

Methanotrophe Bakterien als Produzenten von  
Poly-( $\beta$ -hydroxybuttersäure) (PHB) –  
Charakterisierung des Prozesses, des Polymers und einer stabilen Mischkultur

Von der Fakultät Maschinenwesen

der

TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DRESDEN

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

angenommene Dissertation

von

Dipl.-Ing. JANA HELM

geboren am 09.03.1970 in Wolfen.

Tag der Einreichung: 22.11.2001

Tag der Verteidigung: 22.05.2002

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. T. Bley  
Prof. Dr. rer. nat. habil. U. Stottmeister  
Prof. Dr. rer. nat. habil. G. Klappach

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr.-Ing. N. Mollekopf



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1997 – November 2001 am UFZ – Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH in der Sektion Sanierungsforschung unter der Leitung von Frau Dr. KARIN-DAGMAR WENDLANDT und Herrn Prof. Dr. ULRICH STOTTMEISTER angefertigt.

Die Arbeiten wurden als Teil des Verbundprojektes „Biotechnologische Herstellung von Polymeren mit spezifischen Werkstoffeigenschaften“ von Juni 1997 bis Dezember 1999 vom Sächsischen Staatsministerium für Wissenschaft und Kunst (SMWK) gefördert.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. K.-D. WENDLANDT und Herrn Prof. U. STOTTMEISTER für die Überlassung des interessanten Themas, die intensive fachliche Betreuung und die ständige Bereitschaft zur förderlichen Diskussion.

Herrn Prof. T. BLEY danke für die Übernahme der universitären Betreuung und seine Unterstützung in der Endphase der Bearbeitung.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Methanotrophe Bakterien“ der Sektion Sanierungsforschung für jegliche Unterstützung und das gute Arbeitsklima bedanken. Frau Dr. K.-D. WENDLANDT ein spezielles Dankeschön für die Durchsicht des gesamten Manuskriptes und die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen. Ausdrücklich danke ich Frau E. KNAAK für die sehr gute Zusammenarbeit, ihren unermüdlichen Einsatz bei der Durchführung der Experimente und moralischen Beistand in schwierigen Phasen der Bearbeitung. Für die Ausführung der mikrobiologischen Arbeiten danke ich sehr herzlich: Frau Dipl.-Biol. G. ROGGE (Universität Leipzig), Frau B. RULLE und Frau G. OEHME. Für die Unterstützung bei der Auswertung der zahlreichen Versuchsdaten, hilfreiche Diskussionen sowie die Durchführung und Auswertung der massenspektrometrischen Gasanalysen gilt mein Dank Herrn Dipl.-Ing. M. JECHOREK. Danke auch an Frau Dipl.-Biol. B. MEIBNER und Herrn Dr. M. BECK für die schöne Zeit.

Weiterhin danke ich für den technischen Beistand: Herrn H. ZEIDLER, Herrn D. HALM, Herrn G. MILITSCH, insbesondere aber Herrn H.-J. ROST für die uneingeschränkte Unterstützung (Sektion Sanierungsforschung, UFZ).

Mein Dank für die Durchführung von ionenchromatografischen Analysen gilt Frau G. PLÖTZE (Sektion Sanierungsforschung, UFZ).

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. J. FLACHOWSKI, Herrn Dr. H. BORSODORF und Frau D. SONNTAG für CHN-Analysen von PHB- und Biomasseproben, weiterhin Herrn Dr. R. WENNRICH und seinen Mitarbeitern für die Analyse verschiedener Elemente in Biomasse- und Flüssigproben sowie Herrn Dr. H.J. STÄRK für die Schwermetallbestimmungen (Arbeitsgruppe Anorganische Analytik der Sektion Analytik, UFZ).

Ein herzliches Dankeschön an Herrn Dr. H.J. HEIPIEPER und Frau A. MILTNER für die Hilfe bei der Durchführung der FAME-Analysen sowie Herrn Dr. J. PÖRSCHMANN für die eindeutige Identifizierung der C18:1 $\omega$ 8-Fettsäure (Sektion Sanierungsforschung, UFZ).

Herrn Dr. H.H. RICHNOW danke ich sehr für die Durchführung der <sup>13</sup>C-Messungen (Sektion Sanierungsforschung, UFZ).

Vielen Dank an Dr. C. LÖSER (TU Dresden, Institut für Lebensmitteltechnik und Bioverfahrenstechnik) für seine Hinweise bei der Erstellung des Prozeßmodells.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei Dr. UWE KAPPELMEYER: für seine große Hilfe beim Einstieg in die Welt der Molekularbiologie, die zahlreichen wertvollen Diskussionen, Rat und Tat bei allen computertechnischen Problemen; insbesondere jedoch für sein Verständnis in den schwierigen „Schreibphasen“ sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden in Altmittweida, Leipzig und Laucha danke ich für die moralische Unterstützung und zahllose Aufmunterungen während der gesamten Zeit, besonders aber in den letzten Monaten.

Vor allem danke ich ULI SCHWARZ-LINEK extra herzlich. Er gab mir Mut und Kraft, diese Arbeit fertigzustellen und so viel mehr.

INHALTSVERZEICHNIS

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen | VII   |           |
| Verzeichnis der verwendeten Symbole     | X   |           |
| Verzeichnis der verwendeten Indizes     | XII   |           |
| <b>1</b>                                | <b>EINLEITUNG</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1                                     | Biologisch abbaubare Werkstoffe   | 1         |
| 1.2                                     | Der Markt für PHA: <i>high-price-low-volume</i> -Produkte                                 | 3         |
| 1.3                                     | Poly-( $\beta$ -hydroxybutyrat): Ein bioabbaubarer Werkstoff mit besonderen Eigenschaften | 4         |
| 1.4                                     | PHB aus Methan  | 5         |
| 1.5                                     | Aufgabenstellung  | 7         |
| <b>2</b>                                | <b>SYSTEMANALYSE</b>  | <b>9</b>  |
| 2.1                                     | <b>Polyhydroxyalkansäurester (PHA)</b>  | <b>9</b>  |
| 2.1.1                                   | Historisches  | 9         |
| 2.1.2                                   | Vorkommen und Funktion von PHA  | 11        |
| 2.1.2.1                                 | Vorkommen   | 11        |
| 2.1.2.2                                 | PHA-Granula   | 12        |
| 2.1.2.3                                 | Funktion von PHA in Bakterien   | 13        |
| 2.1.3                                   | Struktur, Eigenschaften und Analytik von PHA  | 14        |
| 2.1.3.1                                 | Chemische Struktur von PHA  | 14        |
| 2.1.3.2                                 | Eigenschaften von PHA   | 17        |
| 2.1.3.3                                 | Analytik von PHA  | 19        |
| 2.1.4                                   | Biosynthese von PHA   | 20        |
| 2.1.5                                   | Abbau von PHA   | 23        |
| 2.1.6                                   | Überblick über technisch relevante Prozesse der PHA-Herstellung                           | 25        |
| 2.1.6.1                                 | PHA-Synthese in Wildtyp-Bakterien   | 26        |
| 2.1.6.1.1                               | <i>scf</i> -PHA   | 26        |
| 2.1.6.1.2                               | <i>mcl</i> -PHA   | 27        |
| 2.1.6.1.3                               | PHA aus alternativen, kostengünstigen Substraten  | 27        |
| 2.1.6.2                                 | PHA-Synthese mit rekombinanten Bakterien  | 29        |
| 2.1.6.3                                 | PHA-Synthese in transgenen Pflanzen   | 30        |
| 2.1.6.4                                 | Zusammenfassung und ökonomische Aspekte   | 30        |
| 2.2                                     | <b>Methan als Substrat zur PHB-Synthese</b>   | <b>31</b> |
| 2.2.1                                   | Methanotrophe Bakterien   | 31        |
| 2.2.2                                   | P(3-HB)-Bildung in methanotrophen Bakterien   | 34        |
| 2.2.3                                   | Spezifik der mikrobiellen Methanoxidation   | 34        |
| 2.2.3.1                                 | Ausbeuten der Biomassebildung aus Methan  | 34        |
| 2.2.3.2                                 | Ausbeuten der PHB-Bildung aus Methan  | 38        |
| 2.2.3.3                                 | Nutzung von Mischkulturen zur Methanfermentation  | 39        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.2.3.4    | Methan als gasförmige Kohlenstoffquelle                    | 44        |
| <b>2.3</b> | <b>Prozeßmodell</b>  | <b>46</b> |
| 2.3.1      | Vorbetrachtungen   | 46        |
| 2.3.2      | Erstellen von Bilanzen                                     | 47        |
| 2.3.3      | Bioreaktormodell   | 48        |
| 2.3.3.1    | Betrachtungen für die Flüssigphase                         | 49        |
| 2.3.3.2    | Betrachtungen für die Gasphase                             | 50        |
| 2.3.4      | Reaktionskinetisches Modell                                | 50        |
| <b>3</b>   | <b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>                            | <b>51</b> |
| <b>3.0</b> | <b>Mikroorganismen</b>                                     | <b>51</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Fermentationsversuche</b>                               | <b>51</b> |
| 3.1.1      | Bioreaktoren   | 51        |
| 3.1.2      | Allgemeine Kultivierungsbedingungen                        | 52        |
| 3.1.3      | Spezielle Kultivierungsbedingungen                         | 53        |
| 3.1.3.1    | Gewinnung von Impfmateriäl                                 | 53        |
| 3.1.3.2    | Wachstumsprozesse zur Vorbereitung der PHB-Bildung         | 54        |
| 3.1.3.3    | PHB-Bildungsprozesse                                       | 54        |
| <b>3.2</b> | <b>Prozeßkontrolle</b>                                     | <b>54</b> |
| 3.2.1      | <i>online</i> -Analysen                                    | 54        |
| 3.2.1.1    | Zusammensetzung der Ein- und Ausgangsgase                  | 54        |
| 3.2.1.2    | pH-Wert  | 55        |
| 3.2.1.3    | Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration                  | 55        |
| 3.2.2      | <i>off-line</i> -Analysen                                  | 55        |
| 3.2.2.1    | Biomassekonzentration                                      | 55        |
| 3.2.2.2    | Ammonium-Stickstoff-Konzentration                          | 56        |
| 3.2.2.3    | Phosphat-Phosphor-Konzentration                            | 56        |
| 3.2.2.4    | Kupferkonzentration  | 57        |
| <b>3.3</b> | <b>Methoden zur Charakterisierung der PHB-Akkumulation</b> | <b>57</b> |
| 3.3.1      | Nilrot-Färbung   | 57        |
| 3.3.2      | PHB-Schnellbestimmung mit Natriumhypochlorit               | 57        |
| 3.3.3      | Gaschromatographische Bestimmung des PHB-Gehaltes          | 57        |
| <b>3.4</b> | <b>Bilanzierung der Wachstumsprozesse</b>                  | <b>58</b> |
| <b>3.5</b> | <b>Bilanzierung des Produktbildungsprozesses</b>           | <b>59</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Weiterführende Analysen der Kulturflüssigkeit</b>       | <b>62</b> |
| 3.6.1      | Bestimmung von Ionen in der Kulturflüssigkeit              | 62        |
| 3.6.2      | Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)                          | 63        |
| 3.6.3      | Bestimmung des Restsalzkonzentration                       | 63        |
| 3.6.4      | Kinematische Viskosität der Kulturflüssigkeit              | 63        |
| <b>3.7</b> | <b>Analyse der Biomassezusammensetzung</b>                 | <b>63</b> |
| 3.7.1      | Elementaranalyse (CHN-Bestimmung)                          | 63        |
| 3.7.2      | Bestimmung von Phosphor, Schwefel, Kalium und Magnesium    | 63        |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 3.7.3       | Schwermetallgehalt   | 64        |
| 3.7.4       | Analyse der Fettsäuremethylester (FAME)  | 64        |
| 3.7.4.1     | Extraktion und Veresterung der Fettsäuren  | 64        |
| 3.7.4.2     | Analyse der FAME's mittels GC-MS   | 64        |
| 3.7.4.3     | Bestimmung der <sup>13</sup> C-Isotopenwerte der Fettsäuren  | 64        |
| <b>3.8</b>  | <b>Methoden zur Gewinnung und Charakterisierung des Polymers</b>                                       | <b>65</b> |
| 3.8.1       | Aufarbeitung und Trocknung der PHB-haltigen Biomasse   | 65        |
| 3.8.2       | Extraktion des Polymers  | 65        |
| 3.8.3       | Berechnung der Extraktionsausbeute   | 65        |
| 3.8.4       | Viskosimetrische Molekulargewichtsbestimmung   | 66        |
| 3.8.4.1     | Probenvorbereitung   | 66        |
| 3.8.4.2     | Messung der Durchlaufzeiten  | 66        |
| 3.8.4.3     | Ermittlung der Polymerkonzentration der Lösung   | 66        |
| 3.8.4.4     | Auswertung und Berechnung  | 66        |
| 3.8.5       | Molekulargewichtsbestimmung mit GPC  | 67        |
| 3.8.6       | Bestimmung des Stickstoffgehaltes  | 67        |
| 3.8.7       | Schwermetallgehalt   | 67        |
| 3.8.8       | Bestimmung der Biokompatibilität   | 67        |
| <b>3.9</b>  | <b>Mikrobiologische Methoden</b>   | <b>68</b> |
| 3.9.1       | Gesamtzellzahl   | 68        |
| 3.9.2       | Bestimmung des Anteils methanotropher Bakterien  | 68        |
| 3.9.3       | Isolierung durch Ausplattieren unterschiedlicher Verdünnungsstufen                                     | 68        |
| 3.9.4       | Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (KBE)  | 69        |
| 3.9.5       | Bestimmung der <i>most probable number</i> (MPN)   | 69        |
| 3.9.6       | Immunofluoreszenz-Färbung  | 70        |
| <b>3.10</b> | <b>Molekularbiologische Methoden</b>   | <b>70</b> |
| 3.10.1      | DNA-Extraktion   | 70        |
| 3.10.2      | PCR  | 71        |
| 3.10.2.1    | PCR zur Amplifizierung der 16S-rDNA  | 71        |
| 3.10.2.2    | PCR zur Amplifizierung einer pMMO-Teilsequenz  | 72        |
| 3.10.2.3    | RAPD-PCR   | 72        |
| 3.10.2.4    | PCR in Vorbereitung der DGGE   | 73        |
| 3.10.3      | Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)  | 74        |
| <b>3.11</b> | <b>Untersuchungen zum Screening von methanotrophen PHB-Produzenten</b>                                 | <b>75</b> |
| 3.11.1      | Voruntersuchungen in Schüttelkolben  | 75        |
| 3.11.2      | Weiterführende Untersuchungen zur PHB-Bildung mit dem Stamm <i>Methylocystis</i> sp. GB 14 (DSM 12955) | 76        |
| 3.11.2.1    | Mikroorganismus  | 76        |
| 3.11.2.2    | Gewinnung von Impfmateriail  | 76        |
| 3.11.2.3    | Durchführung von Fementationsprozessen   | 76        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 4         | <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>78</b> |
| 4.1       | <b>Definition von Zielgrößen zur Beurteilung des PHB-Bildungsprozesses</b>  | <b>78</b> |
| 4.2       | <b>Methodische Entwicklungen zur Prozeßkontrolle</b>  | <b>78</b> |
| 4.2.1     | Entwicklung einer Schnellmethode zur Bestimmung des PHB-Gehaltes  | 78        |
| 4.2.2     | Viskosimetrische Molekulargewichtsbestimmung  | 80        |
| 4.2.2.1   | Voruntersuchungen: Nachweis der Notwendigkeit der Polymerextraktion   | 80        |
| 4.2.2.2   | Voruntersuchungen: Einfluß des Trocknungsprozesses  | 80        |
| 4.2.2.3   | Auswahl des Extraktionsmittels und des Verfahrens   | 81        |
| 4.3       | <b>Untersuchungen zum Wachstumsprozeß</b>   | <b>83</b> |
| 4.3.1     | Gewinnung von Impfmateriäl  | 83        |
| 4.3.2     | Wachstumsprozeß in Vorbereitung der PHB-Bildung   | 88        |
| 4.3.3     | Umsatzgleichungen für die Bildung von Biomasse aus Methan   | 94        |
| 4.3.4     | Charakterisierung der Biomasse und der Kulturflüssigkeit  | 94        |
| 4.3.4.1   | Chemische Zusammensetzung der Biomasse  | 94        |
| 4.3.4.2   | Zusammensetzung der Kulturflüssigkeit während der kontinuierlichen Wachstumsphasen  | 95        |
| 4.3.4.2.1 | Ionen in der Kulturflüssigkeit  | 96        |
| 4.3.4.2.2 | Restsalzkonzentration   | 97        |
| 4.3.4.2.3 | Organischer Kohlenstoff   | 97        |
| 4.3.4.3   | Kinematische Viskosität der Kulturflüssigkeit   | 97        |
| 4.4       | <b>Untersuchungen zur PHB-Synthese</b>  | <b>98</b> |
| 4.4.1     | Nachweis der nichtwachstumsassoziierten PHB-Synthese bei <i>Methylocystis</i> sp. GB 25                                     | 98        |
| 4.4.2     | Einfluß von allgemeinen Milieubedingungen auf die PHB-Synthese  | 100       |
| 4.4.2.1   | Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration   | 100       |
| 4.4.2.2   | Einfluß des pH-Wertes   | 101       |
| 4.4.2.3   | Vergleich verschiedener Prozeßregimes während der PHB-Bildung   | 102       |
| 4.4.2.4   | Zusammenfassung der Ergebnisse der Voruntersuchungen zu allgemeinen Milieubedingungen, Empfehlungen für weitere Experimente | 103       |
| 4.4.3     | Ermittlung der Prozeßkennziffern in Abhängigkeit von den Mangelbedingungen  | 103       |
| 4.4.3.1   | PHB-Synthese unter Ammonium-Stickstoffmangel  | 104       |
| 4.4.3.2   | PHB-Synthese unter Phosphatmangel   | 110       |
| 4.4.3.4   | Initiierung der PHB-Bildung durch Schwefel-, Kalium-, Magnesium-, Eisen-, und Manganmangel                                  | 116       |
| 4.4.3.4.1 | PHB-Gehalt  | 116       |
| 4.4.3.4.2 | Spezifische PHB-Bildungsrate, Produktivität der PHB-Bildung   | 121       |
| 4.4.3.4.3 | Spezifische Ausbeutekoeffizienten   | 123       |
| 4.4.3.4.4 | PHB-Synthese unter Sauerstofflimitation   | 124       |
| 4.4.3.4.5 | Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung  | 125       |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.4.4      | Chemische Zusammensetzung der Biomasse während der PHB-Synthese   | 126        |
| 4.4.4.1    | Stickstoffgehalt  | 126        |
| 4.4.4.2    | Gehalt der Biomasse an weiteren ausgewählten Elementen  | 128        |
| 4.4.4.3    | Zusammenfassung   | 131        |
| 4.4.5      | Charakterisierung der Eigenschaften der Kulturflüssigkeit während der PHB-Synthese                      | 131        |
| 4.4.5.1    | Ionen in der Kulturflüssigkeit  | 131        |
| 4.4.5.2    | Gehalt an organischem Kohlenstoff und kinematische Viskosität   | 132        |
| 4.4.6      | Charakterisierung des gebildeten Polymers   | 134        |
| 4.4.6.1    | Mittleres Molekulargewicht und Molekulargewichtsverteilung  | 134        |
| 4.4.6.1.1  | Endwerte nach 24 h PHB-Synthese   | 134        |
| 4.4.6.1.2  | Bestimmung des mittleren Molekulargewichtes und der Uneinheitlichkeit in Abhängigkeit vom Prozeßverlauf | 135        |
| 4.4.6.2    | Qualität des Polymers im Hinblick auf den Einsatz als Medizinprodukt                                    | 139        |
| 4.4.6.2.1  | Stickstoffgehalt des Polymers   | 139        |
| 4.4.6.2.2  | Schwermetallgehalt des Polymers   | 139        |
| 4.4.6.2.3  | Untersuchungen zur Biokompatibilität  | 141        |
| 4.4.6.3    | Weitere Eigenschaften   | 143        |
| 4.4.6.3.1  | NMR-Untersuchungen zum Nachweis von 3-HB  | 143        |
| 4.4.6.3.2  | Physikalische und mechanische Eigenschaften   | 145        |
| <b>4.5</b> | <b>Prozeßmodell und Simulation</b>  | <b>145</b> |
| 4.5.1      | Randbedingungen   | 145        |
| 4.5.2      | Bilanzen für Komponenten der Flüssigphase   | 146        |
| 4.5.3      | Bilanzen für Komponenten der Gasphase   | 147        |
| 4.5.4      | Reaktionskinetik  | 148        |
| 4.5.5      | Simulation  | 149        |
| <b>4.6</b> | <b>Charakterisierung der Mischkultur und Nachweis ihrer Stabilität</b>                                  | <b>151</b> |
| 4.6.1      | Mikrobiologische Charakterisierung der methanotrophen Mischkultur                                       | 152        |
| 4.6.1.1    | Gesamtzellzahlen und Anteil methanotropher Bakterien durch mikroskopische Bestimmung                    | 152        |
| 4.6.1.2    | Gesamtzellzahlen und Anteil methanotropher Bakterien durch Analyse mit Coulter-Counter                  | 154        |
| 4.6.1.3    | Coulter-Counter-Analysen zur Größen- und Volumenverteilung der Mischkultur                              | 156        |
| 4.6.1.4    | Identifizierung der methanotrophen Hauptkomponente mittels Immunofluoreszenz                            | 157        |
| 4.6.1.5    | Die Komponenten der Mischkultur   | 158        |
| 4.6.1.5.1  | Gewinnung von Isolaten/Bestimmung der KBE   | 158        |
| 4.6.1.5.2  | Bestimmung der <i>most probable number</i> (MPN)  | 160        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.6.2      | Charakterisierung der Mischkultur mittels Fettsäureanalyse und <sup>13</sup> C-Isotopenanalysen                       | 160        |
| 4.6.3      | Molekularbiologische Untersuchungen   | 164        |
| 4.6.3.1    | Identifizierung und taxonomische Einordnung mittels Sequenzierung von Abschnitten der 16Sr-DNA und funktioneller Gene | 165        |
| 4.6.3.2    | Untersuchungen zur Unterscheidung der Isolate durch RAPD-PCR  | 167        |
| 4.6.3.3    | Nachweis der Stabilität der Mischkultur durch PCR-DGGE  | 167        |
| <b>4.7</b> | <b>Anwendungsorientierte Untersuchungen in Bezug auf Prozeß und Polymer</b>   | <b>170</b> |
| 4.7.1      | Modellversuche mit Erdgas   | 170        |
| 4.7.1.1    | Prozeßspezifische Kenndaten   | 170        |
| 4.7.1.2    | Zusammensetzung der Mischkultur   | 172        |
| 4.7.1.3    | Biokompatibilität   | 172        |
| 4.7.2      | Alternative Stämme zur PHB-Synthese   | 173        |
| 4.7.2.1    | Screening von methanotrophen Stämmen  | 173        |
| 4.7.2.2.1  | Wachstumsprozeß   | 174        |
| 4.7.2.2.2  | Untersuchungen zur PHB-Synthese   | 175        |
| <b>5</b>   | <b>DISKUSSION</b>   | <b>178</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Wachstumsprozesse</b>  | <b>178</b> |
| 5.1.1      | Produktivitäten und Ausbeuten   | 178        |
| 5.1.2      | Zusammensetzung der Biomasse  | 180        |
| 5.1.3      | Problematik der Bildung von Nitrat und Nitrit in der Kulturflüssigkeit  | 181        |
| <b>5.2</b> | <b>PHB-Synthese</b>   | <b>183</b> |
| 5.2.1      | PHB-Gehalt  | 183        |
| 5.2.2      | Spezifische PHB-Bildungsraten   | 187        |
| 5.2.3      | Produktivität der PHB-Bildung   | 190        |
| 5.2.4      | Spezifische Ausbeutekoeffizienten   | 192        |
| 5.2.5      | Mittleres Molekulargewicht und Molekulargewichtsverteilung  | 195        |
| 5.2.6      | Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung der Biomasse  | 199        |
| <b>5.3</b> | <b>Prozeßmodell</b>   | <b>200</b> |
| <b>5.4</b> | <b>Charakterisierung und Stabilität der methanverwertenden Mischkultur</b>  | <b>201</b> |
| <b>5.5</b> | <b>Eigenschaften des Polymers</b>   | <b>209</b> |
| <b>5.6</b> | <b>Alternativkulturen zur PHB-Synthese</b>  | <b>209</b> |
| <b>5.7</b> | <b>Ableitung von Empfehlungen für die Prozeßführung zur Produktion von PHB aus Methan</b>                             | <b>211</b> |
| <b>5.8</b> | <b>Ausblick auf weiteren Forschungsbedarf</b>   | <b>213</b> |
| <b>6</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>215</b> |
| <b>7</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>   | <b>218</b> |

## VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

→ Die Abkürzungen der Monomere der Polyhydroxyalkansäuren finden sich in Tabelle II-3 (Seite 15)

|                 |  |
|-----------------|--|
| 3HBDH           | 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase   |
| AACS            | Acetoacetyl-CoA-Synthase   |
| ADP             | Adenosindiphosphat   |
| AES             | Atomemissionspektroskopie  |
| APS             | Ammoniumpersulfat  |
| AR              | Anreicherungskultur  |
| ARB             | Phylogenie-Software  |
| AT              | Amino-Transferase  |
| ATP             | Adenosintriphosphat  |
| BAW             | biologisch abbaubarer Werkstoff  |
| BLAST           | Software für Sequenzvergleiche   |
| BNL             | Bionolle   |
| BW              | Blindwert  |
| CEA             | Chemisch-enzymatischer Aufschluß   |
| CoA             | Coenzym A  |
| CS              | Citratsynthase   |
| CSB             | Chemischer Sauerstoffbedarf  |
| CSTR            | idealer Rührreaktor mit Durchfluß ( <i>continuous stirred tank reaktor</i> )                     |
| CT              | Bezeichnung für Isolat (Kohlenstoffquelle Citrat)  |
| CytC            | Cytochrom C  |
| DCE             | 1,2-Dichlorethan   |
| DCU             | Kontrolleinheit der Bioreaktoren   |
| DDT             | 1,1,1-Trichlor-2,2-bis-(p-chlorphenyl)-ethan   |
| den             | Denier ist das Gewicht in Gramm für 9000 Meter einer Faser.                                      |
| DGGE            | Denaturierende Gradientengel-Elektrophorese  |
| DH              | Dimer-Hydrolase  |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP            | Desoxynukleotidphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)  |
| DOC             | gelöster Kohlenstoff ( <i>dissolved organic carbon</i> )   |
| DSM             | Stammbezeichnung der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) |
| EA              | Extraktionsausbeute  |
| ED              | Endolase   |
| EPS             | Gasanteil in der Flüssigphase ( <i>gas hold up</i> )   |
| ES              | Essigsäure   |
| FAB-MS          | <i>Fast-Atom-Bombardement</i> - Massenspektrometrie  |
| FAD             | Flavinadenindinukleotid  |
| FADH            | Formaldehyd-Dehydrogenase  |
| FAME            | Fettsäuremethylester ( <i>fatty acid methyl ester</i> )  |
| FDH             | Formiat-Dehydrogenase  |
| FH <sub>4</sub> | Tetrahydrofolsäure   |
| FITC            | Fluorescein-Isothiocyanat  |
| FS              | Probebezeichnung für Fettsäureanalytik   |
| FT-IR           | Fouriertransformierte Infrarotspektroskopie  |
| G-6-P           | Glucose-6-Phosphat   |
| GB              | interne Bezeichnung „Gasbakterium“   |
| GC              | Gaschromatographie   |
| GC-MS           | Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion   |
| GFT             | Gefriertrocknung   |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| GK                        | Glycerat-Kinase  |
| GPC                       | Gelpermeationschromatographie  |
| HDPE                      | Polyethylen hoher Dichte   |
| HPR                       | Hydroxypyruvat-Reduktase   |
| IC                        | Isocitrat  |
| ICDH                      | Isocitrat-Dehydrogenase  |
| ICL                       | Isocitrat-Lyase  |
| ICP-AES                   | Induktiv gekoppelte Plasma-Atomemissionsspektroskopie  |
| ICP-MS                    | Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie   |
| IR                        | Infrarot-  |
| ISTR                      | idealer Rührkesselreaktor ( <i>ideal stirred tank reactor</i> )  |
| KBE                       | Koloniebildende Einheit  |
| LCK                       | Produktbezeichnung für Küvettentest  |
| LDPE                      | Polyethylen niedriger Dichte   |
| LM                        | Lösungsmittel  |
| Lsg.                      | Lösung   |
| MA                        | Bezeichnung für Isolat, Methan als Substrat  |
| MaDH                      | Malat-Dehydrogenase  |
| <i>mcl</i>                | <i>medium chain length</i> , PHA mit Kettenlänge >C5   |
| MCL                       | Malyl-CoA-Lyase  |
| MDH                       | Methanol-Dehydrogenase   |
| MeOH                      | Methanol   |
| MFCS                      | Leitrechnersystem der Bioreaktoren   |
| MITI                      | Ministry of International Trade and Industry (Japan)   |
| MK                        | Mischkultur  |
| MMO                       | Methan-Monooxygenase   |
| MNP                       | 1-Methyl-2-Pyrrolidon  |
| MO                        | Bezeichnung für Isolat, Methanol als Substrat  |
| MPN                       | wahrscheinlichste Keimzahl ( <i>most probable number</i> )   |
| MS                        | Massenspektrometer   |
| MTK                       | Malat-Thiokinase   |
| NA                        | Bezeichnung für Isolat, Nährbouillon+Pepton als Substrat   |
| NAD(P)H/NADP <sup>+</sup> | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte/oxidierte Form)  |
| NADH/NAD <sup>+</sup>     | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte/oxidierte Form)   |
| NCBI                      | Informationstelle für Biotechnologie (Vereinigtes Königreich, UK)<br>(National Centre for Biotechnology Information)       |
| NCIMB                     | Stammsammlung des Vereinigten Königreichs (Aberdeen, UK)<br>(National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria) |
| NL                        | Nährlösung   |
| NMR                       | Kernresonanzspektroskopie  |
| NMS                       | Mineralsalzmedium mit Nitrat als Stickstoffquelle  |
| PA                        | Polyamid   |
| PAA                       | Polyacrylsäurederivate   |
| PC                        | Polycarbonat   |
| PCL                       | Poly-ε-Caprolactone  |
| PDB                       | Standardsubstanz zur Berechnung des <sup>13</sup> C-Isotopenwertes   |
| PDS                       | Polydioxanon   |
| PE                        | Polyethylen  |
| PEPC                      | Phosphoenolpyruvat-Carboxylase   |
| PET                       | Polyethylenterephthalat  |
| PGA                       | Polyglycolsäure  |
| PHA                       | Polyhydroxyalkansäuren   |

---

|            |   |
|------------|---|
| PhaA       | $\beta$ -Ketothiolase   |
| PhaB       | Acetoacetyl-CoA-Reduktase   |
| PhaC       | PHA-Synthase  |
| PhaZ       | PHA-Depolymerase  |
| PHB        | Polyhydroxybuttersäure  |
| PLA        | Poly lactide  |
| PLFA       | Fettsäuren der Phospholipide ( <i>phospholipid fatty acid</i> )                                   |
| PMMA       | Polymethylmethacrylat   |
| pMMO       | Methan-Monooxygenase (partikuläre, gebundene Form)  |
| PP         | Polypropylen  |
| PQQ        | Pyrrulochinolin   |
| PS         | Polystyrol  |
| PTFE       | Polytetrafluorethylen   |
| PUR        | Polyurethan   |
| PVA        | Polyvinylalkohol  |
| PVC        | Polyvinylchlorid  |
| QMS        | Quadrupolmassenspektrometer   |
| R          | Restbiomasse, d.h. aktive Biomasse im strukturierten Modell (R=X-PHB)                             |
| RAPD-PCR   | PCR mit speziellen "Zufallsprimern"   |
| SCCP       | Einzelstrang-Konformitätsanalyse  |
| <i>scl</i> | <i>short chain length</i> (Klasse der PHA), Kettenlänge <C <sub>5</sub>                           |
| SCP        | Einzeller ( <i>single cell protein</i> )  |
| SEC        | Lasestreulicht  |
| sMMO       | Methan-Monooxygenase (lösliche Form)  |
| STHM       | Serinhydroxymethyl-Transferase  |
| TCA        | Tricarbonsäure-Zyklus   |
| TCE        | Trichlorethen   |
| TCMS       | Trimethylchlorsilan   |
| TEMED      | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin  |
| TGGE       | Temperatur-Gradientengelelektrophorese  |
| TK         | (Tief-) Gefrierkammer (-70°C)   |
| T-RFLP     | Terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus   |
| TRS        | Trockenrückstand  |
| UD         | Bezeichnung für Bioreaktor  |
| UV         | Ultraviolett-   |
| W          | Wachstumsprozeß   |
| X          | Gesamtbiomasse  |
| XTT        | 2,3- <i>bis</i> (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-(phenylamino-carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid |
| ZZ         | Zellzahl  |

## VERZEICHNIS DER VERWENDETEN SYMBOLE

| Symbol              | Beschreibung                                      | Einheit                 |
|---------------------|---|-------------------------|
| $\alpha$            | stöchiometrischer Koeffizient                     |                         |
| $\alpha_{13C}$      | Wert der $^{13}C$ -Isotopenfraktionierung         |                         |
| $\alpha_{Mv}$       | Konstante zur Berechnung des Molekulargewichtes   |                         |
| $\beta$             | molarer Bedarfskoeffizient                        |                         |
| $\delta$            | Isotopensignatur                                  | ‰                       |
| $\gamma_{CH_4/O_2}$ | Verhältnis $CH_4:O_2$ im Eingangsgas              | [-]                     |
| $\gamma_{IG}$       | Verhältnis Inertgas Eingang/Ausgang               | [-]                     |
| $\gamma_{RG}$       | Reduktionsgrad                                    | [-]                     |
| $\varepsilon$       | Gas-Hold-Up (Anteil Gasphase in Flüssigkeit)      | [-]                     |
| $\rho$              | Dichte  | $g\ l^{-1}$             |
| $\mu$               | spezifischen Wachstumsrate                        | $h^{-1}$                |
| $\eta$              | Viskosität  | $mm^2\ s^{-1}$          |
| $[\eta]$            | Grenzviskosität                                   | $ml\ mg^{-1}$           |
| $a$                 | spezifische Phasengrenzfläche                     | $m^2\ m^{-3}$           |
| $A_m$               | Zugdehnung  | [%]                     |
| $A_r$               | Bruchdehnung                                      | [%]                     |
| $c$                 | Konzentration                                     | $mg\ l^{-1}, g\ l^{-1}$ |
| $c^*$               | Gleichgewichtskonzentration der Komponente i      | $mg\ l^{-1}, g\ l^{-1}$ |
| CPR                 | Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit               | $g\ h^{-1}$             |
| D                   | Verdünnungsrate                                   | $h^{-1}$                |
| $d_B$               | Gasblasendurchmesser                              | m                       |
| E                   | Extinktion  |                         |
| E-Modul             | Elastizitätsmodul                                 | GPa                     |
| F                   | Volumenstrom                                      | $l\ h^{-1}$             |
| $F_\delta$          | Faktor für Isotopenfraktionierung                 |                         |
| $F_{CSB/X}$         | spezifischer Bildungskoeffizient                  | $mg\ g\ X^{-1}$         |
| GTR                 | Gasübergangsrate                                  | $g\ l^{-1}\ h^{-1}$     |
| J                   | Stofftransportrate                                |                         |
| $k_L$               | flüssigkeitsseitiger Stoffübergangskoeffizient    | $m\ s^{-1}$             |
| $k_{La}$            | volumetrischer Stoffübergangskoeffizient          | $h^{-1}$                |
| $k_{MV}$            | Koeffizient zur Berechnung des Molekulargewichtes |                         |
| $K_{visko}$         | Gerätekostante für Viskosimeter                   |                         |
| $K_{H,i}$           | Henry-Konstante der Komponente i                  | $mol\ m^{-3}\ bar^{-1}$ |
| $K_{H,i, L/G}$      | Henry-Konstante der Komponente i                  | [-]                     |
| $K_{Hu}$            | Huggins-Konstante                                 |                         |
| $K_i$               | Inhibierungskonstante                             | $mg\ l^{-1}$            |
| $K_S$               | Sättigungskonstante                               | $mg\ l^{-1}$            |
| n                   | Anzahl  |                         |
| N                   | Rührerdrehzahl                                    | $min^{-1}$              |
| m                   | Masse   | g                       |

| Symbol                | Beschreibung   | Einheit                           |
|-----------------------|--|-----------------------------------|
| $\dot{m}$             | Massenstrom  | $\text{g h}^{-1}$                 |
| $M$                   | Molekulargewicht   | $\text{g mol}^{-1}$               |
| $\overline{M}_w, M_w$ | gewichtsmittleres Molekulargewicht   | $\text{g mol}^{-1}$               |
| $\overline{M}_n, M_n$ | zahlenmittleres Molekulargewicht   | $\text{g mol}^{-1}$               |
| $\overline{M}_v, M_v$ | viskosimetrisches Molekulargewicht   | $\text{g mol}^{-1}$               |
| MUR                   | Methanverbrauchsgeschwindigkeit  | $\text{g h}^{-1}$                 |
| OUR                   | Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit  | $\text{g h}^{-1}$                 |
| $p$                   | Druck  | mbar                              |
| $P$                   | Leistung   |                                   |
| PI                    | Polydispersitätsindex  | [-]                               |
| $q_i$                 | Spezifische Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf aktive Biomasse (Restbiomasse)                        | $\text{g g R}^{-1} \text{h}^{-1}$ |
| $r_i$                 | Spezifische Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf $V_L$ (Produktivität)                                 | $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$   |
| $R_m$                 | Zugfestigkeit  | MPa                               |
| $R_r$                 | Bruchfestigkeit  | MPa                               |
| $S_{HD}$              | Schwellenwert bei Zellgrößenverteilung   | $\mu\text{m}$                     |
| $S_{ZV}$              | Schwellenwert bei Zellvolumenverteilung  | $\mu\text{m}^3$                   |
| $t$                   | Zeit   | min, h                            |
| $T$                   | Temperatur   | $^{\circ}\text{C}$                |
| $T_m$                 | Schmelztemperatur  | $^{\circ}\text{C}$                |
| $T_A$                 | Zersetzungstemperatur  | $^{\circ}\text{C}$                |
| $T_G$                 | Glasübergangstemperatur  | $^{\circ}\text{C}$                |
| $U$                   | Uneinheitlichkeit  | [-]                               |
| $V$                   | Volumen  | l                                 |
| $\dot{V}$             | Volumenstrom   | $\text{l h}^{-1}$                 |
| $w$                   | Term für Erhaltungsstoffwechsel  | $\text{g g X}^{-1} \text{h}^{-1}$ |
| $x$                   | Molenbruch   | [-]                               |
| $Y_{EW}$              | "wahrer" Ausbeutekoeffizient   | $\text{g X g}^{-1}$               |
| $Y_{i/X}$             | reziproker spezifischer Ausbeutekoeffizient für Biomassebildung (Bedarfswert, unstrukturiertes Modell) | $\text{g g X}^{-1}$               |
| $Y_{i/R}$             | reziproker spezifischer Ausbeutekoeffizient für Biomassebildung (Bedarfswert, strukturiertes Modell)   | $\text{g g R}^{-1}$               |
| $Y_{PHB/i}$           | spezifischer Ausbeutekoeffizient für Produktbildung (strukturiertes Modell)                            | $\text{g PHB g}^{-1}$             |
| $Y_{R/i}$             | spezifischer Ausbeutekoeffizient für Biomassebildung (strukturiertes Modell)                           | $\text{g R g}^{-1}$               |
| $Y_{X/i}$             | spezifischer Ausbeutekoeffizient für Biomassebildung (unstrukturiertes Modell)                         | $\text{g X g}^{-1}$               |

## VERZEICHNIS DER VERWENDETEN INDIZES

|                    |   |
|--------------------|---|
| 0                  | Eingang   |
| 1                  | Ausgang   |
| A                  | Ablauf  |
| BR                 | Bioreaktor  |
| BW                 | Blindwert   |
| CO <sub>2</sub>    | Kohlendioxid  |
| G                  | Gasphase  |
| GB                 | Gasphase ( Gasblasen)   |
| GF                 | Grenzfläche   |
| GH                 | Gasphase (Gas über Flüssigkeit)   |
| H <sub>2</sub> O   | Wasser  |
| HD                 | Hypothetischer Kugeldurchmesser   |
| i                  | beliebige Komponente  |
| IG                 | Inertgas  |
| j                  | Zeitpunkt   |
| k                  | Zeitpunkt   |
| kin.               | kinematische  |
| korr.              | nach Korrektur  |
| L                  | Flüssigphase (Flüssigkeit)  |
| M, CH <sub>4</sub> | Methan  |
| max.               | maximal   |
| m                  | Zeitpunkt   |
| n                  | Zeitpunkt   |
| N                  | (Ammonium) Stickstoff   |
| N <sub>2</sub>     | molekularer Stickstoff  |
| norm.              | normiert  |
| NL                 | Nährlösung  |
| O, O <sub>2</sub>  | Sauerstoff  |
| ov                 | <i>overall</i> , gesamt, mittlere   |
| P                  | Produkt, allgemein  |
| PCR                | Polymerase-Kettenreaktion   |
| PHB                | Polyhydroxybuttersäure  |
| PÜ                 | Phasenübergang  |
| R                  | Restbiomasse, aktive Biomasse im strukturierten Modell                                |
| S                  | Substrat, allgemein   |
| spez.              | spezifisch  |
| visko              | viskosimetrisch bestimmt  |
| V                  | Versuch, Variante   |
| X                  | Biomasse (unstrukturiertes Modell) Gesamtbiomasse<br>(strukturiertes Modell, X=R+PHB) |
| ZV                 | Zellvolumen   |

## 1 EINLEITUNG

Eine der wichtigsten Herausforderungen für die Biotechnologie, ursprünglich die technische Anwendbarkeit biologischer Prozesse und Funktionsprinzipien, im engeren Sinne die gezielte Nutzung der Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen sowie von pflanzlichen und tierischen Zellkulturen für vorwiegend industrielle Produktionszwecke, ist die Lösung von Umweltproblemen. Das enorme Potential mikrobieller Systeme wird mittlerweile erfolgreich im industriellen Maßstab in Boden-, Luft- und Wassermanagement genutzt [WHITE 1999, DEMAIN 2000, PIEPER und REINEKE 2000, WACKETT 2000]. Daneben erhält aber auch die Bioprävention immer stärkere Beachtung. Zunehmend etablieren sich Produkte und Prozesse, die als umweltverträglich angesehen werden. Die Beurteilung solcher „grüner Technologien“ erfolgt durch Ökobilanzen, in denen unter dem Aspekt der Nachhaltigkeit Rohstoff-, Wasser- und Energieverbräuche im Vergleich zu Gebrauchswert, Wiederverwertbarkeit, Entsorgung und Umweltverhalten (Persistenz, Akkumulation, Abbau) der Produkte analysiert werden. Als Beispiele können der Ersatz von „chemischen“ Insektiziden durch „Bioinsektizide“ aus *Bacillus thuringiensis* [DEMAIN 2000, WACKETT 2000] bzw. ökologisch wesentlich verträglichere Wirkstoffe der neuen Generation (z.B. Pyrethroide statt DDT) oder die Verwendung linearer anstelle schwer abbaubarer verzweigt-kettiger Alkylbenzonsulfonate in Waschmitteln dienen [FRITSCHKE 1998]. In diesen Zusammenhang ordnet sich auch der Einsatz biologisch abbaubarer Kunststoffe ein, für die allerdings im Unterschied zu den zuvor genannten Beispielen noch kein Durchbruch zu verzeichnen ist. Eine interessante Klasse biologisch abbaubarer Polymere, die aus Bakterien gewonnen werden können, bilden die Polyhydroxyalkanoate (PHA). Neben ökologischen Aspekten sind es vor allem die besonderen Eigenschaften dieser Polymere, die sie als potentiell hochwertige Werkstoffe einer neuen Generation zum Gegenstand der biotechnologischen Forschung werden ließen.

### 1.1 Biologisch abbaubare Werkstoffe

Unter biologisch abbaubaren Werkstoffen (BAW) versteht man in der Regel Polymere, die kunststoffähnlich, d.h. mit Verfahren der Kunststofftechnik verarbeitbar sind und auf Grund ihrer chemischen und physikalischen Zusammensetzung durch Enzyme und/oder chemischen Einflüsse, die im Zusammenhang mit lebenden Organismen (in der Regel Bakterien und Pilzen) und von diesen ausgeschiedenen Stoffen stehen, zersetzbar sind. Am Zersetzungsprozeß sind jedoch auch abiotische Reaktionen wie Photoabbau, Oxidation oder Hydrolyse beteiligt [ALBERTSSON und KARLSSON 1994].

BAW lassen sich unter anderem wie folgt klassifizieren [PETERSEN et al. 1999]:

- Polymere aus natürlichen Quellen: Polysaccharide (z.B. Stärke, Zellulose, Chitin)  
Proteine (z.B. Kasein, Gluten, Kollagen)
- Polymere, die aus biologisch hergestellten Monomeren durch chemische Reaktionen erzeugt werden, z.B. Polymilchsäure (Polylactat, PLA)
- Polymere, die von Mikroorganismen natürlich oder nach gentechnischer Manipulation gebildet werden, z.B. Polyhydroxyalkanoate (PHA).

Neben diesen biosynthetischen und semi-biosynthetischen BAW konnte auch für einige chemosynthetische Polymere Bioabbaubarkeit nachgewiesen werden. Dazu zählen:

- aliphatische bzw. aromatische Copolyester aus  $\alpha$ ,  $\omega$ -Diolen und Dicarbonsäuren
- Poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) aus  $\epsilon$ -Caprolactonen, Adipinsäure und Diolen
- Polyester aus aliphatischen Diolen und Dicarbonsäuren (Bionolle-BNL)
- sowie Blockcopolyesteramide [WITT et al. 1995, AMASS et al. 1998, WITT et al. 1999].

Durch die breite Palette von Produkten können nahezu alle für verschiedenste Anwendungen gestellten Anforderungen erfüllt werden. Vielfältige Anwendungen für BAW sind denkbar oder wurden bereits realisiert, insbesondere:

- als Verpackungsmaterial im Lebensmittel- und Non-Food-Bereich
- zur Herstellung von Einwegartikeln im Fast-Food- und Catering-Bereich
- in Hygieneartikeln
- in Landwirtschaft und Gartenbau (Floristen- und Friedhofsbedarf)
- als hochwertige sog. *high-price-low-volume*-Spezialprodukte in Medizin und Pharmazie.

Das größte Marktpotential haben BAW in der Verpackungsindustrie. Der Verpackungssektor nimmt am Gesamtverbrauch an Kunststoffen einen Anteil von 35–40 % ein. Ein starkes Argument für den Einsatz von abbaubaren Polymeren ist die geringe Nutzungsdauer von Verpackungen aus Kunststoff. In Westeuropa stellt der Anteil von Kunststoffabfällen mit einer durchschnittlichen Nutzungsdauer von weniger als zwei Jahren 67% der Abfälle dar [BRANDRUP 1995]. Das Hauptproblem der Massenanwendung von BAW liegt nach wie vor in den hohen Herstellungskosten. Zunehmend wird jedoch gefordert, für Kostenvergleiche zwischen BAWs und konventionellen Kunststoffen den Gesamtpreis des Produktes zu berücksichtigen, der sich aus Herstellungs- und Entsorgungskosten zusammensetzt [FACCO 1995, MENNER und LUCK 1997, IBAW 2001]. Dabei ergibt sich bei den Entsorgungskosten ein klarer Vorteil für die BAWs: Momentan sind die Gebühren für Deponierung oder Verbrennung ca. dreimal so hoch wie für die Kompostierung [MOHANTY et al. 2000]. Folgende Fakten sollten bei der Kostenabschätzung berücksichtigt werden:

- Gesamtpreis = Herstellungspreis + Entsorgungspreis
- Flächenbedarf für Deponien
- Möglichkeit der Etablierung eines Kreislaufes für BAW: Produkt → Kompostierung →  $\text{CO}_2$  → Photosynthese → nachwachsende Rohstoffe → Biopolymer → Produkt
- Schaffung von geeigneten (und einheitlichen) Kennzeichnungs-, Sammel- und Entsorgungssystemen für BAW
- Beachtung des Beitrages zur globalen Erwärmung ( $\text{CO}_2$ -Ausstoß).

PHAs stellen auf Grund ihrer Eigenschaften potentielle Kandidaten für die Substitution von konventionellen Kunststoffen in bestimmten Bereichen der Verpackungsindustrie dar. Die Verwendung von PHA in der Verpackungsbranche ist aus heutiger Sicht jedoch erst vorstellbar, wenn neue Verfahren wettbewerbsfähige Preise ermöglichen.

## 1.2 Der Markt für PHA: *high-price-low-volume*-Produkte

Für Spezialanwendungen in Medizin und Pharmazie stellt sich die Situation anders dar. Anforderungen an Werkstoffe, die in Therapie und Diagnostik eingesetzt werden, sind Biokompatibilität, das Fehlen von Toxizität, Allergenität und Kanzerogenität, sowie Sterilisierbarkeit, Verarbeitbarkeit, spezielle mechanische Eigenschaften und wählbares Abbauverhalten (schneller Abbau bis Langzeitstabilität *in vivo*) [WINTERMANTEL und HA 1998, SEITER et al. 2000]. Die Abbaubarkeit (Bioresorption) ist nicht in allen Anwendungen erwünscht. Insofern verändert sich der Blickwinkel auf BAW in der Medizin, da nicht mehr Abbaubarkeit und Umweltverträglichkeit sondern Biokompatibilität und *in vivo*-Stabilität maßgebend sind. Es zeigt sich, daß einige der in Abschnitt 1.1 eingeführten Klassen von (semi)biosynthetisch erzeugten Polymeren die hohen Anforderungen an medizinische Spezialprodukte für verschiedene Anwendungen hervorragend erfüllen. Einen umfassenden Überblick geben u.a. RATNER et al. (1996), WINTERMANTEL und HA (1998) und LENDLEIN (2001).

In medizinischen Anwendungen unterscheidet man allgemein zwischen nicht resorbierbaren (u.a. PUR, PET, PTFE, PE, Silicon, Metalle, Keramiken) und resorbierbaren Werkstoffen. Beispiele für den Einsatz synthetischer Polymere geben WINTERMANTEL und HA (Tabelle I-1).

Tabelle I-1: Einsatz synthetischer Polymere in der Medizin [WINTERMANTEL und HA 1998]

| Polymer                       | Anteil am Gesamtverbrauch [%] | <i>in vivo</i> | Anwendungen   |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------|---|
| Polyvinylchlorid (PVC)        | 29                            | Nein           | Blutschläuche und -beutel, Beutel für intravenöse Anwendung, Einwegartikel      |
| Polyethylen (LDPD)<br>(HDPE)  | 17<br>13                      | Ja             | Gelenkpfannen, Knieprothesen, Sehnen- und Bänderersatz, Spritzen, Schläuche,    |
| Polystyrol (PS)               | 16                            |                |   |
| Polypropylen (PP)             | 10                            | Ja             | Fingergelenkprothesen, Herzklappen, Nahtmaterial, Einweg-Spritzen, Verpackungen |
| Polycarbonat (PC)             |                               | Nein           | Teile von Dialysegeräten, unzerbrechliche Flaschen, Spritzen, Schläuche         |
| Polymethylmethacrylat (PMMA)  | 8                             | Ja             | Knochenzement, künstliche Zähne, intraokulare Linsen, Kontaktlinsen             |
| Polyethylenterephthalat (PET) |                               | Ja             | Künstliche Blutgefäße, Sehnen- und Bänderersatz, Nahtmaterial                   |
| Polysiloxan                   | 5                             | Ja             | Brustimplantate, künstliche Sehnen und Haut, Herzklappen, Dialyseschläuche      |
| Polyurethan (PUR)             |                               | Ja             | Künstliche Blutgefäße, Hautimplantate, Herzklappen, Dialysemembranen            |
| Polyamid (PA)                 |                               | Ja             | Nahtmaterial, Herzmitralklappen, Katheterschläuche, Spritzen                    |
| Polytetrafluorethylen (PTFE)  |                               | Ja             | Gefäßimplantate   |

Bei den bioabbaubaren Polymeren für medizinische Anwendungen handelt es sich um eine eigene Gruppe unter den biokompatiblen Biomaterialien. Neben Biokompatibilität und Sterilisierbarkeit ist hier die Abbaubarkeit der Polymere erwünscht, wobei die Abbauprodukte möglichst keine negativen Wirkungen verursachen und vorzugsweise in den physiologischen Stoffwechsel integriert werden sollen. Bei klinischen Anwendungen, z.B. Implantaten, Stützkonstruktionen (Stents) und Knochenstabilisatoren liegt der Vorteil gegenüber herkömmlichen, nicht abbaubaren Materialien darin, daß das Implantat schrittweise durch körpereigenes Gewebe ersetzt wird und eine weitere Operation zum Entfernen der Teile nach vollständiger Heilung nicht notwendig ist. Die mechanischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften sollten dabei über den gesamten Implantationszeitraum klar definiert sein [AN et al. 2000, MIDDLETON und TRIPTON 2000, VAN DER ELST et al. 2000].

Es existiert ein großer Markt für diese Produktklasse. Beispielsweise wurden 1995 in den USA 300 Mio. US\$ für resorbierbare Materialien umgesetzt [MIDDLETON und TIPTON 2000].

In den 70er Jahren starteten die ersten medizinischen Versuche zum Einsatz von Polyglykolsäure (PGA) als abbaubares chirurgisches Nahtmaterial (Dexon®). Später wurde der Einsatz von PLA und PGA/PLA-Copolymeren umfassend untersucht [RATNER et al. 1996]. Von der Vielzahl resorbierbarer Polymere befinden sich auch heute vorwiegend die synthetisch hergestellten Polyester als Homo- oder Copolymere von PLA und PGA in der klinischen Anwendung (Tabelle I-2) [ATHANASIOU et al. 1996, AN et al. 2000, VAN DER ELST et al. 2000].

Tabelle I-2: Bioabbaubare Polymere und ihr Einsatz in der Medizin  
[nach WINTERMANTEL und HA 1998, modifiziert]

| Polymer                        | Abkürzung | Anwendung   |
|--------------------------------|-----------|---|
| Poly(glykolsäure)              | PGA       | <i>drug delivery systems</i> , Nahtmaterial, Knochenfixierung, Orthopädie   |
| Poly(milchsäure)               | PLA       | <i>drug delivery systems</i> , Nahtmaterial, Knochenfixierung, Orthopädie   |
| Poly( $\epsilon$ -caprolacton) | PCL       | verschiedene  |
| Poly( $\beta$ -hydroxybutyrat) | PHB       | <i>drug delivery systems</i> , Nahtmaterial, Wundabdeckung, Gefäßimplantate |
| Poly( $p$ -dioxanon)           | PDS       | Knochenfixierung  |
| Polyanhydride                  | PA        | Träger für <i>drug delivery systems</i>                                     |

### 1.3 Poly-( $\beta$ -hydroxybuttersäure): Ein bioabbaubarer Werkstoff mit besonderen Eigenschaften

Poly(hydroxybutyrat) (PHB), ein biosynthetisch erzeugtes Polymer, weist gegenüber den anderen in Tabelle I-2 aufgeführten, synthetisch hergestellten Polyestern den Vorteil auf, daß es als hochreiner Stoff ohne aus dem Produktionsprozeß verschleppte Katalysatorreste oder sonstige synthesebedingte Kontaminationen gewonnen werden kann. Solche Verunreinigungen können einen unregelmäßigen Abbau der Polymere verursachen [SEITER et al. 2000]. Die Sterilisierbarkeit von PHB ist gut [LOOTZ et al. 1994, BLEDTZKI et al. 1997] und der langsamere hydrolytische

Abbau von PHB im Vergleich zu PGA und PLA kann ebenfalls als positiv für Langzeitanwendungen angesehen werden. Weiterhin wird es als ein resorbierbares Polymer mit hervorragender Gewebe- und Hämokompatibilität und geringer Pyrogenität angesehen [KORSATKO et al. 1984, POUTON und AKHTAR 1996, SAAD et al. 1996, WINTERMANTEL und HA 1998]. Langzeituntersuchungen belegen die Eignung von PHB für den medizinischen Einsatz [SAB et al. 1998, WINTERMANTEL und HA 1998]. Das Vorkommen relativ großer Mengen an PHB mit sehr niedrigem Molekulargewicht im menschlichen Blut wird als wichtiges Indiz für die Nichttoxizität gewertet [POUTON und AKHTAR 1996, MADISON und HUISMAN 1999]. Gleiches gilt für das Abbauprodukt 3-Hydroxybuttersäure, das ein Metabolit aller höheren Lebewesen ist. In Zellkultur- und Tierversuchen wurde eine sehr gute Verträglichkeit von PHB und ihren Abbauprodukten im Blut-, Weichgewebe- und Knochenkontakt gefunden [KORSATKO et al. 1984, LAFFERTY et al. 1988, DOYLE et al. 1991, POUTON und AKHTAR 1996].

PHB wird trotz der mit synthetischen Polyestern vergleichbaren Eigenschaften bisher nicht in großem Umfang verwendet. Als problematisch wird die hohe Sprödigkeit von PHB angesehen, wobei diese durch den Einsatz von speziellen Weichmachern [LOOTZ et al. 2001], die Herstellung von Blends z.B. mit ataktischer PHB [MIGUEL et al. 2000] sowie die Entwicklung von innovativen Verarbeitungstechnologien, wie z.B. Schmelzspinnen, entscheidend verringert werden kann [SCHMACK et al. 2000]. Das Hauptproblem für die weitere Entwicklung von PHB für den Einsatz in der Medizin ist die begrenzte kommerzielle Verfügbarkeit eines qualitativ hochwertigen Produktes. Für die mikrobielle Herstellung von PHB könnten theoretisch über 300 verschiedene Species verwendet werden und verschiedenste Substrate zum Einsatz kommen. Großtechnische Verfahren wurden bisher durch ICI (später von ZENECA bzw. MONSANTO übernommen) mit *Ralsonia eutropha* [HOLMES et al. 1981] und die Chemie Linz GmbH mit *Alcaligenes latus* [LAFFERTY und BRAUNEGG 1984a, LAFFERTY und BRAUNEGG 1984b, HRABAK 1992] mit Glucose bzw. Saccharose als Kohlenstoffquelle entwickelt, wobei die Etablierung von PHB als Verpackungsmaterial im Vordergrund stand. Momentan ist PHB verschiedener Qualitäten in Form von Platten, Folien, Gewebe und als Pulver erhältlich [GOODFELLOW 2001]; BIOMER bietet eine Mischung aus PLA und PHB in verschiedenen Zusammensetzungen an [BIOMER 2001]. Auf Grund der angegebenen Spezifikationen kann davon ausgegangen werden, daß letztere Produkte nicht für eine Anwendung in der Medizin geeignet sind.

#### 1.4 PHB aus Methan

Neben traditionellen Substraten wie Glucose oder Methanol bietet sich auch Methan als Substrat für die PHB-Synthese an. Methan kommt in der Natur in großem Umfang vor. Es wird biogen in Sümpfen, Mooren, in anaeroben Zonen von Seen, Meeren, Sedimenten und im Pansen von Wiederkäuern gebildet, entsteht in Deponien, bei unvollständigen Verbrennungen und ist nicht zuletzt Hauptbestandteil des Erdgases. Großtechnisch wird Methan als Hauptbestandteil von Biogas in anaeroben Prozessen der Abwasser- und Abfallbehandlung erzeugt [FRITSCH 1998, MADIGAN et al. 2001]. In diesem Sinn kann es als „nachwachsender“ Rohstoff

betrachtet werden. Eine ökologisch attraktive Möglichkeit der Nutzung von Methan ergibt sich aus der Fähigkeit einiger Mikroorganismen zur Metabolisierung von Methan. Diese methanotrophen Bakterien gehören zur Gruppe der Methyloproten, die C1-Verbindungen wie Methan, Methanol, methylierte Amine u.a. als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Obligat Methanotrophe sind in der Lage, Methan als alleiniges Substrat zu verwenden. Bei der Kultivierung von Methanotrophen kann diese Fähigkeit als Selektionsdruck dienen, d.h., die Prozesse können unter unsterilen Bedingungen durchgeführt werden. Um die in biotechnologischen Verfahren notwendigen hohen Biomassekonzentrationen zu erreichen, werden Methanotrophe überwiegend in Mischkulturen eingesetzt. Die Begleitorganismen beseitigen Stoffwechselprodukte mit inhibierender Wirkung (z.B. Methanol) und verbessern damit die physiologischen Bedingungen für das Wachstum der Methanotrophen.

In einer der ersten umfassenden Arbeiten über Methanotrophe wurde die Bildung von Poly(3-hydroxybutyrat) (PHB) in verschiedenen Species beschrieben [WHITTENBURY et al. 1970]. Erste genauere Angaben finden sich bei HIGGINS et al. (1981). Für *Methylosinus trichosporium* wird hier ein maximaler PHB-Gehalt von 30 % angegeben. In dieser Arbeit sind zudem erste biochemischen Grundlagen der PHB-Bildung aus Methan dargestellt und Stickstoffmangel im Zusammenhang mit der PHB-Bildung erwähnt (siehe auch Abschnitt 2.2.2).

Die Nutzung von Methan zur Herstellung von PHB ist hingegen erst wenig erforscht. Dabei wird es als attraktives Substrat für die PHB-Synthese angesehen [STEINBÜCHEL und FÜCHTENBUSCH 1998, REHM und STEINBÜCHEL 1999]. Die bislang publizierten Studien stellen entweder allgemeine Abschätzungen zum Bildungspotential (maximal erreichbare PHB-Gehalte) dar oder beschreiben grundlegende Einflußparameter der Synthese. Dabei wurde nur in sehr kleinem Maßstab (Schüttelkolben, Bioreaktoren bis 5 l Arbeitsvolumen) und in Bereichen geringer Biomassekonzentrationen ( $< 5 \text{ g l}^{-1}$ ) gearbeitet.

*Batch*-Versuche mit *Methylocystis parvus* im Schüttelkolben unter für die PHB-Synthese optimierten Bedingungen ergaben nach 180 h Kultivierung (unter Stickstofflimitation) die bisher höchste beschriebene Akkumulation von 70 % PHB in der Biomasse, wobei eine Biomassekonzentration von  $2 \text{ g l}^{-1}$  erreicht wurde. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, daß höhere Biomassekonzentrationen nur durch intensivere Stoffübergänge von Sauerstoff und Methan mittels verbesserter technischer Ausrüstungen der Bioreaktoren (Rührer, Prallbleche usw.) bzw. durch Fermentationen unter Druck zu erreichen sind [ASENJO und SUK 1986b].

SHAH et al. (1996) untersuchten die PHB-Bildung unter einem anderen Aspekt: PHB diene bei der Co-Metabolisierung von Trichlorethen durch den methanotrophen Bakterienstamm *Methylosinus trichosporium OB3b* als Speicher für Reduktionsäquivalente, die normalerweise durch den oxidativen Abbau von Methan zur Verfügung gestellt werden. In einem Bioreaktor (Arbeitsvolumen 5 l) wurden nach 120 h diskontinuierlicher Prozeßführung  $18 \text{ g l}^{-1}$  Biomasse mit einem PHB-Gehalt von 50 % akkumuliert. Als günstig für den Schadstoffabbau erwiesen sich 10 % PHB [SHAH et al. 1996]. Andere Autoren fanden eine Korrelation zwischen dem PHB-Gehalt der Zellen und der TCE-Abbauraten bei verschiedenen methanotrophen Stämmen [CHU und ALVAREZ-COHEN 1998].

Kürzlich wurde in einem metabolischen Modell für *Methylosinus trichosporium* OB3b auch die PHB-Bildung berücksichtigt, wobei sich die Angaben wie maximale Bildungsgeschwindigkeiten nur auf die entsprechenden Einzelenzyme beziehen [SIPKEMA et al. 2000].

Intrazelluläre Umwandlungsprozesse von PHB in einem Typ II-Methanotrophen wurden mit  $^{13}\text{C}$ -NMR untersucht. Im Mittelpunkt stand der Abbau von PHB unter anaeroben Bedingungen, wobei Acetat als ein wesentliches Produkt nachgewiesen wurde [VECHERSKAYA et al. 2001].

In keiner der Arbeiten finden sich Angaben über (Gesamt-)Bildungsgeschwindigkeiten, Produktivitäten und Ausbeuten der PHB-Synthese aus Methan in Prozessen mit hohen Biomassekonzentrationen ( $> 20 \text{ g l}^{-1}$ ), wie sie für die etablierten PHA-Verfahren bekannt sind. Auch die Eigenschaften der akkumulierten PHB wurden bisher nicht untersucht. Erste Veröffentlichungen zu diesem Thema erfolgten auf der Grundlage von Ergebnissen dieser Arbeit bzw. im Vorfeld durchgeführter Studien mit einer methanverwertenden Mischkultur, deren Hauptkomponente der methanotrophe Stamm *Methylocystis* sp. GB 25 DSM 7674 ist, im Maßstab bis zu 70 l [WENDLANDT et al. 1996, 1998, 2001].

## 1.5 Aufgabenstellung

Die Gewinnung von Poly-( $\beta$ -hydroxybutyrat) (PHB) aus Methan ist ein innovativer Prozeß, der Umweltverträglichkeit mit einem attraktiven Produkt, nämlich einem biologisch abbaubaren Polymer, verbinden kann. Die hervorragende Biokompatibilität von PHB prädestiniert es zum Einsatz in hochwertigen bioresorbierbaren Medizinprodukten. Die Herstellung von PHB eines hohen Reinheitsgrades und mit wohldefinierten Eigenschaften ist die entscheidende Voraussetzung für diese Anwendung. Es ist bekannt, daß methanotrophe Bakterien zur Produktion von PHB in der Lage sind, jedoch fehlen systematische Untersuchungen sowohl zur Prozeßführung und Optimierung als auch zur Gewinnung und Charakterisierung des Produktes. Das Arbeiten mit einer methanverwertenden Mischkultur ermöglicht u.a. das Erreichen hoher Biomassekonzentrationen, stellt aber gleichzeitig die Aufgabe, deren Stabilität sowie die Reproduzierbarkeit der Produktqualität nachzuweisen.

Ziel dieser Arbeit war es, prozeßspezifische Parameter und Einflußgrößen zu bestimmen, optimale Bedingungen zu finden und auf dieser Grundlage Empfehlungen für einen Prozeß zur Herstellung hochreiner PHB mit definierten Eigenschaften aus Methan unter Verwendung einer methanverwertenden Bakterien-Mischkultur zu erarbeiten und gleichzeitig Produktmuster für die weitere Charakterisierung der Werkstoffeigenschaften bereitzustellen.

Folgende Aufgaben waren im einzelnen zu lösen:

1. Definition von Zielgrößen für die PHB-Synthese
2. Auswahl der Mangelbedingungen zur Initiierung der PHB-Bildung
3. Bestimmung der prozeßspezifischen Kennziffern und deren Einflußfaktoren

4. Optimierung der PHB-Synthese aus Methan entsprechend der Zielgrößen und Ableitung von Empfehlungen zur Prozeßführung
5. Durchführung einer Systemanalyse, Erstellung der Grundlagen für ein Prozeßmodell (und Überprüfung ausgewählter Parameter )
6. Etablierung von Methoden zu Nachweis, quantitativer Analyse und Charakterisierung von PHB, die sich zur Prozeßkontrolle eignen
7. Charakterisierung der methanverwertenden Mischkultur und Nachweis ihrer Stabilität unter definierten Prozeßbedingungen
8. Bereitstellung von Produktmustern zur Charakterisierung der Eigenschaften bezüglich der biomedizinischen Anwendung
9. Screening weiterer potentieller Produzenten für PHB aus Methan.

## 2 SYSTEMANALYSE

### 2.1 Polyhydroxyalkansäureester (PHA)

#### 2.1.1 HISTORISCHES

Als erster und gleichzeitig wichtigster Vertreter der Polyhydroxyalkansäureester (PHA) wurde der Polyester der D(-)-3-Hydroxybuttersäure, Poly(3-hydroxybutyrat) (PHB), identifiziert, den Lemoigne in Form lichtbrechender Einschlüsse (Granula) in *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*) entdeckte. [LEMOIGNE 1926]. Erst ca. 50 Jahre später war die biochemische Funktion und die Regulation der PHB-Synthese in *Azotobacter beijerinckii* (*A. beijerinckii*) und *Ralstonia eutropha* (*R. eutropha*, früher *Alcaligenes eutrophus*, früher *Hydrogenomonas eutropha*) aufgeklärt [SENIOR und DAWES 1971, SENIOR und DAWES 1973, OEDING und SCHLEGEL 1973]. Mit der Entdeckung anderer Hydroxyalkansäuren [C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>] als Bestandteile dieser intrazellulären Einlagerungen [WALLEN und ROHWEDDER 1974] erkannte man, daß der Homopolyester der 3-Hydroxybuttersäure nur ein Vertreter einer ganzen Klasse von Polyestern der Hydroxyalkansäuren ist. Intensive Forschungen begannen nach der Beschreibung eines Homopolymers der 3-Hydroxyoctansäure (C<sub>8</sub>) [DE SMET et al. 1983], da sich herausstellte, daß die Eigenschaften der verschiedenen Copolymere variieren und damit eine Möglichkeit besteht, diese gezielt zu beeinflussen. 1983 wurde für diese Familie von Verbindungen die übergreifende Abkürzung PHA (*poly hydroxy acid*) eingeführt [MÜLLER und SEEBACH 1993]. Bis 1999 waren bereits über 125 verschiedene PHA-Monomere [REHM und STEINBÜCHEL 1999] bekannt. Ein wichtiger Meilenstein war die Identifizierung und Beschreibung der PHB-Synthesegene von *R. eutropha* und gleichzeitig deren erste erfolgreiche Klonierung und Exprimierung in *Escherichia coli* (*E. coli*), die fast gleichzeitig drei Forschergruppen gelang [SLATER et al. 1988, SCHUBERT et al. 1988, PEOPLES und SINSKEY 1989]. Fünf Jahre später erfolgte die erste Expression von PHA-Synthese-Genen in Pflanzen [POIRIER et al. 1992]. In Tabelle II-1 sind neben den wissenschaftlichen Meilensteinen auch wichtige Ereignisse aus der großtechnischen PHA-Produktion aufgeführt.

Obwohl sich die anfängliche Euphorie bezüglich der schnellen Etablierung von „Bioplastik“ im alltäglichen Leben gelegt hat, und die kommerzielle Herstellung von PHA, Voraussetzung für eine Massenanwendung, nach dem Einstellen der Produktion von Biopol® 1998 zum Erliegen kam, ist das wissenschaftliche Interesse ungebrochen. PHAs werden nach wie vor als Werkstoffklasse mit großem Potential betrachtet [MADISON und HUISMAN 1999, SUDESH et al. 2000, STEINBÜCHEL 2001], wengleich auch die lange Zeit im Vordergrund des Interesses stehenden, aus ökologischen Aspekten abgeleiteten Vorzüge von PHA nicht mehr unumstritten sind [GERNGROSS 1999, GERNGROSS und SLATER 2000].

Tabelle II-1: Meilensteine in der PHA-Forschung [nach STEINBÜCHEL 1996]

| Jahr      | Ereignis  | Quelle  |
|-----------|---|---|
| 1926      | Entdeckung von PHB in <i>B. megaterium</i>                      | LEMOIGNE 1926   |
| 1961      | Isolation von <i>R. eutropha</i> als potentieller PHB-Produzent | SCHLEGEL et al. 1961  |
| 1962      | Entdeckung der thermoplastischen Eigenschaften von PHB          | BAPTIST 1962  |
| 1974      | Identifizierung von anderen PHA                                 | WALLEN und ROHWEDDER 1974   |
| 1981      | Patent für biotechnologische Herstellung von P(3-HB-co-3-HV)    | HOLMES et al. 1981  |
| 1983      | Identifizierung von P(3-HO)                                     | DE SMET et al. 1983   |
| 1988      | Klonen der PHA-Synthese-Gene von <i>R. eutropha</i>             | SLATER et al. 1988<br>SCHUBERT et al. 1988  |
| seit 1988 | Entdeckung weiterer PHA   | u.a. KUNIOKA et al. 1988, TIMM und STEINBÜCHEL 1990, HUIJBERTS et al. 1992, VALENTIN et al. 1994, ABE et al. 1994                           |
| 1990      | erstes kommerzielles Produkt aus PHA                            | ANONYM 1990   |
| seit 1990 | Entdeckung neuer Substrate für PHA-Synthese                     | u. a. PAGE 1992, RUSENDI und SHEPPARD 1995, SON et al. 1996, CHEN und PAGE 1997, GONZALEZ-LOPEZ et al. 1997, HU et al. 1997, YU et al. 1998 |
| 1992      | Expression der PHA-Synthese-Gene in transgenen Pflanzen         | POIRIER et al. 1992   |
| 1994      | Erzeugung eines gummielastischen Produkts aus <i>mcl</i> -PHA   | DE KONING et al. 1994   |

Neben Fragestellungen von wissenschaftlichem Interesse gibt es auf dem Gebiet der PHA auch Forschungsbedarf bezüglich technisch relevanter Aspekte (wie Optimierung und *scale-up* von PHA-Fermentationsprozessen), deren Lösung die Voraussetzung für den wirklichen Durchbruch der PHA darstellen [REHM und STEINBÜCHEL 1999]. Neuere Forschungen konzentrieren sich daher insbesondere auf:

- die Optimierung der Produktion von *mcl*-PHA<sup>1</sup> [DURNER et al. 2000, KELLERHALS et al. 2000, LEE et al. 2000a, LEE et al. 2000b, JUNG et al. 2001]
- die Synthese neuartiger Polymere mit:
  - schwefelhaltigen Substituenten [LÜTKE-EVERSLOH et al. 2001]
  - speziellen Seitenketten [KIM et al. 2000b]
- die weitere Aufklärung der biochemischen Stoffwechselwege und der Genetik der an der PHA-Synthese und -Abbau beteiligten Enzyme [ANTONIO et al. 2000, CLEMENTE et al. 2000, HOFFMANN et al. 2000, JUNG et al. 2000, LEE et al. 2000c, QI et al. 2000, YORK et al. 2001]
- *metabolic engineering* (PHA-Synthese in genetisch veränderten Bakterien oder Pflanzen) [CHOI und LEE 1999a, HOUMIEL et al. 1999, SLATER et al. 1999, ALLENBACH und POIRIER

<sup>1</sup> Zur Klassifizierung von PHA siehe Abschnitt 2.1.3.1

- 2000, BOHMERT et al. 2000, HONG et al. 2000, REN et al. 2000, SUDESH und DOI 2000, VALENTIN et al. 2000, YU et al. 2000]
- die gezielte Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften durch Verarbeitungsprozesse [IORDANSKII et al. 2000, KAMAEV et al. 2000, SCHMACK et al. 2000]
  - die Nutzung innovativer, kostengünstiger Substrate, wie
    - Abwässer der Stärkeproduktion [KIM 2000, YU 2001]
    - Molke [AHN et al. 2000]
    - Klärschlamm [SATOH et al. 1999, BEUN et al. 2000a, 2000b, MA et al. 2000, TAKABATAKE et al. 2000, WONG et al. 2000]
    - CO<sub>2</sub> [ASADA et al. 1999, MIYAKE et al. 2000]
    - verschiedene andere [BORMANN und ROTH 1999, BRAUNEGG et al. 1999, PARRER et al. 2000].

## 2.1.2 VORKOMMEN UND FUNKTION VON PHA

### 2.1.2.1 Vorkommen

PHA wurden in einer Vielzahl von Mikroorganismen nachgewiesen, so in allen wichtigen physiologischen und taxonomischen Gruppen der Eubakterien sowie in einigen Archaeobakterien [DOI 1990, MÜLLER und SEEBACH 1993, STEINBÜCHEL 1996]. Von den über 300 verschiedenen Mikroorganismen, die PHA bilden, besitzen *R. eutropha*, *Alcaligenes latus* (*A. latus*), *Azotobacter vinelandii* (*A. vinelandii*), einige Methyloproteobakterien sowie *Pseudomonas oleovorans* (*P. oleovorans*) und *Pseudomonas putida* (*P. putida*) die größte Relevanz bezüglich technischer Produktionsprozesse [DOI 1990, CHOI und LEE 1999b].

Tabelle II-2: Gattungen PHA-akkumulierender Bakterien

|                     |                         |                         |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>Actinomyces</i>  | <i>Ferrobacillus</i>    | <i>Pseudomonas</i>      |
| <i>Acaligenes</i>   | <i>Halofax</i>          | <i>Protomonas</i>       |
| <i>Azotobacter</i>  | <i>Hyphomicrobium</i>   | <i>Ralstonia</i>        |
| <i>Azosprillum</i>  | <i>Methylobacterium</i> | <i>Rhizobium</i>        |
| <i>Bacillus</i>     | <i>Methylocystis</i>    | <i>Rhodococcus</i>      |
| <i>Beijernickia</i> | <i>Methylosinus</i>     | <i>Rhodopseudomonas</i> |
| <i>Chlorogloea</i>  | <i>Micrococcus</i>      | <i>Rhodospirillum</i>   |
| <i>Chromatium</i>   | <i>Mycoplasma</i>       | <i>Streptomyces</i>     |
| <i>Clostridium</i>  | <i>Nitrobacter</i>      | <i>Thiobacillus</i>     |
| <i>Derxia</i>       | <i>Nocardia</i>         | <i>Vibrio</i>           |
|                     |                         | <i>Zoogloea</i>         |

Bakterien besitzen die Fähigkeit, PHA in Form von Granula als Speicher für Kohlenstoff und Energie in bedeutenden Mengen (bis 96% des Trockengewichtes) zu akkumulieren [STEINBÜCHEL 1996]. Es wurde gezeigt, daß PHB niedriger Kettenlänge (100–300 Monomere) in löslicher Form und als Bestandteil von transmembranen Ionenkanälen in Form von P(3-HB)-Ca<sup>2+</sup>-Polyphosphat-Komplexen auch in Eukaryoten wie Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), und in pflanzlichen und tierischen Geweben vorkommt [REUSCH 1989, 1992, 1995], wobei eine

Beteiligung an Transportmechanismen von DNA, Phosphaten und Calcium als Funktion vermutet wird [REUSCH und SADOFF 1983, ANDERSON und DAWES 1990, MÜLLER und SEEBACH 1993]. Auch im menschlichen Blutplasma kommt PHB gebunden an Albumin und Lipoproteine in relativ großen Mengen vor (0,6–18,2 mg l<sup>-1</sup>), die Bedeutung ist noch unklar [MADISON und HUISMANN 1999].

#### 2.1.2.2 PHA-Granula

Die Speicherung der PHA erfolgt in Bakterien in Form von Granula [LAFFERTY et al. 1988, ANDERSON und DAWES 1990, LEE 1996], die im Phasenkontrast des Lichtmikroskops als stark lichtbrechend erkennbar sind und mit speziellen Farbstoffen wie z.B. Nilblau oder Nilrot markiert werden können. Eine interessante Theorie zur Formierung der Granula in *R. eutropha* auf der Basis von Micellenbildung veröffentlichten GERNGROSS et al. (1993).

Die Anzahl der in der Zelle vorhandenen Einschlüsse ist vom Mikroorganismus und von den Bedingungen der Polymerakkumulation abhängig. In der Literatur werden Werte zwischen 8–10 Granula Zelle<sup>-1</sup> [ANDERSON und DAWES 1990, LEE 1996] oder auch mehr als 100 Granula Zelle<sup>-1</sup> [PAGE et al. 1995] angegeben. Im Verlauf der Polymerakkumulation kann sich die Zahl erhöhen (für *A. vinelandii*) [PAGE et al. 1995] oder unverändert bleiben (bei *R. eutropha*) [ANDERSON und DAWES 1990]. Für die Größe von PHB-Granula finden sich Angaben im Bereich von 100–1100 nm, einige Autoren beobachteten eine Vergrößerung während der Bildungsphase [ELLAR et al. 1968, LAFFERTY et al. 1988, HOROWITZ und SANDERS 1995, STEINBÜCHEL et al. 1995, MCCOOL et al. 1996, BRAUNEGG et al. 1998, KIM et al. 2000a]. Unter diesem Aspekt werden interessante Gesichtspunkte wie der Zusammenhang zwischen Granulagröße und Molekulargewicht (je größer die Granula, um so höher das Molekulargewicht) diskutiert. Ausgangspunkt dafür sind Untersuchungen mit rekombinanten *E. coli* bzw. *in vitro*-Untersuchungen, wobei die Größe der Granula mit 1,13–1,25 µm bzw. 2–3 µm bestimmt wurde [MIDDLEBERG et al. 1995, NOBES et al. 2000], ebenso wie die höchsten Molekulargewichte [GERNGROSS und MARTIN 1995, KUSAKA et al. 1997, KUSAKA et al. 1998].

Die PHA-Granula werden von einer ca. 2 nm dicken Membran umgeben, die aus Lipiden und Proteinen besteht, und setzen sich aus 97,7 % PHA, 1,87 % Proteinen und 0,46 % Lipiden zusammen [LUNDGREN et al. 1964, STEINBÜCHEL et al. 1995]. In der Granulamembran sind Enzyme des PHA-Metabolismus (PHA-Synthase, PHA-Depolymerase) sowie amphiphile Phasinproteine (Phasin = PHA + Oesin, ein spezifisches Protein mit hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften) lokalisiert (Abb. 2-1) [GERNGROSS et al. 1993, STEINBÜCHEL et al. 1995, REHM und STEINBÜCHEL 1999]. Es wird vermutet, daß diese Proteine sowohl die Oberflächenstruktur als auch die Granulagröße beeinflussen [MADISON und HUIJBERTS 1998, YORK et al. 2001]. Eine detaillierte Übersicht gibt STEINBÜCHEL et al. (1995).

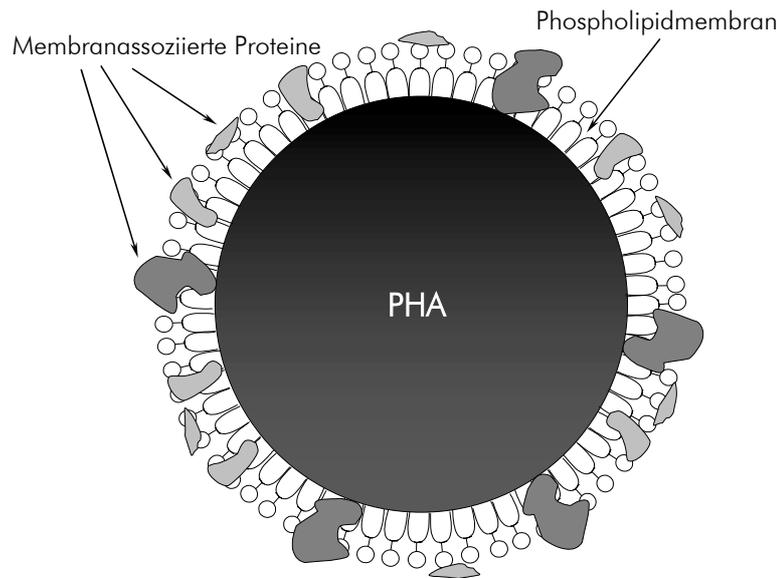


Abb. 2-1: Aufbau eines PHA-Granulums [SUDESH et al. 2000]  
(Die Membran ist nicht maßstabsgerecht, sondern deutlich vergrößert dargestellt.)

Die morphologische Struktur der PHA-Granula (*in vivo*) wurde analog zum isolierten Polymer zunächst als kristallin beschrieben [ELLAR et al. 1968]. 30 Jahre später wurde jedoch mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie gezeigt, daß PHB innerhalb der Granula amorph ist und Wassereinschlüsse als „Weichmacher“ fungieren [BARNARD UND SANDERS 1988, 1989]. Röntgen-Kristallstrukturuntersuchungen an nativen Granula lieferten schließlich den direkten Beweis für den amorphen Zustand des Polymers [KAWAGUCHI und DOI 1990]. Diese Autoren führen die PHB-Kristallisation auf das Entfernen der granulären Lipidkomponenten zurück. Hintergrund dieser Fragestellungen waren Untersuchungen zum Mechanismus des intrazellulären PHB-Abbaus, da kristalline PHB *in vitro* durch Depolymerasen nicht angegriffen wurde.

### 2.1.2.3 Funktion von PHA in Bakterien

Nach der Entdeckung im Jahr 1926 dauerte es noch über 30 Jahre, bis die erste Untersuchung zur Funktion von PHB in Bakterien veröffentlicht wurde. Es wurde gefunden, daß die PHB-Synthese beginnt, wenn das Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis im Wachstumsmedium hoch ist und daß bei Abwesenheit einer externen Kohlenstoffquelle das Polymer wieder abgebaut wird [SUDESH et al. 2000]. PHA sind also intrazelluläre Kohlenstoff- und Energiespeicher, deren Bildung vorwiegend durch Defizite in der Nährstoffversorgung bei gleichzeitigem Überangebot des Kohlenstoffsubstrates in Phasen ausgelöst wird, in denen die Vermehrung auf Grund des Fehlens eines zur Synthese der Zellbausteine essentiellen Elementes nicht möglich ist [LAFFERTY et al. 1988, BABEL et al. 1990, ANDERSON und DAWES 1990, STEINBÜCHEL 1996, BRAUNEGG et al. 1998, SUDESH et al. 2000]. Diese als „nicht-wachstumsassoziiert“ bezeichnete PHA-Synthese wird u.a. durch den Mangel an Stickstoff, Phosphor und Sauerstoff, ferner Magnesium, Schwefel, Eisen, Kalium, Mangan, Kupfer, Natrium, Kobalt, Zink und Calcium initiiert [SUZUKI et al. 1986, STEINBÜCHEL und SCHLEGEL 1989, KIM und LENZ 2001]. Die Speicherform als intra-

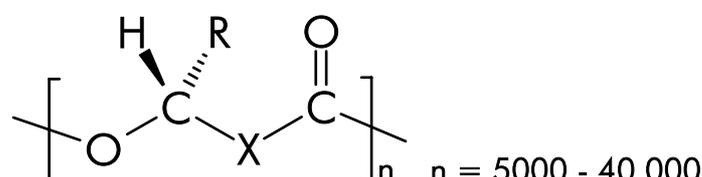
zelluläres, wasserunlösliches Makromolekül ist für die Zellen ideal, da kein osmotischer Druck entsteht [SENOIR und DAWES 1973]. In „Hungerphasen“ können die Polymere durch PHA-abbauende Enzymsysteme zu Monomeren und weiter zu Acetyl-CoA abgebaut und wieder in den Stoffwechsel eingeschleust werden. Der dadurch verhinderte oder verzögerte Abbau anderer, essentieller Makromoleküle (wie Proteine oder Nucleinsäuren) kann das Überleben der Zelle sichern [ANDERSON und DAWES 1990, STEINBÜCHEL 1996]. Bakterien, die PHA als Reservestoffe bilden, sind in der Lage, ungünstige Umweltbedingungen besser zu überstehen als Vertreter, die dazu nicht in der Lage sind [LAFFERTY et al. 1988, STEINBÜCHEL 1996, BRAUNEGG et al. 1998, HANDRICK et al. 2000, SUDESH et al. 2000]. Untersuchungen mit verschiedenen Bakterien (*R. eutropha*, *P. oleovorans*, *Azospirillum brasilense*, *Legionella pneumophila*) zeigen einen Zusammenhang zwischen PHA-Gehalt und Überlebensrate: mit zunehmendem PHB-Gehalt steigt auch die Überlebensrate [JAMES et al. 1999, RUIZ et al. 2001]. Weitere physiologische Bedeutung haben PHA bei der Bildung von Sporen in *Bacillus sp.* [LAW und SLEPECKY 1961] und Cysten in *Azotobacter sp.* [STEINBÜCHEL 1996, KIM und LENZ 2001] sowie als Senke für Reduktionsäquivalente in *Azotobacter sp.* unter Sauerstoffmangel [SENIOR und DAWES 1971, SENIOR et al. 1972].

Einige Bakterienarten sind in der Lage, PHA ohne unmittelbare Mangelbedingungen in einem wachstumsassoziierten Prozeß zu bilden. Unter anderen geschieht das in *A. latus* [BRAUNEGG und BOGENBERGER 1985, LAFFERTY und BRAUNEGG 1984a, LAFFERTY und BRAUNEGG 1984b, YAMANE et al. 1996], *A. vinelandii* UWD [PAGE und KNOSP 1989], *Actinobacillus sp. EL-9* [SON et al. 1996], *Methylobacterium rhodesianum* (*M. rhodesianum*) [ACKERMANN und BABEL 1997], *A. beijerinckii* [BORMANN et al. 1998] und *Azotobacter chroococcum* (*A. croococum*) [SAVENKOVA et al. 1999].

### 2.1.3 STRUKTUR, EIGENSCHAFTEN UND ANALYTIK VON PHA

#### 2.1.3.1 Chemische Struktur von PHA

PHA sind lineare oder verzweigte Polyester der Hydroxyalkansäuren mit der allgemeinen Struktur:



Bislang wurden mindestens 125 verschiedene Monomerbausteine identifiziert [REHM und STEINBÜCHEL 1999], deren Kohlenstoff-Kettenlänge von C<sub>3</sub> bis C<sub>18</sub> variieren kann. Die Hydroxylgruppe kann neben der „gewöhnlichen“ Position 3C auch 4C-, 5C- oder 7C-Stellung einnehmen [STEINBÜCHEL und VALENTIN 1995]. Biosynthetische PHA ist einheitlich D(-) konfiguriert, mit Ausnahme der 3-Hydroxypropionsäure, 4-Hydroxybuttersäure und 5-Hydroxyvaleriansäure. Das entspricht in den allermeisten Fällen der R-Stereochemie.

In Tabelle II-3 sind die wichtigsten Vertreter der PHA-Monomere aufgeführt und in die von STEINBÜCHEL vorgeschlagenen Klassen eingeordnet.

Tabelle II-3: Monomere von PHAs [nach STEINBÜCHEL und VALENTIN 1995, STEINBÜCHEL 1996]

| R   | X  | Name                              | Kürzel   |
|---|--|-----------------------------------|----------|
| a) gesättigte 3-Hydroxyalkansäuren  |  |                                   |          |
| -H  | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxypropionsäure             | 3-HP     |
| -CH <sub>3</sub>  | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxybuttersäure              | 3-HB     |
| -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>   | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxyvaleriansäure            | 3-HV     |
| -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>  | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxyhexansäure               | 3-HHx    |
| -CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>                                  | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxyheptansäure              | 3-HH     |
| -CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>                                  | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxyoctansäure               | 3-HO     |
| b) ungesättigte 3-Hydroxyalkansäuren  |  |                                   |          |
| -CH <sub>3</sub>  | =CH-   | 3-Hydroxy-2-butensäure            | 3-H2B    |
| -CH=CH <sub>2</sub>   | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxy-4-pentensäure           | 3-H4P    |
| -CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -<br>CH=CH <sub>2</sub>                           | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxy-7-octensäure            | 3-H7O    |
| -CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -<br>CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub> | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxy-5,8-tetradecadiensäure  | 3-H5,8TD |
| c) verzweigte 3-Hydroxyalkansäuren  |  |                                   |          |
| -CH <sub>3</sub>  | -CH(CH <sub>3</sub> )-                               | 3-Hydroxy-2-methylbuttersäure     |          |
| -CH(CH <sub>3</sub> )-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>                              | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxy-4-methyloctansäure      |          |
| -CH <sub>2</sub> -(C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> ) <sub>cyc</sub>                                  | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxy-4-cyclohexylbuttersäure |          |
| d) 3-Hydroxyalkansäuren mit Substituenten: Halogene oder andere funktionelle Gruppen                |  |                                   |          |
| -COOH   | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxysuccinsäure              |          |
| -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> Br   | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxy-6-bromhexansäure        |          |
| -CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> F                                | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxy-7-fluorheptansäure      |          |
| -CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> CN                               | -CH <sub>2</sub> -                                   | 9-Cyano-3-hydroxynonansäure       |          |
| e) 3-Hydroxyalkansäuren mit Substituenten, die eine Estergruppe enthalten                           |  |                                   |          |
| -COOCH <sub>3</sub>   | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxysuccinsäuremethylester   |          |
| -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>  | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxyadipinsäuremethylester   |          |
| -CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -<br>COOCH <sub>3</sub>                           | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3-Hydroxysuberinsäuremethylester  |          |
| f) andere (4-Hydroxyalkansäuren, 5-Hydroxyalkansäuren, Dihydroxyalkansäuren)                        |  |                                   |          |
| -H  | -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -                  | 4-Hydroxybuttersäure              | 4-HB     |
| -CH <sub>3</sub>  | -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -                  | 4-Hydroxyvaleriansäure            | 4-HV     |
| -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>   | -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -                  | 4-Hydroxyhexansäure               | 4-HHx    |
| -H  | -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - | 5-Hydroxyvaleriansäure            | 5-HV     |
| -CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>2</sub> OH                               | -CH <sub>2</sub> -                                   | 3,12-Dihydroxydodekansäure        |          |

Bezüglich der Zusammensetzung kann zwischen Homopolymeren (PHA besteht aus einem Monomer) und Heteropolymeren (PHA setzt sich aus zwei oder mehr Monomeren zusammen) unterschieden werden. Üblich ist die Bezeichnung Copolymere bei zwei Bausteinen und Terpolymere für drei verschiedene Elemente. Mikrobiell synthetisierte Copolymere sind dabei stets statistisch verteilte sog. *random*-Polymere. Die Synthese von Copolymeren hängt vom Organismus und entscheidend von der Kohlenstoffquelle ab. Die Bildung unterschiedlicher Monomere wird einerseits durch die Bereitstellung der entsprechenden Präkursoren (z.B. durch  $\beta$ -Fettsäureoxidation, Fettsäurebiosynthese) und andererseits durch Substratspezifität der Enzyme der PHA-Synthese ( $\beta$ -Ketothiolase, PHA-Synthase) gesteuert. Das Verhältnis der Monomere kann über die Zusammensetzung der Substrate variiert werden und beeinflusst die Eigenschaften des Copolymers [SUDESH und DOI 2000, SUDESH et al. 2000, BABEL et al. 2001, KIM und LENZ 2001].

Das bekannteste Copolymer ist P(3-HB-co-3-HV) (molarer Anteil 3-HV bis 95 %), das u.a. von *R. eutropha* aus Gemischen von Glucose mit Propionsäure, Valeriansäure oder Buttersäure gebildet wird. Weitere Vertreter auf der Basis von 3-HB sind Copolymere mit 4-HB, 4-HV oder 3-HHx sowie Heteropolymere aus 3-HB, 3-HV und 4-HB.

*mcI*-PHA sind häufig Heteropolymere, die sich aus mehr als zwei verschiedenen Monomeren zusammensetzen. Beispiele gibt Tabelle II-4.

