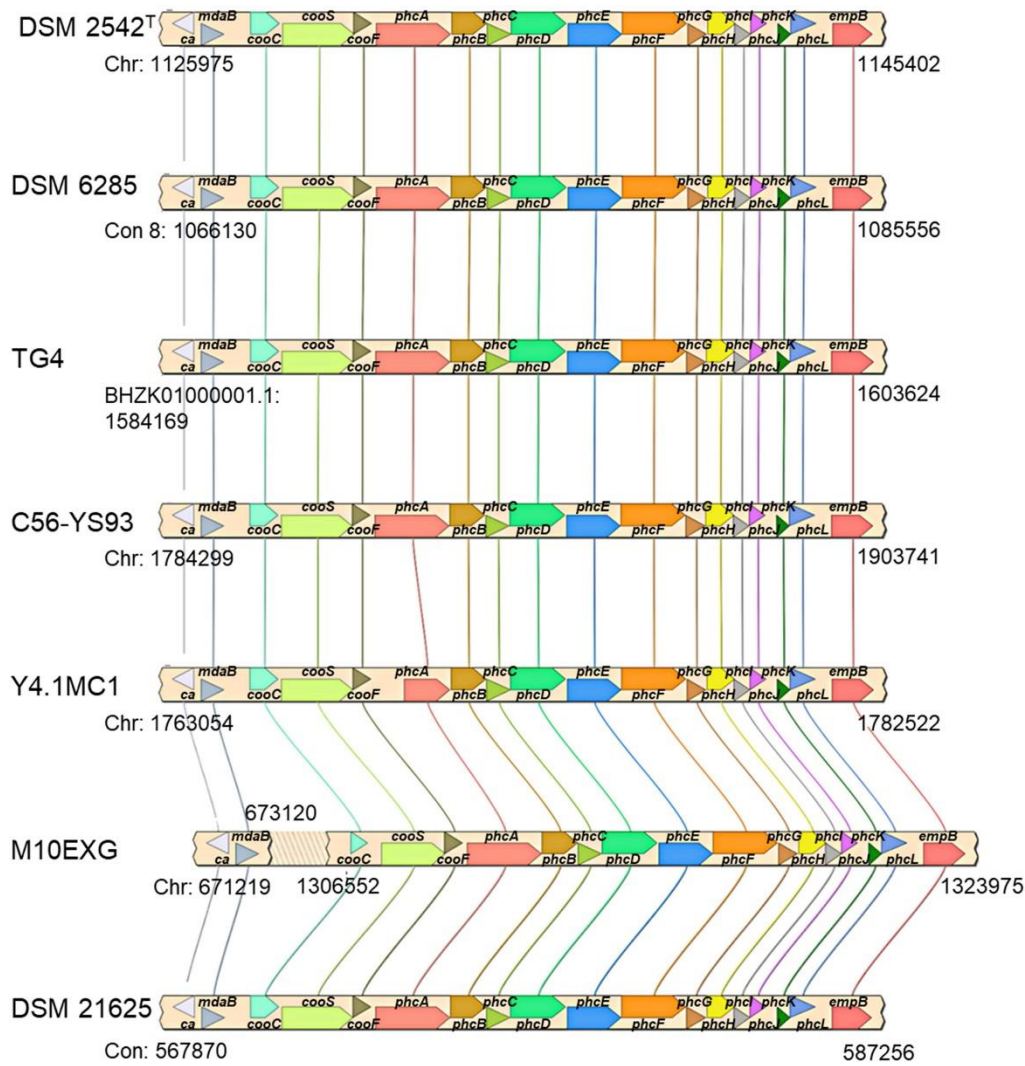


Abbildung 10. *cooCSF-phcA-L*-Locus in sieben *P. thermoglucosidarius*-Genomen, visualisiert mit SimpleSynteny. Nur die Stämme DSM 2542^T, DSM 6285 und TG4 produzieren nachweislich Wasserstoff durch die Oxidation von CO.