Tabelle II-4: Beispiele mikrobieller PHA-Heteropolymere

| Polymer                          | Mikroorganismus                    | Substrat   | Monomere (nicht 3-HB) | Anteil (nicht 3-HB) [mol %]  | Quelle              |
|----------------------------------|------------------------------------|--|-----------------------|------------------------------|---------------------|
| P(3-HB-co-3-HV)                  | <i>R. eutropha</i>                 | Glucose/Propionsäure   | 3-HV                  | 0–30                         | HOLMES 1981         |
|                                  | <i>Azotobacter vinelandii</i> UWD  | Glucose/Valerat<br>Valerat/4-Pentanoat   |                       | 17–24<br>≤ 52                | PAGE et al. 1992    |
|                                  | <i>Paracoccus denitrificans</i>    | Methanol/ <i>n</i> -Amylalkohol  |                       | ≤ 91,5                       | UEDA et al. 1992    |
|                                  | <i>Paracoccus denitrificans</i>    | Methanol<br>Ethanol<br><i>n</i> -Propanol<br><i>n</i> -Butanol<br><i>n</i> -Pentanol |                       | –<br>–<br>≤ 20<br>–<br>≤ 100 | YAMANE et al. 1996b |
|                                  | <i>Methylobacterium extorquens</i> | Methanol/ <i>n</i> -Amylalkohol  |                       | ≤ 38,2                       | UEDA et al. 1992    |
| P(3-HB-co-4-HB)                  | <i>R. eutropha</i>                 | 4-Hydroxybuttersäure/Buttersäure   | 4-HB                  | ≤ 33                         | KUNIOKA et al. 1988 |
| P(3-HB-co-4-HB-co-3-HV)          | <i>R. eutropha</i>                 | 4-Hydroxybuttersäure/Pentansäure   | 4-HB<br>3-HV          | 0–45<br>23–81                | KUNIOKA et al. 1988 |
| P(3-HB-co-3-HV-co-4-HV-co-3-HHx) | <i>P. putida</i>                   | Octansäure/<br>4-Lävulinsäure  | 3-HV<br>4-HV<br>3-HHx | 47–64<br>16–24<br>3–15       | SCHMACK et al. 1998 |
| P(3-HB-co-3-HHx)                 | <i>Aeromonas hydrophila</i>        | Ölsäure  | 3-HHx                 | ≤ 17                         | LEE et al. 2000b    |

Nach der Entdeckung von zahlreiche Monomeren mit längeren Kohlenstoffketten hat sich in der wissenschaftlichen Literatur eine Einteilung durchgesetzt, die sich an der Kettenlänge orientiert:

|                 |   |                                      |
|-----------------|---|--------------------------------------|
| <i>scI</i> -PHA | → Kettenlänge C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub>  | ( <i>short chain length</i> -PHA)    |
| <i>mcl</i> -PHA | → Kettenlänge C <sub>6</sub> -C <sub>16</sub> | ( <i>medium chain length</i> -PHA) . |

### 2.1.3.2 Eigenschaften von PHA

Auf Grund der Vielzahl von Kombinationen verschiedener Monomere variieren die Eigenschaften von PHA. So sind von der relativ steifen, spröden P(3-HB) bis zu einem gummiartigen Elastomer P(4-HB) alle Zwischenformen denkbar. Theoretisch ist es möglich, für jeden speziellen Verwendungszweck eine PHA mit optimierten Eigenschaften herzustellen. Alle Vertreter verfügen jedoch über folgende Charakteristika [LAFFERTY et al. 1988, STEINBÜCHEL 1996]:

- PHAs sind thermoplastisch und/oder elastisch
- haben einen hohen Polymerisationsgrad (bis 40 000)
- sind wasserunlöslich
- sind biologisch abbaubar
- sind wasserdampfdurchlässig
- haben gute Sauerstoff- und Aromabarriere-Eigenschaften<sup>1</sup>
- besitzen eine hohe UV-Resistenz
- sind nicht toxisch
- sind biokompatibel
- sind piezoelektrisch<sup>2</sup>
- sind optisch aktiv<sup>2</sup>

Die mechanischen und physikalischen Eigenschaften der Polymere sind von der Kettenlänge der Monomere, der Art der Seitenketten (und damit dem produzierenden Mikroorganismus), dem verwendeten Substrat und der Prozeßführung abhängig. Dabei wird das Auftreten bestimmter Monomere durch die Substratauswahl bestimmt, die prozentuale Zusammensetzung kann während des Polymerbildungsprozesses gesteuert werden.

Die physikalischen Eigenschaften von PHB wie Kristallinität und Schmelzpunkt sind mit denen von Polypropylen vergleichbar, deutliche Unterschiede zeigen sich jedoch in der höheren Sprödigkeit (d.h. geringeren Bruchdehnung) von P(3-HB), was die Anwendbarkeit in bestimmten Bereichen einschränkt [ABE et al. 1994]. Dieses Problem kann jedoch durch Variation der Verarbeitungsmethoden umgangen werden [HOLMES 1988, LÜPKE et al. 1998]. Untersuchungen von DE KONING zeigten, daß durch einfache thermische Behandlung die Bruchdehnung von 8 % auf über 30 % erhöht werden kann [DE KONING und LEMSTRA 1993, DE KONING 1995]. Interessant ist weiterhin, daß PHB-Proben mit extrem hohem Molekulargewicht

<sup>1</sup> Für Details siehe [MIGUEL et al. 1997, MIGUEL und IRUIN 1999a, 1999b].

<sup>2</sup> bisher nur für PHB und deren Copolymere nachgewiesen

(> 5 000 000 g mol<sup>-1</sup>) nach einfacher mechanischer Behandlung Bruchdehnungen von bis zu 67 % aufweisen [KUSAKA et al. 1998, 1999].

P(3-HB-co-3-HV)-Copolymere zeichnen sich durch eine geringere Sprödigkeit aus. Hier existiert eine starke Abhängigkeit von Eigenschaften wie Schmelzpunkt, Glasübergangstemperatur, E-Modul, Zugfestigkeit und Bruchdehnung vom HV-Anteil [HOLMES 1988, MARCHESSAULT et al. 1988, DOI 1990].

P(4-HB) und deren Copolymere sind auf Grund interessanter mechanischer Eigenschaften und ausgezeichneter Biokompatibilität zunehmend in den Fokus der PHA-Forschung gelangt [STEINBÜCHEL et al. 1994, SUDESH et al. 1999, KIMURA et al. 1999]. Diese PHA haben einen niedrigeren Schmelzpunkt und eine vergleichsweise geringe Kristallinität, was eine höhere Elastizität ergibt [KUNIOKA et al. 1988, NAKAMURA et al. 1992, MADDEN et al. 2000].

*mcl*-PHA sind gummiartige, flexible Polymere mit geringer Kristallinität und können daher für Anwendungen, bei denen hohe Elastizität erwünscht ist (Überzüge, bestimmte medizinische Implantate u.a.) eingesetzt werden [WITHOLT und KESSLER 1999, SODIAN et al. 2000, VAN DER WALLE et al. 2001]. Weitere Anwendungsgebiete sind Zusätze zu umweltfreundlichen Farben [VAN DER WALLE et al. 1999]. Bisher sind nur einige *mcl*-PHA detailliert beschrieben, die wichtigsten Vertreter sind 3-HHx, 3-HO, 3-HD und 3-HDD. Die Schmelztemperaturen für *mcl*-PHA liegen zwischen 40–60°C [DE KONING 1995, WITHOLT und KESSLER 1999, REN et al. 2000]. Eine Möglichkeit, die elastischen Eigenschaften von *mcl*-PHA mit ungesättigten Seitenketten bis zu einer gummiartige Konsistenz zu modifizieren, bietet die Quervernetzung durch UV-Bestrahlung [DE KONING et al. 1994, ASHBY et al. 1998].

Für Copolymere aus *mcl*-PHA (3-HHx, 6-HH, 3-HP) und 3-HB-Monomeren wurde wie bei 3-HV und 4-HB eine starke Abhängigkeit der Eigenschaften (Glasübergangstemperatur, Schmelztemperatur, E-Modul usw.) vom Anteil der *mcl*-Komponente gefunden [SUDESH et al. 2000].

Weitere charakteristische Merkmale sind das Molekulargewicht (meist als gewichtsmittleres Molekulargewicht  $M_w$  angegeben) und die Molekulargewichtsverteilung des gebildeten Polymers (siehe auch Kapitel 2.1.3.3). Diese sind von Organismus, Substrat und Prozeßbedingungen abhängig und können zudem durch die verschiedenen Aufarbeitungsschritte (Trocknung, Extraktion) erheblich beeinflußt werden [HOLMES 1988, SUDESH und DOI 2000, VAN DER WALLE 2001].

Die Gewinnung der Polymere kann u.a. durch Lösungsmittlextraktion erfolgen, einen Überblick über die Lösungseigenschaften gibt Tabelle II-5. PHA sind in Wasser und Ether nicht, in halogenierten Lösungsmitteln dagegen gut löslich [LAFFERTY et al. 1988].

Tabelle II-5: Lösungeigenschaften von PHA

|                        |  |
|------------------------|--|
| gute Lösungsmittel     | Chloroform, Di-, Tri- und Tetrachlorethan, Dichlormethan, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Ethylencarbonat, Trifluorethanol |
| moderate Lösungsmittel | Dioxan, Octanol, Toluol  |
| nicht löslich in       | Wasser, Methanol, Ethanol, Propanol, Aceton, Diethylether  |

Basierend auf thermodynamischen Modellrechnungen für polare Polymere können drei Löslichkeitsparameter (nach Hansen) angegeben werden, die die Abschätzung der Löslichkeit von PHB in unterschiedlichen Lösungsmitteln erlauben und gut mit experimentell bestimmten Werten korrelieren [TERADA und MARCHESSAULT 1999]. Im Hinblick auf die Extraktion der Polymere stellen die sehr hohen Viskositäten der Polymerlösungen oft ein Problem dar. Diese treten schon bei geringen Konzentrationen von 1–2 Masse% auf und können z.B. die effektive Abtrennung der PHB-haltigen Lösungen von den Zellbruchstücken erschweren.

Die durch die kristalline Struktur bedingten piezoelektrischen Eigenschaften von P(3-HB) und P(3-HB-co-3-HV) sind im Hinblick auf den medizinischen Einsatz besonders interessant, da sie möglicherweise das Knochenwachstum stimulieren [FUKADA und ANDO 1986, AMASS et al. 1998].

### 2.1.3.3 Analytik von PHA

Als erste qualitative Methode zum Nachweis von PHA galt die Anfärbung der Granula mit Sudanschwarz B, worauf auch die frühere Bezeichnung „sudanophile Einschlüsse“ beruht. Es zeigte sich jedoch später, daß lediglich die Lipide der granulaassoziierten Membran durch Sudanschwarz angefärbt wurden und nach Waschprozessen keine Färbung mehr erfolgte [STEINBÜCHEL 1996]. Spezifische PHA-Färbungen sind mit Nilrot [FOWLER und GREENSPAN 1984] oder Nilblau [OSTLE und HOLT 1982, PAGE und TENOVE 1997] möglich. Diese Spezialfärbungen können zur Analyse des PHA-Bildungsprozesses und zur Bestimmung des PHB-Gehaltes der Zellen genutzt werden [DEGELAU et al. 1995, MÜLLER et al. 1995, GORENFLO et al. 1999, JAMES et al. 1999, MÜLLER et al. 1999].

Die qualitative Zusammensetzung von PHA bestimmt man mit  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie [KUNIOKA et al. 1988, DOI et al. 1989, BONTRHONE et al. 1992, HUIJBERTS et al. 1994, VECHERSKAYA et al. 2001] sowie GC-MS oder FAB-MS [EGGINK et al. 1992, BALLISTRERI et al. 1999]. Weitere Nachweismethoden zur quantitativen Analyse sind die Trübungsmessung nach Natriumhypochlorit-Aufschluß [WILLIAMSON und WILKINSON 1958], Gaschromatographie nach saurer Hydrolyse und Veresterung [BRAUNEGG et al. 1978, RIIS und MAI 1988, HUIJBERTS et al. 1994b] oder FT-IR-Spektroskopie [KANSIZ et al. 2000]. Ein detaillierter Überblick über die Methoden der PHA-Analytik findet sich bei AMASS et al. (1998).

Eine wichtige Charakterisierung der PHA erfolgt durch die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung, da bei der Polymersynthese *in vivo* Gemische von Molekülen unterschiedlicher Kettenlänge entstehen. Die Polydispersität von Polymeren wird durch die Molekulargewichtsverteilung beschrieben, die im Idealfall einer Gaußschen Verteilungsfunktion entspricht. Zur Charakterisierung des Verteilungszustandes werden Kennzahlen (Gleichungen 2.1 bis 2.4) definiert, z.B. das zahlenmittlere Molekulargewicht  $\bar{M}_n$  (*number average molecular weight*) und das gewichtsmittlere Molekulargewicht  $\bar{M}_w$  (*weight average molecular weight*). Das Verhältnis  $M_w/M_n$ , als Polydispersitätsindex PI bezeichnet, stellt einen weiteren charakteristischen Parameter dar. Im Idealfall ist  $PI = 1$  und je größer dieser Wert ist, um so uneinheitlicher sind

die Moleküle verteilt. Zur Beschreibung der Molekulargewichtsverteilung wird häufig auch die Uneinheitlichkeit  $U$  verwendet.

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^n (n_i \cdot M_i)}{\sum_{i=1}^n n_i} \quad (2.1)$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^n (n_i \cdot M_i) \cdot M_i}{\sum_{i=1}^n (n_i \cdot M_i)} \quad (2.2)$$

$$PI = \frac{M_w}{M_n} \quad (2.3)$$

$$U = \frac{M_w}{M_n} - 1 \quad (2.4)$$

Die wichtigsten Methoden zur Bestimmung dieser Kennwerte sind die statische Streulichtmessung sowie die Ausschlußchromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) bzw. Gelpermeationschromatographie (GPC) mit verschiedenen Detektionsmöglichkeiten (IR, UV, Refraktionsindex, Differentialviskosität, Laserstreulicht) [SUDESH et al. 2000]. Die chromatographischen Methoden werden als Relativmethoden mit Polymerstandards (meist Polystyrol) kalibriert. Bei Vergleichen muß unbedingt die verwendete Analysenmethode beachtet werden.

Eine weitere, unkomplizierte Methode zur Molekulargewichtsbestimmung stellt die Viskositätsmessung von verdünnten Polymerlösungen dar [SCHURZ 1972, HUGHLIN und RADWANN 1981]. Aus der Viskosität der Lösung kann unter Berücksichtigung von systemabhängigen Konstanten mit Hilfe der Kuhn-Mark-Houwink-Beziehung das viskositätsmittlere Molekulargewicht  $\overline{M}_v$  berechnet werden [HOLMES 1988]. Es kann theoretisch Werte zwischen dem zahlenmittleren und gewichtsmittleren Molekulargewicht einnehmen. Für Polymere mit enger Molekulargewichtsverteilung ( $U < 3$ ) unterscheiden sich die Werte der viskosimetrischen und gewichtsmittleren Molekulargewichte nur unwesentlich, so daß letztere aus der Kuhn-Mark-Houwink-Gleichung in guter Näherung bestimmt werden kann [CORNIBERT et al. 1970]. Verfahren zur Polymercharakterisierung durch Viskositätsmessung wurden auch für PHB angewendet [CORNIBERT et al. 1970, MARCHESSAULT et al. 1970, ATIKA et al. 1976, MIYAKI et al. 1977, HUGHLIN und RADWANN 1991].

#### 2.1.4 BIOSYNTHESE VON PHA

Grundsätzlich kann man die PHA-Synthese in drei Phasen unterteilen: (I) Aufnahme des Kohlenstoffsubstrates in die Zelle, (II) anabole oder katabole Umwandlung in ein Hydroxyacyl-CoA und (III) PHA-Synthase-katalysierte Umsetzung dieses Substrats zum Polymer unter Freisetzung von Coenzym A (Abb. 2-2).

Im folgenden soll die Biosynthese von PHA an Hand des am besten untersuchten Beispiels, der Biosynthese von PHB in *R. eutropha*, beschrieben werden. Intrazellulärer Ausgangspunkt für die PHB-Biosynthese ist Acetyl-CoA, das unter normalen Bedingungen über den Citronensäurezyklus (TCA-Zyklus) zur Gewinnung von Zellmaterial und Energie verwendet wird. Unter Bedingungen, die dies verhindern (z.B. eingeschränkte NAD(P)H-Oxidation infolge fehlender reduktiver Aminierung von Pyruvat und  $\alpha$ -Ketoglutarat bei Stickstoffmangel) kommt es zu

erhöhten Konzentrationen an NAD(P)H, NADH und Acetyl-CoA. Dies führt zu einer Hemmung der Citratsynthase und einer weiteren Rückregulierung des TCA-Zyklus. Zur Aufrechterhaltung des energetischen Gleichgewichts wird im sogenannten *overflow*-Metabolismus aus Acetyl-CoA und NAD(P)H PHB synthetisiert [BABEL et al. 1990, BRAUNEGG et al. 1998, BABEL et al. 2001]. Das läßt vermuten, daß das Schlüsselenzym des TCA-Zyklus (Citratsynthase) und das erste Enzym der PHB-Synthese, die  $\beta$ -Ketothiolase, entscheidende Bedeutung für die Regulation der PHB-Synthese haben, was für *R. eutropha* [OEDING und SCHLEGEL 1973] bestätigt wurde.

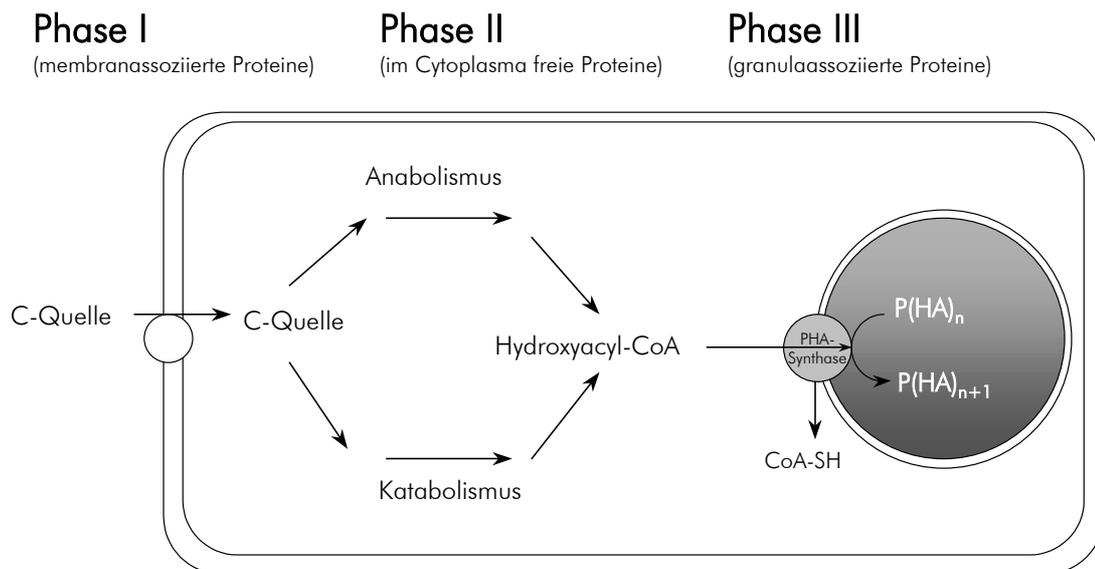


Abb. 2-2: Grundlegende Schritte der PHA-Synthese [STEINBÜCHEL und VALENTIN 1995]

Die für die PHB-Synthese von Acetyl-CoA ausgehende Reaktion in Phase III verläuft bei den meisten Bakterien (mit Ausnahme von *Rhodococcus rubrum*, *Zoogloea ramigera* und *Methylobacterium rhodesianum*) in drei Teilschritten (siehe auch Abb. 2-3) [SUDESH et al. 2000, KIM und LENZ 2001]:

- Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA durch  $\beta$ -Ketothiolase (EC 2.3.1.9)
- Reduktion von Acetoacetyl-CoA zu (*R*)-3-Hydroxybutyryl-CoA durch NAD(P)H-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase (EC 1.1.1.36)
- Polymerisation der (*R*)-3-Hydroxybutyryl-CoA zu Poly(3-hydroxybutyrat) durch P(3-HB) Polymerase (PHB-Synthase) (EC 2.3.1.-)

Die  $\beta$ -Ketothiolase katalysiert den ersten Schritt jeder PHA-Synthese und gilt daher als ein Schlüsselenzym für die Regulation. Diese Thiolasen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: die erste Gruppe katalysiert die Umsetzung von  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Einheiten von  $C_4$  bis  $C_{16}$  und ist in den Fettsäurestoffwechsel involviert, die zweite Gruppe (biosynthetische Thiolase) kann nur  $C_3$  bis  $C_5$ -Körper umsetzen und ist Bestandteil der Steroid- und PHA-Synthese [DOI 1990, MADISON und Huisman 1999]. In einigen PHA-akkumulierenden Organismen (u.a. in *R. eutrophus* [HAYWOOD et al. 1988a], *Zoogloea ramigera* (*Z. ramigera*) [DOI 1990] wurden

außerdem zwei Isoenzyme unterschiedlicher Spezifität nachgewiesen. Die Aktivität des Enzyms wird u.a. durch die intrazellulären Konzentrationen an freiem Coenzym A bzw. NADH/NAD(P)H beeinflusst [OEDING und SCHLEGEL 1973, DOI 1990, LEE et al. 1993].

Die Acetoacetyl-CoA-Reduktase wurde in verschiedenen PHA-Produzenten nachgewiesen, in *R. eutropha*, *Z. ramigera* und *M. rhodesianum* in zwei Formen: einer NAD(P)H-abhängigen (spezifisch für die *R*-Konfiguration) und einer NADH-abhängigen Form (*S*-spezifisch bei *Z. ramigera* und *M. rhodesianum*) [DOI 1990, ANDERSON und DAWES 1990, MOTHEs und BABEL 1995, MOTHEs 1997, MADISON und HUISMAN 1999]. In *R. eutropha* und *Z. ramigera* ist nur die NAD(P)H-abhängige Form direkt an der PHA-Synthese beteiligt [HAYWOOD et al. 1988b].

Die PHA-Synthase (PHA-Polymerase) katalysiert die Verlängerung des PHA-Moleküls um ein weiteres Monomer durch Ausbildung einer Esterbindung unter Abspaltung von Coenzym A und wurde zuerst in *R. eutropha* und *Z. ramigera* charakterisiert. Dieses Enzym findet sich in Abhängigkeit vom metabolischen Status der Zellen entweder gelöst im Plasma oder in einer granulaassoziierten Form [HAYWOOD et al. 1989, DOI 1990, SUDESH et al. 1998]. Der Mechanismus des Übergangs von der gelösten zur granulaassoziierten Form ist Teil des Modells zur Granulabildung [GERNGROSS et al. 1993, GERNGROSS und MARTIN 1995]. Die PHA-Synthasen verschiedener Organismen unterscheiden sich in ihrer Spezifitäten bezüglich der Kettenlänge und Struktur der Substrate [SUDESH et al. 2000]. Widersprüchliche Angaben existieren über den Zusammenhang zwischen Aktivität der Synthase und dem Molekulargewicht (der Kettenlänge) des Polymers. Einerseits wurde beschrieben, daß mit steigender Aktivität der Synthase das Molekulargewicht niedriger wird [SIM et al. 1997], andere Autoren fanden diesbezüglich keinen Zusammenhang [MADDEN et al. 1999].

Die Gene der drei beschriebenen Enzyme werden mit *phbA* (Ketothiolase), *phbB* (Acetoacetyl-CoA-Reduktase) und *phbC* (PHB-Synthase) bezeichnet und wurden zuerst für *R. eutropha* beschrieben. Bis dato sind die Sequenzen für 53 verschiedene PHA-Synthasen aus 42 verschiedenen Bakterien veröffentlicht [STEINBÜCHEL und HEIN 2001].

Anhand der Genstruktur werden drei Typen von PHA-Synthasen unterschieden [REHM und STEINBÜCHEL 1999, SUDESH et al. 2000]:

- Typ I z.B. in *R. eutropha*, kodierendes Gen: *phaC*, Bildung von *scl*-PHA, Substrate:  $C_3-C_5$
- Typ II z.B. in *P. oleovorans*, kodierendes Gen: *phaC1/C2*, Bildung von *mcl*-PHA, Substrate:  $C_6-C_{14}$
- Typ III z.B. in *Chromatium vinosum*, kodierende Gene: *phaC*, *phaE*.

Für *R. eutropha* sind die Gene als Cluster in der Reihenfolge Synthase–Ketothiolase–Reduktase auf einem Operon kodiert (Bezeichnung *phaCAB*). Genauere Angaben über Sequenzen, Eigenschaften, Anordnungen der PHA-Synthase-Gene anderer Bakterien findet man bei REHM und STEINBÜCHEL (1999) und STEINBÜCHEL und HEIN (2001).

Wie in Abb. 2-3 dargestellt, umfaßt der gesamte PHA-Metabolismus neben der Synthese auch den intrazellulären PHA-Abbau. Letzterer wird durch die Lokalisation der PHA-Depolymerase (kodierendes Gen: *phaZ*) auf der Granulaoberfläche ermöglicht, die den Abbau des Polymers zu (in den meisten Fällen) Dimeren katalysiert und damit die Reutilisierung einleitet.

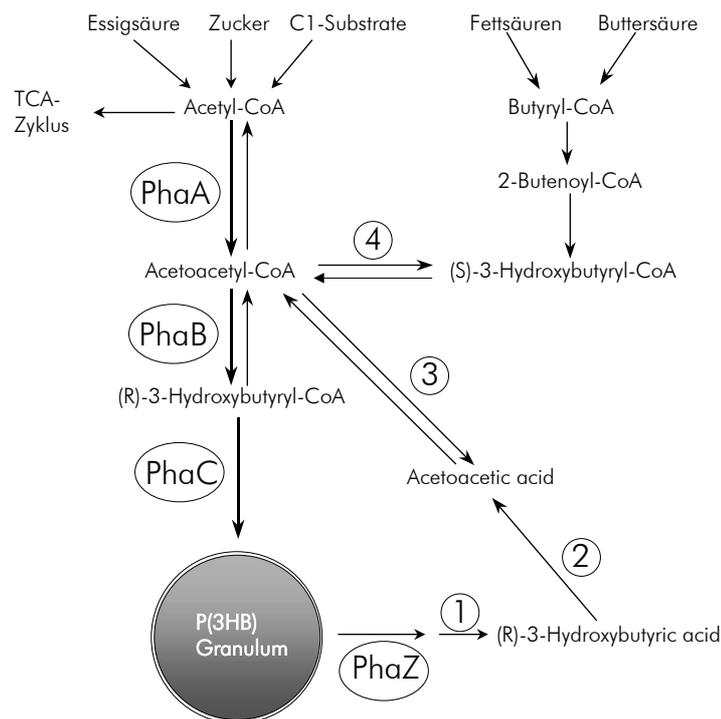


Abb. 2-3: Der zyklische Metabolismus von PHB-Synthese und Abbau [SUDESH et al. 2000] (PhaA:  $\beta$ -Ketothiolase, PhaB: NAD(P)H-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase, PhaC: PHA-Synthase, PhaZ: PHA-Depolymerase, 1: Dimerhydrolase, 2: (*R*)-3-hydroxybutyrat-dehydrogenase, 3: Acetoacetyl-CoA-Synthase, 4: NADH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase)

Die Bildung von *mcl*-PHA in Pseudomonaden erfolgt nach einem anderen Stoffwechselweg, der zum ersten Mal für *P. oelovorans* beschrieben wurde [LAGEVEEN et al. 1988]. Die Substrate sind hier Alkane, Alkohole oder Alkanoate verschiedener Kettenlänge, die über die  $\beta$ -Oxidation des Fettsäureabbaus zu den entsprechenden 3-Hydroxyacyl-CoA-Derivaten, also Substraten für die PHA-Synthase, metabolisiert werden. Dabei können neben Monomeren, die der Kettenlänge des Substrates entsprechen, auch Monomere mit zwei Kohlenstoffatomen weniger synthetisiert werden. Alternativ können *mcl*-PHA aus „unrelated“ Substraten über die *de novo*-Fettsäuresynthese gebildet werden [HUIJBERTS et al. 1994]. Die PHA-Synthasen der Pseudomonaden akzeptieren ein großes Substratspektrum und können auch verzweigte oder seitenketten-substituierte Monomere in die *mcl*-PHA inkorporieren [SUDESH et al. 2000].

### 2.1.5 ABBAU VON PHA

Die Bioabbaubarkeit unter Umweltbedingungen, aber auch in Organismen (*in vivo*) ist ein generelles Merkmal von PHA. Der Abbau kann rein hydrolytisch oder enzymatisch (durch die Wirkung von extrazellulären PHA-Depolymerasen) und durch Kombination beider Prozesse erfolgen.

Ein prinzipielles Problem stellt dabei die Definition der Abbaubarkeit (Gewichtsverlust, Mineralisierung, Verlust von bestimmten Eigenschaften) dar. Hier besteht die Notwendigkeit einer

klaren Begriffsbestimmung (vollständig abbaubar, hinlänglich abbaubar usw.); Testverfahren müssen vereinheitlicht werden [HASCHE et al. 1998a, 1998b, 1998c, SWIFT 1992]. Allgemein anerkannte Abbaubarkeitstests (nach OECD) sind u.a. der modifizierte Sturm-Test, der modifizierte MITI-Test und der *closed-bottle*-Test [AMASS et al. 1995]. In Deutschland sind die Testverfahren in der DIN V 54900 festgelegt.

PHA-abbauende Organismen (Bakterien und Pilzen verschiedener Gattungen) wurden aus den verschiedensten Ökosystemen isoliert (Boden, Klärschlamm, Kompost, Süßwasser, Brackwasser) [BRANDL et al. 1995]. Der Nachweis sowohl für den aeroben als auch für den anaeroben Abbau von *scI*-PHA (P(3-HB), P(3-HB-co-3-HV) und P(3-HB-co-4-HB)) erfolgte unter Labor- und Umweltbedingungen z.B. in Böden, Meer- und Flußwasser, Seen und in Kompost [MERGAERT et al. 1995, 1993, 1992, GILMORE et al. 1990, BRANDL und PÜCHNER 1990].

Die Abbaugeschwindigkeit in der Umwelt ist von der Zusammensetzung und den physikalischen und mechanischen Eigenschaften des Polymers, aber insbesondere den jeweiligen Umgebungsbedingungen (Tabelle II-6) abhängig.

Tabelle II-6: Abbauezeiten für PHB unter verschiedenen Umweltbedingungen [nach HOLMES 1988, + LAFFERTY et al. 1988]  
#Schmelzgußscheibe (1 mm dick), Film (75 µm), Film<sup>++</sup> (50 µm), Monofilament (200 den) <sup>¶</sup>vollständiger Abbau (100% Gewichtsverlust)

| Bedingungen                    | Probekörper <sup>#</sup> | Abbauezeit [Wochen] <sup>¶</sup> |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Anaerobes Abwasser             | Schmelzgußscheibe        | 6                                |
|                                | Film                     | 1                                |
| Aerobes Abwasser <sup>+</sup>  | Schmelzgußscheibe        | 60                               |
|                                | Film <sup>++</sup>       | 7                                |
| Meerwasser (15°C) <sup>+</sup> | Schmelzgußscheibe        | 350                              |
|                                | Film <sup>++</sup>       | 50                               |
| feuchter Boden (25°C)          | Schmelzgußscheibe        | 75                               |
|                                | Film                     | 12                               |
| Estuarines Sediment (20°C)     | Schmelzgußscheibe        | 40                               |
|                                | Film                     | 8                                |
| Rinderpannen                   | Schmelzgußscheibe        | 25                               |
| <i>in vivo</i> (Mensch)        | Monofilament             | 250                              |

Die Ergebnisse mehrerer Autoren über den Abbau verschiedener *scI*-PHA lassen sich wie folgt zusammenfassen [ANDERSON und DAWES 1990, BRAUNEGG et al. 1998, SUDESH et al. 2000]:

- Unter anaeroben Bedingungen erfolgt der Abbau von PHA schneller als bei Anwesenheit von Sauerstoff.
- Copolymere mit 4-HB-Anteilen werden mit höherer Geschwindigkeit abgebaut als P(3-HB) und P(3-HB-co-3-HV).
- Die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus von P(3-HB) ist höher als die von P(3-HB-co-3-HV) und vom HV-Anteil unabhängig.
- Ein wesentlicher Faktor ist der Kristallisationsgrad des Polymers, mit steigendem Kristallisationsgrad nimmt die Abbaugeschwindigkeit ab.

Über den Abbau von *mcl*-PHA unter Umweltbedingungen gibt es momentan nur wenige Daten. Für P(3-HO) wurde ein sehr langsamer hydrolytischer Abbau über 60 Tage bzw. 2 Jahre gefunden [MARIOS et al. 1999, 2000], wie bereits in Laboruntersuchungen festgestellt [FOSTER et al. 1996, MALLARDÉ et al. 1998].

Der Abbau von PHA im menschlichen Körper verläuft deutlich langsamer als unter Umweltbedingungen bei Anwesenheit von PHB-abbauenden Mikroorganismen [LAFFERTY et al. 1988]. So gibt HOLMES (1988) 250 Wochen für den vollständigen Abbau eines PHB-Fadens *in vivo* an. Es wird jedoch vermutet, daß auch im Körper Enzyme am Abbau der PHA beteiligt sind [WINTERMANTEL und HA 1998].

Orientierende Untersuchungen in Tieren zeigten ebenfalls lange Zeiträume: in Mäusen wurden subkutane Implantate in 24 Wochen zu 56–99% abgebaut; Knochenstiftimplantate in Kaninchen innerhalb von 19 Wochen überhaupt nicht [AN et al. 2000].

Der hydrolytische Abbau von PHA in Pufferlösung (als *in vitro*-Test unter physiologischen Bedingungen) erfolgt im Vergleich zu anderen bioabbaubaren Polymeren, wie PLA und PGA, mit deutlich geringerer Geschwindigkeit (Tabelle II-7).

Tabelle II-7: Hydrolytischer Abbau verschiedener Biopolymere [AMASS et al. 1998].  
(10% Gewichtsverlust, T = 37°C, pH = 7,4)

| Polymer                         | Abbauzeit [d] |
|---------------------------------|---------------|
| P(3-HB)                         | 104,2         |
| P(3-HV-co-3-HV), 12 % 3-HV      | 229,1         |
| PLLA-co-PGA (8 % PLLA, Vicryl®) | 18,8          |
| PGA (Dexon®)                    | 22,9          |
| PDS                             | 50,0          |

### 2.1.6 ÜBERBLICK ÜBER TECHNISCH RELEVANTE PROZESSE DER PHA-HERSTELLUNG

Seit der Entdeckung der thermoplastischen Eigenschaften der PHA war es Ziel zahlreicher Forschergruppen, ein ökonomisches Verfahren zu entwickeln, in dem ein Polymer mit gewünschten Eigenschaften produziert werden kann. Verfahren zur großtechnischen Herstellung von P(3-HB) und P(3-HB-co-3-HV), bekannt als Biopol®, wurden durch die Unternehmen ICI Biopolymer Ltd. später ZENECA durchgeführt (*R. eutropha*-Mutante, Substrat: Glucose bzw. Glucose + Propionsäure, zweistufig unter Phosphatmangel). Die Herstellung von P(3-HB) erfolgte ebenfalls durch die Chemie Linz GmbH (*A. latus*, Substrat: Saccharose, einstufig, wachstumsassoziiert). Der ICI-Prozeß wurde bis zu einem Fermentationsmaßstab von 200 m<sup>3</sup> und einer Kapazität von 300 t a<sup>-1</sup> durchgeführt [BYROM 1987], der Prozeß der Chemie Linz in Reaktoren bis 15 m<sup>3</sup> und einem Ausstoß von 20 t a<sup>-1</sup> [HÄNGGI 1990, HRABAK 1992]. Die Firma MONSANTO kaufte 1996 das ICI-Verfahren und entwickelte außerdem Strategien zur Herstellung von PHA in transgenen Pflanzen (s.u.). Zu hohe Kosten führten 1998 bei MONSANTO bzw. 1993 bei der Chemie Linz GmbH zur Einstellung der Produktion und verhinderten die weitere Massenherstellung und -anwendung von PHA [LAFFERTY et al. 1988, HÄNGGI 1990, CHOI und

LEE 1999b, KESSLER et al. 2001]. In einer jüngst erschienenen Publikation wird erstmals über die Herstellung von *mcl*-PHA im industriellen Maßstab berichtet. In einem 20 m<sup>3</sup>-Reaktor mit *Aeromonas hydrophilas* 4AK4 und Glucose als Substrat wird unter Phosphatlimitation Poly(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyhexanoat) mit einer Produktivität von 0,54 g h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup> gebildet (PHA-Gehalt 50 %, Gesamtdauer 60 h, Zusatz von Laurinsäure) [CHEN et al. 2001].

Nach wie vor besteht ein großer Forschungsbedarf für die Verbesserung der ökonomischen Aspekte. Die wichtigsten Zielgrößen bei der Neu- und Weiterentwicklung von Strategien zur PHA-Herstellung sind dabei [CHOI und LEE 1999b]:

- der PHA-Gehalt
- die Produktivität (Raum-Zeit-Ausbeute)
- die auf die Kohlenstoffquelle bezogene Ausbeute
- die Substratkosten.

Den größten Einfluß hat der PHA-Gehalt, da dieser neben der erreichbaren Produktivität auch die Kosten für die Gewinnung/Extraktion beeinflusst [CHOI und LEE 1999b].

### 2.1.6.1 PHA-Synthese in Wildtyp-Bakterien

#### *2.1.6.1.1 scl*-PHA

Die meisten Untersuchungen wurden mit *R. eutropha*, *A. latus*, einigen methylotrophen Stämmen und *Azotobacter* durchgeführt. Vertreter dieser Gattungen können in Abhängigkeit vom Substrat PHB in Anteilen von über 60 % in der Trockenmasse akkumulieren.

Prozesse mit *A. latus* und Saccharose erzielen die höchsten bisher berichteten Produktivitäten, da die PHB-Bildung wachstumsassoziiert erfolgt. In *fed-batch* Prozessen wurden bei einem PHB-Gehalt von 50 % eine Produktivität von 3,97 g PHB l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> erreicht [YAMANE et al. 1996], bei kontinuierlichem Betrieb ( $D=0,4$  h<sup>-1</sup>) waren es 4,69 g PHB l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Gehalt: 71 %) [LAFFERTY und BRAUNEGG 1984a]. Kombiniert man die *fed-batch* Variante mit einer zweiten Phase unter Stickstoffmangel erreicht man sogar noch höhere Werte: 4,94 g PHB l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> bei einem PHB-Gehalt von 88 % [WANG und LEE 1997].

Mit *R. eutropha* sind die höchsten Produktivitäten (PHB-Gehalt ca. 80 %) von 3,75 (Substrat: Glucose) bzw. 3,14 g PHB l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in *fed-batch*-Prozessen unter Phosphatlimitation [RYU et al. 1997, 1999] erreichbar. Wird die PHB-Bildung durch Stickstoffmangel initiiert, sind nur Werte von 2,63 [LEE et al. 1997] bzw. 2,24 g PHB l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> realisierbar [KIM et al. 1994a].

Bei der Synthese von P(3-HB-co-3-HV) können unter Stickstoffmangel ähnliche Werte beobachtet werden: 2,55 g PHA l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (*R. eutropha*, Glucose + Propionsäure [KIM et al. 1994b]). Eine japanische Arbeitsgruppe berichtet über den Einsatz von *R. eutropha* in einer Mischkultur mit *Lactobacillus delbrueckii* zur Synthese von P(3-HB) aus Glucose [KATOH et al. 1999, TOHYAMA und SHIMIZU 1999, TOHYAMA et al. 2000]. Beide Organismen werden zusammen in einem Bioreaktor kultiviert. Glucose als primäre Kohlenstoffquelle wird durch *L. delbrueckii* zu Lactat umgewandelt, welches dann als Substrat für *R. eutropha* dient. Bei gleichzeitiger Steuerung von Glucosedosierung, Gelöstsauerstoff- und Stickstoffkonzentration wurden bisher

Produktivitäten von max.  $0,3 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und Ausbeuten von  $0,24 \text{ g g}^{-1}$  erreicht [TOHYAMA et al. 2000].

In Prozessen mit methylotrophen Bakterien auf der Basis von Methanol erreicht man trotz hoher Zellkonzentrationen auf Grund relativ niedriger PHA-Gehalte ( $< 65 \%$ ) im Vergleich zu *Ralstonia* und *Alcaligenes* nur vergleichsweise niedrige Raum-Zeit-Ausbeuten von maximal  $1,86 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (*M. extorquens*, PHB-Gehalt:  $52 \%$ ) [KIM et al. 1999]. Bemerkenswert ist, daß die PHB-Bildung in diesem Fall durch Mangel an Kalium initiiert wurde und deutlich höher war, als für Prozesse unter Stickstoffmangel ( $0,88 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) mit einem PHB-Gehalt von  $64 \%$  [SUZUKI et al. 1986]. In weiteren Experimenten zeigten die Autoren außerdem, daß die Methanolkonzentration die Ausbeute entscheidend beeinflusst [SUZUKI et al. 1986b, SUZUKI et al. 1988].

*A. vinelandii* UWD ist in der Lage, PHB während der exponentiellen Wachstumsphase bis zu einem Gehalt von  $75 \%$  zu akkumulieren [PAGE und KNOSP 1989]. Untersuchungen mit verschiedenen komplexen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zeigten unter optimierten Bedingungen eine maximale Produktivität von  $1,4 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [PAGE 1992b]. *A. chroococcum* akkumuliert unter Phosphatmangel bis zu  $75 \%$  PHB in der Biomasse, es werden Produktivitäten von  $2,3 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  PHB [SAVENKOVA et al. 1999] erzielt.

#### 2.1.6.1.2 *mcl*-PHA

Am besten untersucht ist die Bildung von *mcl*-PHA mit *Pseudomonas oleovorans* und *P. putida* auf der Basis von Alkanen, Alkoholen und Alkanoaten unterschiedlicher Kettenlänge. Die ersten kontinuierlichen Prozesse mit *n*-Octan als Substrat waren durch Produktivitäten von  $0,58$  bzw.  $0,74 \text{ g PHA l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  mit PHA-Gehalten von ca.  $33 \%$  gekennzeichnet [PREUSTING et al. 1993, HAZENBERG und WITHOLT 1997]. Erst in jüngster Zeit konnten mit *fed-batch*-Prozessen unter Verwendung von Ölsäure Produktivitäten bis  $1,91 \text{ g PHA l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  mit einem PHA-Anteil von  $51 \%$  in der Biomasse realisiert werden [LEE et al. 2000a].

#### 2.1.6.1.3 PHA aus alternativen, kostengünstigen Substraten

Der Preis für das Kohlenstoffsubstrat hat entscheidenden Einfluß auf die Gesamtkosten des PHA-Produktionsprozesses und nimmt unabhängig vom PHA-Produzenten und der erreichten Produktivität einen Anteil von ca.  $50\text{--}60 \%$  ein [YAMANE 1992, CHOI und LEE 1999b]. Durch den Einsatz von Abprodukten aus industrieller und landwirtschaftlicher Produktion wie Hemicellulose-Hydrolysate anstelle von Xylose oder hydrolysiertes Stärke statt Glucose [BRAUNEGG et al. 1999], können die substratbezogenen Kosten (Preis Substrat pro kg PHA) bei gleicher Ausbeute deutlich gesenkt werden. Untersuchungen zur Verwertung von Hemicellulosen zur Senkung der Substratkosten führten RAMSAY et al. (1995) mit *Pseudomonas cepacia* durch; dabei wurden PHB-Gehalte von  $60 \%$  im Schüttelkolben und  $45 \%$  bei der Kultivierung im Bioreaktor erreicht. Die gebildete Biomasse hatte nach einer Kultivierungszeit von  $50 \text{ h}$  eine Konzentration von  $28 \text{ g l}^{-1}$ . Die Ausbeute betrug  $0,11 \text{ g PHB (g Xylose)}^{-1}$ . Auf Grund der niedrigen Preise für Hemicellulosen-Hydrolysate werden trotz relativ schlechter Ausbeuten ver-

gleichsweise niedrige Gesamtkosten (35 % im Vergleich zur Verwendung von Glucose, bezogen auf 1 kg gewonnene PHB) angegeben [RAMSAY et al. 1995].

Die Kombination der PHA-Herstellung mit anderen Verfahren in Kreislaufprozessen stellt eine innovative Strategie dar [WENDLANDT et al. 1998, NONATO et al. 2001].

Weitere Beispiele für die Nutzung alternativer Substrate für die PHA-Gewinnung sind in Tabelle II-8 aufgeführt.

Tabelle II-8: Alternative Strategien zur PHA-Produktion

| Substrat                                 | Mikroorganismus, Verfahren  | Quelle                                       |
|--|---|--|
| Stärke                                   | <i>A. chroococcum</i> , fed-batch, 46 % PHB   | KIM und CHANG 1998                           |
| stärkehaltige Abwässer                   | zweistufiger Prozeß: erste Stufe (anaerob) Bildung von organischen Säuren (Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure) und Biogas, zweite Stufe: Bildung von P(3-HB-co-HV) aus den Säuren            | YU 2001                                      |
| Abwasser aus Ethanolherstellung          | <i>Actinobacillus</i> sp. EL-9, wachstumsassoziiert   | SON et al. 1996                              |
| Abwasser der Ölgewinnung                 | <i>A. chroococcum</i> H23, PHB bzw. P(3-HB-co-3-HV), max. 50 % PHA (24 h)   | GONZALES-LOPEZ et al. 1996, WONG et al. 2000 |
| pflanzliche Öle                          | <i>R. eutropha</i> , 80 % PHB<br>rekombinante <i>R. eutropha</i> , 80 % P(3-HB-co-3-HHx)  | FUKUI und DOI 1998<br>AYORINDE et al. 1998   |
| Rüben- und Zuckerrohr- melasse           | <i>Azotobacter vinelandii</i> , fed-batch<br>$r_{\text{PHB}} \leq 1,4 \text{ g PHA l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  | PAGE 1992a, 1992b                            |
| landwirtschaftliche Abfälle <sup>#</sup> | <i>A. latus</i> , max. 43 % PHB<br><sup>#</sup> (Maltose, Abfälle aus Zuckerherstellung, Rübenmelasse)  | BRAUNEGG et al. 1999                         |
| Abwasser der Kartoffelverarbeitung       | <i>R. eutropha</i> , 77 % PHB<br>(erster Schritt: enzymatische Glucosespaltung)   | RUSENDI und SHEPPARD 1995                    |
| Glycerol und Kasein                      | <i>R. eutropha</i> , 65 %<br><i>M. rhodesianum</i> , 50 % PHB   | BORMANN und ROTH 1999                        |
| Talg                                     | <i>Pseudomonas</i> sp., mcl-PHA (C <sub>4</sub> -C <sub>14</sub> )  | CROMWICK et al. 1996                         |
| pflanzliche und tierische Fette          | <i>Pseudomonas resinovorans</i> , mcl-PHA (C <sub>4</sub> -C <sub>14</sub> ), max. 50 % PHA   | ASHBY und FOGLIA 1998                        |
| Aceton + Licht                           | <i>Rhodobacter capsulatus</i> , 40 % PHB  | KARAYINNIS und MADIGAN 1990                  |
| Phenol                                   | <i>R. eutropha</i> , max. 50 % PHB  | MASKOW und BABEL 2000                        |
| Molke                                    | rekomb. <i>E. coli</i> , 78 % PHB, $r_{\text{PHB}} = 2,57 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$<br>rekomb. <i>E. coli</i> , 80 % PHB, $r_{\text{PHB}} = 1,4 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | AHN et al. 2000<br>WONG und LEE 1998         |
| Melasse                                  | rekomb. <i>E. coli</i> , 81 % PHB, $r_{\text{PHB}} = 1,0 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$   | LIU et al. 1998                              |
| Abfälle der Soja-herstellung             | rekomb. <i>E. coli</i>  | HONG et al. 2000                             |

Zunehmend wird auch die PHA-Bildung im Zusammenhang mit der Abwasserreinigung untersucht [HU et al. 1997, CHUA und YU 1999, SATOH et al. 1999, MA et al. 2000, TAKABATAKE et al. 2000, WONG et al. 2000].

Jedoch nicht nur organische Kohlenstoffquellen sind für die PHA-Produktion geeignet. So ergab die Kultivierung von *R. eutropha* mit  $H_2/CO_2/O_2$  nach 40 Stunden unter Sauerstofflimitation einen PHB-Gehalt von 68 % [TANAKA et al. 1995]. In einem optimierten kontinuierlichen Verfahren, durchgeführt in einem *airlift*-Reaktor, wurden sogar PHB-Gehalte bis 81,4 % und eine Produktivität von  $1 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht [ISHIZAKI et al. 2001].

Besonders attraktiv aus ökologischer Sicht ist die Nutzung von  $CO_2$  als Substrat für die PHA-Synthese durch photoautotrophe Bakterien. Erste Versuche zeigten eine Akkumulation von 27 % PHB in *Synechococcus sp.* MA19 [MIYAKE et al. 1996, 2000]. Ein Hauptproblem bei der technische Umsetzung ist das Fehlen geeigneter Systeme für die Massenkultivierung.

#### 2.1.6.2 PHA-Synthese mit rekombinanten Bakterien

Parallel mit der Aufklärung der PHB-Synthesegene in *R. eutropha* wurde die Klonierung dieser Gene und ihre Exprimierung in *E. coli* beschrieben [SCHUBERT et al. 1988, SLATER et al. 1988, PEOPLES und SINSKEY 1989] und damit die grundlegende Voraussetzung zur Nutzung rekombinanter Organismen für die PHA-Synthese geschaffen. Die Ergebnisse erster Versuche zeigten die folgenden Vorteile der PHB-Synthese mit *E. coli* [LEE und CHANG 1995, 1995a]:

- Es stehen verschiedene rekombinante Stämme mit unterschiedlichen Plasmiden zur Auswahl.
- Die Methoden der Rekombination und Strategien zur Hochzelldichte-Fermentation von *E. coli* sind etabliert.
- *E. coli* wächst schnell in kostengünstigen Medien.
- Es werden PHB-Gehalte von über 80 % in der Trockenmasse erreicht.
- Das Fehlen von Depolymerasen verhindert den intrazellulären PHB-Abbau.
- Durch die Akkumulation von PHB werden die Zellen instabil, dies erleichtert die Gewinnung des Polymers.

In Versuchen zur PHB-Synthese in größeren Maßstäben mit *E. coli XL1-Blue* (*fed-batch*, Substrat: Glucose) konnten unter optimierten Bedingungen ein PHB-Gehalt von 79 % und eine Produktivität von  $2,11 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht werden [KIM et al. 1992]. LEE und CHANG (1995a) untersuchten die PHB-Bildung mit mehreren *E. coli*-Stämmen sowie den Einfluß verschiedener Stickstoffquellen (komplexe N-Quellen fördern die PHB-Bildung) und fanden mit *E. coli XL1-Blue* vergleichbare PHB-Gehalte und Produktivitäten. Die bisher höchste Produktivität ( $4,63 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) wurde in einem *fed-batch*-Prozeß mit einem *E. coli* Stamm erreicht, in den die Gene aus *A. latus* kloniert wurden [CHOI et al. 1998]. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem des Wildtyps *A. latus* [WANG und LEE 1997]. Bemerkenswert ist das extrem hohe Molekulargewicht des Polymers, das von *E. coli XL1-Blue* mit Glucose als Substrat akkumuliert wird:  $20\,000\,000 \text{ g mol}^{-1}$  [KUSAKA et al. 1997, 1998]. Ein interessanter Aspekt der Verwendung rekombinanter Organismen ist die Möglichkeit, zusätzlich nützliche, nicht-PHA-assoziierte Gene involvieren zu können. So ließen sich PHA-haltige *E. coli*-Zellen sehr viel leichter aufschließen, wenn sie neben den PHA-Genen auch das Lyse-Gen E des Bakteriophagen PhiX174

enthielten [RESCH et al. 1998]. Die überwiegende Zahl der rekombinanten *E. coli*-Stämme basiert auf PHB-Synthese-Genen aus *R. eutrophus* und *A. latus*, es gelang jedoch auch die Klonierung und Exprimierung von PHA-Synthese-Gene aus weiteren PHA-Produzenten wie *Pseudomonaden*, *Aeromonas*, *Nocardia corillina* und *Bacillus megaterium*. Außer der Bildung von P(3-HB) ist die Synthese von P(3-HB-co-HV) [FIDLER und DENNIS 1992, YIM et al. 1996, CHOI und LEE 1999b], P(3-HB-co-4-HB) [VALENTIN und DENNIS 1997], P(4-HB) [HEIN et al. 1997, SONG et al. 1999] und *mcl*-PHA [HALL et al. 1998, ANTONI et al. 2000, PARK et al. 2001] möglich.

Neben *E. coli* werden andere rekombinante Organismen beschrieben, die u.a. P(3-HB) (*R. eutropha* [KICHISE et al. 1999, FUKUI und DOI 1998]), *mcl*-PHA (*R. eutropha* [MATSUSAKI et al. 2000]) oder P(3-HB-co-4-HV) (*P. putida* [SCHMACK et al. 1998]) akkumulieren.

### 2.1.6.3 PHA-Synthese in transgenen Pflanzen

Über die PHA-Synthese in genetisch veränderter *Arabidopsis thaliana* wurde zum ersten Mal 1992 berichtet [POIRIER et al. 1992], wobei zunächst maximal 14 % PHB angereichert werden konnten [NAWRATH et al. 1994]. Die Akkumulation von PHA in Pflanzen erfolgt wie in Bakterien in Form von Granula in Vakuolen und Cytoplasma [POIRIER et al. 1992]. Der großtechnischen Herstellung von PHA mit Pflanzen wird eine große Perspektive vorausgesagt [POOL 1987, POIRIER 1999, JUNG und STEINBÜCHEL 2001]. Interessant sind Untersuchungen mit transgenem Raps, wo neben dem Biopolymer, das in der Ölsaart und den Blättern akkumuliert wird, auch das Öl als Produkt gewonnen und vermarktet werden kann [AMASS et al. 1998]. Als kritische Grenze für eine rentable kommerzielle Nutzung wird ein Anteil von 15–20 % des Trockengewichtes angesehen [VALENTIN et al. 1999]. In transgenem Raps wurden bereits PHA-Gehalte von 7,7 % erreicht; positiv wird außerdem der HV-Anteil von > 5 % und das hohe Molekulargewicht von ca. 1 000 000 g mol<sup>-1</sup> bewertet [HOUMIL et al. 1999, VALENTIN et al. 1999].

Auch die Akkumulation von Copolymeren wie P(3-HB-co-3-HV) [SLATER et al. 1999], P(3-HB-co-4-HB) [VALENTIN et al. 2000] und *mcl*-PHA [MITTENDORF et al. 1998, ALLENBACH und POIRIER 2000] ist in transgenen Pflanzen realisierbar.

Der jüngst für *A. thaliana* berichtete PHB-Anteil von 4 % des Frischgewichtes entspricht einem Anteil von etwa 40 % in der Trockenmasse [BOHMERT et al. 2000]. Das übertrifft deutlich den früher von NAWRATH et al. (1994) gefundenen Wert (14 %). Die Nutzung transgener Pflanzen könnte damit erstmals eine Alternative zur fermentativen PHB-Herstellung darstellen, wobei jedoch die Abhängigkeit der Pflanzen von der Vegetationsperiode ein Nachteil ist. Die ökologischen Vorteile der Herstellung von PHA auch aus Pflanzen sind allerdings nicht unumstritten [GERNGROSS 1999, GERNGROSS und SLATER 2000].

### 2.1.6.4 Zusammenfassung und ökonomische Aspekte

Die momentan höchsten Produktivitäten zur biotechnologischen Herstellung von PHA können mit nativen oder rekombinanten Bakterien in Prozessen mit wachstumsassoziiertes Produktbildung realisiert werden, wobei Saccharose bzw. Glucose als Kohlenstoffquelle dient: 4,94 (*A. latus*) [WANG und LEE 1997] bzw. 4,64 g PHB l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (rekombinante *E. coli*) [CHOI et al. 1998].

Auf Basis dieser Prozesse wurden Kostenabschätzungen für verschiedene Verfahren unter vergleichbaren Bedingungen (jährliche Produktion von 100 000 t PHB, gleiche Aufarbeitung, der Produktivität entsprechender Investitionsbedarf für Anlagen) vorgenommen und ein Preis von 2,60 US\$ (kg PHB)<sup>-1</sup> (*A. latus*) bzw. 4,91 US\$ (kg PHB)<sup>-1</sup> (*E. coli*) errechnet [LEE und CHOI 1998, CHOI und LEE 1999c]. Durch die Anwendung einer alternativen Extraktionsmethode ist (für *E. coli*-Prozeß) ein Preis von 3,66 US\$ kg<sup>-1</sup> realisierbar [CHOI und LEE 1999d]. Der vergleichbare Preis für P(3-HB-co-3-HV) (gleicher Produktionsmaßstab, Natriumhypochlorit-Aufarbeitung) ist 3,95 US\$ (kg PHA)<sup>-1</sup> bei einem HV-Anteil von 10,6 % [CHOI und LEE 2000].

Zweistufige Prozesse (d.h. PHA-Bildung unter Mangelbedingungen) sind niedrigere Produktivitäten gekennzeichnet. Berechnungen (Grundlage ca. 3000 t a<sup>-1</sup>) auf Basis der bis dato veröffentlichten Maximalwerte ergeben Preise von 5,58 US\$ (kg PHB)<sup>-1</sup> für *R. eutropha* (Glucose, Stickstoffmangel) bzw. 7,34 US\$ (kg PHB)<sup>-1</sup> für *Methylobacterium organophilum* (Methanol, Kaliummangel) [CHOI und LEE 1997].

Im Einsatz von kostengünstigen Abprodukten als Kohlenstoffquelle liegt theoretisch ein hohes Potential, da die Rohstoffkosten ca. 50 % der Gesamtkosten ausmachen. Die bisher untersuchten Prozesse erreichen jedoch nicht die erforderlichen Produktivitäten, um eine rentable Herstellung zu realisieren.

Der Akkumulationsgrad von PHA in transgenen Pflanzen konnte in den letzten Jahren deutlich erhöht werden, eine ernsthafte Konkurrenz zu fermentativ erzeugten PHA besteht momentan jedoch nicht.

## 2.2 Methan als Substrat zur PHB-Synthese

### 2.2.1 METHANOTROPHE BAKTERIEN

Methanotrophe kommen in Böden und Wässern ubiquitär vor, besiedeln bevorzugt Grenzflächen zwischen aeroben/anaeroben Bedingungen und verwerten dort das durch Methanogenese entstandene Methan. Damit sind sie ein bedeutender Teil des globalen Kohlenstoffkreislaufes. Global kommt es momentan zu einer Erhöhung des Methananteils der Atmosphäre (aus allen Quellen) um 1–2 % pro Jahr [FRITSCH 1998]. Der Meßwert für Methan lag bei 0,7 ppmv um 1800, durch die zunehmende Industrialisierung, intensiven Reisanbau und Großviehhaltung erhöhte er sich bis 1994 auf 1,7 ppmv. Dies ist insofern problematisch, da Methan als Treibhausgas ein 21fach höheres GWP (*global warming potential*), eine Größe die u.a. die Wärmeabsorption und die Verweilzeit in der Atmosphäre berücksichtigt, besitzt als CO<sub>2</sub> [UMWELTBUNDESAMT 2001].

In den letzten Jahren ist die Rolle der Methanotrophen in Standorten wie Sümpfen, Tundren, Reisfeldern, Sedimenten u.a. intensiv untersucht worden [CONRAD 1996, HENCKEL et al. 1999, KUMARASWAMY et al. 2000, ELLER und FRENZEL 2001, KRÜGER et al. 2001]. Neueste Untersuchungen belegen, daß z.B. die Anwesenheit von Ammonium (z.B. bei Düngung von Reisfeldern) entgegen früherer Erkenntnisse [SCHNELL und KING 1994, DUNFIELD und KNOWLES 1995, NOLD et al. 1999] keinen negativen Einfluß auf die Methanoxidation hat [BODELIER und FRENZEL 1999, BODELIER et al. 2000, SCHIMMEL 2000].

Obligat methanotrophe Bakterien sind durch ein charakteristisches Enzym gekennzeichnet, die Methan-Monooxygenase (MMO, EC 1.14.13.25), die durch den Einbau von molekularem Sauerstoff unter Nutzung eines Elektronenakzeptors die Umsetzung von Methan zu Methanol katalysiert. Das Enzym kann in zwei Formen auftreten: im Cytoplasma gelöst (*soluble*, sMMO) oder an das Membransystem gebunden (partikulär, pMMO). Die sMMO stellt einen Enzymkomplex aus drei Komponenten dar:

Komponente **A** (Eisenhaltige Hydroxylase)

Komponente **B** (Elektronentransferprotein)

Komponente **C** (FAD, FeS-haltige Reduktase) [PILKINGTON und DALTON 1990].

Die pMMO ist aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) aufgebaut und enthält neben zwei Eisen- bis zu 15 Kupferatome pro Einheit [ZAHN und DI SPIRITO 1996, MURRELL et al. 2000]. Die Kupferkonzentration im umgebenden Medium (bzw. das Verhältnis Kupfer zu Biomasse) reguliert die Ausbildung von sMMO oder pMMO. Konzentrationen größer  $1 \mu\text{M Cu}^{2+}$  induzieren die Expression von pMMO [HANSON und HANSON 1996]. Bisher konnte in allen Methanotrophen die pMMO nachgewiesen werden, zur Bildung der sMMO sind trotz entsprechender Milieubedingungen, wie niedrige Kupferkonzentrationen, einige Vertreter nicht in der Lage. Interessanterweise unterscheiden sich die Substratspezifitäten der löslichen und membrangebundenen MMO. Während die pMMO lediglich kurzkettige ( $< C_5$ ) Alkane und Alkene akzeptiert, (co)oxidiert die sMMO eine Vielzahl von Verbindungen wie längerkettige Alkane, Alkene, halogenierte, aromatische und heterozyklische Kohlenwasserstoffe (Trichlorethen, Chlorbenzol). Entsprechende Bakterienstämme können daher zur Sanierung von kontaminierten Böden und Wässern eingesetzt werden [HANSON und HANSON 1996, MORAN und HICKEY 1997, SMITH et al. 1997, CHU und ALVAREZ-COHEN 1999, BECK 2000].

Die weitere Metabolisierung des im ersten Schritt aus Methan gebildeten Methanols erfolgt in der katabolischen Sequenz in weiteren Oxidationsstufen über Formaldehyd (Methanol-Dehydrogenase, MDH) und Ameisensäure (Formaldehyd-Dehydrogenase, FADH) zu  $\text{CO}_2$  (Formiat-Dehydrogenase, FDH) (siehe Abb. 2-4, oberen Zeile). Der direkte Abbau von Formaldehyd zu  $\text{CO}_2$  dient hauptsächlich zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten und Energie [BABEL 1992, ANTHONY 1992, HANSON und HANSON 1996, MOTHES 1997, MURRELL et al. 2000]. Dies erfolgt bei anderen heterotrophen Bakterien, die Substrate mit C-C-Bindungen verwerten, im wesentlichen über den Citratzyklus. Auf der Stufe des Formaldehyds, das ein zentrales Intermediat darstellt, erfolgt der Eintritt in den anabolen Weg zur Synthese von neuem Zellmaterial. Die Einbindung des Formaldehyds ist dabei auf zwei verschiedene Weisen möglich, dem Ribulosemonophosphat-Weg (RuMP-Weg) sowie dem Serin-Weg (siehe auch Abb. 2-4). Dieses Merkmal methanotropher Bakterien wird mit der phylogenetischen Einordnung und der intrazellulären Membranstruktur als wesentliches Kriterium zur Einteilung in zwei Hauptgruppen genutzt. Die Familie *Methylococcaceae* (Typ I) sind  $\gamma$ -Proteobakterien und nutzen den RuMP-Weg. Vertreter sind die Gattungen *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylospera*, *Methylococcus* (früher Typ X) und *Methylocaldum*. Die Familie der *Methylocystaceae* (Typ II) gehört zu den  $\alpha$ -Proteobakterien und assimiliert Kohlenstoff über den

Serin-Weg. Vertreter sind die Gattungen *Methylocystis* und *Methylosinus* [BOWMANN 1999, MURRELL et al. 2000, ELLER et al. 2001].

Weitere morphologische, biochemische und genetische Merkmale sind in Tabelle II-9 zusammengestellt. Methanotrophe Bakterien können auch an Hand der speziellen Fettsäuren der Zellmembranlipide identifiziert werden [MAKULA 1978, GUCKERT et al. 1991, BOWMAN et al. 1991]. Charakteristisch für Typ I-Vertreter sind C16:1- $\omega$ 7c-Fettsäuren, bei Typ II-Methanotrophen kommen hauptsächlich C18:1-Fettsäuren vor, als besonders spezifisch gilt der Nachweis der 10-Octadecensäure (18:1 $\omega$ 8c, siehe auch Kapitel 4.6.2). Zur Analyse werden die Lipide extrahiert und durch Methylierung der Säuregruppen zu den sog. FAMES (*fatty acid methyl esters*) umgesetzt. Bestimmt werden die Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren und deren Struktur (Anzahl und Position von Doppelbindungen, Position von Verzweigungen bzw. Methyl-Gruppen, Vorkommen von Substituenten z.B. Hydroxy-Gruppen, *cis/trans*-Konfiguration der Doppelbindung). Die Bezeichnung erfolgt nach folgender Struktur:

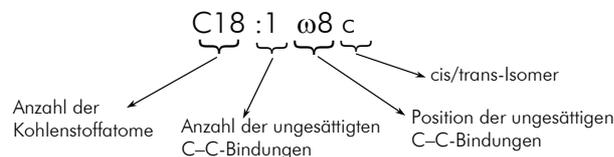


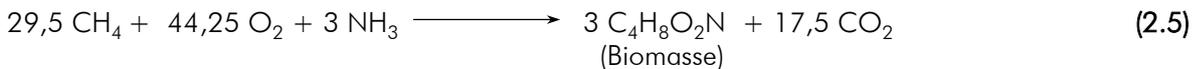
Tabelle II-9: Merkmale und Einteilung methanotropher Bakterien  
[nach HANSON und HANSON 1996, MURRELL et al. 2000, MADIGAN et al. 2001]

|                                    | TYP I   |                              | TYP II                                      |
|------------------------------------|---|------------------------------|---|
|                                    | alle anderen Vertreter                              | <i>Methylococcus</i> (Typ X) |   |
| Morphologie                        | Stäbchen  | Kokken                       | Stäbchen, kommaförmig                       |
| innere Membran                     | Bündel von Bläschen zentral oder am Rand angeordnet |                              | gepaarte Membran, peripher zur Zellwand     |
| Ruhezustand                        | Cysten  |                              | Exosporen/Cysten                            |
| Rosettenbildung                    | Nein  |                              | Ja  |
| 16-rDNA-Gruppe                     | $\gamma$ -Proteobakterien                           |                              | $\alpha$ -Proteobakterien                   |
| GC-Gehalt                          | 50-54   | 62-64                        | 62-67                                       |
| Kohlenstoffassimilation            | RuMP-Weg  |                              | Serin-Weg                                   |
| Citratzyklus                       | unvollständig                                       |                              | vollständig                                 |
| N <sub>2</sub> -Fixierung          | nein  | ja                           | ja  |
| Hauptbestandteile der Lipidmembran | C14:0,<br>C16:1 $\omega$ 7c,<br>C16:1 $\omega$ 5t   | C16:0,<br>C16:1 $\omega$ 7c  | C18:1 $\omega$ 8c,<br>C18:1 $\omega$ 7c     |
| PHB-Bildung                        | Spuren  | ja                           | ja  |
| Vertreter                          | <i>Methylomonas</i><br><i>Methylobacter</i>         | <i>Methylococcus</i>         | <i>Methylosinus</i><br><i>Methylocystis</i> |

### 2.2.2 P(3-HB)-BILDUNG IN METHANOTROPHEN BAKTERIEN

In der Vielzahl von Publikationen über die mikrobielle PHB-Synthese finden sich nur wenige Veröffentlichungen mit methanotrophen Bakterien. Die prinzipielle Fähigkeit methanotropher Bakterien zur Bildung von P(3-HB) wird u.a. von WHITTENBURY et al. (1970) und HIGGINS et al. (1981) beschrieben. Die Bildung von PHB ist bei obligat methanotrophen Bakterien offensichtlich nicht vom Weg der Formaldehyd-Assimilation abhängig und wurde auch für Vertreter des Typ I beschrieben [TROTSENKO et al. 1992]. Deutlich höhere PHB-Gehalte werden jedoch von Typ II-Methanotrophen mit Stoffwechsel über den Serin-Weg erreicht [ASENJO und SUK 1986b].

Erste tiefergehende Forschungsergebnisse, einschließlich Vorschlägen für den Mechanismus und stöchiometrischer Gleichungen der PHB-Bildung in Methanotrophen, veröffentlichten ASENJO und SUK (1986a, 1986b). Ausgehend vom CH<sub>4</sub>-Stoffwechsel in Typ II-Methanotrophen wurde ein Schema der biochemischen Reaktionen von CH<sub>4</sub> zu PHB entwickelt (Darstellung modifiziert in Abb. 2-4). Theoretische Annahmen über die allgemeine Zusammensetzung von Bakterienbiomasse (hier: C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>N), energetische Abschätzungen zur ATP-Bilanz und bekannte Mechanismen der PHB-Bildung waren Grundlage für die Formulierung der stöchiometrischen Gleichungen für die Bildung von Biomasse und PHB aus Methan bei Bakterien mit Stoffwechsel *via* Serin-Weg (Typ II) unter Verwendung von Ammoniak als Stickstoffquelle:



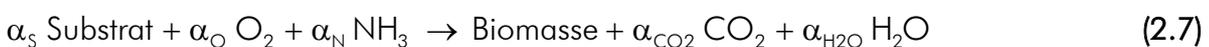
Bei Gültigkeit der Gleichungen 2.5 und 2.6 ergibt sich eine maximale Ausbeute von 0,65 g X (g Methan)<sup>-1</sup> bzw. 0,67 g PHB (g Methan)<sup>-1</sup>. Das stöchiometrische Verhältnis von Sauerstoff/Methan ist in beiden Fällen 1,5.

### 2.2.3 SPEZIFIK DER MIKROBIELLEN METHANOXIDATION

#### 2.2.3.1 Ausbeuten der Biomassebildung aus Methan

Zunächst sollen die theoretischen Ausbeuten der Synthese von Biomasse aus Methan mit denen anderer Substrate verglichen werden.

Theoretische Ausbeuten der Bildung von Biomasse aus einem bestimmten Substrat können unter Annahme einer allgemeinen Summenformel für mikrobielle Biomasse – z.B. nach ROELS (1981) CH<sub>1,8</sub>O<sub>0,5</sub>N<sub>0,2</sub> – mittels stöchiometrischer und thermodynamischer Gesetzmäßigkeiten berechnet werden. Wird dabei von einer allgemeiner Gleichung zur Bildung von Biomasse ausgegangen:



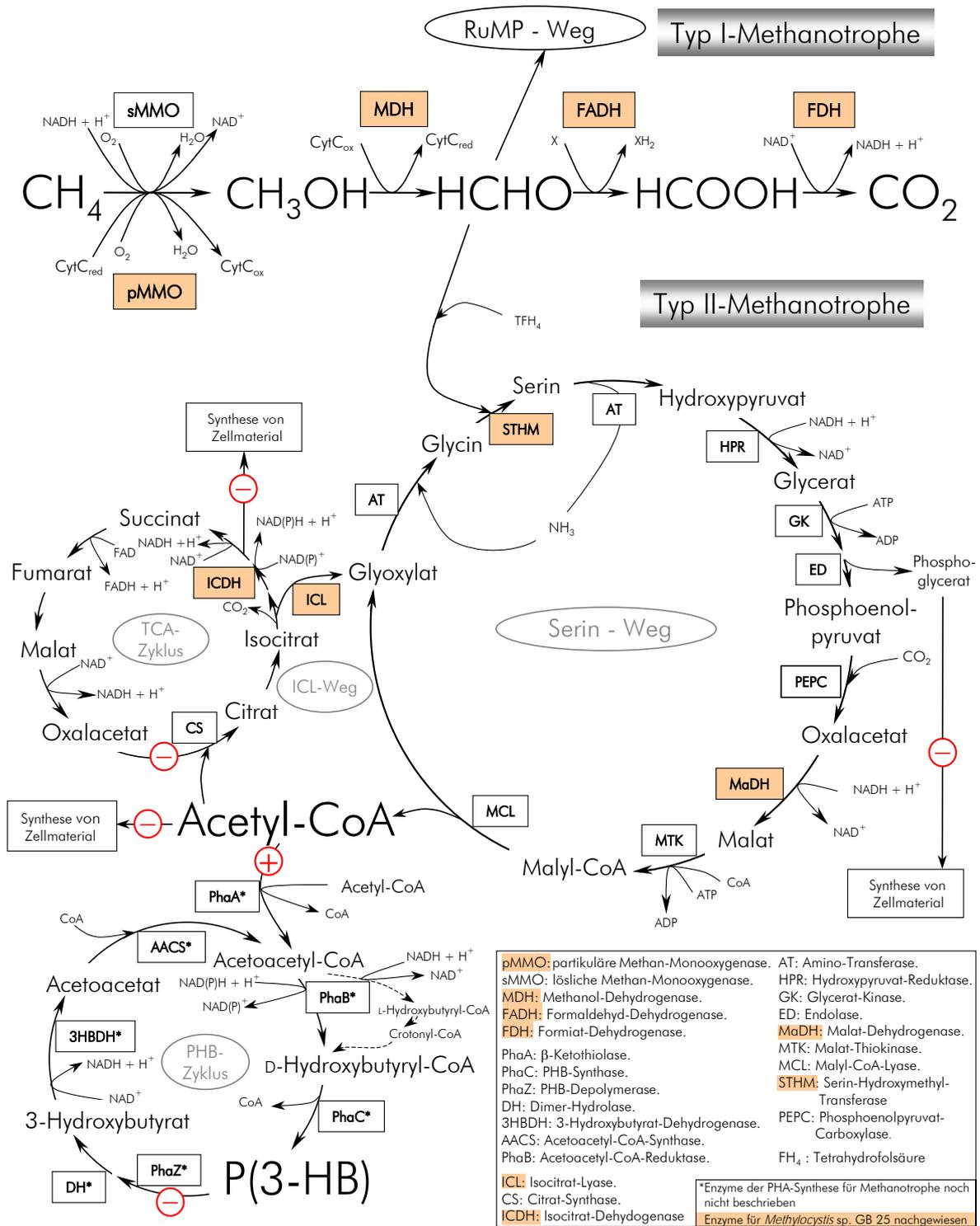


Abb. 2-4: Wege der  $CH_4$ -Oxidation, Formaldehydfixierung und PHB-Synthese bei methanotrophen Bakterien [HIGGINS et al. 1981, ASENJO und SUK 1986b, YAMANE 1993, HANSON und HANSON 1996, MOTHEs 1997, WEBER 1997]

Die Biomasse wird dabei auf ein C-Mol normiert. Folgende substanz- oder prozeßspezifischen Parameter können definiert werden:

➤ spezifischer Ausbeutekoeffizient: 
$$Y_{X/S}^{\text{theo}} = \frac{1}{\alpha_s} \cdot \frac{M_X}{M_S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (2.8)$$

➤ Kohlenstoffkonversionsgrad (*carbon conversion efficiency*, CCE):

$$\text{CCE} = \frac{1}{\alpha_s} \times 100 \quad (2.9)$$

Für eine Verbindung mit der Summenformel  $C_aH_bO_c$  wird der Reduktionsgrad  $\gamma_{\text{RG}}$  wie folgt definiert:

$$\gamma_{\text{RG}} = 4 + \frac{b}{a} - 2 \frac{c}{a} \quad (2.10)$$

Spezifischer molarer Sauerstoffbedarf für die Umwandlung eines Substrates berechnet sich:

$$\beta_{\text{O}_2/X} = \frac{\alpha \cdot \gamma_{\text{RG},S} - \gamma_{\text{RG},X} + 3 \cdot \alpha_N}{4} \quad (2.11)$$

Die unter Laborbedingungen bestimmten Ausbeuten sind zwangsläufig niedriger als theoretische Angaben, können aber für Vergleiche von Substraten untereinander benutzt werden. Die Ausbeute  $Y_{X/S}$  von 1,1 g X (g Methan)<sup>-1</sup> ist deutlich höher als Werte für Glucose oder Methanol [Tabelle II-10, ROELS 1980, RATLEDGE 2001]. Aus energetischer Sicht können maximal 60 % des Substratkohlenstoffs zur Bildung von Biomasse verwendet werden. Die verbleibende Differenz von mindestens 40 % wird zur Energiegewinnung unter Bildung von CO<sub>2</sub> genutzt [ROELS 1980, HEIJNEN und VANDIJKEN 1992]. Im Vergleich zu Kohlenstoffquellen wie Zuckern ( $\gamma_{\text{RG}}=4$ ) oder Alkoholen ( $\gamma_{\text{RG}}=6$ ) besitzt Methan den höchsten Reduktionsgrad ( $\gamma_{\text{RG}}=8$ ). Ein weiterer wichtiger Parameter für biotechnologische Prozesse, der spezifische molare Sauerstoffbedarf ( $\beta_{\text{O}_2/X}$ ), kann vorausberechnet werden (Gleichung 2.11) und ist für Methan höher (2,46 mol O<sub>2</sub> (C-mol X)<sup>-1</sup>) als für Glucose (0,82) [Tabelle II-10].

Tabelle II-10: Ausbeuten und Sauerstoffbedarf der Biomassebildung aus verschiedenen Substraten [#RATLEDGE 2001, \*ROELS 1980]

| Substrat   | Organismus                             | $\gamma_{\text{RG}}^*$ | $Y_{X/S}^{\#}$                 | $Y_{X/C}^{\#}$        | $\beta_{\text{O}_2/X}$                     |
|------------|--|------------------------|--------------------------------|-----------------------|--|
|            |  |                        | g X (g Substrat) <sup>-1</sup> | g X g C <sup>-1</sup> | mol O <sub>2</sub> (C-mol X) <sup>-1</sup> |
| Methan     | <i>Methylomonas sp.</i>                | 8                      | 1,094                          | 1,46                  | 2,46                                       |
| Hexadecan  | <i>Yarrowia lipolytica</i>             | 6,13                   | 0,896                          | 1,06                  | 2,67                                       |
| Methanol   | <i>Methylomonas sp.</i>                | 6                      | 0,519                          | 1,38                  | 1,69                                       |
| Ethanol    | <i>Candida utilis</i>                  | 6                      | 0,678                          | 1,30                  | 1,88                                       |
| Glycerol   | <i>Klebsiella pneumoniae</i>           | 4,67                   | 0,547                          | 1,40                  | 1,02                                       |
| Glucose    | <i>E. coli</i><br>(aerob)<br>(anaerob) | 4                      | 0,528                          | 1,32                  | 0,82                                       |
|            |  |                        | 0,143                          | 0,36                  |  |
| Essigsäure | <i>Pseudomonas sp.</i>                 | 4                      | 0,391                          | 0,98                  | 1,52                                       |
| Saccharose | <i>K. pneumoniae</i>                   | 4                      | 0,505                          | 1,20                  | 1,18                                       |
| Xylose     | <i>K. pneumoniae</i>                   | 4                      | 0,348                          | 0,87                  | 1,86                                       |

In den Grundlagenuntersuchungen zur Bestimmung von realen Wachstumsausbeuten ( $Y_{X/S} = Y_{X/CH_4}$ ) auf der Basis von Methan [DALTON und LEAK 1985, LEAK und DALTON 1986a, 1986b] wurden Abweichungen von theoretischen Werten mit den unterschiedlichen Wegen der Formaldehyd-Assimilation (Serin- oder RuMP-Weg), der Ausbildung von pMMO oder sMMO, der genutzten Stickstoffquelle sowie weiteren Bedingungen (wie  $O_2$ - oder  $CH_4$ -Limitation) korreliert (siehe Tabelle II-11) und mit theoretischen Berechnungen untersetzt. So sind bei Verwendung von Ammoniak im Vergleich zu Nitrat die erreichbaren Ausbeuten größer. Eine höhere Ausbeute wird weiterhin bei Ausbildung von pMMO gegenüber sMMO erreicht. Letzterer Unterschied kann durch einen effizienten internen Mechanismus für den Elektronentransfer erklärt werden, der durch eine Pyrrolochinolin-Chinon (PQQ)-vermittelte Kopplung der pMMO an die Methanol-Dehydrogenase ermöglicht wird.

Tabelle II-11: Ausbeuten der Biomassebildung und Grad der Kohlenumwandlung (CCE) für die Methanfermentation

[a) WENDLANDT 1979, b) SCHNEIDER et al. 1983, c) WILKINSON et al. 1974, d) LEAK und DALTON 1986b, e) LEAK et al. 1985, f) LEAK und DALTON 1986a, g) SHEEHAN und JOHNSON 1971, h) ASENJO und SUK 1986b, i) FURIGO und JORGENSEN 1993, j) SIPKEMA et al. 1998]

| Organismus                                  | $Y_{X/CH_4}$                                     | $Y_{X/O_2}$                                      | CCE                                  | Bedingungen   | Quelle |
|---|--|--|--------------------------------------|---|--------|
|   | $g \times (g CH_4)^{-1}$                         | $g \times (g O_2)^{-1}$                          | %                                    |   |        |
| <i>Methylocystis</i> sp.<br>GB 21 (MK)      | 0,739<br>0,636                                   | 0,236<br>0,203                                   |                                      | $O_2$ -Limitation<br>$CH_4$ -Limitation<br>Chemostat, $D=0,17 h^{-1}$   | a)     |
| <i>Methylocystis</i> sp.<br>GB 25 (MK)      | 0,714  | 0,231  |                                      | $O_2$ -Limitation, Chemostat,<br>$D=0,17 h^{-1}$  | b)     |
| <i>Pseudomonas</i> sp.<br>(MK)              | 0,99<br>0,80                                     | 0,4<br>0,24                                      |                                      | Chemostat, $O_2$ -Limitation<br>Chemostat, $CH_4$ -Limitation   | c)     |
| verschiedene                                | 0,57–0,65<br>0,61–0,75<br>0,57–0,94<br>0,61–1,01 | 0,18–0,21<br>0,19–0,25<br>0,19–0,37<br>0,19–0,38 | 36–41<br>38–47<br>36–59<br>38–63     | Serin/NAD(P)H<br>RuMP/NAD(P)H<br>Serin/MDH<br>RuMP/MDH  | d)     |
| <i>Methylococcus</i><br><i>capsulatus</i>   | 0,50<br>0,69<br>0,50<br>0,67<br>0,73             |  | 31,3<br>43,3<br>31,2<br>41,9<br>45,5 | $NO_3$ /sMMO/ $O_2$ -Limitation<br>$NO_3$ /pMMO/ $O_2$ -Limitation<br>$NO_3$ /sMMO/ $CH_4$ -Lim.<br>$NO_3$ /pMMO/ $CH_4$ -Lim.<br>$NH_4$ /sMMO/ $O_2$ -Limitation | e)     |
| <i>Methylococcus</i><br><i>capsulatus</i>   | 0,69–0,75<br>0,67<br>0,79                        |  | 43–47<br>41,8<br>49,4                | $NH_4$ /pMMO/ $O_2$ -Limitation<br>$NH_4$ /pMMO/ $CH_4$ -Lim.<br>$NH_4/NO_3$ /pMMO/ $CH_4$ -Lim.  | f)     |
| methanotrophe<br>Mischkultur                | 0,624<br>0,598                                   | 0,219<br>0,206                                   |                                      | $O_2$ -Limitation<br>$CH_4$ -Limitation   | g)     |
| <i>Methylocystis</i><br><i>parvus</i>       | 0,65   |  | 40,7                                 | theoretische Angaben  | h)     |
| <i>Methylococcus</i><br><i>capsulatus</i>   | 0,75   |  | 53,0                                 |   | i)     |
| <i>Methylosinus</i><br><i>trichosporium</i> | 0,39   | 0,28   |                                      | Chemostat   | i)     |

Zusammenfassend ist festzustellen, daß Methan als Kohlenstoffquelle hohe Ausbeuten der Biomassebildung ermöglicht und daher ein attraktives Substrat darstellt. Zu beachten sind jedoch der hohe spezifische Sauerstoffbedarf und die Besonderheiten der Methan-Fermentationen, die sich aus zwei gasförmigen Substraten ableiten (siehe 2.2.3.4).

### 2.2.3.2 Ausbeuten der PHB-Bildung aus Methan

Der Gesamtprozeß der PHB-Synthese setzt bei nichtwachstumsassoziierten Prozessen zunächst die Synthese von Biomasse voraus, die das Polymer anschließend akkumuliert. Die entsprechenden Ausbeuten wurden in Kapitel 2.2.3.1 diskutiert. Im folgenden soll ein Überblick über die Ausbeuten der PHB-Bildung von Methan im Vergleich zu anderen Substraten gegeben werden.

Tabelle II-12 zeigt theoretische Ausbeuten, die bei der Biosynthese von PHB aus verschiedenen Substraten erreichbar sind [YAMANE 1993], wobei für Methan ein Wert von 0,54 g g<sup>-1</sup> angegeben wird.

Tabelle II-12: Theoretische Ausbeuten  $Y_{\text{PHB/S}}$  der PHB-Bildung aus verschiedenen Kohlenstoffquellen, basierend auf dem biochemischen Umsatz [YAMANE 1993, # ASENJO und SUK 1986b] (G-6-P: Glucose-6-Phosphat, IC: Isocitrat, n.b. nicht berücksichtigt)

| Substrat    | Weg der Kohlenstoff-assimilation | NAD(P)H-Regeneration | $Y_{\text{PHB/S}}$                 |
|-------------|----------------------------------|----------------------|------------------------------------|
|             |                                  |                      | kg PHB (kg Substrat) <sup>-1</sup> |
| Glucose     | Entner-Doudoroff-Weg             | G-6-P                | 0,48                               |
|             | Pentose-Phosphat-Weg             | G-6-P+6-PG           | 0,44                               |
|             | Glycolyse + Citratzyclus         | IC                   | 0,32                               |
| Saccharose  | Entner-Doudoroff-Weg             | G-6-P                | 0,50                               |
| Methanol    | Serin-Weg                        | IC                   | 0,54                               |
| Methan      | Serin-Weg                        | IC                   | 0,54                               |
|             |                                  | n.b.                 | 0,67 <sup>#</sup>                  |
| Essigsäure  | –                                | IC                   | 0,48                               |
| Ethanol     | –                                | IC                   | 0,62                               |
| Buttersäure | <i>R. eutropha</i> –Typ          | IC                   | 0,65                               |
|             | <i>R. rubum</i> –Typ             | n.b.                 | 0,98                               |
| Butanol     | <i>R. eutropha</i> –Typ          | IC                   | 0,77                               |
|             | <i>R. rubum</i> –Typ             | n.b.                 | 1,16                               |

Aus theoretischen Ausbeuten und Substratpreisen können die in Tabelle II-13 gezeigten minimalen Substratkosten für die Herstellung einer bestimmten Menge PHB aus verschiedenen Rohstoffen errechnet werden.

Tabelle II-13: Rohstoffpreise für potentielle Substrate der PHB-Synthese und resultierende Substratkosten zur Herstellung von 1 kg PHB [+CHOI und LEE 1999c, \*YAMANE 1993] (# berechnet aus dem Preis für Erdgas in Deutschland, Stand Januar 2000: 3,86 Euro GJ<sup>-1</sup> (Industrie, Großabnehmer) [EU 2001], durchschnittlicher Brennwert 1 m<sup>3</sup> = 10 kWh, Dichte CH<sub>4</sub> = 0,71863 g l<sup>-1</sup>)

| Substrat                | Preis <sup>+</sup>    | $Y_{\text{PHB/S}}^*$               | Substratkosten              |
|-------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------------|
|                         | US\$ kg <sup>-1</sup> | kg PHB (kg Substrat) <sup>-1</sup> | US\$ (kg PHB) <sup>-1</sup> |
| Methan                  | 0,168 <sup>#</sup>    | 0,54                               | 0,31                        |
| Methanol                | 0,180                 | 0,54                               | 0,33                        |
| Glucose                 | 0,493                 | 0,48                               | 1,02                        |
| Glucose aus Abprodukt   | 0,220                 |                                    | 0,46                        |
| Saccharose              | 0,290                 | 0,50                               | 0,58                        |
| Ethanol                 | 0,502                 | 0,62                               | 0,81                        |
| Acetat                  | 0,595                 | 0,48                               | 1,24                        |
| Rübenmelasse            | 0,220                 | 0,42                               | 0,52                        |
| Käsemolke               | 0,071                 | 0,33                               | 0,22                        |
| Hemicellulosehydrolysat | 0,069                 | 0,20                               | 0,34                        |

Die Daten der Tabelle zeigen, daß mit Methan im Vergleich zu Substraten wie Glucose sehr niedrige Substratkosten erreicht werden können. Ähnliche Werte sind lediglich mit Methanol oder Substraten, die Abfallprodukte anderer Verfahren sind, erreichbar.

Doch besitzt die Verwendung von Methan in großtechnischen Verfahren einen entscheidenden Vorteil: Die Fermentation kann auf Grund der spezifischen Fähigkeit methanotropher Bakterien, Methan als einzige Kohlenstoffquelle verwerten zu können und damit einen großen Selektionsvorteil zu besitzen, unter unsterilen Bedingungen durchgeführt werden.

### 2.2.3.3 Nutzung von Mischkulturen zur Methanfermentation

Neben Reinkulturen werden in biotechnologischen Prozessen auch Mischkulturen eingesetzt, beispielsweise bei der Produktion von Joghurt [DRIESSEN 1987], zur photosynthetischen Gewinnung von Biomasse [LEE 1981], zur Herstellung von Dextran für den klinischen Einsatz [KIM und DAY 1994, KIM et al. 1996] oder auch bei der Weinherstellung [MUSMANNO et al. 1999]. Für die Mehrzahl der Prozesse in der Umweltbiotechnologie – in der Abwasserbehandlung, bei biologischer Sanierung von Böden, der Kompostierung u.a. – ist der Einsatz von Bakteriengemeinschaften charakteristisch und ein Sanierungserfolg ist häufig nur durch das Zusammenwirken der unterschiedlichen Species einer Mischkultur möglich. Folgende Klassen mikrobieller Gemeinschaften können unterschieden werden [SLATER 1981]:

- Klasse I Gemeinschaften zur Versorgung unterschiedlicher Angehöriger mit spezifischen Nährstoffen
- Klasse II Gemeinschaften zur Beseitigung von Stoffwechselprodukten, die eine inhibierende Wirkung auf ein Mitglied der Gemeinschaft besitzen
- Klasse III Gemeinschaften auf co-metabolischer Grundlage.

Methanotrophe Mischkulturen rückten insbesondere in den 70er Jahren im Zusammenhang mit der *single-cell-protein* (SCP)-Produktion in den Mittelpunkt des biotechnologischen Interesses [FAUST und PRÄVE 1991]. Bei der Entwicklung von Verfahren zur Herstellung mikrobieller Biomasse aus Methan oder Erdgas zeigten sich klare Vorteile der Verwendung von Mischkul-

turen im technischen Maßstab [WILKINSON et al. 1974, SHEEHAN und JOHNSON 1971, HARRISON 1978]:

- Erhöhung der Prozeßstabilität
- Erreichen höherer Biomassekonzentrationen und Wachstumsraten im Vergleich zu Reinkulturen.

In einem Verfahren (British Shell) zur Gewinnung mikrobieller Biomasse aus Erdgas wurden mit einer Mischkultur (Hauptkomponente *M. capsulatus*) in einem kontinuierlichen Prozeß ( $D=0,3 \text{ h}^{-1}$ ) im 300 l-Maßstab Biomassekonzentrationen von  $25 \text{ g l}^{-1}$  erreicht [PRÄVE et al. 1987]. In der ehemaligen Sowjetunion wurde die SCP-Produktion mit methanotrophen Bakterien in  $400 \text{ m}^3$ -Reaktoren und einer Kapazität von  $20\,000 \text{ t a}^{-1}$  durchgeführt [WENDLANDT 1997]. Die Rahmenbedingungen zur Herstellung von SCP aus Methan/Erdgas verschlechterten sich mit fallenden Preisen von Konkurrenzprodukten, vor allem Sojaprotein, so daß die meisten Unternehmen die Forschungen einstellten. Nicht so die norwegische Firma Norferm, die 1998 in unmittelbarer Nähe eines erdgasverarbeitenden Industriearcals eine Produktionsanlage für Fermentationen mit einer *M. capsulatus*-Mischkultur mit einer Kapazität von  $10\,000 \text{ t a}^{-1}$  eröffnete. Die erreichte Biomassekonzentration wird mit 2 % (entspricht ca.  $20 \text{ g l}^{-1}$ ) angegeben, wobei die Fermentation kontinuierlich in speziell konstruierten 100 m langen Rohr-Schlaufen-Reaktoren (Volumen ca.  $300 \text{ m}^3$ ) erfolgt. Das hergestellte Produkt besteht aus 70 % Protein, 10 % Fett, 12 % Kohlenhydraten und 8 % Mineralien, erfüllt die gestellten Anforderungen bezüglich der Aminosäurezusammensetzung und ist für die Verwendung als Futter in der Fisch-, Hühner- und Schweineanzucht in der EU zugelassen [FALCH 2000, NORFERM 2001]. Dieses Beispiel zeigt, daß mit methanverwertenden Mischkulturen stabile Fermentationsprozesse im industriellen Maßstab durchführbar sind.

Die Zuordnung methanverwertender Mischkulturen nach o.g. Einteilung erfolgte durch verschiedene Autoren [WILKINSON et al. 1974, SLATER 1981] in Klasse II (Kommensalismus). Die Wechselwirkungen sind in Abb. 2-5 beispielhaft dargestellt. Methanol ist dabei ein inhibierendes Stoffwechselprodukt. Ursache für dessen Auftreten ist der Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten der Teilschritte der Methanoxidation. Die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Daher wird Methanol als Stoffwechselprodukt in das umgebende Medium ausgeschieden und kann sich dort anreichern. Die MMO wird durch Methanol in Konzentrationen über  $30 \text{ mg l}^{-1}$  [HARRISON 1978] bzw.  $60 \text{ mg l}^{-1}$  inhibiert [WILKINSON et al. 1974]. Folglich ist die Anwesenheit von methanolverwertenden Bakterien in methanverwertenden Gemeinschaften wünschenswert.

In detaillierten Untersuchungen der dargestellten, stabilen Mischkultur wurde neben der methanotrophen Hauptkomponente (ehm. *Pseudomonas* sp.) ein methanolverwertender Stamm (*Hyphomicrobium* sp.) sowie zwei weitere Species nachgewiesen [WILKINSON et al. 1974] (Abb. 2-5).

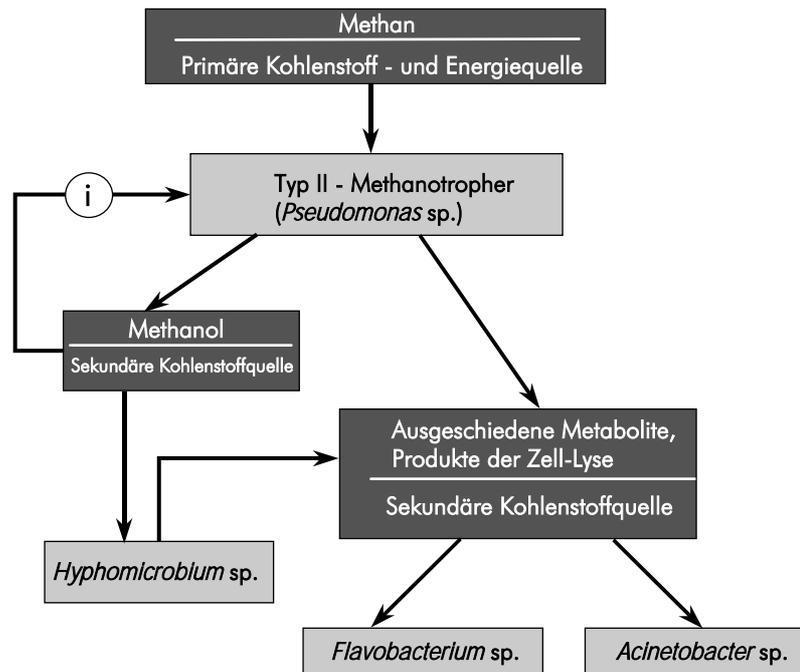


Abb. 2-5: Wechselwirkungen in einer methanverwertenden Mischkultur [SLATER 1981]  
(i = Inhibierung)

Bereits in Vorversuchen mit den isolierten Komponenten beobachtete man, daß in Flüssigkultur kein nachhaltiges Wachstum des Methanotrophen allein möglich war. Nur in Kombination mit dem Methylothrophen und bei Vorhandensein mindestens einer weiteren Komponente war ein mit der ursprünglichen Kultur vergleichbares Wachstum zu beobachten. Unter *steady-state*-Bedingungen (für  $0,034 < D < 0,148 \text{ h}^{-1}$ ) konnte gezeigt werden, daß das Verhältnis der Species unter Sauerstoff- und Methanlimitation nahezu gleich war (Anteil der methanotrophen Species 94,2 bzw. 89,9 %) und außerdem unabhängig von der Verdünnungsrate. Auf der Basis eines mathematischen Modells wurde nachgewiesen, daß für  $(\mu_{MA} = \mu_{MO} > D)$  das Verhältnis nur von den Ausbeutekoeffizienten der Methanolerzeugung durch den Methanotrophen und des Methanol-Verbrauches durch den Methanolverwerter abhängt:

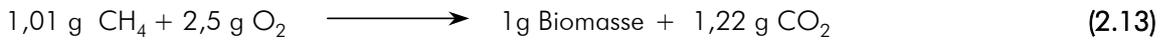
$$\frac{c_{X,MA}}{c_{X,MO}} = \frac{Y_{X,MA/MeOH}}{Y_{MeOH/X,MO}} \quad (2.12)$$

Ein Grund dafür ist die hohe Affinität des methylothrophen Stammes zu Methanol, so daß unter *steady-state*-Bedingungen auch geringe Mengen ausgeschiedenen Methanols sofort verbraucht wurden ( $c_{L,MeOH} \approx 0$ ) [WILKINSON et al. 1974]. Methan und Sauerstoff wurden nach Gleichungen 2.13 und 2.14 zu Biomasse umgesetzt, dabei ergaben sich unter Sauerstoff- bzw. Methanlimitation Ausbeuten  $Y_{X/CH_4}$  von 0,99 bzw. 0,8  $\text{g g}^{-1}$ ,  $Y_{X/O_2}$  von 0,4 bzw. 0,24  $\text{g g}^{-1}$  und ein stöchiometrisches Verhältnis  $O_2/CH_4$  von 1,24 bzw. 1,71. Diese Werte zeigen u.a., daß Methanfermentationen auf Grund der höheren Ausbeuten unter Sauerstoffmangel geführt werden sollten.

Gleiche Aussagen wurden in Untersuchungen mit einer methanverwertenden Mischkultur (Typ II, GB 21) in kontinuierlicher Kultivierung ( $D=0,07-0,17 \text{ h}^{-1}$ ) gewonnen: die Ausbeuten

bei Methanlimitation sind deutlich geringer ( $Y_{X/CH_4}=0,65$  und  $Y_{X/O_2}=0,21 \text{ g g}^{-1}$ ) als unter Sauerstofflimitation ( $Y_{X/CH_4}=0,87$  bzw.  $Y_{X/O_2}=0,27 \text{ g g}^{-1}$ ) [WENDLANDT 1979].

Sauerstofflimitation



Methanlimitation



Die Stabilität der oben beschriebenen Mischkultur wurde auch durch *transient*-Experimente nachgewiesen. Durch schrittweise (externe) Zugabe von Methanol stieg die Konzentration im Medium an, bis der kritische Wert für die Inhibierung der Methanoxidation erreicht war. Der Anteil der Methyloptrophen nahm von 4 % auf 25 % zu. Nach schnellem Verbrauch des überschüssigen Methanols und damit der Aufhebung der Inhibierung stellte sich die Ausgangszusammensetzung der Mischkultur wieder ein [WILKINSON et al. 1974, SLATER 1981].

In einer anderen Mischkultur, die neben dem *Mc. capsulatus* vier Begleitorganismen (14 % der Gesamtbiomasse), jedoch keinen Methanolverwerter enthielt, wurde das Fehlen von Methanol in der Kulturflüssigkeit mit gleichen Geschwindigkeiten für die Methan- und Methanoloxidation erklärt. Als Hauptbestandteile der im Medium nachgewiesenen organischen Verbindungen wurden Proteine und Nukleinsäuren, Produkte der Zell-Lyse von *Mc. capsulatus*, identifiziert. Als Hauptkomponente der Begleitorganismen wurde in diesem Fall ein heterotropher, zur Bildung extrazellulärer Proteasen und DNAasen befähigter Stamm isoliert, der diese makromolekularen Stoffwechselprodukte verwerten konnte [LINTON und BUCKEE 1977].

Neben den beschriebenen Wechselwirkungen zwischen methanotrophen Bakterien und Begleitorganismen, die kein Methan verwerten, wurden auch Beziehungen von Methanotrophen untereinander untersucht [GRAHAM et al. 1993]. Die positiven Wechselwirkungen zwischen Typ I und Typ II-Methanotrophen werden mit Stoffwechselprodukten erklärt, die ins Kultivierungsmedium abgegeben werden [STAROSTINA et al. 1995].

Bezüglich der Wechselwirkungen und der Stabilität der methanverwertenden Mischkulturen lassen sich die Erkenntnisse aus der Literatur wie folgt zusammenfassen:

1. Als primäre Kohlenstoffquelle steht nur Methan zur Verfügung, d.h. der sich ergebende Selektionsdruck ermöglicht in erster Linie Wachstum und Vermehrung von methanotrophen Bakterien. Alle anderen Mitglieder der Gemeinschaft können sich nur abhängig von den Stoffwechselprodukten der Methanotrophen entwickeln (Abb. 2-5, 2-6).
2. Die Bedeutung der Begleitorganismen liegt vorrangig in der Metabolisierung inhibierender Stoffwechselprodukte (insbesondere Methanol) und damit Verbesserung der Wachstumsbedingungen für die methanotrophen Organismen.
3. Die Kultivierung im kontinuierlichen Betrieb mit einer definierten Verweilzeit bietet zusätzlich die Möglichkeit, Mikroorganismen nach ihrer Wachstumsgeschwindigkeit zu selektieren. Die entstehende Gemeinschaft setzt sich bei Einstellung identischer Bedingungen entsprechend gleich zusammen. Sind die Wachstumsgeschwindigkeiten der Komponenten gleich, ist die Zusammensetzung unabhängig von der Verdünnungsrate.

4. Neben der Entfernung von Stoffwechselprodukten kann die Bedeutung der Begleitorganismen auch in der Bildung wachstumsfördernder Substanzen für die Methanotrophen liegen.

Frühe Veröffentlichungen zeigten die Gültigkeit der letzteren Aussage in Untersuchungen zur Stabilität und zu spezifischen Wechselwirkungen einer methanverwertenden Mischkultur [LAMB und GARVER 1980a, 1980b]. Aus der ursprünglich aus Klärschlamm gewonnenen Kultur wurden drei verschiedene Komponenten isoliert: ein Methanotropher (MA), ein Citratverwerter (CT) und ein Methanolverwerter (MO). Um den Einfluß der einzelnen Species zu analysieren, wurden definierte Mischkulturen unterschiedlicher Zusammensetzung eingesetzt. Die wichtigsten Ergebnisse dabei waren:

- Die Zusammensetzung der Originalmischkultur (MA:(CT+MO) = 5:1) blieb unter allen Bedingungen über mindestens drei Jahre stabil.
- Auch Zwei-Komponenten-Systeme waren stabil (z.B. MA+CT). Das Verhältnis MA:CT, das mit ca. 50:1 einen wesentlich höheren Anteil des Methanotrophen im Vergleich zur Originalkultur widerspiegelt, war unabhängig von der Methankonzentration, aber abhängig von der Verdünnungsrate. Je kleiner letztere, desto kleiner wird das Verhältnis von MA:CT.
- Komponente CT bildet einen für MA essentiellen Wachstumsfaktor, wahrscheinlich Vitamin B12. In Mischungen von MA und MO wurde kein Wachstum beobachtet. Nach der oben angeführten Einteilung würde dieses System der Klasse I (Mutualismus) entsprechen.
- Im künstlich gemischten MA+CT+MO stellte sich ein Verhältnis MA:(CT+MO) von 3,3:1 ein. Da dieses im Vergleich zum Zweikomponenten-System deutlich besser dem Zustand der Originalkultur entspricht, wurde geschlossen, daß der Methylotrrophe MO (trotz instabiler Gemische von MA+MO) inhärenter Bestandteil des nativen Systems ist.

Bemerkenswert beim Vergleich mit oben von SLATER (1981) beschriebener Mischkultur ist der Umstand, daß auch in der Mischkultur (MA+CT), in der der Methanolverwerter fehlt, keine Methanolanreicherung und damit Inhibierung des Methanotrophen beobachtet wurde. Möglicherweise waren bedingt durch insgesamt niedrige Biomassekonzentrationen die Methanolkonzentrationen stets kleiner als der kritische Wert. [LAMB und GARVER 1980a, 1980b].

Ein Modell für die beschriebene Mischkultur (MA+CT+MO) ist in Abb. 2-6 gezeigt: Die methanotrophe Komponente (MA) verwertet Methan, erzeugt Methanol und andere Stoffwechselprodukte (DOC). Diese Substanzen sind Substrate für die Begleitorganismen (MO und CT). Letztere bildet einen für die Methanotrophen essentiellen Wachstumsfaktor (VB12), der das Wachstum der Methylotrphen ebenfalls unterstützt (+). Von Methanol geht eine inhibierende Wirkung (-) auf die Species CT aus.

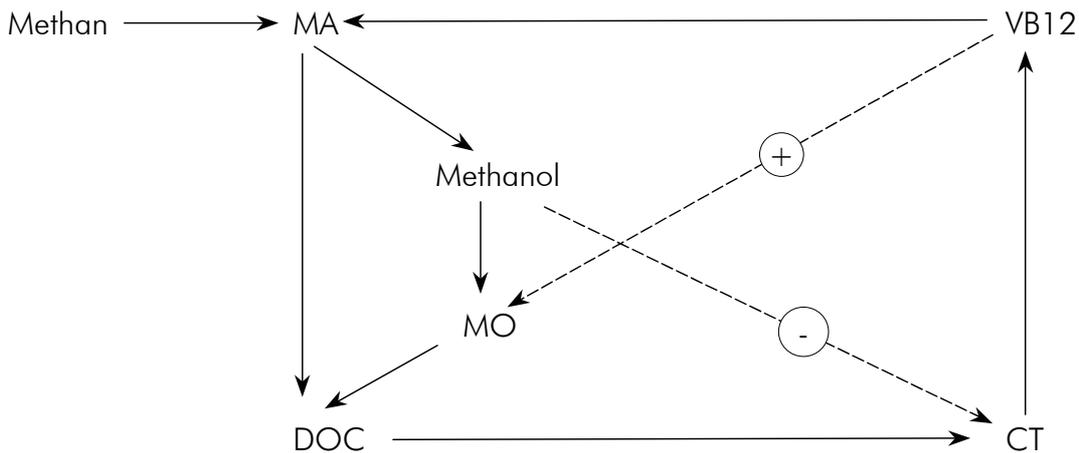


Abb. 2-6: Modell der Wechselwirkungen in einer methanverwertenden Mischkultur aus drei Komponenten (Mutualismus) [LAMB und GARVER 1980b]

Insgesamt wird deutlich, daß in methanverwertenden Mischkulturen komplexe Beziehungen zwischen den verschiedenen Species bestehen. Die Rolle der Begleitorganismen liegt vorrangig in der Entfernung von Stoffwechselprodukten, weiterhin möglich ist die Bildung von essentiellen Wachstumsfaktoren. Es kann geschlußfolgert werden, daß methanverwertende Mischkulturen sehr stabil und im Hinblick auf Wachstumsraten und Biomasseproduktion entsprechenden Reinkulturen überlegen sind.

#### 2.2.3.4 Methan als gasförmige Kohlenstoffquelle

Mit der Verwendung von Methan als Kohlenstoffquelle sind hohe Ausbeuten möglich (siehe Tabelle II-10). Als gasförmiges Substrat bringt es folgende Besonderheiten gegenüber herkömmlichen Kohlenstoffquellen mit sich:

- Methan kann im Fermentationsmedium nicht bevorratet werden. → Eine ständige Nachlieferung ist erforderlich.
- Methanotrophe sind streng aerob. → Eine gleichzeitige Bereitstellung von Sauerstoff ist nötig. Somit muß fortlaufend die Versorgung mit zwei gasförmigen Substraten gesichert werden, deren Konzentrationen im wässrigen Medium sich gegenseitig durch Partialdruckerniedrigung beeinflussen (Dalton'sches und Henry'sches-Gesetz).
- Die spezifischen Bedarfswerte, Löslichkeiten und Diffusionskonstanten von Sauerstoff und Methan sind unterschiedlich. → Das Verhältnis  $O_2/CH_4$  im Eingangsgas muß entsprechend eingestellt werden.
- Beide Gase sind allgemein schlecht im Fermentationsmedium löslich. → Um hohe Übergangsraten zu erzielen, müssen die Fermentationen bei hohen Gasdurchsätzen, Rührerdrehzahlen bzw. unter Druck durchgeführt werden.
- Methan und Sauerstoff bilden in bestimmten Bereichen explosive Gemische. → Es sind erhöhte Sicherheitsanforderungen zu berücksichtigen.

Für Mikroorganismen sind nur in der Flüssigkeit gelöste Substrate zugänglich, daher ist der Stoffübergang der Gase in die Flüssigphase entscheidend für deren Verfügbarkeit. Die Gase

werden in Form von Blasen in den Bioreaktor eingebracht, ideal durchmischt und verteilt, die Phasengrenze stellt dabei die Grenzflächen Gasblase/Flüssigkeit dar. Triebkraft für den Übergang des Gases in die Flüssigkeit ist der Konzentrationsgradient an der Phasengrenze Gas/Flüssigkeit. Weitere Abhängigkeiten für die Stoffübergänge ergeben sich nach der Zweifilmtheorie (Abb. 2-7, Gl. 2.15 und 2.16) vom spezifischen Stoffübergangskoeffizienten ( $k_L$  bzw.  $k_G$ ) und bei Bezug auf das Bilanzvolumen von der zur Verfügung stehenden spezifischen Grenzfläche  $a$  (Gl. 2.17). Der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen an der Grenzfläche ( $p_{GF,i}$  und  $c_{GF,i}$ ) ist über den Henry-Koeffizienten gegeben (Gl. 2.18), die Gleichgewichtskonzentration  $c_{i,L}^*$  ist im Fall Übergang Gas  $\rightarrow$  Flüssigkeit (für schlechtlösliche Gase) gemäß dem Henry-Gesetz vom Partialdruck der Komponente  $i$  und der Henry-Konstante abhängig. Die spezifische Phasengrenzfläche ist gemäß Gleichung. 2.19 durch den Anteil der Gasblasen am Gesamtvolumen  $(1-\varepsilon)$  und dem mittleren Blasendurchmesser  $d_B$  gegeben.

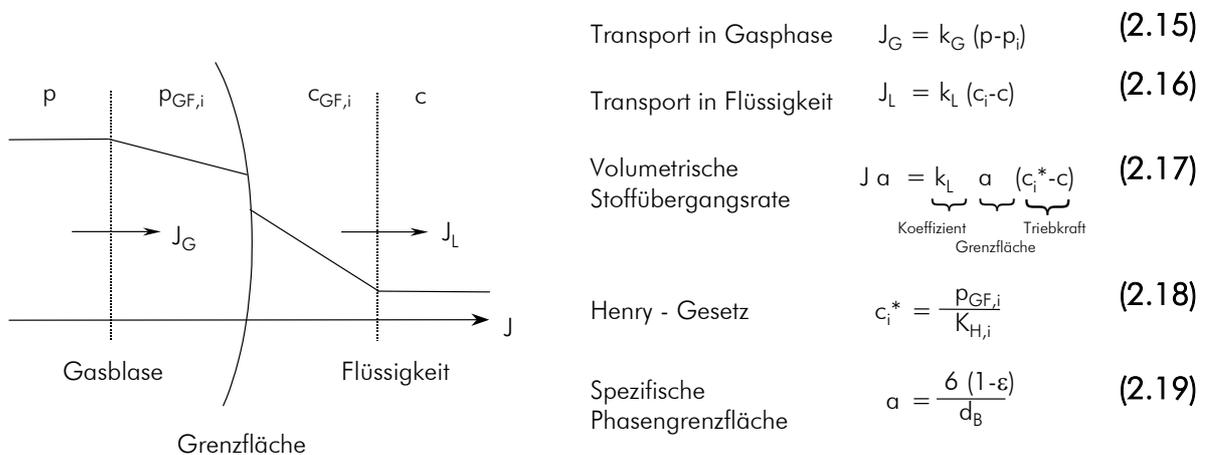


Abb. 2-7: Zweifilmtheorie des Stoffübergangs an der Phasengrenzfläche Gas/Flüssigkeit

Über das Henry'sche-Gesetz und das Dalton'sche Gesetz ( $\sum p_i = 1$ ) ergibt sich die gegenseitige Beeinflussung durch den Partialdruck im Gasmisch, was bei der Methanfermentation für die Mischung aus Methan, Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff relevant ist. In einem Fermentationsprozeß kann der Stoffübergang durch die in Tabelle II-14 zusammengefaßten Parameter beeinflußt werden:

Tabelle II-14: Einflußfaktoren auf Gastransport [MUTZALL 1993]

| Variable   | Einfluß auf                 |
|--|-----------------------------|
| O <sub>2</sub> - bzw. CH <sub>4</sub> -Gehalt der Gasphase | $c_{i,L}^*$                 |
| Druck  | $c_{i,L}^*$                 |
| Gasdurchsatz (Gesamtbegasung)                              | $\varepsilon, a, c_{i,L}^*$ |
| Temperatur   | $c_{i,L}^*, k_L$            |
| Energieeintrag durch Rührer                                | $\varepsilon, d_B$          |
| Viskosität des Mediums                                     | $\varepsilon, d_B$          |
| Antischaummittel   | $k_L$                       |

Wichtige physikalischen Eigenschaften von Sauerstoff und Methan sind in Tabelle II-15 aufgeführt. Die Henry-Konstanten sind unterschiedlich (Mittelwerte:  $K_{H,CH_4}=1,38$  bzw.  $K_{H,O_2}=1,23 \text{ mol m}^{-3} \text{ bar}^{-1}$ ), die Sättigungskonzentration (massebezogen) von reinem Sauerstoff in Wasser ist deutlich höher. Da aber in der Praxis kaum mit reinem Sauerstoff gearbeitet wird, liegen die relevanten Werte bei der Verwendung von Methan und Luft für beide Gase in der gleichen Größenordnung. Für ein Gemisch aus 25 % Methan und 75 % Luft ergeben sich bei 25 °C beispielsweise  $c_{L,CH_4}^*=5,52$  bzw.  $c_{L,O_2}^*=6,32 \text{ mg l}^{-1}$ .

Tabelle II-15: Eigenschaften von Methan und Sauerstoff  
[FOGG und GERRAD 1991, #SANDER 1999]

| Eigenschaft                  | Einheit<br>(Bedingungen)                                | Methan<br>CH <sub>4</sub> | Sauerstoff<br>O <sub>2</sub>              |
|------------------------------|---|---------------------------|---|
| Molare Masse                 | g mol <sup>-1</sup>                                     | 16,043                    | 31,999                                    |
| Dichte                       | g l <sup>-1</sup><br>(p=1,013 bar,<br>T=273,15 K)       | 0,71683                   | 1,42898                                   |
| Dampfdruck                   | bar<br>(T=148,35 K)                                     | 10,1325                   | 40,53                                     |
| Henry-Konstante <sup>#</sup> | mol m <sup>-3</sup> bar <sup>-1</sup><br>(T = 298,15 K) | 1,28-1,48                 | 1,18-1,28                                 |
| Sättigungskonzentration      | mg l <sup>-1</sup><br>(p=1,013 bar,<br>T=298,15 K)      | 22,08                     | 39,36<br>LUFT: 21% O <sub>2</sub><br>8,29 |

## 2.3 Prozeßmodell

### 2.3.1 VORBETRACHTUNGEN

Die Beschreibung von biotechnologischen Prozessen mit Hilfe von mathematischen Modellen ist eine sehr komplexe Aufgabe. Ziel ist es, die Gesamtheit der Prozesse zu erfassen und die Zusammenhänge und Wechselwirkungen zu verstehen. (Gute) Modelle bieten folgende Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten [MUTZALL 1993, BLEY 1990]:

- Modelle sind überschaubar, es werden Zusammenhänge deutlich, die in der komplexen Realität nicht zu erkennen sind.
- Modelle beschreiben die Vorgänge quantitativ mittels einfacher mathematischer Ausdrücke.
- Mathematische Modelle ermöglichen die Simulation von Prozessen am Computer, kombinatorische Effekte können erkannt und der Prozeß optimiert werden.
- Modelle helfen bei der Interpretation der Ergebnisse und sind Werkzeuge für weitere Versuchsplanungen.

Einer Modellierung geht die Definition des Bilanzraumes, der einzelnen Komponenten und der Randbedingungen für die Gültigkeit voraus. In der Biotechnologie sind das z.B. die Annahme von Bioreaktoren als ideale Rührkessel. Das Prozeßmodell setzt sich aus zwei Teilen zusammen, dem Bioreaktormodell (beschreibt den Reaktortyp, die vorhandenen Phasen, die Trans-

portprozesse) und dem reaktionskinetischen Modell (beschreibt die Kinetik der Verbrauchs- und Bildungsprozesse).

Bezüglich Struktur und Komplexität können Modelle beliebig vertieft werden. Das soll kurz anhand der Kompartimentierung des Bilanzraumes erläutert werden. Wird zum Beispiel die Gesamtmasse von Bakterien in einem Reaktor als Gesamtheit „Biomasse“ betrachtet, ist das Modell unstrukturiert; unterscheidet man hingegen nach physiologischen Gesichtspunkten z.B. in intrazelluläre Speicherstoffe und aktive (vermehrungsfähige) Biomasse, spricht man von strukturierten Modellen (Bsp. PHB-Bildung). Eine Population von Zellen kann weiterhin als einheitlich betrachtet (nicht-segregiert) oder auf der Grundlage von Stoffwechselzuständen (DNA-Gehalt) oder (für Mischkulturen) in verschiedene Species unterteilt werden (segregiert).

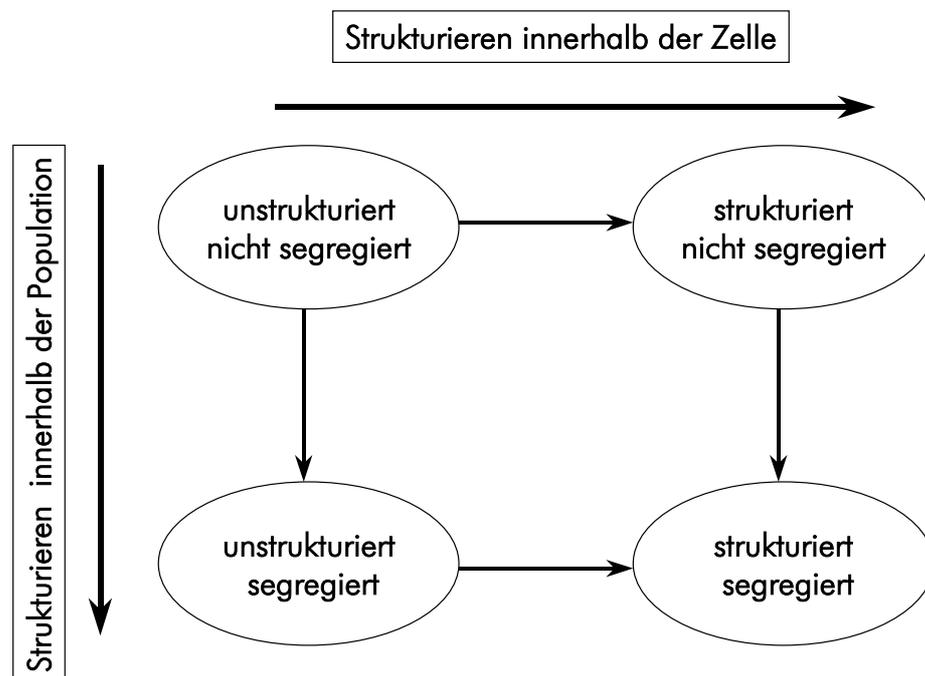


Abb. 2-8: Einteilung von Bioprozeßmodellen [NIELSEN 2001]

### 2.3.2 ERSTELLEN VON BILANZEN

Die Erstellung der Bilanzgleichungen erfolgt auf der Basis allgemeingültiger Erhaltungssätze für Masse, Energie und Volumen. In einem Bioreaktor, der für das Modell z.B. als idealer Rührkesselreaktor (ISTR–*ideal stirred tank reactor*) oder idealer Rührreaktor mit Durchfluß (CSTR–*continuous stirred tank reactor*) angesehen wird, können Änderungen durch Transport- und Reaktionsprozesse erfolgen. Transportprozesse werden in konvektive (aktive Strömung) und diffusive Vorgänge unterteilt (Gleichung 2.20). [ROELS 1980, DUNN et al. 1992]:

$$\left( \begin{array}{c} \text{Allgemeine} \\ \text{Änderung} \\ \text{im System} \end{array} \right) = \left( \begin{array}{c} \text{Eintrag – Austrag} \\ \text{durch} \\ \text{konvektiven Transport} \end{array} \right) + \left( \begin{array}{c} \text{Eintrag - Austrag} \\ \text{durch} \\ \text{diffusiven Transport} \end{array} \right) + \left( \begin{array}{c} \text{Änderung} \\ \text{durch} \\ \text{Reaktion} \end{array} \right) \quad (2.20)$$

Für Bioreaktoren wird meist der Reaktormantel als Bilanzgrenze betrachtet. Das Ziel fermentativer Prozesse ist Vermehrung von Mikroorganismen (Gewinnung von Biomasse) und/oder die Bildung eines bestimmten Produktes. Zu- und abfließende Ströme dienen der Versorgung der Mikroorganismen mit Kohlenstoffquelle(n), Nährstoffen, Sauerstoff und können Flüssigkeiten (Substrat, Wasser, Nährsalze) und Gase (Sauerstoff) sein.

Bei Betrachtung der möglichen Zu- und Abflüsse für die Flüssigphase  $F_L$  sind die wichtigsten Betriebsweisen für Bioreaktoren und die entsprechenden Bedingungen:

|              |                  |               |                |                          |
|--------------|------------------|---------------|----------------|--------------------------|
| geschlossen: | <i>batch</i>     | $F_{L,0} = 0$ | $F_{L,1} = 0,$ | $V_L = \text{konst.}$    |
| offen:       | <i>fed-batch</i> | $F_{L,0} > 0$ | $F_{L,1} = 0,$ | $V_L \neq \text{konst.}$ |
|              | kontinuierlich   | $F_{L,0} > 0$ | $F_{L,1} > 0,$ | $V_L = \text{konst.}$    |

Da Gase (üblicherweise Sauerstoff, im speziellen Fall auch Methan) nur eine geringe Löslichkeit besitzen, werden sie dem Reaktor ständig zugeführt. In diesem Sinne sind Bioreaktoren in allen aeroben Prozesse offene Systeme, da permanent von einem Gasstrom durchströmt.

Zur vollständigen Beschreibung des Gesamtsystems müssen Bilanzen für alle Komponenten der Gas- und Flüssigphase aufgestellt werden.

### 2.3.3 BIOREAKTORMODELL

In Abb. 2-9 sind die Stoffströme der Flüssigkeiten und Gase im untersuchten System sowie der gewählte Bilanzraum skizziert.

In das System werden je ein Flüssigkeits- und ein Gasstrom geleitet ( $F_{L,0}$  und  $F_{G,0}$ ) und aus diesem abgeführt ( $F_{L,1}$  und  $F_{G,1}$ ). Die Eingangsströme setzen sich aus mehreren Teilströmen zusammen: der Flüssigkeitsstrom aus drei verschiedenen Teilströmen für Nährlösung ( $F_{NL}$ ) pH-Korrekturmittel ( $F_{pH}$ ) und Wasser ( $F_{H_2O}$ ) mit den entsprechenden Konzentrationen der beliebigen Komponente  $i$ . Der zugeführte Gasstrom besteht aus zwei Teilströmen von Luft ( $F_{Luft}$ ) und Methan ( $F_{CH_4}$ ).

Als Bilanzraum wurde das Gesamtvolumen des Reaktors definiert, das sich aus dem Volumen der Flüssigkeit und dem des Gasraumes zusammensetzt und sich für den betrachteten Bioreaktor nicht ändert:

$$V_{BR} = V_G + V_L = \text{konstant.} \quad (2.21)$$

Für die folgenden Ableitungen werden weitere Annahmen getroffen:

- Die Flüssigkeit ist ideal durchmischt.  $\rightarrow c_{i,L,1} = c_{i,L}$
- die Gasphase ist ideal durchmischt.  $\rightarrow x_{i,1} = x_i$
- Temperatur und Druck der Gasphase sind im Reaktor und am Reaktorausgang gleich groß.  $\rightarrow p_{i,G,1} = p_{i,G}$
- Die Feuchte der ein- und austretenden Gasströme wird vernachlässigt.

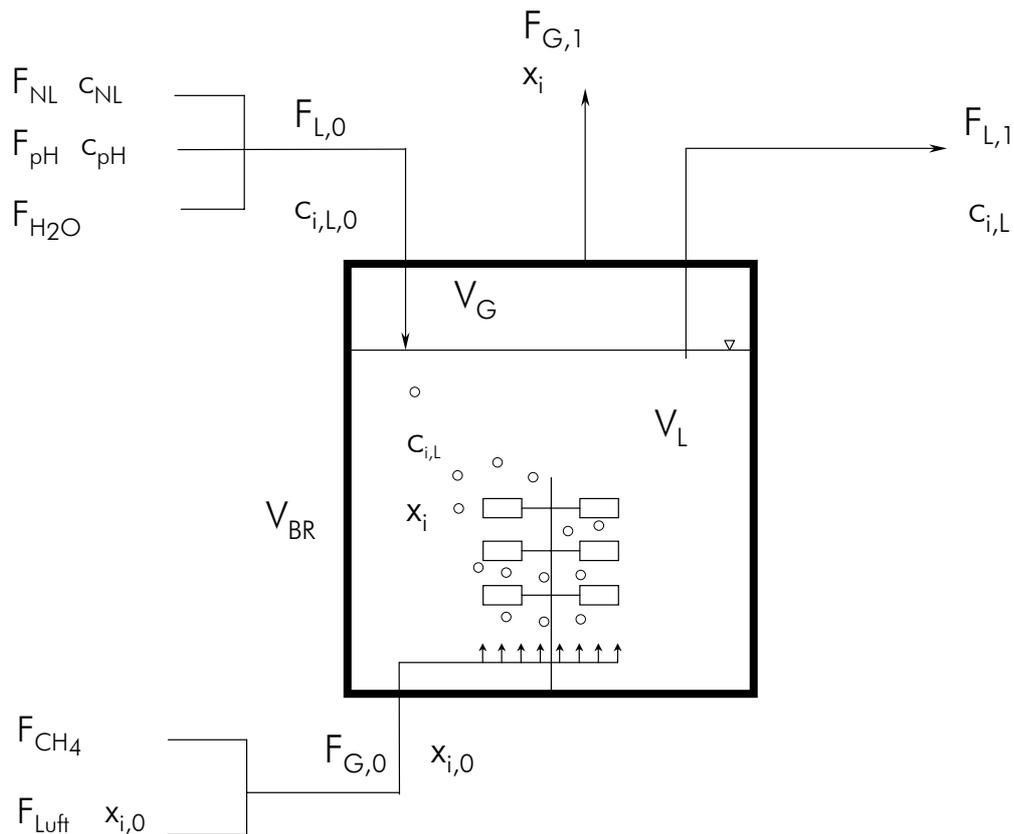


Abb. 2-9: Darstellung der Bilanzräume und Stoffströme für die Gas- und Flüssigphase im untersuchten System

In die allgemeine Gleichung zur Beschreibung der Massenänderung der Komponente  $i$  im Reaktor (mit  $V_{BR}$  als Bilanzraum) gehen die Massenströme in den und aus dem Bilanzraum sowie die Massenänderung durch Reaktion im Bilanzraum ein :

$$\frac{dm_{i,BR}}{dt} = \sum \dot{m}_{i,0} - \sum \dot{m}_{i,1} + \left( \frac{dm_i}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} \quad (2.22)$$

mit den einzelnen Strömen für Gas und Flüssigkeit:

$$\frac{dm_{i,BR}}{dt} = \dot{m}_{i,L,0} + \dot{m}_{i,G,0} - \dot{m}_{i,L,1} - \dot{m}_{i,G,1} + \left( \frac{dm_i}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} \quad (2.23)$$

Im System existieren zwei Phasen (Gas und Flüssigkeit), die sich unterschiedlich verhalten. Reaktionen finden nur in der flüssigen Phase statt. Daher wird für das Modell für diese zwei Phasen in den entsprechenden Teilvolumina der Flüssig- ( $V_L$ ) und Gasphase ( $V_G$ ) isoliert betrachtet und der Phasenübergang berücksichtigt.

### 2.3.3.1 Betrachtungen für die Flüssigphase

Für die Änderung der Masse einer Komponente in der Flüssigphase gilt:

$$\frac{dm_{i,L}}{dt} = \dot{m}_{i,L,0} - \dot{m}_{i,L,1} + \left( \frac{dm_i}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} + (\dot{m}_i)_{P_{Ü}(G \rightarrow L)} \quad (2.24)$$

Entsprechend der Herleitung [siehe Anhang 1] ergibt sich für die Konzentrationsänderung der Komponente  $i$  in der Flüssigphase (Gleichung A1-14):

$$\frac{dc_{i,L}}{dt} = (c_{i,L,0} - c_{i,L}) \cdot D - c_{i,L} \cdot \frac{dc_{H_2O}}{dt} \cdot \frac{1}{\rho_{H_2O}} + r_i + k_L a_i \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{G,i} - c_{i,L}) \quad (2.25)$$

### 2.3.3.2 Betrachtungen für die Gasphase

Unter der Bedingung, daß in der Gasphase keine Reaktionen stattfinden, wird die Massenänderung der Komponente  $i$  durch folgende Bilanz beschrieben:

$$\frac{dm_{i,G}}{dt} = \dot{m}_{i,G,0} - \dot{m}_{i,G,1} - (\dot{m}_i)_{PÜ(G \rightarrow L)} \quad (2.26)$$

Nach Herleitung [siehe Anhang 2] ergibt sich für die Konzentrationsänderung der Komponente  $i$  in der Gasphase (Gleichung A2-9):

$$\text{(mit } c_{i,G} = x_i \cdot p_i) \quad (2.27)$$

$$\frac{dc_{i,G}}{dt} = c_{i,G,0} \cdot \frac{F_{G,0}}{V_G} - c_{i,G} \cdot \frac{F_{G,1}}{V_G} - [k_L a_i \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{i,G} - c_{i,L})] \cdot \frac{V_L}{V_G} \quad (2.28)$$

### 2.3.4 REAKTIONSKINETISCHES MODELL

Masseänderungen der Komponenten im System durch Reaktion finden nur in der Flüssigphase statt, daher gilt:

$$\left( \frac{dm_i}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} = V_L \cdot r_i \quad (2.29)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeiten für Bildung und der Verbrauch der einzelnen Komponenten ist der Gesamtbiomasse  $X$  und deren Änderungen und einem spezifischen Ausbeutekoeffizienten proportional. Für das betrachtete Modell wird, wie in einem Modell von HEINZLE und LAFFERTY (1980), die Gesamtbiomasse in Restbiomasse (R) und Produkt (PHB) strukturiert, beide Terme werden berücksichtigt:

$$r_i = \frac{r_R}{Y_{R/i}} + \frac{r_{PHB}}{Y_{PHB/i}} \quad \text{mit } X = R + PHB \quad (2.30)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeiten für Restbiomasse und PHB sind wiederum der Konzentration selbst und spezifischen Bildungsgeschwindigkeiten proportional.

$$r_R = \mu \cdot C_R \quad \text{mit } \mu = \mu_{\max} \cdot f(c_i) \quad (2.31)$$

$$r_{PHB} = q \cdot C_{PHB} \quad \text{mit } q = q_{\max} \cdot f(c_i) \cdot f(c_{PHB}) \quad (2.32)$$

Die detaillierten Bilanzen für alle Komponenten mit den entsprechenden reaktionskinetischen Gleichungen sind in den Ergebnissen unter Punkt 4.5 dargestellt.

### 3 MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3.0 Mikroorganismen

Die Hauptkomponente der verwendeten Mischkultur bildete der obligat methanotrophe Stamm *Methylocystis* sp. GB 25 (DSM 7674), der einen Anteil von  $\geq 95\%$  an der Gesamtbiomasse einnehmen sollte [WENDLANDT et al. 1981]. Dieser wurde am ehemaligen Institut für Biotechnologie (IBT, Leipzig) aus mit Industrieabwasser kontaminiertem Flußwasser isoliert.

Die wichtigsten Parameter zur Kultivierung der Mischkultur sind [WENDLANDT et al. 1981, SCHNEIDER et al. 1983]:

|   |  |
|---|--|
| Temperaturoptimum:                      | 38 °C  |
| pH-Optimum:                             | 5,7  |
| max. spezifische Ausbeutekoeffizienten: | 0,8 g g <sup>-1</sup> CH <sub>4</sub><br>0,28 g g <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> |
| max. Wachstumsrate:                     | 0,29 h <sup>-1</sup>   |

Auf der Grundlage der intrazellulären Membranstruktur und dem Weg der Kohlenstoffassimilation über den Serin-Weg wurde der Stamm *Methylocystis* sp. GB 25 in die Gruppe der Typ II-Methanotrophen eingeordnet. Folgende Schlüsselenzyme der Kohlenstoffassimilation konnten nachgewiesen werden: Hydroxypyruvat-Reduktase, Isocitrat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Isocitrat-Lyase [GROBE 1998].

#### 3.1 Fermentationsversuche

##### 3.1.1 BIOREAKTOREN

Die Kultivierung der methanverwertenden Mischkultur erfolgte in Druck-Bioreaktoren der Firma B. Braun Biotech International, Melsungen. Folgende Reaktoren wurden verwendet:

| Bezeichnung                 | UD 5   | UD 50  |
|-----------------------------|--------|--------|
| Reaktorvolumen ( $V_{BR}$ ) | 6,72 l | 67,1 l |
| Arbeitsvolumen ( $V_l$ )    | 4,0 l  | 40,0 l |

Die Bioreaktorsysteme bestehen aus dem Kulturgefäß aus Edelstahl (max. Druck 6 bar), ausgerüstet mit Antrieb (Rührerdrehzahl max. 1500 min<sup>-1</sup> (UD 5) bzw. 1000 min<sup>-1</sup> (UD 50)), Versorgungssystemen für Gase (Methan, Luft, Stickstoff), Nährlösung, Wasser sowie Lösungen zur pH-Korrektur (NH<sub>3</sub>, NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ein digitales Meß- und Regelsystem DCU ist mit einem übergeordneten Leitrechnersystem (Micro-MFCS) verbunden. Letzteres ist ein Rechnersystem zur Prozeßdatenerfassung und Speicherung, Prozeßkontrolle und -protokollierung. Dabei konnte die Datenerfassung und Prozeßkontrolle für beide Bioreaktoren gleichzeitig erfolgen. Meß- und Regelsysteme existierten für pH-Wert, Druck, Temperatur, Gewicht (Reaktorinhalt), Gelöstsauerstoff, Rührerdrehzahl und Gesamtgasmenge. Das Verhältnis Luft/Methan im Eingangsgas war frei wählbar und wurde durch die spezielle Regelgröße „ratio“ unabhängig von

Gesamtgasmenge und Druck konstant gehalten. Die Bioreaktorsysteme waren weiterhin mit einer Kaskadenregelung zur Konstanthaltung der Gelöstsauerstoffkonzentration ausgestattet (UD 5: Rührerdrehzahl, Gesamtgasmenge; UD 50: Rührerdrehzahl, Gesamtgasmenge, Druck). Folgende Parameter charakterisieren die verwendeten Reaktoren:

Tabelle III-1: Wichtige Kennziffern der verwendeten Bioreaktoren.

Der  $k_L a_{O_2}$ -Wert wurde aus der Gasbilanz bei chemostatischer Kultivierung unter Sauerstofflimitation nach Gleichung 3.1 [REUSS 1993] bestimmt.

$$k_L a = \frac{r_{O_2}}{\Delta c_{O_2,L}} \quad (3.1)$$

$$\text{mit } \Delta c_{O_2,L} = \frac{c_{O_2,L,0}^* - c_{O_2,L,1}^*}{\ln \frac{(c_{O_2,L,0}^* - c_{O_2,L})}{(c_{O_2,L,1}^* - c_{O_2,L})}} \quad (3.2)$$

| Parameter  | Einheit  | UD 5                  | UD 50                 |
|--|--|-----------------------|-----------------------|
| maximaler Überdruck  | mbar   | 5000                  | 5000                  |
| maximale Rührerdrehzahl  | min <sup>-1</sup>                                | 1500                  | 1000                  |
| maximale Gesamtgasmenge  | l min <sup>-1</sup>                              | 10                    | 100                   |
| maximale Sauerstoffübergangsrate<br>(N=max., F <sub>G,0</sub> =max., drucklos) | g O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> | 12,5                  | 15,0                  |
| maximale Sauerstoffübergangsrate<br>(N=max., F <sub>G,0</sub> =max.)           | g O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> | 29,2<br>(p=4500 mbar) | 26,3<br>(p=3600 mbar) |
| $k_L a_{O_2}$  | h <sup>-1</sup>                                  | 1990                  | 2708                  |

Die Analyse der Eingangs- und Ausgangsgase erfolgte paramagnetisch (O<sub>2</sub>) bzw. durch Infrarotabsorptionsgasanalyse (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>), weiterhin war ein Quadrupolmassenspektrometer zur Erfassung der Gaswerte *online* gekoppelt.

### 3.1.2 ALLGEMEINE KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN

Folgende Prozesse wurden durchgeführt:

- A) Gewinnung von Impfmateriale
- B) Wachstumsprozesse in Vorbereitung der PHB-Bildung
- C) PHB-Bildungsprozesse

Die Biomasse wurde unsteril in kontinuierlichen Prozessen unter Verwendung von Methan (Methan 5.0, 52 l Druckgasflaschen 200 bar, Fa. LINDE) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle unter folgenden Bedingungen kultiviert:

|                                  |                       |
|----------------------------------|-----------------------|
| Temperatur:                      | 38 °C                 |
| pH-Wert:                         | 5,7                   |
| Verhältnis $\gamma_{CH_4/O_2}$ : | 1,30–1,45             |
| ratio (Methan: Luft):            | 25:75                 |
| Durchflußrate:                   | 0,167 h <sup>-1</sup> |

|                      |                                      |
|----------------------|--------------------------------------|
| Gesamtgasmenge:      | 5–10 bzw. 50–100 l min <sup>-1</sup> |
| Rührerdrehzahl:      | 400–1400 bzw. 1000 min <sup>-1</sup> |
| Gelöstsauerstoff:    | ≤ 15 % der Sättigung                 |
| Phosphat-Phosphor:   | 30–60 mg l <sup>-1</sup>             |
| Ammonium-Stickstoff: | 70–100 mg l <sup>-1</sup> .          |

Die Nährlösung enthielt in 1 l Wasser die für das Wachstum von 1 g Biomassetrockensubstanz nötigen Elemente (alle Chemikalien p.A., Fa. Merck) [WENDLANDT et al. 1981]:

|   |          |
|---|----------|
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (80 %ig)                               | 0,028 ml |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                       | 35 mg    |
| MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                                | 25 mg    |
| CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O                                | 0,785 mg |
| MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O                                  | 1,389 mg |
| FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                                | 1,678 mg |
| ZnCl <sub>2</sub>   | 0,322 mg |
| CoSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                                | 0,036 mg |
| NiSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                                | 0,109 mg |
| Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> × 18 H <sub>2</sub> O | 0,186 mg |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O                | 0,883 mg |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O                 | 0,041 mg |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>  | 1,286 mg |
| CrCl <sub>3</sub> × 6 H <sub>2</sub> O                                | 0,077 mg |

Die entsprechende Nährsalzlösung wurde in Ansätzen von 10 l 2000fach konzentriert hergestellt und für die Dosierung in den Fermentationen auf die 60fache Konzentration verdünnt. Um optimale Konzentrationen aller Nährsalze einzustellen, wurde diese Nährlösung 2 g über der aktuellen Biomassekonzentration im Bioreaktor bilanziert. Diese Nährlösung beinhaltet alle essentiellen Ionen in dem entsprechenden, ausgewogenen Verhältnis. Daher kann ein Leition analysiert werden, die weiteren Ionen sind dann im entsprechenden Verhältnis zum Verbrauchswert vorhanden. In allen Kultivierungen wurde Phosphat als Leition verwendet und in Grenzen von 40–60 mg l<sup>-1</sup> konstant gehalten.

Die Regelung des pH-Wertes erfolgte mit 2%iger (v/v) NH<sub>3</sub>-Lösung, wobei mit letzterer gleichzeitig die Versorgung mit Ammonium-Stickstoff realisiert wurde. Bei Bedarf konnte mit 2%iger (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung bzw. 2%iger Natronlauge gearbeitet werden.

### 3.1.3 SPEZIELLE KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN

#### 3.1.3.1 Gewinnung von Impfmateri

Die Gewinnung erfolgte unter den o.g. Bedingungen unter Normaldruck bei maximaler Rührerdrehzahl und Gesamtbelegung.

### 3.1.3.2 Wachstumsprozesse zur Vorbereitung der PHB-Bildung

Die Kultivierungsbedingungen waren wie angegeben, die Standardprozesse wurden über einen Zeitraum von 20–24 h mit erhöhtem Systemdruck von max. 4500 mbar geführt.

### 3.1.3.3 PHB-Bildungsprozesse

Der Start der PHB-Bildungsprozesse erfolgte unmittelbar aus den Wachstumsprozessen durch Auslösung des entsprechenden Mangelzustands. Die Standardprozesse wurden diskontinuierlich durchgeführt, indem die Dosierung von Wasser und Nährlösung gestoppt und die automatische Gewichtsregelung abgestellt wurde. (Voruntersuchungen: Für Versuche mit  $D=0,04 \text{ h}^{-1}$  wurde die entsprechende Menge für Nährlösung und Wasser eingestellt.)

- Ammoniumstickstoffmangel: Zusätzlich wurde die Regelung des pH-Wertes von Ammoniaklösung auf Natronlauge umgestellt.
- Alle anderen Mangelbedingungen (Phosphat, Kalium, Schwefel, Magnesium, Eisen, Mangan): Der pH-Wert wurde weiterhin mit Ammoniaklösung geregelt. Um nur den Einfluß des entsprechenden Ions zu erfassen, wurden modifizierte Nährlösungskonzentrate hergestellt (analog dem Standardrezept, jedoch ohne das entsprechende Salz) und diese bei Bedarf manuell über eine Schleuse während des Prozesses zugesetzt. Bedingt durch die hohe Konzentration der Lösung mußten nur geringe Mengen zugesetzt werden, so daß die Volumenerhöhung vernachlässigt werden konnte (UD 5: 2–4 ml, UD 50: 20–40 ml). Als Richtwert für die zu dosierende Menge diente auch hier ein Überschuß für den Zuwachs von  $2 \text{ gX l}^{-1}$ . Referenzwert war dafür die Phosphat-Phosphorkonzentration (ca.  $40 \text{ mg l}^{-1}$ ), in Prozessen mit Phosphormangel jedoch die Magnesiumkonzentration (Vorgabe  $5 \text{ mg l}^{-1}$ ).

Für Prozesse im UD 50 wurde bei Bedarf die Gewichtsregelung bei  $V_L=45 \text{ l}$  wieder eingestellt, um eine Überfüllung des Reaktors zu vermeiden. Das ablaufende Produkt wurde quantitativ erfaßt.

## 3.2 **Prozeßkontrolle**

Die Analyse von Gaszusammensetzung, pH-Wert und Gelöstsauerstoffkonzentration erfolgte kontinuierlich; die Bestimmung der weiteren charakteristischen Kenngrößen stündlich.

### 3.2.1 *ONLINE-ANALYSEN*

#### 3.2.1.1 Zusammensetzung der Ein- und Ausgangsgase

Die Analyse der Ein- und Ausgangsgase erfolgte getrennt und alternierend, wobei die Meßzyklen der Geräte jeweils ca. 3 min betragen. Dieses Verfahren diente als Standardmethode.

|                                      |             |                                 |
|--------------------------------------|-------------|---------------------------------|
| $\text{O}_2$ -Analyse:               | Meßprinzip: | paramagnetisch                  |
|                                      | Gerät:      | Magnos 6G, Fa. Hartmann & Braun |
| $\text{CH}_4, \text{CO}_2$ -Analyse: | Meßprinzip: | Infrarotabsorption              |
|                                      | Gerät:      | Uras 10 P, Fa. Hartmann & Braun |

Die Kalibrierung der Geräte erfolgt jeweils vor Versuchsbeginn mit verschiedenen Kalibriergasen der Firma AGA folgender Zusammensetzung:

- |   |  |
|---|--|
| a) O <sub>2</sub> und CO <sub>2</sub> in Stickstoff:  | O <sub>2</sub> =15,3 %, CO <sub>2</sub> =3,7 %   |
| b)  | O <sub>2</sub> =0,96 %, CO <sub>2</sub> =0,07 %  |
| c)  | O <sub>2</sub> = 2,0 %, CO <sub>2</sub> =0,7 %   |
| d) CH <sub>4</sub> und CO <sub>2</sub> in Stickstoff: | CH <sub>4</sub> =35,2 %, CO <sub>2</sub> =10,7 % |
| e)  | CH <sub>4</sub> =18,3 %, CO <sub>2</sub> =2,9 %  |

Bei zusätzlichen Analysen mittels Massenspektrometer wurde das Eingangsgas ca. 1 min und das Abgas ca. 5 min analysiert.

Messung CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar:                      Quadrupolmassenspektrometer  
(QMG 421 C, Fa. BALZERS)

Die Kalibrierung des QMS erfolgte jeweils vor Versuchsbeginn mit zertifizierten Gasen der Firma AGA:

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| a) Methan in Argon:                    | CH <sub>4</sub> = 20,1 %           |
| b) Sauerstoff und Argon in Stickstoff: | O <sub>2</sub> =20,3 %, Ar = 9,2 % |
| c) Kohlendioxid in Argon:              | CO <sub>2</sub> =10,2 %            |

### 3.2.1.2            pH-Wert

Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer drucküberlagerten pH-Elektrode (Fermotrode 250 Spezial, p<sub>max</sub>=6 bar) der Firma Hamilton gemessen. Die Kalibrierung erfolgte unmittelbar vor Versuchsbeginn mit pH-Pufferlösungen (Mettler Toledo) von 4,00 und 7,01 bei Raumtemperatur.

### 3.2.1.3            Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration

Die Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration erfolgte mit einer Elektrode (InPro 6100/320/S/P) der Firma Mettler Toledo. Die Kalibrierung wurde bei einer Temperatur von 38°C und Normaldruck durchgeführt. Durch Begasung mit Stickstoff bzw. Luft (je 20 min, 5 bzw. 50 l min<sup>-1</sup>) wurde der Nullpunkt bzw. der Wert für 100 % Sättigung definiert.

## 3.2.2 OFF-LINE-ANALYSEN

### 3.2.2.1 Biomassekonzentration

#### a) Trübungsmessung

Routinemäßig erfolgte die Bestimmung der Biomassekonzentration durch Extinktionsmessung gegen demin. H<sub>2</sub>O bei 600 nm. Die Proben wurden so verdünnt, daß die Extinktion zwischen 0,1 und 0,8 lag. Es wurde ein Spekol 11 (Fa. Carl Zeiss Jena) bzw. Spekol 1100 (Fa. Jena Analytik) verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibrierung mit gravimetrischen Vergleichswerten. Die folgenden Kalibrierungen gelten für Spekol 11 (Abb. 3-1a) bzw. Spekol 1100 (Abb. 3-1b).

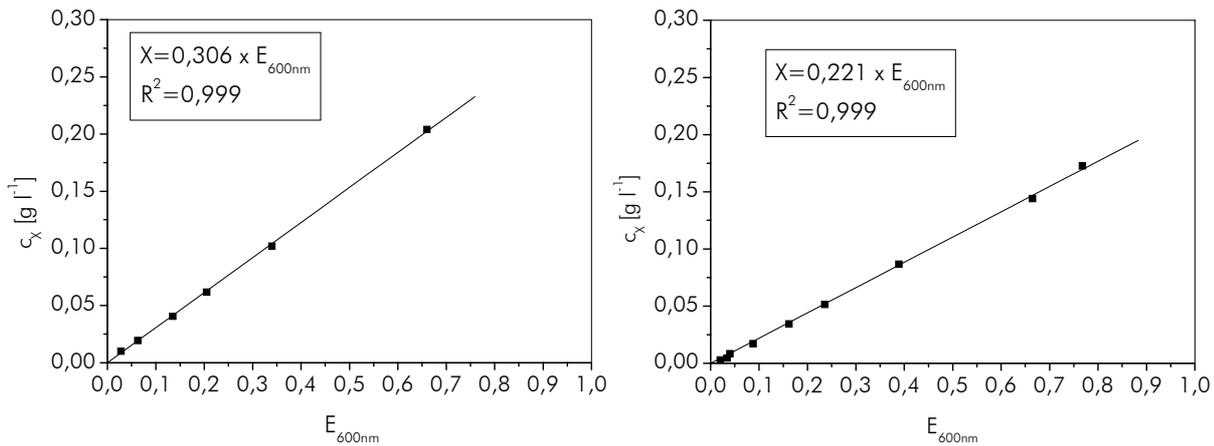


Abb. 3-1: Kalibrierfunktion: Extinktion (600 nm) gegen Biomassekonzentration  
 a) für Spekol 11 b) für Spekol 1100

#### b) gravimetrische Bestimmung

Während der PHB-Bildungsphase wurde die Biomassekonzentration stündlich gravimetrisch ermittelt. Dazu wurden 50 ml der Probe 20 min bei  $14\,000\text{ min}^{-1}$  und  $15\text{ °C}$  zentrifugiert (Kühlzentrifuge 3 K 18, Fa. Sigma), der Überstand für weitere Analysen aufbewahrt und das Sediment bei  $105\text{ °C}$  bis zur Gewichtskonstanz (36–48 h, Umlufttrockenschrank, Fa. Heraeus) getrocknet.

#### 3.2.2.2 Ammonium-Stickstoff-Konzentration

5 ml des klaren Zentrifugates wurden mit 10 ml demin.  $\text{H}_2\text{O}$  in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 2–3 Tropfen Phenolphthalein versetzt. Nach Titration mit  $0,05\text{ M KOH}$  bis zum Farbumschlag von farblos nach rosa erfolgte die Zugabe von 5 ml Formaldehyd (Fa. Merck, min. 35 %, reinst) und Rücktitration bis zum Umschlag von farblos nach rosa. Der Verbrauch an  $\text{KOH}$  zur Rücktitration wurde mit Gleichung 3.3 in Ammonium-Stickstoff umgerechnet. Als Blindwert diente ein mit 15 ml demin.  $\text{H}_2\text{O}$  bestimmter Wert.

$$\text{NH}_4\text{-N} = \frac{M_{\text{Stickstoff}} \cdot (V_{\text{KOH, Probe}} - V_{\text{KOH, BW}}) \cdot c_{n, \text{KOH}} \cdot 1000}{V_{\text{Probe}}} = (V_{\text{KOH, Probe}} - V_{\text{KOH, BW}}) \cdot 140 \quad (3.3)$$

[mg l<sup>-1</sup>]

[modifiziert nach JANDER und BLASIUS 1962]

#### 3.2.2.3 Phosphat-Phosphor-Konzentration

1 ml des klaren Zentrifugates wurde in einem 25 ml Maßkolben mit 5 ml Vanadat-Molybdat-Reagenz zur Phosphatbestimmung (Fa. Merck) versetzt und mit demin.  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion der gelb gefärbten Lösung bei 435 nm gegen den Nullwert (5 ml VM-Reagenz in 25 ml-Maßkolben, aufgefüllt mit demin.  $\text{H}_2\text{O}$ ) (Spekol 11, Fa. Carl Zeiss Jena bzw. Spekol 1100, Fa. Jena Analytik). Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Kalibrierung mit Lösungen bekannter Konzentration erstellt (Abb.3-2a) Spekol 11, (Abb. 3-2b) Spekol 1100.

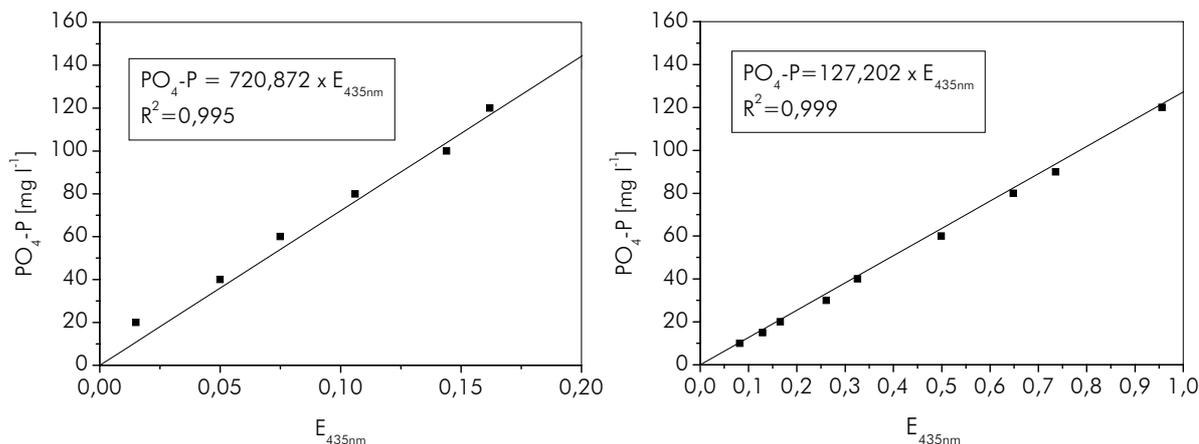


Abb. 3-2: Kalibrierfunktion: Extinktion (436 nm) gegen Phosphat-Phosphorkonzentration  
 a) für Spekol 11  
 b) für Spekol 1100

#### 3.2.2.4 Kupferkonzentration

Die Bestimmung der Kupferkonzentration in der Kulturflüssigkeit erfolgte mit einem kommerziellen Küvettentest (LCK 329, Fa. Dr. Lange). Untersucht wurde das klare Zentrifugat nach Filtration (0,2  $\mu\text{m}$  Spritzenvorsatz). Die Messung erfolgte mit einem Spektralphotometer (CADAS 100, LPG 210, Fa. Dr. Lange) in einem Meßbereich von 0,1 bis 8  $\text{mg Cu l}^{-1}$ .

### 3.3 Methoden zur Charakterisierung der PHB-Akkumulation

#### 3.3.1 NILROT-FÄRBUNG

1 ml der auf  $E_{600\text{nm}} = 1$  verdünnten Probe wurde nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  10 % (m/v) Natriumazidlösung und 40  $\mu\text{l}$  einer frisch zubereiteten Lösung von 1 mg Nilrot in 1 ml Aceton eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Ein bei 35–40 °C hitzefixiertes mikroskopisches Präparat dieser Probe wurde zur Beurteilung der Fluoreszenzintensität bei Blauanregung (Filter B2) an einem Durchlichtmikroskop (Optiphot X-2, Fa. Nikon) betrachtet [modifiziert nach FOWLER und GREENSPAN 1985].

#### 3.3.2 PHB-SCHNELLBESTIMMUNG MIT NATRIUMHYPOCHLORIT

0,2 ml Biomassensuspension wurden in ein Reagenzglas pipettiert, mit 4,8 ml Natriumhypochloritlösung (12 % freies Chlor, Fa. ROTH) versetzt und 40 min bei 38 °C inkubiert. Die Messung der Extinktion der Probe erfolgte bei 436 nm (Spekol 11, Fa. Carl Zeiss Jena) gegen den Blindwert (0,2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  + 4,8 ml Natriumhypochlorit) [modifiziert nach WILLIAMSON und WILKINSON 1958].

#### 3.3.3 GASCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DES PHB-GEHALTES

Die Analyse des PHB-Gehaltes erfolgte nach der Methode von RIIS und MAI (1988). 40 mg getrocknete und gemahlene Biomasse wurden in einem 10 ml-Probefläschchen eingewogen, 2 ml 1,2-Dichlorethan (LiChrosolv<sup>®</sup>, Fa. Merck), 2 ml salzsaure Propanollösung (1-Propanol

(p.A., Fa. Merck), HCl (32 % p.A., Fa. Merck) Verhältnis 4:1 (v/v)) und 200  $\mu\text{l}$  interner Standard (2 % (m/v) Benzoesäure (p.A., Fa. Merck) in Propanol) zugegeben, mit einem teflonbeschichtetem Septum verschlossen und 1 min kräftig geschüttelt. Nach 2 h Inkubation bei 100 °C und Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 4 ml demin.  $\text{H}_2\text{O}$  zugefügt und die Mischung ausgeschüttelt (ca. 2 min). Aus der organischen Phase wurde 1 ml entnommen und zur gaschromatographischen Analyse der gebildeten Propylester in entsprechende Autosampler-Gefäße überführt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Zur gaschromatographischen Analyse (GC-System HP 6890: Gaschromatograph G1530A, GC-Autosampler G 1512AX, Fa. Hewlett-Packard) wurde 1  $\mu\text{l}$  Probe injiziert (Injektortemperatur: 250 °C, Split 200:1, Trägergas: Helium 250  $\text{ml min}^{-1}$ ) und auf einer Kapillarsäule HP-5 (HP 19091J-413, Abmessungen 30 m  $\times$  320  $\mu\text{m}$   $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ , Fa. Hewlett-Packard) mit folgendem Temperaturprogramm getrennt: 2 min bei 60°C, Aufheizen mit 20°C  $\text{min}^{-1}$  auf 180°C, 8 min bei 180°C. Die Detektion erfolgte mittels FID (Temperatur: 250°C, Wasserstoff: 40  $\text{ml min}^{-1}$ , Luft: 400  $\text{ml min}^{-1}$ , *make up*-Gas: Stickstoff: 20  $\text{ml min}^{-1}$ ).

Die Identifizierung erfolgte über die Retentionszeit im Vergleich zu PHB-Standards (Fa. ICN Biochemicals). Zur quantitativen Bestimmung von PHB wurden Doppelbestimmungen von vier verschiedenen Proben reiner PHB unter den oben beschriebenen Bedingungen vorgenommen. Mit diesen Werten wurden Kalibrierfunktionen erstellt, deren Korrelationskoeffizienten  $R^2$  stets über 0,99 lagen. Für jede Versuchsreihe wurde zusätzlich zu den Proben ein PHB-Standard zur Kontrolle analysiert.

### 3.4 Bilanzierung der Wachstumsprozesse

Die Erstellung der Bilanzgleichungen erfolgt auf der Basis allgemeingültiger Erhaltungssätze für Masse und Volumen. Während der kontinuierlichen Wachstumsphase wird der Bioreaktor als idealer Rührreaktor mit Durchfluß (*CSTR-continuous stirred tank reactor*) angesehen. Weiterhin kann für schwerlösliche Gase die Akkumulation in der Flüssigkeit vernachlässigt werden, daher sind Stoffübergangsraten gleich den Stoffverbrauchsraten- bzw. Bildungsraten.

Grundlegende Parameter für die Erstellung der Gasbilanzen sind die Meßwerte für Methan, Sauerstoff und Kohlendioxid ( $x_{i,0}$ ,  $x_{i,1}$ ) im Eingangs- und Abgas sowie das zugeführte Gesamtgas ( $F_{G,0}$ ). Das Gesamtvolumen des Abgases ( $F_{G,1}$ ) wird nicht meßtechnisch erfaßt, daher über die Bilanz eines Inertgases wie Stickstoff oder Argon bestimmt und als Faktor  $\gamma_{IG}$  in der Bilanz berücksichtigt.

- Berechnung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit

$$\text{OUR} = \rho_{\text{O}_2} \cdot F_{G,0} \cdot (x_{\text{O}_2,0} - x_{\text{O}_2,1} \cdot \gamma_{IG}) \quad [\text{g h}^{-1}] \quad (3.4)$$

mit  $\rho_{\text{O}_2} = 1,4286 \text{ g l}^{-1}$

- Inertgasverhältnis:

$$\gamma_{IG} = \frac{x_{IG,0}}{x_{IG,1}} \quad (3.5)$$

bei Gasanalysen mit Standardmethode:

$$\gamma_{IG} = \frac{1 - x_{O_2,0} - x_{CH_4,0}}{1 - x_{O_2,1} - x_{CH_4,1} - x_{CO_2,1}} \quad (3.6)$$

- Berechnung der spezifischen Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit (volumenbezogen):

$$r_{O_2} = \frac{OUR}{V_L} \quad [g \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (3.7)$$

- Berechnung der Methanverbrauchsgeschwindigkeit:

$$MUR = \rho_{CH_4} \cdot F_{G,0} \cdot (x_{CH_4,0} - x_{CH_4,1} \cdot \gamma_{IG}) \quad [g \text{ h}^{-1}] \quad (3.8)$$

mit  $\rho_{CH_4} = 0,7143 \text{ g l}^{-1}$

- Berechnung der spezifischen Methanverbrauchsgeschwindigkeit (volumenbezogen):

$$r_{CH_4} = \frac{MUR}{V_L} \quad [g \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (3.9)$$

- Berechnung der Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit:

$$CPR = \rho_{CO_2} \cdot F_{G,0} \cdot (x_{CO_2,1} \cdot \gamma_{IG}) \quad [g \text{ h}^{-1}] \quad (3.10)$$

mit  $\rho_{CO_2} = 1,9643 \text{ g l}^{-1}$

- Berechnung der spezifischen Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit (volumenbezogen):

$$r_{CO_2} = \frac{CPR}{V_L} \quad [g \text{ h}^{-1}] \quad (3.11)$$

- Die Produktivität der Biomassebildung wurde wie folgt berechnet:

$$r_X = D \cdot c_X \quad [g \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (3.12)$$

$$D = \frac{\sum F_{L,0}}{V_L} \quad [h^{-1}] \quad (3.13)$$

- Die Gesamtausbeuten für die Bildung von Biomasse ergeben sich zu:

$$Y_{X/O_2} = \frac{r_X}{r_{O_2}} \quad [g \text{ g}^{-1}] \quad (3.14)$$

$$Y_{X/CH_4} = \frac{r_X}{r_{CH_4}} \quad [g \text{ g}^{-1}] \quad (3.15)$$

$$Y_{X/CO_2} = \frac{r_X}{r_{CO_2}} \quad [g \text{ g}^{-1}] \quad (3.16)$$

### 3.5 Bilanzierung des Produktbildungsprozesses

Während des PHB-Bildungsprozesses wurde die Prozeßführung variiert. Da unter bestimmten Bedingungen das Reaktorvolumen nicht konstant war, wurden die Bilanzen über die absoluten

Massen erstellt. Zur Berechnung der Gesamtmengen wurden die zu diskreten Zeitpunkten ermittelten Gasreaktionsraten über den Versuchsverlauf numerisch integriert (nach Simpson-Regel).

Der während der PHB-Akkumulation verbrauchte Sauerstoff, das verbrauchte Methan sowie das gebildete Kohlendioxid wurden nach folgenden Beziehungen ermittelt:

➤ Sauerstoff

$$m_{\text{O}_2}(t_k) = \int_0^{t_k} \text{OUR}(t) dt \quad [\text{g}] \quad (3.17)$$

$$m_{\text{O}_2}(t_k) \approx \sum_{n=1}^k [\text{OUR}(t_{n-1}) + 4 \cdot \text{OUR}(t_n) + \text{OUR}(t_{n+1})] / 6 \cdot (t_{n+1} - t_{n-1}) \quad [\text{g}] \quad (3.18)$$

$$\text{mit: } \text{OUR}(t_n) = \rho_{\text{O}_2} \cdot F_{\text{G},0}(t_n) \cdot [x_{\text{O}_2,0}(t_n) - x_{\text{O}_2,1}(t_n) \cdot \gamma_{\text{IG}}(t_n)] \quad [\text{g h}^{-1}] \quad (3.19)$$

➤ Methan

$$m_{\text{CH}_4}(t_k) = \int_0^{t_k} \text{MUR}(t) dt \quad [\text{g}] \quad (3.20)$$

$$m_{\text{CH}_4}(t_k) \approx \sum_{n=1}^k [\text{MUR}(t_{n-1}) + 4 \cdot \text{MUR}(t_n) + \text{MUR}(t_{n+1})] / 6 \cdot (t_{n+1} - t_{n-1}) \quad [\text{g}] \quad (3.21)$$

$$\text{mit: } \text{MUR}(t_n) = \rho_{\text{CH}_4} \cdot F_{\text{G},0}(t_n) \cdot \{x_{\text{CH}_4,0}(t_n) - x_{\text{CH}_4,1}(t_n) \cdot \gamma_{\text{IG}}(t_n)\} \quad [\text{g h}^{-1}] \quad (3.22)$$

➤ Kohlendioxid (bei konstantem pH-Wert)

$$m_{\text{CO}_2}(t_k) = \int_0^{t_k} \text{CPR}(t) dt \quad [\text{g}] \quad (3.23)$$

$$m_{\text{CO}_2}(t_k) \approx \sum_{n=1}^k \{\text{CPR}(t_{n-1}) + 4 \cdot \text{CPR}(t_n) + \text{CPR}(t_{n+1})\} / 6 \cdot (t_{n+1} - t_{n-1}) \quad [\text{g}] \quad (3.24)$$

$$\text{mit: } \text{CPR}(t_n) = \rho_{\text{CO}_2} \cdot F_{\text{G},0}(t_n) \cdot \{x_{\text{CO}_2,1}(t_n) \cdot \gamma_{\text{IG}}(t_n)\} \quad [\text{g h}^{-1}] \quad (3.25)$$

In der Gesamtmenge der akkumulierten PHB wurden die stündlich entnommenen Probenmengen (UD 5:  $V_{\text{Probe}} = 60 \text{ ml}$ , UD 50:  $V_{\text{Probe}} = 100\text{--}300 \text{ ml}$ ) folgendermaßen berücksichtigt: zum Zeitpunkt  $t_i$  wird eine Probe mit dem Volumen  $V_{\text{Probe}}(t_i)$  und der Konzentration  $c_{\text{PHB}}(t_i)$  entnommen, folglich ist die enthaltene PHB-Menge:

$$m_{\text{PHB,Probe}}(t_i) = V_{\text{Probe}}(t_i) \cdot c_{\text{PHB}}(t_i) \quad [\text{g}] \quad (3.26)$$

und die bis zum Zeitpunkt  $t=t_m$  entnommene PHB-Menge:

$$m_{\text{PHB,Probe}}(t_m) = \sum_{i=1}^m V_{\text{Probe}}(t_i) \cdot c_{\text{PHB}}(t_i) \quad [\text{g}] \quad (3.27)$$

In diskontinuierlichen Prozessen mit Volumenzunahme wurde das Volumen bei Erreichen von  $V_L = 45$  l bei diesem Wert automatisch konstant gehalten und der Ablauf ( $\dot{V}_A$ ) berücksichtigt. Die Gesamtmenge der akkumulierten PHB mit Probenahme und ablaufender PHB-Menge ergibt sich:

$$\text{➤ } m_{\text{PHB}}(t_k) = c_{\text{PHB}}(t_k) \cdot V_L(t_k) + \int_0^{t_k} c_{\text{PHB}}(t) \cdot \dot{V}_A(t) dt + \sum_{i=1}^m (c_{\text{PHB}}(t_i) \cdot V_{\text{Probe}}(t_i)) \quad [\text{g}] \quad (3.28)$$

wobei:  $t_m \leq t_i$

$$\text{mit: } \int_0^{t_k} c_{\text{PHB}}(t) \cdot \dot{V}_A(t) dt \approx \sum_{n=1}^k \{c_{\text{PHB}}(t_{n-1}) + 4 \cdot c_{\text{PHB}}(t_n) + c_{\text{PHB}}(t_{n+1})\} / 6 \cdot (t_{n+1} - t_{n-1}) \quad [\text{g}] \quad (3.29)$$

Die gleiche Verfahrensweise wurde für die Berechnung der Gesamtbiomassekonzentration angewendet:

$$\text{➤ } m_X(t_k) = c_X(t_k) \cdot V_L(t_k) + \int_0^{t_k} c_X(t) \cdot \dot{V}_A(t) dt + \sum_{i=1}^m (c_X(t_i) \cdot V_{\text{Probe}}(t_i)) \quad [\text{g}] \quad (3.30)$$

wobei:  $t_m \leq t_i$

$$\text{mit: } \int_0^{t_k} c_X(t) \cdot \dot{V}_A(t) dt \approx \sum_{n=1}^k \{c_X(t_{n-1}) + 4 \cdot c_X(t_n) + c_X(t_{n+1})\} / 6 \cdot (t_{n+1} - t_{n-1}) \quad [\text{g}] \quad (3.31)$$

Die spezifische PHB-Bildungsrate errechnet sich aus der zeitlichen Änderung der PHB-Gesamtmenge und der entsprechenden Menge an aktiver Biomasse  $m_R$ . Dazu wurde für die Gesamtmengen  $m_X$  und  $m_{\text{PHB}}$  eine nichtlineare Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (NLSF, ORIGIN®, Microcal) auf der Grundlage einer logistischen Funktion durchgeführt und die gefundene Funktion abgeleitet.

$$\text{➤ } q_{\text{PHB}}(t) = \frac{1}{m_R(t)} \cdot \frac{dm_{\text{PHB}}}{dt} \quad [\text{g PHB gR}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (3.32)$$

$$\text{mit } m_R(t) = m_X(t) - m_{\text{PHB}}(t) \quad [\text{g}] \quad (3.33)$$

Die mittlere spezifische Bildungsrate :

$$\text{➤ } q_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-k)}(t_k) = \frac{1}{\overline{m_R}} \cdot \frac{m_{\text{PHB}}(t_k) - m_{\text{PHB}}(t_0)}{t_k - t_0} \quad [\text{g PHB gR}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (3.34)$$

$$\text{mit } \overline{m_R} = \frac{m_R(t_k) + m_R(t_0)}{2} \quad [\text{g}] \quad \text{und } t_0 = 0 \quad (3.35)$$

Die Produktivität der PHB-Bildung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{➤ } r_{\text{PHB}}(t) = \frac{1}{V_L(t)} \cdot \frac{dm_{\text{PHB}}}{dt} \quad [\text{g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (3.36)$$

sowie die mittlere Produktivität:

$$\triangleright r_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-k)}(t_k) = \frac{1}{\bar{V}_L} \cdot \frac{m_{\text{PHB}}(t_k) - m_{\text{PHB}}(t_0)}{t_k - t_0} \quad [\text{g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (3.37)$$

$$\text{mit } \bar{V}_L = \frac{V_L(t_k) - V_L(t_0)}{2} \quad [l] \quad \text{und } t_0 = 0 \quad (3.38)$$

In der Berechnung der Ausbeuten für die PHB-Synthese wurde der ermittelte Gesamtverbrauch um die Menge korrigiert, die für die Bildung von Biomasse (R) mit einem mittleren Bedarfswert von  $1/Y_{X/i}$  benötigt wird:

$$m_{i,X} = m_{i,\text{PHB}} + m_{i,R} \quad \text{bzw.} \quad m_{i,\text{PHB}} = m_i - m_{i,R} \quad (3.39)$$

$$m_{i,\text{PHB}} = m_{i,X} - \frac{m_R(t_k) - m_R(t_0)}{Y_{X/i}} \quad [g] \quad (3.40)$$

$$\text{bzw.} \quad m_{i,\text{PHB}}(t_k) = m_{i,X}(t_k) - \frac{m_R(t_k) - m_R(t_0)}{Y_{X/i}} \quad [g] \quad (3.41)$$

$\triangleright$  Ausbeute bezüglich des Sauerstoffverbrauchs für die PHB-Bildung:

$$Y_{\text{PHB}/\text{O}_2}(t_k) = \frac{m_{\text{PHB}}(t_k) - m_{\text{PHB}}(t_0)}{m_{\text{O}_2,\text{PHB}}(t_k)} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (3.42)$$

$\triangleright$  Ausbeute bezüglich des Methanverbrauchs für die PHB-Bildung:

$$Y_{\text{PHB}/\text{CH}_4}(t_k) = \frac{m_{\text{PHB}}(t_k) - m_{\text{PHB}}(t_0)}{m_{\text{CH}_4,\text{PHB}}(t_k)} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (3.43)$$

$\triangleright$  Ausbeute bezüglich Kohlendioxidbildung für PHB-Synthese:

$$Y_{\text{PHB}/\text{CO}_2}(t_k) = \frac{m_{\text{PHB}}(t_k) - m_{\text{PHB}}(t_0)}{m_{\text{CO}_2,\text{PHB}}(t_k)} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad (3.44)$$

### 3.6 Weiterführende Analysen der Kulturflüssigkeit

#### 3.6.1 BESTIMMUNG VON IONEN IN DER KULTURFLÜSSIGKEIT

##### a) Ionenchromatographie

Ausgewählte Proben wurden mittels Ionenchromatographie (DX 100, Fa. Dionex) untersucht. Es wurden jeweils die klaren Überstände der Zentrifugation (15 min,  $14\,000 \text{ min}^{-1}$ ) verwendet und folgende Ionen analysiert:

Anionen: Chlorid, Nitrit, Nitrat, Phosphat, Sulfat;

Kationen: Natrium, Ammonium, Kalium, Magnesium, Calcium.

(UFZ, Sektion Sanierungsforschung)

### b) Atomemissionsspektroskopie (AES)

Weitere Analysen zur Ermittlung der Konzentrationen von Eisen-, Kupfer- und Kaliumionen in der Kulturflüssigkeit wurde mittels ICP-AES (Spektrorflame, Fa. Spectro Analytical Instruments) vorgenommen (UFZ, Sektion Analytik).

### 3.6.2 CHEMISCHER SAUERSTOFFBEDARF (CSB)

Der chemische Sauerstoffbedarf wurde als Maß für die in der Kulturflüssigkeit vorhandenen Stoffwechselprodukte (als organischer Kohlenstoff) bestimmt. Für die Analyse wurde der Überstand der 15 min bei 14 000 min<sup>-1</sup> zentrifugierten und gegebenenfalls filtrierten (0,2 µm Spritzenvorsatz) Proben verwendet. Entsprechend der Analysenvorschrift wurden Küvettentests der Fa. Dr. Lange in drei verschiedenen Bereichen verwendet: LCK 514 (100–2000 mg l<sup>-1</sup>), LCK 314 (10–150 mg l<sup>-1</sup>) bzw. LCK 014 (1000–10000 mg l<sup>-1</sup>). Die Auswertung erfolgte mit einem Spektralphotometer (CADAS 100, LPG 210, Fa. Dr. Lange).

### 3.6.3 BESTIMMUNG DER RESTSALZKONZENTRATION

Die Restsalzkonzentration wurde als Trockenrückstand bestimmt. Dazu wurden 20 ml des klaren Überstandes in einen ausgewogenen Porzellan-Tiegel pipettiert, bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C getrocknet, ausgewogen und in g l<sup>-1</sup> umgerechnet.

### 3.6.4 KINEMATISCHE VISKOSITÄT DER KULTURFLÜSSIGKEIT

Die kinematische Viskosität wurde vom Überstand (nach Zentrifugation der Biomassesuspension für 20 min bei 10 000 min<sup>-1</sup>) durch automatische Messung der Laufzeit (Viskoclock, Fa. Schott) im Mikro-Ubbelohde-Viskosimeter (Typ 53613/1 c, Fa. Schott), das bei 25°C temperiert wurde (Thermostat B2 E11, Fa. Medingen), bestimmt. Die Berechnung der kinematischen Viskosität erfolgte aus dem Mittelwert der Laufzeiten von min. 5 Messungen (nach Hagenbach-Korrektur lt. Angaben des Herstellers) und der Gerätekonstanten des verwendeten Viskosimeters ( $K_{\text{visko}}$ ).

$$\eta_{\text{kin}} = \bar{t} \cdot K_{\text{visko}} \quad [\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}] \quad (3.45)$$

## 3.7 Analyse der Biomassezusammensetzung

### 3.7.1. ELEMENTARANALYSE (CHN-BESTIMMUNG)

Das CHN-Verhältnis der getrockneten, homogenisierten Biomasseproben wurde mittels CHN-Analysator CHN 1000 der Firma Leco bestimmt (UFZ, Sektion Analytik).

### 3.7.2 BESTIMMUNG VON PHOSPHOR, SCHWEFEL, KALIUM UND MAGNESIUM IN DER BIOMASSE

Die Ermittlung der Konzentrationen von Phosphor, Schwefel, Kalium und Magnesium in der Biomasse erfolgte nach Mikrowellen-Aufschluß mittels ICP-AES (UFZ, Sektion Analytik).

### 3.7.3 SCHWERMETALLGEHALT

Die Bestimmung erfolgte massenspektrometrisch durch ICP-MS (ELAN 5000, Fa. Perkin-Elmer). Folgende Elemente wurden detektiert: Cadmium, Chrom, Cobalt, Kupfer, Eisen, Mangan, Nickel, Blei, Zink (UFZ, Sektion Analytik).

### 3.7.4 ANALYSE DER FETTSÄUREMETHYLESTER (FAME)

#### 3.7.4.1 Extraktion und Veresterung der Fettsäuren

Zur Gewinnung der FAME's der Gesamtfettsäuren (=freie Fettsäuren+Membranlipide) wurden ca. 10 mg der getrockneten und homogenisierten Biomasseprobe einer Umesterung unter sauren Bedingungen unterzogen. Dazu wurden 200  $\mu$ l TMCS (Fa. Supelco) und 1,8 ml Methanol (p.A., Fa. Merck) zugegeben und der Ansatz im Trockenschrank 2 h bei 70 °C inkubiert. Nach Abdampfen des Methanols mit Stickstoff wurde der Rückstand in Diethylether aufgenommen (p.A. Fa. Merck) und dieser Extrakt mittels einer Kieselsäule (Silicagel 100) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels durch Abblasen mit Stickstoff wurde der Rückstand in 50  $\mu$ l Dichlorethan (LiChrosolv®, Fa. Merck) aufgenommen und analysiert [modifiziert nach THIEL et al. 2001].

#### 3.7.4.2 Analyse der FAME's mittels Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS)

Zur Bestimmung der FAME's wurden je 1  $\mu$ l Probe in das GC-MS-System (HP 6890-GC mit HP 5973 MS-Detektor) injiziert (Injektortemperatur: 220°C, Transferline-Temperatur: 225°C, Split: 40:1, Trägergas Helium 2 ml min<sup>-1</sup>) und auf einer Kapillarsäule (CP-Sil 88, Abmessungen 50 m  $\times$  320  $\mu$ m  $\times$  0,2  $\mu$ m, Fa. Chrompack) mit folgendem Temperaturprogramm getrennt: 4 min bei 120°C, Aufheizen mit 4°C min<sup>-1</sup> auf 190°C und mit 20°C min<sup>-1</sup> auf 225°C, 3 min bei 225°C. Die Detektion erfolgte mittels MS: Ionisierung mit QI=70 eV, Quelltemperatur: 230°C, Quadrupoltemperatur: 150°C).

Die Identifizierung erfolgte durch den Vergleich der Massenspektren mit der Spektrenbibliothek (Kettenlänge und Sättigungsgrad) und mit Hilfe der Retentionszeiten im Vergleich zu kommerziellen Standards (Fa. Sigma; C15:0, C16:0, C16:1 $\omega$ 7t, C16:1 $\omega$ 7c, C18:0, C18:1 $\omega$ 9t, C18:1 $\omega$ 7c, C18:1 $\omega$ 7t; Lage der Doppelbindung, *cis-trans*-Isomerie). Die C18:1 $\omega$ 8c-Fettsäure wurde nach Derivatisierung mit Dimethyldisulfid anhand der Massenspektren identifiziert [modifiziert nach WIDMER et al. 2001].

#### 3.7.4.3 Bestimmung der <sup>13</sup>C-Isotopenwerte der Fettsäuren

Die Analysen wurden mit einem GC-C-IRMS-System, bestehend aus einem GC (HP-5890) mit GC-combustion-Interface (Fa. Finnigan, Bremen) und einem Isotopen-MS (MAT 252, Fa. Finnigan), in der Sektion Sanierungsforschung des UFZ analysiert. Nach Injektion (Modus: *hot on column, splitless*, Injektortemperatur 280°C) erfolgte die Trennung auf einer Kapillarsäule (BPX-5, Abmessungen 50 m  $\times$  320  $\mu$ m  $\times$  0,5  $\mu$ m, Fa. SGE, Darmstadt) mit folgendem Temperaturprogramm: 4 min bei 80°C, Aufheizen mit 4°C min<sup>-1</sup> auf 300°C, 15 min bei 300°C.

### 3.8 Methoden zur Gewinnung und Charakterisierung des Polymers

#### 3.8.1 AUFARBEITUNG UND TROCKNUNG DER PHB-HALTIGEN BIOMASSE

Proben zur Extraktion des Polymers wurden während und nach Beendigung der Experimente entnommen, in entsprechende Behälter gefüllt und bis zur Aufarbeitung bei 4 °C gelagert. Die Aufarbeitung des Bioreaktorinhaltes UD 5 (gesamter Inhalt) sowie bei Experimenten im UD 50 (5 l des Inhaltes je Ansatz) erfolgte unmittelbar nach Versuchsende durch Aufkonzentrierung in einer kontinuierlichen Zentrifuge (Contifuge 17 RS, Fa. Heraeus Sepatech). Die so erhaltene Paste stichfester Konsistenz wurde bei –20 °C eingefroren und binnen 60–80 h gefriergetrocknet (Gefrier Trockner Modulo 4K, Fa. Edwards). Nach abschließender Mahlung lag die Biomasse als pulverförmige Substanz vor und wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### 3.8.2 EXTRAKTION DES POLYMERS

Als Standardmethode zur Gewinnung der PHB zur Charakterisierung der Eigenschaften wurde die Extraktion mit 1,2-Dichlorethan nach folgendem Schema durchgeführt:

Die Biotrockenmasse ( $m_{X(\text{Einwaage})} = 5\text{--}15\text{ g}$ ) wurde zur Vorextraktion mit 20 ml Methanol/Wasser (4:1 (v/v)) pro Gramm Biomasse aufgenommen und für eine Stunde bei 50 °C extrahiert (Rührbad-Thermostat, Fa. Variomag). Nach Zentrifugation (10 min, 4°C, 10000 min<sup>-1</sup>) wurde der Überstand dekantiert, das Pellet zweimal mit je 5–10 ml Methanol gründlich gewaschen und jeweils durch Zentrifugation abgetrennt. Nach Trocknung (1–3 h bei 60°C) wurde das so erhaltene Pulver im Hauptextraktionsschritt mit 16 ml 1,2-Dichlorethan pro Gramm behandelt. Zunächst wurde dieses Gemisch für min. 10 h bei Raumtemperatur gerührt (Anquellen). Die eigentliche Extraktion erfolgte dann eine Stunde bei 80 °C unter Rühren. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurde die Mischung über einen Büchnertrichter im Wasserstrahlpumpenvakuum in eine auf 60 °C vorgewärmte Saugflasche filtriert (Whatman-Filterpapier Nr.4). Das Filtrieren erfolgte in kleinen Teilschritten, wobei die Lösung gegebenenfalls erneut erwärmt oder verdünnt werden mußte (Problem der hohen Viskosität). Die so erhaltene Lösung wurde zur Fällung der PHB in dünnem Strahl in das vierfache Volumen einer Methanol/Wasser-Mischung (4:1 (v/v)) gegossen, die Suspension aufgerührt und filtriert (Büchner-Trichter, Whatman-Filterpapier Nr.4, Wasserstrahlpumpe). Das Polymer wurde hierauf mit so viel Methanol gewaschen, daß der gesamte Niederschlag bedeckt war (etwa 20 ml) und durch Filtration abgetrennt. Die abschließende Trocknung des zu kleinen Flocken zerteilten Polymers erfolgte binnen 1–2 h bei 60 °C im Trockenschrank. Das so gewonnene Material wurde gewogen ( $m_{\text{PHB}(\text{Auswaage})}$ ) und bis zur weiteren Verwendung in fest verschlossenen Gefäßen bei 4 °C aufbewahrt.

#### 3.8.3 BERECHNUNG DER EXTRAKTIONS-AUSBEUTE

Aus der theoretisch erzielbaren PHB-Menge und der Masse der extrahierten Probe wurde die Extraktionsausbeute berechnet.

$$m_{\text{PHB,theoretisch}} = \frac{m_{X(\text{Einwaage})} \cdot \text{PHB}(\%)}{100} \quad [\text{g}] \quad (3.46)$$

$$\text{EA} = \frac{m_{\text{PHB,Auswaage}}}{m_{\text{PHB,theoretisch}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (3.47)$$

### 3.8.4 VISKOSIMETRISCHE MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG

#### 3.8.4.1 Probenvorbereitung

Ca. 50 mg durch Standardextraktion gewonnene PHB wurden in einen 25 ml-Maßkolben eingewogen und mit 15 ml 2,2,2-Trifluorethanol (reinst, Fa. Merck) versetzt. Anschließend erfolgten die Inkubation der Gefäße auf einem Horizontalschüttler für 2 h bei 30°C, das Auffüllen der Lösung 2,2,2-Trifluorethanol und Filtration (Gelbrandfilter, Fa. Schleicher & Schuell, Porengröße 1 µm). Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

#### 3.8.4.2 Messung der Durchlaufzeiten

Die Durchlaufzeiten der PHB-Lösungen wurden in einem Ubbelohde-Viskosimeter (Typ 50110/l) mit automatischer Zeiterfassung (ViskoClock, Fa. Schott) durchgeführt, das sich in einem auf 25 °C temperierten Glasmantel befand (Thermostat B2 E11), mit mindestens fünf Wiederholungen bestimmt. Die Laufzeit des reinen Lösungsmittels wurde für jede Versuchsserie gemessen. Zwischen den einzelnen Analysen wurde das Viskosimeter sorgfältig gesäubert und getrocknet.

#### 3.8.4.3 Ermittlung der Polymerkonzentration der Lösung

Zweimal 10 ml der Probelösung wurden in ausgewogene Aluminiumbecher pipettiert, das Lösungsmittels abgedampft und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (60 °C, Trockenschrank). Aus der Massendifferenz erfolgte die Berechnung der Konzentration der Polymerlösung:

$$c_{\text{Lsg.}} = (m_{\text{Alu,PHB}} - m_{\text{Alu,tara}}) \cdot 100 \quad [\text{mg l}^{-1}] \quad (3.48)$$

Es wurde der arithmetische Mittelwert aus beiden Bestimmungen verwendet.

#### 3.8.4.4 Auswertung und Berechnung

Die mittleren Molekulargewichte wurden aus den Mittelwerten der gemessenen Laufzeiten (wenn erforderlich nach Hagenbach-Korrektur, Tabelle mit Richtwerten in Produktbeschreibung des Viskosimeters) sowie der ermittelten Konzentration der Polymerlösung wie folgt berechnet:

a) Bestimmung der spezifischen Viskosität -  $\eta_{\text{spez.}}$ :

$$\eta_{\text{spez.}} = \frac{\bar{t}_{\text{Lsg.}} - \bar{t}_{\text{LM}}}{\bar{t}_{\text{LM}}} \quad [-] \quad (3.49)$$

b) Berechnung der Grenzviskosität  $[\eta]$  nach der Huggins-Gleichung ( $K_{\text{Hu}}=0,35$ ):

$$[\eta] = -\frac{1}{2 \cdot K_{\text{Hu}} \cdot c_{\text{Lsg.}}} + \sqrt{\frac{1}{4 \cdot K_{\text{Hu}}^2 \cdot c_{\text{Lsg.}}^2} + \frac{\eta_{\text{spez.}}}{K_{\text{Hu}} \cdot c_{\text{Lsg.}}^2}} \quad [\text{ml mg}^{-1}] \quad (3.50)$$

- c) Berechnung des mittleren Molekulargewichtes nach Kuhn-Mark-Houwink-Beziehung (mit  $k_{Mv} = 1,21 \times 10^{-2}$ ,  $\alpha_{Mv} = 0,805$  [HUGLIN und RADWANN 1991]):

$$[\eta] = k_{Mv} \cdot \bar{M}_v^{\alpha_{Mv}} \quad [\text{ml mg}^{-1}] \quad (3.51)$$

$$\bar{M}_v = e^{14,1 + 1,25 \cdot \ln[\eta]} \quad [\text{g mol}^{-1}] \quad (3.52)$$

Das Ergebnis wurde als arithmetischer Mittelwert der Doppelbestimmungen angegeben.

### 3.8.5 MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG MIT GPC

Die GPC-Analysen wurden mit einem Hochtemperaturgerät der Firma Knauer bei 135°C mit 1,2,4-Trichlorbenzen als Eluent (1 ml min<sup>-1</sup>) an der FH Merseburg, Fachbereich Chemie und Umweltingenieurwesen, bestimmt. Es kamen vier Trennsäulen (25 cm, Ø 8 mm) zum Einsatz. Die Proben wurden viermal in Konzentrationen von 0,22–0,4 mg ml<sup>-1</sup> gemessen, als relative Standardabweichung für  $\bar{M}_w$  wurde  $\pm 5\%$  angegeben. Die Kalibrierung erfolgte mit zehn Polystyrenstandards von  $1,3 \times 10^3$ – $2,6 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup> und Konstanten der Universalkalibrierung<sup>1</sup>.

### 3.8.6 BESTIMMUNG DES STICKSTOFFGEHALTES

- a) Der Stickstoffgehalt (als CHN-Verhältnis) der PHB-Proben wurde mittels CHN-Analysator CHN 1000 der Firma Leco bestimmt (UFZ, Sektion Analytik).
- b) Der Gesamtstickstoffgehalt von PHB wurde nach DIN 38409 H27 analysiert. Die Nachweisgrenze dieser Methode war deutlich niedriger, als die der CHN-Analyse (0,04 %) (Fa. MiTec, Leuna).

### 3.8.7 SCHWERMETALLGEHALT

Die Bestimmung erfolgte massenspektrometrisch durch ICP-MS (ELAN 5000, Fa. Perkin-Elmer). Folgende Elemente wurden detektiert: Cadmium, Chrom, Cobalt, Kupfer, Eisen, Mangan, Nickel, Blei, Zink (UFZ, Sektion Analytik).

### 3.8.8 BESTIMMUNG DER BIOKOMPATIBILITÄT

Die Untersuchungen zur Biokompatibilität wurden am Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock durchgeführt [FREIER 1999b, SCHMITZ et al. 2000]. Zur Anwendung kam ein *in vitro* XTT<sup>2</sup>-Test (nach ISO 10993-5) mit Mausfibroblasten. Dabei wird das Tetrazoliumsalz XTT von lebenden Zellen enzymatisch zu orangem Formazan umgesetzt und die Absorption des zellfreien Überstandes bei 450 nm (unter Berücksichtigung der unspezifischen Absorption bei 620 nm) gemessen. Aus der Höhe des Meßwertes kann auf die metabolische Aktivität der Zellen und damit auf die Biokompatibilität des Materials geschlossen werden.

<sup>1</sup> CERVENKA, A. (1973) *Makromol. Chem.* **170**, 239

<sup>2</sup> XTT-Salz: (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-(phenylamino-carbonyl)2H-tetrazolium hydroxid)

### 3.9 Mikrobiologische Methoden

#### 3.9.1 GESAMTZELLZAHL

##### a) Thomakammer

Die Gesamtzellzahl wurde mit einem Lichtmikroskop (Amplival, Fa. Carl Zeiss Jena) in der Thoma-Kammer (Tiefe 0,02 mm) durch Auszählen von 16 Feldern bei 400facher Vergrößerung bestimmt (Mittelwert aus 5–8 Zählungen). Die Proben wurden vor der Zählung auf  $E_{600\text{nm}} \approx 0,1$  verdünnt.

##### b) Coulter-Counter

Die aus dem kontinuierlichen Wachstumsprozeß entnommenen Proben wurden mit einem Verdünnungsautomaten (Coulter Diluter DD III c) in zwei Stufen auf 1:50 000 verdünnt und am Coulter-Counter (Multisizer 3, Fa. Beckman Coulter) vermessen (Durchmesser der Kapillare  $30 \mu\text{m}$ , Meßvolumen  $100 \mu\text{l}$ ). Die Zellzahl wurde als Mittelwert von mindestens zehn Messungen angegeben.