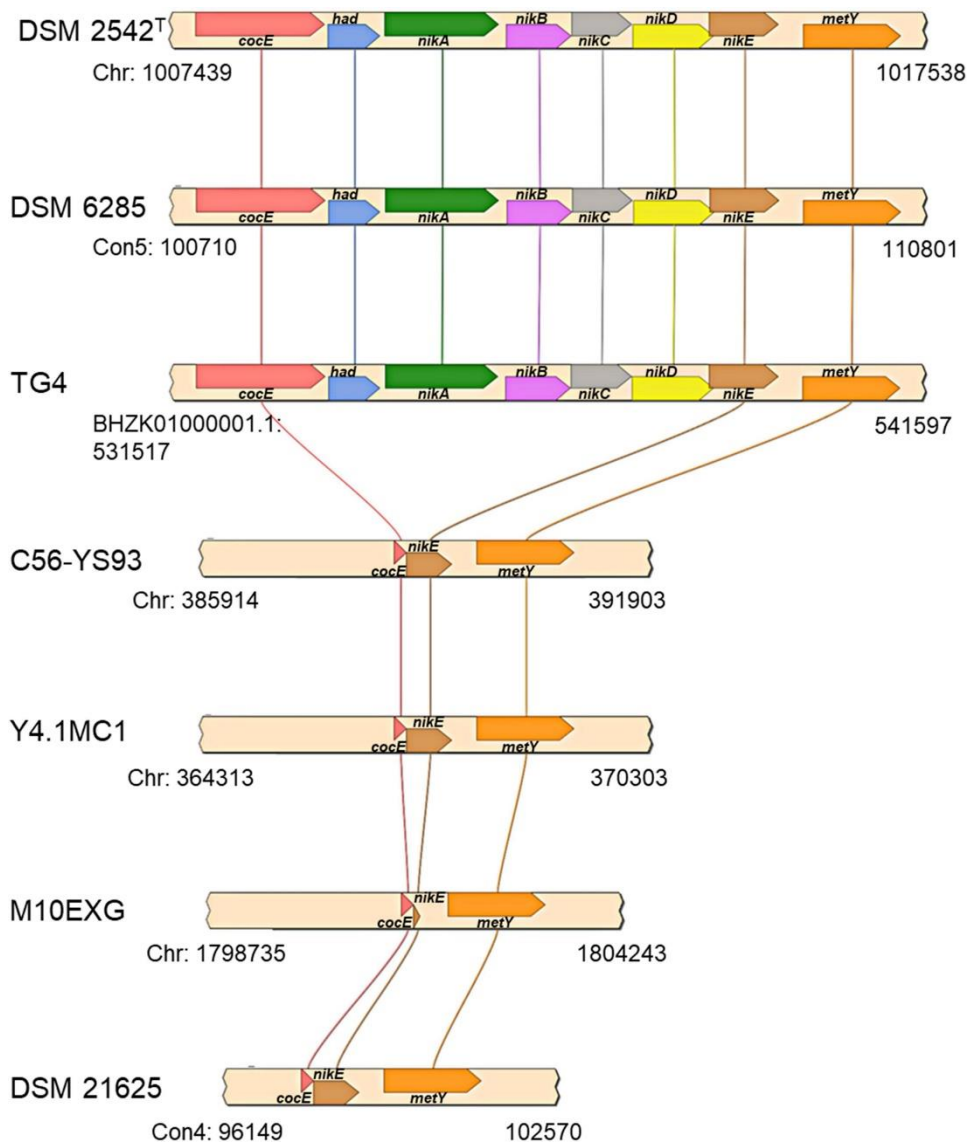


Abbildung 11. Organisation des mutmaßlichen Nickel-Transport-Locus (HSUL 1), der auf wasserstoffproduzierenden *P. thermoglucosidarius*-Stämmen vorhanden ist, dargestellt mit Hilfe von SimpleSynteny. *cocE*, *had*, *nikA*, *nikBC*, *nikDE* und *metY* kodieren für mutmaßliche Cocainesterase, mutmaßliche Hydrolase der HAD-Superfamilie, Peptid/Nickel-Transportsystem-Substratbindung, Permease, ATP-bindende Proteine und *O*-Acetylhomoserin(thiol)- Lyase.