#### 3.9.2 BESTIMMUNG DES ANTEILS METHANOTROPHER BAKTERIEN

##### a) mikroskopisch

Das Verhältnis Methanotropher zur Begleitflora wurde im Lichtmikroskop (Optiphot X-2, Fa. Nikon) bei 1250facher Vergrößerung in Verdünnungen einer  $OD_{600\text{nm}}$  von 0,4–0,6 mit Hilfe einer Okularnetzplatte ausgezählt. Der angegebene Wert war ein Mittelwert von 8–10 verschiedenen Zählungen unterschiedlicher Bildausschnitte, wobei pro Ausschnitt durchschnittlich 15 Felder ausgezählt wurden.

##### b) Coulter-Counter

Die Ergebnisse der Zellzählungen wurden unter Berücksichtigung der Zellgrößen- bzw. Zellvolumenverteilung ausgewertet, als Schwellenwerte wurden festgelegt (siehe 4.6.1.3):

$$\begin{array}{ll} \text{Zellvolumen:} & S_{\text{ZV}} = 0,39 \mu\text{m}^3 \\ \text{Hypothetischer Durchmesser:} & S_{\text{HD}} = 0,91 \mu\text{m}. \end{array}$$

#### 3.9.3 ISOLIERUNG DURCH AUSPLATTIEREN UNTERSCHIEDLICHER VERDÜNNUNGSSTUFEN

Zur Isolierung von relevanten Komponenten zur Charakterisierung der Mischkultur wurden jeweils  $100 \mu\text{l}$  der Zellsuspension in verschiedenen Verdünnungsstufen (Ausgangssprobe  $OD_{600\text{nm}} = 0,1$ ) bis  $10^{-8}$  in drei verschiedenen Varianten auf Agarplatten kultiviert:

Variante 1: Standardagar, Begasung mit  $\text{CH}_4$  (30 %)/Luftgemisch

Variante 2: Standardagar, Zugabe Methanol ( $50 \mu\text{l}$  pro Platte)

Variante 3: Nähragar

Das Standardmedium enthielt pro 1000 ml demin.  $\text{H}_2\text{O}$  (alle Salze p.A. Fa. Merck):

|   |           |
|---|-----------|
| $\text{NH}_4\text{Cl}$                      | 761,25 mg |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                    | 530 mg    |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                   | 860 mg    |
| $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | 3,7 mg    |

|  |          |
|--|----------|
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$              | 71,2 mg  |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$              | 0,44 mg  |
| $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$              | 0,812 mg |
| $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$              | 0,785 mg |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$    | 0,252 mg |
| $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ <sup>1</sup> | 11,2 mg  |

Das Nährmedium enthielt auf 1000 ml demin.  $\text{H}_2\text{O}$ : 20 g Pepton und 8 g Nährbouillon (für die Mikrobiologie, Fa. Merck).

Zur Verfestigung der Kultivierungsmedien diente 1,5 % Agar (w/v) (Bacto-Agar, Fa. Difco).

Die Platten wurden bei 38 °C inkubiert (Variante 3: 48 h, Variante 2: 5 Tage, Variante 1: 8–10 Tage) und ausgewertet. Ausgehend von einer Verdünnungsstufe mit Einzelkolonien (meist  $10^{-6}$  bzw.  $10^{-7}$ ) erfolgte die weitere Vereinzelnung durch Abimpfen der Kolonien. Die Kolonien und die entsprechenden Zellen wurden morphologisch charakterisiert. Von den Platten durch Abschwemmen mit sterilem demin.  $\text{H}_2\text{O}$  gewonnene Zellsuspensionen dienten als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion.

#### 3.9.4 BESTIMMUNG DER KOLONIEBILDENDEN EINHEITEN (KBE)

Die KBE wurden aus den Ergebnissen der Isolationsversuche (3.9.3) unter Berücksichtigung der entsprechenden Ausgangsverdünnung berechnet.

#### 3.9.5 BESTIMMUNG DER *MOST PROBABLE NUMBER* (MPN)

Die Bestimmung der MPN wurde in 96well-Mikrotiterplatten in drei Varianten jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt:

Variante 1: Standardmedium + Methan/Luftgemisch (30/70)

Variante 2: Standardmedium + Methanol ( $1 \mu\text{l ml}^{-1}$ )

Variante 3: Nährmedium

Variante 4: Kontrolle für 1 (Standardmedium ohne Methan)

Von den entsprechenden sterilen Medien (siehe 3.9.3) wurden in Spalte 2–12 mit einer Achtkanal-Pipette jeweils  $225 \mu\text{l}$  pipettiert. Die erste Spalte wurde mit Probe (Probe aus Bioreaktor mit steriler Natriumchloridlösung (0,9 % NaCl (m/v) in Wasser) 1:1000 ( $E_{600\text{nm}} \approx 0,1$ ) verdünnt) gefüllt, die zweite diente zur Kontrolle der Sterilität, zur dritten Spalte erfolgte die Zugabe von  $25 \mu\text{l}$  der zu untersuchenden Probe (aus Spalte 1). Die Ansätze wurden durch mehrmaliges Ansaugen und Ausstoßen der Flüssigkeit durchmischt, anschließend mit neuen Pipettenspitzen je  $25 \mu\text{l}$  entnommen, in die folgende Spalte gegeben, gemischt,  $25 \mu\text{l}$  entnommen usw. Dies entsprach jeweils Verdünnungen von 1:10, so daß pro Platte Verdünnungen bis  $10^{-10}$  realisiert wurden. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 38 °C, die Mikrotiterplatten der Variante 3 befanden sich dabei in einem Anaerobgefäß, das mit einem Methan-Luftgemisch (30:70) begast wurde.

<sup>1</sup> Die Eisensulfatlösung wurde separat hergestellt ( $5,6 \text{ g l}^{-1}$  in 1M HCl), autoklaviert und dem Nährmedium nach der Sterilisation beigelegt.

Die Messung der Extinktion bei 595 nm mit einem automatischen Lesegerät für Mikrotiterplatten (VICTOR 2, 1420 Multilabel Counter, Fa. Wallac) erfolgte für Variante 3 nach 48 h, Variante 2 nach 72 h und Varianten 1 und 4 nach einer Woche.

Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Extinktionswerte (bei negativer Sterilkontrolle) unter Berücksichtigung der Medienblindwerte; positiv, wenn:

$$E_{V2,V3} > E_{BW2,3} + (0,05 \times E_{BW}) \quad (3.53)$$

Für die Bewertung der Methanotrophen (Variante 1) wurde zusätzlich die Kontrolle (Variante 4) berücksichtigt; positiv, wenn:

$$E_{V1,korr} = E_{V1} - E_{V4} > E_{BW1} + (0,05 \times E_{BW}) \quad (3.54)$$

Zur Berechnung der MPN wurde die Methode nach BRIONES und REICHARD (1999) verwendet.

### 3.9.6 IMMUNOFLUORESCENZ-FÄRBUNG

Von der Probe (verdünnt mit PBS-Medium auf  $E_{600nm} \approx 1,0$ ) wurde ein hitzefixiertes Präparat angefertigt. Nach Spülen mit PBS (pro 1000 ml demin.  $H_2O$ :  $Na_2HPO_4$  1,236 g,  $NaH_2PO_4 \times H_2O$  0,18 g,  $NaCl$  8,5 g) erfolgte Behandlung mit GB 25-spezifischem Kaninchenserum<sup>1</sup>, nach Spülen und Trocknen die Färbung mit FITC-markiertem Anti-GB 25-Ziegen Serum. Für die Kreuztests wurden zusätzlich Anti-GB 14<sup>2</sup> und Anti-GB 130<sup>1</sup>-spezifische Kaninchenseren verwendet. (Die flüssigen Seren wurden portioniert und bis zur Verwendung bei  $-20^\circ C$  gelagert.) Die Beurteilung der Immunfluoreszenz erfolgte mit Vectoshield-Medium (Blauanregung, Filter B2) im Mikroskop (Optiphot X-2, Fa. Nikon) bei 1250facher Vergrößerung [modifiziert nach BURGHARDT 1992].

## 3.10 Molekularbiologische Methoden

Das Probematerial für die molekularbiologische Untersuchungen der methanverwertenden Mischkultur wurde zu verschiedenen Zeitpunkten aus dem Wachstums- und dem PHB-Bildungsprozeß entnommen und je 1–2 ml in sterilen 2 ml Eppendorf-Tubes bei  $-20^\circ C$  eingefroren. Isolate wurden direkt mit physiologischer  $NaCl$ -Lösung von den Agarplatten abgeschwemmt und eingefroren.

Weiterhin in die Untersuchungen einbezogen wurden Stämme der gruppeneigenen Stammsammlung, u.a. die Reinkultur *Methylocystis* sp. GB 25. Dieses Material wurde direkt von gut bewachsenen Agarplatten gewonnen.

### 3.10.1 DNA-EXTRAKTION

Nach Verdünnung der Proben auf eine Extinktion  $E_{600nm} = 1,0$  wurde jeweils 1 ml zur DNA-Gewinnung mit dem DNA-Extraktionskit DNeasy (Fa. QIAGEN) verwendet. Die Aufbewahrung der DNA war bis zu 24 h bei  $4^\circ C$  möglich, danach bei  $-20^\circ C$ .

<sup>1</sup> Das Serum wurden durch den DRK Blutspendedienst, Neubrandenburg (Dr. Zahn), hergestellt.

<sup>2</sup> Das Serum wurde von der Firma BioGenes GmbH (Berlin) hergestellt.

Der Nachweis der DNA erfolgte nach elektrophoretischer Trennung (60 V) im Agarose-Gel (0,7% (m/v) Agarose Ultrapur, Fa. Bio-Rad) in  $0,5 \times \text{TAE-Puffer}^1$ ) durch Ethidiumbromid-Färbung.

### 3.10.2 PCR

Alle verwendeten Primer wurden von MWG Biotech, Ebersberg hergestellt, Taq-DNA-Polymerase und der entsprechende Puffer ( $10 \times \text{Reaction-Buffer}$ ) waren von der Fa. Pharmacia.

Alle PCR's wurden in einem Thermocycler (Mastercycler, Fa. Eppendorf) durchgeführt.

Die jeweiligen PCR-Produkte wurden in einem Agarose-Gel (1,2 % (m/v) in  $0,5 \times \text{TAE}$ ) zusammen mit einem Größenstandard elektrophoretisch aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Färbung auf Größe und Reinheit geprüft.

#### 3.10.2.1 PCR zur Amplifizierung der 16S-rDNA

In Vorbereitung der Sequenzierung wurde die DNA der Reinkultur GB 25 (aus der einer Tiefkühlkonserve von 1991), der methanotrohen Rückisolate MA1 und MA2 sowie des methylo-trophen Isolates MO2 in einer PCR mit universellen Primern eingesetzt.

Folgende Primer wurden verwendet [LANE 1992]:

**f 27:** 5'-AGAGTTT'GATCMTGGCTCAG-3'

**r 1492:** 5'-TACGGYTACCTTGT'TACGACTT-3'

Zusammensetzung 50  $\mu\text{l}$ -Ansatz:

|                                    | Konzentration        | Volumen pro Ansatz [ $\mu\text{l}$ ] |
|------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| DNA                                |                      | 5                                    |
| dNTP's                             | je 200 $\mu\text{M}$ | je 2 ( $\Sigma$ 8)                   |
| $\text{MgCl}_2$                    | 2,5 mM               | 4                                    |
| Primer                             | 10 $\mu\text{M}$     | je 1 ( $\Sigma$ 2)                   |
| $10 \times \text{Reaction-Buffer}$ |                      | 5                                    |
| Taq-DNA-Polymerase                 | 2,5 U                | 0,5                                  |
| demin. $\text{H}_2\text{O}$        |                      | 25,5                                 |

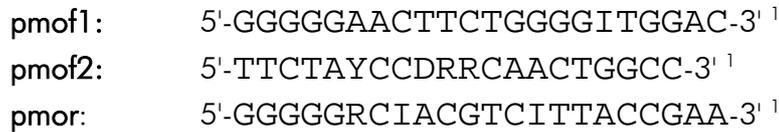
Temperaturprogramm:

| Schritt          | T [ $^{\circ}\text{C}$ ] | t [min] | Anzahl der Zyklen |
|------------------|--------------------------|---------|-------------------|
| <i>Hotstart</i>  | 95                       | 3       |                   |
| Denaturierung    | 93                       | 1       | 29                |
| <i>Annealing</i> | 60                       | 1       |                   |
| Extension        | 72                       | 1       |                   |
| Denaturierung    | 93                       | 1       | 1                 |
| <i>Annealing</i> | 60                       | 1       |                   |
| Extension        | 72                       | 3       |                   |

<sup>1</sup> Hergestellt aus  $50 \times \text{TAE-Puffer}$  (pro 1000 ml): 242 g TRIS-Base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0).

### 3.10.2.2 PCR zur Amplifizierung einer pMMO-Teilsequenz

Die Reaktion wurde als *nested*-PCR durchgeführt, dabei wurden zuerst die Primer pmof1 und pmor eingesetzt und die Produkte (330 bp) anschließend mit pmof2 und pmor amplifiziert (178 bp) [CHEN et al. 1999]. Die Primersequenzen waren folgende:



Zusammensetzung 50 µl-Ansatz:

|                         | Konzentration | Volumen pro Ansatz [µl] |
|-------------------------|---------------|-------------------------|
| DNA                     |               | 5                       |
| dNTP's                  | je 200 µM     | je 2 (Σ 8)              |
| Primer                  | je 10 pM      | je 1 (Σ 2)              |
| 10 × Reaction-Buffer    |               | 5                       |
| Taq-DNA-Polymerase      | 2,5 U         | 0,5                     |
| demin. H <sub>2</sub> O |               | 29,5                    |

Temperaturprogramm:

| Schritt          | T [°C] | t [min] | Anzahl der Zyklen |
|------------------|--------|---------|-------------------|
| <i>Hotstart</i>  | 95     | 10      |                   |
| Denaturierung    | 94     | 1       | 29                |
| <i>Annealing</i> | 45     | 1       |                   |
| Extension        | 72     | 1       |                   |
| Denaturierung    | 94     | 1       | 1                 |
| <i>Annealing</i> | 45     | 1       |                   |
| Extension        | 72     | 5       |                   |

### 3.10.2.3 RAPD-PCR

Die gewonnene DNA von Isolaten der verschiedenen selektiven Kultivierungen diente als Ausgangsmaterial für die PCR nach BECKER et al. (1998). Es wurde der Primer Z8 verwendet:



Zusammensetzung 50 µl-Ansatz:

|                         | Konzentration | Volumen pro Ansatz [µl] |
|-------------------------|---------------|-------------------------|
| DNA                     |               | 5                       |
| dNTP's                  | je 200 µM     | Je 2 (Mix 8)            |
| MgCl <sub>2</sub>       | 2,5 mM        | 2                       |
| Primer                  | 10 pM         | 1                       |
| 10 × Reaction-Buffer    |               | 5                       |
| Taq-DNA-Polymerase      | 2,5 U         | 0,5                     |
| demin. H <sub>2</sub> O |               | 28,5                    |

<sup>1</sup> Y=C oder T, D=G, A oder T, R=A oder G, N=A, G, C oder T

Temperaturprogramm:

| Schritt          | T [°C] | t [min] | Anzahl der Zyklen |
|------------------|--------|---------|-------------------|
| <i>Hotstart</i>  | 95     | 3       |                   |
| Denaturierung    | 93     | 1       | 25                |
| <i>Annealing</i> | 35     | 1       |                   |
| Extension        | 72     | 2       |                   |
| Denaturierung    | 93     | 1       | 1                 |
| <i>Annealing</i> | 35     | 1       |                   |
| Extension        | 72     | 10      |                   |

### 3.10.2.4 PCR in Vorbereitung der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Die gewonnene DNA war Ausgangsmaterial für die PCR nach MUYZER et al. (1993).

Die verwendeten universellen Primer dienen zur Amplifikation einer Teilsequenz der V3-Region der 16S rDNA (Pos. 341 bis 534 *E. coli*) mit einer Gesamtlänge von 233 bp (incl. 40 bp G/C-Clamp) und waren durch folgende Sequenzen charakterisiert :

**MUY2:** 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

**MUY3:** 5'-GCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCCGGGGG-  
(G/C-Clamp, 40 bp)-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'

Zusammensetzung 50 µl-Ansatz:

|                             | Konzentration | Volumen pro Ansatz [µl] |
|-----------------------------|---------------|-------------------------|
| DNA                         |               | 5                       |
| dNTP's                      | je 200 µM     | je 2 (Σ 8)              |
| MgCl <sub>2</sub>           | 2,5 mM        | 4                       |
| <i>Primer</i>               | je 10 pM      | je 1 (Σ 2)              |
| 10 × <i>Reaction-Buffer</i> |               | 5                       |
| Taq-DNA-Polymerase          | 2,5 U         | 0,5                     |
| demin. H <sub>2</sub> O     |               | 25,5                    |

Temperaturprogramm:

| Schritt          | T [°C] | t [min] | Anzahl der Zyklen |
|------------------|--------|---------|-------------------|
| <i>Hotstart</i>  | 95     | 5       |                   |
| Denaturierung    | 94     | 1       | 20                |
| <i>Annealing</i> | 65*    | 1       |                   |
| Extension        | 72     | 1       |                   |
| Denaturierung    | 94     | 1       | 5                 |
| <i>Annealing</i> | 55     | 1       |                   |
| Extension        | 72     | 1       |                   |
| Denaturierung    | 93     | 1       | 1                 |
| <i>Annealing</i> | 35     | 1       |                   |
| Extension        | 72     | 3       |                   |

\* *touch down* (-1°C in jedem 2. Zyklus)

### 3.10.3 DENATURIERENDE GRADIENTENGELELEKTROPHORESE (DGGE)

Die DGGE wurde in einer vertikalen Apparatur der Firma Bio-Rad (DCode Electrophoresis) durchgeführt. Die Elektrophoresekammer hatte ein Volumen von 7 l und war mit Laufpuffer (Tris-Puffer  $0,5 \times$  TAE, Fa. Bio-Rad) gefüllt. Die Gradienten der 8 %igen Acrylamid/ Bisacrylamid-Gele verliefen in verschiedenen Bereichen von 15–100 % Denaturierung. Für 100 % Denaturierung waren die Konzentrationen der Agenzien wie folgt definiert: 7 M Harnstoff (Fa. Bio-Rad), 40 % (v/v) Formamid (Fa. Roth).

Zur Stabilisierung der Gele wurde eine Stützfolie (Gel-Fix, Fa. Serva) verwendet, die vor der Gelpräparation auf eine der Glasplatten, die zur Fixierung des Geles dienen, aufgebracht wurde.

Die Ansätze für die Gradientengele waren wie folgt zusammengesetzt (pro Gel in zwei verschiedenen Konzentrationen):

- 4 ml Acrylamid/Bisacrylamid 40 % (37,5:1)
- 0,2 ml Tris-Puffer  $50 \times$  TAE<sup>1</sup>
- Formamid und Harnstoff entsprechend der gewünschten Konzentration
- Zugabe von demin. H<sub>2</sub>O als Differenz zum Gesamtvolumen von 20 ml.

Das Sammelgel hatte die Zusammensetzung:

- 2 ml Acrylamid/Bisacrylamid 40 % (37,5:1)
- 0,1 ml Tris-Puffer  $50 \times$  TAE
- Zugabe von demin. H<sub>2</sub>O bis zum Gesamtvolumen von 10 ml.

Bei der Präparation der Gele wurde wie folgt vorgegangen:

- Entgasen der Lösungen der Gradientengele (5 min (Exsikkator, Wasserstrahlpumpe)
- Start der Polymerisation durch Zugabe von je 100  $\mu$ l einer frisch hergestellten Lösung von 100 mg Ammoniumpersulfat (APS) in 1 ml demin. H<sub>2</sub>O und 20  $\mu$ l *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) pro 20 ml Ansatz
- Zugabe von 100  $\mu$ l Bromphenolblau-Lsg. (0,5 % (m/v) in TAE-Puffer) zum Ansatz mit höherem Anteil denaturierender Substanzen
- Gießen des Gels mittels Gradientenformer (Model 475, Fa. Bio-Rad, linearer Gradient)
- Polymerisation des Gradientengeles, ca. 45 min
- Start der Polymerisation des Sammelgels durch Zugabe 50  $\mu$ l APS-Lösung und 10  $\mu$ l TEMED
- Aufgießen des Sammelgels auf das Trenngel (Höhe ca. 2cm) und Einsetzen des Kamms für Probetaschen
- Polymerisation des Sammelgeles, ca. 20 min

Nach Entfernung des Probekamms wurden die Probetaschen mit Laufpuffer gespült. Zu 10  $\mu$ l PCR-Produkt wurden 2  $\mu$ l Farbstofflösung (*gel loading dye*) gegeben und diese Mischungen komplett in die Probetaschen des Sammelgels überführt. Die Farbstofflösung wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

50  $\mu$ l Bromphenolblau (2 % m/v)  
 50  $\mu$ l Xylencyanol (2 % (m/v))  
 1,4 ml Glycerol (100 % (v/v))  
 0,5 ml demin. H<sub>2</sub>O

Die Elektrophorese wurde bei einer Temperatur von 60 °C und einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt. Die Laufzeit betrug 150–300 min.

Zum DNA-Nachweis erfolgte die Silberfärbung (Tabelle III-2) der Gele in Fotoschalen (je Arbeitsgang wurden ca. 300 ml Reagenz benötigt, alle Reagenzien p.A., Fa. Merck).

Tabelle III-2: Arbeitsschritte für Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

| Arbeitsgang  | Dauer     | Reagenz  |
|--------------|-----------|--|
| Waschen      | 5 min     | Ethanol (10 % (v/v))                           |
| Fixieren     | 2 × 3 min | Salpetersäure (1 % (v/v))                      |
| Waschen      | 3 min     | demin. H <sub>2</sub> O                        |
| Färben       | 20 min    | Silbernitratlösung (0,2 % (m/v))               |
| Waschen      | 3 min     | demin. H <sub>2</sub> O                        |
| Entwickeln   | 2 × 2 min | Natriumcarbonat-Lösung (3 % (m/v), 484 $\mu$ l |
|              | 5–10 min  | Formaldehyd 37 % pro Liter, gekühlt)           |
| Abstoppen    | 3 min     | Essigsäure (10 % (v/v))                        |
| Waschen      | 3 min     | demin. H <sub>2</sub> O                        |
| Konservieren | 10 min    | Glycerol (10 % (v/v))                          |

Die entwickelten Gele wurden ca. 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und zur weiteren Auswertung eingescannt.

### 3.11 Untersuchungen zum Screening von methanotrophen PHB-Produzenten

#### 3.11.1 VORUNTERSUCHUNGEN IN SCHÜTTELKOLBEN

Die Voruntersuchungen zur PHB-Bildung in neun Stämmen der internen Stammsammlung der Arbeitsgruppe „Methanotrophe Bakterien“ des UFZ wurden in Schüttelkolben im Rahmen von Praktikumsarbeiten<sup>2</sup> durchgeführt (Tabelle III-3).

Zur Anzucht wurden die Mikroorganismen aus Tiefkühlkonserven (–70°C) bzw. vorhandenen Platten auf neue Agarplatten (Standardmedium, siehe 3.9.3 bzw. NMS-Medium<sup>3</sup>) überimpft, in Anaerobtöpfen mit einem Methan/Luft-Gemisch (30:70) begast und bei der entsprechenden Optimaltemperatur inkubiert. Von den gut bewachsenen Platten wurden die Mikroorganismen in Schüttelkolben (100 ml Standard- bzw. NMS-Medium, 1000 ml Glaskolben mit Begasungsaufsatz) überimpft ( $E_{600nm} \approx 0,1$ ) und nach erneuter Begasung auf einem Horizonttalschüttler kultiviert. Nach 24 h wurde die Vorkultur ( $E_{600nm} > 0,6$ ) als Inoculum auf drei Schüttelkolben

<sup>1</sup> TAE: Tris/Acetic Acid/EDTA-Puffer 50 ×, Fa. Bio-Rad

<sup>2</sup> KRAUSE 1998, SCHULZ 1999

<sup>3</sup> Die Zusammensetzung des NMS-Mediums entsprach bis auf die Stickstoffquelle der des Standardmediums: statt NH<sub>4</sub>Cl wurden 151,77 mg l<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> verwendet.

verteilt, so daß  $E_{600nm} \approx 0,1$  war ( $c_x \approx 0,03 \text{ g l}^{-1}$ ), und erneut unter optimalen Bedingungen kultiviert. Die Probenahme zur Bestimmung von Extinktion, Phosphatphosphor- und Stickstoffkonzentration sowie PHB-Gehalt mittels Schnellmethode erfolgte jeweils nach 24 h über einen Gesamtzeitraum von 72 h. Die PHB-Akkumulation wurde stets durch Stickstoffmangel ( $\text{NH}_4^+$  bzw.  $\text{NO}_3^-$ ) initiiert, der ca. 24 h nach dem Beginn der Kultivierung zu beobachten war. Nach 72 h erfolgte die Ernte der Biomasse und Trocknung bei  $105^\circ\text{C}$  zur gaschromatographischen Bestimmung des PHB-Gehaltes.

Tabelle III-3: Übersicht zum Screening von PHB-Produzenten

| Stamm  | Herkunft          | MMO  | T [ $^\circ\text{C}$ ] | Morphologie                   |
|--------|-------------------|------|------------------------|-------------------------------|
| GB 4   | Abwasser          | pMMO | 30                     | hörnchenförmig gekrümmt       |
| GB 21  | Straßenlaub       | pMMO | 30                     | hörnchenförmig gekrümmt       |
| GB 130 | Kläranlagenwasser | pMMO | 30                     | Kurzstäbchen                  |
| GB 29  | Fermentation      | sMMO | 38                     | Kokken, meist als Diploform   |
| GB 11  | Abwasser          | sMMO | 30                     | Stäbchen                      |
| GB 12  | Abwasser          | sMMO | 30                     | Stäbchen                      |
| GB 13  | Abwasser          | sMMO | 30                     | Stäbchen                      |
| GB 14  | Gülle             | sMMO | 30                     | Kurzstäbchen, leicht gekrümmt |
| GB 15  | Gülle             | sMMO | 30                     | Kurzstäbchen, leicht gekrümmt |

### 3.11.2 WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR PHB-BILDUNG MIT DEM STAMM *METHYLOCYSTIS* SP. GB 14 (DSM 12955)

#### 3.11.2.1 Mikroorganismus

Der ausgewählte Stamm *Methylocystis* sp. GB 14 wurde am UFZ Leipzig-Halle aus Gülle isoliert und gehört auf Grund der intrazellulären Membranstruktur und der Kohlenstoffassimilation über den Serinweg zur Gruppe der Typ II-Methanotrophen. Bei Abwesenheit von Kupfer ist er in der Lage, sMMO zu bilden. Detaillierte Untersuchungen zur Charakterisierung der sMMO und des Potentials zur cometabolischen Degradation von Trichlorethen wurden im Rahmen von Dissertationen durchgeführt [GROBE 1998, BECK 2000].

#### 3.11.2.2 Gewinnung von Impfmateri

Aus Tiefkühlkonserven ( $-70^\circ\text{C}$ ) wurden zunächst Agarplatten (NMS-Medium) beimpft und unter Methan-Luftatmosphäre (30:70) bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Je eine gutbewachsene Platte diente als Inokulum für die weiteren Anzucht in Schüttelkolben (100 ml NMS-Medium, 1000 ml Glaskolben mit Begasungsaufsatz) die nach entsprechender Begasung bei  $T=30^\circ\text{C}$  ( $E_{600nm} \approx 0,1$ ) auf einem Horizontalschüttler inkubiert und am Ende der exponentiellen Wachstumsphase ( $E_{600nm} \approx 1,0$ ) geerntet wurden.

#### 3.11.2.3 Durchführung von Fementationsprozessen

Die aus max. drei Schüttelkolben durch Zentrifugation gewonnene Biomasse wurde in frischem NMS-Medium resuspendiert und in Kleinstbioreaktoren (Biostat Q, Fa. Braun Biotech) über-

führt. Diese Bioreaktoren bieten die wichtigsten Funktionen eines Bioreaktors kombiniert mit dem Maßstab und der Multiplizität der Schüttelkolben. Zusätzlich zu Schüttelversuchen können online-Messung, Regelung und Auswertung der wichtigsten Prozeßgrößen sowie Probenahmen für externe Analysen durchgeführt werden. Dabei können die Prozeßparameter Temperatur, pH- und Gelöstsauerstoffkonzentration im Kulturgefäß gemessen und (mit Ausnahme von  $c_{O_2,L}$ ) geregelt werden. Alle Prozeßdaten stehen über eine serielle Schnittstelle für die zentrale, computergestützte Datenerfassung, Protokollierung und Auswertung zur Verfügung.

Systemaufbau:

- Grundgerät mit Versorgungseinheit und separater Gefäßkontrolle und Magnetantrieb
- vier autoklavierbare Kulturgefäße mit 330 ml Gesamtvolumen (200 ml Arbeitsvolumen)
- digitales Instrumentierungssystem DCU

Die Versorgungseinheit enthält alle Systeme für Temperierung, Begasung sowie die pH-Regelungspumpen. Zur Begasung der Bioreaktoren sind in der Versorgungseinheit Schwebekörperdurchflußmesser mit vorgeschaltetem Druckminderer installiert. Jedem Kulturgefäß sind je 2 in der Versorgungseinheit eingebaute Schlauchpumpen (Typ Watson Marlow) für die Zugabe von Säure und Lauge zugeordnet. Als Rührer dienen prismenförmige Magnetstabbrührer, die eine homogene Durchmischung bei optimaler Sterilsicherheit gewährleisten. Die Gefäße sind mit einer Temperaturelektrode (Pt 100), pH-Sonde, Elektrode für Gelöstsauerstoffmessung, Begasungsrohr mit Edelstahlfritte (Porenweite 80  $\mu\text{m}$ ), Membran-Anstechstutzen (Septum), Abluftkühler mit Abluftfilter und Zuluftfilter bestückt.

Die Kultivierung wurde bei einem pH-Wert von 6,5 und einer Temperatur von 30°C durchgeführt. Die angestrebte Gelöstsauerstoffkonzentration von 10 % wurde über Drehzahl und kontinuierliche Gesamtbelegung ( $\text{CH}_4$ -Anteil 20–40 %) eingestellt. Die Konzentration der Biomasse, sowie Phosphor- und Stickstoffkonzentrationen wurden dreimal täglich gemessen und bei Bedarf Nährlösungskonzentrat (siehe 3.1.2) bzw. NitratstammLösung ( $\text{NaNO}_3$  170  $\text{g l}^{-1}$ ) zugegeben. Am Ende der Kultivierung konnten maximale Biomassekonzentrationen von ca. 5  $\text{g l}^{-1}$  erreicht werden.

Die gewonnene Biomasse wurde zur weiteren Kultivierung in den Bioreaktor UD 5 überführt und mit NMS-Medium auf ein Arbeitsvolumen von 4 l verdünnt. Die Anzucht erfolgte unter unsterilen Bedingungen bei  $\text{pH} = 6,5$  und  $T = 30^\circ\text{C}$ , Begasung mit Methan/Luftgemisch (30 % Methan) zunächst im *batch*-Regime. Nach 48 h wurde die kontinuierliche Kultivierung mit einer Verdünnungsrate von 0,04  $\text{h}^{-1}$  gestartet, über vier Wochen fortgesetzt und nach Erreichen einer Biomassekonzentration von ca. 10  $\text{g l}^{-1}$  der PHB-Bildungsprozeß gestartet. Alternativ wurde Impfmateriel mit Ammonium als Stickstoffquelle kultiviert. In diesem Fall erfolgte die Regelung des pH-Wertes mit 2 %iger Ammoniaklösung. Nach 24 h wurde auf kontinuierliche Betriebsweise ( $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ ) umgestellt und die Verdünnungsrate schrittweise auf 0,083  $\text{h}^{-1}$ , 0,1  $\text{h}^{-1}$ , 0,125  $\text{h}^{-1}$  angehoben (Dauer ca. 7 Tage). Mit der höchsten Verdünnungsrate wurde die Kultivierung bis zu einer Biomassekonzentration von ca. 20  $\text{g l}^{-1}$  realisiert, danach erfolgt die PHB-Synthese unter diskontinuierlichen Bedingungen, ausgelöst durch Stickstoffmangel.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Definition von Zielgrößen zur Beurteilung des PHB-Bildungsprozesses

Entsprechend der Aufgabenstellung waren Beurteilungskriterien in zweierlei Hinsicht nötig: um einerseits den Prozeß und andererseits das Produkt zu charakterisieren. Folgende Größen wurden als Grundlage für die Empfehlungen zur Optimierung des Fermentationsprozesses ausgewählt und stellen gleichzeitig wichtige Parameter im entwickelten Prozeßmodell dar:

- prozeßspezifische Parameter:
  - PHB-Gehalt
  - spezifische PHB-Bildungsrate
  - Produktivität der PHB-Bildung
  - spezifischer Ausbeutekoeffizient der PHB-Bildung
- Qualitätsmerkmale für das Polymer:
  - Stickstoffgehalt als Maß für die Reinheit
  - mittleres Molekulargewicht
  - Molekulargewichtsverteilung.

Die Kenntnis der o.g. Parameter ist auch Voraussetzung für einen Vergleich der Ergebnisse mit bekannten Verfahren zur PHB-Produktion.

### 4.2 Methodische Entwicklungen zur Prozeßkontrolle

#### 4.2.1 ENTWICKLUNG EINER SCHNELLMETHODE ZUR BESTIMMUNG DES PHB-GEHALTES

Der PHB-Gehalt ist ein Parameter, der sowohl in die Berechnung prozeßspezifischer Kennwerte wie Bildungsrate und Ausbeute eingeht, aber auch die Prozesse der Aufarbeitung stark beeinflusst (besonders im Hinblick auf die Gesamtkosten des Verfahrens). Standardmethode für die Bestimmung des PHB-Gehaltes ist die gaschromatographische Analyse nach entsprechendem chemischen Aufschluß [RIIS und MAI 1988]. Dieser Nachweis eignet sich allerdings nicht zur Prozeßkontrolle, da die Probenvorbereitung mit Trocknung und Derivatisierung langwierig ist und Analysenergebnisse erst nach etwa 48 h erhalten werden können. Zur Prozeßkontrolle wäre der Einsatz einer Schnellmethode von Vorteil, die ein schnelles Erkennen von Störungen ermöglicht.

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von PHB nach Aufschluß von Bakterien mit Natriumhypochlorit wurde von WILLIAMSON und WILKINSON (1958) beschrieben. Hypochlorit bewirkt Zell-Lyse durch oxidative Spaltung von Kohlenhydraten und Proteinen. Lipide und PHA lassen sich unter diesen Bedingungen jedoch nicht oxidieren und bleiben intakt. Unter standardisierten Konditionen ist die durch freigesetzte PHB-Granula verursachte Trübung der Hypochloritlösung vom PHB-Gehalt der Zellen abhängig.

Die Methode wurde bezüglich Inkubationszeit und Vorbehandlung modifiziert, so daß bereits nach 40 Minuten der PHB-Gehalt von Proben der Mischkultur zuverlässig beurteilt werden konnte. So wurde, wie in Abb. 4-1 beispielhaft dargestellt, der Verlauf der PHB-Bildung während einer Fermentation korrekt wiedergegeben, und es bestand ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und PHB-Gehalt (Abb. 4-2). Voraussetzung für diese Linearität war aller-

dings die Normierung der Meßwerte durch Berücksichtigung der Biomassekonzentration (Abb. 4-3). Dies wurde durch die Korrelation mit der Extinktion der Zellsuspension (600 nm), die wiederum ein Maß für die Biomassekonzentration ist, mit den gemessenen Trübungen (436 nm) in den Hypochlorit-behandelten Proben erreicht. Zur Überprüfung der Gültigkeit dieser Näherungen wurden verschiedene Mengen PHB eingewogen, im Ultraschallbad in Hypochloritlösung suspendiert und vermessen. Diese externe Kalibrierung stimmte für  $E_{436\text{nm}} < 1,5$  gut mit der Kurve überein, die sich aus Werten für die Abhängigkeit PHB-Konzentration und Extinktion ergab, die mit Hilfe der Bestimmung der optischen Dichte (600 nm) auf die Biomassekonzentration normiert wurden (Abb. 4-4). Aus den Extinktionswerten des Natriumhypochloritaufschlusses bei 436 nm konnte unter Berücksichtigung der Biomassekonzentrationen der PHB-Gehalt innerhalb kurzer Zeit (40 min) mit großer Genauigkeit bestimmt werden.

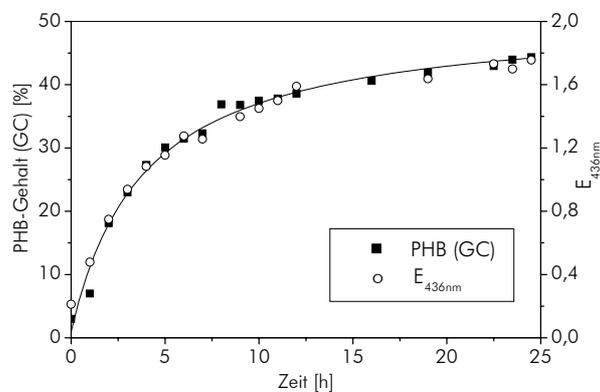


Abb. 4-1: Vergleich von Werten der PHB-Schnellmethode mit gaschromatographisch bestimmten PHB-Gehalten

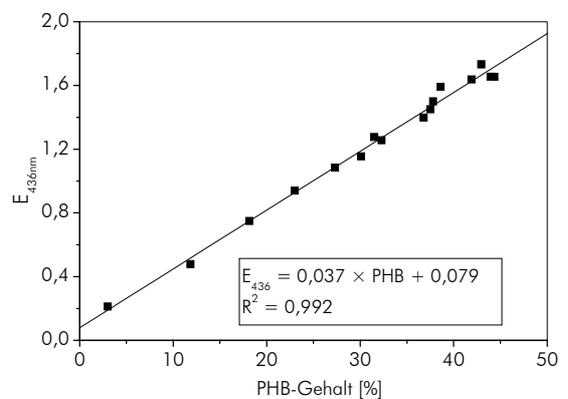


Abb. 4-2: Korrelation zwischen PHB-Gehalt und Extinktion bei 436 nm nach Natriumhypochloritaufschluß

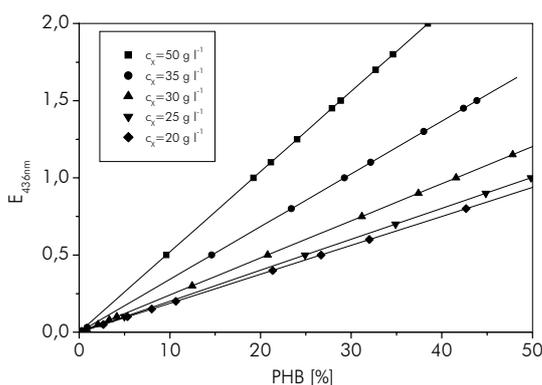


Abb. 4-3: Korrelation von PHB-Gehalt (GC) und Werten der Schnellmethode in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration

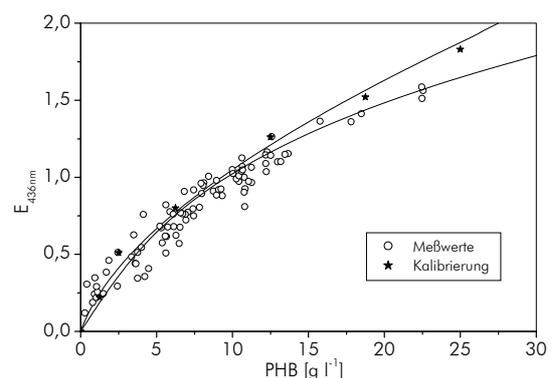


Abb. 4-4: Zusammenhang zwischen PHB-Konzentration und Extinktion der Proben zur Kalibrierung bzw. realen Proben nach Natriumhypochloritaufschluß

Die Schnellmethode diente bei allen Versuchen als Prozeßkontrolle. Zur exakten Bestimmung der erzielten PHB-Gehalte erfolgten am Ende jedes Versuches zusätzlich gaschromatographische Analysen.

#### 4.2.2 VISKOSIMETRISCHE MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine viskosimetrische Methode zur Bestimmung des mittleren Molekulargewichtes mit Trifluorethanol als Lösungsmittel modifiziert [HUGHLIN und RADWANN 1991]. Die Analyse mittels GPC diente als Vergleichsmethode für die viskosimetrischen Messungen und gleichzeitig zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung. Sie wurde für ausgewählte Proben extern an der Fachhochschule Merseburg, Fachbereich Chemie und Umweltingenieurwesen (Dr. E. Brauer) durchgeführt.

##### 4.2.2.1 Voruntersuchungen: Nachweis der Notwendigkeit der Polymerextraktion

Allgemein wird bei Analysen zur Charakterisierung von Polymeren das reine, d.h. zuvor extrahierte Polymer eingesetzt. Für die viskosimetrische Bestimmung wird die Substanz in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und nach anschließender Filtration (zur Entfernung störender Partikel) vermessen. Aus der großen Anzahl zu untersuchender Proben resultierte die Überlegung, direkt von PHB-haltiger Biomasse auszugehen, diese mit Trifluorethanol zu behandeln, durch die Filtration den gesamten Anteil der Zellbruchstücke abzutrennen und damit den Schritt der PHB-Extraktion einzusparen. In mehreren Vorversuchen zeigte sich jedoch, daß das verwendete Lösungsmittel (Trifluorethanol) unter den Versuchsbedingungen auch andere, nicht PHB-haltige Bestandteile aus der Biomasse herauslöst. Dies führte zu Abweichungen bis zu 50% und damit zu einer Verfälschung des berechneten Molekulargewichtes, so daß für exakte Bestimmungen eine Extraktion der PHB erfolgen muß.

##### 4.2.2.2 Voruntersuchungen: Einfluß des Trocknungsprozesses

Weiterhin war zu klären, ob bzw. wie der Trocknungsprozeß während der Aufarbeitung das Molekulargewicht des Polymers beeinflusst. Nach der Aufkonzentrierung der Biomasse erfolgte die Entfernung des vorhandenen Restwassers, wobei prinzipiell drei Methoden zur Verfügung standen: die Trocknung bei 105 °C, die Sprüh- und die Gefriertrocknung. Es wurde vermutet, daß erhöhte Temperaturen durch beschleunigte Hydrolyse der Esterbindungen zu einer künstlichen Senkung des Molekulargewichtes und somit zu verfälschten Ergebnissen führen. Bei der Gefriertrocknung sollte dieser Effekt nicht auftreten.

Zum Vergleich wurden aus Proben, die entweder bei 105 °C getrocknet wurden oder aus der Gefriertrocknung stammen, das Polymer extrahiert und das Molekulargewicht viskosimetrisch bestimmt und in Abb. 4-5 gegenübergestellt. Die im Diagramm zusätzlich dargestellte Gerade (gestrichelt), stellt die theoretische Funktion  $\overline{M}_{v(105^{\circ}\text{C})} = \overline{M}_{v(\text{GFT})}$  dar.

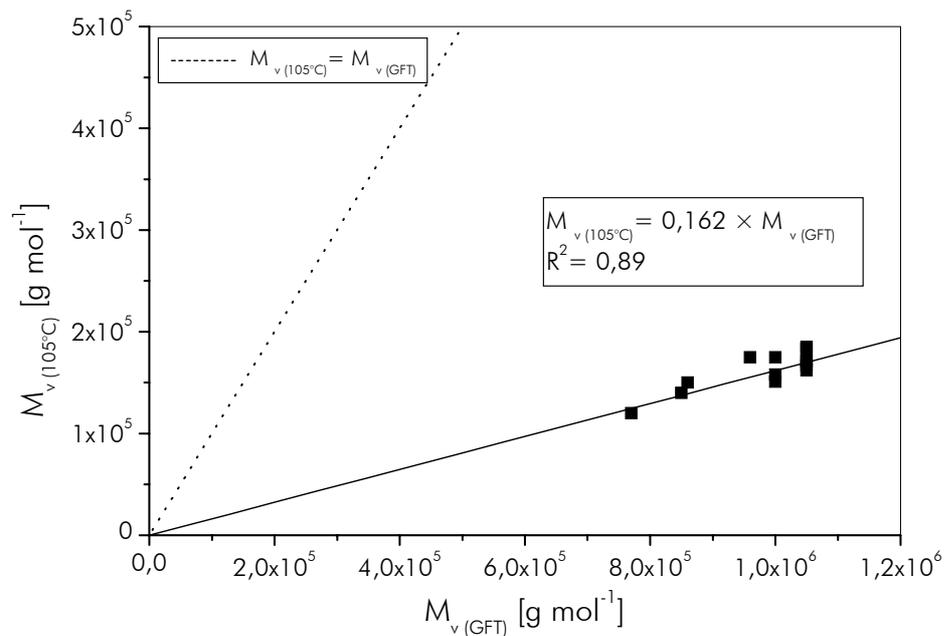


Abb. 4-5: Vergleich der Molekulargewichte von Proben nach unterschiedlichen Trocknungsprozessen

Die Vermutung bestätigte sich: die Molekulargewichte der bei 105 °C getrockneten Proben waren fast eine Größenordnung niedriger als die durch Gefriertrocknung gewonnenen. Zur Aufarbeitung der Biomasse sollte daher die Gefriertrocknung verwendet werden, was allerdings nur für kleinere Mengen praktikabel ist.

Für Aufarbeitungen in größerem Maßstab kann die Sprühtrocknung eingesetzt werden. Orientierende Untersuchungen zeigten, daß Parameter wie Temperatur und Kontaktzeit Einfluß auf das Molekulargewicht hatten, unter optimal gewählten Bedingungen jedoch keine signifikanten Unterschiede zu Molekulargewichten gefriergetrockneter Proben bestanden [VOSGERAU 1998]. Ein Vergleich von Sprüh- und Gefriertrocknung zeigte auch, daß bei der Sprühtrocknung höhere Extraktionsausbeuten erzielt wurden [SKROWNY 1996, VOSGERAU 1998].

#### 4.2.2.3 Auswahl des Extraktionsmittels und des Verfahrens

Ziel der Extraktion war es, die in der Bakterienzelle akkumulierte PHB möglichst unverändert und vollständig zu isolieren. Zur Extraktion von PHB aus der Biomasse standen zwei im Vorfeld erprobte Verfahren zur Auswahl: die Extraktion mit 1,2-Dichlorethan (DCE) [SKROWNY 1996] und die Gewinnung der PHB mittels Essigsäure (ES) [LEHMANN et al. 1993]. In Vorversuchen wurden aus gefriergetrockneter Biomasse PHB-Proben mit beiden Varianten gewonnen und viskosimetrisch untersucht. Die Laufzeiten der Probelösungen (bei gleicher Konzentration der Polymerlösung proportional zur Höhe des Molekulargewichtes) waren bei den essigsäureextrahierten Proben deutlich niedriger (Tabelle IV-1). Das ließ auf einen erheblichen hydrolytischen Abbau der PHB während der Extraktion schließen. Die Hydrolyse könnte zwar theoretisch durch die Zugabe von Essigsäureanhydrid entsprechend dem Wassergehalt der Proben verhindert werden, dies hätte jedoch durch zusätzlich notwendige Analysen einen erhöhten Aufwand

bedeutet. Daher wurde für die Gewinnung von PHB-Proben zur Molekulargewichtsbestimmung 1,2-Dichlorethan als Extraktionsmittel angewendet.

Tabelle IV-1: Vergleich der PHB-Extraktion mit Essigsäure und 1,2-Dichlorethan (DCE)

|                               | Einheit             | Extraktionsmittel |         |
|-------------------------------|---------------------|-------------------|---------|
|                               |                     | Essigsäure        | 1,2-DCE |
| Konzentration der Probelösung | mg ml <sup>-1</sup> | 2,0               | 2,0     |
| Laufzeit der Probelösung      | s                   | 200–300           | 420–600 |
| Reinheit der PHB              | %                   | 90–96             | 96–100  |

Für die weiteren Untersuchungen wurden Proben aus verschiedenen Versuchen nach dem Standardverfahren (3.8.1, 3.8.2) extrahiert und wie unter (3.8.4) beschrieben, analysiert. Um die Richtigkeit der viskosimetrischen Bestimmungen bewerten zu können und zusätzlich Aussagen über die Molmassenverteilung und Uneinheitlichkeiten der PHB treffen zu können, wurden einige Proben (Endwerte nach 24 h PHB-Bildung) parallel viskosimetrisch und mittels GPC analysiert [Brauer 1998, 1999]. Die Werte für Molekulargewichte nach GPC-Bestimmung waren etwa doppelt so hoch wie die viskosimetrisch analysierten Daten (Tabelle IV-2).

Tabelle IV-2: Mittlere Molekulargewichte von PHB bestimmt mittels Viskosimetrie und GPC

| Probe | $\bar{M}_v$ (Viskosimetrie)<br>[ $\times 10^6$ g mol <sup>-1</sup> ] | $\bar{M}_w$ (GPC)<br>[ $\times 10^6$ g mol <sup>-1</sup> ] |
|-------|--|--|
| 1     | 1,25   | 2,38   |
| 2     | 1,44   | 2,70   |
| 3     | 1,29   | 2,48   |
| 4     | 1,33   | 2,26   |
| 5     | 1,31   | 2,26   |
| 6     | 1,35   | 2,62   |
| 7     | 1,26   | 2,28   |
| 8     | 1,16   | 2,28   |
| 9     | 1,09   | 2,02   |
| 10    | 1,28   | 2,54   |
| 11    | 1,51   | 3,08   |
| 12    | 1,53   | 3,09   |
| 13    | 1,54   | 2,85   |
| 14    | 1,38   | 2,85   |

Die Unterschiede in den Meßergebnissen sind durch die verschiedenen Meßprinzipien erklärbar. Die mit GPC bestimmten Werte sind das Ergebnis einer Kalibrierung mit Polystyrolstandards und stellen daher relative Werte dar. Die Korrelation zwischen beiden Werten kann in dem untersuchten Bereich ( $> 1\,000\,000$  g mol<sup>-1</sup>) jedoch näherungsweise als linear angenommen werden (Abb. 4-6). Die zusätzlich dargestellte Gerade zeigt den theoretischen Verlauf für  $\bar{M}_v = \bar{M}_w$ .

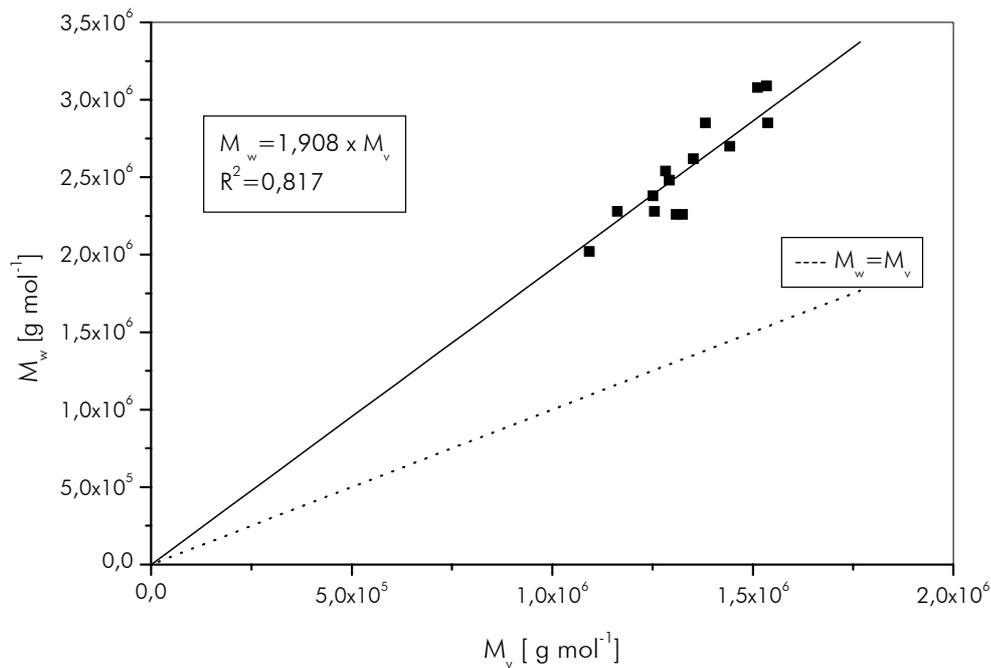


Abb. 4-6: Korrelation zwischen mittleren Molekulargewichten, bestimmt mittels Viskosimetrie und GPC

Um auszuschließen, daß die unterschiedlichen Konzentrationen der Polymerlösungen, wie sie für GPC (0,2–0,4 g ml<sup>-1</sup>) und Viskosimetrie (2 g ml<sup>-1</sup>) vorlagen, Einfluß auf die Meßergebnisse hatten, wurden viskosimetrische Messungen mit Lösungen verschiedener Konzentrationen (0,2–2 g ml<sup>-1</sup>) vorgenommen. In diesem Bereich konnte jedoch kein Einfluß der Konzentration auf das ermittelte Molekulargewicht gefunden werden.

Viskositätsmessungen lieferten somit realistische Werte für das mittlere Molekulargewicht von PHB und konnten als routinemäßige Kontrollmethode genutzt werden. Aussagen über die Uneinheitlichkeit können mit diesem Verfahren jedoch nicht getroffen werden. Es ergab sich damit die Notwendigkeit, für ausgewählte Proben zusätzlich die Molekulargewichtsverteilung mittels GPC zu bestimmen.

### 4.3 Untersuchungen zum Wachstumsprozeß

#### 4.3.1 GEWINNUNG VON IMPFMATERIAL

Die Prozeßbedingungen für die kontinuierliche Kultivierung der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) wurden zu einem früheren Zeitpunkt untersucht und die in Tabelle IV-3 dargestellten Werte empfohlen. Die Nutzung von Methan als einziger Kohlenstoffquelle ermöglichte, auf Grund des Selektionsvorteils für Methanotrophe, die Kultivierung unter unsterilen Bedingungen in einem vergleichsweise einfachen Anzuchtprozeß. Die während der kontinuierlichen Kultivierung entstehende Biomasse konnte gesammelt, bei 4 °C gelagert und innerhalb von drei Monaten ohne Aktivitätsverlust wieder eingesetzt werden. Die Standardanzucht (Agarplatte → Schüttelkolben → Vorkultur) war deshalb nicht notwendig und Prozesse konnten mit hohen Biomassekonzentrationen gestartet werden.

Daneben existieren Tiefkühlkonserven dieser Mischkultur, so daß bei Bedarf zu jeder Zeit ein identisches Inokulum zur Verfügung steht.

Tabelle IV-3: Parameter zur Kultivierung der methanverwertenden Mischkultur [SCHNEIDER et al. 1983, WENDLANDT et al. 1981]

| Parameter                         | Empfohlene Einstellung                        |
|-----------------------------------|---|
| T                                 | 38 °C   |
| pH-Wert                           | 5,7   |
| $c_{L,O_2}$                       | 1 mg l <sup>-1</sup>                          |
| $\gamma_{CH_4/O_2}$ (Eingangsgas) | 1,19  |
| D                                 | 0,167 h <sup>-1</sup> (D=0,6 × $\mu_{max.}$ ) |

Die Gewinnung von Impfmateriale wurde in regelmäßigen Abständen von 3 Monaten im UD 5 bzw. UD 50 durchgeführt. Nach Beimpfen des Bioreaktors erfolgte die Kultivierung unter Zufuhr des Methan-Luftgemisches nur so lange diskontinuierlich, bis Temperatur und pH-Wert die vorgegebenen Werte erreichten. In den ersten Versuchen wurde das empfohlene Verhältnis Methan:Luft im Eingangsgas von 20:80 eingestellt, was einem Methan-Sauerstoff-Verhältnis von 1,2 entspricht. Die Analysen der Gaszusammensetzung mit den Routinemethoden (Infralyt, Permolyt) und zusätzlich mit dem Massenspektrometer ergaben jedoch Abweichungen dieses Verhältnisses (1,04 bis 1,08; Tabelle IV-4). Mögliche Fehler liegen in der Messung und Regelung der zugeführten Gasflüsse oder konnten nicht beseitigt werden. In den weiteren Versuchen wurde ein Verhältnis Methan zu Luft von 25:75 (entspricht  $\gamma_{CH_4/O_2}=1,58$ ) verwendet. Die Routine-Gasanalysen bei diesen Einstellungen ergaben Werte zwischen 1,35 und 1,45.

Tabelle IV-4: Vergleich der Zusammensetzung des Eingangsgases: Werte entsprechend Einstellung des *ratio* und Meßwerte der Gasanalysen (Infralyt, Permolyt) und Quadrupolmassenspektrometer (QMS) (UD 50, *ratio*: 20 % CH<sub>4</sub>)

|            | O <sub>2</sub> [%] |         | CH <sub>4</sub> [%] |         | $\gamma_{CH_4/O_2}$ |          |
|------------|--------------------|---------|---------------------|---------|---------------------|----------|
|            | eingestellter Wert | Meßwert | eingestellter Wert  | Meßwert | eingestellter Wert  | Messwert |
| Gasanalyse | 16,8               | 17,09   | 20,0                | 18,42   | 1,19                | 1,08     |
| QMS        | 16,8               | 17,27   | 20,0                | 17,87   | 1,19                | 1,04     |

Während die Einstellung des pH-Wertes nach Beginn der Fermentation sehr schnell erfolgte (1–2 min), war die gewünschte Temperatur in Abhängigkeit vom Reaktorvolumen nach 5 min (UD 5) bzw. 20–30 min (UD 50) erreicht. Unter Begasung bei optimalem pH-Wert zeigte sich die Aktivität der Organismen bei Temperaturen oberhalb von 30 °C durch eine deutliche Abnahme der Gelöstsauerstoffkonzentration. Für Werte von weniger als 50 % konnte sofort auf die kontinuierliche Betriebsweise umgestellt werden. Um die optimale Konzentration von 1 mg l<sup>-1</sup> [WENDLANDT et al. 1993] zu gewährleisten<sup>1</sup>, erfolgte zuerst die Erhöhung der Rührer-

<sup>1</sup> Dies entspricht bei T=38°C einem Wert  $c_{O_2,L}=14,5$  % der Luftsättigung bei Normaldruck.

drehzahl und anschließend der Gesamtgasmenge bis zu den entsprechenden Maximalwerten. Diese Anpassung wurde manuell durchgeführt oder über die Kaskadenregelung realisiert. Je nach Konzentration des Inokulums ist ein Zunahme der Biomassekonzentration im kontinuierlichen Prozeß bis zur Einstellung des *steady-state*-Zustandes durch Sauerstofflimitation möglich, da eine Verdünnungsrate von  $D=0,6 \times \mu_{\max}$  gewählt wurde. Der Prozeß wurde mindestens über einen Zeitraum von drei Verweilzeiten geführt, das Material wurde gesammelt und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Folgende Parameter kennzeichneten die Prozesse in den verwendeten Reaktoren:

Tabelle IV-5: Kennziffern der *chemostat*-Kultivierung unter Sauerstofflimitation ( $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ ,  $N_{\max}$ ,  $F_{G,0,\max}$ , *ratio*: 25 % CH<sub>4</sub>,  $p < 500 \text{ mbar}$  (Staudruck))

| Kenngröße         | Einheit                          | UD 5            | UD 50           |
|-------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| $r_{\text{O}_2}$  | $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | $12,3 \pm 5 \%$ | $14,7 \pm 5 \%$ |
| $r_{\text{CH}_4}$ | $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | $4,2 \pm 5 \%$  | $4,8 \pm 5 \%$  |
| $r_{\text{CO}_2}$ | $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | $6,4 \pm 5 \%$  | $7,0 \pm 5 \%$  |
| $c_{\text{X,GG}}$ | $\text{g l}^{-1}$                | 15,5            | 18,2            |
| $r_{\text{X}}$    | $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | 2,5             | 3,05            |

Im folgenden Experiment zur Gewinnung von Impfmateriale im UD 50 ( $V_L = 40 \text{ l}$ , Abbildungen 4-7 bis 4-11) hatte das Inokulum eine Biomassekonzentration von  $c_X = 19,6 \text{ g l}^{-1}$ . Nach Erreichen von Temperaturen oberhalb 30 °C nahm die Gelöstsauerstoffkonzentration sehr schnell ab, Rührerdrehzahl und Gasmenge mußten an den steigenden Sauerstoffverbrauch angepaßt werden und bereits nach 10 min waren die technisch möglichen Maximalwerte erreicht (Abb. 4-7). Zu diesem Zeitpunkt wurde die kontinuierliche Kultivierung durch die Dosierung von Nährsalzlösung und Wasser (Gesamtfluß  $6,67 \text{ l h}^{-1}$ ) gestartet ( $D = 0,167 \text{ h}^{-1}$ ). Die Biomassekonzentration nahm in der ersten Phase ( $t < 12 \text{ h}$ ) geringfügig ab und blieb danach auf einem konstanten Niveau von durchschnittlich  $18,2 \text{ g l}^{-1}$ . Dies hatte folgende Ursache: Die Biomassekonzentration des Inokulums war durch Sedimentation während der Lagerung höher als unter den gewählten Bedingungen erreichbar. Innerhalb von zwei Volumenwechseln ( $t=2 \times 1/D$ ) stellte sich die entsprechende Gleichgewichtskonzentration im *steady-state* ein. Die Zusammensetzung des Eingangs- und Ausgangsgases ist in Abb. 4-8 dargestellt, die Anteile im Abgas änderten sich etwa drei Stunden nach dem Erreichen der maximalen Rührerdrehzahl und Gesamtgasmenge praktisch nicht mehr. Dies spiegelte sich auch im Verlauf der spezifischen Gasverbrauchsrate wider (Abb. 4-9). Im stationären Zustand ( $t > 12 \text{ h}$ ) änderte sich auch die Produktivität der Biomassebildung nicht mehr. Er war durch konstante Verbrauchsgeschwindigkeiten für Sauerstoff und Methan von  $14,67$  bzw.  $4,75 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und einer Produktivität  $r_X$  von  $3,05 \text{ g X l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  gekennzeichnet (Abb. 4-9). Die Darstellung der Ausbeuten während des Prozesses verdeutlicht diese Aussage: nach 12 h erreichten diese ein praktisch konstantes Niveau mit  $Y_{\text{X/O}_2} = 0,2 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Y_{\text{X/CH}_4} = 0,63 \text{ g g}^{-1}$  und  $Y_{\text{X/CO}_2} = 0,43 \text{ g g}^{-1}$  (Abb. 4-10). Die Gesamtbilanzen für Sauerstoff und Kohlenstoff waren durch Abweichungen von 5–7 % gekennzeichnet.

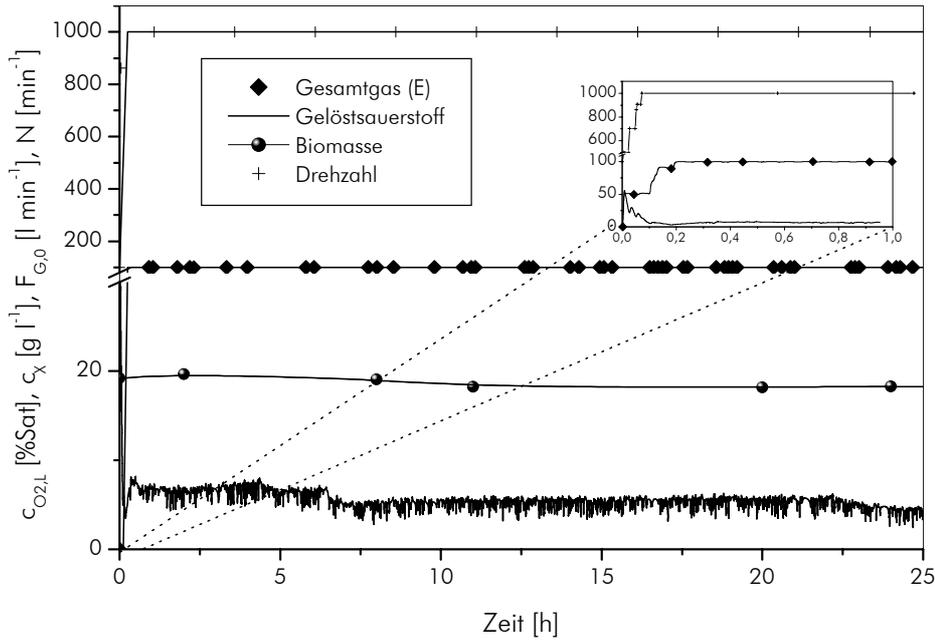


Abb. 4-7: Zeitlicher Verlauf von Gesamtgas (◆), Biomassekonzentration (●), Drehzahl (+) und Gelöstsauerstoffkonzentration (—) während kontinuierlicher Kultivierung (UD 50,  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ ). Im oberen Diagramm ist der Zeitraum der ersten Stunde vergrößert dargestellt.

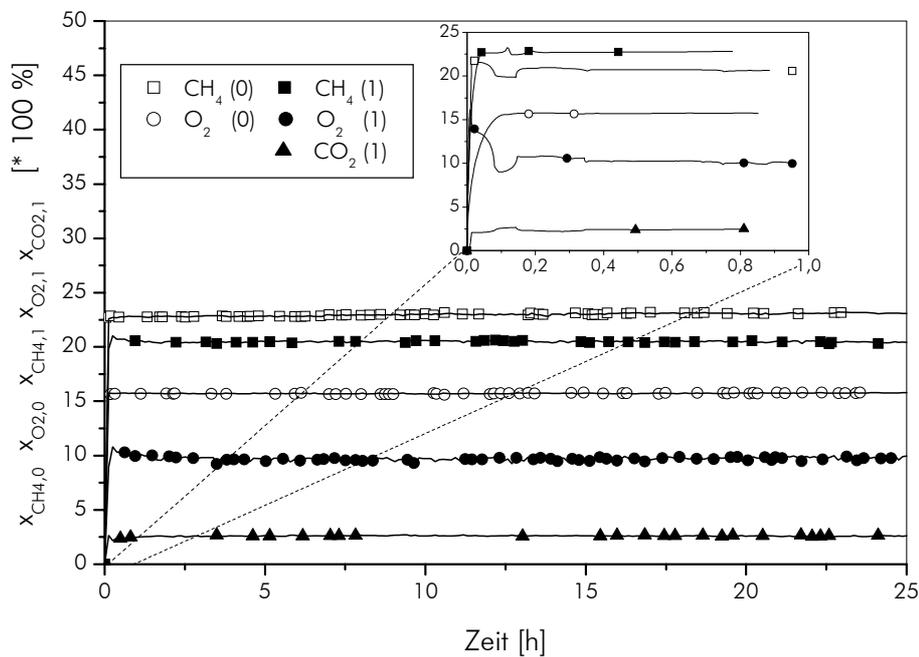


Abb. 4-8: Prozentuale Zusammensetzung des Eingangs- und Ausgangsgases ( $x_{CH_4,0}$  (□),  $x_{O_2,0}$  (○),  $x_{CH_4,1}$  (■),  $x_{O_2,1}$  (●),  $x_{CO_2,1}$  (▲)) während kontinuierlicher Kultivierung (UD 50,  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ ). Das obere Diagramm zeigt vergrößert den Zeitraum der ersten Versuchsstunde.

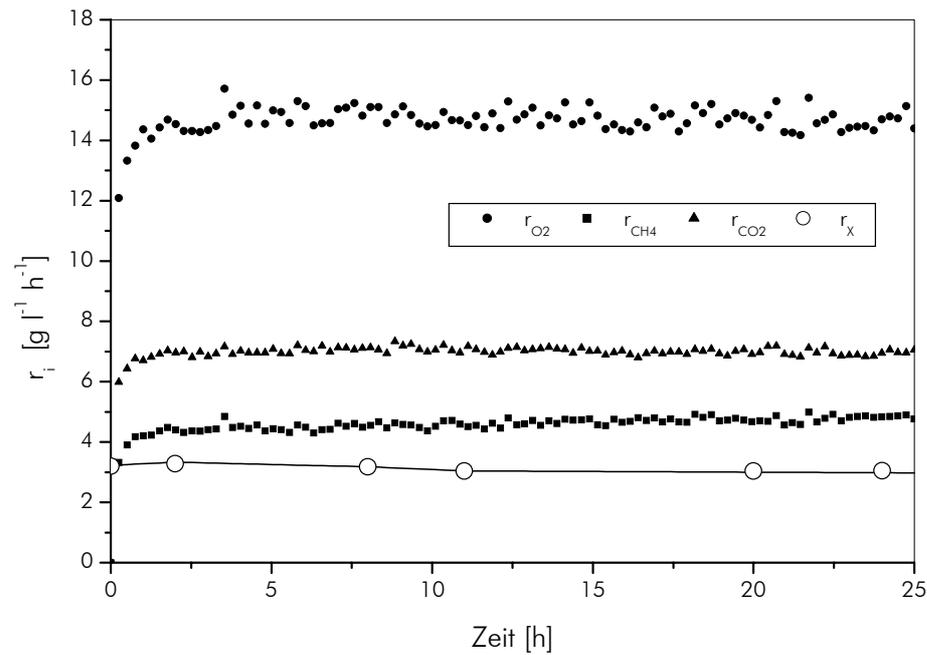


Abb. 4-9: Spezifische Verbrauchsraten für Methan (■), Sauerstoff (●), Kohlendioxid (▲) und Produktivität der Biomassebildung (○) bei kontinuierlicher Kultivierung (UD 50,  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ )

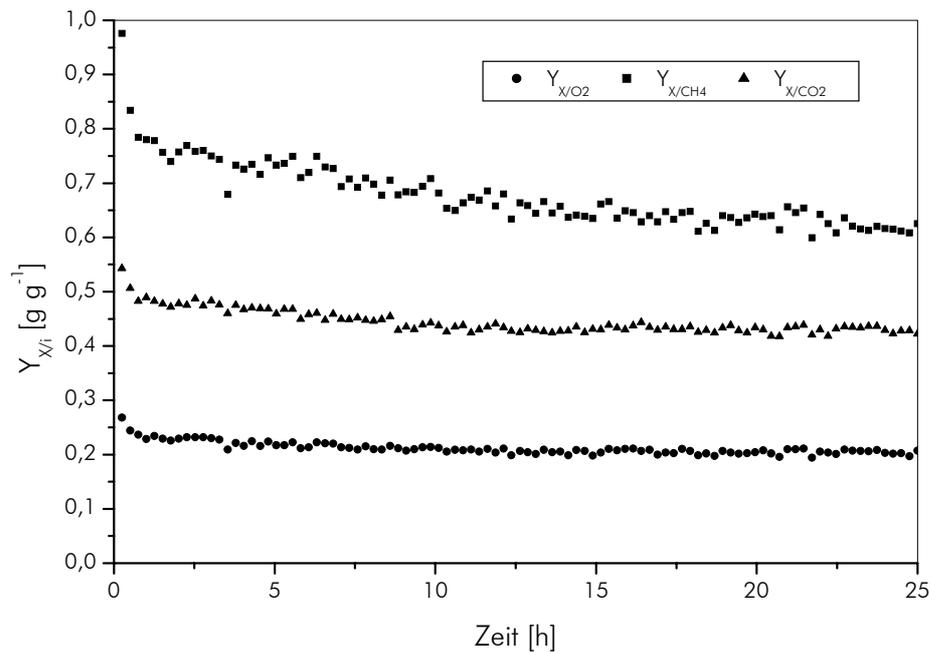


Abb. 4-10: Ausbeutekoeffizienten der Biomassebildung bezogen auf Methanverbrauch (■), Sauerstoffverbrauch (●) und Kohlendioxidbildung (▲) während kontinuierlicher Kultivierung (UD 50,  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ )

Mit dem beispielhaft beschriebenen Prozeß war die jederzeit reproduzierbare Gewinnung von Impfmateriale der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente GB 25) in Biomassekonzentrationen  $14,7\text{--}16,3 \text{ g l}^{-1}$  (UD 5) bzw.  $17,3\text{--}19,1 \text{ g l}^{-1}$  (UD 50) und konstanten Ausbeuten möglich. Unterschiede zwischen den Reaktoren ergeben sich aus den reaktorspezifischen Parametern, die die Stoffübergangsraten bestimmen. Der UD 50 ist unter vergleichbaren

Bedingungen ( $N = \max.$ ,  $F_{G,0} = \max.$ ) durch eine ca. 20 % höhere Sauerstoffübergangsrate charakterisiert. Ein Vergleich der  $k_L a$ -Werte für Sauerstoff (berechnet nach Gleichung 3.1) belegt das (UD 5:  $1990 \text{ h}^{-1}$ , UD 50:  $2708 \text{ h}^{-1}$ ).

Umfassende Ergebnisse zur Charakterisierung der Mischkultur und zu dem Nachweis ihrer Stabilität sind in Kapitel 4.6 dargestellt.

#### 4.3.2 WACHSTUMSPROZEß IN VORBEREITUNG DER PHB-BILDUNG

Die in o.g. Prozessen kultivierte Biomasse diente als das Inokulum für die PHB-Bildungsprozesse. In Vorbereitung der PHB-Bildungsphase bestand das Ziel, maximale Biomassekonzentrationen zu erreichen. Dies war durch eine Erhöhung der Stoffübergänge für Sauerstoff und Methan mittels Druck ( $p < 5000 \text{ mbar}$ ) möglich. Der Druckanstieg bedingte eine höhere Sättigungskonzentration (Gl. 2.18) und führte damit zur Steigerung der Triebkraft des Stoffübergangs. Die weiteren Bedingungen entsprachen den optimalen Einstellungen.

Die Abbildungen 4-11 bis 4-14 zeigen einen typischen Wachstumsprozeß in Vorbereitung der PHB-Synthese im UD 50, der über einen Zeitraum von 24 h geführt wurde. Der Prozeß wurde mit einer Biomassekonzentration von  $19,1 \text{ g l}^{-1}$  gestartet, innerhalb von 20 min erfolgte die Erhöhung der Rührerdrehzahl zum Maximalwert und der Übergang zur kontinuierlichen Betriebsweise. Die Zusammensetzung der Ein- und Ausgangsgase zeigt Abb. 4-11. Hier sind sprunghafte Veränderungen, z.B. bei  $t = 5 \text{ h}$ , zu erkennen. Die Einstellung der optimalen Gelöstsauerstoffkonzentration erfolgte durch wechselseitiges Erhöhen von Gasmenge und Systemdruck in Schritten von  $10 \text{ l min}^{-1}$  bzw.  $500\text{--}750 \text{ mbar}$  (Abb. 4-12). Die beobachteten Sprünge in der Zusammensetzung des Abgases wurden durch die stufenweise Erhöhung des Drucks verursacht. Im dargestellten Beispiel wird ein weiteres Problem der manuellen Prozeßführung deutlich. Unmittelbar nach der Druckerhöhung wurde die optimale Gelöstsauerstoffkonzentration schnell überschritten. Dies kann zu Aktivitätsverlusten führen, da Sauerstoff in höheren Konzentrationen inhibierend auf das Wachstum wirkt [ $K_{i,O_2} = 22,5 \text{ mg l}^{-1}$ , WENDLANDT et al. 1993]. Die Konzentration der Biomasse erhöhte sich während des Prozesses auf  $25,7 \text{ g l}^{-1}$ . Abb. 4-13 zeigt den Zusammenhang zwischen Druck und spezifischen Gasreaktionsraten: mit Erhöhung des Systemdrucks stiegen die Gasreaktionsraten sprunghaft an, das Profil der Druckerhöhung spiegelt sich auch in den Verläufen der Stoffübergangsgeschwindigkeiten wider. Über den Zeitraum des Prozesses betrachtet, konnten die Stoffübergangsraten jeweils verdoppelt werden. Folgende Endwerte stellten sich ein ( $t = 23 \text{ h}$ ,  $p = 2500 \text{ mbar}$ ,  $F_{G,0} = 6000 \text{ l h}^{-1}$ ):  $r_{O_2} = 22,02 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $r_{CH_4} = 6,94 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bzw.  $r_{CO_2} = 10,57 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Die Steigerung der Biomassekonzentration und damit der Produktivität erfolgte verzögert, da der schnell zur Verfügung stehende Sauerstoff zuerst für die Synthese von Zellbestandteilen verwendet wird. Nach der letzten Druckerhöhung ( $t = 12 \text{ h}$ ) näherte sich der Prozeß dem Gleichgewichtszustand, der unter diesen Bedingungen praktisch nicht erreicht wird, da bis zum Ende eine geringe Zunahme der Biomassekonzentration erfolgte. Diese Aussage bestätigte der zeitliche Verlauf der Ausbeuten, die im Zeitraum von 12 bis 23 h eine steigende Tendenz haben (Abb. 4-14). Dies ist mit der verzögerten Erhöhung der Biomassekonzentration bei nahezu konstanten spezifischen Gasübergangsraten in diesem Abschnitt zu begründen. In dem darge-

stellten Experiment wurden nach 23 Stunden Ausbeuten  $Y_{X/O_2} = 0,2$  bzw.  $Y_{X/CH_4} = 0,63 \text{ g g}^{-1}$  erreicht.

Durch die Erhöhung des Systemdrucks konnte eine Steigerung der Übergangsraten für Sauerstoff auf 149,8 % bzw. Methan auf 144,6 % im Vergleich zu den Werten der Impfmateri-  
gewinnung ohne Druck erzielt werden. Dies ist vergleichbar mit der Erhöhung der Biomasse-  
konzentration auf 141,2 %.

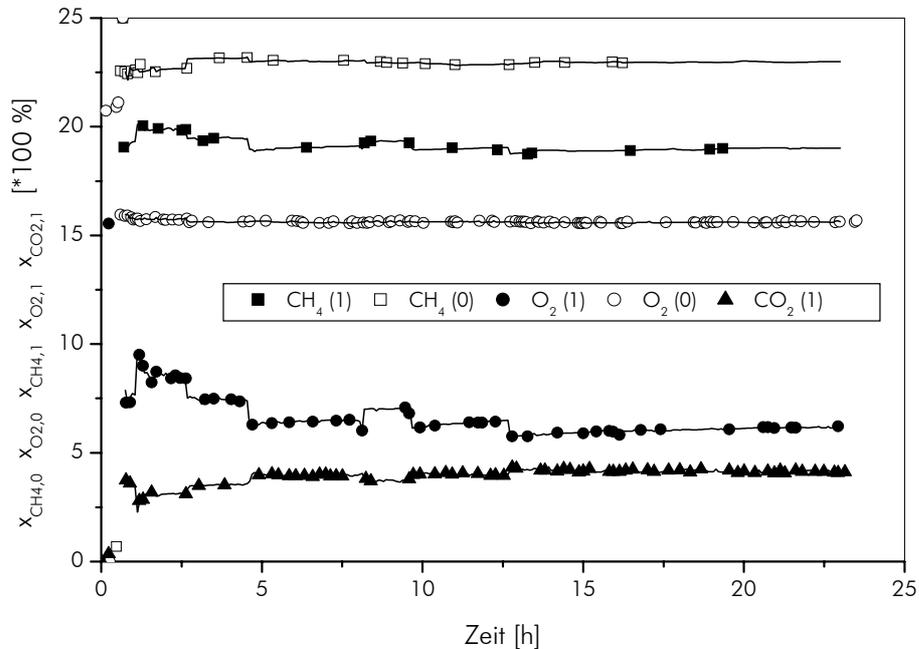


Abb. 4-11: Zusammensetzung der Ein- und Ausgangsgase ( $x_{CH_4,0}$  ( $\square$ )  $x_{O_2,0}$  ( $\circ$ )  $x_{CH_4,1}$  ( $\blacksquare$ )  $x_{O_2,1}$  ( $\bullet$ )  $x_{CO_2,1}$  ( $\blacktriangle$ )) während eines Wachstumsprozesses mit erhöhtem Systemdruck (UD 50,  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ )

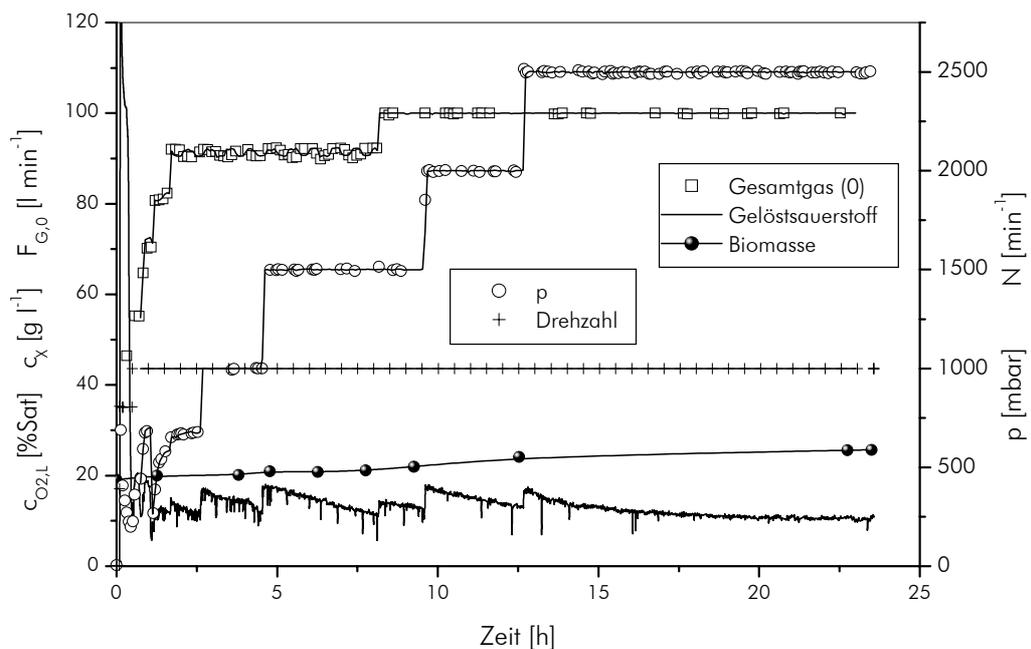


Abb. 4-12: Zeitlicher Verlauf von Biomassekonzentration ( $\bullet$ ) Gelöstsauerstoffkonzentration(-), Gesamtbelegung ( $\square$ ), Systemdruck ( $\circ$ ) und Drehzahl (+) während eines Wachstumsprozesses unter erhöhtem Systemdruck (UD 50,  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ )

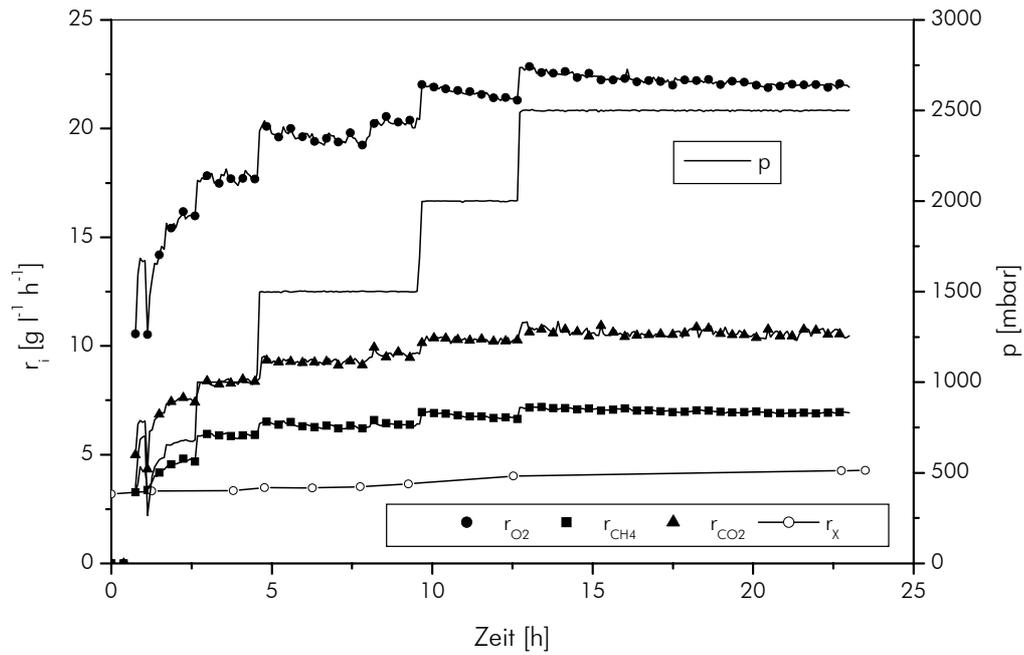


Abb. 4-13: Spezifische Gasreaktionsraten für Sauerstoff (●), Methan (■), Kohlendioxid (▲) und Produktivität (○) sowie Systemdruck (–) während eines Wachstumsprozesses mit erhöhtem Systemdruck (UD 50,  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ )

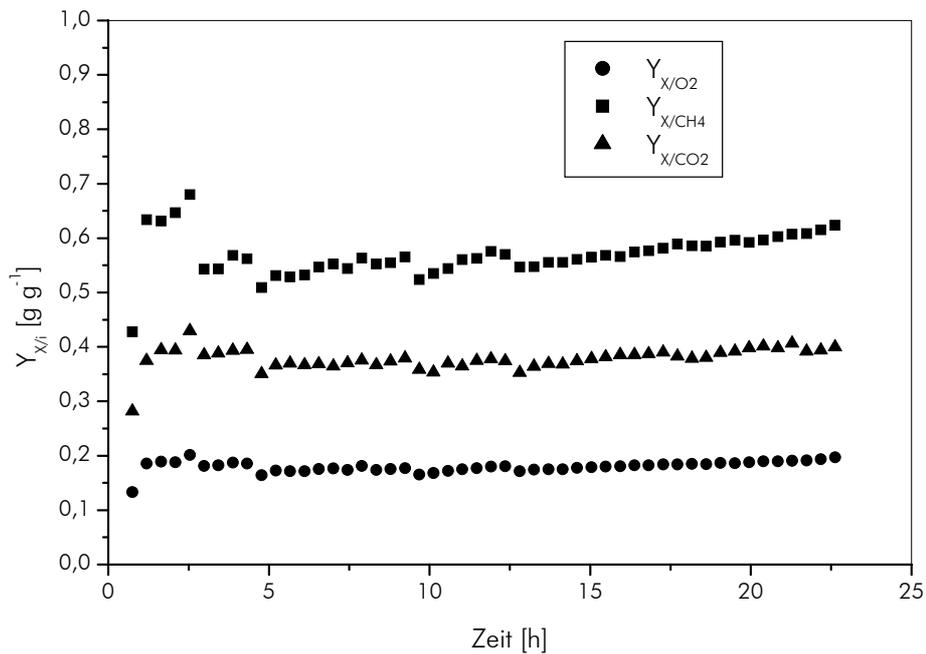


Abb. 4-14: Ausbeuten der Biomassebildung bezogen auf Methanverbrauch (■), Sauerstoffverbrauch (●) und Kohlendioxidbildung (▲) während eines Wachstumsprozesses mit erhöhtem Systemdruck (UD 50,  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ )

Das beschriebene Prozeßregime wurde als Standardanzucht der Biomasse in Vorbereitung von PHB-Bildungsprozessen angewendet. Die beschriebenen Ergebnisse konnten mit Abweichungen von maximal 5 % reproduziert werden.

**Tabelle IV-6:** Beispiele für Wachstumsprozesse zur PHB-Bildung (Für alle Prozesse werden die Ergebnisse nach 20–22 h Kultivierung gezeigt; Gesamtbegasung  $100 \text{ l min}^{-1}$ ,  $p_{\text{max.}}=2500 \text{ mbar}$ , *ratio*: 25 %  $\text{CH}_4$ ,  $c_{\text{O}_2, \text{L}}=10\text{--}15 \text{ \%Sat}$ ,  $c_x=24\text{--}26 \text{ g l}^{-1}$ , UD 50)

| p                  | $r_{\text{O}_2}$                     | $r_{\text{CH}_4}$                    | $r_{\text{CO}_2}$                    | $r_x$                                |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| [mbar]             | [ $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ] |
| 2500               | 21,91                                | 6,82                                 | 10,24                                | 4,35                                 |
| 2500               | 22,39                                | 6,93                                 | 9,96                                 | 4,20                                 |
| 2500               | 21,88                                | 6,82                                 | 10,24                                | 4,22                                 |
| 2500               | 22,17                                | 6,86                                 | 10,25                                | 4,21                                 |
| <b>Mittelwerte</b> | <b><math>22,09 \pm 0,21</math></b>   | <b><math>6,86 \pm 0,05</math></b>    | <b><math>10,17 \pm 0,12</math></b>   | <b><math>4,25 \pm 0,06</math></b>    |

Für die Ausbeuten dieser Versuche wurden folgende Mittelwerte bestimmt:

$$Y_{x/\text{O}_2} = 0,192 \pm 0,004 \text{ g g}^{-1}$$

$$Y_{x/\text{CH}_4} = 0,619 \pm 0,012 \text{ g g}^{-1}$$

$$Y_{x/\text{CO}_2} = 0,417 \pm 0,006 \text{ g g}^{-1}$$

Während des Bearbeitungszeitraumes wurden alle Wachstumsprozesse in Vorbereitung der PHB-Synthese kontinuierlich bei einer Verdünnungsrate von  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$  über einen Zeitraum von 18–24 h durchgeführt. Diese Entscheidung wurde getroffen, obwohl im *batch*-Verfahren bzw. mit geringeren Durchflußraten die gewünschte Startbiomassekonzentration für die PHB-Bildung schneller erreicht worden wären. Das folgende Argument sprach jedoch für die gewählten Prozeßbedingungen:

In *chemostat*-Experimenten gilt allgemein: mit sinkender Verdünnungsrate ( $D=\mu$ ) verschlechtern sich die Ausbeuten, da das Substrat weniger effektiv für Wachstum und Zellteilung genutzt und ein zunehmender Teil des Substrates für den Erhaltungsstoffwechsel verbraucht wird. Die Abhängigkeit der Ausbeutekoeffizienten von der Wachstumsrate wurde zu einem früheren Zeitpunkt in Untersuchungen mit der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) für Methan und Sauerstoff nachgewiesen [SCHNEIDER et al. 1983].

Dieser Zusammenhang wird durch die Einführung einer wahren Ausbeute  $Y_{\text{EW}}$  und eines Terms für den Erhaltungsstoffwechsel  $w$  beschrieben:

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{Y_{\text{EW}}} + w \cdot \frac{1}{\mu} \quad (4.1)$$

und kann in dieser Form zur Ermittlung der Konstanten ( $Y_{\text{EW}}$ ,  $w$ ) aus *chemostat*-Experimenten genutzt werden [BERGTER 1983].

Mit Kenntnis des Terms für den Erhaltungsstoffwechsels am Gesamtverbrauch sollte die Entscheidung bezüglich der Prozeßführung im Hinblick auf die Festlegung der optimalen Verdünnungsrate überprüft werden. Dazu wurden im UD 5 *chemostat*-Prozesse unter Sauerstofflimitation (ohne Druck) mit unterschiedlichen Verdünnungsraten durchgeführt und hinsichtlich der

spezifischen Gasübergangsraten, Biomassebildung und Ausbeuten analysiert (Tabelle IV-7). Hierbei wurden stets die für den Reaktor bestimmten Gasreaktionsraten erreicht, die Produktivität der Biomassebildung nahm jedoch mit zunehmender Verweilzeit ab. Abb. 4-15 zeigt die Korrelation zwischen den reziproken Ausbeuten der Biomasse- bzw. CO<sub>2</sub>-Bildung aus Methan, Sauerstoff und der eingestellten Verdünnungsrate. Es zeigte sich, daß mit abnehmender Verdünnungsrate die Ausbeuten geringer werden. Aus der linearen Beziehung wurde anhand des Schnittpunktes mit der Y-Achse die wahre Ausbeute  $Y_{EW}$  und aus dem Anstieg der Gerade der Term des Erhaltungsstoffwechsels  $w$  ermittelt.

Normiert man die Ausbeuten von Sauerstoff und Methan auf den niedrigsten Wert (bei  $1/D=5$  h) wird deutlich, daß die Anteile des Sauerstoff- und Methanverbrauches für den Erhaltungsstoffwechsel im Verhältnis zum Gesamtverbrauch gleich groß sind (kleines Diagramm in Abb. 4-15).

Tabelle IV-7: Gasreaktionsraten und Produktivität der Biomassebildung bei kontinuierlicher Kultivierung mit verschiedenen Verdünnungsraten (UD 5, *ratio*: 25 % CH<sub>4</sub>)

| D                  | $r_{O_2}$                            | $r_{CH_4}$                           | $r_{CO_2}$                           | $c_X$                | $r_X$                                |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| [h <sup>-1</sup> ] | [g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | [g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | [g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | [g l <sup>-1</sup> ] | [g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |
| 0,2                | 12,00                                | 4,08                                 | 6,24                                 | 12,72                | 2,57                                 |
| 0,17               | 12,27                                | 4,20                                 | 6,43                                 | 15,53                | 2,55                                 |
| 0,1                | 12,30                                | 4,19                                 | 6,59                                 | 21,47                | 2,18                                 |
| 0,07               | 11,75                                | 3,93                                 | 6,35                                 | 25,81                | 1,81                                 |

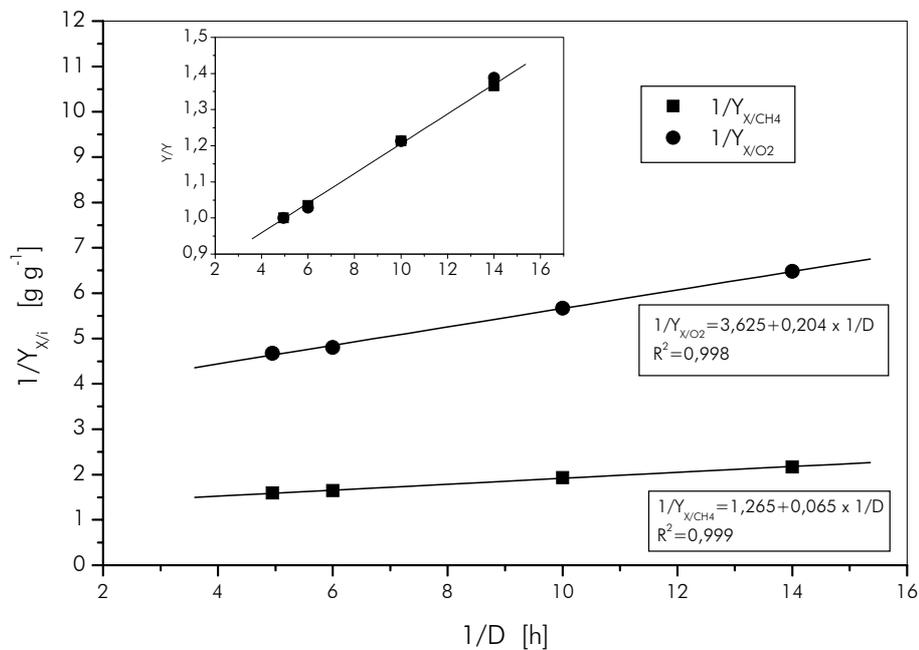


Abb. 4-15: Abhängigkeit der reziproken Ausbeuten von Sauerstoff (●) und Methan (■) von der reziproken Verdünnungsrate bei kontinuierlicher Kultivierung (UD 5). (Das kleine Diagramm zeigt normierte Darstellung, wobei der Wert der höchsten untersuchten Verdünnungsrate = 1 gesetzt wurde.)

Folgende Beziehungen wurden ermittelt,

$$\text{mit } Y_{x/i} = \frac{1}{Y_{i/x}} \quad (4.2)$$

$$\text{➤ Sauerstoff: } Y_{O_2/X} = 3,62 + 0,203 \cdot \frac{1}{D} \quad (4.3)$$

$$\text{➤ Methan: } Y_{CH_4/X} = 1,265 + 0,065 \cdot \frac{1}{D} \quad (4.4)$$

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Anzuchtprozesse der PHB-Bildung kontinuierlich mit  $D = 0,167 \text{ h}^{-1}$  durchgeführt. Diese Verdünnungsrate wurde im Hinblick auf eine stabile Prozeßführung niedriger als die maximale Wachstumsrate gewählt ( $D = 0,6 \times \mu_{\max}$ ) und ermöglichte bei entsprechenden Stoffübergängen und Bereitstellung von Nährsalzen noch einen Zuwachs während der kontinuierlichen Kultivierung.

Folgende Empfehlungen für den Wachstumsprozeß können zusammengefaßt werden:

- Die Gewinnung von Impfmateriale sollte bei  $D = 0,167 \text{ h}^{-1}$  bei den in Tabelle IV-3 angegebenen Bedingungen unter Normaldruck durchgeführt werden.
- Dieses Material kann bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  mindestens drei Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert und ohne *lag*-Phase erneut eingesetzt werden.

Die Erneuerung des Impfmateriale sollte regelmäßig, mindestens im Abstand von drei Monaten erfolgen. Bei Bedarf kann auf Tiefkühlkonserven der Mischkultur zurückgegriffen werden.

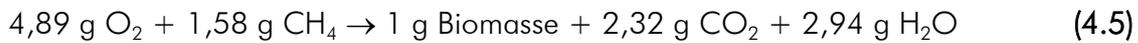
- Wachstumsprozesse mit nachfolgender PHB-Bildung sind zwecks Realisierung hoher Biomassekonzentrationen zum Start der PHB-Synthese kontinuierlich ( $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ ) unter den genannten Bedingungen unter erhöhtem Systemdruck zu führen. Dabei sollte die Einstellung der optimalen Gelöstsauerstoffkonzentration idealerweise durch eine Kaskadenregelung erfolgen.

Die Dauer des Anzuchtprozesses muß entsprechend der technischen Voraussetzungen (Anzahl der Reaktoren, Bedienungspersonal) angepaßt werden. Zu empfehlen ist die Trennung von Wachstums- und Produktbildungsreaktoren.

Für diese Arbeit stand jeweils nur ein Bioreaktor (mit 4 l- bzw. 40 l-Arbeitsvolumen) für Wachstum bzw. PHB-Bildung zur Verfügung. Für einen Prozeß im technischen Maßstab empfiehlt sich der Einsatz mehrerer Reaktoren. Die in einem Reaktor kontinuierlich erzeugte Biomasse kann dann als Material für mehrere Produktbildungsreaktoren, die bezüglich Größe und Anzahl auf den Anzuchtbioreaktor abgestimmt sind, dienen. Somit könnte eine quasi-kontinuierliche PHB-Produktion realisiert werden.

### 4.3.3 UMSATZGLEICHUNGEN FÜR DIE BILDUNG VON BIOMASSE AUS METHAN

Aus den berechneten Ausbeuten der kontinuierlichen Kultivierung der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) unter Sauerstofflimitation ( $D = 0,167 \text{ h}^{-1}$ ) kann die folgende Umsatzgleichung aufgestellt werden:



Mit Berücksichtigung der chemischen Zusammensetzung der Biomasse (siehe 4.3.4.1, Tabelle IV-9) und auf ein C-mol in der Biomasse bezogen, gilt:



Die Bilanzierung der Gasverbräuche und Biomassebildung, auf die grundlegenden Elemente C, H, O bezogen, zeigt für Kohlenstoff und Sauerstoff nur geringe Abweichungen von ca. 6 % (Tabelle IV-8), was als Hinweis auf die Richtigkeit der stöchiometrischen Gleichung gewertet werden kann.

Tabelle IV-8: Bilanz der Biomassebildung aus Methan und Sauerstoff (nach Gl. 4.6)

| Element | Substrat [mol] |                 | Produkt [mol] |                 |                  | Bilanz |       |
|---------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|------------------|--------|-------|
|         | O <sub>2</sub> | CH <sub>4</sub> | Biomasse      | CO <sub>2</sub> | H <sub>2</sub> O | [mol]  | [%]   |
| C       |                | 2,40            | 1,00          | 1,29            |                  | 0,12   | 4,85  |
| O       | 7,45           |                 | 0,48          | 2,57            | 3,98             | 0,43   | 5,72  |
| H       |                | 9,61            | 1,77          |                 | 7,96             | -0,12  | -1,23 |

Für die unter 2.2.3.1 beschriebenen Kennziffern ergibt sich:

$$\beta_{\text{O}_2/X} = 3,73 \text{ mol O}_2 (\text{C-mol X})^{-1}$$

$$\text{CCE} = 41,67 \text{ \%}$$

Für den molaren Sauerstoffbedarf und den Kohlenstoffkonversionsgrad sind die ermittelten Werte schlechter als die theoretisch für Methan angegebenen ( $\beta_{\text{O}_2/X} = 2,46$  bzw.  $\text{CCE} = 60 \text{ \%}$ ). Dies ergibt sich durch den Einfluß der real ermittelten Ausbeute  $Y_{X/\text{CH}_4} = 0,63 \text{ g g}^{-1}$ , die niedriger ist, als der Wert ( $Y_{X/\text{CH}_4} = 1,1 \text{ g g}^{-1}$ ), der für die theoretischen Berechnungen zugrunde gelegt wurde [RATLEDGE 2001].

Das stöchiometrische Verhältnis Sauerstoff zu Methan von 1,55 stimmt gut mit einem theoretischen Wert von 1,5 überein [ASENJO und SUK 1986b].

### 4.3.4 CHARAKTERISIERUNG DER BIOMASSE UND DER KULTURFLÜSSIGKEIT

#### 4.3.4.1 Chemische Zusammensetzung der Biomasse

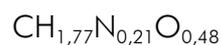
Die chemische Zusammensetzung der Biomasse diente als Grundlage für die Erstellung der Bilanz für deren Bildung. Eine weitere Frage war, ob Änderungen in der Zusammensetzung zwischen Wachstumsprozessen und PHB-Synthese erkennbar sind.

Zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung wurden während des gesamten Bearbeitungszeitraumes Proben aus Wachstumsprozessen zur Gewinnung von Impfmateriale und in Vorbereitung der PHB-Synthese analysiert. In Tabelle IV-9 sind diese Ergebnisse dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte, wobei die relative Standardabweichung 1–2 % für alle Elemente beträgt. Zu bemerken ist, daß während des Wachstumsprozesses stets PHB vorhanden war, allerdings mit einem sehr niedrigen Anteil von 1–3 % in der Biomasse.

Tabelle IV-9: Chemische Zusammensetzung der methanverwertenden Mischkultur (ausgewählte Komponenten, \* berechnet aus Differenz)

| Element | Anteil |                      |
|---------|--------|----------------------|
|         | %      | mg g X <sup>-1</sup> |
| C       | 49,25  |                      |
| H       | 7,33   |                      |
| N       | 11,81  |                      |
| O*      | 31,31  |                      |
| P       |        | 16,62                |
| Mg      |        | 2,02                 |
| K       |        | 5,66                 |
| S       |        | 5,66                 |
| Cu      |        | 0,20                 |
| Fe      |        | 0,26                 |
| Mn      |        | 0,18                 |

Basierend auf der chemischen Zusammensetzung (Tabelle IV-9) kann die folgende Summenformel für die Biomasse (bezogen auf ein C-mol und die Hauptelemente C, H, N, O) angegeben werden:



#### 4.3.4.2 Zusammensetzung der Kulturflüssigkeit während der kontinuierlichen Wachstumsphasen

Bei Kenntnis der Zusammensetzung der Kulturflüssigkeit können Aussagen über die Bildung von extrazellulären Stoffwechselprodukten gemacht werden. Weiterhin können z.B. aus Viskosität Aussagen über die Aufarbeitungseigenschaften der Suspension abgeleitet werden.

Die Kulturflüssigkeit läßt sich durch vier Parameter charakterisieren:

- Konzentration bestimmter Ionen
- Restsalzkonzentration
- Gehalt an organischem Kohlenstoff
- Kinematische Viskosität

#### 4.3.4.2.1 Ionen in der Kulturflüssigkeit

Mittels Ionenchromatographie, Küvettentest und anderen Analysen (siehe Kapitel 3.6) wurden Konzentrationen verschiedener Anionen und Kationen in der Kulturflüssigkeit bestimmt. Als Idealzustand wurde ein Überschuß der essentiellen Ionen für einen Biomassezuwachs von  $2 \text{ g l}^{-1}$  angestrebt, was einer Konzentration von Phosphat-Phosphor (als Leition) von  $40 \text{ mg l}^{-1}$  entsprach. Typische Konzentrationen weiterer Ionen während einer kontinuierlichen Kultivierung zeigt Tabelle IV-10. Die Konzentrationen von Sulfat, Kalium und Calcium waren durch den zusätzlichen Eintrag mit dem Wasserstrom (Leitungswasser) deutlich höher als sich durch die Dosierung der Nährlösung ergeben hätte. Routineanalysen des Leitungswassers ergaben keine nennenswerten Mengen an Nitrat und Nitrit, nachweisbar waren in erheblichen Konzentrationen Sulfat, Chlorid, Kalium, Calcium und z. T. Magnesium. Die Kupferkonzentration im Leitungswasser wurde detailliert untersucht. Ein zusätzlicher Eintrag wäre hier kritisch, da bereits ein dreifacher Überschuß (bezogen auf den Bedarfswert  $Y_{\text{Cu}/X}$ ) zur Reduzierung der Wachstumsgeschwindigkeit um 70 % führt [WENDLANDT et al. 1987]. Das Problem schwankender Kupferkonzentrationen mit Maximalwerten von bis zu  $1 \text{ mg l}^{-1}$  im Leitungswasser führte teilweise zu erheblichen Schwierigkeiten bei der Kultivierung. Dieses Problem wurde durch den Austausch der Kupferleitungen durch Leitungen aus Edelstahl bzw. Kunststoff gelöst (Kupferkonzentrationen  $< 0,1 \text{ mg l}^{-1}$ ). Für die zusätzlich eingetragenen Ionen ist u.a. für Kalium und Magnesium ein Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit erst zu beobachten, wenn die Überschüsse den achtfachen Bedarfswert übersteigen [WENDLANDT et al. 1987]. Daher kann aus praktischen Gründen Leitungswasser anstelle von demineralisiertem Wasser verwendet werden.

Tabelle IV-10: Konzentrationen ausgewählter Ionen während der kontinuierlichen Kultivierung der methanotrophen Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25,  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$ )

| Anionen            | $c_{i,L}$              | Kationen         | $c_{i,L}$              |
|--------------------|------------------------|------------------|------------------------|
|                    | [ $\text{mg l}^{-1}$ ] |                  | [ $\text{mg l}^{-1}$ ] |
| $\text{Cl}^-$      | 28–32                  | $\text{Na}^+$    | 18–23                  |
| $\text{NO}_2^-$    | 0–5                    | $\text{NH}_4^+$  | 70–100                 |
| $\text{NO}_3^-$    | 50–100                 | $\text{K}^+$     | 70–80                  |
| $\text{PO}_4^{3-}$ | 120–180                | $\text{Mg}^{2+}$ | 5–10                   |
| $\text{SO}_4^{2-}$ | 250–300                | $\text{Ca}^{2+}$ | 45–50                  |

Das Auftreten von Nitrat und Nitrit im Medium ist, obwohl nicht mit der Nährlösung zugegeben, wie folgt zu erklären. Das Schlüsselenzym in Methanotrophen, die Methan-Monooxygenase (MMO), kann neben Methan auch Ammoniak (oder Ammoniumionen) oxidieren, wobei als Zwischenprodukt Hydroxylamin und als Produkt Nitrit entsteht [u.a. O'NEILL und WILKINSON 1977, YOSHINARI 1985, BEDARD und KNOWLES 1989].

Bei kontinuierlichen Wachstumsprozessen mit der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) wurden Nitrat-Ionen praktisch zu jedem Zeitpunkt nach-

gewiesen, Nitrit-Ionen in ca. 75 % der untersuchten Proben. Dabei war das Auftreten von Nitrit und Nitrat von der Konzentration des Ammoniumstickstoff abhängig. Der Gesamtstickstoff im Medium lag unter Standardbedingungen zu etwa 70–80 % als  $\text{NH}_4\text{-N}$ , zu 15–20 % als  $\text{NO}_3\text{-N}$  und zu 0–10 % als  $\text{NO}_2\text{-N}$  vor. Bei Eintreten von Ammoniumstickstoffmangel wurden innerhalb kurzer Zeit auch Nitrit und Nitrat verbraucht. Dabei kann nicht abgeleitet werden, ob dies durch die methanotrophe Hauptkomponente oder die Begleitorganismen erfolgte.

#### 4.3.4.2.2 Restsalzkonzentration

Die verwendete Nährlösung zeichnete sich durch ein ausgewogenes Verhältnis aller essentieller Ionen aus. Die Restsalzgehalte (bestimmt als Trockenrückstand) bei Bilanzierung für  $2 \text{ g l}^{-1}$  Zuwachs (und Verwendung von Leitungswasser) lagen in einem Bereich von  $c_{\text{TRS}} = 1,0 \text{ g l}^{-1}$  ( $\pm 5 \%$ ), unabhängig davon, ob Wachstumsprozesse mit oder ohne Druck durchgeführt wurden.

Interessant ist diese Fragestellung im Zusammenhang mit früheren Ergebnissen zur Kultivierung methanotropher Mischkulturen, wonach eine Restsalzkonzentration von  $> 7 \text{ g l}^{-1}$  als kritisch zu bewerten ist, da es zur Erniedrigung der Produktivität und Schleimbildung kommt [WENDLANDT 1979]. Dies ist unter den gegebenen Bedingungen nicht zu erwarten.

#### 4.3.4.2.3 Organischer Kohlenstoff

Der Gehalt an organischem Kohlenstoff in der biomasse- und PHB-freien Kulturflüssigkeit, der sich aus ausgeschiedenen Stoffwechsel- und Zell-Lyseprodukten zusammensetzt, wurde als Summenparameter über die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) analysiert. Diese Größe gibt Auskunft über den Anteil des Kohlenstoffs, der weder als Biomasse bzw. PHB noch als  $\text{CO}_2$  erfaßt wird und als Endprodukt in der Kulturflüssigkeit verbleibt.

Der CSB-Gehalt der Kulturflüssigkeit stieg mit der Konzentration der Biomasse an (Tabelle IV-11). Um diesen Effekt zu berücksichtigen, wurde auf die vorhandene Biomasse normiert und so ein spezifischer Bildungskoeffizient  $F_{\text{CSB/X}}$  erhalten. Wie aus Tabelle IV-11 weiter hervorgeht, unterschied sich die Bildung von Stoffwechselprodukten pro Gramm vorhandene Biomasse bei Kultivierungen ohne Druck (Gewinnung von Impfmateriale) und unter erhöhtem Systemdruck (in Vorbereitung der PHB-Synthese). Unter erhöhtem Druck war eine gesteigerte Bildung von Stoffwechsel- und Lyseprodukten zu beobachten.

#### 4.3.4.3 Kinematische Viskosität der Kulturflüssigkeit

Die kinematische Viskosität der Kulturflüssigkeit wurde durch Messungen des klaren Überstandes bestimmt und war für den Fermentationsprozeß in zweierlei Hinsicht von Bedeutung:

- Einfluß auf die Stoffübergangsraten von Methan und Sauerstoff (siehe Tabelle II-14)
- Einfluß auf die Aufarbeitungseigenschaften (speziell bei Zentrifugation) der Biomassesuspension.

Die Messungen ergaben keine Abhängigkeit der Viskosität vom vorhandenen Druck im Bioreaktor. Während der kontinuierlichen Wachstumsprozesse betrug die kinematische Viskosität des Mediums (bei  $T=25^{\circ}\text{C}$ ) im Mittel:

$$\eta_{\text{kin}} = 1,07 \pm 0,07 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$$

und lag damit etwa im Bereich des für demin. Wasser gemessenen Wertes:

$$\eta_{\text{kin,H}_2\text{O}} = 0,932 \pm 0,02 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}.$$

Tabelle IV-11: CSB der Kulturflüssigkeit in kontinuierlichen Wachstumsprozessen

|   | CSB                   | $c_x$                | $F_{\text{CSB}/X}$    |
|---|-----------------------|----------------------|-----------------------|
|   | [mg l <sup>-1</sup> ] | [g l <sup>-1</sup> ] | [mg g <sup>-1</sup> ] |
| Wachstumsprozesse zur Gewinnung von Impfmateri-<br>al ( $p < 500$ mbar)         | 85,1                  | 8,36                 | 10,18                 |
|   | 130                   | 11,87                | 10,95                 |
|   | 151                   | 15,62                | 9,67                  |
|   | 147                   | 15,78                | 9,32                  |
|   | 155                   | 15,32                | 10,12                 |
|   | 240                   | 18,25                | 13,15                 |
|   | 196                   | 17,9                 | 10,95                 |
|   | 221                   | 17,86                | 12,37                 |
|   | Mittelwert            |                      | $10,84 \pm 1,24$      |
| Wachstumsprozesse in Vorbereitung der PHB-Synthese<br>( $2000 < p < 3000$ mbar) | 623                   | 25,94                | 24,07                 |
|   | 570                   | 24,2                 | 23,55                 |
|   | 462                   | 22,69                | 20,36                 |
|   | 624                   | 26,73                | 23,34                 |
|   | 623                   | 24,89                | 25,03                 |
|   | 646                   | 23,83                | 27,11                 |
|   | Mittelwert:           |                      | $23,9 \pm 2,02$       |

#### 4.4 Untersuchungen zur PHB-Synthese

##### 4.4.1 NACHWEIS DER NICHTWACHSTUMSASSOZIERTEN PHB-SYNTHESE BEI *METHYLOCYSTIS* SP. GB 25

Der Begriff „nichtwachstumsassoziierte Produktbildung“ muß im eigentlichen Sinn auf die Betrachtung einer einzelnen Zelle bezogen werden, in der entweder Wachstums- bzw. Zellteilungs- oder Produktbildungsprozesse ablaufen. Weiterhin sind dies Prozesse, die durch äußere Mangelbedingungen ausgelöst werden. Im weiteren Sinn wird dieser Begriff bei der Betrachtung der PHB-Synthese für die getrennte Bildung von Biomasse und PHB gebraucht.

Grundlegende Aussagen über die Art der PHB-Akkumulation können durch die Bestimmung des PHB-Gehaltes während des unlimitierten Wachstums und die Bestimmung von Zellzahl und Biomassekonzentration unter Bedingungen der PHB-Synthese getroffen werden. Detail-

lierte Aussagen könnten *flow-cytometrische* Messungen, d.h. die Betrachtung des Zustandes einzelner Zellen, erbringen.

Während der Gewinnung von Impfmateriale, die wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben unter Sauerstofflimitation bei einem Überangebot aller anderen Nährstoffe und Methan durchgeführt wurde, ergaben Analysen der Biomasse durchschnittliche PHB-Gehalte von 2–4 %. Das spricht dafür, daß während des Wachstumsprozesses die PHB-Synthese fast vollständig unterbunden ist und außerdem dafür, daß durch alleinige Sauerstofflimitation die PHB-Bildung nicht initiiert werden kann. Dies ist plausibel, da der erste Schritt im Stoffwechsel, die Methanoxidation zu Methanol, bereits Sauerstoff benötigt und für alle weiteren Reaktionen Voraussetzung ist. Weiterhin wurde die Zellzahl während der PHB-Bildung unter Ammoniumstickstoff-Mangelbedingungen im diskontinuierlichen Prozeß bestimmt. Wie die aus gravimetrischen Analysen der Gesamtbiomasse  $X$  und der PHB-Konzentration bestimmte Konzentration der „aktiven“ Biomasse ( $c_R = c_X - c_{PHB}$ ) änderte sich auch die in der Thomakammer ermittelte Zellzahl praktisch nicht, sie schwankte zwischen  $0,4$  und  $0,7 \times 10^{11} \text{ ml}^{-1}$  (Abb. 4-16).

Für den Stamm *Methylocystis* sp. GB 25 konnte (unter Ammoniumstickstoffmangel) daher die nichtwachstumsassoziierte PHB-Bildung nachgewiesen werden.

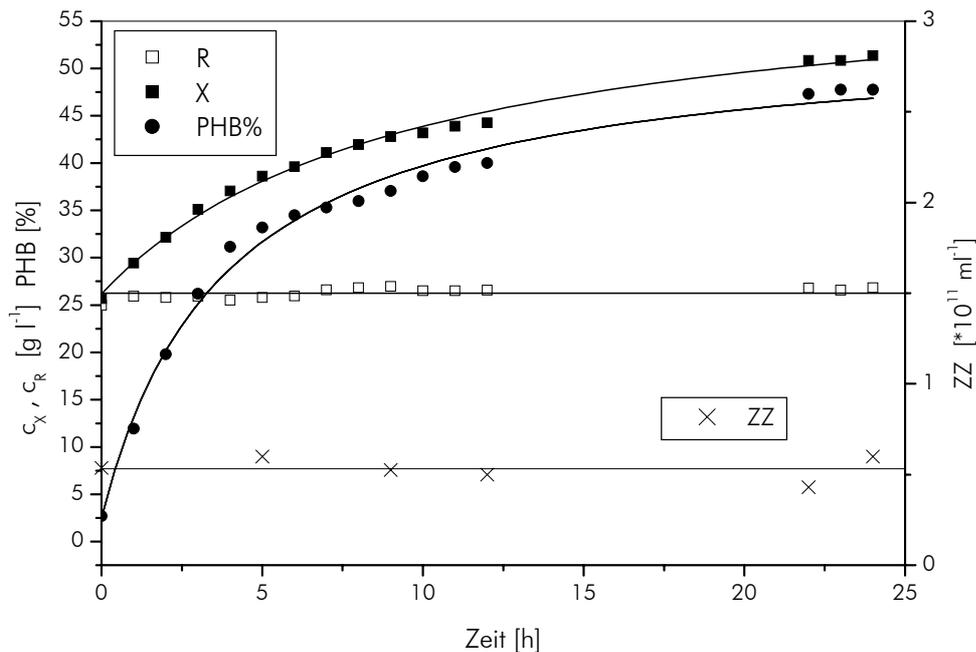


Abb. 4-16: Zeitlicher Verlauf von Gesamt- (■) und Restbiomassekonzentration (□), PHB-Gehalt (●) und Zellzahl (×) unter Ammoniumstickstoffmangel (diskontinuierlicher Prozeß, pH=5,7,  $c_{O_2,L} = 5-10 \%$ )

#### 4.4.2 EINFLUß VON ALLGEMEINEN MILIEUBEDINGUNGEN AUF DIE PHB-SYNTHESE

Im Vorfeld war der Einfluß der Milieubedingungen auf die PHB-Bildung zu überprüfen, um diese für die weiteren Untersuchungen zur Ermittlung der Prozeßkennziffern zu optimieren. Die Experimente hierzu wurden in UD 5 durchgeführt. Nach Anzuchtphasen von 18–24 h erfolgte der Start der PHB-Bildung, ausgelöst durch Ammoniumstickstoffmangel.

Es wurden pH-Wert, Gelöstsauerstoffkonzentration und Prozeßführung während der Bildungsphase variiert. Als Zielgrößen dienten der PHB-Gehalt der Biomasse sowie die spezifische PHB-Bildungsgeschwindigkeit  $q_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)}$  (berechnet nach Gl. 4.7 als mittlerer Wert über einen Zeitraum von 24 h). Zur Beurteilung der Prozeßführung wurde zusätzlich die mittlere Produktivität (Gl. 4.8) verglichen.

$$q_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)} = \frac{r_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)}}{\left( \frac{C_{\text{R},t=24} + C_{\text{R},t=0}}{2} \right)} \quad (4.7)$$

$$r_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)} = \frac{C_{\text{PHB},t=24} - C_{\text{PHB},t=0}}{24\text{h}} + \left( \frac{C_{\text{PHB},t=24} + C_{\text{PHB},t=0}}{2} \right) \times D \quad (4.8)$$

##### 4.4.2.1 Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration

Für den Wachstumsprozeß war der Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration auf Wachstumsrate und Ausbeuten bekannt und ein Optimum von 1 mg l<sup>-1</sup> bestimmt [WENDLANDT et al. 1993]. Daher sollte dieser Parameter auch für den PHB-Bildungsprozeß untersucht werden.

Dazu wurden folgende Gelöstsauerstoffkonzentrationen eingestellt: 0,5–5 %, 15 % und > 90 % der Luftsättigung bei 38°C<sup>1</sup>. Die weiteren Versuchsbedingungen waren:

- Prozeßführung: D=0,04 h<sup>-1</sup>
- pH-Wert: 5,7

In Tabelle IV-12 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Die Mittelwerte für die erreichten PHB-Gehalte zeigten mit steigender Gelöstsauerstoffkonzentration eine abnehmende Tendenz. Auf Grund relativ starker Schwankungen der Einzelerperimente sind diese Änderungen jedoch als nicht signifikant einzustufen (Signifikanzebene 0,05). Die erreichbaren mittleren spezifischen Bildungsraten waren bei geringen Sauerstoffkonzentrationen am höchsten ( $q_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)} = 0,042 \text{ g gR}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) im Vergleich zu Werten bei 15 und 90 %, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden.

Diese Ergebnisse weisen auf Unterschiede in der optimalen Gelöstsauerstoffkonzentration für Wachstums- und PHB-Bildungsprozesse hin. Die unterschiedlichen biochemischen Reaktionen, die in beiden Prozessen ablaufen, könnten die Ursache dafür sein. Für  $c_{\text{O}_2\text{L}} > 15 \%$  wurde die

<sup>1</sup> entsprechen Werten von 0,04–0,4 mg l<sup>-1</sup>, 1 mg l<sup>-1</sup> und 6,35 mg l<sup>-1</sup>.

PHB-Synthese möglicherweise durch Methanlimitation beeinflusst. Zur Bestätigung dieser Vermutung müßten Messungen der Gelöstmethankonzentration durchgeführt werden.

Tabelle IV-12: PHB-Gehalte und mittlere spezifische PHB-Bildungsraten bei verschiedenen Gelöstsauerstoffkonzentrationen

|  | $c_{O_2,L} = 0,5-5 \text{ Sat\%}$ | $c_{O_2,L} = 15 \text{ Sat\%}$ | $c_{O_2,L} \geq 90 \text{ Sat\%}$ |
|--|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| PHB-Gehalt [%]   | $46,1 \pm 5,6$                    | $41,6 \pm 5,4$                 | $37,5 \pm 4,7$                    |
| $q_{PHB}^{ov(0-24)}$ [g gR <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | $0,042 \pm 0,007$                 | $0,027 \pm 0,006$              | $0,023 \pm 0,004$                 |

#### 4.4.2.2 Einfluß des pH-Wertes

Die Aktivität von Enzymen ist vom pH-Wert abhängig, in den meisten Fällen liegt das Optimum im Bereich von pH 5–8. Auf Grund der Vielzahl enzymatischer Reaktionen in der betrachteten Mischkultur ist dieses Optimum natürlich Ergebnis der Überlagerung verschiedenster Prozesse. Für das Wachstum der Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) wurde ein Optimum von 5,7 gefunden [WENDLANDT et al. 1981]. Dies sollte für die PHB-Synthese im Vergleich zu einem höheren pH-Wert (ausgewählt 6,5) überprüft werden. Die Randbedingungen waren folgende:

- Prozeßführung:  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$
- $c_{O_2,L}$ : 5 %

Bei den untersuchten pH-Werten von 5,7 und 6,5 wurde kein signifikanter Unterschied (Signifikanzebene 0,05) im PHB-Gehalt und der spezifischen PHB-Bildungsrate gefunden (Tabelle IV-13). Möglicherweise war der untersuchte pH-Bereich zu eng gewählt. Daher wurden alle folgenden Wachstums- und Produktbildungsprozesse bei gleichem pH-Wert (pH=5,7) durchgeführt.

Tabelle IV-13: PHB-Gehalte und mittlere spezifische PHB-Bildungsraten bei verschiedenen pH-Werten

|  | pH = 5,7          | pH = 6,5          |
|--|-------------------|-------------------|
| PHB-Gehalt [%]   | $46,1 \pm 5,6$    | $44,2 \pm 1,5$    |
| $q_{PHB}^{ov(0-24)}$ [g gR <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | $0,042 \pm 0,007$ | $0,034 \pm 0,004$ |

In der Literatur gibt es Hinweise auf eine starke Abhängigkeit der PHB-Bildung vom pH-Wert des Fermentationsmediums. So wurde gefunden, daß bei der Synthese von PHB auf Methanol mit dem Stamm *Protomonas extorquens* bei neutralem pH, der auch optimal für das Wachstum des Stammes ist, die höchste PHB-Akkumulation erfolgte. Bei den sauren und alkalischen Grenzwerten (5,3 und 8,6) betrug der maximale PHB-Gehalt der Biomasse weniger als 30 % des Optimums [SUZUKI et al. 1988].

#### 4.4.2.3 Vergleich verschiedener Prozeßregimes während der PHB-Bildung

Mikrobielle Produkte, deren Bildung wachstumsentkoppelt erfolgt (z.B. Sekundärmetabolite), werden üblicherweise in *batch*- bzw. *fed-batch*-Prozessen gewonnen. Es werden jedoch auch kontinuierliche Prozesse mit niedrigen Verdünnungsraten beschrieben. Für die PHB-Synthese wurde außerdem gezeigt, daß die spezifischen PHB-Bildungsraten bei kontrollierter Zugabe sehr geringer Mengen an Stickstoff im Vergleich zum totalen Mangel höher sind [SUZUKI et al. 1986b, ARAGAO et al. 1996]. Um das für die Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) zu überprüfen, erfolgte in Prozessen mit einer hohen Verweilzeit ( $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ ) eine Dosierung von 10 % des Bedarfs an Ammoniumstickstoff. Weiterhin wurden Prozesse mit  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  und diskontinuierliche Prozesse ohne Stickstoffzugabe bei folgenden Bedingungen untersucht:

- pH-Wert: 5,7
- $c_{\text{O}_2, \text{L}}$ : 5 %

Die erreichten PHB-Gehalte und mittleren spezifischen Bildungsraten waren von den eingestellten Bedingungen unabhängig. Die erwartete Erhöhung der Bildungsrate durch Zugabe von Ammoniumstickstoff konnte unter den gewählten Bedingungen nicht festgestellt werden (Tabelle IV-14). Die Produktivität der PHB-Bildung  $r_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)}$  wurde bei diesen Untersuchungen bewertet, um den Einfluß der Biomassekonzentration und damit Effekte wie das Auswaschen der Biomasse zu berücksichtigen. Während der kontinuierlichen Prozesse kam es in beiden Fällen zu einer deutlichen Abnahme der Restbiomassekonzentration im Vergleich zum Startwert auf ca. 50 % ohne Stickstoffzugabe bzw. 70 % mit Stickstoffzugabe. Die theoretischen Abnahme für  $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$  müßte (nach 24 h) auf 41 % der Startkonzentration erfolgen, d.h. durch die Dosierung von Nährsalzen und Stickstoff wurde Restbiomassewachstum entsprechend der verfügbaren Nährsalze erreicht. Dies erklärt auch die geringere Biomasseabnahme für den Fall der erhöhten Stickstoffdosierung. Im diskontinuierlichen Prozeß blieb die Konzentration der Restbiomasse annähernd gleich und es wurden die höchsten Produktivitäten erreicht. Ein weiteres Argument für die Nutzung dieser Variante zur PHB-Bildung ist die bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (deutlich niedrigere Standardabweichungen).

Tabelle IV-14: PHB-Gehalte, PHB-Produktivität und spezifische PHB-Bildungsraten bei unterschiedlicher Prozeßführung

|  | diskontinuierlich | $D=0,04 \text{ h}^{-1}$ | $D=0,04 \text{ h}^{-1}$<br>+ 10 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ |
|--|-------------------|-------------------------|--|
| PHB-Gehalt [%]   | $46,6 \pm 1,0$    | $45,9 \pm 5,6$          | $47,6 \pm 3,1$   |
| $q_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)}$ [ $\text{g gR}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ] | $0,037 \pm 0,002$ | $0,040 \pm 0,009$       | $0,041 \pm 0,003$  |
| $r_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)}$ [ $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]  | $0,94 \pm 0,03$   | $0,63 \pm 0,2$          | $0,77 \pm 0,15$  |
| $c_{\text{R}, t=0}$ [ $\text{g l}^{-1}$ ]                                | 26,0              | 26,6                    | 24,8   |
| $c_{\text{R}, t=24\text{h}}$ [ $\text{g l}^{-1}$ ]                       | 27,3              | 13,2                    | 17,8   |
| $\Delta c_{\text{R}}$ [%]  | +5,0              | -50,4                   | -28,2  |

Die Mehrzahl der bekannten Prozesse zur PHB-Gewinnung wird als *fed-batch* Kultivierung durchgeführt, da während der PHB-Synthese die weitere Dosierung der Kohlenstoffquelle erfolgt. Bei der Verwendung von Methan hingegen muß die Zufuhr bedingt durch die geringe Löslichkeit und Nichtbevorratbarkeit kontinuierlich erfolgen.

#### 4.4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Voruntersuchungen zu allgemeinen Milieubedingungen und Empfehlungen für weitere Experimente

Die untersuchten Milieubedingungen (pH-Wert, Gelöstsauerstoffkonzentration, Prozeßführung) haben keinen signifikanten Einfluß auf den PHB-Gehalt, der maximal einen Wert von 50 % erreichen kann. Die mittlere spezifische Produktbildungsrate ist von pH-Wert (zwischen 5,7 und 6,5) und Prozeßregime (diskontinuierlich,  $D=0,04 \text{ h}^{-1}$ ) unabhängig. Bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 5 % ist sie am höchsten.

Da die PHB-Bildung nicht wachstumsassoziiert erfolgt, ist die mittlere Produktivität der PHB-Bildung über einen Zeitraum von 24 h in diskontinuierlichen Prozessen maximal.

Folgende Bedingungen wurden in den weiteren Untersuchungen verwendet:

Tabelle IV-15: Bedingungen für weiterführende Experimente der PHB-Synthese

|                            |                   |
|----------------------------|-------------------|
| pH-Wert                    | 5,7               |
| $c_{\text{O}_2, \text{L}}$ | 5 %Sat            |
| Prozeßführung              | diskontinuierlich |

#### 4.4.3 ERMITTLUNG DER PROZEBKENNZIFFERN IN ABHÄNGIGKEIT VON DEN MANGELBEDINGUNGEN

Die nichtwachstumsassoziierte PHB-Bildung, die auch für *Methylocystis* sp. GB 25 nachgewiesen wurde, wird durch Mangel eines essentiellen Nährstoffes ausgelöst, der für die Synthese von neuem Zellmaterial wie z.B. Aminosäuren und Proteinen benötigt wird. Dies sind in erster Linie Makroelemente wie Stickstoff, Phosphor und Sauerstoff, aber auch Meso- bzw. Mikroelemente wie Magnesium, Schwefel, Eisen, Kalium, Mangan, Kupfer, Natrium, Kobalt, Zinn und Calcium [u.a. SUZUKI et al. 1986, STEINBÜCHEL 1996, KIM und LENZ 2001]. Obwohl den einzelnen Elementen im Stoffwechsel sehr unterschiedliche Bedeutung zukommt, ist die Wirkung bei Mangelzuständen mit dem gleichen Mechanismus erklärbar. In allen Fällen werden Bedingungen erreicht, unter denen die Konzentrationen der Substrate für die PHB-Synthese (Acetyl-CoA und Reduktionsäquivalente) in der Zelle ansteigen, da die normalen Wege der weiteren Umsetzung blockiert sind. Die Anreicherung von Acetyl-CoA in der Zelle hebt die Inhibierung des ersten Enzyms der PHB-Synthese, der Ketothiolase, auf und hemmt gleichzeitig die Citrat-Synthase. Damit wird der Stofffluß in die PHB-Synthese gelenkt [STEINBÜCHEL 1996, BABEL et al. 2001]. Aus physiologischer Sicht bedeutet diese Speicherung von Kohlenstoff und Reduktionsäquivalenten auch einen stabileren energetischen Zustand.

Die meisten Untersuchungen zur mikrobiellen PHA-Synthese wurden unter Stickstoffmangel durchgeführt. Da der Stickstoffbedarf für Wachstum und Vermehrung hoch ist, wird der Man-

gelzustand nach Unterbrechung der Stickstoffzufuhr innerhalb kurzer Zeit erreicht. Ein weiteres wichtiges Element ist Phosphor, wobei hier auf Grund intrazellulärer Speicher meist längere Zeiträume bis zum Erreichen der Limitation benötigt werden. Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Organismen zeigen, daß die maximalen PHB-Gehalte und spezifischen Bildungs-raten in Abhängigkeit vom Limitationsfaktor variieren und keine generellen Empfehlungen gegeben werden können. So wurden für *Methylobacterium organophilum* die höchsten PHB-Gehalte unter Kaliummangel erreicht [KIM et al. 1996b,1998,1999]; bei *Pseudomonas* sp. K wurden gleiche PHB-Gehalte (45–55 %) unter Stickstoff-, Sulfat-, Magnesium-, Eisen- und Manganmangel beobachtet; eine Mutante von *R. eutropha* zeigte maximale Bildungs-raten unter Sulfatmangel [STEINBÜCHEL und SCHLEGEL 1989].

Somit bestand die Aufgabe, geeignete Elemente bzw. Ionen auszuwählen und optimale Mangelbedingungen für die Initiierung der PHB-Synthese mit *Methylocystis* sp. GB 25 zu finden. Folgende Elemente (Ionen) wurden untersucht.

- Stickstoff ( $\text{NH}_4\text{-N}^+$ )
- Phosphor ( $\text{PO}_4\text{-P}^{3-}$ )
- Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ )
- Schwefel ( $\text{SO}_4^{2-}$ )
- Kalium ( $\text{K}^+$ )
- Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ )
- Mangan ( $\text{Mn}^{2+}$ ).

#### 4.4.3.1 PHB-Synthese unter Ammonium-Stickstoffmangel

Stickstoff nimmt in bakterieller Biomasse ungefähr einen Anteil von 10–12 % ein, ist u.a. Bestandteil von Proteinen und Nukleinsäuren und stellt damit ein essentielles Element für Wachstum, Vermehrung und Stoffwechsel dar. Bei Stickstoffmangel kann beispielsweise die reduktive Aminierung zur Synthese von Aminosäuren (z.B. die Bildung von Glutamat aus  $\alpha$ -Ketoglutarat) nicht ablaufen. Dadurch steht ein Überschuß an Reduktionsäquivalenten und, auf Grund der Hemmung der Citrat-Synthase, Acetyl-CoA zur Verfügung, die eigentlichen Substrate für die Synthese von PHB [BABEL et al. 2001].

Versuche zur Bestimmung der prozeßspezifischen Parameter unter Ammoniumstickstoffmangel wurden im UD 50 unter den empfohlenen Bedingungen (siehe 3.1.3.1 bzw. Tabelle IV-15) über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt. Tabelle IV-16 zeigt die Ergebnisse von fünf Experimenten unter gleichen Bedingungen:

Tabelle IV-16: Prozeßkennziffern der PHB-Synthese unter Stickstoffmangel

| Versuch     | Start                |     | 24h                  |            | mittlere Kennzahlen                      |   |
|-------------|----------------------|-----|----------------------|------------|--|---|
|             | $c_x$                | PHB | $c_x$                | PHB        | $r_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)}$       | $q_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)}$        |
|             | [g l <sup>-1</sup> ] | [%] | [g l <sup>-1</sup> ] | [%]        | [g PHB l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | [g PHB gR <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |
| 1           | 25,1                 | 3,0 | 49,1                 | 44,4       | 0,877                                    | 0,034                                     |
| 2           | 25,7                 | 2,6 | 50,0                 | 45,2       | 0,914                                    | 0,035                                     |
| 3           | 25,4                 | 2,4 | 49,5                 | 46,3       | 0,930                                    | 0,036                                     |
| 4           | 25,3                 | 3,1 | 50,7                 | 45,9       | 0,937                                    | 0,036                                     |
| 5           | 25,6                 | 2,7 | 51,4                 | 47,7       | 0,993                                    | 0,038                                     |
| Mittelwerte |                      |     |                      | 45,9 ± 1,4 | 0,93 ± 0,04                              | 0,036 ± 0,001                             |

Im folgenden Beispiel (Versuch 5 aus Tabelle IV-16, Abbildungen 4-17 bis 4-21) wurde im Wachstumsprozeß über einen Zeitraum von 20 h eine Biomassekonzentration von 25,6 g l<sup>-1</sup> erreicht. Nach Umschalten der pH-Regelung von Ammoniaklösung auf Natronlauge wurde der im Medium vorhandene Ammoniumstickstoff innerhalb von ca. 15 min verbraucht, gleichzeitig begann die Bildung von PHB. Der Zeitpunkt der Umstellung von Wachstum auf PHB-Bildung war durch ein schnelles Ansteigen des Gelöstsauerstoff zu erkennen. Durch Erniedrigung von Druck und Gesamtgasmenge erfolgt die Anpassung an den vorgegebenen Sollwert. In den ersten acht Stunden erfolgt eine Zunahme des PHB-Gehaltes von 2 auf ca. 35 %, danach stieg der Gehalt langsamer an und nach 24 h waren 47,7 % PHB in der Biomasse akkumuliert (Abb. 4-17). Die Zunahme der Gesamtbiomasse wurde fast ausschließlich durch die Bildung von PHB verursacht, die Konzentration der Restbiomasse blieb nach einer geringen Zunahme in der ersten Versuchsstunde nahezu konstant.

Die Zusammensetzung des Bioreaktor Ausgangsgases änderte sich während der PHB-Bildung deutlich (Abb. 4-18). Im Versuchsverlauf nahm der Anteil von Sauerstoff und Methan zu, entsprechend entstand weniger Kohlendioxid.

Zur Bilanzierung des Verbrauches von Methan und Sauerstoff sowie der Bildung von PHB, Biomasse und CO<sub>2</sub> wurde mit Masseströmen und absoluten Mengen gearbeitet (zur Berechnung siehe 3.5), da die Erhöhung des Volumens auf Grund der Wasserbildung im Laufe des Prozesses berücksichtigt werden mußte. Entsprechend werden in den Abbildungen nicht die auf das Reaktorvolumen bezogenen spezifischen Gasübergangsraten  $r_i$  [g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] dargestellt, sondern die Gesamtverbrauchsgeschwindigkeiten für Sauerstoff (OUR), Methan (MUR) und bzw. die Gesamtbildungsgeschwindigkeit für Kohlendioxid (CPR) (Abb. 4-19) in [g h<sup>-1</sup>]. Wie aus dem Verlauf der Gaszusammensetzung ableitbar, nehmen die Gasübergänge innerhalb der ersten acht Stunden sehr schnell ab (auf ca. 20 % des Startwertes) und nähern sich asymptotisch dem Wert 0.

Die durch Integration ermittelten Verbräuche von Methan und Sauerstoff für die PHB-Bildung sind in Abb. 4-20 der Bildung von PHB und CO<sub>2</sub> während des Prozesses gegenübergestellt. Zusätzlich wurde die Funktion  $dm_{\text{PHB}}/dt$  dargestellt, die als Grundlage für die Ermittlung spezifischen PHB-Bildungsraten (Abb. 4-22) und der Produktivität diente.

Den zeitlichen Verlauf der auf den Verbrauch von Sauerstoff und Methan bezogenen Ausbeuten für die PHB-Synthese zeigt Abb. 4-21.

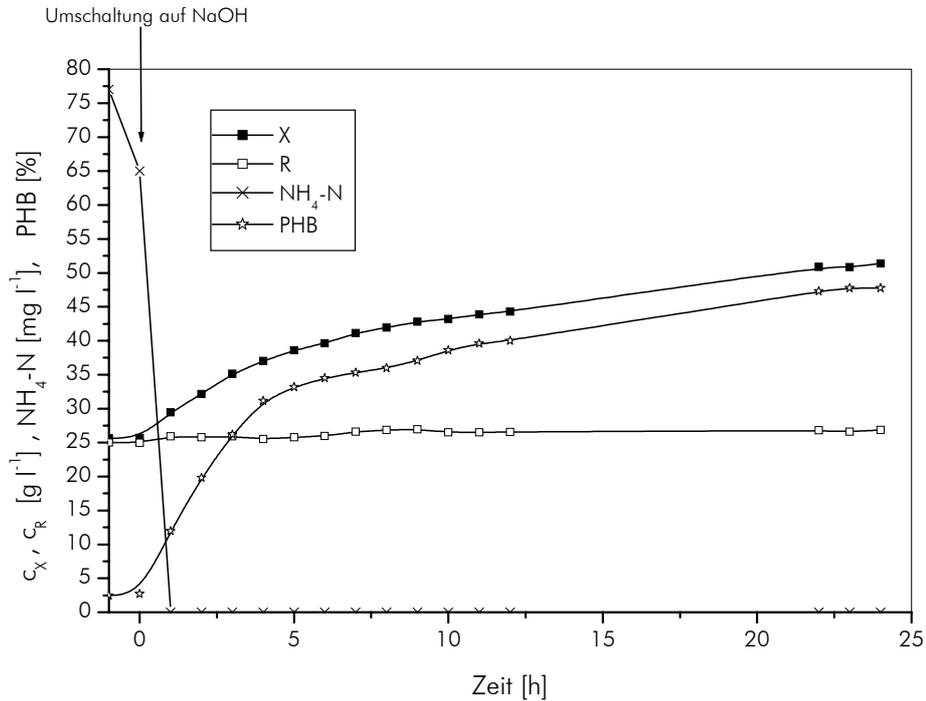


Abb. 4-17: Zeitlicher Verlauf von Gesamt- (■) und Restbiomassekonzentration (□), PHB-Gehalt der Biomasse (☆) und Ammoniumstickstoffkonzentration der Kulturflüssigkeit (×) während der PHB-Synthese unter Ammoniumstickstoffmangel (UD 50)

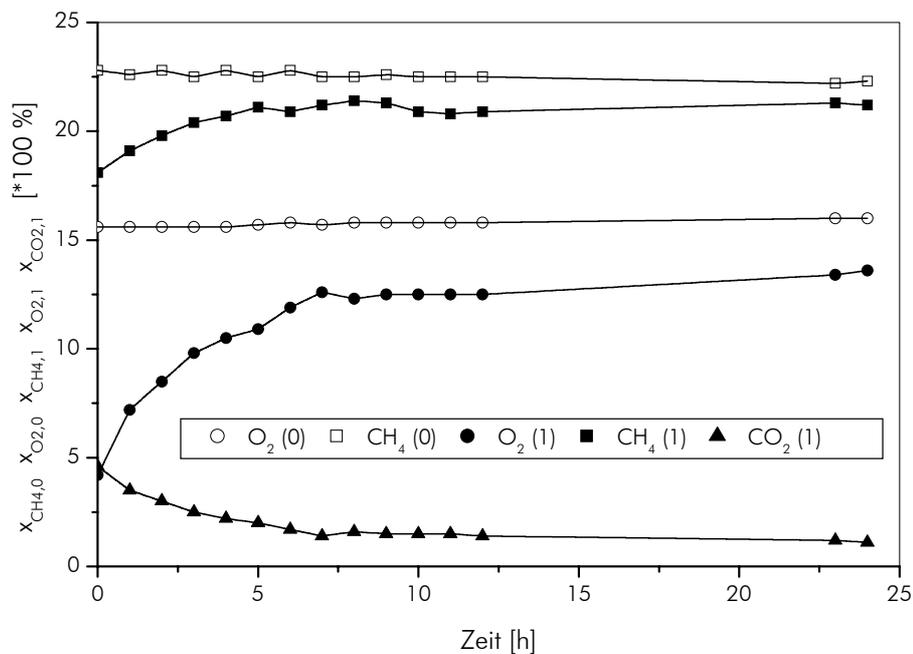


Abb. 4-18: Zusammensetzung des Eingangs- ( $x_{CH_4,0}$  (□)  $x_{O_2,0}$  (○)) und Abgases ( $x_{CH_4,1}$  (■)  $x_{O_2,1}$  (●)  $x_{CO_2,1}$  (▲)) während der PHB-Bildung unter Ammoniumstickstoffmangel (UD 50)

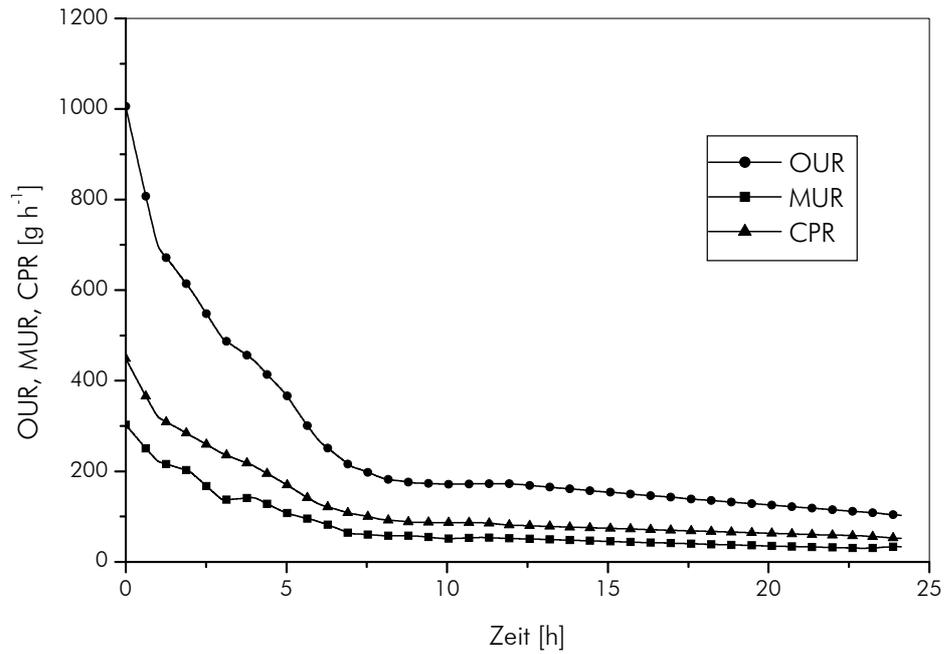


Abb. 4-19: Gasreaktionsraten für Sauerstoff (OUR ●), Methan (MUR ■) und Kohlendioxid (CPR ▲) während der PHB-Bildung unter Ammoniumstickstoffmangel (UD 50)

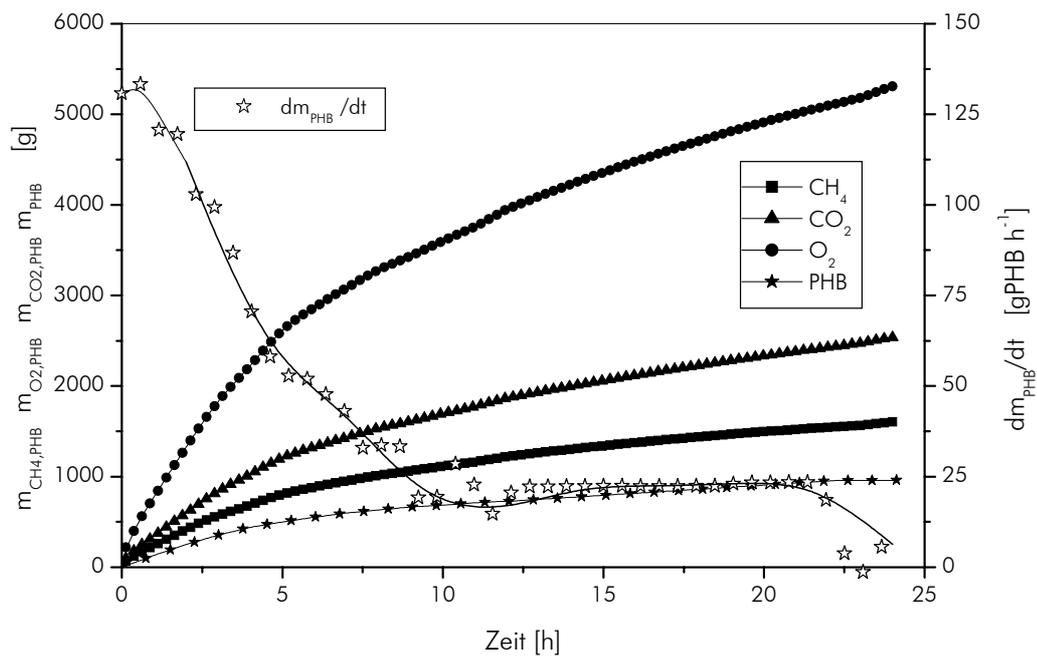


Abb. 4-20: Gesamtverbrauch von Methan (■) und Sauerstoff (●), Gesamtproduktion von PHB (★) und  $\text{CO}_2$  (▲) sowie PHB-Bildungsgeschwindigkeit  $dm_{\text{PHB}}/dt$  (☆) während der PHB-Bildung unter Ammoniumstickstoffmangel (UD 50)

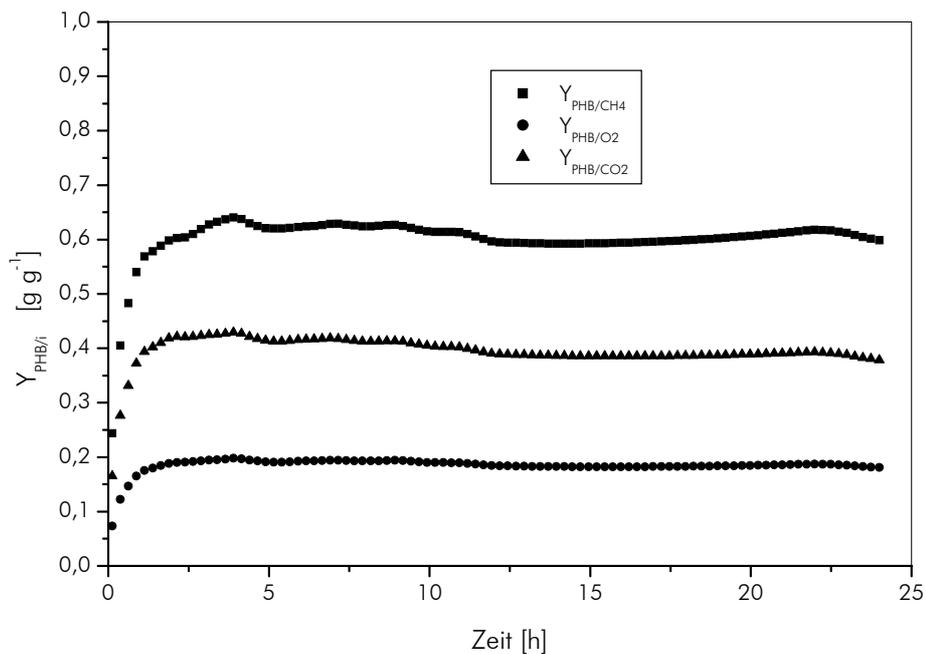


Abb. 4-21: Spezifische Ausbeutekoeffizienten der Bildung von PHB und Kohlendioxid aus Methan und Sauerstoff (UD 50)

Zur Bewertung der ermittelten Ausbeuten kann eine Kohlenstoffbilanz aufgestellt werden, indem der Verbrauch an Kohlenstoff (aus Methan) der Bildung von Kohlenstoff (als Kohlendioxid, PHB und Restbiomasse) gegenübergestellt wird. Ein Vergleich dieser Werte ergab für das gezeigte Experiment eine geringe Abweichung von 0,9 % (Tabelle IV-17).

Tabelle IV-17: Kohlenstoffbilanz für Methanverbrauch und die Bildung von PHB, R und CO<sub>2</sub>-Bildung bei der PHB-Bildung unter Ammoniumstickstoffmangel (PHB-Monomer: CH<sub>1,5</sub>O<sub>0,5</sub>, R: CH<sub>1,77</sub>N<sub>0,21</sub>O<sub>0,48</sub>)

|           |                 | Gesamtmenge | Kohlenstoff | Summe   |
|-----------|-----------------|-------------|-------------|---------|
|           |                 | [g]         | [g C]       | [g C]   |
| Verbrauch | Methan          | 1867,9      | 1400,9      |         |
|           | $\Sigma$        |             |             | -1400,9 |
| Bildung   | CO <sub>2</sub> | 2941,9      | 802,3       |         |
|           | Biomasse (R)    | 140,2       | 68,7        |         |
|           | PHB             | 972,5       | 542,8       |         |
|           | $\Sigma$        |             |             | 1413,8  |
| Differenz |                 |             |             | 12,9    |

Folgende Ausbeuten, bezogen auf die PHB-Bildung, wurden bestimmt:

$$Y_{\text{PHB}/\text{CH}_4} = 0,594 \text{ g g}^{-1}$$

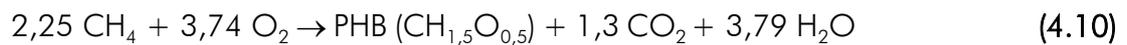
$$Y_{\text{PHB}/\text{O}_2} = 0,180 \text{ g g}^{-1}$$

$$Y_{\text{PHB}/\text{CO}_2} = 0,376 \text{ g g}^{-1}.$$

Die PHB-Synthese findet nach folgender Reaktion statt:



bzw.



Das stöchiometrische Verhältnis  $\text{O}_2/\text{CH}_4$  ist mit 1,65 etwas höher als der Wert 1,5 aus theoretischen Ableitungen [ASENJO und SUK 1986b].

Die Ergebnisse der Bilanz für die Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff können mit maximalen Abweichungen von 7,7 % zur Bestätigung der gefundenen Werte herangezogen werden (Tabelle IV-18).

Tabelle IV-18: Bilanz der PHB-Bildung aus Methan und Sauerstoff unter Ammoniumstickstoffmangel

| Element | Substrat [mol] |                 | Produkt [mol] |                 |                  | Bilanz |      |
|---------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|------------------|--------|------|
|         | O <sub>2</sub> | CH <sub>4</sub> | PHB           | CO <sub>2</sub> | H <sub>2</sub> O | [mol]  | [%]  |
| C       |                | 2,26            | 1,00          | 1,30            |                  | 0,58   | 7,7  |
| O       | 7,47           |                 | 0,50          | 2,60            | 3,80             | -0,04  | -1,9 |
| H       |                | 9,03            | 1,50          |                 | 7,58             | -0,04  | -0,4 |

Die spezifische PHB-Bildungsgeschwindigkeit wurde aus der PHB-Bildungsgeschwindigkeit ( $dm_{\text{PHB}}/dt$ ) und der absoluten Masse aktiver Biomasse  $m_R$  berechnet (Gl. 3.32). Die Änderung dieser PHB-Bildungsgeschwindigkeit folgte dem zeitlichen Verlauf der Gasübergangsraten. Die maximale Bildungsrate von  $q_{\text{PHBmax}} = 0,145 \text{ g PHB g R}^{-1} \text{ h}^{-1}$  wurde unmittelbar nach Start des Prozesses erreicht, was auf eine sehr schnelle Umstellung des Stoffwechsels von Wachstum auf PHB-Bildung schließen läßt. Weiterhin war eine deutliche Abnahme im weiteren Verlauf zu erkennen, d.h. mit zunehmendem Anteil von PHB in den Zellen verringerte sich die Bildungsgeschwindigkeit auf einen Wert von  $0,008 \text{ g g R}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Der Prozeß war durch eine maximale Produktivität der PHB-Bildung von  $3,25 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  unmittelbar nach Start der PHB-Bildung bzw. einen Mittelwert von  $0,96 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  gekennzeichnet. Der zeitliche Verlauf entspricht dem der spezifischen Bildungsrate.

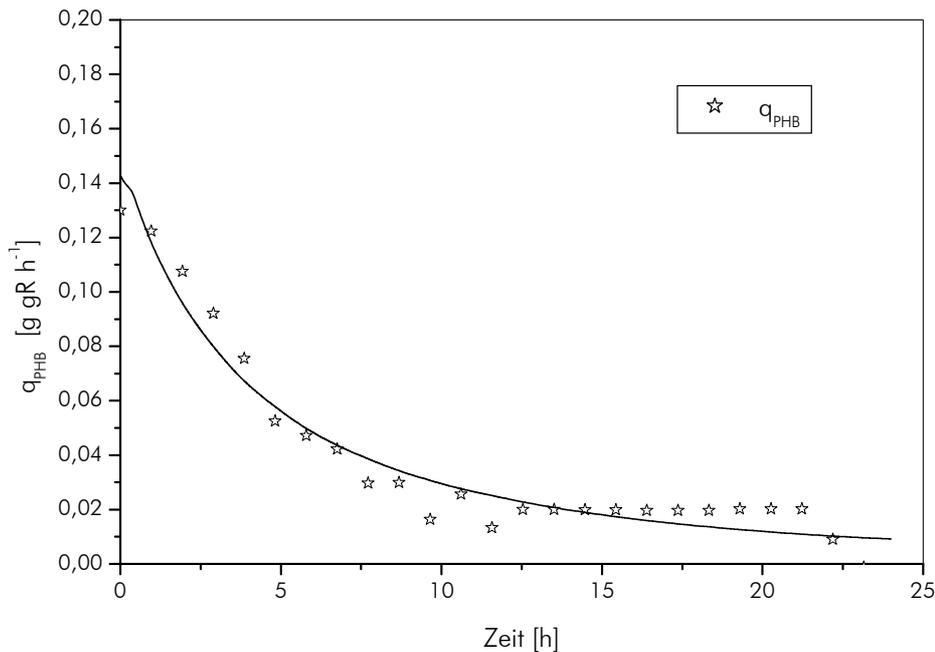


Abb. 4-22: Zeitlicher Verlauf der spezifischen PHB-Bildungsrate während der PHB-Bildung unter Stickstoffmangel

#### 4.4.3.2 PHB-Synthese unter Phosphatmangel

Phosphor liegt in biologischen Systemen in der Regel als Phosphat vor und nimmt als Bestandteil von Nucleinsäuren und Phospholipiden einen Anteil von etwa 1–3 % an der Zelltrockenmasse ein [MADIGAN et al. 2001]. Eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel spielen energiereiche Phosphatbindungen, wie z.B. in Adenosintri-phosphat (ATP).

Unter Phosphatmangelbedingungen können freie Reduktionsäquivalente entstehen, die unter normalen Bedingungen zur Synthese von ATP aus ADP verbraucht werden. Dadurch werden bestimmte Enzyme des TCA-Zyklus (u.a. die Citrat-Synthase) beeinflusst und die Umsetzung von Acetyl-CoA gehemmt. Dieses kann zusammen mit den Reduktionsäquivalenten für die PHB-Synthese genutzt werden.

Die Experimente zur Untersuchung der PHB-Synthese unter Phosphatmangel wurden im UD 50 durchgeführt. Die weiteren Bedingungen entsprachen denen in Tabelle IV-15 bzw. Kapitel 3.1.3.3 angegebenen. Tabelle IV-19 zeigt die Ergebnisse von fünf Experimenten.

In den Abbildungen 4-23 bis 4-27 ist ein typischer Versuchsverlauf dargestellt. Nach Stop der Dosierung von Nährlösung wurde das vorhandene Phosphat innerhalb von 90–120 min zu etwa 95 % verbraucht. Danach war eine niedrige Konzentration nachweisbar, die mit 1–3 mg l<sup>-1</sup> bereits im Bereich der Nachweisgrenze lag. Die Akkumulation von PHB in der Biomasse begann, wenn die Phosphatkonzentration in der Kulturflüssigkeit kleiner als 2,5 mg l<sup>-1</sup> war. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde nur PHB-freie Biomasse gebildet.

Die Zunahme des PHB-Gehaltes erfolgte fast linear bis zur 12. Stunde auf etwa 40 % (das entspricht 80 % des Endwertes), danach deutlich langsamer bis auf 47,7 % nach 24 h.

Im Gegensatz zu Prozessen unter Ammoniumstickstoffmangel nahm die Konzentration der Restbiomasse  $c_R$  auch nach Erreichen des Phosphatmangels und Einsetzen der PHB-Synthese etwa bis zur 8. Stunde zu (Abb. 4-23).

Den Verbrauch von Methan und Sauerstoff während des Prozesses zeigten die Zusammensetzung des Abgases (Abb. 4-24) bzw. die ermittelten Gasreaktionsraten CPR, OUR und MUR (Abb. 4-25). Letztere waren zum Startzeitpunkt mit  $976 \text{ g O}_2 \text{ h}^{-1}$  bzw.  $276 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1}$  am höchsten und nahmen im Prozeßverlauf auf  $155 \text{ g O}_2 \text{ h}^{-1}$  bzw.  $43 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1}$  ab. Innerhalb der ersten zwölf Stunden war dabei ein noch relativ hoher Verbrauch dieser Gase erkennbar.

Bei den Experimenten unter Phosphatmangel mußte die Prozeßführung variiert werden. Durch die Dosierung von Ammoniaklösung zur pH-Korrektur und die Bildung von Reaktionswasser durch Biomasse- und PHB-Synthese vergrößert sich das Reaktionsvolumen beträchtlich von 40 l auf 45 l in den ersten fünf Stunden. Um eine Überfüllung des Reaktors zu vermeiden, wurde bei Erreichen von 45 l die automatische Gewichtsregelung eingestellt. Das abfließende Produkt wurde gesammelt und bei der Berechnung der PHB- und Biomassebildung berücksichtigt (zur Berechnung siehe 3.5), wie es z.B. mit den Gesamtmengen ( $m_i = m_{i,PHB} + m_{i,R}$ ) für den Methan- und Sauerstoffverbrauch in Abb. 4-26 dargestellt ist. Zu beachten ist die Bildung von PHB-freier Biomasse bis zu 8. Versuchsstunde. Analog Abb. 4-20 für Ammoniumstickstoffmangel ist die Funktion  $dm_{PHB}/dt$  zusätzlich dargestellt.

Die in Abb. 4-27 dargestellten Ausbeuten sind nur auf die Bildung von PHB bezogen.

Tabelle IV-19: Prozeßspezifische Kennwerte der PHB-Bildung unter Phosphatmangel

| Versuch     | Start                |     | 24h                  |      | mittlere Kennzahlen                      |   |
|-------------|----------------------|-----|----------------------|------|--|---|
|             | $c_X$                | PHB | $c_X$                | PHB  | $r_{PHB}^{ov(0-24)}$                     | $q_{PHB}^{ov(0-24)}$                      |
|             | [g l <sup>-1</sup> ] | [%] | [g l <sup>-1</sup> ] | [%]  | [g PHB l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | [g PHB gR <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |
| 1           | 24,8                 | 1,3 | 57,1                 | 47,3 | 1,11                                     | 0,037                                     |
| 2           | 25,4                 | 2,6 | 60,2                 | 47,2 | 1,16                                     | 0,040                                     |
| 3           | 24,7                 | 1,9 | 60,9                 | 44,5 | 1,11                                     | 0,041                                     |
| 4           | 26,4                 | 2,2 | 59,3                 | 45,2 | 1,09                                     | 0,038                                     |
| 5           | 24,6                 | 3,1 | 58,2                 | 47,9 | 1,17                                     | 0,038                                     |
| Mittelwerte |                      |     | 46,4 ± 1,3           |      | 1,13 ± 0,03                              | 0,039 ± 0,001                             |

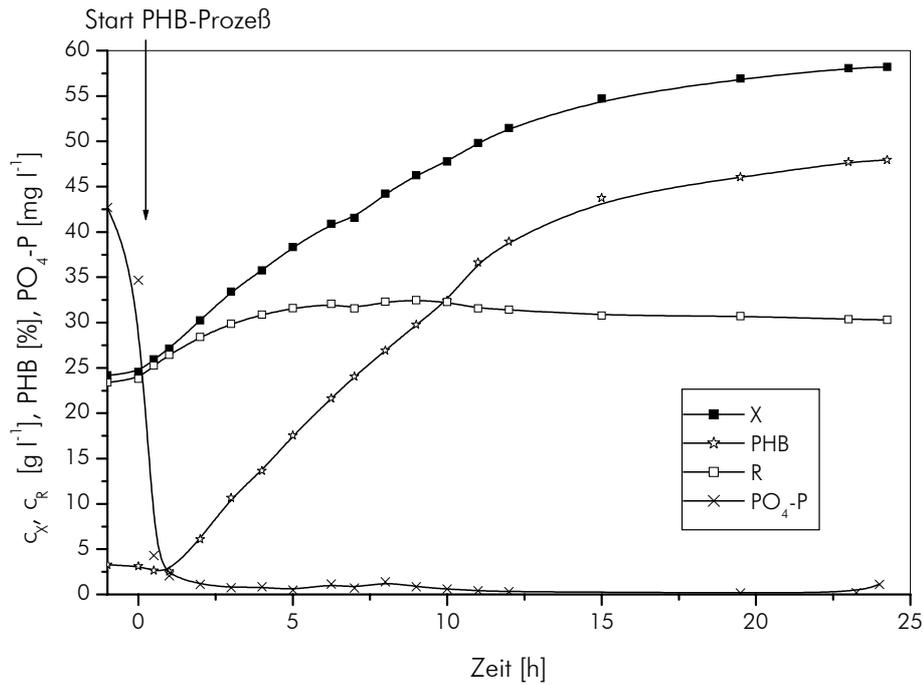


Abb. 4-23: Zeitlicher Verlauf von Gesamt- (■) und Restbiomassekonzentration (□), PHB-Gehalt der Biomasse (☆) und Phosphat-Phosphorkonzentration der Kulturflüssigkeit (×) während der PHB-Synthese unter Phosphatmangel (UD 50)

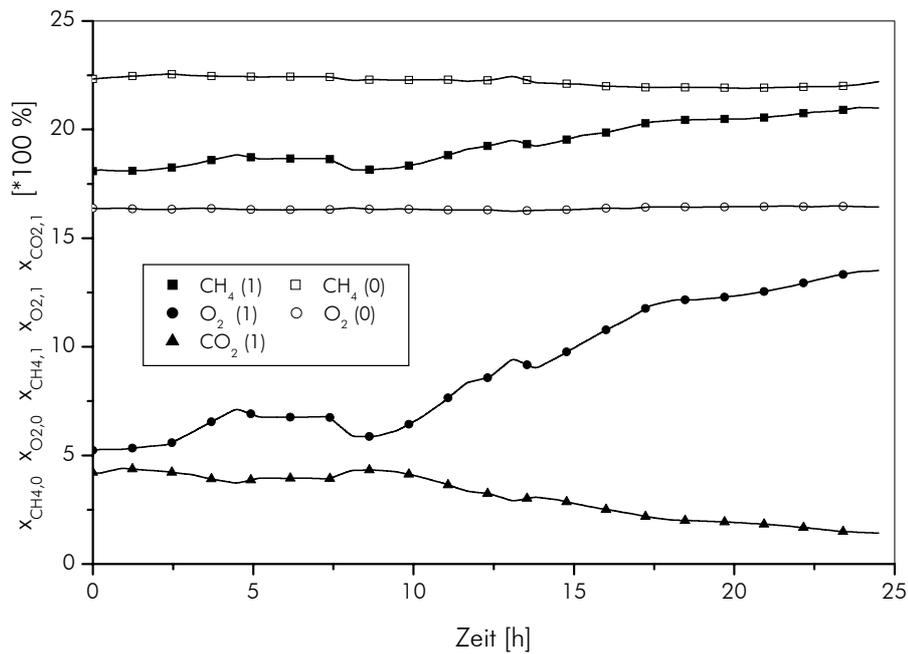


Abb. 4-24: Zusammensetzung des Eingangs- ( $x_{CH_4,0}$  (□)  $x_{O_2,0}$  (○)) und Abgases ( $x_{CH_4,1}$  (■)  $x_{O_2,1}$  (●)  $x_{CO_2,1}$  (▲)) während der PHB-Bildung unter Phosphatmangel (UD 50)

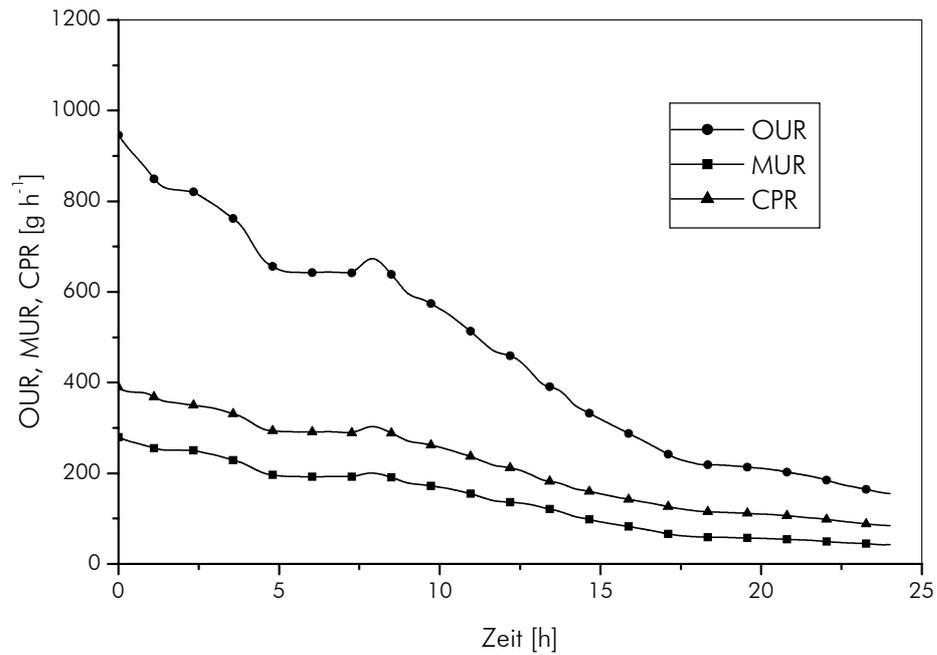


Abb. 4-25: Gasreaktionsraten für Sauerstoff (OUR ●), Methan (MUR ■) und Kohlendioxid (CPR ▲) während der PHB-Bildung unter Phosphatmangel

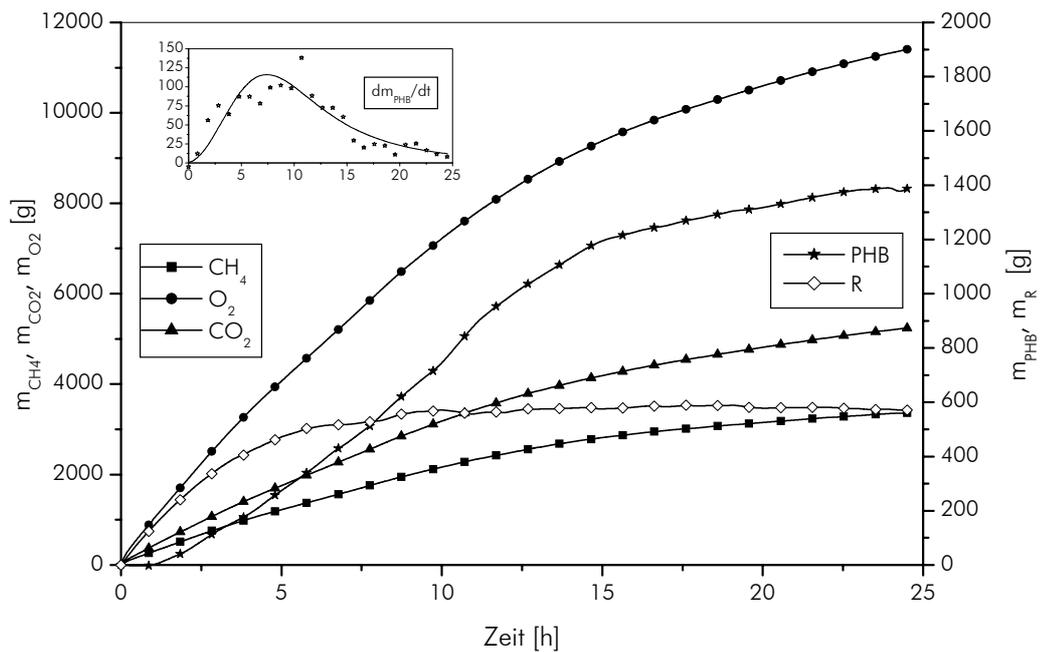


Abb. 4-26: Gesamtverbrauch von Methan (■) und Sauerstoff (●), Bildung von PHB (★), Restbiomasse (◇) und  $\text{CO}_2$  (▲) und PHB-Bildungsgeschwindigkeit (☆) während der PHB-Bildung unter Phosphatmangel

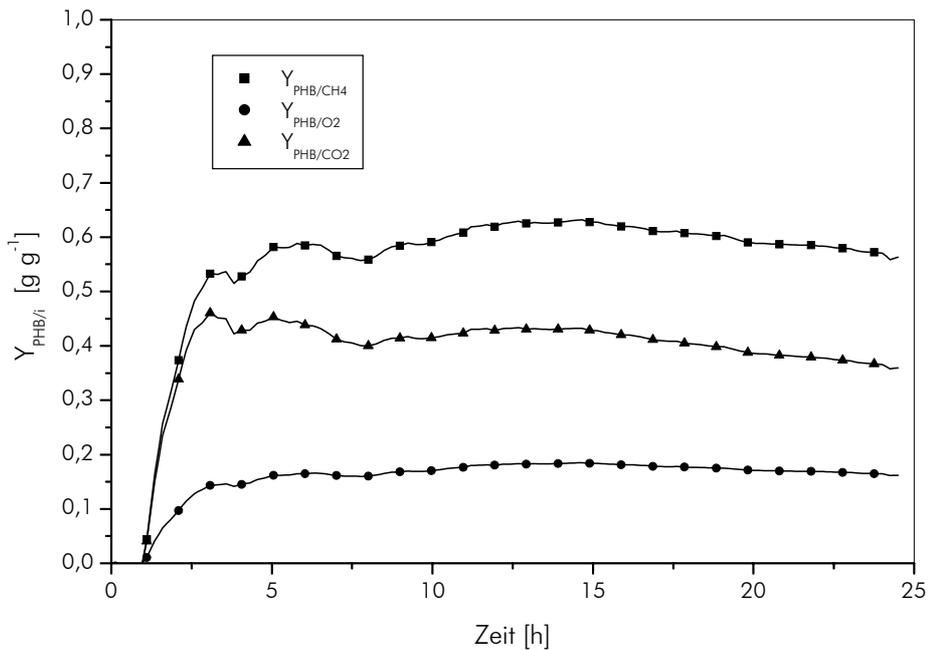


Abb. 4-27: Ausbeuten der PHB-Bildung für Methan, Sauerstoff und Kohlendioxid unter Phosphatmangel

In der Kohlenstoffbilanz für dieses Experiment wurden die Gesamtmengen an verbrauchtem Methan und Sauerstoff der Bildung von Kohlendioxid, Restbiomasse und PHB in Tabelle IV-20 gegenübergestellt. Es ergab sich eine Abweichung von lediglich  $-1,6\%$ .

Tabelle IV-20: Kohlenstoffbilanz für Methanverbrauch, PHB- und  $\text{CO}_2$ -Bildung bei der PHB-Bildung unter Phosphatmangel  
(PHB-Monomer:  $\text{CH}_{1,5}\text{O}_{0,5}$ , R:  $\text{CH}_{1,77}\text{N}_{0,21}\text{O}_{0,48}$ )

|           |               | Gesamtmenge | Kohlenstoff | Summe          |
|-----------|---------------|-------------|-------------|----------------|
|           |               | [g]         | [g C]       | [g C]          |
| Verbrauch | Methan        | 3349,8      | 2512,3      |                |
|           | $\Sigma$      |             |             | <b>-2512,3</b> |
| Bildung   | $\text{CO}_2$ | 5202,5      | 1418,9      |                |
|           | Biomasse (R)  | 574,0       | 276,0       |                |
|           | PHB           | 1391,5      | 776,7       |                |
|           | $\Sigma$      |             |             | <b>2471,6</b>  |
| Differenz |               |             |             | <b>-40,74</b>  |

Die Gesamtausbeuten, bezogen auf die PHB-Bildung, waren:

$$Y_{\text{PHB}/\text{CH}_4} = 0,570 \text{ g g}^{-1}$$

$$Y_{\text{PHB}/\text{O}_2} = 0,165 \text{ g g}^{-1}$$

$$Y_{\text{PHB}/\text{CO}_2} = 0,365 \text{ g g}^{-1}.$$

Dies entspricht folgender Umsatzgleichung für die Bildung von PHB unter Phosphatmangel:



bzw.



Das stöchiometrische Verhältnis  $\text{O}_2/\text{CH}_4$  ist mit 1,73 höher als ein theoretisch bestimmter Wert von 1,5 [ASENJO und SUK 1986b].

Die Gesamtbilanz der Elemente für das dargestellte Experiment zeigt für Kohlenstoff eine sehr gute Übereinstimmung, für Sauerstoff eine Differenz von 12 % :

Tabelle IV-21: Bilanz der PHB-Bildung aus Methan und Sauerstoff unter Phosphatmangel

| Element | Substrat [mol] |                 | Produkt [mol] |                 |                  | Bilanz |      |
|---------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|------------------|--------|------|
|         | O <sub>2</sub> | CH <sub>4</sub> | PHB           | CO <sub>2</sub> | H <sub>2</sub> O | [mol]  | [%]  |
| C       |                | 2,35            | 1             | 1,34            |                  | 0,014  | 0,6  |
| O       | 8,15           |                 | 0,5           | 2,68            | 3,96             | 1,01   | 12,4 |
| H       |                | 9,41            | 1,5           |                 | 7,92             | 0,006  | 0,1  |

Die spezifische Produktbildungsrate  $q_{\text{PHB}}$ , berechnet nach Gl. 3.32, erreichte einen Maximalwert von  $0,08 \text{ g gR}^{-1} \text{ h}^{-1}$  nach 7,5 h (Abb.4-28). Dies ist annähernd der Zeitpunkt, ab dem keine Restbiomasse mehr gebildet wurde. Dieser Befund läßt auf eine Überlagerung von Wachstum und Produktbildung in den ersten Stunden schließen. Beide Prozesse laufen offenbar nebeneinander ab, wobei sich der Anteil der Produktbildung erhöht.

Die maximale Produktivität von  $2,54 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  wurde analog der spezifischen Bildungsrate 7,5 h nach Start des Prozesses erreicht.

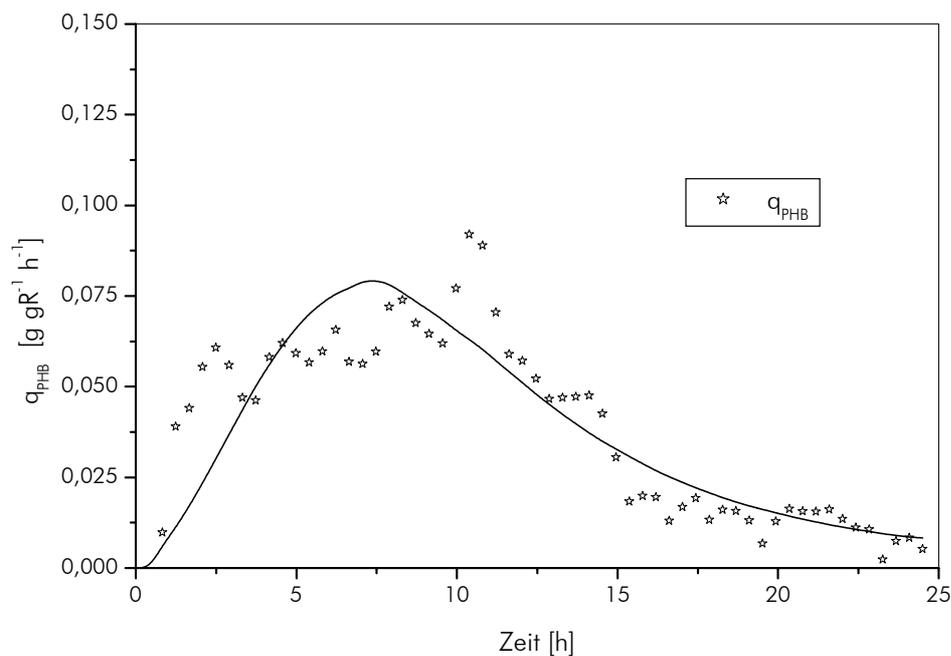


Abb. 4-28: Zeitlicher Verlauf der spezifischen PHB-Bildungsrate während der PHB-Bildung unter Phosphatmangel

#### 4.4.3.4 Initiierung der PHB-Bildung durch Schwefel-, Kalium-, Magnesium-, Eisen- und Manganmangel

Obwohl in den meisten Veröffentlichungen die mikrobielle PHB-Synthese unter Bedingungen von Stickstoff- oder Phosphatmangel beschrieben wird, kann sie auch durch das Fehlen anderer Bioelemente ausgelöst werden. Denkbar sind Elemente, die im physiologischen Wachstumsprozeß als Substrat verwendet werden, oder bei der Enzymregulation eine Rolle spielen, beispielsweise Schwefel (Sulfat), Kalium, Calcium, Natrium, Magnesium, Eisen, Mangan, Kupfer u.a.. In Tabelle IV-22 sind die für diese Arbeit ausgewählten Elemente aufgeführt.

Tabelle IV-22: Untersuchte Elemente zur Initiierung der PHB-Synthese und deren Funktion in Bakterien [TEMPEST und WOUTERS 1981, MADIGAN et al. 2001]

| Element (Ion)                   | Funktion in Bakterien   |
|---------------------------------|---|
| Schwefel ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) | struktureller Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Methionin bzw. Vitaminen und Coenzymen                            |
| Kalium( $\text{K}^+$ )          | Bestandteil von Enzymen, wichtiger Bestandteil des Cytoplasmas (Bedeutung für Regulierung der osmotischen Verhältnisse) |
| Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ )  | essentieller Bestandteil und Aktivator von Enzymen, Stabilisator für Zellmembranen und Ribosomen                        |
| Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ )      | Bestandteil vieler Enzyme, Cytochrome und Eisen-Schwefel-Proteine   |
| Mangan ( $\text{Mn}^{2+}$ )     | Bestandteil und Aktivator von Enzymen   |

Die Untersuchungen wurden in der Bioreaktoren UD 5 und UD 50 über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt. Die weiteren Bedingungen entsprachen denen in Kapitel 3.1.3.3 bzw. Tabelle IV-15 beschrieben.

##### 4.4.3.4.1 *PHB-Gehalt*

In Tabelle IV-23 sind die ermittelten PHB-Gehalte als Mittelwerte aus zwei bzw. drei Experimenten dargestellt. Keine der Mangelbedingungen führte zu PHB-Gehalten im Bereich der unter Stickstoff- bzw. Phosphatmangel erreichten Werte (max. 50 %). Vor allem Magnesium-, Eisen- bzw. Manganmangel ergaben eine deutlich niedrigere Polymerakkumulation.

Tabelle IV-23: PHB-Gehalte unter verschiedenen Mangelbedingungen nach 24 h Produktbildung (in Klammern Anzahl der Experimente)

| Mangelbedingung    | PHB-Gehalt [%]     |
|--------------------|--------------------|
| $\text{SO}_4^{2-}$ | $32,6 \pm 2,0$ (2) |
| $\text{K}^+$       | $33,6 \pm 0,3$ (3) |
| $\text{Mg}^{2+}$   | $22,4 \pm 4,9$ (3) |
| $\text{Fe}^{2+}$   | $10,4 \pm 1,2$ (2) |
| $\text{Mn}^{2+}$   | $13,6 \pm 2,1$ (2) |

Die in den Abbildungen 4-29 bis 4-33 dargestellten zeitlichen Verläufe von PHB-, Gesamtbiomasse- und Restbiomasse-Gehalten sowie der Konzentrationen der entsprechenden Ionen zeigten deutliche Unterschiede für die einzelnen Bedingungen. Für die Darstellungen wurde je ein Versuch ausgewählt und zum besseren Vergleich zwischen den Versuchen nicht die gemessenen Konzentrationen der Ionen ( $c_{i,L}$ ) gezeigt, sondern ein auf den Bedarfswert ( $Y_{i/X}$ ) normiertes Verhältnis ( $c_{i,L}/Y_{i/X}$ ) verwendet. Dieser Wert gibt an, wieviel Gramm Biomasse<sup>1</sup> aus der aktuell im Medium vorhandenen Menge eines bestimmten Elements (pro Liter) gebildet werden könnte [ $\text{gX l}^{-1}$ ] und läßt eine Aussage über den Versorgungszustand zu. Die zur Berechnung verwendeten Bedarfswerte wurden in früheren Versuchen ermittelt (Tabelle IV-24).

Tabelle IV-24: Bedarfswerte ausgewählter Elemente für das Wachstum methanotropher Bakterien [WENDLANDT 1979]

| Element | Verbrauchswert ( $Y_{i/X}$ ) |
|---------|------------------------------|
|         | [ $\text{mg g}^{-1}$ ]       |
| S       | 5,5                          |
| K       | 10                           |
| Mg      | 2,5                          |
| Fe      | 0,337                        |
| N       | 120                          |
| P       | 20                           |

Bei der kontinuierlichen Kultivierung wurde die Dosierung der Nährlösung entsprechend der aktuellen Biomassekonzentration so eingestellt, daß der Nährsalzüberschuß die Bildung von  $2 \text{ gX l}^{-1}$  erlaubte ( $c_{i,L}/Y_{i/X} \approx 2$ ). Durch die Verwendung von Leitungswasser wurden jedoch zusätzliche Ionen eingetragen (siehe Tabelle IV-10).

#### SULFATMANGEL

Bei dem dargestellten Experiment unter Sulfatmangel (Abb. 4-29) lag zu Versuchsbeginn ein 6,5facher Überschuß im Medium vor, was einer Konzentration von  $175,6 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ l}^{-1}$  entsprach. Innerhalb von drei Stunden wurden diese Ionen verbraucht und ein Zuwachs an Biomasse von  $8,1 \text{ g l}^{-1}$  registriert. Bis zum Versuchsende blieb die Biomassekonzentration konstant und die Konzentration an Sulfat war nahezu 0 (Nachweisgrenze  $1 \text{ mg l}^{-1}$ ). Die Akkumulation von PHB begann erst nach Verbrauch der Restionen, gekennzeichnet durch ein normiertes Verhältnis  $c_{i,L}/Y_{i/X}$  von  $< 0,1$  ( $t=3 \text{ h}$ ), wobei bis zur 12. Stunde 29,3 % und nach 24 h 32,5 % PHB in der Biomasse akkumuliert wurden. In den Versuchsstunden 12 bis 24 erhöhte sich der PHB-Gehalt noch um ca. 10 % bezogen auf den Endwert. Dieser Verlauf ähnelt dem unter Phosphatmangelbedingungen, wobei bis zur 12. Versuchsstunde etwa 80 % des Endwertes erreicht waren und der PHB-Gehalt in der zweiten Phasen ( $t=12\text{--}24 \text{ h}$ ) weiter zunahm.

<sup>1</sup> Gemeint ist Biomasse im Sinne von „quasi“-PHB-freier Biomasse im Wachstumsprozeß.

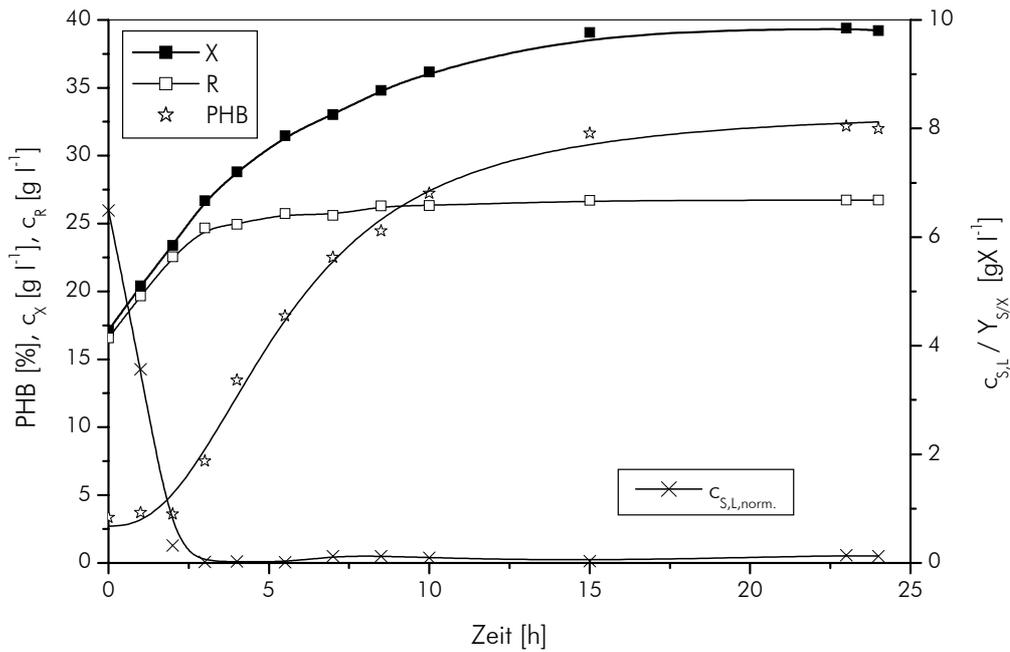


Abb. 4-29: Konzentration von Gesamt- (■) und Restbiomasse (□), PHB-Gehalt der Biomasse (☆) und normierte Sulfatkonzentration (×) in der Kulturflüssigkeit während der PHB-Synthese unter Sulfatmangel

#### KALIUMMANGEL

Der in Abb. 4-30 dargestellte Versuchsverlauf für die PHB-Synthese unter Kaliummangel zeigt Besonderheiten in der zweiten Versuchsphase. Zu Beginn lag ein 5,2facher Überschuss an Kaliumionen vor, der sich innerhalb von 3 h bis zum 2fachen Überschuss verringerte, verbunden mit einem Biomassezuwachs um 6,4 g l<sup>-1</sup> auf 21,6 g l<sup>-1</sup>. Im weiteren Verlauf nahm die Konzentration der Kaliumionen leicht ab, nach 8 h wurde der niedrigste Wert von 1,17 registriert. Ein vollständiger Verbrauch, wie bei den bisherigen Versuchen unter Ammoniumstickstoff-, Phosphat- oder Sulfatmangel beobachtet, wurde zu keinem Zeitpunkt erreicht. Der Biomassegehalt erhöhte sich bis auf 23,0 g l<sup>-1</sup>, blieb bis t=12 h bei diesem Wert und nahm bis Versuchsende geringfügig ab auf 21,8 g l<sup>-1</sup>. Die Konzentration der Kaliumionen zeigte nach der 10. Versuchsstunde überraschend eine Zunahme, die bis Versuchsende andauerte und nach 24 h mit 5,8 gX l<sup>-1</sup> sogar höher war als der Ausgangswert. Dieser Befund läßt sich mit Austauschprozessen zwischen Biomasse und Kulturflüssigkeit erklären [TEMPEST und WOUTHERS 1981]. Auf Grund des spezifischen Kaliumionenkonzentrations-Gradienten (intrazellulär höhere Werte) kommt es bei Änderung der Ionenkonzentration außerhalb der Zelle zu Abgabe von Kaliumionen ins Medium, um die Konzentrationsdifferenz auszugleichen.

Die PHB-Akkumulation begann ca. 3 h nach Versuchsbeginn, nach Unterschreiten einer normierten Konzentration von 1,7 gX l<sup>-1</sup>. Nach 12 h waren 32,8 % und nach 24 h 33,8 % PHB-Gehalt erreicht, d.h., wie in Prozessen unter Ammoniumstickstoffmangel nach 12 h die PHB-Bildung praktisch beendet (97 % des Endwertes). Bereits nach 10 h stagnierte die Zunahme, zu diesem Zeitpunkt stieg die Kaliumkonzentration wieder an. Die Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die PHB-Bildung nicht durch die völlige Abwesenheit von Kalium im Medium sondern durch das Unterschreiten einer bestimmten Konzentration initiiert wird. Für die Misch-

kultur kann diese Konzentration mit  $17 \text{ mg l}^{-1}$  angegeben werden. Möglicherweise wird durch die Abgabe von Kaliumionen aus dem Cytoplasma das osmotische Gleichgewicht so stark verschoben, daß der Zellstoffwechsel nach endlicher Zeit vollständig zum Erliegen kommt. Dafür spricht auch der Verlauf des Sauerstoff- und Methanverbrauches bzw. der Kohlendioxidbildung (Daten nicht gezeigt), die nach ca. 15 h fast vollständig zum Erliegen kommen.