Die Transkriptomanalyse (Abb. 12) mit *P. thermoglucosidarius* DSM 6285 zeigte jedoch eine erhöhte genetische Aktivität im HSUL-2-Locus über den Übergang zwischen aerobem Wachstum und WGS-Reaktionsphase. Gleichzeitig wurde die Expression von PtPL-Genen, die mit dem Metabolismus des Nebenprodukts der Katecholspaltung (*dmpCH* und *bphH-J*) assoziiert sind, unterdrückt. Die Bedeutung der beobachteten Unterschiede in der Expression der Phenol-Katabolisierungsgene der beiden Loci ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es könnte jedoch spekuliert werden, dass das HSUL2-Locus-Gen *petF*, das für ein 2Fe-2S-Ferredoxin kodiert und einzigartig für die hydrogenogenen *P. thermoglucosidarius*-Stämme ist, eine zentrale Rolle bei der Modulation des Katecholabbaus in der Zeit vor der WGS-Reaktion spielt.

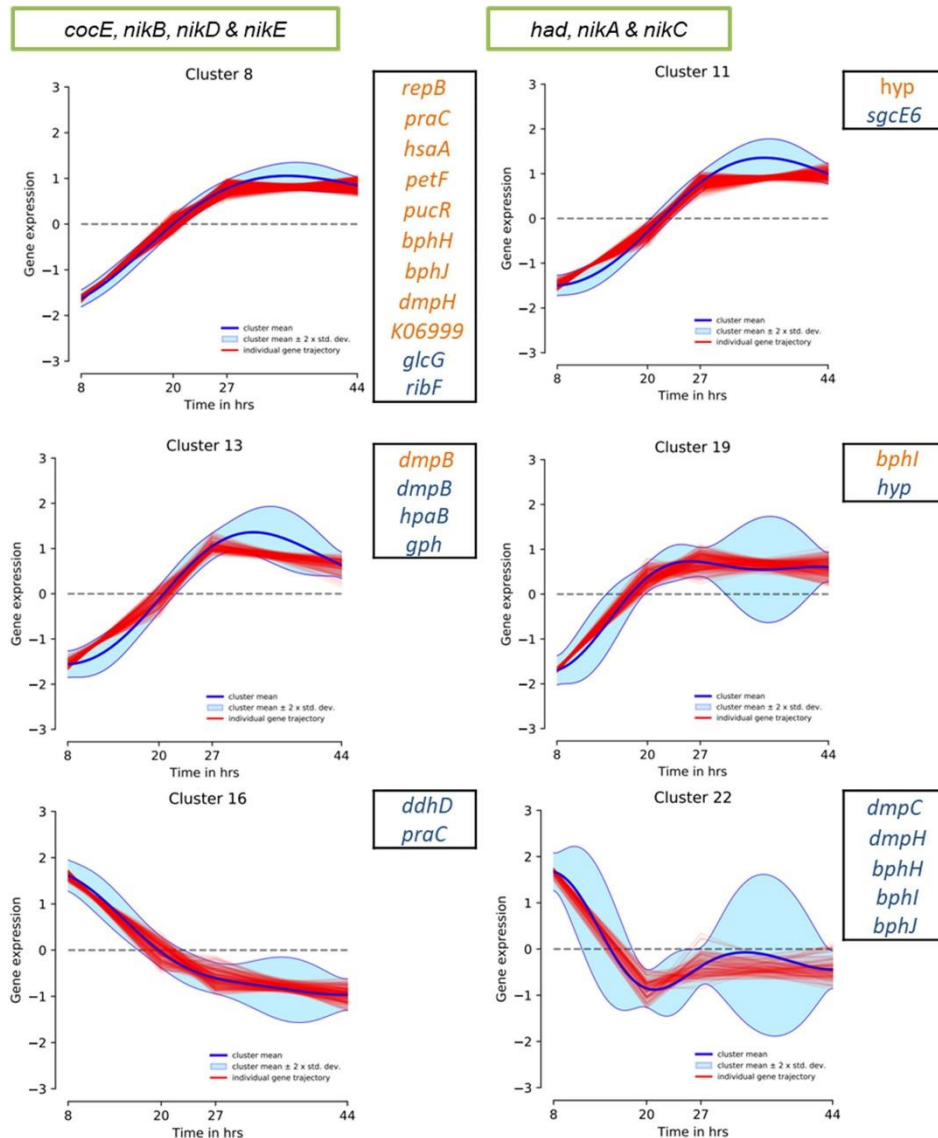


Abbildung 12. DP_GP_cluster-Trajektorie der differentiell exprimierten Gene von *P. thermoglucosidarius* DSM 6285, die in den Clustern 8, 11, 13 und 19 angeordnet sind. Der Stamm wurde unter einer anfänglichen Gasatmosphäre von 50 % CO und 50 % Luft kultiviert und es wurden Proben für die Expressionsanalyse mittels RNA-seq über vier Zeitpunkte entnommen (Aliyu et al., 2020). Die grüne Box zeigt Gene, die in HSUL 1 platziert wurden, und die schwarze Box hebt Plasmid-Gene von HSUL 2 und PtPL hervor. Blaue und orangefarbene Schriftarten kennzeichnen PtPL- bzw. HSUL 2-Gene.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mehrheit der bisher analysierten Stämme von *P. thermoglucosidarius* nicht in der Lage sind, die WGS-Reaktion unter den beschriebenen Bedingungen zu katalysieren. Offensichtliche Genverluste, die Gene betreffen, die mit der intrazellulären Entgiftung sowie der Verfügbarkeit von Nickel und Eisen in Zusammenhang stehen, spielen wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der Entstehung der beobachteten Unterschiede in den hydrogenogenen Fähigkeiten von *P. thermoglucosidarius*-Stämmen. Dies schließt jedoch nicht aus, dass die Nicht-CO-Oxidierer die WGS-Reaktion unter veränderten Kultivierungsbedingungen katalysieren können, beispielsweise durch Ergänzung mit optimalen Mengen an Nickel und Eisen. Eine weitere Charakterisierung der Nickel- und Eisenaufnahmesysteme von *P. thermoglucosidarius* könnte einen besseren Einblick in ihre Rolle bei der Modulation der WGS-Reaktion geben.

1.7 Referenzen

1. Sivaramakrishnan R, Shanmugam S, Sekar M, Mathimani T, Incharoensakdi A, Kim S-H, et al. Insights on biological hydrogen production routes and potential microorganisms for high hydrogen yield. *Fuel*. 2021;291:120136.