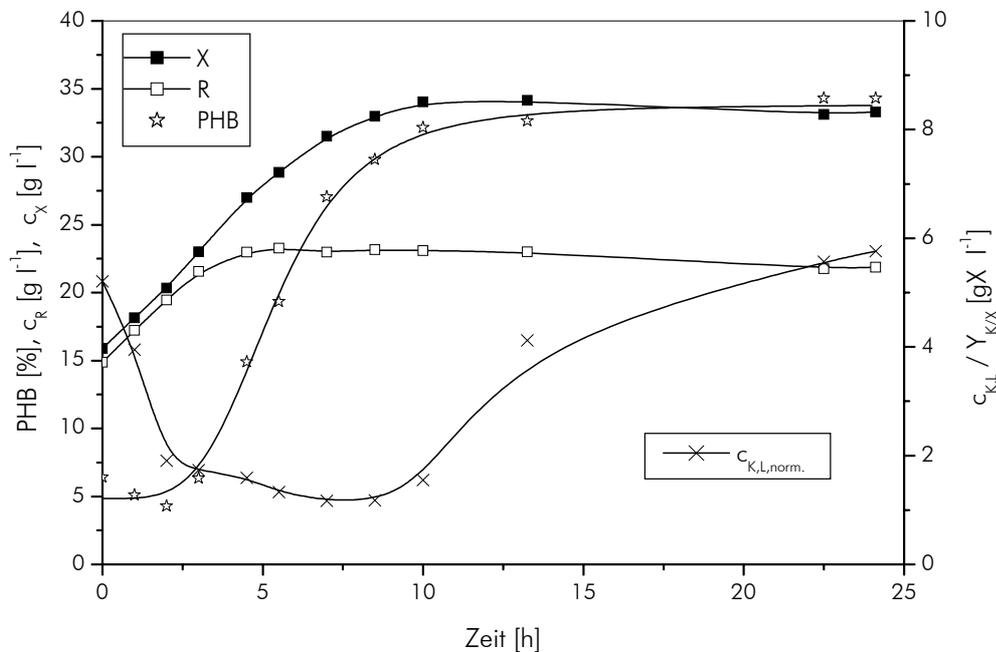


Abb. 4-30: Konzentration von Gesamt- (■) und Restbiomasse (□), PHB-Gehalt der Biomasse (☆) und normierte Kaliumkonzentration (×) in der Kulturflüssigkeit während der PHB-Synthese unter Kaliummangel

#### MAGNESIUMMANGEL

Zu Beginn der PHB-Synthese unter Magnesiummangel lag der Überschuß an Magnesiumionen im Medium bei 3,2 (Abb. 4-31), d.h. in etwa dem durch die Bilanzierung der Nährlösung angestrebten Bereich. Innerhalb von 2 h verringerte sich dieser Wert auf 0,29 und weiter auf  $0,15 \text{ gX l}^{-1}$  nach 24 h. Die Biomassekonzentration erhöhte sich von 20,9 auf  $25,8 \text{ g l}^{-1}$  innerhalb der ersten vier Stunden. Dieser Wert blieb bis zum Versuchsende konstant. Die Synthese von PHB setzte bereits eine Stunde nach Versuchsbeginn bei einer normierten Konzentration von  $0,8 \text{ gX l}^{-1}$  ein. Über einen Zeitraum von sieben Stunden wurde in der Biomasse ein Gehalt von 18,3 % erreicht, der sich bis zum Ende des Versuches nicht mehr signifikant änderte. Dieser Verlauf ähnelte wiederum dem unter Ammoniumstickstoff- und Kaliummangel. Bereits nach 8 h war die PHB-Akkumulation abgeschlossen.

#### EISENMANGEL

Die PHB-Synthese konnte auch durch Eisenmangel initiiert werden. Es wurden jedoch nur sehr niedrige PHB-Gehalte von max. 11 % in der Biomasse beobachtet (Abb. 4-32). Beim Start war Eisen in einem Überschuß von 1,2 im Medium vorhanden; innerhalb von 7 h sank dieser Wert auf  $0,7 \text{ gX l}^{-1}$  ab, verringerte sich im weiteren Versuchsverlauf jedoch nicht. Allerdings erfolgte

im gleichen Zeitraum die Zunahme der Biomassekonzentration um 6,8 auf 16,7 g l<sup>-1</sup>. Das läßt auf intrazelluläre Speicher schließen, aus denen das für den deutlich höheren Biomassezuwachs benötigte Eisen zur Verfügung gestellt wurde. Die PHB-Bildung setzte 2 h nach Versuchsbeginn bei einer normierten Konzentration unter 0,9 gX l<sup>-1</sup> ein. Nach 12 h wurde ein PHB-Gehalt von 10,5 % registriert, der etwa mit dem Endwert nach 24 h übereinstimmte.

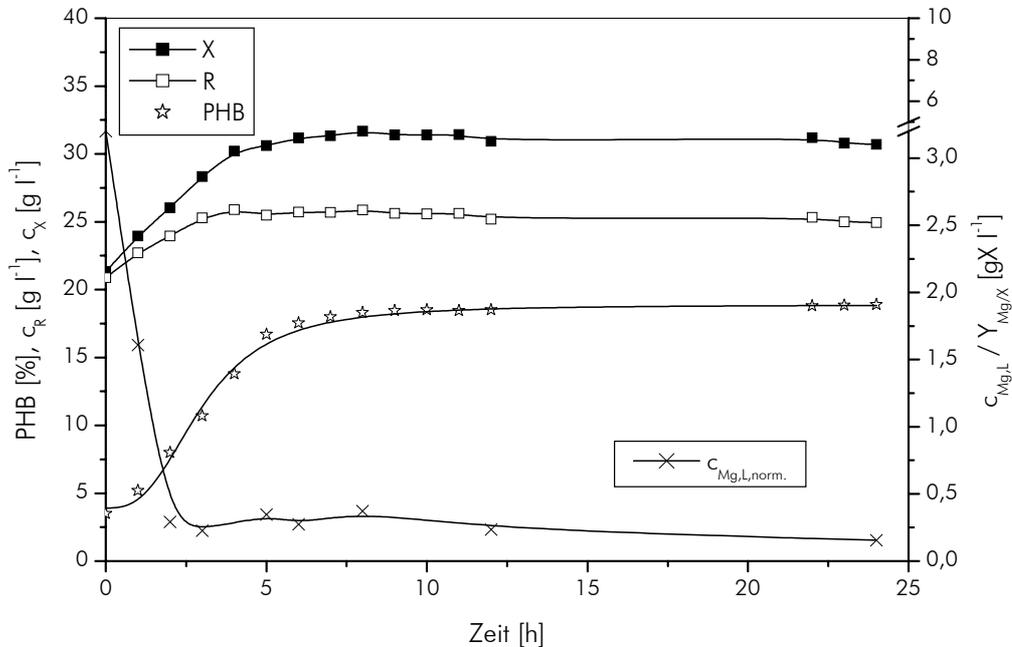


Abb. 4-31: Konzentration von Gesamt- (■) und Restbiomasse (□), PHB-Gehalt der Biomasse (☆) und normierte Magnesiumkonzentration (×) in der Kulturflüssigkeit während der PHB-Synthese unter Magnesiummangel

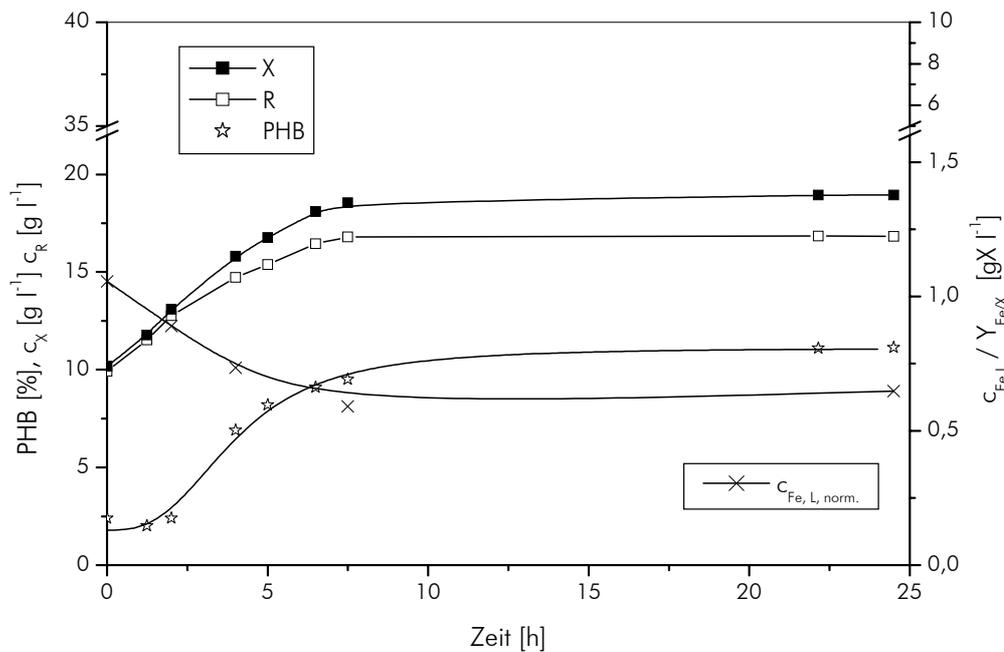


Abb. 4-32: Konzentration von Gesamt- (■) und Restbiomasse (□), PHB-Gehalt der Biomasse (☆) und normierte Eisenkonzentration (×) in der Kulturflüssigkeit während der PHB-Synthese unter Eisenmangel

### MANGANMANGEL

Bei den unter Manganmangel durchgeführten Versuchen war ein völlig anderer Versuchsverlauf zu beobachten (Abb. 4-33). Zu Beginn lag ein Überschuß an Manganionen von  $5 \text{ gX l}^{-1}$  vor, der im Versuchsverlauf kontinuierlich auf  $2,0$  bzw.  $1,2 \text{ gX l}^{-1}$  nach  $8 \text{ h}$  bzw.  $24 \text{ h}$  abnahm. In den ersten zehn Stunden erfolgte ausschließlich die Bildung neuer Biomasse, insgesamt  $20 \text{ g l}^{-1}$ . Dies kann entweder auf Speichereffekte zurückgeführt werden oder aber der zugrunde gelegte Bedarfswert unterscheidet sich deutlich von der real benötigten Manganmenge zur Bildung von einem Gramm Biomasse. Der PHB-Gehalt schwankte in dieser Zeit und lag im Mittel bei  $5 \%$ . Ein Anstieg war nach der  $15.$  Stunde und einer normierten Konzentration von  $< 1,7 \text{ gX l}^{-1}$  zu beobachten, wobei gleichzeitig PHB-freie Biomasse gebildet wurde. Der nach  $24 \text{ h}$  erreichte PHB-Gehalt von  $15,1 \%$  stellte offenbar noch nicht den maximal erreichbaren Wert dar. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde der Prozeß unter Manganmangel jedoch zu diesem Zeitpunkt beendet.

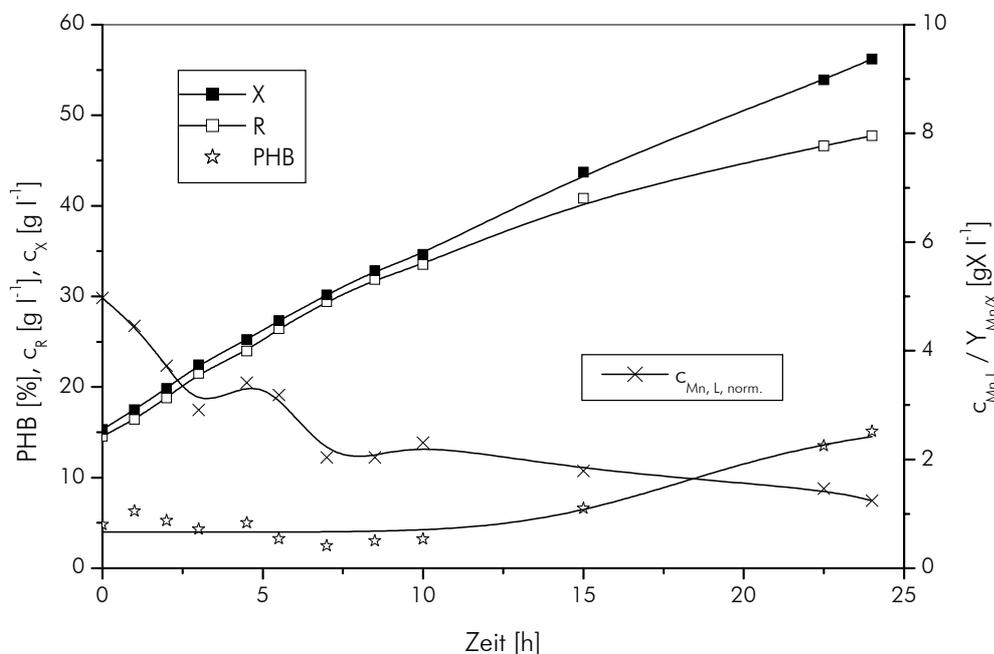


Abb. 4-33: Konzentration von Gesamt- (■) und Restbiomasse (□), PHB-Gehalt der Biomasse (☆) und normierte Mangankonzentration (×) in der Kulturflüssigkeit während der PHB-Synthese unter Manganmangel

#### 4.4.3.4.2 Spezifische PHB-Bildungsrate und Produktivität der PHB-Bildung

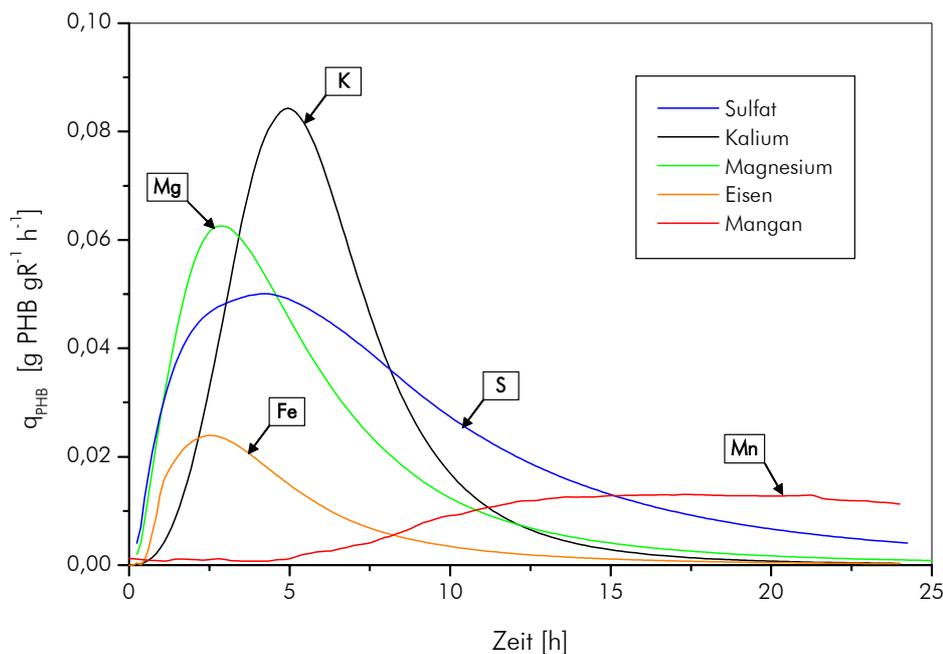
Die spezifischen PHB-Bildungsraten unter den verschiedenen Mangelbedingungen sowie deren zeitlicher Verlauf sind in Tabelle IV-25 und Abb. 4-34 dargestellt.

Die maximalen spezifischen Bildungsraten dieses Versuchskomplexes wurden unter Kaliummangel realisiert ( $0,08 \text{ g PHB gR}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Die Durchschnittswerte über den gesamten Versuch waren am höchsten unter Sulfat- bzw. Kaliummangel ( $0,024$  bzw.  $0,02 \text{ g PHB gR}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Ähnliche Ergebnisse waren bei den Produktivitäten zu erkennen: Maximalwert  $2 \text{ g PHB l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $\text{K}^+$ ), mittlere Produktivitäten  $0,693$  bzw.  $0,512 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $\text{SO}_4^{2-}$  bzw.  $\text{K}^+$ ).

**Tabelle IV-25:** Spezifische PHB-Bildungsraten und Produktivitäten in Abhängigkeit von den Mangelbedingungen (UD 5, UD 50, *ratio*: 25 % CH<sub>4</sub>, relative Standardabweichungen ± 3–8 %, für Magnesium und Sulfatmangel ± 15–18 %)

| Mangel-<br>bedingung          | spezifische Bildungsrate                  |                       | Produktivität der PHB-Bildung            |                       |
|-------------------------------|---|-----------------------|--|-----------------------|
|                               | [g PHB gR <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |                       | [g PHB l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |                       |
|                               | $q_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)}$        | $q_{\text{PHB,max.}}$ | $r_{\text{PHB}}^{\text{ov}(0-24)}$       | $r_{\text{PHB,max.}}$ |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | 0,024                                     | 0,050                 | 0,69                                     | 1,37                  |
| K <sup>+</sup>                | 0,020                                     | 0,080                 | 0,51                                     | 2,01                  |
| Mg <sup>2+</sup>              | 0,011                                     | 0,051                 | 0,35                                     | 1,66                  |
| Fe <sup>2+</sup>              | 0,006                                     | 0,024                 | 0,09                                     | 0,33                  |
| Mn <sup>2+</sup>              | 0,009                                     | 0,013                 | 0,43                                     | 0,81                  |

Abb. 4-34 veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der spezifischen Bildungsrate  $q_{\text{PHB}}$  und verdeutlicht die aus dem Verlauf des PHB-Gehaltes ableitbaren Unterschiede in der Polymerakkumulation in Abhängigkeit von den untersuchten Mangelbedingungen. Die spezifischen Bildungsraten unter allen Bedingungen (außer Manganmangel) erreichten ihr Maximum zwischen 4–9 h nach dem Start des PHB-Bildungsprozesses. Die Höhe dieses Wertes variierte in Abhängigkeit von der Mangelbedingung (Tabelle IV-25). Der Akkumulationsprozeß war unter Kalium-, Magnesium- und Eisenmangel praktisch nach 12 h beendet, die Bildungsrate näherte sich Null. Im Fall von Sulfatmangel wies die Bildungsrate kein scharf ausgeprägtes Maximum auf. Hier setzte die Akkumulation relativ langsam ein und war nach 24 h noch nicht beendet. Der Zeitpunkt der jeweiligen Maxima wurde entscheidend vom Zeitraum bis zur Unterschreitung der kritischen Konzentration für die Initiierung der PHB-Synthese beeinflusst.



**Abb. 4-34:** Zeitlicher Verlauf der spezifischen PHB-Bildungsraten unter verschiedenen Mangelbedingungen

#### 4.4.3.4.3 Spezifische Ausbeutekoeffizienten

Die Ausbeutekoeffizienten der PHB-Synthese (Tabelle IV-26), bezogen auf den Verbrauch von Sauerstoff und Methan sowie die Bildung von Kohlendioxid, variierten mit den Mangelbedingungen und waren prinzipiell niedriger als die Ausbeutekoeffizienten der Biomassesyntese für die Wachstumsphase (siehe 4.3.3). Die Werte für die methanbezogene PHB-Ausbeute waren zudem in allen Fällen kleiner als die theoretisch berechneten Werte  $0,54$  [YAMANE 1993] bzw.  $0,67 \text{ g g}^{-1}$  [ASENJO und SUK 1986b] und die in dieser Arbeit unter Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel ermittelten PHB-Ausbeutekoeffizienten (siehe 4.4.3.1 und 4.4.3.2).

In Abb. 4-35 ist der zeitliche Verlauf der methanbezogenen Ausbeute  $Y_{\text{PHB/CH}_4}$  dargestellt, der für alle Mangelbedingungen (außer Mangan) ähnlich war. In den ersten Stunden wurde bis zur Auszehrung der Restionen im Medium vorrangig PHB-freie Biomasse gebildet, daher waren die PHB-Ausbeuten zunächst niedrig, erhöhten sich jedoch in Folge mit abnehmendem Biomassewachstum. Bis zum Ende der Prozesse war eine leichte Abnahme der Ausbeuten zu beobachten, möglicherweise weil das aufgenommene Methan hauptsächlich für Erhaltungsprozesse genutzt wurde und die PHB-Synthese zum Erliegen kam. Der Ausbeutekoeffizient unter Manganmangel erhöhte sich nach Einsetzen der PHB-Synthese (10. Stunde) kontinuierlich bis zum Versuchsende nach 24 h.

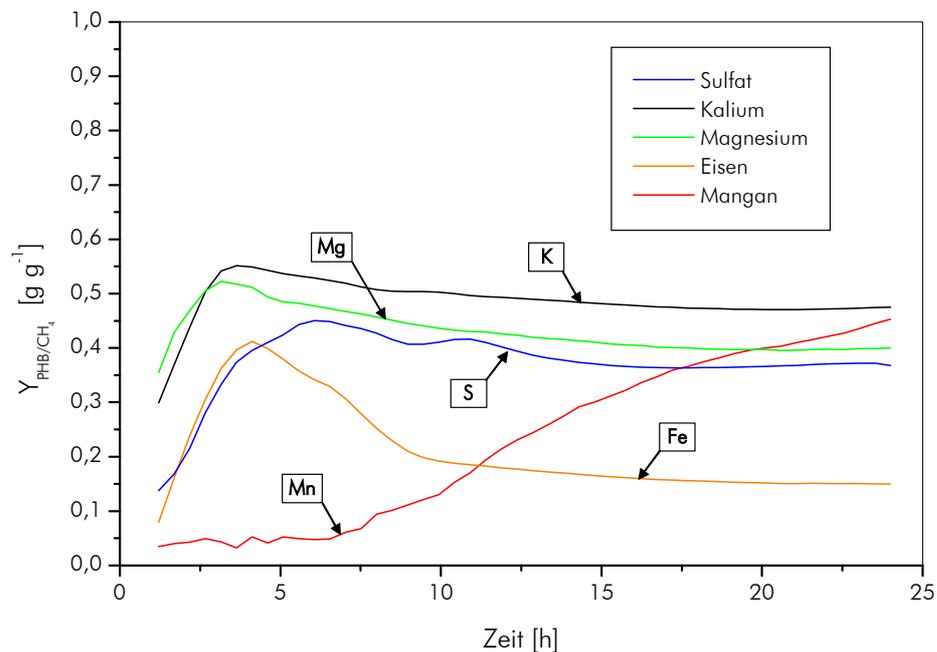


Abb. 4-35: Zeitlicher Verlauf der Ausbeutekoeffizienten der PHB-Synthese aus Methan unter verschiedenen Mangelbedingungen

Tabelle IV-26: Ausbeutekoeffizienten der PHB-Synthese bezogen auf den Verbrauch von Methan und Sauerstoff bzw. für die Bildung von Kohlendioxid (UD 5, UD 50, *ratio*: 25 % CH<sub>4</sub>, Standardabweichungen < ±10 %, \* deutliche Abweichung in Kohlenstoffbilanz )

| Mangelbedingung               | Y <sub>PHB/CH<sub>4</sub></sub> | Y <sub>PHB/O<sub>2</sub></sub> | Y <sub>PHB/CO<sub>2</sub></sub> |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
|                               | [g g <sup>-1</sup> ]            | [g g <sup>-1</sup> ]           | [g g <sup>-1</sup> ]            |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | 0,40                            | 0,11                           | 0,20                            |
| K <sup>+</sup>                | 0,45                            | 0,15                           | 0,25                            |
| Mg <sup>2+</sup>              | 0,39                            | 0,11                           | 0,19                            |
| Fe <sup>2+</sup>              | 0,22                            | 0,06                           | 0,10                            |
| Mn <sup>2+</sup>              | 0,45 *                          | 0,09                           | 0,23                            |

#### 4.4.3.4.4 PHB-Synthese unter Sauerstofflimitation

Wie bereits im Abschnitt 4.3 erwähnt, wurden unter Sauerstofflimitation, die praktisch während der gesamten kontinuierlichen Anzucht- und Wachstumsphase vorlag, nur sehr geringe PHB-Gehalte von 1–3 % in der Biomasse nachgewiesen. Um den Einfluß von Sauerstoffmangel auf die PHB-Synthese mit den anderen untersuchten Mangelbedingungen direkt vergleichen zu können, wurden Experimente unter diskontinuierlichen Bedingungen durchgeführt, in denen die Versorgung mit allen essentiellen Ionen durch manuelle Zugabe des kompletten Nährlösungskonzentrates gewährleistet wurde und nur Sauerstoff das Wachstum limitierte.

Wie Abb. 4-36 zeigt, erfolgte nach Umstellung auf die diskontinuierliche Betriebsweise die Zunahme der Biomasse linear entsprechend der Sauerstoffübergangsrate. Auf Grund der Bildung von Reaktionswasser erhöhte sich während der Versuches das Volumen, im Diagramm wurde daher anstatt der Konzentration die Gesamtmenge der Biomasse dargestellt. Die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit war nach einer Übergangsphase von 2 h durch einen Wert von 47,8 g h<sup>-1</sup> gekennzeichnet und sank nach 11 h (durch Verringerung der Geamtbegasung) auf 35,0 l h<sup>-1</sup>. Die Gesamtmenge m<sub>x</sub> wurde durch zwei Geraden angepaßt, die zur Berechnung der spezifischen Wachstumsrate dienen. In der ersten Phase wurde eine maximale Wachstumsrate von 0,08 h<sup>-1</sup> ermittelt, bedingt durch die erhöhte Biomasse bei gleichbleibendem Sauerstoffübergang verringert sich diese im weiteren Verlauf. Für die zweite Phase ist ein ähnlicher Verlauf zu erkennen, die maximale spezifische Wachstumsrate wurde zu 0,03 h<sup>-1</sup> bestimmt. Eine Akkumulation von PHB war während des gesamten Zeitraumes nicht zu beobachten, der PHB-Gehalt schwankte im Bereich von 3–5 %. Damit konnte in Übereinstimmung mit den kontinuierlichen Versuchen bestätigt werden, daß durch Sauerstofflimitation die PHB-Synthese in *Methylocystis* sp. GB 25 nicht initiiert werden konnte.

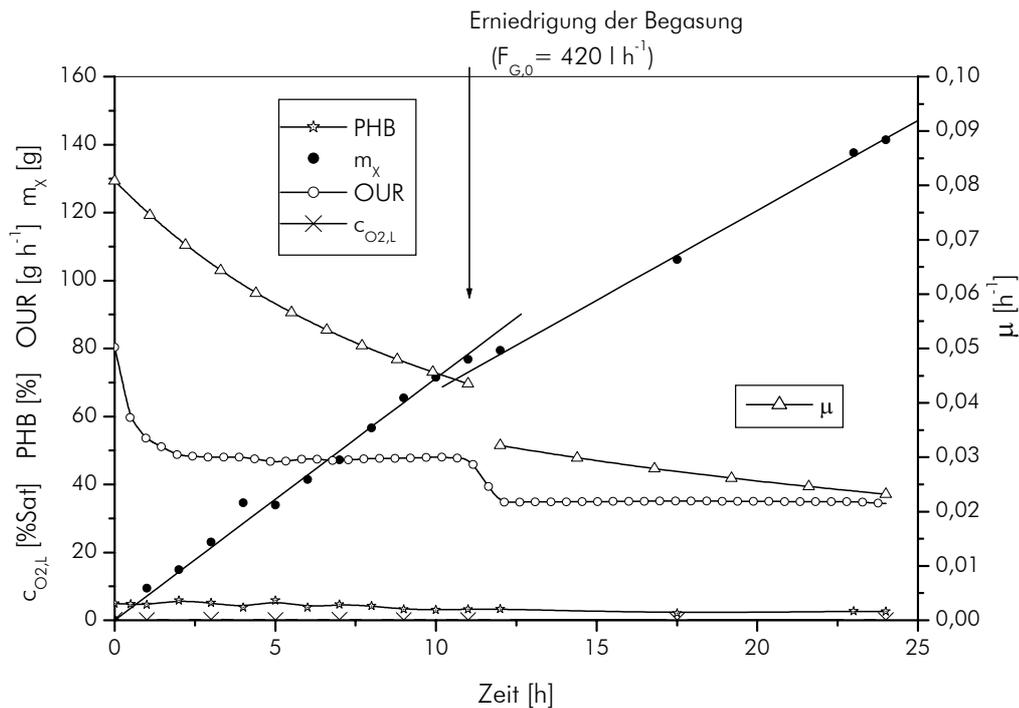


Abb. 4-36: Zeitlicher Verlauf der Gesamtbiomasse (●), Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit (○), spezifischer Wachstumsrate (Δ) und PHB-Gehalt der Biomasse (☆) unter Sauerstoffmangel

#### 4.4.3.4.5 Vergleich der Ergebnisse und Zusammenfassung

Ein Vergleich der durch verschiedene Mangelbedingungen ausgelösten PHB-Synthese zeigt Gemeinsamkeiten und deutliche Unterschiede im Prozeßverlauf und den ermittelten Kennziffern. Berücksichtigt man zusätzlich die Prozesse unter Ammonium- und Phosphatmangel, lassen sich die Mangelfaktoren in folgende Gruppen einteilen:

- PHB-Synthese, ausgelöst durch Mangel an **Kationen** ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ): Nach Eintritt des Mangel kam es innerhalb kurzer Zeit ( $t < 6$  h) zu einer deutlichen Zunahme des PHB-Gehaltes, d.h. diese Prozesse waren durch ausgeprägte Maxima im Verlauf der spezifische Bildungsraten gekennzeichnet. Nach ca. 12 h war praktisch keine weitere Erhöhung des PHB-Gehaltes bzw. eine sehr niedrige Zunahme (für  $\text{NH}_4^+$ ) zu beobachten. Die PHB-Synthese konnte entweder durch vollständiges Fehlen der Ionen ( $\text{NH}_4^+$ ) oder durch das Unterschreiten einer kritischen Konzentration ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) initiiert werden.
- PHB-Synthese, ausgelöst durch Mangel an **Anionen** ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ): Die Akkumulation von PHB begann erst, wenn die Restionen im Medium nahezu vollständig verbraucht waren. Die Akkumulation erfolgte deutlich langsamer als unter Bedingungen des Kationenmangels. Innerhalb von 12 h wurden ca. 75–85 % des Endwertes erreicht und bis zum Versuchsende erhöhte sich der PHB-Gehalt weiter. Der Verlauf der spezifischen Bildungsraten war daher durch niedrigere Maxima gekennzeichnet, die über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten wurden.
- PHB-Synthese unter **Manganmangel**: Der Prozeß lief in anderen Zeitphasen ab als die bisher betrachteten. Der relativ hohe Überschuß an Manganionen im Medium verringerte sich

nur sehr langsam, obwohl für die gemessene Zunahme der Biomasse theoretisch sämtliche Ionen benötigt würden. Die Akkumulation begann erst 12 h nach Start.

- Eine Initiierung der PHB-Synthese durch **Sauerstofflimitation** war nicht möglich.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die oben dargestellten Resultate gegenüber Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel im Hinblick auf eine möglichst effiziente PHB-Synthese keine Verbesserung darstellen. Der beobachtete starke oder weniger ausgeprägte Einfluß verschiedener Elemente auf die PHB-Bildung ist jedoch als Hintergrundwissen für die Prozeßführung nützlich. Die maximalen PHB-Gehalte, spezifischen Bildungsraten und Ausbeuten wurden klar unter Stickstoff- und Phosphatmangel realisiert. Daher sollten diese Prozesse für die weitere Festlegung der optimalen Parameter in Betracht gezogen werden.

#### 4.4.4 CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DER BIOMASSE WÄHREND DER PHB-SYNTHESE

##### 4.4.4.1 Stickstoffgehalt

In ausgewählten Versuchen wurde neben den Konzentrationen der entsprechenden Ionen in der Kulturflüssigkeit auch die Konzentrationen in der Biomasse bestimmt. Damit sollten Zusammenhänge zwischen dem PHB-Gehalt und Biomassebestandteilen (z.B. Proteinanteil) und Wechselwirkungen zwischen Bakterienzelle und Kulturflüssigkeit untersucht werden. Unter Wachstumsbedingungen betrug der Stickstoffgehalt der Biomasse 11,8 %. Für Prozesse unter Ammoniumstickstoff-, Phosphat- und Magnesiummangel wurden über den Versuchszeitraum Stickstoffanalysen der Biomasse durchgeführt. Neben den gemessenen Stickstoffgehalten der Gesamtbioasse (X) wurde mit dem PHB-Gehalt die sich ergebende Stickstoffkonzentration in der PHB-freien Biomasse (R) nach der folgenden Gleichung errechnet:

$$c_{N,R} = \frac{c_{R,X}}{[(100 - \text{PHB}[\%])/100]} \quad (4.13)$$

An dieser Stelle sollen nur die wichtigsten Ergebnisse dargestellt werden. Die zeitlichen Verläufe des Stickstoffgehaltes in Gesamt- und Restbiomasse zusammen mit dem PHB-Gehalt sind in Abbildungen A-1 bis A-3 im Anhang 0 zu finden. In eingebetteten Diagrammen sind dort zusätzlich die aktuellen Stickstoffgehalte bezogen auf den Anfangswert ( $c_{N,i}/c_{N,i,t=0}$ ) dargestellt. In allen Experimenten zeigte sich der gleiche Verlauf: Korrespondierend zur Zunahme des PHB-Gehaltes der Biomasse verringerte sich der Stickstoffgehalt.

In Tabelle IV-27 sind durchschnittliche Stickstoffgehalte zu Beginn und nach 24 h unter Ammoniumstickstoff-, Phosphat- und Magnesiummangel zusammengefaßt. Zusätzlich wurde der Wert zum Zeitpunkt dargestellt, an dem 75 % des maximalen PHB-Gehaltes erreicht waren. Der Stickstoffgehalt der Gesamtbioasse verringerte sich über den Versuchsverlauf erheblich, unter allen Bedingungen wurden die niedrigsten Werte zu Versuchsende, d.h. bei maximalem PHB-Gehalt erreicht. Es zeigte sich, daß keine Unterschiede zwischen Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel existieren, die Stickstoffanteile aber niedriger sind als unter Magnesiummangel, was die PHB-Gehalte reflektiert. Außerdem ist erkennbar, daß die Verringerung des Stickstoffanteils in der Gesamtbioasse unterschiedlich schnell verlief (unter Phos-

phatmangel werden 75 % erst nach 11–12 h erreicht). Dies wurde wiederum bereits für den Verlauf der PHB-Gehaltes beobachtet. Sowohl bei Phosphat- (trotz ausreichender Versorgung mit Ammoniumstickstoff während der PHB-Synthese) als auch Ammoniumstickstoffmangel wurde eine Verringerung des Stickstoffgehaltes in der Restbiomasse (ca. 10–15 %) beobachtet.

Tabelle IV-27: Stickstoffgehalte der Gesamt- und Restbiomasse während der PHB-Synthese unter Ammoniumstickstoff-, Phosphat- und Magnesiummangel

| Mangel-<br>bedingung          | Gehalt                                 | Start (t=0 h) |      | PHB = 0,75 × PHB <sub>max.</sub> |     |      | Ende (t=24 h) |      |         |
|-------------------------------|--|---------------|------|----------------------------------|-----|------|---------------|------|---------|
|                               |  | i=X           | i=R  | t [h]                            | i=X | i=R  | i=X           | i=R  | PHB [%] |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>  | c <sub>N,i</sub> [%]                   | 11,7          | 12,0 | 4–6                              | 7,1 | 11,0 | 5,6           | 10,4 | 46–50   |
|                               | c <sub>N,i</sub> /c <sub>N,i,t=0</sub> | 1             | 1    | 4–6                              | 0,6 | 0,9  | 0,5           | 0,9  |         |
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | c <sub>N,i</sub> [%]                   | 11,5          | 11,9 | 10–12                            | 7,0 | 10,9 | 5,4           | 10,3 | 46–50   |
|                               | c <sub>N,i</sub> /c <sub>N,i,t=0</sub> | 1             | 1    | 10–12                            | 0,6 | 0,9  | 0,5           | 0,9  |         |
| Mg <sup>2+</sup>              | c <sub>N,i</sub> [%]                   | 11,5          | 12,0 | 4–6                              | 9,8 | 11,7 | 9,2           | 11,6 | 18–28   |
|                               | c <sub>N,i</sub> /c <sub>N,i,t=0</sub> | 1             | 1    | 4–6                              | 0,9 | 1    | 0,8           | 1    |         |

Im folgenden Diagramm (Abb. 4-37) sind PHB- und Stickstoffgehalt der Gesamtbiomasse aus verschiedensten PHB-Experimenten und Wachstumsprozessen (insgesamt 130) aufgetragen. Es zeigt sich eine lineare Korrelation ( $R^2=0,99$ ) zwischen den beiden Größen. Der extrapolierte Stickstoffanteil der (vollständig) PHB-freien Biomasse beträgt 12,1 %. Der unter Wachstumsbedingungen gefundene Stickstoffgehalt von 11,8 % (Tabelle IV-9) entspricht einem Anteil von 1,9 % PHB.

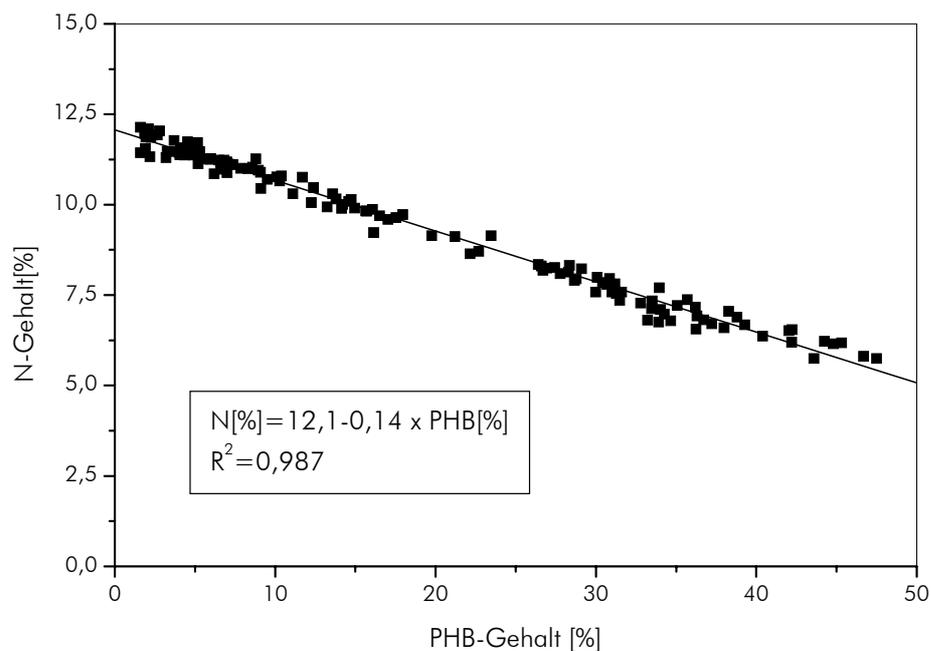


Abb. 4-37: Zusammenhang zwischen Stickstoff- und PHB-Gehalt der Gesamtbiomasse

#### 4.4.4.2 Gehalt der Biomasse an weiteren ausgewählten Elementen (P, S, K, Mg, Fe)

Neben den Stickstoffgehalten wurden während der PHB-Synthese unter weiteren Mangelbedingungen die entsprechenden Elemente in der Biomasse bestimmt, um eventuelle Zusammenhänge zwischen Änderungen des Gehaltes der Elemente in der Biomasse durch die Akkumulation von PHB zu erkennen. Für die PHB-Synthese unter Manganmangel liegen keine Analysen der Biomasse vor.

Wie schon für den Stickstoffgehalt beschrieben, erfolgte unter Berücksichtigung des PHB-Gehaltes eine Berechnung der Anteile in der Restbiomasse, um den Verdünnungseffekt durch die Bildung von PHB als N-, P-, S-, K-, Mg- bzw. Fe-freie Substanz zu eliminieren, entsprechend der Gleichung 4.14 für das jeweilige Element i:

$$c_{i,R} = \frac{c_{i,X}}{[(100 - \text{PHB}[\%]) / 100]} \quad (4.14)$$

Zeitlichen Verläufe von  $c_{i,X}$ ,  $c_{i,R}$  und PHB für typische Versuche sind im Anhang 0 zu finden (Abb. A-4 bis A-8). In eingebetteten Diagrammen sind dort zusätzlich die auf den Anfangswert ( $c_i/c_{i,t=0}$ ) bezogenen aktuellen Gehalte gezeigt. Unter allen Bedingungen wurde eine Abnahme in der Biomasse mit zunehmendem PHB-Gehalt beobachtet. Unterschiede traten in der Höhe der relativen Abnahme im Vergleich zum erreichten PHB-Gehalt auf, außerdem waren auch in der Restbiomasse erhebliche Änderungen zu erkennen.

In Tabelle IV-28 sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengestellt, wobei die ermittelten Gehalte der Elemente jeweils dem untersuchten Faktor zur Initiierung der PHB-Synthese entsprechen, d.h. Phosphorgehalt unter Phosphatmangel, Schwefelgehalt unter Sulfatmangel usw.. Analog werden Werte zu Versuchsbeginn und -ende sowie Werte für den Zeitpunkt dargestellt, als 75 % des maximalen PHB-Gehaltes erreicht waren. Die Anfangsgehalte entsprechen den unter 4.3.4 (Tabelle IV-9) ermittelten Werten.

Der Phosphorgehalt in der Gesamtbio­masse verringerte sich innerhalb von 24 h kontinuierlich auf 29 % der Anfangskonzentration. Der PHB-Gehalt nahm im gleichen Zeitraum auf 47,3 % zu. Im Unterschied zu den Ergebnissen unter Stickstoffmangel zeigte der Phosphoranteil in der Restbiomasse ebenfalls eine deutliche Abnahme auf 47 %. Dies spricht für eine Mobilisierung von Phosphat aus intrazellulären Speichern, mit dem die Bildung neuer Biomasse (mit niedrigerem Phosphorgehalt) ermöglicht wird. (Das wird durch den Verlauf der Rest-Biomassekonzentration unterstrichen, die Zunahme nach Start des Versuches erfolgte i.d.R. um 10 bis 12 g l<sup>-1</sup> bei Überschüssen im Medium für die Bildung von 2–4 gX l<sup>-1</sup>, siehe auch 4.4.3.2)

Der Magnesiumgehalt in der Gesamtbio­masse nahm innerhalb von 24 h auf 62 %, bezogen auf die Restbiomasse auf 74 % des Ausgangswertes ab.

Der Anteil von Kalium an der Gesamtbio­masse während der PHB-Akkumulation unter Kaliummangelbedingungen war durch eine Gesamtabnahme auf 38 % gekennzeichnet, bei einem maximalen PHB-Gehalt von 33 %. Ebenfalls war eine deutliche Verringerung in der Restbiomasse auf 54 % des Startwertes zu beobachten. Diese Versuche waren durch eine Besonderheit gekennzeichnet. Etwa 10 h nach Versuchsbeginn war ein Anstieg der Kaliumkonzentration

im Medium zu verzeichnen. Parallel verringerte sich der Kaliumgehalt in der Biomasse weiter, obwohl der PHB-Gehalt bereits konstant war. Als Ursache konnte somit die Abgabe von Kaliumionen in das umgebende Medium nachgewiesen werden (siehe auch 4.4.3.4.1). Die Mobilisierung von Kaliumionen aus dem Cytosol führte im Gegensatz zu Phosphatmangelbedingungen trotz Abgabe ins Medium nicht zur Bildung neuer Restbiomasse.

Die Analysen während der PHB-Synthese unter Sulfatmangel, bezogen auf die Gesamt- und Restbiomasse, zeigten eine Abnahme des Schwefelgehaltes während des Versuches. Auf den Anfangswert bezogen auf 54 % für X bzw. 77 % für R nach 24 h.

Unter Eisenmangel wurden die geringsten PHB-Gehalte realisiert (ca. 11 %), die Konzentrationen in Gesamt- und Restbiomasse verringerten sich dagegen sehr deutlich, um 51 % bzw. 45 %. Wie unter Phosphatmangel sind wahrscheinlich Speichereffekte die Ursache. Die Mobilisierung von Eisenionen ermöglichte die Bildung von Biomasse in wesentlich höherem Maße als es der Überschuß an Ionen im Medium erlaubt hätte (siehe 4.4.3.4.1).

Wie bereits in den einzelnen PHB-Bildungsprozessen beobachtet, waren die Abnahmen der Konzentrationen der Elemente in der Biomasse durch unterschiedliche Geschwindigkeiten gekennzeichnet.

**Tabelle IV-28:** Gehalte ausgewählter Elemente in Gesamt- und Restbiomasse während der PHB-Synthese verschiedenen Mangelbedingungen

| Mangel-<br>bedingung          | Gehalt                                   | Start (t=0 h) |      | PHB = 0,75 × PHB <sub>max.</sub> |      |      | Ende (t=24 h) |      |
|-------------------------------|--|---------------|------|----------------------------------|------|------|---------------|------|
|                               |  | i=X           | i=R  | t [h]                            | i=X  | i=R  | i=X           | i=R  |
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | c <sub>P,i</sub> [mg g <sup>-1</sup> ]   | 16,6          | 17,0 | 10–12                            | 6,7  | 10,6 | 4,7           | 8,9  |
|                               | c <sub>P,i</sub> /c <sub>P,i,t=0</sub>   | 1             | 1    | 10–12                            | 0,4  | 0,6  | 0,3           | 0,5  |
| Mg <sup>2+</sup>              | c <sub>Mg,i</sub> [mg g <sup>-1</sup> ]  | 2             | 2,1  | 4–6                              | 1,2  | 1,5  | 1,3           | 1,5  |
|                               | c <sub>Mg,i</sub> /c <sub>Mg,i,t=0</sub> | 1             | 1    | 4–6                              | 0,5  | 0,7  | 0,6           | 0,7  |
| K <sup>+</sup>                | c <sub>K,i</sub> [mg g <sup>-1</sup> ]   | 5,6           | 5,8  | 4–6                              | 3,6  | 4,9  | 2,1           | 3,1  |
|                               | c <sub>K,i</sub> /c <sub>K,i,t=0</sub>   | 1             | 1    | 4–6                              | 0,6  | 0,8  | 0,4           | 0,5  |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | c <sub>S,i</sub> [mg g <sup>-1</sup> ]   | 5,5           | 5,7  | 8–10                             | 3,5  | 4,7  | 2,9           | 4,3  |
|                               | c <sub>S,i</sub> /c <sub>S,i,t=0</sub>   | 1             | 1    | 8–10                             | 0,7  | 0,8  | 0,5           | 0,7  |
| Fe <sup>2+</sup>              | c <sub>Fe,i</sub> [mg g <sup>-1</sup> ]  | 0,26          | 0,28 | 5–6                              | 0,14 | 0,16 | 0,11          | 0,13 |
|                               | c <sub>Fe,i</sub> /c <sub>Fe,i,t=0</sub> | 1             | 1    | 5–6                              | 0,70 | 0,73 | 0,48          | 0,58 |

Der Zusammenhang zwischen PHB-Gehalt und dem Anteil der Ionen in der Biomasse kann nicht einheitlich für alle Bedingungen beschrieben werden.

Die Ergebnisse der Analysen (n=65) unter Phosphatmangel sind in Abb. 4-38 dargestellt und zeigen den Zusammenhang zwischen Phosphorkonzentration der Gesamtbio- masse und PHB-Gehalt. Angepaßt mit einer linearen Funktion wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,92 ermittelt, für eine Exponentialfunktion erster Ordnung dagegen ein Wert von 0,97. Dies spricht dafür, daß neben der PHB-Bildung weitere Faktoren, wie die Mobilisierung intrazellulärer Phosphatspeicher, einen Einfluß auf die Abnahme des Phosphorgehaltes besitzen.

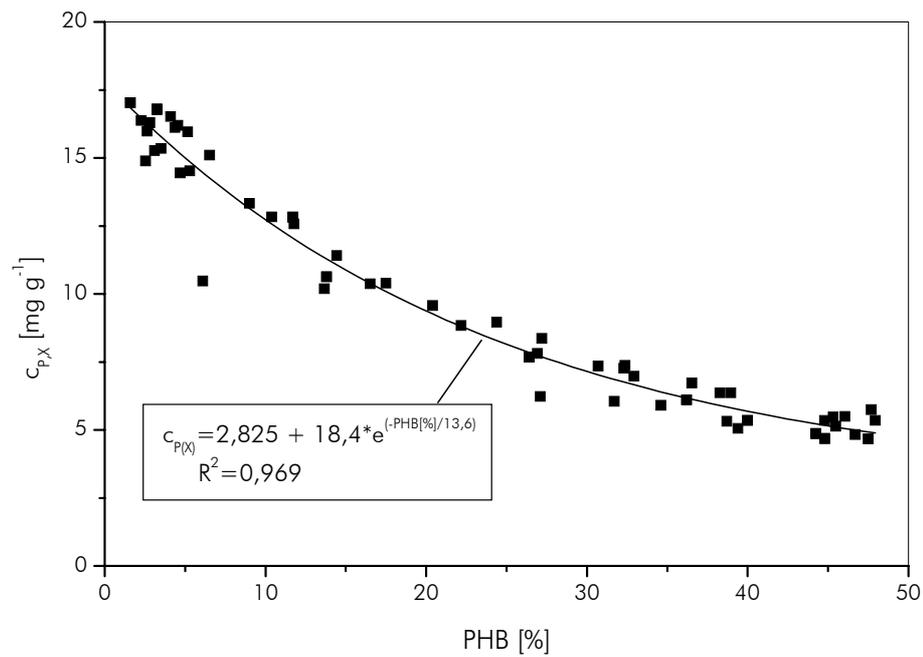


Abb. 4-38: Zusammenhang zwischen Phosphor- und PHB-Gehalt der Gesamtbiomasse

Für Kalium-, Magnesium- und Eisenmangel wurden für lineare Beziehungen ebenfalls niedrigere Korrelationskoeffizienten ( $R^2 < 0,93$ ) bestimmt als für exponentielle Funktionen ( $R^2 > 0,96$ ) (nicht gezeigt).

Unter Sulfatmangel zeigte die Gesamtheit aller untersuchten Proben einen linearen Zusammenhang zwischen PHB-Gehalt und Schwefelkonzentration der Gesamtbiomasse (Abb. 4-30). Dies bestätigt die Beobachtung, daß wie bei Stickstoffmangel Speichereffekte keine Rolle spielen.

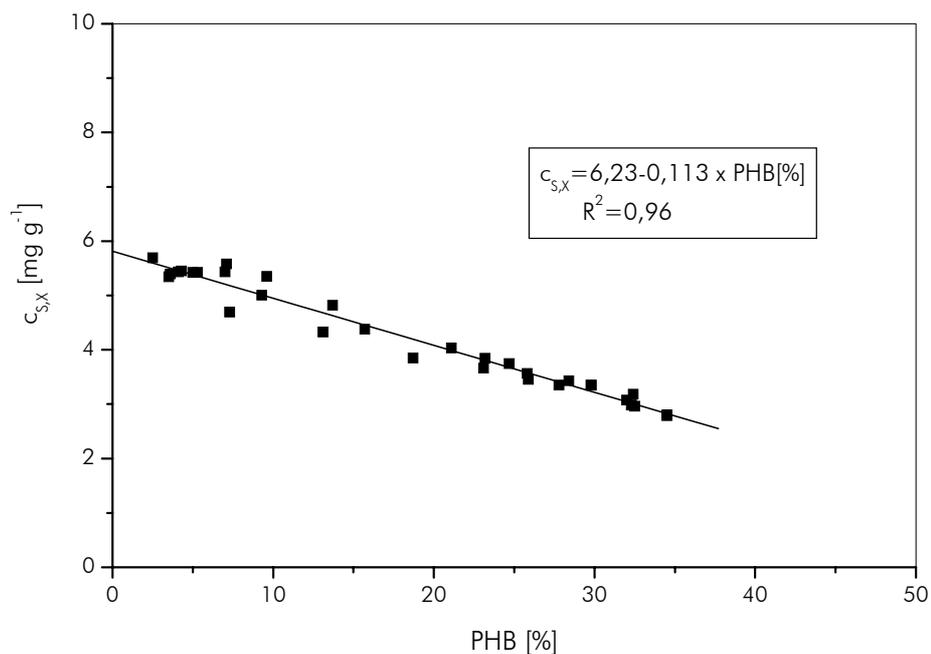


Abb. 4-39: Zusammenhang zwischen Schwefel- und PHB-Gehalt der Gesamtbiomasse

#### 4.4.4.3 Zusammenfassung

Die Analyse der Biomasse im Verlauf der PHB-Bildung unter verschiedenen Mangelbedingungen ergaben einen prinzipiellen Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Element- und dem PHB-Gehalt der Gesamtbio­masse. Dieser Zusammenhang war am deutlichsten für den Stickstoffgehalt, wo eine lineare Korrelation mit  $R^2=0,987$  gefunden wurde. Für die Elemente war die Korrelation weniger deutlich linear ( $R^2<0,93$ ) oder nichtlinear, was als Hinweis auf komplexe Ein­flussfaktoren verstanden werden kann. Für Phosphat, Kalium und Eisen wurde die Mobilisierung intrazellulärer Speicher nachgewiesen, die entweder für die Bildung neuer Bio­masse (Phosphat, Eisen) dienten oder (bei Kalium) ins umgebende Medium abgegeben wurden.

Für die einzelnen Elemente nahm der Gehalt in der Gesamt- und Restbiomasse in unterschiedlichem Maße ab. Die größten Differenzen der Gesamtbio­masse waren bei Phosphat- (31 % des Ausgangswertes) bzw. Kaliummangel (36 %) zu beobachten. Eine Korrelation zum maximal erreichbaren PHB-Gehalt ließ sich aus der Höhe der Abnahme nicht ableiten (Tabelle IV-29).

Die Gehalte der Restbiomasse bestätigen die Existenz intrazellulärer Speicher für bestimmte Elemente und die Fähigkeit der Bakterien, diese unter äußeren Mangelbedingungen zu mobilisieren.

Tabelle IV-29: Gehalte ausgewählter Elemente in Gesamt- (X) und Restbiomasse (R) (bezogen auf den Anfangswert) unter unterschiedlichen Mangelbedingungen und erreichter PHB-Gehalt (Werte nach 24 h PHB-Synthese)

| Mangelbedingung<br>Element (Ion) | $c_i/c_{i,t=0}$ (X) | PHB-Gehalt<br>[%] | $c_i/c_{i,t=0}$ (R) | Bemerkungen  |
|----------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|--|
| Stickstoff ( $\text{NH}_4^+$ )   | 0,50                | 46,8              | 0,87                |  |
| Phosphor ( $\text{PO}_4^{3-}$ )  | 0,31                | 47,5              | 0,54                | intrazellulärer Speicher<br>(Bildung von Biomasse)   |
| Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ )   | 0,64                | 22,4              | 0,74                |  |
| Kalium ( $\text{K}^+$ )          | 0,36                | 33,6              | 0,46                | intrazellulärer Speicher<br>(Akkumulation im Medium) |
| Schwefel ( $\text{SO}_4^{2-}$ )  | 0,54                | 32,6              | 0,79                |  |
| Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ )       | 0,48                | 11,4              | 0,53                | intrazellulärer Speicher<br>(Bildung von Biomasse)   |

#### 4.4.5 CHARAKTERISIERUNG DER EIGENSCHAFTEN DER KULTURFLÜSSIGKEIT WÄHREND DER PHB-SYNTHESE

##### 4.4.5.1 Ionen in der Kulturflüssigkeit

Die Konzentrationsbestimmung von Anionen und Kationen während der PHB-Bildung wurde für das zu untersuchende Element sowie Ammoniumstickstoff und Phosphat (als Leit­ion) durchgeführt.

Die Konzentrationsverläufe der Mangelionen unter den entsprechenden Bedingungen wurden im Kapitel 4.4.3.4.1 dargestellt. Alle weiteren Bestandteile der Nährlösung wurden durch manuelle Zugabe vorzugsweise im Bereich gehalten, der einem theoretischen Zuwachs von zwei Gramm Biomasse pro Liter erlaubte ( $c_{L,i}/Y_{i/X} \approx 2 \text{ gX l}^{-1}$ ).

Für die Prozesse unter Stickstoffmangel ist anzumerken, daß nach Umstellen der pH-Regelung von Ammoniaklösung auf Natronlauge innerhalb kurzer Zeit ( $t < 1 \text{ h}$ ) neben den Ammoniumionen auch Nitrat- und Nitriten vollständig verbraucht wurden, d.h. in der Kulturflüssigkeit waren keine anorganischen Stickstoffverbindungen nachweisbar.

#### 4.4.5.2 Gehalt an organischem Kohlenstoff und kinematische Viskosität

Wie für die Anzucht- und Wachstumsbedingungen wurde der Gehalt an organischem Kohlenstoff im Medium als Summenparameter bestimmt und als Bildungskoeffizient  $F_{\text{CSB}/X}$  auf die Biomassekonzentration bezogen. Die ausgewählten Parameter zeigten unter verschiedenen Mangelbedingungen prinzipiell den gleichen zeitlichen Verlauf, mit zunehmender Versuchszeit erhöhten sich CSB und Viskosität der Kulturflüssigkeit, wobei die Zunahme in den ersten zwölf Stunden am größten war (etwa 88 % der Gesamterhöhung). Beispielhaft ist der Verlauf unter Phosphatmangelbedingungen in Abb. 4-40 dargestellt. Bedingt durch das Ansteigen der Biomassekonzentration änderte sich der Bildungskoeffizient  $F_{\text{CSB}/X}$  unter diesen Bedingungen nur geringfügig von 23,5 auf 28,9  $\text{mg g}^{-1}$  nach 12 h bzw. 26,5  $\text{mg g}^{-1}$  nach 24 h. Die Endwerte variierten jedoch in Abhängigkeit von den gewählten Mangelbedingungen. Bei Magnesium- und Eisenmangel war eine deutlich höhere Bildung zu beobachten (70,7 bzw. 60,2  $\text{mg g}^{-1}$ ). Im Vergleich zu den Wachstumsbedingungen waren für Phosphat- und Manganmangel keine Unterschiede zu erkennen, unter Ammoniumstickstoff- und Schwefelmangel wurde eine Erhöhung um ca. 50 % bestimmt (siehe Abb. 4-41).

Die Viskosität des Mediums nahm während der PHB-Bildungsprozesse grundsätzlich zu, jedoch in Abhängigkeit von den Mangelbedingungen in unterschiedlichem Maße. Die höchsten Viskositäten wurden mit 2,6  $\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$  unter Stickstoffmangel gemessen, für alle anderen Bedingungen lagen die Werte im Bereich von 1,2 bis 1,6  $\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Eine allgemeingültige Korrelation zwischen dem Bildungskoeffizienten bzw. den absoluten CSB-Werten und der Viskosität konnte nicht gefunden werden. Daraus kann abgeleitet werden, daß

- die Substanzen, die in den Summenparameters CSB für organischen Kohlenstoff eingehen, in Abhängigkeit von den Mangelbedingungen variieren,
- die Viskosität der Kulturflüssigkeit nicht vom CSB an sich abhängt, sondern von der Art der jeweiligen Substanzen, die den CSB ausmachen,
- unter Stickstoffmangel Stoffwechselprodukte gebildet werden, die eine deutliche Viskositäts-erhöhung bewirken.

Eine mögliche Ursache für die deutliche Viskositäts-erhöhung bei Stickstoffmangel könnte die Bildung von Exopolysacchariden sein, die für Typ I-Methanotrophe (*M. capsulatus* [DWORKIN und FORSTER 1956]), und verschiedene methylotrophe Bakterien, die als Begleitorganismen in der Mischkultur vorhanden sind, nachgewiesen wurden [HUQ et al. 1978, HOU et al. 1978, BREUER et al. 1995].

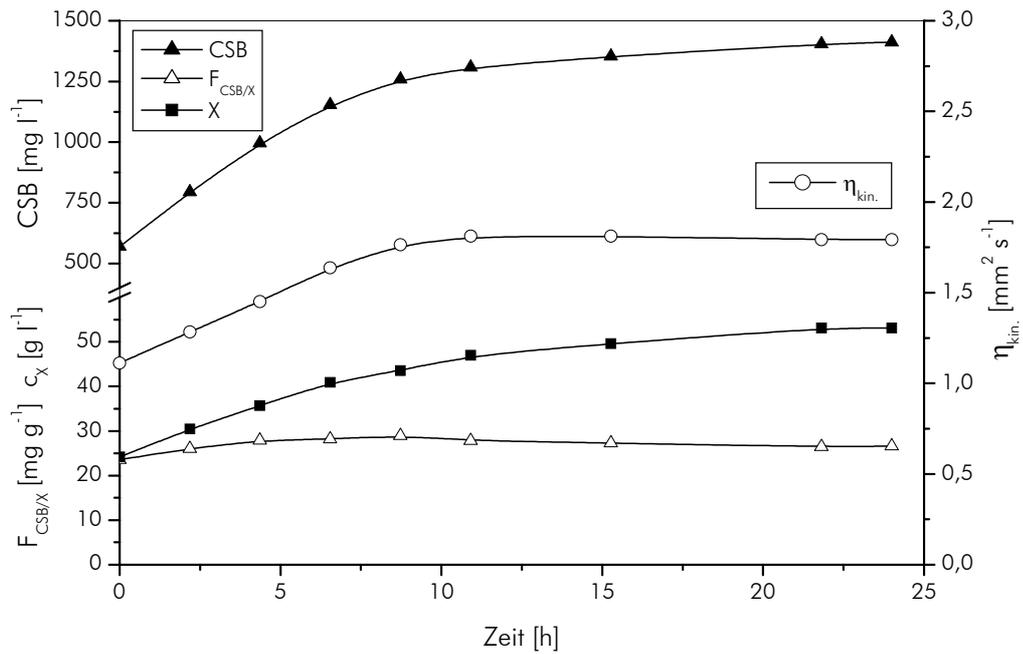


Abb. 4-40: Charakteristische Kenngrößen der Kulturflüssigkeit während der PHB-Synthese unter Phosphatmangel

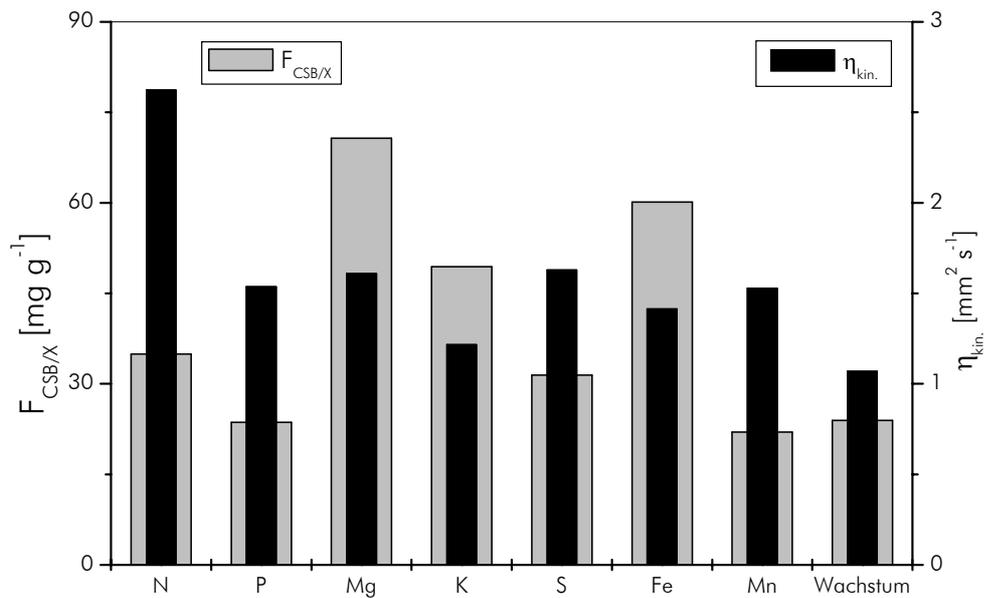


Abb. 4-41: Spezifischer Bildungskoeffizient und kinematische Viskosität der Kulturflüssigkeit nach 24-stündiger PHB-Synthese unter verschiedenen Mangelbedingungen im Vergleich zu Wachstumsprozessen

#### 4.4.6 CHARAKTERISIERUNG DES GEBILDETEN POLYMERS

##### 4.4.6.1 Mittleres Molekulargewicht und Molekulargewichtsverteilung

Intrazellulär gebildeten Speicherpolymere sind neben der chemischen Zusammensetzung (Art und Anteile der Monomere) durch die Anzahl der verknüpften Monomere charakterisiert. Die Beschreibung des Molekulargewichtes des nativen Polymers erfolgt mit einer Verteilungsfunktion der Einzelmolekülmassen als Molekulargewichtsverteilung mit den Kenngrößen **mittleres Molekulargewicht** ( $\overline{M}_w$ ,  $\overline{M}_n$  oder  $\overline{M}_v$ ) und **Uneinheitlichkeit** (U) (siehe Kapitel 2.1.3.3). Der spezifische Aufbau des Polymers beeinflusst die mechanischen Eigenschaften und das Abbauverhalten, daher können die o.g. Größen als Zielparameter für die Synthese von Biopolymeren mit definierten Eigenschaften, sog. „maßgeschneiderte“ Produkte, dienen.

##### 4.4.6.1.1 Endwerte nach 24 h PHB-Synthese

In der vorliegenden Arbeit wurde das Molekulargewicht der unter verschiedenen Mangelbedingungen mit der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) synthetisierten PHB bestimmt. In Abb. 4-42 sind Durchschnittswerte (Standardabweichungen 4–8 %) der mittleren Molekulargewichte  $\overline{M}_w$  (bestimmt mit GPC) und  $\overline{M}_v$  (viskosimetrisch ermittelt) sowie der Uneinheitlichkeiten U (bestimmt mit GPC) 24 h nach Induktion der PHB-Synthese dargestellt. Die maximalen mittleren Molekulargewichte wurden unter Kaliummangel erreicht und waren um 25 % (GPC) bzw. 18 % (Viskosimetrie) höher<sup>1</sup> als die Werte bei Stickstoff-, Phosphat-, Magnesium- und Sulfatmangel:  $3,10 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup> im Vergleich zu  $2,4\text{--}2,5 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup> (GPC) bzw.  $1,54 \times 10^6$  verglichen mit  $1,28\text{--}1,33 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup> (Viskosimetrie). Für Prozesse unter Eisen- und Manganmangel betragen die mittleren Molekulargewichte mit  $0,90 \times 10^6$  bzw.  $0,85 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup> (Viskosimetrie) nur 72 % bzw. 66 % der Werte unter Stickstoff-, Phosphat-, Magnesium- und Sulfatmangel (keine GPC-Werte vorhanden). Die Uneinheitlichkeiten waren nach 24 h durch Werte von 1,9–2,2 gekennzeichnet und von den Mangelbedingungen unabhängig.

Da auch während der kontinuierlichen Wachstumsprozesse stets ein geringer PHB-Gehalt nachweisbar war, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und diese PHB extrahiert. Aus den einzelnen Mengen wurde eine Mischprobe hergestellt, um die Analysen zu ermöglichen. Die Werte besitzen daher lediglich orientierenden Charakter. Das mittlere Molekulargewicht war mit  $7,2 \times 10^5$  (GPC) bzw.  $3,4 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup> (Viskosimetrie) deutlich niedriger als unter Bedingungen der PHB-Synthese und durch eine breite Verteilung (U=29,8) gekennzeichnet.

---

<sup>1</sup> Signifikant höher (t-Test, Signifikanzniveau 0,05). Für Kalium n=3, alle anderen Proben n=20.

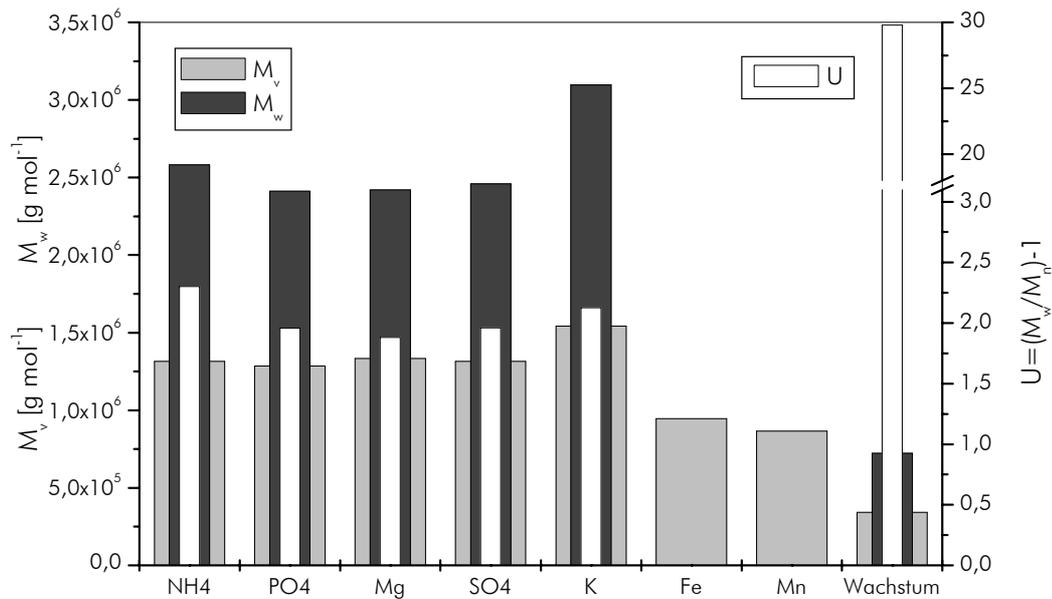


Abb. 4-42: Mittlere Molekulargewichte (GPC und Viskosimetrie) und Uneinheitlichkeiten der akkumulierten PHB nach 24 h PHB-Bildungsprozeß (Mittelwerte). Zum Vergleich sind auch die Werte für eine Mischprobe aus der Wachstumsphase gezeigt.

#### 4.4.6.1.2 Bestimmung des mittleren Molekulargewichtes und der Uneinheitlichkeit in Abhängigkeit vom Prozeßverlauf

In den Abbildungen 4-43 bis 4-47 sind die zeitlichen Verläufe der mittleren Molekulargewichte und der Uneinheitlichkeiten (bestimmt mit GPC) zusammen mit den PHB-Gehalten der Biomasse für die verschiedenen Mangelbedingungen dargestellt. Als Ausgangspunkte ( $t=0$ ) wurden in allen Darstellungen die für den Wachstumsprozeß ermittelten Werte eingesetzt. Als einheitlicher Vergleich wurde außerdem der 75 % Wert des maximalen PHB-Gehaltes bestimmt und Zeitpunkt und Höhe des mittleren Molekulargewichtes verglichen.

#### AMMONIUMSTICKSTOFFMANGEL

Das Molekulargewicht nahm zu Beginn sehr schnell zu. Der Verlauf gleicht dem des PHB-Gehaltes. Zum Zeitpunkt, an dem 75 % des maximalen PHB-Gehaltes erreicht waren ( $t \approx 4$  h), war das mittlere Molekulargewicht auf 81 % des Endwertes gestiegen. Die Uneinheitlichkeit verringerte sich innerhalb von 8 h bis auf das Niveau des Endwertes:  $U=2,2$  (Abb. 4-43).

#### PHOSPHATMANGEL

Der Anstieg des mittleren Molekulargewichtes unter Phosphatmangel erfolgte (wie auch die PHB-Bildung) langsamer als unter Stickstoffmangel. 75 % des Maximalwertes des Molekulargewichtes (wie auch des PHB-Gehaltes) waren erst nach 10 h erreicht. Die Uneinheitlichkeit nahm während des gesamten Prozesses kontinuierlich ab und betrug nach 12 h noch das 2,3fache des Endwertes:  $U=1,95$  (Abb. 4-44).

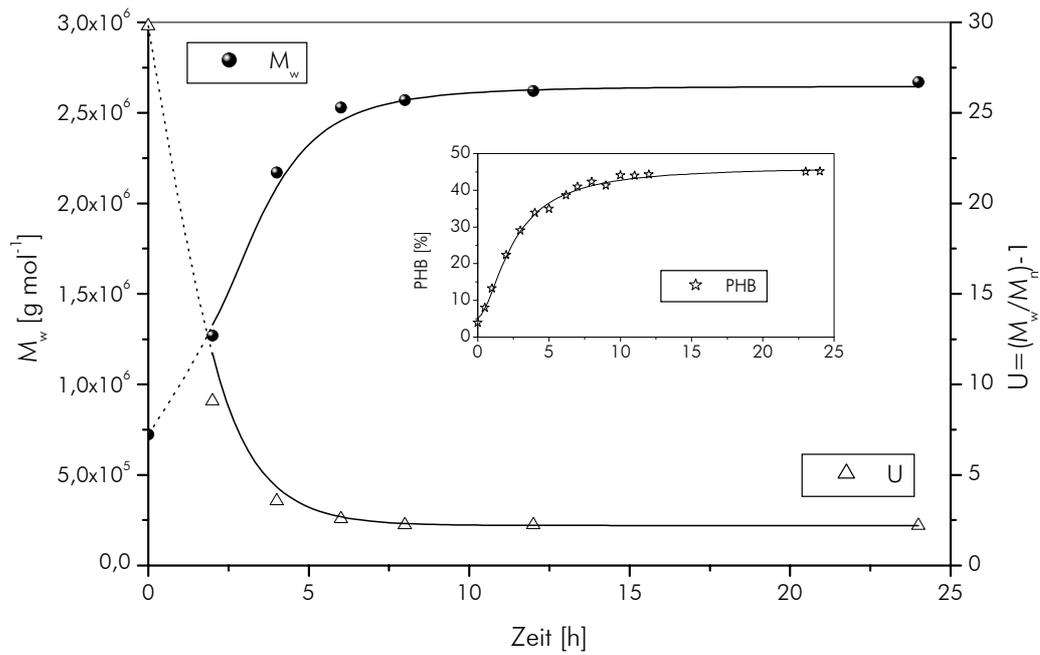


Abb. 4-43: Zeitlicher Verlauf des mittleren Molekulargewichtes (●) und der Uneinheitlichkeit ( $\Delta$ ) (bestimmt mit GPC) sowie PHB-Gehalt der Biomasse ( $\star$ ) während der PHB-Synthese unter Ammoniumstickstoffmangel

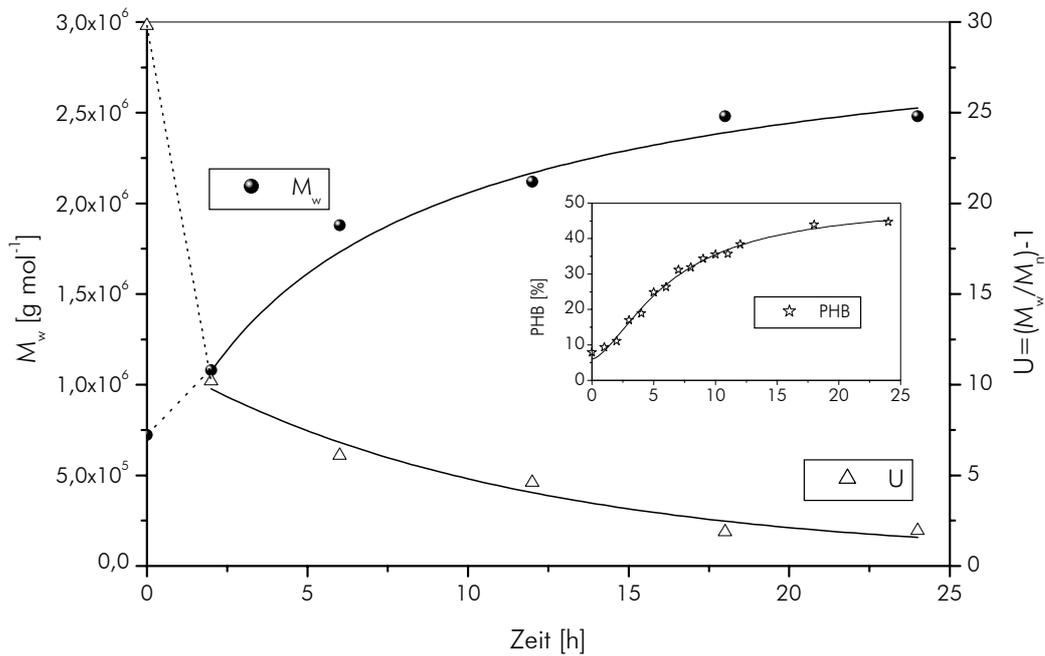


Abb. 4-44: Zeitlicher Verlauf des mittleren Molekulargewichtes (●) und der Uneinheitlichkeit ( $\Delta$ ) (bestimmt mit GPC) sowie PHB-Gehalt der Biomasse ( $\star$ ) während der PHB-Synthese unter Phosphatmangel

### SULFATMANGEL

Das Molekulargewicht nahm bis zum Versuchsende korrespondierend zum PHB-Gehalt leicht zu. Nach ca. 9 h waren 81 % des Endwertes des mittleren Molekulargewichtes und 75 % des maximalen PHB-Gehaltes erreicht. Die Uneinheitlichkeit war bereits nach 6 h auf das Niveau des Endwertes ( $U=1,6$ ) gesunken, obwohl sich Molekulargewicht (auf  $2,57 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ ) und PHB-Gehalt danach noch leicht erhöhten (Abb. 4-45).

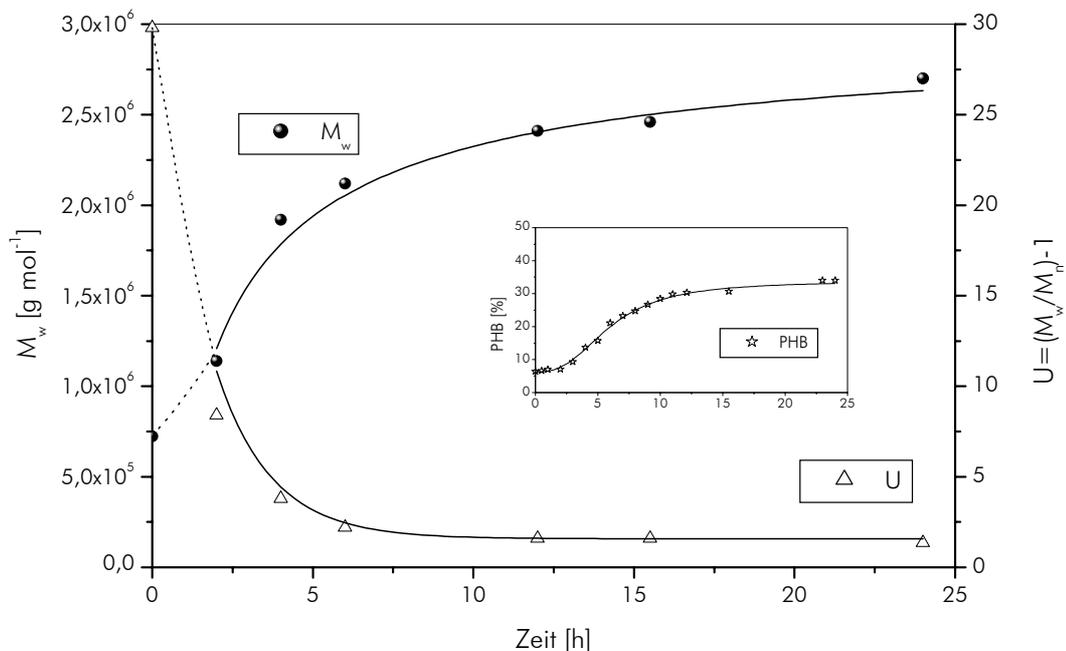


Abb. 4-45: Zeitlicher Verlauf des mittleren Molekulargewichtes (●) und der Uneinheitlichkeit ( $\Delta$ ) (bestimmt mit GPC) sowie PHB-Gehalt der Biomasse ( $\star$ ) während der PHB-Synthese unter Sulfatmangel

### KALIUMMANGEL

Unter Kaliummangel war nach 5 h bereits eine Zunahme des mittleren Molekulargewichtes auf 85 % des Maximums zu verzeichnen, zu diesem Zeitpunkt hatte der PHB-Gehalt 75 % erreicht. Die Molekulargewichtsverteilung änderte sich in diesem Experiment bereits nach vier Stunden nicht mehr ( $U=1,89$ ) (Abb. 4-46).

### MAGNESIUMMANGEL

Der zeitliche Verlauf der Parameter unter Magnesiummangel zeigt Ähnlichkeiten zur der PHB-Synthese bei Abwesenheit von Kalium und Ammoniumstickstoff. Das Molekulargewicht erhöhte sich zu Beginn sehr schnell und erreichte im gezeigten Versuch bereits nach 6 h mit  $2,3 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  95 % des Endwertes. Die Zunahme des PHB-Gehaltes erfolgte im gleichen Zeitraum auf 75 %. Die Uneinheitlichkeit in dem dargestellten Prozeß war bereits nach 2 h durch niedrige Werte gekennzeichnet ( $U=3,1$ ) und änderte sich nach weiteren 2 h praktisch nicht mehr ( $U=1,78$ ) (Abb. 4-47).

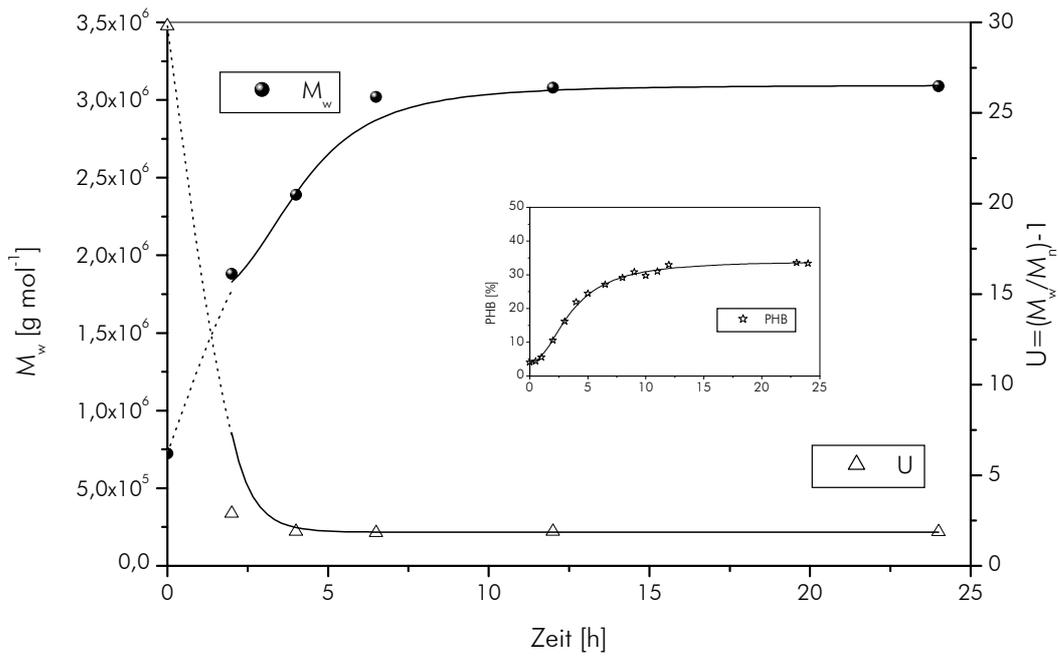


Abb. 4-46: Zeitlicher Verlauf des mittleren Molekulargewichtes (●) und der Uneinheitlichkeit ( $\Delta$ ) (bestimmt mit GPC) sowie PHB-Gehalt der Biomasse ( $\star$ ) während der PHB-Synthese unter Kaliummangel

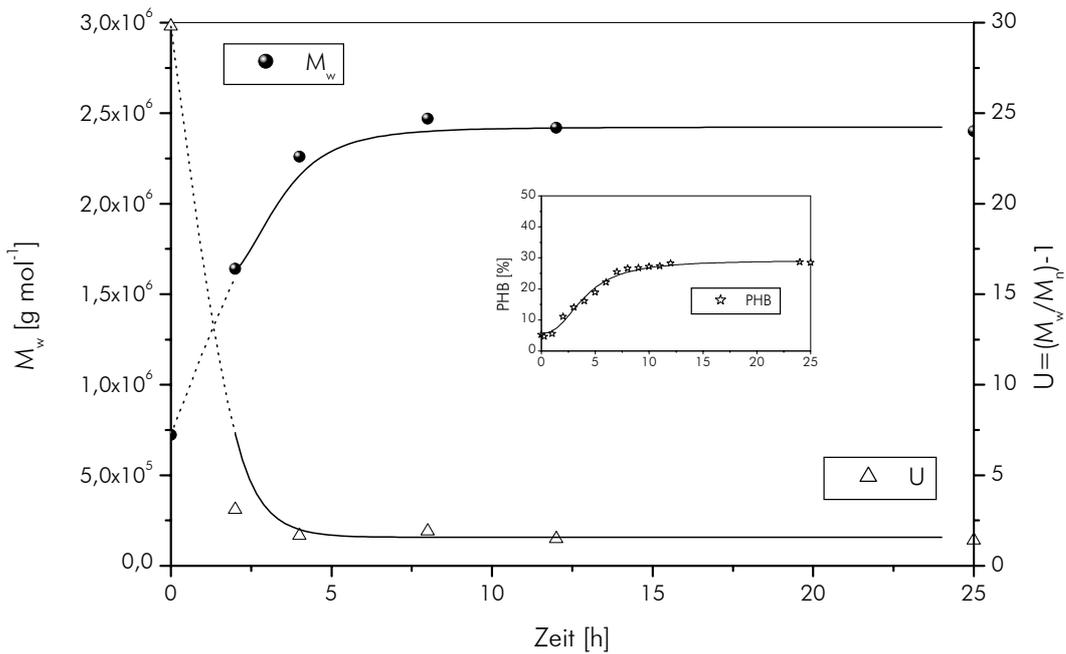


Abb. 4-47: Zeitlicher Verlauf des mittleren Molekulargewichtes (●) und der Uneinheitlichkeit ( $\Delta$ ) (bestimmt mit GPC) sowie PHB-Gehalt der Biomasse ( $\star$ ) während der PHB-Synthese unter Magnesiummangel

#### 4.4.6.2 Qualität des Polymers im Hinblick auf den Einsatz als Medizinprodukt

PHB ist aufgrund seiner Biokompatibilität für Anwendungen in der Medizin prädestiniert. Ein wichtiges Kriterium, das für den Einsatz als medizinischer Werkstoff erfüllt sein muß, ist neben einem sehr niedrigen Stickstoffgehalt ein geringer Gehalt an Schwermetallen. Diese Ansprüche müssen bei Fermentation und Aufarbeitung berücksichtigt werden.

##### 4.4.6.2.1 *Stickstoffgehalt des Polymers*

Für die Anwendung von PHB als Implantatmaterial wird z.B. durch das Kompetenzzentrum für Biomedizinische Technik der Universität Rostock ein Stickstoffgehalt  $< 0,02\%$  gefordert, um eine Abwesenheit von allergie- bzw. entzündungsauslösenden Fremdproteinen in dem das Implantat umgebenden Gewebe zu gewährleisten, aber auch die Anwesenheit von Bakterientoxinen auszuschließen. Der Stickstoffgehalt des Polymers wird entscheidend durch die gewählte Extraktionsmethode beeinflusst.

PHB<sup>1</sup> aus Prozessen mit unterschiedlichen Mangelbedingungen wurden bezüglich ihres Stickstoffgehaltes untersucht. In Tabelle IV-30 sind Proben gezeigt, die mit alternativen Aufarbeitungsvarianten gewonnenen wurden. Dabei kamen das Lösungsmittel 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) [SCHUMANN und WENDLANDT 1999] sowie ein chemisch-enzymatisches Aufschlußverfahren (CEA) zum Einsatz [SCHUMANN und MÜLLER 2000]. Es kann festgestellt werden, daß unter den genannten Varianten nur die Lösungsmittlextraktion mit DCE PHB der geforderten Reinheit für den Einsatz als Implantat liefert. Für andere Anwendungen könnten die o.g. Aufarbeitungsvarianten praktikable Alternativen zu der Extraktion mit halogenhaltigen Lösungsmitteln darstellen.

Tabelle IV-30: Stickstoffgehalt von PHB in Abhängigkeit vom Extraktionsverfahren [SCHUMANN et al. 2000, Analysenmethoden: \*DIN 38409 H27, #CHN-Analysator (Nachweisgrenze 0,04 %)]

| Aufarbeitungsmethode | Gesamtstickstoffgehalt [%] |
|----------------------|----------------------------|
| DCE                  | $< 0,01^*$                 |
| NMP                  | 0,8–1,2 <sup>#</sup>       |
| CEA                  | 0,4–0,9 <sup>#</sup>       |

##### 4.4.6.2.2 *Schwermetallgehalt des Polymers*

Für die Analysen wurden zwei Proben ausgewählt, die nach 24 stündigem PHB-Syntheseprozess unter Phosphat- (PHB 1) bzw. Ammoniumstickstoffmangel (PHB 2) mittels Standardextraktion gewonnen wurden. In Tabelle IV-31 sind die Ergebnisse im Vergleich mit Literaturwerten (Biopol®) und orientierenden Vorgaben für die medizinische Anwendung [METZNER 1998] dargestellt.

<sup>1</sup> Gewonnen durch Standardextraktion, siehe 3.8.2

Tabelle IV-31: Schwermetallgehalte von PHB (aus Methan) und Biopol® [GOTTSCHALL et al. 1994] im Vergleich zu Empfehlungen für den Einsatz in der Medizin (n.n. = nicht nachweisbar, n.b. = nicht bestimmt, \*Markenname für PHB, hergestellt von Buna SOW Leuna Olefinverbund GmbH)

| Element | PHB 1                  | PHB 2                  | Vorgabe Sconacell®*    | Biopol®                |
|---------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|         | [mg kg <sup>-1</sup> ] |
| Cd      | < 0,02                 | < 0,02                 | <0,7                   | 0,01                   |
| Co      | < 0,02                 | < 0,02                 | <0,7                   | n.b.                   |
| Cr      | 1,2                    | 1,7                    | 1,1                    | 0,17                   |
| Cu      | 0,8                    | 0,35                   | <0,7                   | 1,37                   |
| Fe      | 14                     | 21                     | <0,7                   | n.b.                   |
| Mn      | < 0,25                 | < 0,24                 | <0,7                   | n.b.                   |
| Ni      | 0,3                    | < 0,21                 | <0,7                   | 0,37                   |
| Pb      | 0,1                    | 0,07                   | <3                     | 0,1                    |
| Zn      | <1                     | <1                     | 3                      | 28,5                   |
| Hg      | n.n.                   | n.n.                   | 0,5                    | n.b.                   |

Die Schwermetallgehalte der PHB für Cadmium, Kobalt, Kupfer, Mangan, Nickel, Blei und Quecksilber liegen unter den empfohlenen Grenzwerten. Der Zinkgehalt von Biopol® ist deutlich höher, wobei das untersuchte Produkt nicht für den medizinischen Einsatz vorgesehen war. Zur Aufklärung von Ursachen für höhere Werte von Eisen und Chrom der eigenen PHB-Proben wurden zusätzlich die Biomassen BTS 1 und BTS 2, aus denen PHB 1 bzw. PHB 2 extrahiert wurden und die verwendeten Extraktionsmittel untersucht (Tabelle IV-32).

Tabelle IV-32: Anteile ausgewählter Schwermetalle in der Biotrockenmasse und ihre Konzentrationen in den verwendeten Lösungsmitteln [\*MERCK 2000]

| Element | Methanol, p.A.        | 1,2-Dichlorethan*, reinst | BTS 1                  | BTS 2                  |
|---------|-----------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|
|         | [mg l <sup>-1</sup> ] | [mg l <sup>-1</sup> ]     | [mg kg <sup>-1</sup> ] | [mg kg <sup>-1</sup> ] |
| Cd      | < 0,0001              | ≤ 0,025                   | < 0,02                 | < 0,02                 |
| Cr      | 0,00005               | ≤ 0,025                   | 6,4                    | 3,2                    |
| Co      | < 0,0001              | ≤ 0,025                   | 2,8                    | 3,1                    |
| Cu      | < 0,0004              | ≤ 0,025                   | 100                    | 84                     |
| Fe      | 0,011                 | ≤ 0,625                   | 175                    | 116                    |
| Mn      | 0,00004               | ≤ 0,025                   | 177                    | 104                    |
| Ni      | < 0,0000013           | ≤ 0,025                   | 10                     | 11                     |
| Pb      | 0,00012               | ≤ 0,025                   | < 0,05                 | < 0,05                 |
| Zn      | < 0,006               | ≤ 0,125                   | 42                     | 42                     |

Nach einer Abschätzung der verwendeten Mengen von Biotrockenmasse und Extraktionsmittel ist eine Kontamination durch die verwendeten Extraktionsmittel unwahrscheinlich. Daher ist zu vermuten, daß Chrom- und Eisenspuren aus der Edelstahlwand des Bioreaktors gelöst wurden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnene PHB (METHANOMER<sup>®</sup>) erfüllte hinsichtlich des Gehaltes an Schwermetallen die gestellten Anforderungen für den Einsatz als Medizinprodukt. Lediglich für Eisen wurde ein höherer Wert bestimmt. In Untersuchungen an der Universität Rostock konnte die Biokompatibilität dieser PHB nachgewiesen werden (siehe 4.4.6.2.3).

#### 4.4.6.2.3 Untersuchungen zur Biokompatibilität<sup>1</sup>

Die Biokompatibilität von ausgewählten PHB-Proben wurde mit *in vitro* XXT-Tests untersucht (siehe 3.8.8). Die Biokompatibilität von PHB ist prinzipiell bekannt, daher standen zwei Fragestellungen im Mittelpunkt. 1) Beeinflußt das Aufarbeitsverfahren diese Eigenschaft des Polymers und 2) gibt es Unterschiede in der Biokompatibilität des Polymers, wenn Erdgas anstelle von Methan eingesetzt wird (siehe 4.7.1) ?

Die Gewinnung des reinen Polymers spielt im Gesamtproduktionsprozeß eine wichtige Rolle. Neben der Lösungsmittelextraktion mit Chloroform, Methylenchlorid, 1,2-Dichlorethan [WALKER et al. 1981, HRABAK 1992, RAMSAY et al. 1994] wurde, vor allem unter Berücksichtigung des ökologischen Aspekts, versucht, alternative Aufarbeitsverfahren zu etablieren, z.B. mit Natriumhypochlorit [RAMSAY et al. 1990], Essigsäure [LEHMANN et al. 1993] oder enzymatischen Verfahren [BYROM 1987]. Auch für den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Prozeß wurde durch einen Kooperationspartner ein alternatives chemisch-enzymatisches Verfahren entwickelt, das eine Gewinnung von PHB mit einer Reinheit von > 98 % und hoher Extraktionsausbeute (> 90 %) erlaubt [SCHUMANN et al. 2000, SCHUMANN und MÜLLER 2000]. Die Biokompatibilität dieses Produktes PHB(CEA)<sup>2</sup> wurde im Vergleich mit PHB aus der Standardextraktion PHB(DCE) sowie mit zwei nachbehandelten Proben des neuen Verfahren PHB(CEA1)<sup>3</sup> und PHB(CEA2)<sup>4</sup> untersucht. Es zeigten sich klare Unterschiede für die Biokompatibilität von PHB aus verschiedenen Aufarbeitsvarianten (Abb. 4-48). PHB(DCE) zeigte die beste, PHB(CEA) die schlechteste Biokompatibilität. Da sich auch der Stickstoffgehalt dieser Proben deutlich unterschied, wird ein Zusammenhang zwischen Biokompatibilität und Stickstoffgehalt vermutet [FREIER 1999], der u.a. durch Bakterientoxine verursacht werden könnte. Die besondere Eignung der Lösungsmittelextraktion zur Gewinnung „medizinisch reiner“ PHB aus *R. eutropha*, *A. latus* und rekombinanten *E. coli* wurde auch von LEE et al. (1999) bestätigt, ein alternatives Extraktionsverfahren mit NaOH für *E. coli* erreichte jedoch vergleichbare Ergebnisse.

---

<sup>1</sup> Die Untersuchungen wurden am Institut für Biomedizinische Technik der Universität Rostock durchgeführt.

<sup>2</sup> CEA: Chemisch-enzymatischer Aufschluß [SCHUMANN und MÜLLER 2000]

<sup>3</sup> CHCl<sub>3</sub>-Umfällung von PHB(CEA)

<sup>4</sup> PHB(CEA), gewaschen mit Methanol.

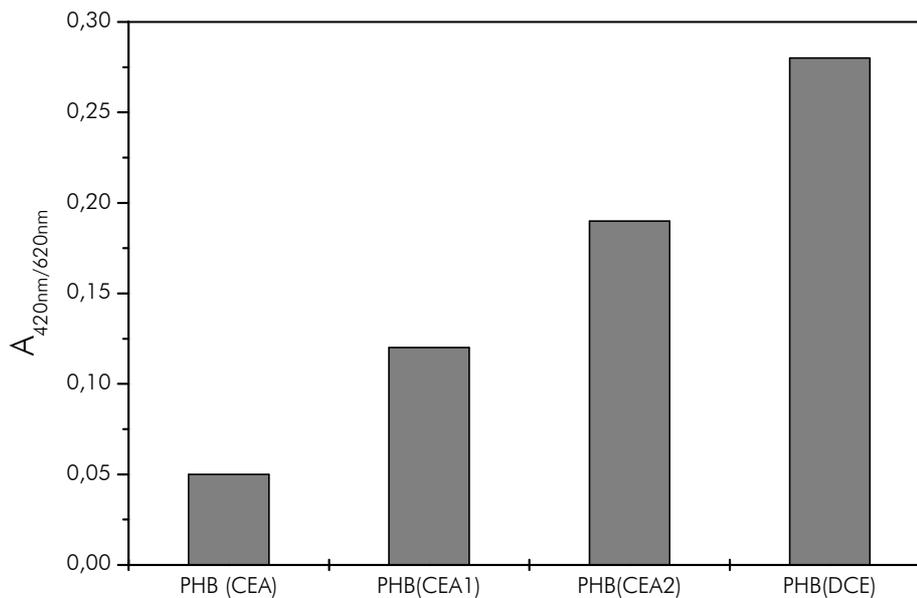


Abb. 4-48: *In vitro* XTT-Test zur Biokompatibilität von PHB, gewonnen mit verschiedenen Aufarbeitungsmethoden [FREIER 1999b]

Im Hinblick auf eine Herstellung von PHB aus Methan in größerem Maßstab kann Methan durch andere methanhaltige Gase wie Erdgas (oder perspektivisch Biogas) substituiert werden. Ein wichtiges Entscheidungskriterium für den Einsatz von Erdgas ist die Sicherung der Produkteigenschaften des Polymers bezüglich der gewünschten Anwendung. Für den Einsatz in der Medizin ist es unabdingbar, die Biokompatibilität des Polymers als wichtigste Eigenschaft nicht zu verändern. Daher sollte in ersten orientierenden Untersuchungen festgestellt werden, ob aus den im Erdgas vorhandenen Spuren Propan bzw. Ethan (siehe auch 4.7.1) Hydroxyvaleriansäure synthetisiert wird und es damit zur Bildung eines PHB-co-HV-Copolymers mit möglicherweise veränderter Biokompatibilität kommt. Die Bildung eines Copolymers könnte durch die Möglichkeit der Co-Oxidation von Methanhomologen durch die pMMO gegeben sein.

Für den XTT-Test wurden aus entsprechenden Proben Gießfolien hergestellt und in verschiedenen Varianten über 3 bzw. 5 Tage getestet. In Abhängigkeit vom Abdampfverfahren entstanden zwei unterschiedliche Strukturen der Folie, die getrennt untersucht wurden [SCHMITZ et al. 2000] (Tabelle IV-33).

Tabelle IV-33: Charakterisierung der untersuchten PHB-Proben (siehe auch 4.7.1)

| Ausgangsmaterial       | Probenbezeichnung | Charakteristik                   |
|------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Versuch 1 (Charge 1+2) | Probe 1A          | Unterseite, direkter Glaskontakt |
|                        | Probe 1B          | Oberseite, Abdampfseite          |
| Versuch 2 (Charge 2+3) | Probe 2 A         | Unterseite, direkter Glaskontakt |
|                        | Probe 2 B         | Oberseite, Abdampfseite          |

Die untersuchten Proben zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Biokompatibilität im Vergleich untereinander und zur Referenz-PHB. Damit kann von einer grundsätzlichen Eignung der PHB aus den Versuchen mit Erdgas-Modellgemischen für medizinische Zwecke ausgegangen werden (Abb. 4-49) und die Substitution von Methan durch Erdgas (LINDE-Qualität) empfohlen werden.

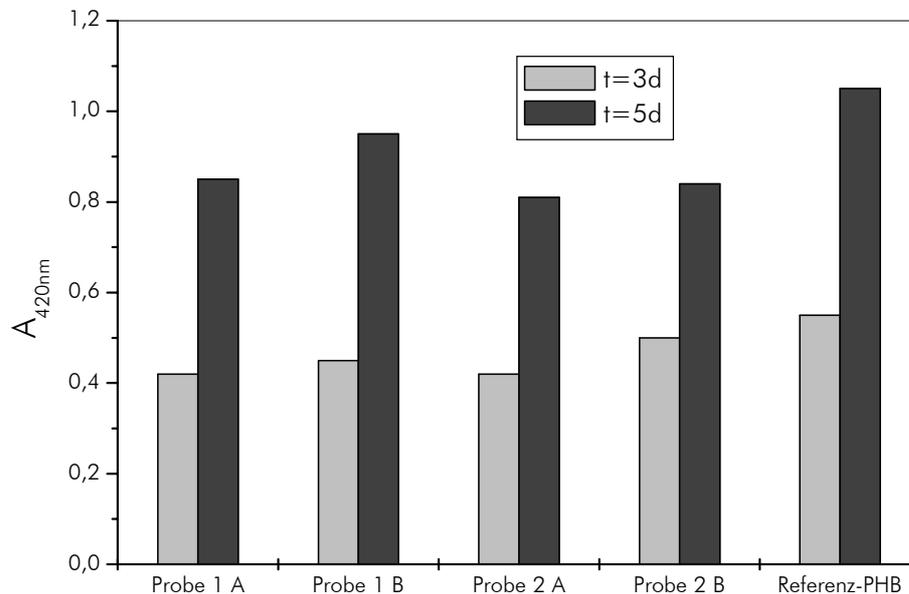
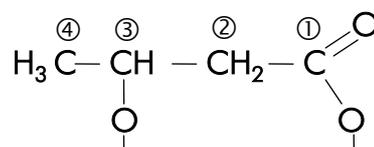


Abb. 4-49: Ergebnisse der Untersuchungen zur Biokompatibilität von PHB aus Erdgas (XTT-Test mit Mausfibroplasten)

#### 4.4.6.3 Weitere Eigenschaften

##### 4.4.6.3.1 NMR-Untersuchungen zum Nachweis von 3-HB<sup>1</sup>

Die Identifizierung des synthetisierten Polymers erfolgte ergänzend zu gaschromatographischen Analysen, nach denen es sich bei dem akkumulierten Polymer um ein reines Homopolymer der 3-Hydroxybuttersäure handelte, mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Kernresonanzspektroskopie (NMR). Dabei wurden PHB-Proben aus Prozessen mit Methan und Erdgas-Modellgemisch als Substrat untersucht (siehe 4.7.1). Das <sup>1</sup>H-Spektrum zeigte die charakteristischen Signale für das 3-Hydroxy-Monomer: bei 1,26 ppm (④, CH<sub>3</sub>-Gruppe), 2,5 ppm (②, CH<sub>2</sub>-Gruppe) und 5,2 ppm (③, CH-Gruppe) (Abb. 4-50a). Hinweise auf 4-Hydroxybuttersäure und 3-Hydroxyvaleriansäure wurden nicht gefunden. Auch die <sup>13</sup>C-Spektren bestätigen die Identität als 3-HB mit den entsprechenden Resonanzen bei 19,7 ppm (④), 40,7 ppm (②), 67,6 ppm (③) und 169,1 ppm (①) (Abb. 4-50b).



<sup>1</sup> Diese Untersuchungen wurden im Institut für Biomedizinische Technik (Universität Rostock) durchgeführt.

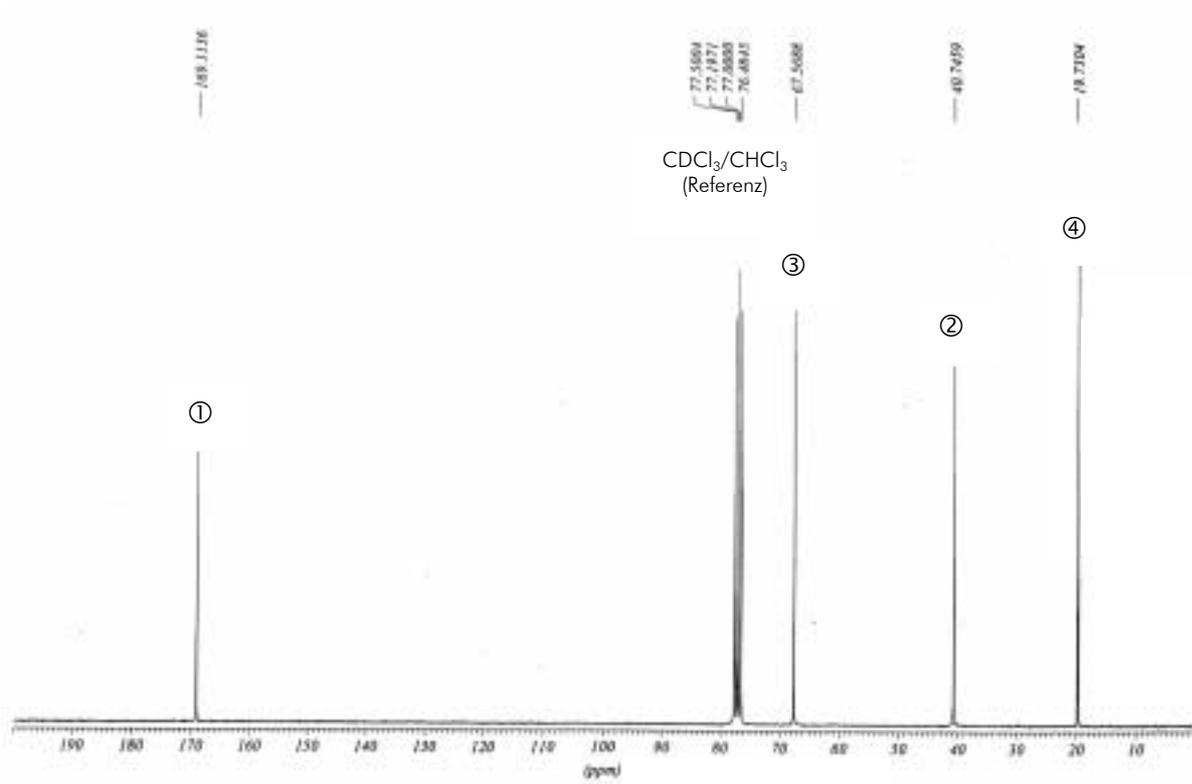
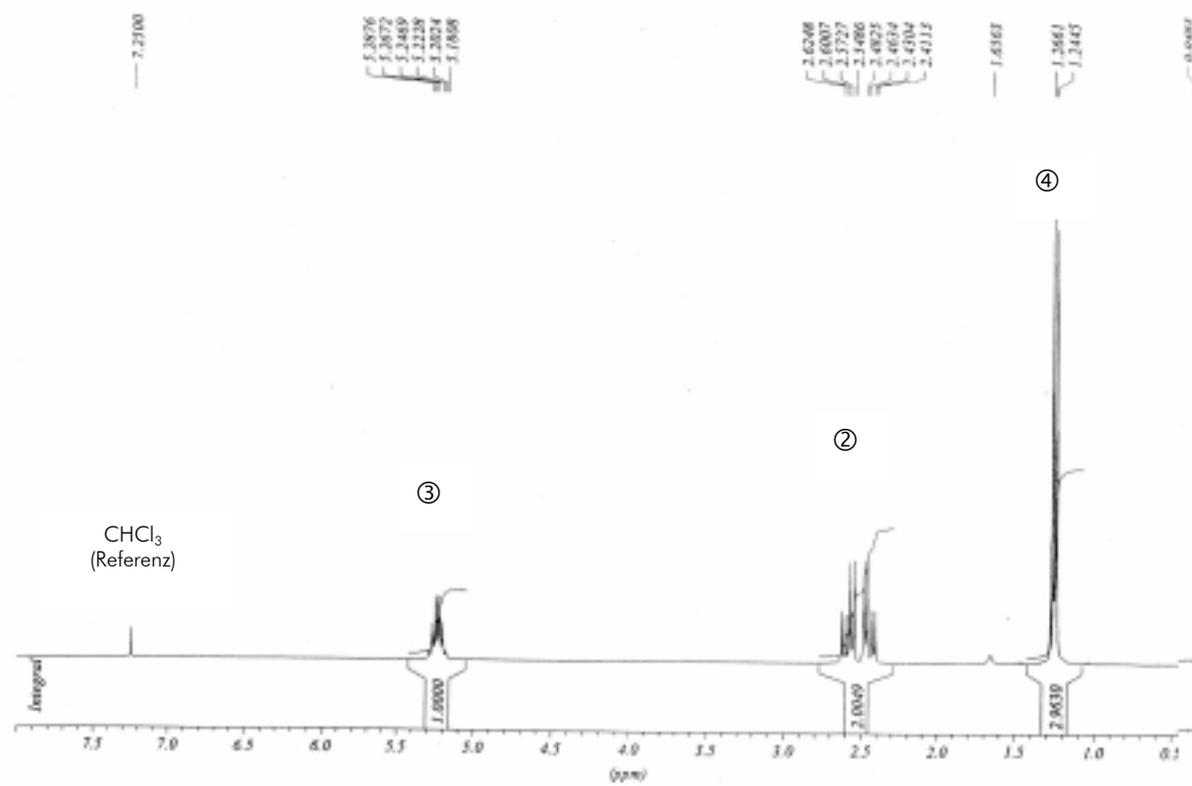
a)  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrumb)  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum

Abb. 4-50: NMR-Spektren von Methanomer® [FREIER 1999a]

#### 4.4.6.3.2 Physikalische und mechanische Eigenschaften<sup>1</sup>

Zur Charakterisierung der Polymereigenschaften wurden Schmelztemperatur und Kristallisationsgrad einer repräsentativen PHB-Probe (Phosphatmangel, Standardextraktion) ermittelt. Zusätzlich wurden an aus dieser Probe gefertigten Prüfkörpern<sup>2</sup> in einem Zugversuch die entsprechenden Parameter ermittelt (Tabelle IV-34).

Tabelle IV-34: Physikalische und mechanische Eigenschaften von PHB aus Methan [STARKE et al. 1998, STARKE et al. 2000]

| Eigenschaft                    |       | Einheit | Wert  |
|--------------------------------|-------|---------|-------|
| Schmelztemperatur              | $T_m$ | °C      | 174,2 |
| Zersetzungstemperatur          | $T_A$ | °C      | 281   |
| Glasübergangstemperatur        | $T_G$ | °C      | 4     |
| Elastizitätsmodul <sup>2</sup> | E     | GPa     | 1,63  |
| Zugfestigkeit <sup>2</sup>     | $R_m$ | MPa     | 36,2  |
| Bruchfestigkeit <sup>2</sup>   | $R_r$ | MPa     | 32,4  |
| Zugdehnung <sup>2</sup>        | $A_m$ | %       | 4,6   |
| Bruchdehnung <sup>2</sup>      | $A_r$ | %       | 5,5   |
| Kristallisationsgrad           |       | %       | 65,0  |

## 4.5 Prozeßmodell und Simulation

### 4.5.1 RANDBEDINGUNGEN

Mit Hilfe des folgenden Modells sollen die Änderungen der Massenströme bzw. Konzentrationen für die Komponenten in den entsprechenden Phasen mit mathematischen Gleichungen beschrieben werden.

Das Prozeßmodell setzt sich aus zwei Teilen zusammen, dem Reaktormodell und dem reaktionskinetischen Modell, und beschreibt die quantitativen und qualitativen Änderungen der einzelnen Komponenten im System.

Die grundlegenden Bilanzgleichungen für den in Gas- und Flüssigphase unterteilten Bilanzraum wurden in Kapitel 2.3 aufgeführt.

Im Bilanzraum sind verschiedenste Komponenten existent. Die wichtigsten sind Methan, Sauerstoff und Kohlendioxid, die in Gas- und Flüssigphase vorliegen, sowie die Biomasse und Komponenten der Nährlösung wie Ammonium oder Phosphat, die nur in der Flüssigphase betrachtet werden.

<sup>1</sup> Diese Ergebnisse wurden im Rahmen des SMWK-Projektes „Biotechnologische Herstellung von Polymeren mit spezifischen Werkstoffeigenschaften“ am Institut für Polymerforschung Dresden (IPF) gewonnen.

<sup>2</sup> Prüfkörper mit Minimixer hergestellt.

Für die Ableitung des Modells wurden folgende Annahmen getroffen:

- Gas- und Flüssigphase sind ideal (homogen) durchmischt.
- Temperatur und pH-Wert werden konstant gehalten ( $T=38^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5,7$ ).
- Die Bedingungen an Gasein- und -ausgang sind gleich (Druck, Temperatur) ( $\rho_{i,G,0} = \rho_{i,G}$ ).
- Die Änderungen der Methan-, Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration durch den zu- und abfließenden Flüssigkeitsstrom sind im Vergleich zum Phasenübergang und dem Verbrauch durch die Organismen sehr gering und werden daher nicht berücksichtigt.
- Die Volumenänderung durch Verdunstung wird vernachlässigt, da das Kondensat zurückgeführt wird.
- Die Volumenänderung durch Bildung von Reaktionswasser wird nicht berücksichtigt ( $F_{L,0}=F_{L,1}$  bzw.  $V_L=\text{konst.}$ ).
- Der Gesamtprozeß ist in zwei Phasen unterteilt:

Wachstumsphase:            kontinuierlich (Chemostatbedingungen),  $D = \frac{F_{L,0}}{V_L}$

PHB-Bildungsphase:        diskontinuierlich,  $D=0$ .

- Bezüglich der Biomasse wird eine Strukturierung vorgenommen. Die Gesamtbiomasse  $X$  setzt sich aus der aktiven Biomasse (Restbiomasse)  $R$  und dem Produkt PHB zusammen ( $X=R+\text{PHB}$ ). Die Bilanzen werden für beide Bestandteile getrennt aufgestellt.
- Die Restbiomasse wird als homogen angesehen, die Existenz der einzelnen Komponenten der Mischkultur und ihre Wechselwirkungen werden nicht betrachtet.
- Als Initiierungsfaktor für die PHB-Synthese wird Ammoniumstickstoff betrachtet.
- Die Umwandlungsprozesse der Stickstoffverbindungen untereinander werden nicht berücksichtigt.
- Drei Substrate limitieren (nach dem Ansatz von MONOD) die Bildung von Biomasse: Sauerstoff, Methan und Stickstoff.
- Für die Biomassebildung werden Inhibierungen durch diese Substrate nicht betrachtet.
- Die PHB-Synthese wird durch Sauerstoff und Methan limitiert, Inhibierung geht von Stickstoff aus.

#### 4.5.2 BILANZEN FÜR KOMPONENTEN DER FLÜSSIGPHASE

Die folgenden Gleichungen wurden ausgehend von der allgemeinen Gleichung für Konzentrationsänderung einer Komponente  $i$  in der Flüssigphase (2.25 aus 2.3.3.1) unter Berücksichtigung der o.g. Annahmen aufgestellt.

Restbiomasse, PHB und Ammoniumstickstoff existieren nur in der Flüssigphase, es findet kein Phasenübergang statt. Außerdem ist der Zulauf frei von Restbiomasse und PHB ( $c_{R,0}=0$  bzw.  $c_{\text{PHB},0}=0$ ). Die Konzentrationsänderungen werden durch Transportvorgänge und Reaktion verursacht, auf die Reaktionsterme wird im Abschnitt 4.5.4 näher eingegangen.

$$\frac{dc_R}{dt} = -c_R \cdot D + r_R \tag{4.15}$$

$$\frac{dc_{\text{PHB}}}{dt} = -c_{\text{PHB}} \cdot D + r_{\text{PHB}} \quad (4.16)$$

$$\frac{dc_{\text{N,L}}}{dt} = (c_{\text{N,L},0} - c_{\text{N,L}}) \cdot D + r_{\text{N}} \quad (4.17)$$

Bei der Bilanzierung der Konzentrationen von Sauerstoff, Methan und Kohlendioxid in der Flüssigphase wird der Phasenübergang von der Gas- in die Flüssigphase berücksichtigt.

$$\frac{dc_{\text{O}_2,\text{L}}}{dt} = k_{\text{L}} a_{\text{O}_2} \cdot (K_{\text{H},\text{O}_2,\text{L}/\text{G}} \cdot c_{\text{O}_2,\text{G}} - c_{\text{O}_2,\text{L}}) + r_{\text{O}_2} \quad (4.18)$$

$$\frac{dc_{\text{CH}_4,\text{L}}}{dt} = k_{\text{L}} a_{\text{CH}_4} \cdot (K_{\text{H},\text{CH}_4,\text{L}/\text{G}} \cdot c_{\text{CH}_4,\text{G}} - c_{\text{CH}_4,\text{L}}) + r_{\text{CH}_4} \quad (4.19)$$

$$\frac{dc_{\text{CO}_2,\text{L}}}{dt} = k_{\text{L}} a_{\text{CO}_2} \cdot (K_{\text{H},\text{CO}_2,\text{L}/\text{G}} \cdot c_{\text{CO}_2,\text{G}} - c_{\text{CO}_2,\text{L}}) + r_{\text{CO}_2} \quad (4.20)$$

#### 4.5.3 BILANZEN FÜR KOMPONENTEN DER GASPHASE

Auf der Basis der allgemeinen Gleichung (2.27 aus 2.3.3.2) für die Konzentrationsänderung der Komponente  $i$  in der Gasphase wurden unter den getroffenen Annahmen die Bilanzen erstellt. Zur Vereinheitlichung der Dimensionen werden auch in der Gasphase Konzentrationen verwendet. Zwischen Konzentration und Volumenanteil (Partialdruck, Molenbruch) besteht folgender Zusammenhang:

$$c_{i,\text{G}} = x_i \cdot p_i \quad (4.21)$$

Bei den Betrachtungen wird das Kohlendioxid im Eingangsgas vernachlässigt ( $c_{\text{CO}_2,\text{G},0} = 0$ ).

$$\frac{dc_{\text{O}_2,\text{G}}}{dt} = c_{\text{O}_2,\text{G},0} \cdot \frac{F_{\text{G},0}}{V_{\text{G}}} - c_{\text{O}_2,\text{G}} \cdot \frac{F_{\text{G},1}}{V_{\text{G}}} - [k_{\text{L}} a_{\text{O}_2} \cdot (K_{\text{H},\text{O}_2,\text{L}/\text{G}} \cdot c_{\text{O}_2,\text{G}} - c_{\text{O}_2,\text{L}})] \cdot \frac{V_{\text{L}}}{V_{\text{G}}} \quad (4.22)$$

$$\frac{dc_{\text{CH}_4,\text{G}}}{dt} = c_{\text{CH}_4,\text{G},0} \cdot \frac{F_{\text{G},0}}{V_{\text{G}}} - c_{\text{CH}_4,\text{G}} \cdot \frac{F_{\text{G},1}}{V_{\text{G}}} - [k_{\text{L}} a_{\text{CH}_4} \cdot (K_{\text{H},\text{CH}_4,\text{L}/\text{G}} \cdot c_{\text{CH}_4,\text{G}} - c_{\text{CH}_4,\text{L}})] \cdot \frac{V_{\text{L}}}{V_{\text{G}}} \quad (4.23)$$

$$\frac{dc_{\text{CO}_2,\text{G}}}{dt} = -c_{\text{CO}_2,\text{G}} \cdot \frac{F_{\text{G},1}}{V_{\text{G}}} - [k_{\text{L}} a_{\text{CO}_2} \cdot (K_{\text{H},\text{CO}_2,\text{L}/\text{G}} \cdot c_{\text{CO}_2,\text{G}} - c_{\text{CO}_2,\text{L}})] \cdot \frac{V_{\text{L}}}{V_{\text{G}}} \quad (4.24)$$

Der Volumenstrom des Ausgangsgases wird über eine Inertgasbilanz berechnet, unter der Annahme, daß diese Komponenten (Stickstoff, Argon) weder verbraucht noch gebildet werden und keine Akkumulation in der wäßrigen Phase erfolgt. Im folgenden Modell wird der Stickstoffanteil der Gasphase zur Berechnung verwendet:

$$x_{\text{N}_2} = 1 - x_{\text{O}_2} - x_{\text{CH}_4} - x_{\text{CO}_2} \quad (4.25)$$

$$x_{\text{N}_2,0} = 1 - x_{\text{O}_2,0} - x_{\text{CH}_4,0} \quad (4.26)$$

$$F_{G,1} = F_{G,0} \cdot \frac{x_{N_2,0}}{x_{N_2}} \quad (4.27)$$

#### 4.5.4 REAKTIONSKINETIK

Die entsprechenden Reaktionsraten für die interessierenden Komponenten Biomasse und Produkt sind der Biomassekonzentration und einer spezifischen Bildungsrate proportional. Der Zusammenhang zwischen Verbrauch von Methan und Sauerstoff bzw. der Bildung von Kohlendioxid ist über spezifische Ausbeutekoeffizienten gegeben. Dabei werden in den einzelnen Phasen die Substrate in verschiedenen Anteilen für die Bildung von Biomasse und Produkt verwendet.

$$r_{CH_4} = -\frac{1}{Y_{R/CH_4}} \cdot \mu \cdot c_R - \frac{1}{Y_{PHB/CH_4}} \cdot q \cdot c_R \quad (4.28)$$

$$r_{O_2} = -\frac{1}{Y_{R/O_2}} \cdot \mu \cdot c_R - \frac{1}{Y_{PHB/O_2}} \cdot q \cdot c_R \quad (4.29)$$

$$r_{CO_2} = Y_{CO_2/R} \cdot \mu \cdot c_R + Y_{CO_2/PHB} \cdot q \cdot c_R \quad (4.30)$$

$$\text{mit } Y_{CO_2/R} = \frac{1}{Y_{R/CO_2}} \quad (4.31)$$

$$Y_{CO_2/PHB} = \frac{1}{Y_{PHB/CO_2}} \quad (4.32)$$

$$r_N = -\frac{1}{Y_{R/N}} \cdot \mu \cdot c_R \quad (4.33)$$

$$r_R = \mu \cdot c_R \quad (4.34)$$

$$r_{PHB} = q \cdot c_R \quad (4.35)$$

#### Betrachtungen für $\mu$ und $q$

Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  und die spezifische PHB-Bildungsrate  $q$  sind von verschiedenen Faktoren abhängig, wobei sich die physikalischen Bedingungen ( $T$ ,  $pH$ ) während der Experimente nicht ändern und daher einen konstanten Einfluß haben:

$$\mu = f(T, pH, O_2, CH_4, N)$$

$$q = f(T, pH, O_2, CH_4, N, PHB)$$

Wie oben angegeben, werden für die Berechnung der Wachstumsrate drei Substrate unter den Annahme einer Substratlimitation nach MONOD berücksichtigt (multiplikative Verküpfung). Für die spezifische PHB-Bildungsrate  $q$  ist der Einfluß der Stickstoffkonzentration inhibierend, zusätzlich muß der Einfluß des bereits gebildeten Polymers beachtet werden (d.h. es existiert ein maximaler PHB-Gehalt). Außerdem gilt, je höher der aktuelle Wert in der Zelle ist, um so langsamer erfolgt die Zunahme [HEINZLE und LAFFERTY 1980, ASENJO und SUK 1986a]. Für die fol-

genden Ableitungen wird eine weitere Vereinfachung eingeführt: der PHB-Abbau und die mögliche Umwandlung von PHB in R wird nicht berücksichtigt.

$$\mu = \mu_{\max.} \cdot \frac{c_{\text{CH}_4,\text{L}}}{c_{\text{CH}_4,\text{L}} + K_{\text{S,CH}_4}} \cdot \frac{c_{\text{N,L}}}{c_{\text{N,L}} + K_{\text{S,N}}} \cdot \frac{c_{\text{O}_2,\text{L}}}{c_{\text{O}_2,\text{L}} + K_{\text{S,O}_2}} \quad (4.36)$$

$$q = q_{\max.} \cdot \frac{c_{\text{CH}_4,\text{L}}}{c_{\text{CH}_4,\text{L}} + K_{\text{S,CH}_4}} \cdot \frac{c_{\text{O}_2,\text{L}}}{c_{\text{O}_2,\text{L}} + K_{\text{S,O}_2}} \cdot \frac{K_{\text{S,N}}}{c_{\text{N,L}} + K_{\text{S,N}}} \cdot \frac{\text{PHB}_{\max.} - \left( \frac{c_{\text{PHB}}}{c_{\text{R}} + c_{\text{PHB}}} \right)}{\text{PHB}_{\max.}} \quad (4.37)$$

#### 4.5.5 SIMULATION

Dieses System von Differentialgleichungen wurde mit dem Programm BERKELEY MADONNA® unter der Annahme von Startbedingungen mit dem Verfahren nach ROSENBRÖCK numerisch gelöst. Dieses Verfahren ist für das vorliegende System von steifen Differentialgleichungen besonders geeignet. Die verwendeten Parameter sind im Anhang 4 zusammengestellt.

Abb. 4-51 zeigt eine Simulation zum Einfluß der Biomassekonzentration des Inoculums (15, 20, 25 g l<sup>-1</sup>) auf die nach 24 h erreichbare Biomassekonzentration (zum vorgegebenen Startzeitpunkt der PHB-Synthese). Auf Grund der Begrenzung durch die Sauerstoffübergangsrate wird in allen Fällen eine Gleichgewichtskonzentration angestrebt, diese ist für die erste Phase 19,6 g l<sup>-1</sup>. Zum Zeitpunkt t = 8h erfolgte eine Druckerhöhung von 750 auf 2500 mbar, diese führt zu einem Anstieg der Sauerstoffübergangsrate und der Biomassekonzentration, der sich ergebene Wert ist 24 g l<sup>-1</sup>. Der Verlauf der PHB-Akkumulation ist für alle Fälle identisch.

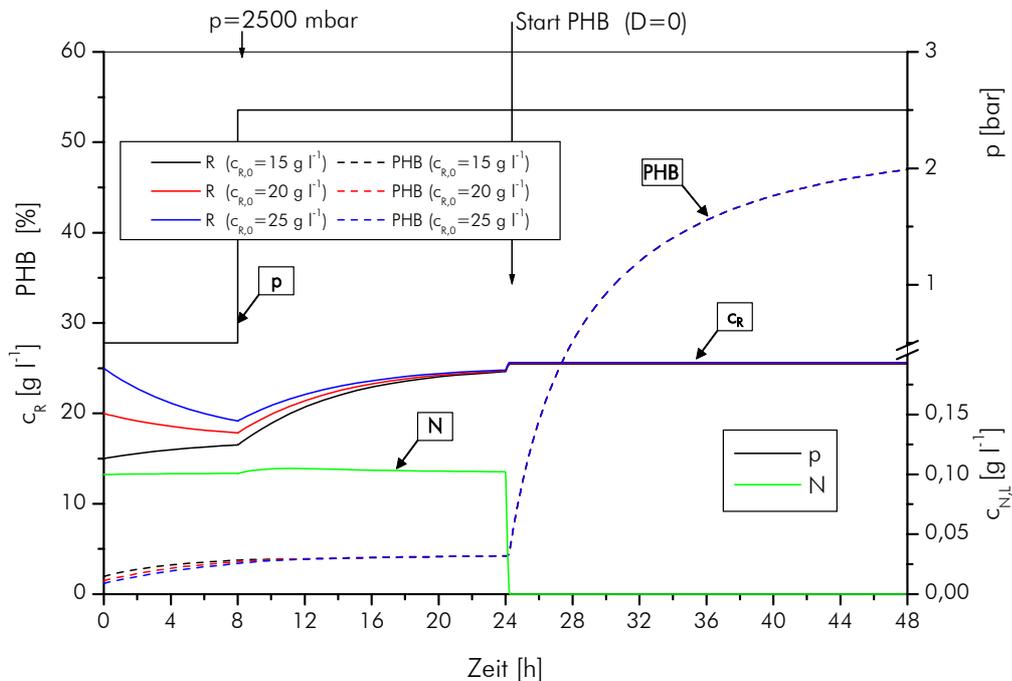


Abb. 4-51: Simulation des zeitlichen Verlaufes der Biomassekonzentration und des PHB-Gehaltes in Abhängigkeit vom Systemdruck und verschiedenen Startkonzentrationen

In den folgenden Abbildungen sind Ergebnisse einer Simulation Daten aus einem realen Experiment gegenübergestellt. Im Anzuchtprozeß wurde die (dem Experiment entsprechende) stufenweise Druckerhöhung simuliert. Die sich ergebenden Verläufe der Sauerstoff- und Methanübergangsraten in Simulation und Experiment zeigen dabei eine gute Übereinstimmung. Im Experiment werden die Gleichgewichtswerte jedoch wesentlich langsamer erreicht. Durch die im Mittel höheren Stoffübergänge erhöht sich die Biomassekonzentration im realen Experiment stärker als in der Simulation. Nach 24 h wird der Start der PHB-Synthese durch Stop der Stickstoffzufuhr simuliert, die Gasverbrauchsraten nehmen sehr schnell ab und die Konzentration der Restbiomasse ändert sich nicht mehr.

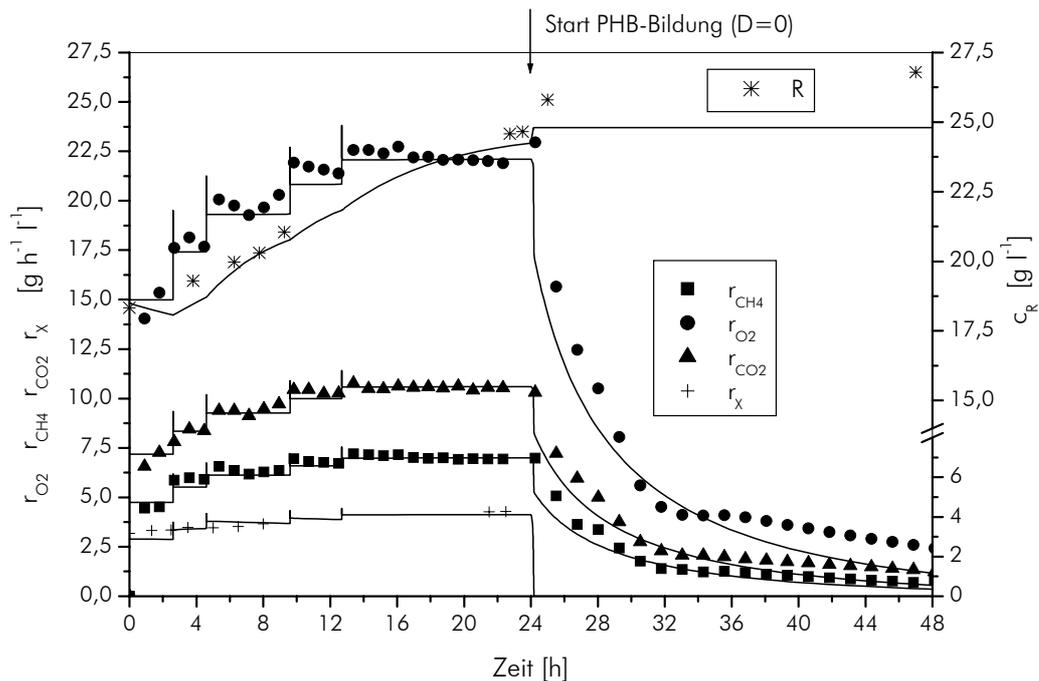


Abb. 4-52: Vergleich einer Simulation der spezifischen Gasreaktionsraten (volumenbezogen) für Methan (■), Sauerstoff (○) und Kohlendioxid (▲), Biomassekonzentration (✱) und der Produktivität der Biomassebildung (+) während eines Anzuchtprozesses unter erhöhtem Systemdruck mit experimentellen Daten (Datenpunkte → experimentelle Werte, Linien → simulierte Verläufe)

Die Verläufe der simulierten und experimentell ermittelten PHB-Akkumulation sowie spezifischen Bildungsrate ergaben ebenfalls gute Übereinstimmung. Die Abweichungen in der PHB-Konzentration sind auf die geringfügige Zunahme der Restbiomasse im realen Experiment zurückzuführen (Abb. 4-53).

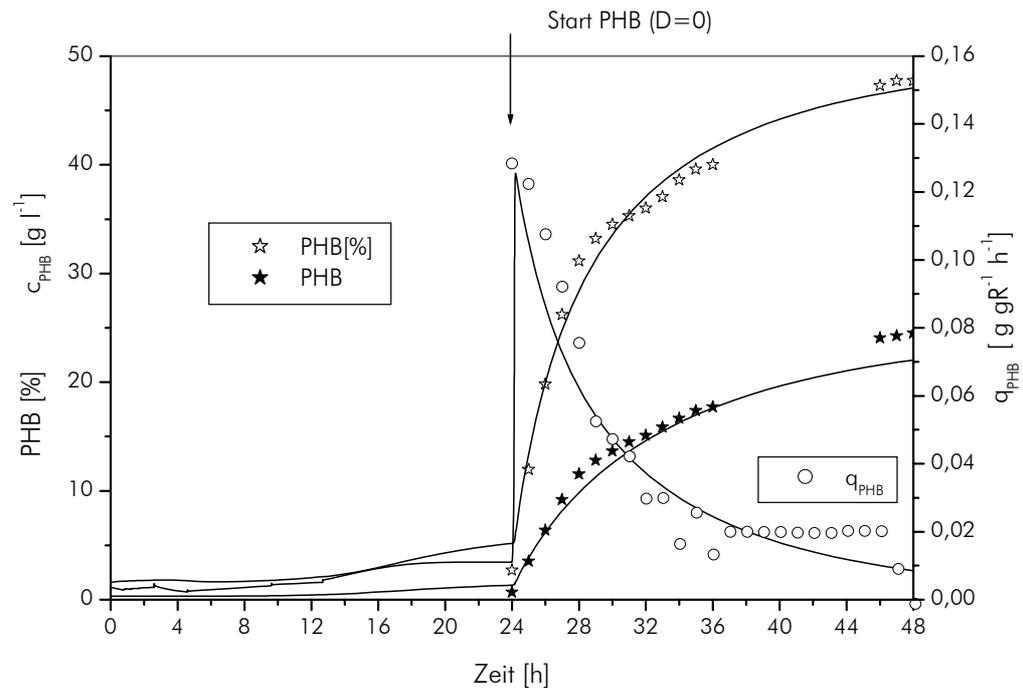


Abb. 4-53: Vergleich einer Simulation des zeitlichen Verlaufs des PHB-Gehaltes (☆), der PHB-Konzentration (★) und der spezifischen PHB-Bildungsrate (○) während der PHB-Synthese unter Ammoniumstickstoffmangel mit experimentellen Daten (Datenpunkte → experimentelle Werte, Linien → simulierte Verläufe)

#### 4.6 Charakterisierung der Mischkultur und Nachweis ihrer Stabilität

Die Verwendung von Mischkulturen bietet insbesondere bei der Methanfermentation Vorteile, da höhere Wachstumsraten und Biomassekonzentrationen im Vergleich zu Reinkulturen erreicht werden können [SHEENAN und JOHNSON 1971, HARRISON 1978]. Die Charakterisierung dieser Mischkulturen kann durch verschiedene Methoden erfolgen: durch mikrobiologische, molekularbiologische oder durch chemische Analysen der Biomasse oder ihrer spezifischen Bestandteile. Die Grenzen der einzelnen Methoden können durch ihre Kombination überwunden werden.

Aussagen aus mikrobiologischen Untersuchungen sind in erster Linie von der Kultivierbarkeit der Organismen unter den gewählten Laborbedingungen abhängig. Die Methoden sind meist zeitaufwendig und die Untersuchungsergebnisse teilweise mit hohen Fehlern (Zellzahlbestimmung mit Thomakammer, MPN, KBE) behaftet. Der technische Aufwand ist dagegen gering. Eine Erhöhung der Richtigkeit und Genauigkeit ermöglicht die Nutzung automatischer Geräte, z.B. Coulter-Counter zur Zellzählung.

Methoden zur chemischen Charakterisierung spezifischer Bestandteile der Biomasse, z.B. Fettsäureanalytik, können innerhalb kurzer Zeit Ergebnisse liefern. Für Detailstudien, z.B. zur eindeutigen Identifizierung von Mikroorganismen, sind jedoch standardisierte Bedingungen und die Verwendung von speziellen Medien nötig. In der medizinischen Diagnostik wird dieses Verfahren erfolgreich angewendet [MADIGAN et al. 2001].

Molekularbiologische Untersuchungen bieten den großen Vorteil der Kultivierungsunabhängigkeit, d.h. zeitraubende Isolierungen entfallen, daher besteht nicht die Gefahr, bestimmte Species durch die Wahl der Bedingungen zu bevorteilen. Andererseits werden bei DNA-Analysen von Mischkulturen auch tote bzw. stoffwechsellinaktive Organismen erfaßt. Die Ergebnisse erlauben eine sichere und genaue Identifizierung, hierfür besteht jedoch ein hoher apparativer und ökonomischer Aufwand.

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden angewendet. Dabei wurden die einzelnen Verfahren nicht bis ins Detail optimiert; vielmehr war das Ziel, durch Kombination der Resultate unter Berücksichtigung der jeweiligen Grenzen sowie technischer und zeitlicher Gegebenheiten eine verlässliche Gesamtaussage zu erhalten.

Sämtliche Untersuchungen zur PHB-Bildung wurden mit einer methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) unter unsterilen Bedingungen durchgeführt. Die Charakterisierung dieser Mischkultur und der Nachweis ihrer Stabilität sowohl für die Wachstums- als auch die Produktbildungsphasen waren wichtige Bestandteile dieser Arbeit.

#### 4.6.1 MIKROBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER METHANOTROPHEN MISCHKULTUR

Durch lichtmikroskopische Untersuchungen wurden vorrangig das biologische Bild (Zustand des Zellplasmas, Zellform u.a.), das Verhältnis GB 25 zu Begleitorganismen (nach Zellzahl) sowie die Gesamtzellzahlen bestimmt. Zusätzliche Informationen während der Wachstumsprozesse konnten aus Coulter-Counter-Analysen gewonnen werden. (Das Gerät stand erst zum Ende der Bearbeitungszeit zur Verfügung und wurde daher nur für ergänzende Analysen von Wachstumsprozessen genutzt). Das Ausplattieren von Proben verschiedener Verdünnungsstufen sollte zur Gewinnung von Isolaten unter verschiedenen Bedingungen dienen und weitere Informationen über die quantitative Zusammensetzung (koloniebildende Einheiten, KBE) liefern. Ergänzt wurde dies durch einen Mikrotiterplatten-Assay zur Bestimmung der MPN (*most probable number*). Der Nachweis der methanotrophen Hauptkomponente erfolgte mittels Immunofluoreszenz unter Verwendung polyklonaler GB 25-spezifischer Antikörper.

##### 4.6.1.1 Gesamtzellzahlen und Anteil methanotropher Bakterien durch mikroskopische Bestimmung

In Tabelle IV-35 sind die Ergebnisse der mikroskopischen Bestimmungen von Gesamtzellzahlen und der Anteile der methanotrophen Hauptkomponente zusammengefaßt. Die Zellzahlen während des Wachstumsprozesses (und damit zu Beginn der PHB-Bildungsphase) wurden in der Thoma-Kammer im Mittel zu  $0,57 \times 10^{11} \text{ ml}^{-1}$  bestimmt (Tabelle IV-35a). Die Zellzahlen bei der PHB-Bildung wurden unter Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel analysiert. Vergleicht man die Mittelwerte beim Start mit denen nach 12 und 24 h bei Prozessen unter Stickstoffmangel, sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Signifikanzebene 0,05). Dies bestätigt die bereits in Kapitel 4.4.1 getroffene Aussage zur Konstanz der Zellzahlen, d.h. nichtwachstumsassoziierten PHB-Bildung unter Stickstoffmangel. Für Prozesse unter Phosphatmangel unterschieden sich die Mittelwerte beim Start und nach 12 h signifikant, zwischen 12

und 24 h jedoch nicht. Ursache sind Zellteilungen in den ersten Stunden nach Start der Experimente, die auch in der Erhöhung der Restbiomassekonzentration zum Ausdruck kommen (siehe 4.4.3.2 bzw. 5.2.2).

Die Zellzahlbestimmung mit der Thomakammer ist relativ ungenau (subjektive Faktoren), was in den Standardabweichungen der Mittelwerte von bis zu 40 % zum Ausdruck kommt.

Das Verhältnis Methanotrophe/Begleitorganismen wurde routinemäßig durch mikroskopisches Auszählen mit Hilfe einer Okularnetzplatte bestimmt. Aufgrund der Größe der GB 25-Zellen (siehe 4.6.1.3 ) waren diese im mikroskopischen Bild deutlich von denen der Begleitflora zu unterscheiden (Abb. 4-54). Bei störungsfreier kontinuierlicher Kultivierung unter definierten Bedingungen ( $D = 0,167 \text{ h}^{-1}$ , pH-Wert = 5,7,  $T = 38^\circ\text{C}$ ) stellte sich ein Zellzahl-Anteil von ca. 60 % GB 25 ( $\pm 10\%$ ) ein (Tabelle IV-35b). Während der PHB-Bildungsphase änderte sich die Zusammensetzung nicht. Die Art des Mangels, der zur Initiierung angelegt wurde, hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Kulturzusammensetzung.

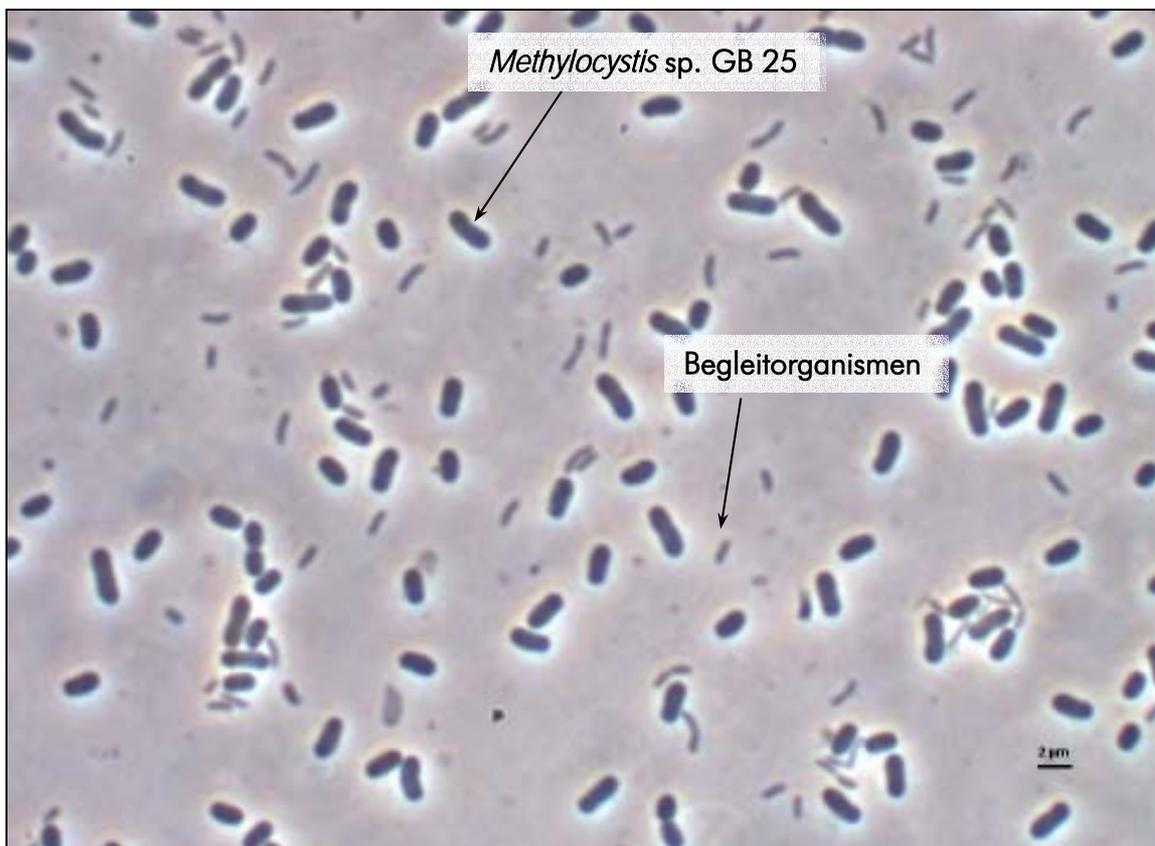


Abb. 4-54: Mikroskopisches Bild der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25)

Tabelle IV-35: Ergebnisse mikroskopischer Untersuchungen  
a) Gesamtzellzahlen

| Mangel-<br>bedingung | Gesamtzellzahlen [ml <sup>-1</sup> ]  |                                |                                |
|----------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                      | Start PHB-Bildung =<br>Wachstumsphase | t=12 h                         | t=24 h                         |
| NH <sub>4</sub> -N   | 0,57 ± 0,21 × 10 <sup>11</sup>        | 0,63 ± 0,18 × 10 <sup>11</sup> | 0,63 ± 0,24 × 10 <sup>11</sup> |
| PO <sub>4</sub> -P   | 0,57 ± 0,21 × 10 <sup>11</sup>        | 1,38 ± 0,46 × 10 <sup>11</sup> | 1,26 ± 0,41 × 10 <sup>11</sup> |

b) Anteil methanotropher Bakterien (nach Zellzahl)

| Mangel-<br>bedingung | Anteile Methanotropher [%]            |             |             |
|----------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|
|                      | Start PHB-Bildung =<br>Wachstumsphase | t=12 h      | t=24 h      |
| NH <sub>4</sub> -N   | 57,8 ± 11,6                           | 59,1 ± 6,2  | 57,2 ± 8,1  |
| PO <sub>4</sub> -P   | 57,8 ± 11,6                           | 58,9 ± 11,5 | 58,3 ± 13,9 |

#### 4.6.1.2 Gesamtzellzahlen und Anteil methanotropher Bakterien durch Analyse mit Coulter-Counter

Die Analyse von Proben mit dem Coulter-Counter sollte einerseits zur Evaluierung der Ergebnisse aus Thoma-Kammer-Zählungen mit einer wesentlich genaueren Meßmethode dienen und außerdem die Korrelation zwischen Zellzahl und Biotrockenmasse für spätere Untersuchungen präzisieren. Die Proben wurden ausschließlich aus kontinuierlichen Wachstumsprozessen entnommen, wobei sich durch die Variation der Verweilzeit (bei gleichem Sauerstoffübergang unter O<sub>2</sub>-limitierenden Bedingungen) unterschiedliche Biomassekonzentrationen einstellten. Parallel zu den Coulter-Counter-Analysen erfolgte die gravimetrische Bestimmung der Biomassetrockensubstanz.

In der Größenverteilung waren deutlich zwei Komponenten unterschiedlicher mittlerer Größe erkennbar (Abb. 4-55). Die Grenze für die Bestimmung des Anteils Methanotropher wurde, basierend auf den im folgenden Abschnitt dargestellten Untersuchungen, bei 0,91 µm definiert.

Die Gesamtzellzahlen stimmten (für gleiche Biomassekonzentrationen) mit dem Mittelwert der Zählungen in der Thomakammer gut überein, die Standardabweichung der Coulter-Counter-Analyse war jedoch wesentlich geringer. Der Anteil der Zellen mit einer Größe > 0,91 µm nahm am Gesamtvolumen einen Anteil von > 95 % ein. Damit konnten die volumetrischen Abschätzungen früherer Untersuchungen [WENDLANDT et al. 1981], die an Hand der im Lichtmikroskop bestimmten Anteile und Zellgrößen erhalten wurden, bestätigt werden.

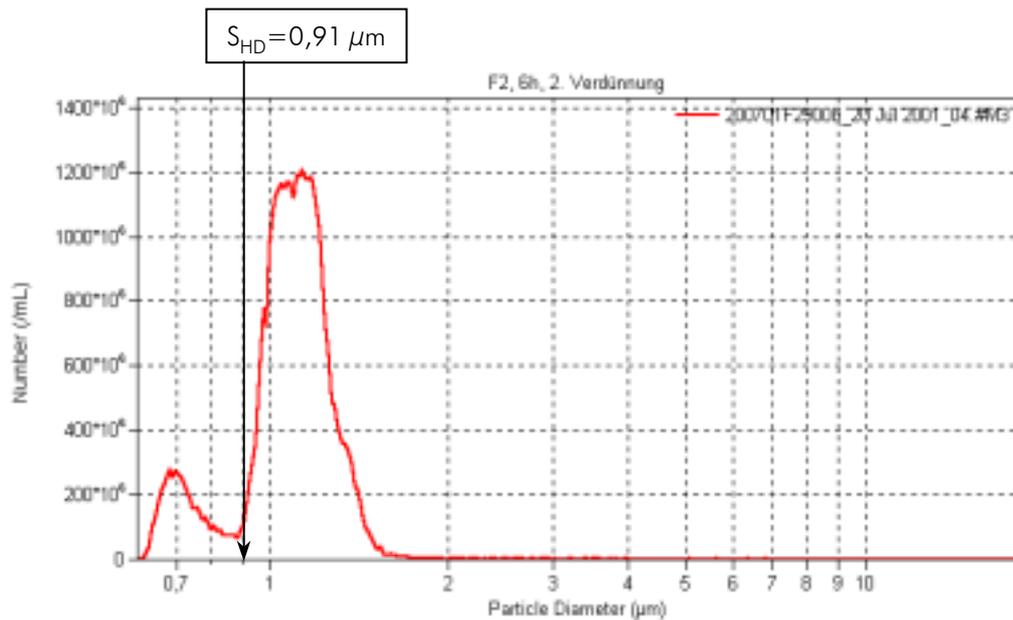


Abb. 4-55: Beispieldiagramm einer Größenverteilung der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) nach Coulter-Counter-Analyse

Stellt man die unter den verschiedenen Bedingungen gemessenen Werte der Zellzahlen gravimetrisch ermittelten Biomassekonzentrationen gegenüber, zeigt sich der in Abb. 4-56 dargestellte lineare Zusammenhang. Somit kann mit Hilfe von Coulter-Counter-Messungen neben der Zusammensetzung der Mischkultur auch die Biomassekonzentration bestimmt werden.

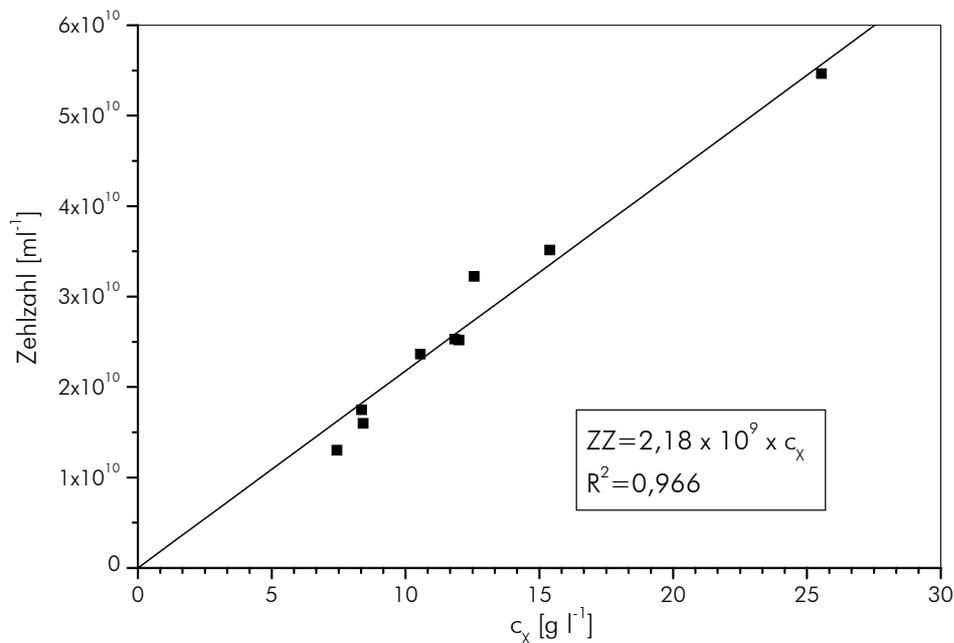


Abb. 4-56: Zusammenhang zwischen Zellzahl (mit Coulter-Counter bestimmt) und Biomassekonzentration (gravimetrisch bestimmt)

Folgende Aussagen über die Zusammensetzung der methanverwertenden Mischkultur (kontinuierliche Kultivierung, BTS=22-25 g l<sup>-1</sup>) lassen sich zusammenfassen:

Tabelle IV-36: Zusammensetzung der untersuchten Mischkultur

| Gesamtzellzahl                 |                                | Anteil Methanotropher |                      |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------|
| [ml <sup>-1</sup> ]            |                                | [%]                   |                      |
| Thomakammer                    | Coulter-Counter                | an Gesamtzellzahl     | an Gesamtzellvolumen |
| $0,57 \pm 0,21 \times 10^{11}$ | $0,56 \pm 0,03 \times 10^{11}$ | $57,6 \pm 11,6$       | $96,8 \pm 1,8$       |

#### 4.6.1.3 Coulter-Counter-Analysen zur Größen- und Volumenverteilung der Mischkultur

Durch die Analyse von Zellsuspensionen am Coulter-Counter kann nicht nur die absolute Zellzahl, sondern auch die Größe bzw. die Größenverteilung der Zellen bestimmt werden. Die Darstellung erfolgt in Abhängigkeit vom Volumen oder vom hypothetischen Durchmesser (einer Kugel dieses Volumens) der gemessenen Objekte. Für die Bestimmung des Anteils der methanotrophen Bakterien kann diese Methode genutzt werden, da diese sich in ihrer Größe (und im Zellvolumen) signifikant von den Begleitorganismen unterscheiden (t-Test, Signifikanzniveau 0,05; Tabelle IV-37). Für die Begleitorganismen untereinander wurden keine Größenunterschiede festgestellt. Die Zellen wurden im lichtmikroskopischen Bild mit Hilfe des Bildauswertesystems LUCIA (Fa. Nikon) vermessen.

Tabelle IV-37: Mittlere Zellgrößen von *Methylocystis* sp. GB 25 und Begleitorganismen, Zellvolumen (berechnet als Kreiszyylinder) und hypothetischer Durchmesser einer Kugel dieses Volumens (Mittelwerte aus 100 Einzelmessungen) im Wachstumsprozeß

|   | <i>Methylocystis</i> sp. GB 25 | Begleitorganismen |
|---|--------------------------------|-------------------|
| mittlere Länge [ $\mu\text{m}$ ]  | $2,05 \pm 0,45$                | $1,61 \pm 0,27$   |
| mittlere Breite [ $\mu\text{m}$ ]   | $1,17 \pm 0,12$                | $0,48 \pm 0,08$   |
| mittleres Zellvolumen [ $\mu\text{m}^3$ ]   | $2,252 \pm 0,828$              | $0,296 \pm 0,096$ |
| hypothetischer Durchmesser einer Kugel des mittleren Zellvolumens [ $\mu\text{m}$ ] | $1,626 \pm 0,186$              | $0,816 \pm 0,093$ |

Anhand dieser Ergebnisse wurde der Schwellenwert  $S$  zur Bestimmung des Anteils der Begleitorganismen aus Summe des Mittelwertes plus Standardabweichung festgesetzt:

$$\text{Zellvolumen: } S_{\text{ZV}} = 0,39 \mu\text{m}^3$$

$$\text{Hypothetischer Durchmesser: } S_{\text{HD}} = 0,91 \mu\text{m}.$$

#### 4.6.1.4 Identifizierung der methanotrophen Hauptkomponente mittels Immuno- fluoreszenz

Zum Nachweis der Identität der methanotrophen Hauptkomponente wurde die Serumfärbung mit polyklonalen Antikörpern (aus Kaninchenserum gewonnenes Anti-GB 25-Serum) genutzt. Zur Beurteilung der Spezifität polyklonaler Antikörper war es wichtig, Kreuzreaktionen zu testen. Daher wurden neben verschiedenen methanotrophen Stämmen der gruppeneigenen Stammsammlung auch drei Stämme aus der internationalen Stammsammlung NCIMB mit unterschiedlichen Antiseren auf Kreuzreaktionen getestet (Tabelle IV-38). Das Serum Anti-GB 25 zeigt starke Fluoreszenz sowohl mit der Reinkultur GB 25 als auch mit den Zellen der methanotrophen Species in Proben der Mischkultur. Es konnten keine Kreuzreaktionen gegen andere *Methylocystis*-Stämme oder *Methylosinus trichosporium* OB3b beobachtet werden. Somit konnte von einer hohen Spezifität der verwendeten Antikörper ausgegangen werden.

Als serologischer Nachweis der methanotrophen Bakterien GB 25 in der Mischkultur diente das Fluoreszenz-Signal der mit Anti-GB 25-Kaninchen-Serum und FITC-markiertem Anti-Kaninchen-Serum behandelten Zellen (Abb. 4-57).

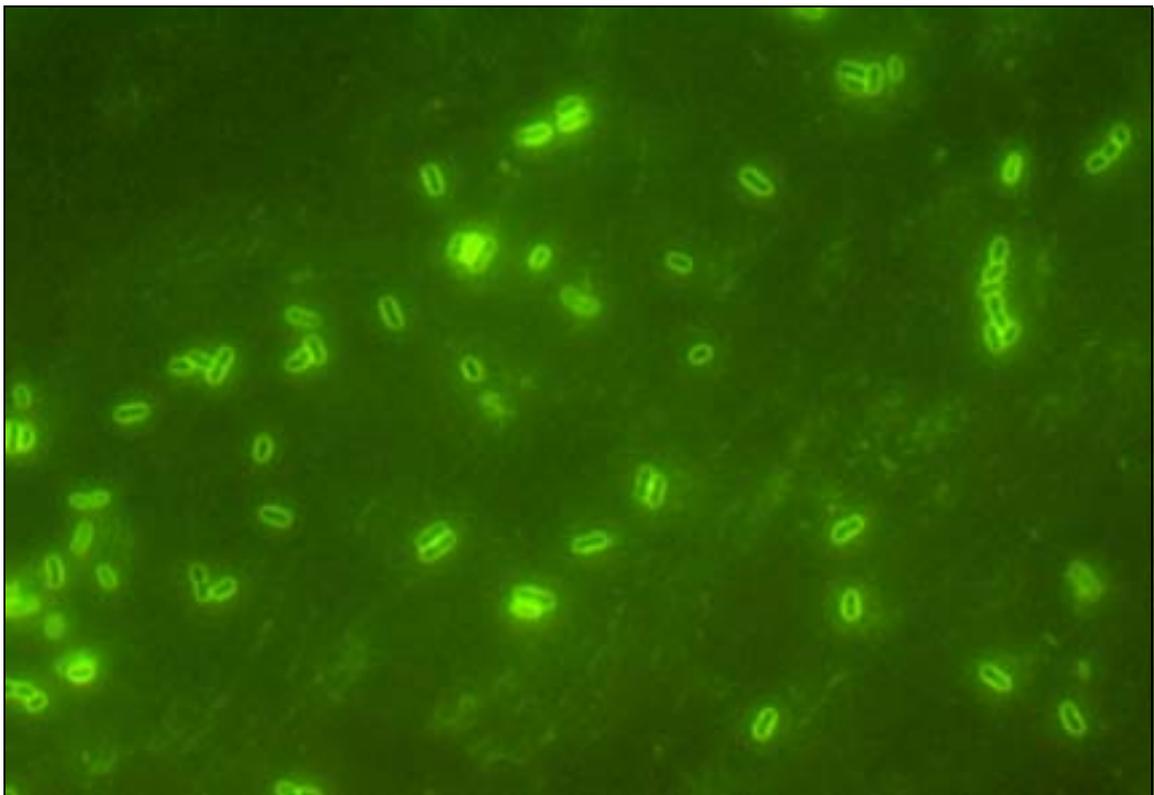


Abb. 4-57: Serologischer Nachweis von *Methylocystis* sp. GB 25 in der Mischkultur mit Anti-GB 25 Serum, FITC-markiert

**Tabelle IV-38:** Kreuztest der verwendeten Seren gegen methanotrophe Stämme (OB3b = *Methylosinus trichosporium* OB3b; *Mcy. sp.* = *Methylocystis sp.*, *Mcy. parv.* = *Methylocystis parvus*)

| Serum       | Getestete Stämme |       |       |        |       |                 |                   |
|-------------|------------------|-------|-------|--------|-------|-----------------|-------------------|
|             | Mischkultur      | UFZ   |       |        | NCIMB |                 |                   |
|             |                  | GB 25 | GB 14 | GB 130 | OB3b  | <i>Mcy. sp.</i> | <i>Mcy. parv.</i> |
| Anti-GB 25  | +++              | +++   | –     | –      | –     | –               | –                 |
| Anti-GB 14  | –                | –     | +++   | –      | –     | –               | –                 |
| Anti-GB 130 | –                | –     | –     | +++    | –     | –               | –                 |

#### 4.6.1.5 Die Komponenten der Mischkultur

##### 4.6.1.5.1 Gewinnung von Isolaten/Bestimmung der KBE

Die Hauptaufgabe bestand in der Isolierung der methanotrophen Hauptkomponente (zum Vergleich mit der Stammkultur) und in der quantitativen Beschreibung der dominierenden Komponenten der Begleitorganismen in der Mischkultur. Für die Charakterisierung der Begleitorganismen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Bearbeitungszeitraumes aus dem Bioreaktor Proben zur Isolierung von Reinkulturen entnommen, die gleichzeitig zur Bestimmung der KBE dienten. Beispielhaft sollen hier die Ergebnisse für eine Probe aus einem PHB-Versuch unter Stickstoffmangel dargestellt werden. Ausgehend von Verdünnungsreihen bis  $10^{-8}$  (die Originalprobe wurde auf  $OD_{600nm}=0,1$  verdünnt) erfolgte die Ausplattierung und Kultivierung mit dem Ziel der Isolierung von Reinkulturen nach drei Methoden:

- 1) Standard-Agar + Methan/Luftgemisch
- 2) Standard-Agar + Methanol
- 3) Pepton-Nähragar.

Zur Gewinnung von Reinkulturen erfolgte dann jeweils die Passagierung auf neue Agarplatten, bis visuell und im mikroskopischen Präparat keine Kontaminationen erkennbar waren. Dies war für die Kultivierung mit Methanol bzw. auf Nähragar im Zeitraum von ca. drei Wochen erreicht, die Rückisolierung der methanotrophen Hauptkomponente war jedoch mit größeren Schwierigkeiten verbunden. Erst nach 9 Monaten konnte die methanotrophe Hauptkomponente als Reinkultur isoliert werden. Als Entscheidungskriterium dienten das (Nicht-)Wachstum auf Nähragar sowie die Reinheit entsprechender mikroskopischer Präparate. Als Hauptproblem dabei erwies sich die schlechte Einzelkoloniebildungsfähigkeit von GB 25, wodurch bei den Überimpfungen stets auch begleitende Organismen mit übertragen wurden.

Ein Teil der zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Isolate wurde mittels RAPD-PCR untersucht und die Bezeichnung identischer Stämme entsprechend vereinheitlicht.

Die Ermittlung des Verhältnisses zwischen methanolverwertenden und anderen Begleitorganismen war durch die Bestimmung der KBE nach der ersten Inkubationsperiode durch Auszählen der Platten einer geeigneten Verdünnungsstufe (50–80 Kolonien) geplant. Schwankungen in den parallelen Proben, teilweises Nichtauftreten bestimmter Typen und fehlende Einzelkoloniebildung verhinderten jedoch eine exakte Angabe der KBE, so daß nur Abschätzungen durch-

geführt wurden. Die Ergebnisse konnten jedoch durch die Bestimmung der MPN unterstützt werden (siehe 4.6.1.5.2).

Tabelle IV-39: Eigenschaften von Isolaten der Begleitorganismen aus der Mischkultur

|                            | Methode 1<br>(Methan)                                     | Methode 2<br>(Methanol)                     | Methode 3<br>(Nähragar)   |
|----------------------------|---|---|---|
| Bezeichnung der Isolate    | MA1, MA2 <sup>1</sup>                                     | MO1, MO2                                    | NA1, NA2, NA3, NA4, NA5   |
| Bildung von Einzelkolonien | MA1: +<br>MA2: –  | MO1: +<br>MO2: +                            | NA1, NA2, NA3, NA4, NA5: +  |
| Morphologie Kolonie        | MA1: 1–2 mm, weiß<br>MA2: milchiger Rasen                 | MO1: 0,5 mm, glasig<br>MO2: 1–2 mm, milchig | NA1: 1–2 mm, zitronengelb<br>NA2: 1–2 mm, cremeweiß<br>NA3: 1–2 mm, milchig<br>NA4: 1 mm, glasig-trüb<br>NA5: 1 mm, gelb-orange |
| Morphologie Zellen         | MA1: Diplokokken<br>MA2: kräftige Stäbchen, z.T. gekrümmt | MO1, MO2: dünne Stäbchen                    | NA1: Diplo-/Tetrakokken<br>NA2: Kokken<br>NA3, NA4, NA5: kurze Stäbchen   |
| Gramfärbung                | Negativ   |   |   |

Die Auswertung der Platten für Methode 1 zeigte Einzelkolonien des Isolates MA1 bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-4}$ , wogegen Isolat MA2 noch bis zur Verdünnung  $10^{-7}$  einen milchigen Bewuchs zeigte. Daher konnte abgeschätzt werden, daß Isolat MA1 nur ca. im Verhältnis von 1:1000 zu MA2 vorhanden war.

Aus der Anzahl der Kolonien, die mit den Methoden 2 und 3 erhalten wurden, ließ sich der Anteil von Methyloprophen (Methanolverwertern) und anderen Heterotrophen (Nicht-Methyloprophen) an der Begleitflora zu je 50 % abschätzen (Tabelle IV-40). Innerhalb der Methanolverwerter dominierte Typ MO2, der einen Anteil von ca. 90 % ausmachte. Unter den Isolaten auf Nähragar waren die Vertreter NA1 und NA2 nur in sehr geringen Anteilen vorhanden (in Verdünnungsstufen bis  $10^{-3}$ ), die Hauptkomponente bildete das Isolat NA3 ( $> 75 %$ ). Aus den Zählungen der Kolonien und Berücksichtigung der Verdünnungsreihen ließ sich in guter Übereinstimmung mit der Zellzahl ein KBE-Wert von etwa  $10^{11} \text{ ml}^{-1}$  ableiten.

Tabelle IV-40: Ausplattierungen zur Bestimmung der KBE auf unter selektiven Bedingungen (Bezeichnung siehe Tabelle IV-39, n.z. = nicht zählbar; ü. = überwiegend)

| Verdünnung | Methode 2 – Methanol<br>[Anzahl Kolonien] |     |     | Methode 3 – Nähragar<br>[Anzahl Kolonien] |     |     |     |     |     |
|------------|---|-----|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|            | Σ   | MO1 | MO2 | Σ   | NA1 | NA2 | NA3 | NA4 | NA5 |
| $10^{-8}$  | 9   | –   | 9   | 15  | –   | –   | 14  | –   | 1   |
| $10^{-7}$  | 68  | 4   | 64  | 57  | –   | –   | 44  | 4   | 9   |
| $10^{-6}$  | 435                                       | 35  | 400 | n.z.                                      | –   | –   | ü.  | 50  | 78  |

<sup>1</sup> MA2 wurde mittels Immunofluoreszenz als *Methylocystis* sp. GB 25 identifiziert.

#### 4.6.1.5.2 Bestimmung der most probable number (MPN)

Um die Schwierigkeiten der Bestimmung der KBE auf festen Medien zu umgehen, wurde zusätzlich die Bestimmung der MPN in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dabei wurden die Proben analog in drei Varianten behandelt (siehe 3.9.5, mit zusätzlicher Kontrolle für Methanotrophe).

Die Ergebnisse für zwei Proben wichen deutlich voneinander ab, was auf die große, für MPN-Bestimmungen typische Ungenauigkeit zurückzuführen ist (Tabelle IV-41). Für verlässliche Aussagen hätte eine große Anzahl an Parallelmessungen durchgeführt werden müssen. Aus dem Mittelwert beider Proben konnte ein Verhältnis 1:1:1 bezüglich der Anteile von Methanotrophen, Methanolverwertern und anderen Heterotrophen abgeschätzt werden, was in Übereinstimmung mit dem Verhältnis 1:1 für die Isolate auf Methanol (MO) und Nähragar (NA) aus der KBE-Bestimmung steht. Der Anteil der Methanotrophen war dagegen niedriger (ca. 30 %) als nach der mikroskopischen Zählung. Die wahrscheinlichsten Gesamtkeimzahlen der beiden Proben unterschieden sich um eine Größenordnung, das Ergebnis der Probe 2 war deutlich niedriger, als die ermittelte Zellzahl bzw. der Wert der KBE.

Tabelle IV-41: Ergebnisse der MNP-Bestimmung

|                               |                     | Gesamt-MPN             | Methode 1<br>(Methan)  | Methode 2<br>(Methanol) [ml <sup>-1</sup> ] | Methode 3<br>(Nähragar) [ml <sup>-1</sup> ] |
|-------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|---|---|
| Probe 1                       | [ml <sup>-1</sup> ] | 4,7 × 10 <sup>10</sup> | 1,1 × 10 <sup>10</sup> | 1,8 × 10 <sup>10</sup>                      | 1,8 × 10 <sup>10</sup>                      |
|                               | [%]                 | 100                    | 23,4                   | 38,3  | 38,3  |
| Probe 2                       | [ml <sup>-1</sup> ] | 6,3 × 10 <sup>9</sup>  | 2,8 × 10 <sup>9</sup>  | 7,6 × 10 <sup>8</sup>                       | 2,7 × 10 <sup>9</sup>                       |
|                               | [%]                 | 100                    | 44,7                   | 12,1  | 43,1  |
| Mittelwert aus<br>1 und 2 [%] |                     | 100                    | 31,3                   | 25,2  | 40,7  |

#### 4.6.2 CHARAKTERISIERUNG DER MISCHKULTUR MITTELS FETTSÄUREANALYSE UND <sup>13</sup>C-ISOTOPENANALYSEN

Die Analyse der bakteriellen Membranlipide (bzw. der durch Methylierung der Säuregruppen gebildeten *fatty acid methyl esters* – FAMES) wird in der ökologischen Forschung zunehmend genutzt, um einerseits Vertreter bestimmter Organismen in Umweltproben zu identifizieren; andererseits aber auch, um die Diversität und Dynamik mikrobieller Gemeinschaften zu beschreiben [WHITE et al. 1998, IBEKWE und KENNEDY 1998, BODELIER et al. 2000, GREEN und SCOW 2000, HEDRICK et al. 2000]. Methanotrophe Bakterien besitzen spezifische Fettsäuren und können in Mischkulturen nachgewiesen werden (siehe 2.2.1). Aus diesem Grund wurde die Methode zur Charakterisierung der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) eingesetzt. Die ausgewählten Proben stammten aus dem Zeitraum 1997–2000 und wurden aus kontinuierlichen Wachstumsprozessen entnommen.

In den Proben wurden insgesamt sieben Fettsäuren detektiert, den Hauptanteil (in Summe über 99 %) machten die Fettsäuren C18:1 (zwei Vertreter), C16:1 und C16:0 aus. Abb. 4-58 zeigt ein Beispiel-Chromatogramm. Der Anteil der 18:1-Fettsäuren betrug für alle Proben der Mischkultur 86,7 ± 2,9 % (Tabelle IV-42).

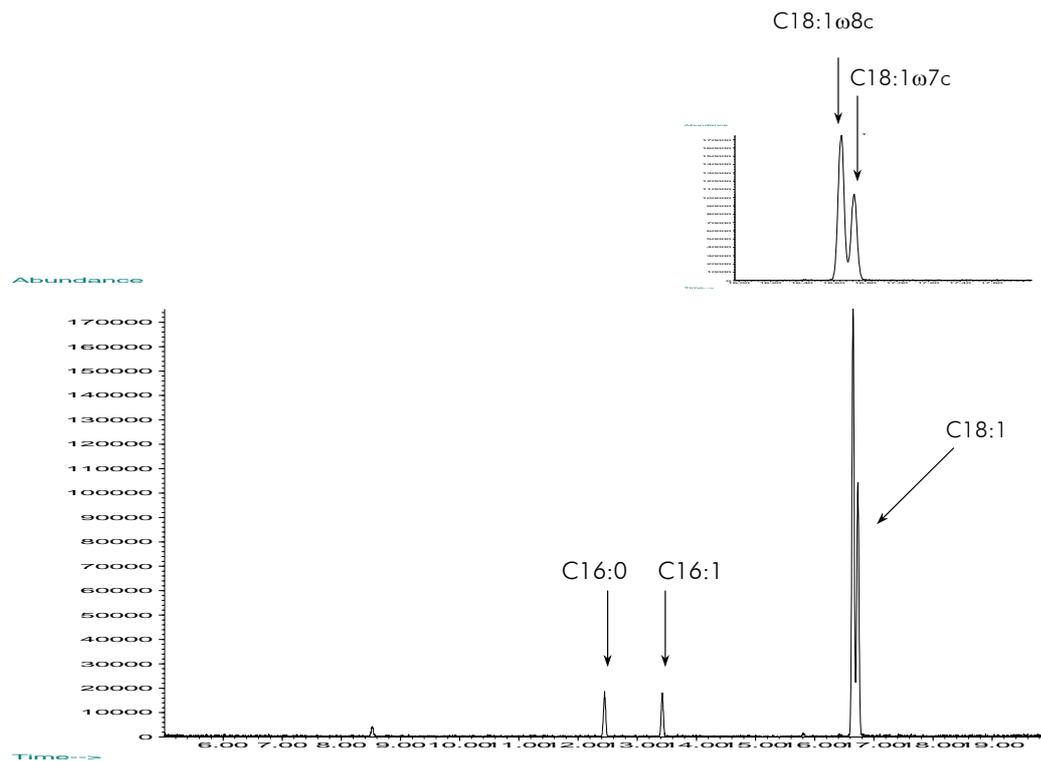


Abb. 4-58: Nachweis von FAMES in der untersuchten Mischkultur

Tabelle IV-42: Analyse der FAMES-Zusammensetzung der methanverwertenden Mischkultur aus verschiedenen Prozessen innerhalb des Untersuchungszeitraumes (FS 1-5=Probennummer, in Klammern Zeitpunkt der Probenahme)

| Fettsäure<br>(Kurzbezeichnung) | GB 25<br>(Reinkultur) | FS 1<br>(11/97)<br>[%] | FS 2<br>(12/98)<br>[%] | FS 3<br>(5/99)<br>[%] | FS 4<br>(8/99)<br>[%] | FS 5<br>(12/99)<br>[%] |
|--------------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 15:0                           | –                     | 0,54                   | 0,24                   | 0,18                  | 1,15                  | 0,26                   |
| 16:0                           | –                     | 7,34                   | 4,65                   | 6,37                  | 4,87                  | 7,74                   |
| 16:1                           | –                     | 7,23                   | 3,79                   | 6,78                  | 4,62                  | 8,19                   |
| 18:1ω7t                        | +                     | 0,55                   | 2,07                   | 0,72                  | 0,86                  | 0,81                   |
| 18:1ω8c                        | 63,6                  | 54,56                  | 61,47                  | 54,5                  | 55,93                 | 52,44                  |
| 18:1ω7c                        | 35,3                  | 29,03                  | 27,13                  | 30,62                 | 31,57                 | 29,34                  |
| Σ 18:1c                        | 98,9                  | 83,59                  | 88,6                   | 85,12                 | 87,5                  | 81,78                  |
| 18:0                           | +                     | 0,74                   | 0,73                   | 0,83                  | 1,00                  | 1,22                   |

In Abb. 4-59 sind die vier wichtigsten Fettsäuren der untersuchten Proben über den gesamten Zeitraum detailliert dargestellt. Das Fettsäuremuster entspricht dem in der Literatur für *Methylocystis* beschriebenen, insbesondere das Auftreten und der Anteil der ungewöhnlichen 10-Octadecensäure (18:1ω8) [MAKULA 1978, GUCKERT et al. 1991].

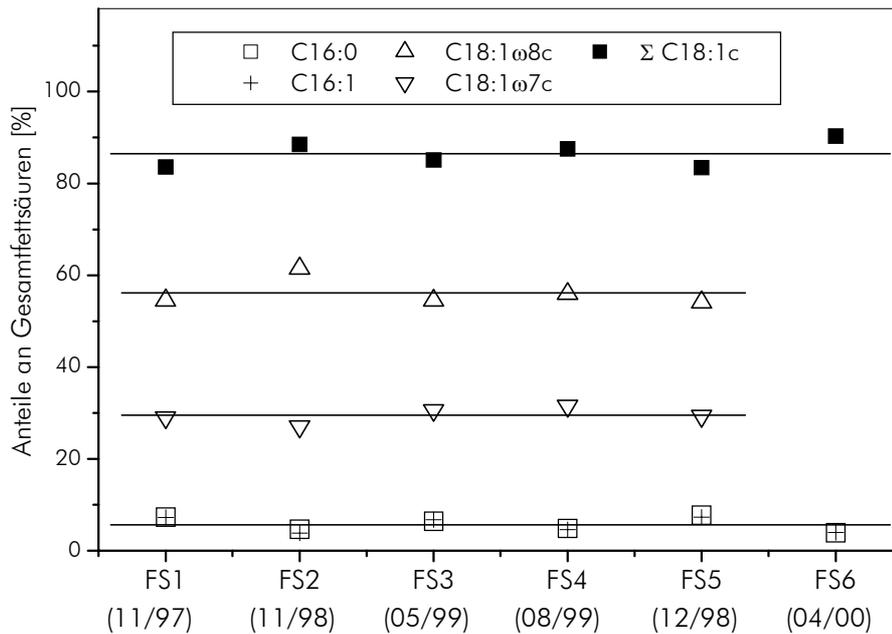


Abb. 4-59: Differenzierung der Anteile der Fettsäuren C16:0, C16:1, C18:1ω8c und C18:1ω7c in Proben der Mischkultur (Probe FS6, siehe Tabelle IV-43)

Mit Hilfe der FAME-Analysen konnte durch die Identifizierung der für *Methylocystis* sp. (Typ II-Methanotrophe) typischen C18:1 Fettsäuren, die im Mittel einen Anteil von 87 % aufweisen, ein weiteres Indiz für die Dominanz dieser Komponente in der Gesamtbiomasse erbracht werden. Die in der Mischkultur gefundenen Fettsäuren stimmen bezüglich der identifizierten Hauptvertreter C18:1ω8c und C18:1ω7c mit den Fettsäuren überein, die in der methanotrophen Species GB 25 auftreten ( $\Sigma$  C18:1 > 99 %, Tabelle IV-42). Die Analyse der Fettsäuren lieferte außerdem ein zusätzliches Indiz für die Stabilität der verwendeten Mischkultur, da über den gesamten Zeitraum (ca. 3 Jahre) keine Veränderungen in der Zusammensetzung registriert werden konnten.

Ergänzend zu der oben beschriebenen FAME-Analyse wurde unter Verwendung von GC/IRMS die  $^{13}\text{C}$ -Isotopensignatur der Fettsäuren analysiert. Die natürliche Häufigkeit des Kohlenstoffisotops  $^{13}\text{C}$  beträgt 1,11 % [GALIMOV 1985]. Aufgrund des Isotopeneffektes wird  $^{13}\text{C}$  in biochemischen Prozessen langsamer umgesetzt als das entsprechende  $^{12}\text{C}$ -Isotop. Daher haben Produkte des mikrobiellen Stoffwechsels einen  $^{13}\text{C}$ -Anteil, der niedriger als der der Kohlenstoffquelle(n) ist. Für Prozesse der Methanoxidation führt dieser Effekt zu einer Anreicherung von  $^{13}\text{C}$  im nicht verbrauchten Methan [BARKER und FRITZ 1981, ZYAKUN und ZAKHARCHENKO 1998]. Das Isotopenverhältnis bzw. die Isotopensignatur  $\delta$  wird für einzelne Elemente (C, O, N) auf Standardwerte bezogen, für Kohlenstoff auf den sog. PDB-Standard [GALIMOV 1985].

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Probe}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} \cdot 1000 \quad [\text{‰}] \quad (4.38)$$

Bei der Analytik von Fettsäuren können  $^{13}\text{C}$ -Messungen Aussagen über deren biochemische Genese liefern. Unterschiede in den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte geben Hinweise auf verschiedene Stoffwechselwege z.B. in methanotrophen Bakterien oder Begleitorganismen. Dazu wurde die Isotopensignatur der FAMES bestimmt. Weitere  $^{13}\text{C}$ -Analysen von Methan, Gesamtbiomasse und PHB sollten die Interpretation und Einordnung dieser Meßwerte ermöglichen.

Es konnte gezeigt werden, daß bei der Verwertung des Methans ( $\delta^{13}\text{C} = -43 \text{‰}$ ) eine Fraktionierung stattfand. Im Methan des ausgehenden Gases wurde  $^{13}\text{C}$  angereichert ( $\delta^{13}\text{C} = -39 \text{‰}$ ), entsprechend zeigten die Produkte des mikrobiellen Metabolismus eine  $^{12}\text{C}$ -Anreicherung. Das traf für (Gesamt-)Biomasse ( $\delta^{13}\text{C} = -51 \text{‰}$ ), PHB ( $\delta^{13}\text{C} = -52,8 \text{‰}$ ), Fettsäuren (für C18:1,  $\delta^{13}\text{C} = -63,5 \text{‰}$ ) und  $\text{CO}_2$  ( $\delta^{13}\text{C} = -68 \text{‰}$ ) zu. In Abb. 4-60 ist die Fraktionierung schematisch dargestellt.

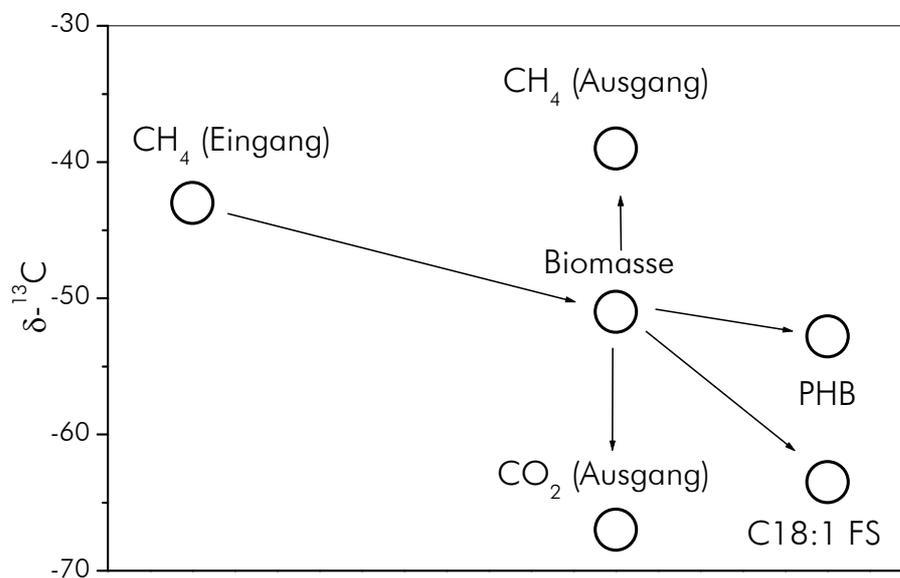


Abb. 4-60: Isotopenfraktionierung von Kohlenstoff aus Methan durch die methanverwendende Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25)

Ausgehend von den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten für Methan wurde für den Wachstumsprozeß die Isotopenfraktionierung  $\alpha_{13\text{C}}$  berechnet (nach Gl. 4.39) [ZYAKUN und ZAKHARCHENKO 1998]:

$$\alpha_{13\text{C}} = 1 + \frac{[\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4,1} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4,0}]}{1000 \cdot F_\delta} \quad (4.39)$$

$$\text{mit } F_\delta = \frac{x_{\text{CH}_4,0} - x_{\text{CH}_4,1}}{x_{\text{CH}_4,0}} \quad (4.40)$$

$$\alpha_{13\text{C}} = 1,036$$

In weiteren  $^{13}\text{C}$ -Analysen der Fettsäuren aus einem 24-stündigen PHB-Bildungsprozeß unter Stickstoffmangel wurde für die einzelnen Komponenten sowohl der quantitative Anteil, als auch das Isotopenverhältnis bestimmt (Tabelle IV-43). Dabei dominierten die für methanotrophe

Bakterien der Species *Methylocystis* typische C18:1-Fettsäuren mit einem Anteil von 87–90 %. Der zugehörige  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert betrug – 62 bis – 65 ‰. Die mit einem Anteil von 1,8–2,5 % detektierten C15:0-Fettsäuren zeigen eine deutlich verschiedene  $\delta^{13}\text{C}$ -Signatur, was für deren Synthese auf einem anderen Stoffwechselweg spricht, z.B. in Begleitorganismen.

Tabelle IV-43:  $^{13}\text{C}$ -Isotopensignatur der Fettsäuren der methanverwertenden Mischkultur während eines 24h-stündigen PHB-Bildungsprozesses unter Stickstoffmangel (+ = detektiert, quantitativ nicht auswertbar)

| FAME | FS6 (PHB <sub>0h</sub> ) |            | FS6a (PHB <sub>6h</sub> ) |            | FS6b (PHB <sub>12h</sub> ) |            | FS6c (PHB <sub>24h</sub> ) |            |
|------|--------------------------|------------|---------------------------|------------|----------------------------|------------|----------------------------|------------|
|      | $\delta^{13}\text{C}$    | Anteil [%] | $\delta^{13}\text{C}$     | Anteil [%] | $\delta^{13}\text{C}$      | Anteil [%] | $\delta^{13}\text{C}$      | Anteil [%] |
| 15:0 | –40,1<br>± 0,32          | 1,8        | –40,7<br>± 0,39           | 2,2        | –43,7<br>± 0,84            | 2,5        | –42,8<br>± 0,10            | 2,5        |
| 16:0 | –54,7<br>± 0,31          | 4,0        | –48,7<br>± 0,23           | 6,3        | –57,1<br>± 0,62            | 7,1        | –58,3<br>± 0,71            | 5,2        |
| 16:1 | –57,0<br>± 0,08          | 3,9        | –55,1<br>± 0,25           | 3,8        | –59,3<br>± 1,37            | 3,2        | –63,9<br>± 0,29            | 2,2        |
| 18:0 |                          | +          |                           | +          |                            | +          |                            | +          |
| 18:1 | –63,3<br>± 0,07          | 90,3       | –62,7<br>± 0,22           | 87,7       | –62,8<br>± 0,40            | 87,1       | –65,4<br>± 0,59            | 90,1       |

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen einerseits die Dominanz der methanotrophen Species in der untersuchten Mischkultur (Anteil der C18:1 > 87 %) und zeigen andererseits die Stabilität der mikrobiellen Gemeinschaft während des Zeitraumes der Produktbildung. Die Isotopenwerte der C18:1-, C16:1- und C16:0-Fettsäuren könnten mit Unterschieden von 5–10 Einheiten aus dem gleichen Stoffwechsel stammen, im Gegensatz dazu weist die Signatur der C15:0-Fettsäure auf einen anderen Bildungsweg hin.

#### 4.6.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

In den Abschnitten 4.6.1 und 4.6.2 wurde die Charakterisierung der Mischkultur durch Mikroskopie, Verwendung polyklonaler Antikörper, Isolierungen und FAME-Analysen dargestellt. Die Ergebnisse sollten durch molekularbiologische Untersuchungen ergänzt werden. Mit Hilfe von DNA-Analysen wird der Gesamtzustand einer Population/Mischkultur zum Zeitpunkt der Probenahme realistisch (da kultivierungsunabhängig) wiedergespiegelt, wogegen z.B. bei der Isolierung von Reinkulturen durch die Wahl der Kultivierungsbedingungen stets die Gefahr einer Bevorteilung bestimmter Species besteht (Selektion) und Ergebnisse verfälscht werden können. Hinzu kommt, daß oft nicht alle Einzelkomponenten komplexer mikrobieller Gemeinschaften erfaßt werden können. So gibt es Schätzungen, nach denen z.B. in Umweltproben nur 1–15 % der Organismen als kultivierbar angesehen werden [AMANN et al. 1995].

Zur molekularbiologischen Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften in verschiedensten Systemen (Umwelt, Medizin, Lebensmittel, Trinkwasser u.a.) kommen in erster Linie sog. *fingerprint*-Methoden zum Einsatz. Dazu gehören u.a. die denaturierende Gradienten-

gelelektrophorese (DGGE), die Temperatur-Gradientengelelektrophorese (TGGE), die Einzel-Strang-Konformitätsanalyse (SCCP) sowie die terminale Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (T-RFLP). Zur Unterscheidung von Organismen auf genetischer Ebene kann die sog. RAPD-PCR genutzt werden: dabei werden Primer (meist nur wenige Nukleotide lang, sog. Zufallsprimer), zur Amplifikation der DNA eingesetzt. Es entstehen Produkte unterschiedlicher Größe, die bei der elektrophoretischen Auftrennung ein stammspezifisches Muster ergeben. Die Sequenzierung der 16S-rDNA bietet die Möglichkeit, über Vergleiche mit in Datenbanken erfaßten Sequenzen anhand von Sequenzhomologien eine Identifizierung der Organismen vorzunehmen.

Für die Untersuchungen der Stabilität im Rahmen dieser Arbeit wurde die DGGE ausgewählt, die von FISCHER und LEHRMAN (1983) für die medizinische Forschung entwickelt wurde. Das Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Bindungsstärke zwischen A-T bzw. G-C-Basenpaaren und damit unterschiedlichen Schmelzeigenschaften von DNA-Teilabschnitten in Abhängigkeit vom G/C-Gehalt. Amplifiziert man bestimmte universelle Bereiche der 16S-rDNA mit Hilfe von spezifischen Primerpaaren unter Einsatz einer G/C-reichen Region (G/C-clamp zur Verhinderung der vollständigen Denaturierung) kann man diese Abschnitte (gleicher Größe) unter denaturierenden Bedingungen entlang eines linearen Gradienten aus Harnstoff und Formamid in einem Gel nach der Schmelztemperatur, die sich aus der Nukleotidsequenz ergibt, auftrennen.

Diese Methode wird seit den 90er Jahren auch in der Umweltforschung eingesetzt, um Populationsdynamiken zu beschreiben [MUYZER et al. 1993] oder Änderungen in der Diversität zu verfolgen [MUYZER und SMALLA 1998] und dient u.a. auch zur Charakterisierung methanotropher Bakteriengemeinschaften in verschiedenen Ökosystemen, z.B. in Böden [JENSEN et al. 1998, DUNFIELD et al. 1999, HENCKEL et al. 2000], Reisfeldern [HENCKEL et al. 1999, BODELIER et al. 2000, ELLER UND FRENZEL 2001], Deponien [WISE et al. 1999], Grundwasser [IWAMOTO et al. 2000] o.a. [VALLAEYS et al. 1997, MURRELL und RADAJEWSKI 2000] angewendet.

#### 4.6.3.1 Identifizierung und taxonomische Einordnung mittels Sequenzierung von Abschnitten der 16S-rDNA und funktioneller Gene

Zur Identifizierung auf genetischer Ebene wurden einerseits die 16S-rDNA Sequenzen und andererseits eine Teilsequenz des charakteristischen Gens methanotropher Bakterien, das die partikuläre Methan-Monooxygenase (pMMO) kodiert, ausgewählt. Dabei standen die methanotrophen Isolate im Mittelpunkt, als Referenz diente die Reinkultur GB 25.

Tabelle IV-44: Überblick über sequenzierte Genabschnitte ausgewählter Stämme

| Bezeichnung | Herkunft /Beschreibung                             | 16S-rDNA | pMMO |
|-------------|--|----------|------|
| GB 25       | Reinkultur GB 25                                   | ✓        | ✓    |
| MA 2        | methanotrophe Hauptkomponente (= Rückisolat GB 25) | ✓        | ✓    |
| MA 1        | Methanotrophes Isolat                              | ✓        | ✓    |
| MO 2        | Methanolverwertendes Isolat                        | ✓        |      |

Aus den Sequenzen der o.g. Stämme wurde mit Hilfe der Phylogenie-Software ARB [http://www.arb-home.de] und in der zugehörigen Datenbank (Stand April 1997) hinterlegten Sequenzen ein 16S-rDNA Stammbaum erstellt (Abb. 4-61), der die phylogenetische Einordnung der Organismen erlaubte. Verschiedene in ARB integrierte Funktionen ermöglichen die Berechnung des evolutionären Abstandes auf der Grundlage von Sequenzvergleichen. Damit konnte die Einordnung der methanotrophen Hauptkomponente GB 25 als Rückisolat (MA2) und Reinkultur (GB 25 (TK)) zu den  $\alpha$ -Proteobakterien bestätigt werden. Das methylorophe Isolat MO2 ist ein Vertreter der  $\beta$ -Proteobakterien. Ein eigenständiges Cluster bilden die Typ I-Methanotrophen, die zur Gruppe der  $\gamma$ -Proteobakterien gehören. In diese Gruppe ordnet sich das zweite Isolat MA 1 ein. Weiterhin wird die Zugehörigkeit zu den jeweiligen Gattungen *Methylocystis* (GB 25, MA2), *Methylophilus* (MO2) und *Methylococcus* (MA1) belegt. Aus dem geringen Abstand der Stämme MA2 und GB 25 ist eine hohe Verwandtschaft abzuleiten.