2. Cabrol L, Marone A, Tapia-Venegas E, Steyer J-P, Ruiz-Filippi G, Trably E. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41:158-81.
3. Sherif SA, Barbir F, Veziroglu TN. Windenergie und Wasserstoffwirtschaft - Überblick über die Technologie. *Solar Energy*. 2005;78:647-60.
4. da Silva Veras T, Mozer TS, da Costa Rubim Messeder dos Santos D, da Silva César A. Hydrogen: Trends, Produktion und Charakterisierung der wichtigsten Verfahren weltweit. *Int J Hydrogen Energy*. 2017;42:2018-33.
5. Nikolaidis P, Poullikkas A. A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017;67:597-611.
6. Aliyu H, Mohr T, Cowan D, De Maayer P, Neumann A. Time-Course Transcriptome of *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285 Grown in the Presence of Carbon Monoxide and Air. *Int J Mol Sci*. 2020;:1-17.
7. Mohr T, Aliyu H, Biebinger L, Gödert R, Hornberger A, Cowan D, et al. Effects of different operating parameters on hydrogen production by *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285. *AMB Express*. 2019;9:207.
8. Aliyu H, De Maayer P, Neumann A. Not All That Glitters Is Gold: The Paradox of CO-dependent Hydrogenogenesis in *Parageobacillus thermoglucosidasius*. *Front Microbiol*. 2021;12.
9. Mohr T, Aliyu H, Küchlin R, Zwick M, Cowan D, Neumann A, et al. Comparative genomic analysis of *Parageobacillus thermoglucosidasius* strains with distinct hydrogenogenic capacities. *BMC Genomics*. 2018;19:880.
10. Dong Y, Zhang Y, Liu D, Chen Z. Strain and process engineering towards continuous industrial fermentation. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 2023;17:1336-53.
11. Xavier JC, Preiner M, Martin WF. Something special about CO-dependent CO₂ fixation. *FEBS J*. 2018;285:4181-95.
12. Aliyu H, Kastner R, De Maayer P, Neumann A. Carbon Monoxide Induced Metabolic Shift in the Carboxydophilic *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285. *Microorganisms* . 2021;9.
13. St-Pierre Lemieux G, Groleau D, Proulx P. Introduction on Foam and its Impact in Bioreactors. *Canadian Journal of Biotechnology*. 2019;3:143-57.
14. Tiso T, Demling P, Karmainski T, Oraby A, Eiken J, Liu L, et al. Foam control in biotechnological processes-challenges and opportunities. *Discover Chemical Engineering*. 2024;4.
15. Greening C, Biswas A, Carere CR, Jackson CJ, Taylor MC, Stott MB, et al. Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H₂ is a widely utilized energy source for microbial growth and survival. *ISME J*. 2016;10:761-77.

16. Schoelmerich MC, Müller V. Energy conservation by a hydrogenase-dependent chemiosmotic mechanism in an ancient metabolic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116:6329-34.
17. Adachi Y, Inoue M, Yoshida T, Sako Y. Genetic Engineering of Carbon Monoxide-dependent Hydrogen-producing Machinery in *Parageobacillus thermoglucosidasius*. *Microbes Environ*. 2020;35.
18. Unden G. Transcriptional regulation and energetics of alternative respiratory pathways in facultatively anaerobic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetik*. 1998;1365:220-4.
19. Mol M, Ardila MS, Mol BA, Aliyu H, Neumann A, de Maayer P. The effects of synthesis gas feedstocks and oxygen perturbation on hydrogen production by *Parageobacillus thermoglucosidasius*. *Microb Cell Fact*. 2024;23:125.
20. Mol M, de Maayer P. Elucidating the biotechnological potential of the genera *Parageobacillus* and *Saccharococcus* through comparative genomic and pan-genome analysis. *BMC Genomics*. 2024;25.
21. Mohr T, Aliyu H, Küchlin R, Polliack S, Zwick M, Neumann A, et al. CO -abhängige Wasserstoffproduktion durch den fakultativen Anaerobier *Parageobacillus thermoglucosidasius*. *Microb Cell Fact*. 2018;:1-12.
22. Sivalingam V, Haugen T, Wentzel A, Dinamarca C. Effect of Elevated Hydrogen Partial Pressure on Mixed Culture Homoacetogenesis. *Wissenschaft der chemischen Technik: X*. 2021;12:100118.
23. Mohr T, Infantes A, Biebinger L, De Maayer P, Neumann A. Acetogenic Fermentation From Oxygen Containing Waste Gas. 2019;7 December:1-6.
24. Perret L, Boukis N, Sauer J. Synthesegasfermentation bei hoher Zelldichte: Wie pH-Wert und Wasserstoffpartialdruck die Produktivität und das Produktverhältnis bei kontinuierlicher Fermentation beeinflussen. *Bioresour Technol*. 2024;391.
25. Alfano M, Cavazza C. The biologically mediated water-gas shift reaction: structure, function and biosynthesis of monofunctional [NiFe]-carbon monoxide dehydrogenases. *Sustain Energy Fuels*. 2018;2:1653-70.
26. Hurst KM, Lewis RS. Auswirkungen des Kohlenmonoxidpartialdrucks auf den Stoffwechselprozess der Synthesegasfermentation. *Biochem Eng J*. 2010;48:159-65.
27. Mandal B, Nath K, Das D. Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol Lett*. 2006;28:831-5.
28. Zhao Y, Cimpioia R, Liu Z, Guiot SR. Kinetik der CO-Umwandlung in H₂ durch *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;91:1677-84.

1.8 Publikationen aus dem Projekt zusammen mit den südafrikanischen Partnern:

Not All That Glitters Is Gold: The Paradox of CO-dependent Hydrogenogenesis in *Parageobacillus thermoglucosidasius*. H Aliyu, P de Maayer, A Neumann;
Frontiers in Microbiology 12, 784652; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.784652>

Effect of different partial pressures on H₂ production with *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285. Magda S. Ardila, Habibu Aliyu, Pieter de Maayer, Anke Neumann.
Fermentation (2024), 10, 592. <https://doi.org/10.3390/fermentation10110592>

The effects of synthesis gas feedstocks and oxygen perturbation on hydrogen production by *Parageobacillus thermoglucosidasius*. Michael Mol, Magda S. Ardila, Bronwyn Ashleigh Mol, Habibu Aliyu, Anke Neumann, and Pieter de Maayer.
Microbial Cell Factories (2024), 23:125. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02391-4>

Batch and semi-continuous fermentation with *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285 for H₂ production. Magda S. Ardila, Habibu Aliyu, Pieter de Maayer, Anke Neumann. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts (2025), 18:3. <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02597-z>

Evaluation of lab-defined syngas as a substrate for H₂ production with *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 6285. Magda S. Ardila, Habibu Aliyu, Pieter de Maayer, Anke Neumann.
Manuscript in preparation.