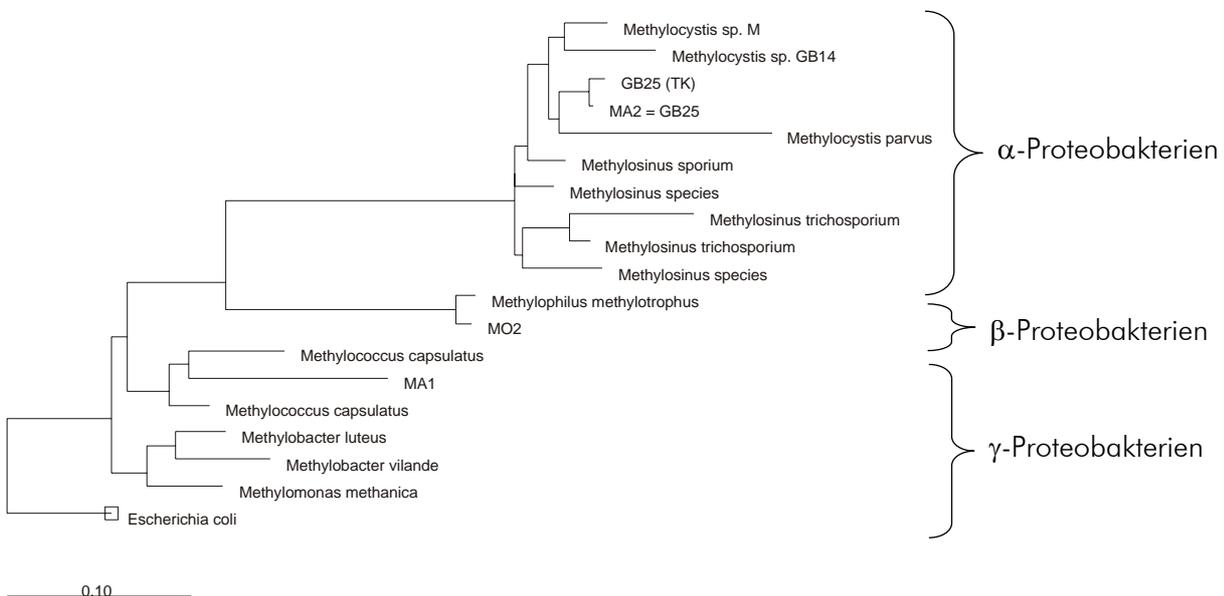


Abb. 4-61: Phylogenetischer Stammbaum und Einordnung der Stämme und Isolate GB 25, MA1, MA2 und MO2 ins Reich der Proteobakterien

Homologievergleiche in der Gendatenbank des NCBI (Bethesda) und Sequenzanalysen mit Hilfe von BLAST ergaben die in Tabelle IV-45 zusammengestellten maximalen Sequenzhomologien, die sehr gut mit den Zuordnungen nach ARB übereinstimmen.

Tabelle IV-45: Identifizierung/Einordnung von Isolaten und Reinkulturen auf der Basis von Vergleichen der 16S-rDNA- und pMMO-Sequenzen

| Bezeichnung | Basis für Datenvergleich / Übereinstimmung [%]               |              |                                 |       |
|-------------|--|--------------|---------------------------------|-------|
|             | 16S-rDNA   |              | pMMO                            |       |
| GB 25       | Typ II- Methanotropher AML-A3<br><i>Methylocystis parvus</i> | 98 %<br>98 % | <i>Methylocystis</i> sp. LW5    | 97 %  |
| MA 2        | Typ II-Methanotropher AML-A3<br><i>Methylocystis parvus</i>  | 98 %<br>98 % | <i>Methylocystis</i> sp. LW5    | 97 %  |
| MA 1        | <i>Methylococcus capsulatus</i>                              | 97 %         | <i>Methylococcus capsulatus</i> | 100 % |
| MO 2        | <i>Methylophilus methylothropus</i>                          | 97 %         |                                 |       |

#### 4.6.3.2 Untersuchungen zur Unterscheidung der Isolate durch RAPD-Analysen

Die zur Charakterisierung der methanverwertenden Mischkultur auf verschiedenen Medien zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnenen Isolate wurden mittels RAPD-PCR analysiert und die erhaltenen Muster untereinander und mit bekannten Stämmen verglichen. Auf diese Weise konnte die auf Grund morphologischer Merkmale erfolgte Klassifizierung der Isolate sowie die Identität von Isolaten zu verschiedenen Zeitpunkten bestätigt werden. Abb. 4-62 zeigt beispielhaft ein Gel der Produkte der RAPD-PCR verschiedener Isolate. Die Isolate i1MO (Nr. 8), i2MO (Nr. 9) vom 11.4.00 sowie i2MO (11) und i3MO (12) vom 20.7.99 und i2MO (13) vom 2.12.99 ergaben identische Bandenmuster. Das gleiche gilt für die Isolate i1MA (17) vom 11.4.00, i1MA1 (18) vom 13.8.99 und i1MA (19) vom 2.12.99.

Zur einheitlichen Bezeichnung wurden dann die wie unter 4.6.1.5.1 (Tabelle IV-39) eingeführten Namen verwendet.

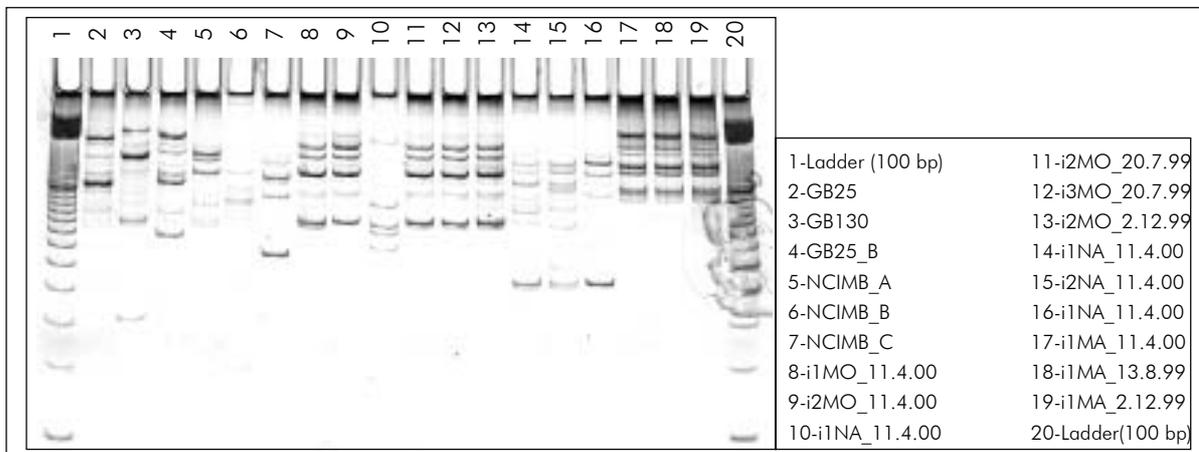


Abb. 4-62: Produkte der RADP-PCR von Isolaten, gewonnen unter selektiven Bedingungen ((MA)-Isolat auf Methan, (MO)-Isolat auf Methanol, (NA)-Nähragar-Isolat; zum Vergleich Stämme der eigenen (GB) und englischen Stammsammlung (NCIMB), Bedingungen: 200 V, 100 min)

#### 4.6.3.3 Nachweis der Stabilität der Mischkultur durch denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Durch PCR-DGGE sollten Aussagen über Zusammensetzung und Stabilität der Mischkultur während der einzelnen Wachstums- und Produktbildungsprozesse, jedoch auch über längere Zeiträume (10 Monate) erhalten werden. Bei der Amplifizierung der DNA, die eine Mischung aus den verschiedenen Anteilen der Vertreter der Mischkultur darstellt, mit den entsprechenden Primern wird praktisch für jede Species die gleiche Region der 16S-rDNA vervielfältigt. Da die Sequenzen dieser Teilstücke unterschiedlich sind, können diese in speziellen Gelen aufgetrennt werden. Dabei wird theoretisch für jede Komponente eine Bande erwartet.

Die Proben der Mischkultur wurden aus verschiedenen Prozessen von Mai 1999 bis März 2000 entnommen. Das Gradientengel in Abb. 4-63 zeigt Proben der Mischkultur über einen 24stündigen PHB-Bildungsprozeß unter Phosphatmangel. Erkennbar ist die Auftrennung der

amplifizierten DNA in verschiedene Banden, die zusammen ein charakteristisches Muster ausbilden. Fünf Banden im mittleren Bereich sind deutlich zu erkennen, weitere Banden sind im unteren Teil des Gels zu vermuten. Die Bandenmuster zeigten keine Veränderung und sprechen für eine stabile Zusammensetzung der Mischkultur im untersuchten Zeitraum der PHB-Synthese. Diese Aussage konnte für Proben aus weiteren Versuchen reproduziert werden (Gele nicht gezeigt).

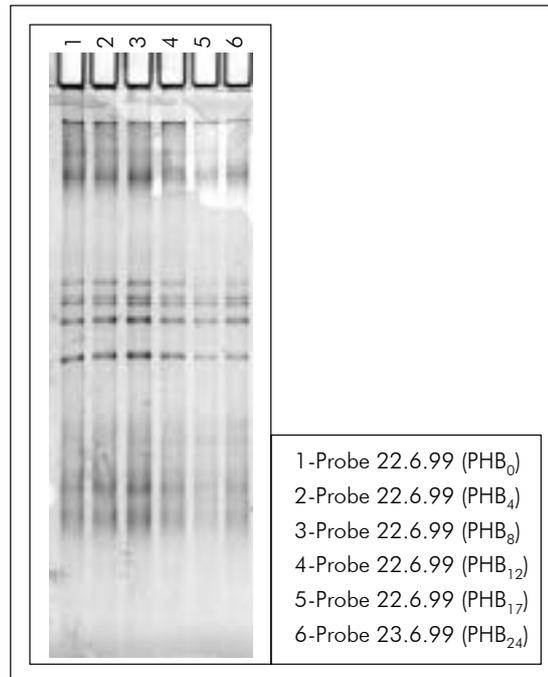


Abb. 4-63: Proben der methanotrophen Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) während eines 24-stündigen PHB-Bildungsprozesses unter Phosphatmangel (Denaturierung 30–60 %, Bedingungen: 200 V, 150 min)

Weiterhin wurde versucht, die Banden einzelnen Organismen zuzuordnen. Dazu wurden unter gleichen Bedingungen gewonnene Proben der Isolate und der Reinkultur der Hauptkomponente GB 25 analysiert und die Position der Banden verglichen (Abb. 4-64). Eine Zuordnung gelang in der Mischkultur für eine methanotrophe Komponente (MA2, dominante Species GB 25), zwei methylootrophe Isolate (MO1, MO2) und zwei auf Nähragar gewachsene Organismen (NA5, NA3). Damit konnten die relevanten Species, die aus mikrobiologischen Untersuchungen erhalten wurden, den stärksten Banden der Mischkultur zugeordnet werden. Entgegen der Problematik der Kultivierbarkeit bei realen Umweltproben und trotz der Probleme bei der Gewinnung der Reinkulturen zeigten die Befunde beider Methoden (DGGE, Isolierungen) gute Übereinstimmung.



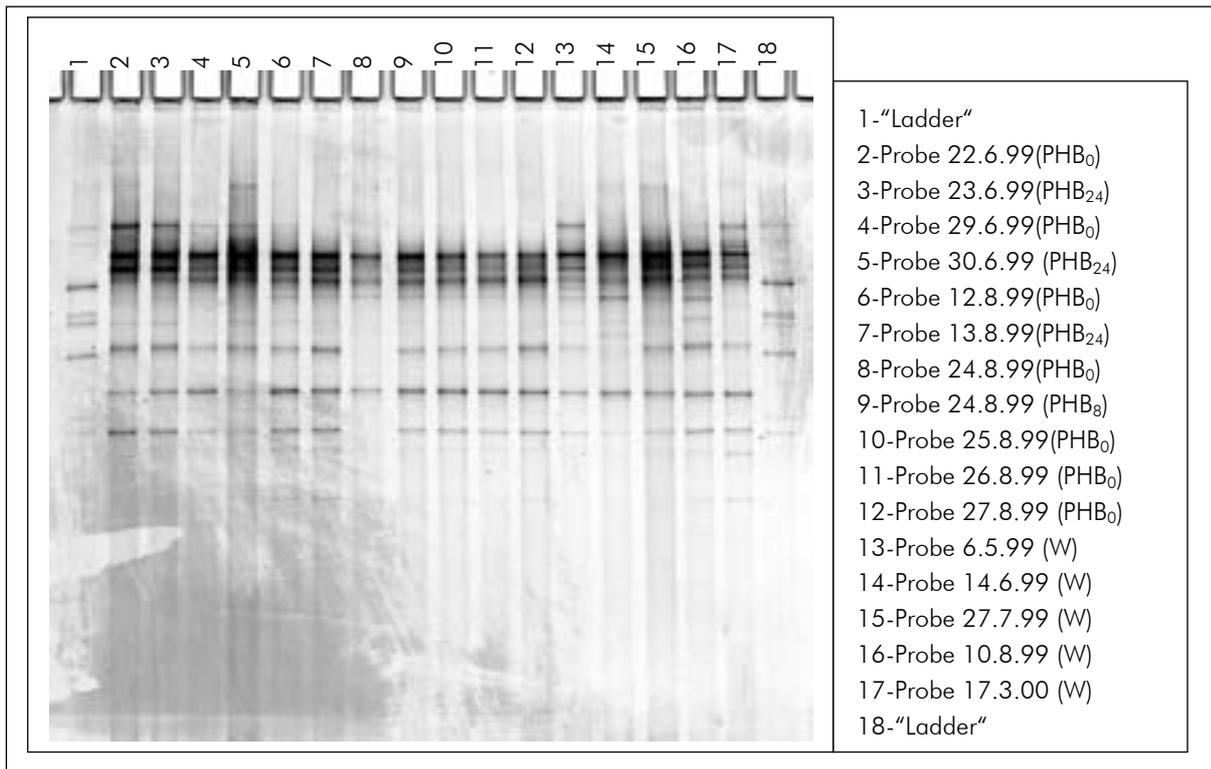


Abb. 4-65: Stabile Zusammensetzung der methanotrophen Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) während Wachstums- und PHB-Bildungsprozessen im Zeitraum 5/99–3/00 (30–100 % Denaturierung, 200 V, 300 min)

## 4.7 Anwendungsorientierte Untersuchungen in Bezug auf Prozeß und Polymer

### 4.7.1 MODELLVERSUCHE MIT ERDGAS

#### 4.7.1.1 Prozeßspezifische Kenndaten

Im Hinblick auf die ökonomische Verbesserung des Gesamtverfahrens sollte auch die Fragestellung geklärt werden, in welcher Rohstoff-Form Methan insbesondere im Technikums- und perspektivisch im großtechnischen Maßstab eingesetzt werden kann.

In den bisher dargestellten Grundlagenuntersuchungen wurde Methan der Reinheit 2.5 verwendet. In zukünftigen Anwendungen ist die Nutzung von Erdgas denkbar, das z.B. durch die Fa. LINDE (Zusammensetzung siehe Tabelle IV-46) für 40 % des Methanpreises (Methan 2.5: 8,02 DM m<sup>-3</sup>, Erdgas: 3,25 DM m<sup>-3</sup>) angeboten wird.

Für die Untersuchungen wurden auf der Grundlage der Angaben zur Zusammensetzung des Erdgases (Tabelle IV-46) hergestellte Modellgemische eingesetzt (Tabelle IV-47).

Der Verlauf der Biomasseanzucht zeigte keine Unterschiede im Vergleich zu den Prozessen mit Methan 2.5. Zur Charakterisierung der PHB-Synthese wurden zwei Experimente im UD 5 unter Phosphatmangel über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt. Die Aufarbeitung der Biomasse erfolgte nach dem Standardverfahren und die gewonnene PHB diente als Untersuchungsmaterial hinsichtlich der Biokompatibilität.

Tabelle IV-46: Zusammensetzung von Methan 2.5 und Erdgas [LINDE 1999]

| Komponente                               |     | Methan 2.5  | Erdgas       |
|--|-----|-------------|--------------|
| CH <sub>4</sub>                          | %   | 99,96 ± 1 % | 99,5 ± 1 %   |
| C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>            | vpm | 270 ± 2 %   | 2275 ± 2 %   |
| C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>            | vpm | < 5         | 891 ± 2 %    |
| i-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>         | vpm | < 5         | 24 ± 5 %     |
| n-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>         | vpm | < 5         | < 10         |
| i-C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>         | vpm | 6 ± 10 %    | < 10         |
| n-C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>         | vpm | 11 ± 10 %   | < 10         |
| i-C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>         | vpm |             | < 10         |
| n-C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>         | vpm |             | < 10         |
| C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>            | vpm | < 5         | < 10         |
| C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>            | vpm |             | < 10         |
| C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>            | vpm | < 5         |              |
| Σ C <sub>n</sub> H <sub>m</sub><br>n > 5 | vpm | 30 ± 10 %   |              |
| Ar + O <sub>2</sub>                      | vpm | 7 ± 10 %    | < 60         |
| N <sub>2</sub>                           | vpm | 3,5 ± 10 %  | 0,82 % ± 2 % |
| CO                                       | vpm | << 10       | < 1          |
| CO <sub>2</sub>                          | vpm | 5 ± 10 %    | 4,5 ± 5 %    |

Tabelle IV-47: Zusammensetzung der Modellgemische

| Komponente                    |     | Charge 1 | Charge 2 | Charge 3 |
|-------------------------------|-----|----------|----------|----------|
| CH <sub>4</sub>               | %   | 99,6897  | 99,6895  | 99,6842  |
| C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> | vpm | 2270     | 2280     | 2360     |
| C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> | vpm | 833      | 825      | 798      |

Der Verlauf der PHB-Bildung und die charakteristischen Parameter zeigten (gleiche Startbedingungen vorausgesetzt) keine Unterschiede im Vergleich zu Versuchen mit reinem Methan (Tabelle IV-48, zeitliche Verläufe siehe Abb. A-9 und A-10 im Anhang 0). Nach 24 h wurden PHB-Gehalte von ca. 49 % in der Biomasse und mittlere viskosimetrisch bestimmte Molekulargewichte von  $> 1 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  erreicht.

In gaschromatographischen Analysen der Biotrockenmasse und der extrahierten PHB konnten keine Hydroxyvaleriansäure-Einheiten detektiert werden. Als Vergleich diente ein kommerzielles PHB-co-HV-Polymer (12% PHV, Fa. Aldrich). Damit wurde die Hypothese bestätigt, daß die Konzentration von Ethan und Propan im Gemisch zu niedrig ist, um die Bildung nachweisbarer Anteile von Hydroxyvaleriat zu bewirken<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Bei der Charakterisierung der pMMO aus *Methylocystis* sp. GB 25 wurde die Oxidation von Alkanen bis zum Propan nachgewiesen [GROBE 1998].

Tabelle IV-48: Ergebnisse der PHB-Versuche unter Verwendung von Erdgas-Modellgemischen

| Kenngröße                               | Zeit | Versuch 1                     | Versuch 2                     | Vergleich  |
|---|------|-------------------------------|-------------------------------|------------|
| Einheit                                 | [h]  | Charge 1 + 2<br>Modellgemisch | Charge 2 + 3<br>Modellgemisch | Methan 2.5 |
| BTS                                     | 0    | 25,8                          | 18,1                          | 24,6       |
| [mg l <sup>-1</sup> ]                   | 24   | 63,6                          | 52,5                          | 61,2       |
| PHB-Gehalt                              | 0    | 2,2                           | 1,4                           | 3,3        |
| [%]                                     | 24   | 49,8                          | 49,9                          | 47,9       |
| CSB                                     | 0    | 454                           | 306                           | 379        |
| [mg l <sup>-1</sup> ]                   | 24   | 1008                          | 994                           | 1127       |
| F <sub>CSB/X</sub>                      | 0    | 17,6                          | 16,9                          | 15,4       |
| [mg g <sup>X-1</sup> ]                  | 24   | 15,8                          | 18,9                          | 18,4       |
| $\eta_{kin}$                            | 0    | 1,01                          | 0,98                          | 1,01       |
| [mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ]      | 24   | 1,43                          | 1,50                          | 1,31       |
| $\overline{M}_v$ [g mol <sup>-1</sup> ] | 24   | 1 116 000                     | 1 088 000                     | 1 119 000  |

#### 4.7.1.2 Zusammensetzung der Mischkultur

Auch die mikrobiologischen Befunde zeigten keine Unterschiede zu den Versuchen mit reinem Methan (Tabelle IV-49). Der durch Zählungen in der Thomakammer bestimmte Anteil der methanotrophen Hauptkomponente betrug 58,6 bzw. 50,9% (nach Zellzahl), die Gesamtzellzahlen lagen im Bereich der Endwerte nach 24 h PHB-Synthese unter Phosphatmangel.

Tabelle IV-49: Gesamtzellzahlen und Anteil methanotropher Bakterien nach 24-stündigem PHB-Bildungsprozeß

|                      | Zeit | Zellzahl              | Anteil GB 25 |
|----------------------|------|-----------------------|--------------|
|                      | [h]  | [ml <sup>-1</sup> ]   | [%]          |
| Versuch 1            | 24   | $1,3 \times 10^{11}$  | 58,6         |
| Versuch 2            | 24   | $1,2 \times 10^{11}$  | 50,9         |
| Vergleich Methan 2.5 | 24   | $1,26 \times 10^{11}$ | 58,3         |

#### 4.7.1.3 Biokompatibilität

Die Biokompatibilität der PHB aus diesen Versuchen wurden gezielt untersucht, da diese Voraussetzung für einen Einsatz des Polymers in der Medizin ist. Es zeigte sich, daß die untersuchten Proben keine signifikanten Unterschiede in der Biokompatibilität im Vergleich zur Referenz-PHB (aus Methan 2.5) besaßen. Damit kann von einer grundsätzlichen Eignung der PHB aus Erdgas für biomedizinische Anwendungen ausgegangen werden.

Details der Biokompatibilitätsuntersuchungen sind in Abschnitt 4.4.6.2.3 dargestellt.

## 4.7.2 ALTERNATIVE STÄMME ZUR PHB-SYNTHESE

### 4.7.2.1 Screening von methanotrophen Stämmen

Ziel dieser Untersuchungen war, das PHB-Bildungspotential weiterer methanotropher Stämme zu beurteilen und möglicherweise einen effektiveren PHB-Produzenten zu finden. Dazu wurden Schüttelkolbenversuche mit einer Versuchsdauer von 50 bis 70 h durchgeführt, abhängig vom Zeitraum bis zum Verbrauch der Stickstoffquelle. Die erzielten PHB-Gehalte der Biomasse lagen zwischen 0,7 und 30 % (Tabelle IV-50 zeigt Mittelwerte aus je drei Versuchen). Insgesamt waren die Ergebnisse der Untersuchungen in Schüttelkolben unbefriedigend, da häufig bereits Probleme in den vorgelagerten Wachstumsphasen auftraten. Diese wurden verursacht durch fehlende Meßmöglichkeiten und damit nicht optimalen Bedingungen während der Versuche (pH-Wert, Stoffübergänge für Methan und Sauerstoff). Die besten Ergebnisse bezüglich PHB-Gehalt wurden mit den Stämmen GB 4 (20,3 % PHB) und GB 12 (18,4 % PHB) erreicht. Die in Versuchen in Kleinstfermentoren (200 ml) bestimmten PHB-Gehalte waren für den Stamm GB 14 mit 34 % maximal und unabhängig von der Stickstoffquelle ( $\text{NH}_4^+$  oder  $\text{NO}_3^-$ ). Da dieser Stamm auch zum cometabolischen Abbau von Trichlorethylen (TCE) befähigt ist, ergibt sich mit der möglichen Nutzung von PHB als Reservestoff für die Lieferung von Reduktionsäquivalenten bei der Cometabolisierung ein interessanter Aspekt. Für weitere Experimente im UD 5 wurde deshalb dieser Stamm ausgewählt.

Tabelle IV-50: Charakterisierung der untersuchten methanotrophen Stämme und maximale PHB-Gehalte in Schüttelkolbenversuchen (Mittelwerte aus drei Ansätzen [KRAUSE 1998], \*Ergebnis in Kleinstfermentoren [SCHULZ 1999])

| Interne Stammbezeichnung | Typ   | sMMO | Stickstoffquelle | PHB-Gehalt [%] |
|--------------------------|-------|------|------------------|----------------|
| FI 20                    | II    | +    | $\text{NO}_3^-$  | 2,3            |
| GB 4                     | II    | -    | $\text{NH}_4^+$  | 20,3           |
| GB 21                    | II    | -    | $\text{NH}_4^+$  | 11,0           |
| GB 130                   | I     | -    | $\text{NO}_3^-$  | 0,7            |
| GB 29                    | I (X) | +    | $\text{NO}_3^-$  | 0,02           |
| GB 11                    | II    | +    | $\text{NH}_4^+$  | 8,3            |
| GB 12                    | II    | +    | $\text{NH}_4^+$  | 18,4           |
| GB 13                    | II    | +    | $\text{NH}_4^+$  | 3,5            |
| GB 14                    | II    | +    | $\text{NO}_3^-$  | 3,2            |
|                          |       |      | $\text{NO}_3^-$  | 31,3 *         |
|                          |       |      | $\text{NH}_4^+$  | 33,9 *         |
| GB 15                    | II    | +    | $\text{NO}_3^-$  | 3,2            |

#### 4.7.2.2 Orientierende Untersuchungen mit *Methylocystis* sp. GB 14

##### 4.7.2.2.1 Wachstumsprozeß

Als Impfmateriale dieser Experimente diente in Kleinstfermentoren unter sterilen Bedingungen gezüchtete Biomasse. Die weiteren Kultivierungen im UD 5 wurden unsteril durchgeführt. Über einen Zeitraum von vier Wochen etablierte sich eine Mischkultur (dominante Species *Methylocystis* sp. GB 14), die in weiterführenden Untersuchungen charakterisiert wurde [ROGGE und KLEBER 2001]. Die wichtigsten Ergebnisse waren:

- die Identifizierung der methanotrophen Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 14 über den gesamten Zeitraum (über Immunofluoreszenz)
- die Isolierung von methanolverwertenden und anderen heterotrophen Bakterien als Begleitorganismen unter selektiven Bedingungen (insgesamt fünf bis acht Species)
- die Identifizierung eines methylotrophen Isolates, das nach den Ergebnisse der RAPD-Analysen hohe Ähnlichkeit mit dem Isolat MO2 (*Methylophilus methylotrophus*) aufwies
- der Nachweis der Stabilität mittels PCR-DGGE-Analysen.

Es wurde jeweils ein Versuch mit Nitrat bzw. Ammonium als Stickstoffquelle durchgeführt. Der Wachstumsprozeß verlief für beide Bedingungen unterschiedlich. Nach Erreichen einer Biomassekonzentration von  $2 \text{ g l}^{-1}$  im *batch*-Prozeß wurde auf kontinuierliche Kultivierung mit einer Verdünnungsrate von  $D=0,05 \text{ h}^{-1}$  umgestellt. Die Anzucht mit Nitrat wurde unter diesen Bedingungen bis zu einer Biomassekonzentration von ca.  $10 \text{ g l}^{-1}$  geführt. Bei der Verwendung von Ammonium war ein deutlich besseres Wachstum zu beobachten, so daß die Verdünnungsrate schrittweise von  $D=0,05$  auf  $D=0,1$  und  $D=0,125 \text{ h}^{-1}$  erhöht werden konnte. Die maximalen Biomassekonzentrationen betragen  $22 \text{ g l}^{-1}$ . Für die Wachstumsprozesse wurden die Ausbeutekoeffizienten ermittelt (Tabelle IV-51), die bei der Nutzung von Ammonium höher waren als bei Nitratverwertung. Diese Ergebnisse stimmen mit theoretischen Betrachtungen überein, wonach bei der Verwendung von Ammonium höhere Ausbeuten der Biomassebildung erreichbar sind [ROELS 1980, HEIJNEN et al. 1992]. Die für *Methylocystis* sp. GB 14 ermittelten Werte bei der Kultivierung mit Ammonium betragen etwa 80 % der mit *Methylocystis* sp. GB 25 erreichten Ausbeuten.

Tabelle IV-51: Spezifische Ausbeutekoeffizienten und Produktivitäten der Biomassebildung mit der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 14)

| Kenngröße    | Einheit                          | GB 14                | GB 14                |
|--------------|----------------------------------|----------------------|----------------------|
|              |                                  | (NO <sub>3</sub> -N) | (NH <sub>4</sub> -N) |
| $Y_{X/O_2}$  | $\text{g g}^{-1}$                | 0,11                 | 0,17                 |
| $Y_{X/CH_4}$ | $\text{g g}^{-1}$                | 0,34                 | 0,56                 |
| $Y_{X/CO_2}$ | $\text{g g}^{-1}$                | 0,18                 | 0,36                 |
| $r_x$        | $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ | 0,52                 | 2,7                  |

#### 4.7.2.2.2 Untersuchungen zur PHB-Synthese

Nach Erreichen der angegebenen Biomassekonzentrationen wurde die PHB-Synthese durch Unterbrechung der Stickstoffversorgung eingeleitet und über 24 h geführt.

In Tabelle IV-52 sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefaßt, der zeitliche Verlauf der wichtigsten Kenngrößen in den Abbildungen 4-66 und 4-67 dargestellt. Die maximalen PHB-Gehalte waren 22,6 % für Nitrat- und 32,9 % für Ammoniumstickstoffmangel. Die Gesamtbiomassekonzentrationen unterschieden sich auf Grund der vorhergehenden Wachstumsprozesse beträchtlich. Auffallend ist die in beiden Varianten starke Bildung von extrazellulären Stoffwechselprodukten ( $F_{CSB/X}$ ).

Tabelle IV-52: Ergebnisse der PHB-Synthese mit *Methylocystis* sp. GB 14 unter Stickstoffmangel

| Kenngröße    | Einheit                         | Zeit | GB 14                | GB 14                |
|--------------|---------------------------------|------|----------------------|----------------------|
|              |                                 | [h]  | (NO <sub>3</sub> -N) | (NH <sub>4</sub> -N) |
| $c_X$        | g l <sup>-1</sup>               | 0    | 10,4                 | 22,5                 |
|              |                                 | 12   | 16,1                 | 33,5                 |
|              |                                 | 24   | 18,7                 | 37,1                 |
| PHB-Gehalt   | %                               | 0    | 3,0                  | 0,54                 |
|              |                                 | 12   | 21,0                 | 27,3                 |
|              |                                 | 24   | 22,6                 | 32,9                 |
| $F_{CSB/X}$  | mg gX <sup>-1</sup>             | 0    | 98,5                 | 51,1                 |
|              |                                 | 12   | 80,7                 | 57,2                 |
|              |                                 | 24   | 83,0                 | 60,6                 |
| $\eta_{kin}$ | mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> | 0    | 0,98                 | 1,63                 |
|              |                                 | 12   | 1,06                 | 2,23                 |
|              |                                 | 24   | 1,09                 | 2,41                 |

Die mittleren und maximalen spezifischen PHB-Bildungsraten unterschieden sich nicht wesentlich für beide Stickstoffquellen. Die wesentlich höhere Produktivität bei Ammoniumstickstoffmangel ist vor allem auf den Einfluß der Biomassekonzentration zurückzuführen. Zahlenwerte für die spezifischen Ausbeutekoeffizienten der PHB-Synthese können auf Grund von deutlichen Abweichungen in der Kohlenstoffbilanz ( $\Delta C > 35\%$ ) nicht angegeben werden.

Tabelle IV-53: Spezifische Bildungsraten der PHB-Synthese mit *Methylocystis* sp. GB 14

| Kenngröße | Einheit                            |         | GB 14                | GB 14                |
|-----------|------------------------------------|---------|----------------------|----------------------|
|           |                                    |         | (NO <sub>3</sub> -N) | (NH <sub>4</sub> -N) |
| $q_{PHB}$ | g gR <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> | Maximum | 0,043                | 0,046                |
|           |                                    | 0-24 h  | 0,014                | 0,02                 |
| $r_{PHB}$ | g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>  | Maximum | 0,52                 | 1,1                  |
|           |                                    | 0-24 h  | 0,19                 | 0,5                  |

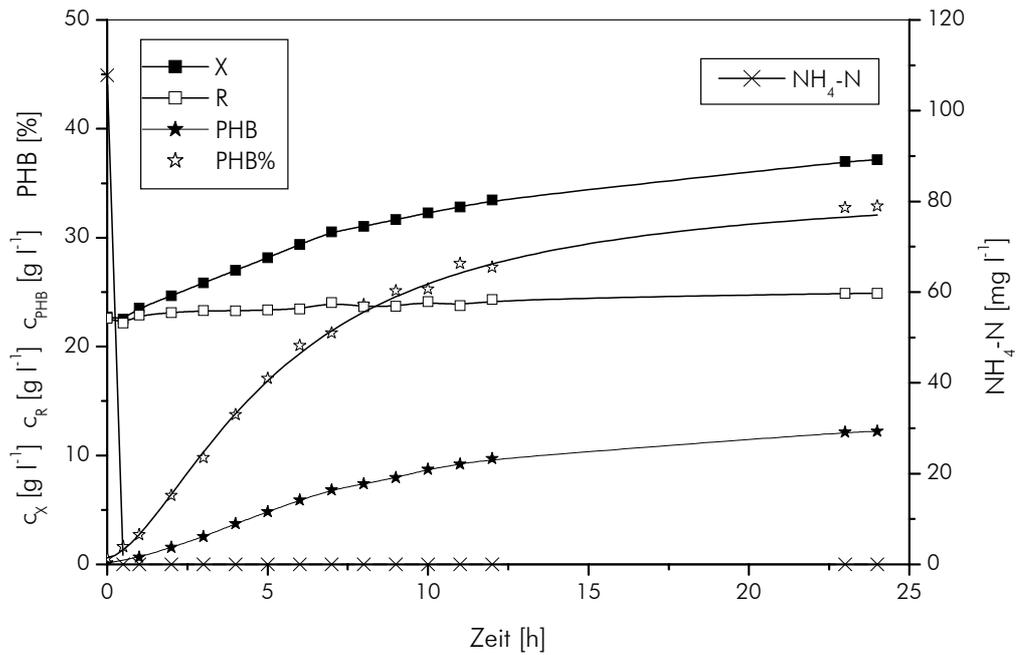


Abb. 4-66: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Gesamtbiomasse (■), Restbiomasse (□), PHB (★) und Ammoniumstickstoff (×) sowie des PHB-Gehaltes der Biomasse (☆) während der PHB-Synthese mit *Methylocystis* sp. GB 14 (Wachstum auf  $NH_4^+$ , UD 5)

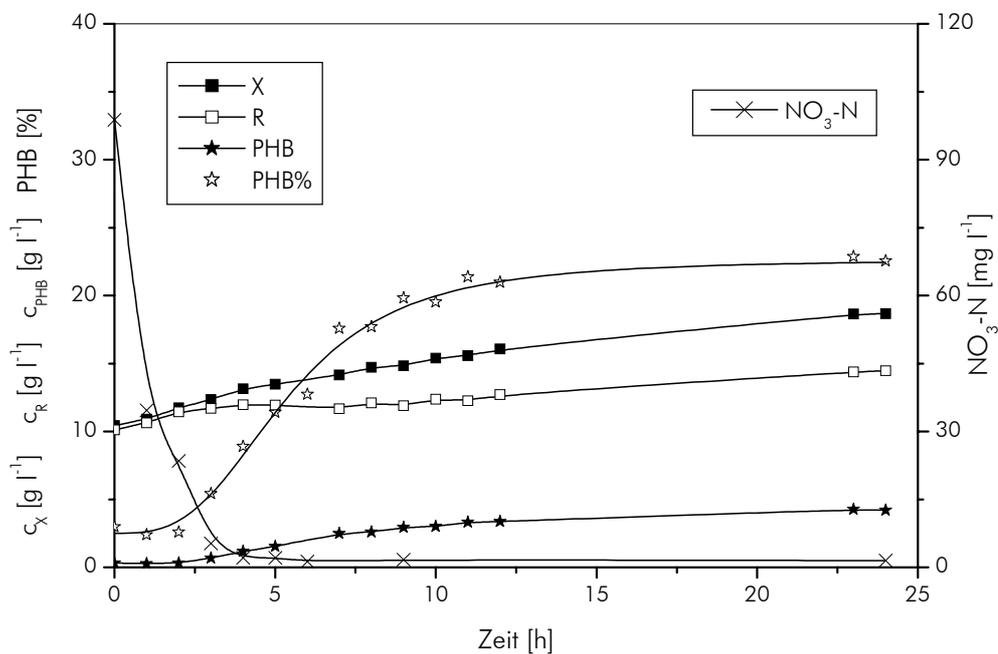


Abb. 4-67: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Gesamtbiomasse (■), Restbiomasse (□), PHB (★) und Nitratstickstoff (×) sowie des PHB-Gehaltes der Biomasse (☆) während der PHB-Synthese mit *Methylocystis* sp. GB 14 (Wachstum mit  $NO_3^-$ , UD 5)

Das in beiden Versuchen gebildete Polymer wurde hinsichtlich des Molekulargewichtes charakterisiert (Tabelle IV-54). Die PHB (unter Ammoniummangel) war nach 24 h durch ein mittleres Molekulargewicht von  $1,5 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  (GPC) bzw.  $0,88 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  (viskosimetrisch bestimmt) und eine Uneinheitlichkeit von 3,2 gekennzeichnet. In dem Prozeß unter Nitratmangel wurden nach 12 h dem Prozeß unter Ammoniummangel vergleichbare Werte erreicht. In der zweiten Phase erfolgte jedoch eine Abnahme des Molekulargewichtes, verbunden mit gleichzeitiger Zunahme der Uneinheitlichkeit. Dies war anhand der ermittelten Parameter und in den betrachteten Zeiträumen nicht zu erklären, da der PHB-Gehalt in der Biomasse unverändert blieb.

Das von *Methylocystis* sp. GB 14 gebildete Polymer war insgesamt durch niedrigere mittlere Molekulargewichte und höhere Uneinheitlichkeiten charakterisiert als das von *Methylocystis* sp. GB 25 synthetisierte.

Tabelle IV-54: Kennziffern zur Charakterisierung des gebildeten Polymers

| Kenngröße   | Einheit             | Zeit | GB 14                | GB 14                |
|-------------|---------------------|------|----------------------|----------------------|
|             |                     | [h]  | (NO <sub>3</sub> -N) | (NH <sub>4</sub> -N) |
| $\bar{M}_v$ | g mol <sup>-1</sup> | 12   | 853 000              | 863 000              |
|             |                     | 24   | 797 000              | 883 000              |
| $\bar{M}_w$ | g mol <sup>-1</sup> | 2    | n.b.                 | 953 000              |
|             |                     | 12   | 1 540 000            | 1 470 000            |
|             |                     | 24   | 1 380 000            | 1 550 000            |
| U           |                     | 2    | n.b.                 | 6,27                 |
|             |                     | 12   | 3,79                 | 3,74                 |
|             |                     | 24   | 6,67                 | 3,21                 |

## 5 DISKUSSION

In diesem Kapitel werden nur die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit diskutiert. Auf die relevanten Abschnitte der theoretischen Betrachtungen und der Ergebnisse, auf die die Diskussion Bezug nimmt, wird der Übersichtlichkeit halber am Beginn jedes Abschnittes mit → verwiesen.

### 5.1 Wachstumsprozesse

#### 5.1.1 PRODUKTIVITÄTEN UND AUSBEUTEN

##### → Kapitel 2.2.3.1, Kapitel 4.3.1 bis 4.3.3

Für die Anzucht der methanotrophen Mischkultur als Impfmateriale wurde eine kontinuierliche *chemostat*-Kultivierung ( $D = 0,167 \text{ h}^{-1}$ , als Ergebnis von Voruntersuchungen festgelegt) unter Sauerstofflimitation genutzt, die in Abhängigkeit vom verwendeten Bioreaktor (d.h. den entsprechenden Stoffübergangsraten) das Erreichen einer maximalen Biomassekonzentration von 15,5 (UD 5) bzw. 18,2  $\text{g l}^{-1}$  (UD 50) und Produktivitäten von 2,5 bzw. 3,1  $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erlaubte. Das Impfmateriale konnte bis zu drei Monate bei 4 °C gelagert und eingesetzt werden, ohne daß eine *lag*-Phase und Änderungen in der Zusammensetzung auftraten. In Vorbereitung der PHB-Prozesse wurden die Wachstumsprozesse unter Druck durchgeführt ( $p \leq 4500 \text{ mbar}$ ), um die Stoffübergänge für Methan und Sauerstoff zu steigern und damit eine Erhöhung von Biomassekonzentration und Produktivität zu realisieren. Die maximal erreichten Produktivitäten waren  $r_x = 4,77 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (UD 5,  $p = 4500 \text{ mbar}$ ) und  $5,03 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (UD 50,  $p = 3750 \text{ mbar}$ ). Diese Werte sind mit denen vergleichbar, die in der Literatur für Prozesse mit methanotrophen Bakterien (Tabelle V-1) angegeben werden.

Tabelle V-1: Übersicht über erreichte Biomassekonzentrationen und Produktivitäten in Wachstumsprozessen mit methanotrophen Bakterien (MK-Mischkultur)

| Organismus   | Bedingungen                 | Druck | $c_x$                 | $r_x$                            |
|--|-----------------------------|-------|-----------------------|----------------------------------|
| [Quelle]   |                             | mbar  | [ $\text{g l}^{-1}$ ] | $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ |
| <i>Methylococcus capsulatus</i><br>[SHEEHAN und JOHNSON 1971]  | CH <sub>4</sub> -Limitation | k.A.  | 11,74                 | 1,81                             |
|  | O <sub>2</sub> -Limitation  | k.A.  | 8,75                  | 1,67                             |
| <i>Methylococcus capsulatus</i> (MK)<br>[FAUST 1987]           | k.A.                        |       | 25                    | 7,5                              |
| <i>Methylococcus capsulatus</i> (MK)<br>[NORFERM 2001]         | k.A.                        |       | 20                    | k.A.                             |
| <i>Methylocystis</i> sp. GB 21 (MK)<br>[PÖHLAND et al. 1992]   | O <sub>2</sub> -Limitation  | 7000  | 54,1                  | 9,03                             |
|  | O <sub>2</sub> -Limitation  | 4000  | 18,6                  | 3,11                             |
| <i>Methylocystis</i> sp. GB 25 (MK)<br>[WENDLANDT et al. 1993] | O <sub>2</sub> -Limitation  | 3000  | 35,0                  | 4,2                              |
| <i>Methylocystis</i> sp. GB 25 (MK)<br>[WAGLER et al. 1983]    | k.A.                        |       | 10000                 | 75,2                             |
| <i>Methylocystis</i> sp. GB 25 (MK)<br>[diese Arbeit]          | O <sub>2</sub> -Limitation  | 3750  | 30,1                  | 5,03                             |

Bei dem Vergleich ist jedoch die Abhängigkeit der Produktivität von den erreichbaren (Sauerstoff-)Übergangsraten zu beachten. Dies zeigt beispielhaft die lineare Abhängigkeit der Produktivität vom Systemdruck unter gegebenen Bedingungen eines spezifischen Bioreaktors mit einem Maximalwert von  $9 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bei 6500–7000 mbar [PÖHLAND et al. 1992]. Die Stoffübergangsraten für Sauerstoff und Methan sind entscheidende Einflußfaktoren bei der Kultivierung methanotropher Bakterien.

Die ermittelten Ausbeutekoeffizienten für die Bildung von Biomasse bezogen auf Sauerstoff und Methan betragen bei Standardfermentationsbedingungen (siehe Kapitel 3.1.3.1 bzw. 3.1.3.2)  $Y_{X/CH_4} = 0,63 \text{ g g}^{-1}$  bzw.  $Y_{X/O_2} = 0,2 \text{ g g}^{-1}$  und waren damit ca. 15 bzw. 10 % niedriger als in früheren Untersuchungen mit der Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) [SCHNEIDER et al. 1983]. Sie ordnen sich jedoch in den Bereich der Ausbeuten methanotropher Bakterien ein:  $Y_{X/CH_4} = 0,4\text{--}0,99$  bzw.  $Y_{X/O_2} = 0,18\text{--}0,4 \text{ g g}^{-1}$  [LEAK und DALTON 1986a, 1986b, VARY und JOHNSON 1967] (siehe auch Tabelle II-11). Dieser weite Bereich, und damit möglicherweise auch die Abweichung von früheren Werten, ist mit der Vielzahl von Einflußfaktoren zu erklären, wie z.B. Art der Stickstoffquelle, Ausbildung von pMMO oder sMMO, Weg der Kohlenstoffassimilation, Kultivierungsbedingungen (Wachstumsrate, limitierendes Substrat bzw. Verhältnis  $\gamma_{CH_4/O_2}$  im Eingangsgas, Temperatur, pH-Wert u.a.). Die Abhängigkeit der spezifischen Ausbeutekoeffizienten von der Durchflußrate wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht (chemostatische Kultivierung unter Sauerstofflimitation): Mit Verringerung der Wachstumsrate erniedrigte sich auch die gebildete Menge Biomasse pro Gramm verbrauchten Substrates. Dieser Zusammenhang wird durch den mit sinkender Wachstumsrate ansteigenden Anteil des Erhaltungsstoffwechsels am Gesamtsubstratverbrauch bestimmt und durch Gleichung 4.1 (siehe Kapitel 4.3.1) beschrieben [BERGTER 1983]. Die „wahren“ Ausbeutekoeffizienten  $Y_{EW}$  stellen hier theoretische Maximalwerte für die Bildung von Biomasse unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels dar. Dieses Konzept fand breite Anwendung bei der Bestimmung von Ausbeutekoeffizienten in mikrobiellen Wachstumsprozessen [RUSSEL und COOK 1995, NIELSEN 2001]. In jüngerer Zeit wurde alternativ ein allgemeingültiger, species-unabhängiger Ansatz, der sich lediglich aus thermodynamischen Merkmalen der Substrate ableitet [HARDER 1997, VON STOCKAR und LIU 1999], aber auch neue Modelle zur Bewertung der Erhaltungsenergie unter Bedingungen extrem niedriger Substratkonzentrationen oder bei toxischen Substraten (z.B. bei Schadstoffen in Umweltproben) diskutiert [MÜLLER und BABEL 1996].

In Tabelle V-2 sind die in dieser Arbeit ermittelten Ausbeuten und Erhaltungsterme Ergebnissen früherer Untersuchungen, die mit der Zielstellung SCP-Produktion durchgeführt wurden, gegenübergestellt. Die erzielten Ergebnisse stimmen bezüglich der „wahren“ Ausbeuten mit den früheren Werten der Mischkultur GB 25 überein, die Erhaltungsterme sind jedoch höher. Bei diesem Vergleich muß die Abhängigkeit der (Gesamt-) Ausbeuten von der Zusammensetzung des Eingangsgases berücksichtigt werden, wonach das optimale Verhältnis von Methan und Sauerstoff nach Gleichung 5.1 von den spezifischen Ausbeutekoeffizienten, den Stoffübergangswerten ( $k_L a$ -Werten) und der Löslichkeit (Henry-Konstanten) beider Gase bestimmt wird [PÖHLAND et al. 1992].

**Tabelle V-2:** Vergleich von spezifischen Ausbeutekoeffizienten und Termen des Erhaltungsstoffwechsels für die Biomassebildung von methanotrophen Bakterien

| Untersuchter Stamm   | CH <sub>4</sub>   |                                   |                                   | O <sub>2</sub>  |                                  |                                   |
|--|---|-----------------------------------|-----------------------------------|---|----------------------------------|-----------------------------------|
|  | Y <sub>X/CH<sub>4</sub></sub><br>(D=0,167 h <sup>-1</sup> ) | Y <sub>EW, X/CH<sub>4</sub></sub> | w <sub>CH<sub>4</sub></sub>       | Y <sub>X/O<sub>2</sub></sub><br>(D=0,167h <sup>-1</sup> ) | Y <sub>EW, X/O<sub>2</sub></sub> | w <sub>O<sub>2</sub></sub>        |
| [Quelle]   | g g <sup>-1</sup>   | g g <sup>-1</sup>                 | g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> | g g <sup>-1</sup>   | g g <sup>-1</sup>                | g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> |
| <i>Methylocystis</i> sp. GB 21 (MK)<br>[PÖHLAND et al. 1992]   | 0,71  | 0,80                              | 0,026                             | 0,23  | 0,30                             | 0,220                             |
| <i>Methylocystis</i> sp. GB 25 (MK)<br>[SCHNEIDER et al. 1983] | 0,80  | 1,04                              | 0,048                             | 0,30  | 0,38                             | 0,117                             |
| <i>Methylocystis</i> sp. GB 25 (MK)<br>[diese Arbeit]          | 0,61  | 0,79                              | 0,065                             | 0,20  | 0,28                             | 0,203                             |

Gleichung 5.1 ergibt für das Verhältnis von Methan und Sauerstoff im Eingangsgas einen Wert von 0,73, bei dem die Ausbeuten der Biomassebildung maximal sind. Für Werte unter bzw. über 0,73 limitieren entsprechend Methan bzw. Sauerstoff das Wachstum und die Ausbeuten sinken. Dabei sind die Einbußen unter Methanmangel höher als unter Sauerstoffmangel [PÖHLAND et al. 1992]. In Experimenten von WENDLANDT (1979) wurde (ohne Berücksichtigung der Henry-Konstanten) ein optimales Verhältnis von  $\gamma_{\text{CH}_4/\text{O}_2, \text{opt.}} = 0,88$  ermittelt.

$$\gamma_{\text{CH}_4/\text{O}_2, \text{opt.}} = \frac{F_{\text{G,CH}_4,0}}{F_{\text{G,O}_2,0}} = \frac{Y_{\text{X/O}_2} \cdot K_{\text{H,O}_2} \cdot k_{\text{L}} a_{\text{O}_2}}{Y_{\text{X/CH}_4} \cdot K_{\text{H,CH}_4} \cdot k_{\text{L}} a_{\text{CH}_4}} = 0,73 \quad (5.1)$$

Die hier dargestellten Untersuchungen wurden mit einem Verhältnis  $\gamma_{\text{CH}_4/\text{O}_2} = 1,35-1,45$  durchgeführt. Vergleicht man die Ausbeutekoeffizienten (errechnet auf der Basis einer von PÖHLAND gefundenen Beziehung<sup>1</sup>) für  $\gamma_{\text{CH}_4/\text{O}_2} = 0,73$  und  $\gamma_{\text{CH}_4/\text{O}_2} = 1,4$  ergeben sich Unterschiede von 15 % bzw. 10 % für Sauerstoff bzw. Methan. Übertragen auf die erzielten Ergebnisse, kann damit eine gute Übereinstimmung mit den Resultaten früherer Untersuchungen mit der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) festgestellt werden, das heißt, die Leistungsfähigkeit der Mischkultur blieb über Jahre unverändert. Zudem sind die Ausbeuten und Produktivitäten mit denen bekannter Verfahren vergleichbar (siehe Tabelle V-1), so daß in dieser Hinsicht das in dieser Arbeit untersuchte System und die entsprechenden Parameter Grundlage für die Erarbeitung eines Verfahrens zur Gewinnung von PHB aus Methan sein können.

### 5.1.2 ZUSAMMENSETZUNG DER BIOMASSE

#### → Kapitel 4.3.4.1

Die Zusammensetzung der Biomasse während der Wachstumsprozesse (CH<sub>1,77</sub>N<sub>0,21</sub>O<sub>0,48</sub>) stimmt gut mit anderen Angaben für methanotrophe Mischkulturen überein und entspricht außerdem einem Wert, der durchschnittliche bakterielle Biomasse charakterisiert (Tabelle V-3).

<sup>1</sup>  $Y_{\text{O}_2/\text{X}} = 2,64 + 0,784 \times \gamma_{\text{CH}_4/\text{O}_2}$  bzw.  $Y_{\text{CH}_4/\text{X}} = 0,773 + 0,369 \times \gamma_{\text{CH}_4/\text{O}_2}$  [PÖHLAND et al. 1992]

Tabelle V-3: Vergleich der Zusammensetzung bakterieller Biomasse (MK-Mischkultur)

| Organismus                          | Zusammensetzung  | Quelle                |
|-------------------------------------|--|-----------------------|
| <i>Methylocystis</i> sp. GB 21 (MK) | CH <sub>1,79</sub> N <sub>0,19</sub> O <sub>0,47</sub> | WENDLANDT 1979        |
| <i>Methylocystis</i> sp. GB 4 (MK)  | CH <sub>1,65</sub> N <sub>0,19</sub> O <sub>0,53</sub> | WENDLANDT 1979        |
| <i>Methylomomas</i> sp. (MK)        | CH <sub>1,65</sub> N <sub>0,14</sub> O <sub>0,48</sub> | WILKINSON et al. 1974 |
| bakterielle Biomasse                | CH <sub>1,79</sub> N <sub>0,2</sub> O <sub>0,5</sub>   | ROELS 1980            |

Der in den eigenen Untersuchungen auch im Wachstumsprozeß stets vorhandene geringe Anteil an PHB kann mit Befunden erklärt werden, wonach PHB niedriger Kettenlänge in komplexen Verbindungen mit Proteinen oder mit Calcium und Polyphosphat (sog. *complexed*-c-PHB) Bestandteil von Ionenkanälen in Membranen ist [REUSCH 1992, REUSCH 1995].

### 5.1.3 PROBLEMATIK DER BILDUNG VON NITRAT UND NITRIT IN DER KULTURFLÜSSIGKEIT

#### → Kapitel 4.3.4.2.1

Die Relevanz der Fragestellung der Nitrat- und Nitritbildung leitet sich aus der vielfach beschriebenen Inhibierung der Methanoxidation durch verschiedene Stickstoffverbindungen ab [CARLSEN et al. 1991, YOSHINARI 1985, KING und SCHNELL 1994, DUNFIELD und KNOWLES 1995, CHU und ALVAREZ-COHEN 1998, 1999, YE und THOMAS 2001]. Die Fähigkeit von Methanotrophen zur Ammoniumoxidation ist bekannt [O'NEILL und WILKINSON 1977, YOSHINARI 1985, BEDARD und KNOWLES 1989, CARLSEN et al. 1991]. Sie erfolgt in zwei Schritten: 1) Oxidation von Ammonium zu Hydroxylamin, katalysiert durch die Methan-Monooxygenase (MMO), und 2) Bildung von Nitrit durch eine spezifische Hydroxylamin-Oxidoreduktase (HAO) [BEDARD und KNOWLES 1989, BOTHE et al. 2000].

Die Kulturflüssigkeit wurde hinsichtlich der Einflußfaktoren für das Auftreten von Nitrat und Nitrit nicht systematisch untersucht. Unter normalen Wachstumsbedingungen, also bei einer Ammoniumkonzentration von 60–100 mg l<sup>-1</sup>, wurden jedoch stets Nitrat- und in den meisten Fällen Nitriten im Medium nachgewiesen. Eine mittlere Konzentration im *steady state* von ≈ 80 mg l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (siehe Tabelle IV-10) entsprach einer Bildungsrate von  $r_{\text{NO}_3} = 13,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bzw.  $q_{\text{NO}_3} = 0,7\text{--}0,9 \text{ mg g X}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Für *Methylosinus trichosporium* OB3b und *Methylomonas albus* BG8 werden Angaben für die Bildung von Nitrit in einem Bereich von  $q_{\text{NO}_2} = 1,86\text{--}14,88 \text{ mg g X}^{-1} \text{ h}^{-1}$  gemacht [O'NEILL und WILKINSON 1977].

Zwar wurde für die untersuchte Mischkultur in dieser Arbeit nicht explizit gezeigt, daß die Ammoniumoxidation durch die methanotrophe Hauptkomponente und speziell durch die MMO verursacht wird, aber unter Berücksichtigung der Literaturangaben ist die Nitritbildung mit einer Co-Metabolisierung durch die MMO zu erklären. Dieser Prozeß steht dabei nicht im Widerspruch zur deutlich höheren Spezifität des Enzyms für Methan gegenüber Ammoniak, wenn man die vergleichsweise hohe Ammoniumionenkonzentration (etwa 20fach gegenüber Methan) in Betracht zieht. Es zeigte sich weiterhin ein deutlicher Zusammenhang zwischen den Ammonium- und Nitratkonzentrationen im Medium – je höher die Konzentration von Ammonium war, um so mehr Nitrat und z.T. Nitrit wurde nachgewiesen. Die Konzentration von Nitrit

war im Vergleich zu Nitrat generell sehr niedrig, das entstehende Nitrit wurde offenbar unmittelbar weiter oxidiert. Ähnliche Ergebnisse werden für *transient*-Experimente bei stickstofflimitierter Chemostatkultivierung einer *Methylococcus capsulatus*-Mischkultur beschrieben [FURIGO und JORGENSEN 1993]. Nach einmaliger Zugabe von Ammoniumsulfat zur Einstellung von Ammoniumkonzentrationen von 255, 340 und 425 mg l<sup>-1</sup> wurden entsprechend höhere maximale Nitrat- und Nitritkonzentrationen ermittelt (jeweils ca. 10 % und 2 % des Stickstoffs im Ammoniak). Es wurde gefunden, daß maximal 5 % der MMO-Aktivität zur Oxidation von Ammonium verwendet werden und keine Inhibierung der MMO für Ammoniumkonzentrationen bis 425 mg l<sup>-1</sup> bzw. Nitrat bis 310 mg l<sup>-1</sup> und Nitrit bis 230 mg l<sup>-1</sup> auftritt (für Nitrit lagen die maximal gemessenen Konzentration allerdings nur bei 10 % dieses Wertes). Ungeklärt bleibt, ob auch der zweite Schritt der Ammoniakoxidation, die Bildung von Nitrat aus Nitrit, tatsächlich durch die methanotrophe Komponente bewirkt wird.

Gegen diese Vermutung spricht die allgemein anerkannte Auffassung, nach der an der Gesamtreaktion (Nitrifikation), die die Bildung von Nitrat aus Ammonium über Nitrit zusammengefaßt, zwei Organismengruppen in zwei Teilreaktionen beteiligt sind:

| Teilreaktion   | Organismengruppe  | Vertreter (Gattungen)                     |
|--|-------------------|---|
| Nitritifikation<br>$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ | Ammoniumoxidierer | <i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosospira</i> |
| Nitratifikation<br>$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ | Nitritoxidierer   | <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrospira</i>    |

Diese These stützen auch jüngere Veröffentlichungen, wonach Ammoniumoxidierer nicht zur Nitritoxidation fähig sind [HORZ 2000, BOTHE et al. 2000]. Die beobachtete Nitratbildung ließe sich somit durch die Beteiligung nitritoxidierender Begleitorganismen erklären, was in Übereinstimmung mit Untersuchungen der Methan- und Ammoniumoxidation in Reis-Mikrokosmen steht, wonach eine erhöhte Anzahl nitritoxidierender Organismen im Zusammenhang mit hoher Aktivität methanotropher Bakterien beobachtet wurde [BODELIER et al. 2000b]. Die Anwesenheit von Nitritoxidierern in der hier untersuchten Mischkultur ist allerdings unwahrscheinlich, da diese durch sehr geringe Wachstumsraten gekennzeichnet sind und sich bei einer Verdünnungsrate  $D=0,167 \text{ h}^{-1}$  nicht etablieren könnten. Die nichtenzymatische Umsetzung von Nitrit zu Nitrat unter den gegebenen Bedingungen ist fragwürdig [IGNARRO et al. 1993]. Auch bei der Chemodenitrifikation entsteht kein Nitrat, sondern es werden gasförmige Produkte ( $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$ ) gebildet [KAPPELMEYER et al. 2001].

Für die prinzipielle Fähigkeit der Methanotrophen zur Nitritoxidation sprechen Untersuchungen mit drei methanotrophen Reinkulturen. Bei Einsatz von Ammoniak als Stickstoffquelle (158 mg l<sup>-1</sup>) wurden geringe Konzentrationen an Nitrat (0,01–0,07 mg l<sup>-1</sup>) im Medium nachgewiesen, bevorzugt bei Inkubation unter Methanmangel [REN et al. 2000b].

Die Wechselwirkungen zwischen Methan- und Ammoniumoxidation fanden in den letzten Jahren im Zusammenhang mit der ökologischen Bewertung der globalen Methanemissionen aus Böden, Reisfeldern und Feuchtgebieten verstärkt Beachtung [SCHNELL und KING 1994, DUNFIELD und KNOWLES 1995, CAI und YAN 1999, BOTHE et al. 2000, CAI und MOSIER 2000, VAN BODEGOM et al. 2001].

Prinzipiell ist die Möglichkeit der Inhibierung der Methanoxidation durch Ammonium und Nitrit unter bestimmten Bedingungen, insbesondere in Abhängigkeit von der Methankonzentration, gegeben [KING und SCHNELL 1994]. Während der Kultivierungen für diese Arbeit wurden Effekte abnehmender Aktivität wie ansteigende Gelöstsauerstoffkonzentration und verminderter Sauerstoffverbrauch beobachtet, wenn die Ammoniumstickstoffkonzentration über  $120 \text{ mg l}^{-1}$  anstieg. Dabei ist nicht klar, ob diese Wirkung von den Ammoniumionen selbst oder den gebildeten Nitrat- bzw. Nitriten ausgeht. Deshalb sollte bei der Kultivierung die  $\text{NH}_4^+$ -N-Konzentration Werte von  $100 \text{ mg l}^{-1}$  nicht übersteigen, bei *online*-Messung und Regelung (z.B. über FIA-Analysen) ist ein Bereich von Wert von  $70 \pm 10 \text{ mg l}^{-1}$  anzustreben.

## 5.2 PHB-Synthese

### 5.2.1 PHB-GEHALT

#### → Kapitel 4.4.3.1 und 4.4.3.2, Kapitel 4.4.3.4.1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PHB-Synthese unter Ammoniumstickstoff-, Phosphat-, Kalium-, Magnesium-, Sulfat-, Eisen- und Manganmangel untersucht. Die optimalen Bedingungen bezüglich pH-Wert, Gelöstsauerstoffkonzentration und Betriebsweise für diese Versuche wurden in Voruntersuchungen ermittelt.

Die erreichten PHB-Gehalte betragen maximal 50 % in Prozessen unter Ammoniumstickstoffmangel und Phosphatmangel, die im Mittel durch gleiche PHB-Gehalte von 46–47 % gekennzeichnet waren. Die weiterhin untersuchten Bedingungen führten zu niedrigeren PHB-Gehalten, wobei unter Eisenmangel mit 11 % die geringste Akkumulation erfolgte.

Erklärungen für die Abhängigkeit der PHB-Bildung von Mangelbedingungen könnten mit Hilfe der Cofaktorabhängigkeiten und Regulationsmechanismen von Enzymen der PHB-Synthese gegeben werden. Gemeinsam für alle Bedingungen ist, daß unter dem Aspekt des zellulären Energiehaushaltes die Synthese von PHB im sog. *overflow*-Metabolismus unter Nährsalzmangel- und Kohlenstoffüberschußbedingungen zu einem stabileren Zustand für die Mikroorganismen führt. Da jedoch für methanotrophe Bakterien die Enzyme der PHB-Synthese bisher nicht charakterisiert wurden, können die gefundenen Differenzen in den Maximalwerten nur teilweise erklärt werden.

Die niedrige PHB-Bildung unter Eisenmangel ist plausibel, da u.a. Einfluß auf das Schlüsselenzym der Methanoxidation und andere cytochromhaltige Enzymsysteme besteht. Unter den Versuchsbedingungen ist bei einer Kupferkonzentration von  $> 0,2 \text{ mg l}^{-1}$  im Medium von der Expressierung der partikulären MMO auszugehen<sup>1</sup> [COOK und SHIEMKE 1996, HANSON und HANSON 1996, MURRELL et al. 2000]. Die Proteine des aktiven Zentrums der pMMO enthalten neben Kupfer- auch Eisenionen [ZAHN und DI SPIRITO 1996] und beide sind für die volle Aktivität des Enzyms essentiell [TAKEGUCHI et al. 1999]. Defizite in der Eisenversorgung führen daher zu einer verminderten Aktivität der MMO und damit einer Beeinträchtigung aller nachfolgenden Reaktionen.

---

<sup>1</sup> Von ausgewählten Proben wurden PCR-Analysen mit sMMO-spezifischen Primern durchgeführt, bei denen keine Produkte nachgewiesen werden konnten.

Auch Magnesium ist ein wichtiger Cofaktor vieler Enzyme. Eine mögliche Auswirkung kann Magnesiummangel auf die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase (ein Enzym des TCA-Zyklus) haben, das bei *Methylocystis* sp. GB 25 nachgewiesen wurde [GROBE 1998]. Über den TCA-Zyklus kann NAD(P)H für die (i.d.R. NAD(P)H-abhängige) Acetoacetyl-CoA-Reductase im zweiten Schritt der PHB-Synthese (siehe auch Abb. 2-4) regeneriert werden, wie es u.a. für *M. rhodesianum*, ein methylotrophes Bakterium mit Stoffwechsel über den Serin-Weg, nachgewiesen wurde. Gleichzeitig fand man dort jedoch auch eine alternative NADH-abhängige Reaktion zu (D)-Hydroxybutyryl-CoA über (L)-Hydroxybutyryl-CoA [MOTHES 1997]. Dies wird als mögliche Besonderheit bei der PHB-Synthese von C1-Verwertern angesehen [BABEL 1992, BREUER et al. 1995, TROTSENKO und BELOVA 2001]. Wie bereits erwähnt, sind diese Details für *Methylocystis* sp. GB 25 nicht bekannt, aber das geringe Ausmaß der PHB-Synthese unter Magnesiummangel könnte durch den erstgenannten Mechanismus verursacht werden.

Kaliummangel könnte infolge der Störung des für den osmotischen Druck essentiellen Konzentrationsgradienten zwischen Zellinnerem und Medium zu intrazellulären Kaliumverlusten führen und zahlreiche Vorgänge und Reaktionen, denkbar wären z.B. Transportprozesse durch die Zellwand, beeinträchtigen, die sowohl für Wachstum als auch die PHB-Synthese wichtig sind. Für diese Vermutung spricht die Tatsache, daß in der zweiten Phase der Versuche ein erneutes Ansteigen der Kaliumionenkonzentration im Medium bis zu Konzentrationen der normalen Anzuchtprozesse ( $c_{K,L}/Y_{K/X}=3-5 \text{ gX l}^{-1}$ ) verzeichnet wurde, jedoch kein erneutes Wachstum erfolgte.

Eine wichtige Schlußfolgerung aus den durchgeführten Experimenten ist, daß für das Erreichen maximaler PHB-Gehalte, z.B. in Prozessen unter Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel, die Bereitstellung von Eisen, Magnesium und Kalium gewährleistet werden muß, wohingegen die Manganversorgung unproblematisch zu sein scheint.

Auch der zeitliche Verlauf der PHB-Bildung unterschied sich unter verschiedenen Mangelbedingungen. Für Mangel an Kationen ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) wurde nach Initiierung der PHB-Synthese sehr schnell der Anteil des Polymers an der Biomasse vergrößert. Bezogen auf die Endwerte waren bereits nach 5–6 h (abhängig von der Konzentration zum Startzeitpunkt der Experimente) 75 % des Endwertes erreicht, die weitere Zunahme verlief langsamer und in der zweiten Hälfte (12–24 h) wurden nur noch minimale Änderungen registriert. Unter Mangelbedingungen für Anionen ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) waren die Zeiträume für die Akkumulation von 75 % des Endwertes wesentlich länger (10–12 h). Die PHB-Synthese dauerte bis zum Ende der Experimente an. Von Einfluß waren dabei die Restkonzentrationen beim Start der Prozesse und die sich daraus ergebenden Startzeitpunkte der PHB-Synthese. Hier wurden für fast alle Bedingungen (Ausnahmen  $\text{NH}_4^+$  mit  $t < 0,5 \text{ h}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  mit  $t > 12 \text{ h}$ ) Zeiträume von 1–3 h beobachtet. Unter den untersuchten Ionen bildete Mangan eine Ausnahme. Hier waren die Zeiträume bis zur Initiierung der PHB-Synthese außergewöhnlich lang (ca. 12 h), so daß die Maximalwerte vermutlich erst lange nach Ablauf der Versuchszeit ( $t > 24 \text{ h}$ ) erreicht wurden. Genauere Untersuchungen (über einen längeren Zeitraum) sind hier jedoch kaum notwendig, da nicht zu erwarten ist, daß dieser langsame Prozeß mit den favorisierten Stickstoff- und Phosphatmangel-Varianten konkurrieren könnte.

Für die Initiierung der PHB-Synthese war nur unter Ammoniumstickstoff-, Phosphat- und Sulfatmangel eine vollständige Abwesenheit der entsprechenden Ionen im Medium notwendig. Für die weiteren Prozesse war das Unterschreiten einer kritischen Konzentration ausreichend, für Kalium beispielsweise  $17 \text{ mg l}^{-1}$ , d.h. einem Überschuß im Medium ( $c_{K,L}/Y_{K/X}$ ) der theoretisch noch ausreichend für die Bildung von  $3 \text{ g X l}^{-1}$  war. Dieser Effekt war bei Kaliummangel besonders ausgeprägt und wurde auch von anderen Autoren beobachtet [KIM et al. 1996b, STEINBÜCHEL und SCHLEGEL 1989]. So wird für *Methylobacterium organophilum* (Substrat: Methanol) ein Schwellenwert von  $24 \text{ mg K}^+ \text{ l}^{-1}$  angegeben [KIM et al. 1998].

**Tabelle V-4:** Normierte Konzentrationen zur Initiierung der PHB-Synthese in der methanverwertenden Mischkultur GB 25  
 (\* Endwert nach 24 h noch nicht erreicht, # Berechnung mit in dieser Arbeit bestimmten Kalium- bzw. Schwefelgehalt der Biomasse aus Tabelle IV-9)

| Mangelbedingung    | $c_{i,L}/Y_{i/X}$  | PHB <sub>max.</sub> |
|--------------------|--------------------|---------------------|
|                    | $\text{gX l}^{-1}$ | %                   |
| $\text{NH}_4^+$    | 0,05               | 51                  |
| $\text{PO}_4^{3-}$ | 0,1                | 52                  |
| $\text{SO}_4^{2-}$ | 0,2 <sup>#</sup>   | 33                  |
| $\text{K}^+$       | 3,1 <sup>#</sup>   | 34                  |
| $\text{Fe}^{2+}$   | 0,8                | 12                  |
| $\text{Mg}^{2+}$   | 0,8                | 26                  |
| $\text{Mn}^{2+}$   | 1,7                | 15*                 |

Der Einfluß verschiedener Mangelbedingungen auf die PHB-Bildung wurde unter anderem für *Pseudomonas* sp. K und Methanol als Kohlenstoffquelle untersucht, wobei vergleichbare maximale PHB-Gehalte (45–55 %) unter Stickstoff-, Sulfat-, Magnesium-, Eisen- und Manganmangel gefunden wurden, wohingegen durch Defizite in der Calcium-, Zink-, Cobalt-, Kupfer-, Molybdän- und Natriumversorgung keine nennenswerte PHB-Akkumulation stattfand ( $\leq 10 \%$ ) [SUZUKI et al. 1986]. Der Einfluß von Kalium- und Phosphatmangel wurde von diesen Autoren nicht untersucht. Im Unterschied zu den eigenen Ergebnissen wurden unabhängig von der Art der Initiierung etwa gleiche PHB-Gehalte der Biomasse beobachtet. Andere Autoren berichten jedoch von Unterschieden in den erreichbaren PHB-Gehalten, wobei die Maxima für *Pseudomonas putida* (Substrate: Glucose, Octanoat) unter Stickstoffmangel [KIM et al. 1997] und für *Methylobacterium organophilum* (Substrat: Methanol) unter Kaliummangel beschrieben werden [KIM et al. 1999] (Tabelle V-5).

Die von anderen Bakterien erreichten maximalen PHB-Gehalte sind z.T. wesentlich höher, und stellen offensichtlich für jede Species individuelle „Grenzwerte“ dar (Tabelle V-6). Die PHB-Akkumulation wurde in Methanotrophen sowohl für Typ I- (26–32 %) als auch für Typ II-Vertreter (18–58 %) nachgewiesen [TROTSENKO et al. 1992]. Für *Methylocystis parvus* wird ein PHB-Gehalt von 70 % [ASENJO und SUK 1986b] und für *Methylosinus trichosporium* ein PHB-Gehalt von 50 % [SHAH et al. 1996] angegeben. Beide sind Vertreter des Typ II, die den Serin-

Weg zur Kohlenstoffassimilation nutzen. Es wird deutlich, daß diese Gruppe, wie auch die methylotrophen Bakterien mit Kohlenstoffassimilation über den Serin-Weg, die effektiveren PHB-Produzenten sind [TROTSENKO et al. 1992, BABEL 1992]. Die eigenen maximalen PHB-Gehalte liegen im Bereich der Maximalwerte und stellen für diese Bakterien vermutlich die Grenze dar.

Tabelle V-5: Vergleich der unter verschiedenen Mangelbedingungen erreichbaren PHA-Gehalte verschiedener Organismen

[a)=diese Arbeit, b) SUZUKI et al. 1986, c)KIM et al. 1996b, d) KIM et al. 1997, e) DANIEL et al. 1992, f) KIM et al. 1999]

(\* Endwert nach 24 h noch nicht erreicht \*mcl-PHA # P(3-HB-co-3-HV))

| Mangelbedingung  | PHA-Gehalt [%]           |                        |                         |                           |                        |                         |
|--|--------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|
|  | <i>Methylocystis</i> sp. | <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Methylobacterium</i> | <i>Pseudomonas putida</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Methylobacterium</i> |
|  | a)                       | b)                     | c)                      | d)*                       | e)                     | f)#                     |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>   | 45–51                    | 52–57                  |                         | 79,8                      | 37                     |                         |
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>  | 45–52                    | n.b.                   |                         | 15,3                      | 34,5                   | 24                      |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>  | 31–34                    | 48–53                  |                         | 15,0                      |                        | 10                      |
| K <sup>+</sup>   | 32–35                    | n.b.                   | 52–56                   | 44,4                      |                        | 50                      |
| Fe <sup>2+</sup>   | 8–12                     | 43–48                  |                         |                           |                        | 28                      |
| Mg <sup>2+</sup>   | 18–26                    | 45–50                  |                         | 20                        | 42,5                   | 13                      |
| Mn <sup>2+</sup>   | 10-15*                   | 50–55                  |                         |                           |                        |                         |
| Ca <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> ,<br>Cu <sup>2+</sup> , Na <sup>2+</sup> , Mo <sup>6+</sup> |                          | ≤10                    |                         |                           |                        |                         |

Tabelle V-6: Vergleich der maximalen PHA-Gehalte für verschiedene Mikroorganismen

[a) KIM und LENZ 2001, b) YU et al. 2000, c) MIYAKE et al. 2000, d) TANAKA et al. 1995 e) ASENJO und SUK 1986b

| Organismus                  | Substrat  | PHB-Gehalt [%] | Quelle |
|-----------------------------|---|----------------|--------|
| <i>Ralstonia</i>            | Glucose   | 96             | a)     |
| rekombinante <i>E. coli</i> | Glucose   | 96             | b)     |
| <i>Pseudomonas</i>          | Methanol  | 67             | a)     |
| <i>Axobacter</i>            | Glucose   | 73             | a)     |
| <i>Rhodobacter</i>          | Acetat  | 60             | a)     |
| <i>Beijernickia</i>         | Glucose   | 38             | a)     |
| <i>Synechococcus</i>        | CO <sub>2</sub> +Licht                            | 30             | c)     |
| <i>Ralstonia eutropha</i>   | CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> + O <sub>2</sub> | 68             | d)     |
| <i>Methylobacterium</i>     | Methanol  | 47             | a)     |
| <i>Methylocystis</i>        | Methan  | 70             | e)     |

Zusammenfassend kann abgeleitet werden, daß zur Erzielung maximaler PHB-Gehalte, die für die methanverwertende Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) bei ca. 50 % liegen, Prozesse unter Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel besonders geeignet sind. Zusätzlich ist es wichtig, die Versorgung mit speziellen Ionen wie Eisen, Magnesium und Kalium auch während der PHB-Bildungsphase zu gewährleisten.

## 5.2.2 SPEZIFISCHE PHB-BILDUNGSRATEN

### → Kapitel 4.4.3.1 und 4.4.3.2, Kapitel 4.4.3.4.2

Die spezifische PHB-Bildungsrate  $q_{\text{PHB}}$  (bezogen auf  $c_{\text{R}} = c_{\text{X}} - c_{\text{PHB}}$ ) variierte in Abhängigkeit von den untersuchten Mangelbedingungen sowohl in den Maximalwerten als auch in den Mittelwerten über die gesamte Prozeßdauer von 24 h. Die höchsten spezifischen Bildungsrate von  $0,145 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  waren unter Ammoniumstickstoffmangel zu beobachten, über den gesamten Zeitraum von 24 h wurden etwa gleiche Werte für Stickstoff- und Phosphatmangel bestimmt ( $0,036\text{--}0,039 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Alle anderen untersuchten Mangelbedingungen waren durch niedrigere Bildungsrate gekennzeichnet. Mit Ausnahme des Manganmangels zeigten die Bildungsprozesse ähnliche Verläufe. Generell entsprach der zeitliche Verlauf der PHB-Bildungsrate dem des PHB-Gehaltes. Unter Stickstoffmangel wurde das Maximum unmittelbar nach Eintreten des Mangels erreicht. Danach erfolgte ein starker Abfall der Bildungsrate. Das Maximum der PHB-Bildungsrate unter Phosphatmangel wurde dagegen erst 4–6 h nach Start des Prozesses bzw. 2–4 h nach Verbrauch der Restionen verzeichnet. Im weiteren Verlauf verringerte sich dieser Wert ebenfalls, jedoch dauerte die PHB-Akkumulation bis zum Ende des Prozesses an. Die deutlich verschiedenen Verläufe der Bildungsprozesse in beiden Fällen werden auch durch die unterschiedlichen Verläufe der Konzentrationen von Ammonium bzw. Phosphat bis zur Induktion der PHB-Bildung beeinflusst. Die Ammoniumionen im Medium waren nur in geringem Überschuß vorhanden ( $c_{\text{N,L}}/Y_{\text{N,X}}=0,5\text{--}0,8 \text{ gX l}^{-1}$ ) und wurden binnen kurzer Zeit ( $< 30 \text{ min}$ ) verbraucht, so daß man von einem „Umschalten“ im Stoffwechsel sprechen kann. Die PHB-Bildung erfolgte daraufhin sofort mit maximaler Geschwindigkeit. Hingegen wurde nach Unterbrechung der Dosierung von Phosphat die im Medium vorhandene Restmenge (meist ausreichend zur Bildung von 2–3 Gramm Biomasse) innerhalb von ca. 2 h unter weiterem Biomassezuwachs verbraucht. Die PHB-Bildung setzte bei Phosphatkonzentrationen unter  $2 \text{ mg l}^{-1}$  ein. Auch danach wurde noch neue Biomasse gebildet, was auf die Mobilisierung intrazellulärer Phosphatspeicher (Polyphosphate) zurückgeführt werden kann (siehe auch 4.4.4.2). Dieser Befund bedeutet, daß es sich bei der PHB-Bildung unter Phosphatmangelbedingungen um einen wachstumsassoziierten Prozeß im weiteren Sinne handelt (zur Begriffserklärung siehe Kapitel 4.4.1). Im eigentlich Sinn liegt jedoch eine nichtwachstumsassoziierte Produktbildung vor, auf eine einzelne Zelle bezogen erfolgt entweder PHB-Bildung oder Wachstum, und die anfängliche gleichzeitige Zunahme von PHB und Restbiomasse stellt eine Überlagerung dieser Prozesse in verschiedenen Zellen dar. Die gaschromatografische PHB-Analyse lieferte lediglich einen Durchschnittswert für die Gesamtbiomasse, eine Unterscheidung einzelner Zellen bzw. Zellzustände war mit dieser Methode nicht möglich. ACKERMANN et al. (1995) erfaßten diese Einzelzustände mit flow-cytometrischen Messungen bei der PHB-Bildung mit *Methylobacterium rhodesianum* und wiesen die Existenz unterschiedlicher

Teilpopulationen nach, die sich hinsichtlich DNS- und PHB-Gehalt unterschieden. Unter Phosphatmangel wurden zwei Populationen von Zellen festgestellt: eine mit keinem bis geringem PHB-Anteil und inhomogener Größenverteilung und eine Population gleicher Größe mit einem hohen Anteil an PHB-Einlagerungen. Unter Stickstoffmangel fand man eine einheitliche Population mit gleichem PHB-Gehalt und Größen. Nach diesen Erkenntnissen sind nur Zellen in einem bestimmten Stadium (doppelter Chromosomensatz) zur PHB-Synthese fähig. Bei eintretender Limitation erfolgt erst der Übergang in diesen Zustand und dann die Einlagerung von PHB. Unter Bedingungen von Phosphatmangel werden unter Nutzung intrazellulärer Speicher noch Zellteilungen vollzogen. Diese Zellen mit einfachem Chromosomensatz sind kleiner und haben keine PHB-Einlagerungen [ACKERMANN et al. 1995]. Im Hinblick auf die eigenen Ergebnisse können die beobachtete Zunahme der Restbiomasse und der Zellzahlen unter Phosphatmangel mit diesen Zusammenhängen erklärt werden. Zur Beschreibung dieser Übergangsprozesse und ihrer Auswirkungen auf Wachstum und PHB-Bildung für *M. rhodesianum* wurde ein strukturiertes, segregiertes Modell entwickelt [GROBE-UHLMANN und BLEY 1999].

Unter den weiteren Mangelbedingungen wurden die Maxima 3–6 h nach Start des PHB-Bildungsprozesses erreicht. Die maximale spezifische Bildungsrate betrug unter Kaliummangel  $0,08 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , sie liegt damit im Bereich der Werte für Phosphatmangel. Die Maxima unter Magnesium-, Sulfat- bzw. Eisenmangel betragen  $0,051$ ;  $0,05$  bzw.  $0,024 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Für *R. eutropha* wurde ebenfalls gezeigt, daß die Art der Mangelbedingung die Höhe der spezifischen Bildungsrate beeinflusst (Tabelle V-7), wobei die höchsten Werte (Substrat: Gluconat) für Sulfat- ( $q_{\text{PHB,max.}} = 0,28 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) bzw. Stickstoffmangel ( $0,23 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) erreicht wurden. Für Stickstoffmangel geben auch LEE et al. (1995a) und HENDERSON und JONES (1997) (Substrat: Glucose) die Maximalwerte an. Diese liegen bei  $0,15$  bzw.  $0,21 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in der gleichen Größenordnung wie die in dieser Arbeit bestimmten. Widersprüchlich sind dagegen die großen Unterschiede in den von verschiedenen Autoren veröffentlichten Werten unter Phosphat- und Magnesiummangel. Als Ursache für die beobachteten Differenzen wurde die Beziehung zwischen der spezifischen PHB-Bildungsrate und Umsatzgeschwindigkeit des Kohlenstoffsubstrates sowie die Rolle der intrazellulären Konzentrationen bzw. Verhältnisse von NADH/NAD bzw. NAD(P)H/NADP beschrieben. Je höher diese Verhältnisse, um so größer ist die spezifische Bildungsrate [LEE et al. 1995a]. Die Konzentrationen dieser Cofaktoren (bzw. deren Verhältnis) regulieren neben der Konzentration von Coenzym A die Flüsse von Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus oder die PHB-Synthese über die Steuerung der jeweiligen Schlüsselenzyme Citrat-Synthase (TCA) und  $\beta$ -Ketothiolase (PHB) [JACKSON und DAWES 1976, ANDERSON und DAWES 1990, HENDERSON und JONES 1997, 1997a, MOTHEs et al. 1997, 1998].

Die maximalen spezifischen Bildungsraten werden mit der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25), wie auch für *R. eutropha* (Substrat: Glucose), unter Ammoniumstickstoffmangel gefunden. Der Wert von  $0,145 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ist vergleichbar mit denen anderer PHB-Produzenten wie *R. eutropha* oder rekombinanten *E. coli*-Stämmen. Die maximalen Werte wachstumassoziierter Organismen wie *A. latus* werden nicht erreicht. Tabelle V-8 zeigt einen Vergleich maximaler spezifischer PHB-Bildungsraten verschiedener PHB-Produzenten. Für methanotrophe Bakterien finden sich in der Literatur keine Angaben.

**Tabelle V-7:** Vergleich der spezifischen PHB-Produktbildungsraten von *Methylocystis* sp. GB 25 (MK) und *R. eutropha* in Abhängigkeit von den Mangelbedingungen [Quellen: a) diese Arbeit, b) STEINBÜCHEL und SCHLEGEL 1989, c) LEE et al. 1995a, d) HENDERSON und JONES 1997]  
 (\*ursprüngliche Angabe in g g Protein<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, umgerechnet mit angegebenen Proteingehalt von 57,5 %, #kontinuierliche Kultivierung)

| Mangelbedingung               | Spezifische PHB-Bildungsrate $q_{\text{PHB}}$ [g g R <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] |                    |       |      |
|-------------------------------|--|--------------------|-------|------|
|                               | <i>Methylocystis</i> sp. GB 25 (MK)  | <i>R. eutropha</i> |       |      |
|                               | a)   | b)*                | c)    | d)#  |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>  | 0,145  | 0,23               | 0,150 | 0,21 |
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | 0,08   | 0,155              | 0,006 |      |
| K <sup>+</sup>                | 0,08   | 0,132              | 0,127 | 0,08 |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | 0,05   | 0,282              |       |      |
| Mg <sup>2+</sup>              | 0,011  | 0,121              | 0,035 |      |
| Fe <sup>2+</sup>              | 0,006  | 0,127              | 0,109 |      |
| O <sub>2</sub>                |  | 0,058              |       | 0,08 |

**Tabelle V-8:** Vergleich der spezifischen PHB-Bildungsraten verschiedener Organismen

| Organismus                             | Substrat           | PHB-Bildungsrate                    | Quelle                         |
|--|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
|  |                    | g g R <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> |                                |
| <i>A. latus</i>                        | Saccharose         | 0,80 ( <i>batch</i> )               | WANG und LEE 1997              |
|  |                    | 0,44 ( <i>fed-batch</i> )           |                                |
|  |                    | 0,45–0,6 ( <i>batch</i> )           | BRAUNEGG und BOGENSBERGER 1985 |
|  | Maltose            | 0,16                                | BRAUNEGG et al. 1999           |
|  | <i>green sirup</i> | 0,14                                |                                |
| Melasse                                | 0,11               |                                     |                                |
| <i>R. eutropha</i>                     | Glucose            | 0,20                                | KIM et al. 1994a               |
|  |                    | 0,16                                | HENDERSON und JONES 1997       |
|  | Natriumlactat      | 0,38                                | ARAGAO et al. 1996             |
| rekombinante<br><i>E. coli</i>         | Glucose            | 0,20                                | HENDERSON und JONES 1997       |
|  |                    | 0,08                                | LEE et al. 1994                |
| <i>Methylobacterium<br/>extorquens</i> | Biodiesel          | 0,23                                | VAN WEGEN et al. 2001          |
|  | Methanol           | 0,07                                | BRAUNEGG et al. 1999           |
| <i>Pseudomonas<br/>cepacia</i>         | Glucose            | 0,017                               | SUZUKI et al. 1986b            |
|  | Xylose             | 0,018                               |                                |
|  | Lactose            | 0,016                               |                                |
| <i>M. rhodesianum</i>                  | Fructose           | 0,03                                | YOUNG et al. 1994              |
|  | Methanol           | 0,036                               | ACKERMANN und BABEL 1997       |
| <i>Methylocystis</i> sp.<br>GB 25 (MK) | Methan             | 0,145                               | MOTHES 1997                    |
|  |                    |                                     | diese Arbeit                   |

Ein Vergleich der mittleren PHB-Bildungsraten von Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel, über verschiedene Zeiträume berechnet, zeigt, daß der anfängliche Vorteil ( $t=0-8$  h) für Prozesse unter Ammoniumstickstoffmangel bereits für eine Versuchsdauer von 12 h aufgehoben ist. Für den Zeitraum von 24 h unterscheiden sich beide Werte ebenfalls nicht, sie sind jedoch unter beiden Bedingungen niedriger im Vergleich zu kürzeren Zeiträumen (Abb. 5-1). Beide Bedingungen sind daher als geeignete Varianten anzusehen. Weiterhin könnte bei Betrachtung der mittleren spezifischen Bildungsraten eine Verkürzung der Prozeßdauer in Betracht gezogen werden, da 30 % höhere Werte erreichbar sind (Vergleich der Ergebnisse mit 12 h bzw. 24 h Produktbildung).

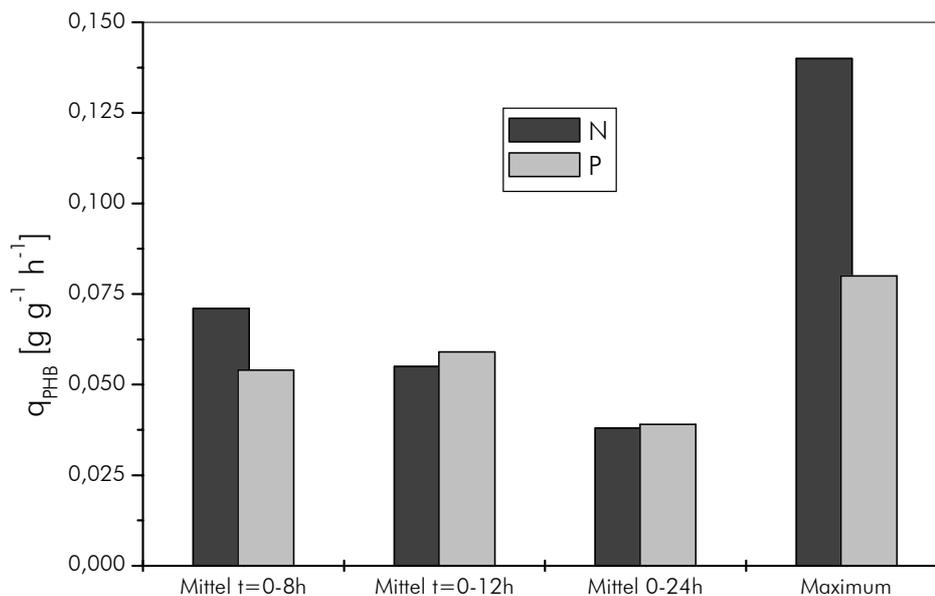


Abb. 5-1: Vergleich der maximalen und mittleren spezifischen PHB-Bildungsraten (berechnet über Zeiträume 0–8 h, 0–12 h und 0–24 h) unter Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel

### 5.2.3 PRODUKTIVITÄT DER PHB-BILDUNG

#### → Kapitel 4.4.3.1 und 4.4.3.2, Kapitel 4.4.3.4.2

Neben den charakteristischen Kenngrößen spezifische Produktbildungsrate und PHB-Gehalt ist die Produktivität eines Prozesses ein weiteres, besonders in Hinblick auf die ökonomische Bewertung eines Verfahrens entscheidendes Kriterium.

Sowohl die Maximalwerte der Produktivität als auch deren auf den Zeitraum der PHB-Bildung bezogenen Mittelwerte variierten in Abhängigkeit von den Mangelbedingungen. Die maximalen Werte wurden unter Ammoniumstickstoffmangel realisiert ( $r_{PHB}=3,25$  g l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). Unter Phosphat- bzw. Kaliummangel lagen die Produktivitäten bei 2,3 g l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> bzw. 2 g l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Betrachtet man den gesamten Zeitraum, ist die mittlere Produktivität unter Phosphatmangel bezogen auf 12 und 24 h signifikant höher als unter Ammoniumstickstoffmangel (Signifikanzniveau 0,05) (Abb. 5-2). Dies ist mit der deutlichen Zunahme der Restbiomassekonzentration unter Phosphatmangel zu erklären. Wie bei den spezifischen Bildungsraten sind auch hier die mittleren

Werte (unter allen Bedingungen) des Gesamtzeitraumes von 24 Stunden 30–35 % niedriger als für den Zeitraum 0–12 h. Nach Erreichen des Maximums (außer unter Ammoniumstickstoff- und Manganmangel zwischen 3–6 h nach Initiierung der PHB-Bildungsphase) erfolgte die PHB-Bildung mit fortschreitender Prozeßzeit mit immer geringeren Produktivitäten, die sich dem Wert 0 annähern. Der Zeitpunkt der maximalen PHB-Produktion wird im wesentlichen durch den Zeitraum bis zum Verbrauch der Restionen (Unterschreiten einer kritischen Konzentration), aber auch durch Phasen der Überlagerung von Wachstum und PHB-Bildung bestimmt.

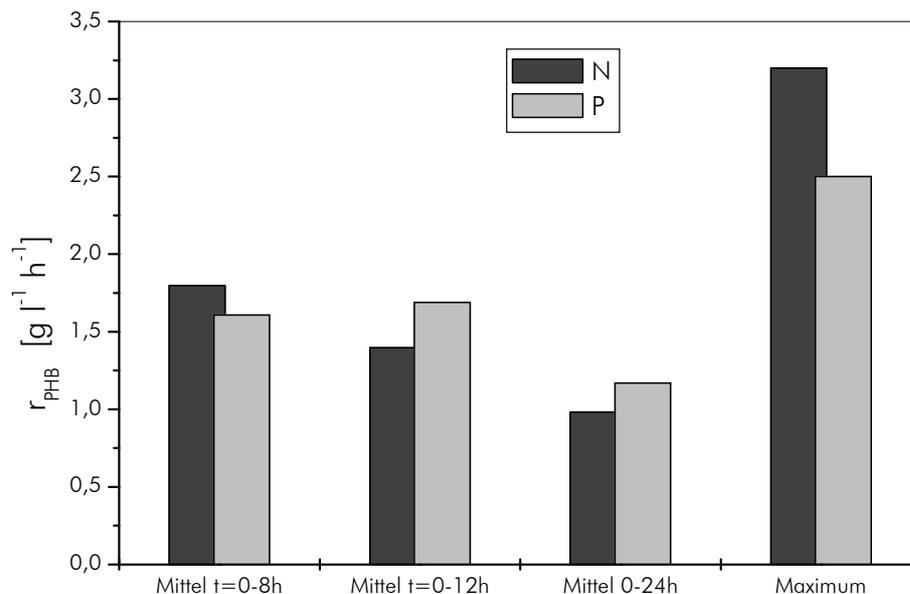


Abb. 5-2: Vergleich der maximalen und mittleren spezifischen Produktivitäten (berechnet über Zeiträume 0–8 h, 0–12 h und 0–24 h) unter Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel

Für methanotrophe Bakterien liegen keine Angaben über Produktivitäten von PHB-Bildungsprozessen vor, da bisher nur Grundlagenuntersuchungen in Schüttelkolben bzw. unter anderer Zielstellung durchgeführt wurden [ASENJO und SUK 1986a, 1986b, SHAH et al. 1996, VECHERSKAYA et al. 2001].

Die Produktivität des Gesamtprozesses wird von den folgenden Faktoren bestimmt: Startkonzentration der Biomasse ( $c_{x,0}$ ), Wachstumsrate ( $\mu$ ), Produktbildungsrate ( $q_{\text{PHB}}$ ), Dauer des Wachstumsprozesses ( $t_x$ ) und Dauer der PHB-Bildung ( $t_{\text{PHB}}$ ). So kann beispielsweise eine Steigerung der Produktivität des Gesamtprozesses (=100% für gegebene  $\mu$  und  $q$ ) auf 130 % durch Erhöhung der Wachstumsrate  $\mu$  um 40 % bei konstanter Produktbildungsrate  $q$  erreicht werden. Der umgekehrte Fall, eine 40 %ige Erhöhung von  $q$  bei konstantem  $\mu$ , bewirkt hingegen nur eine Erhöhung der Produktivität auf 110 % (für 40 % PHB-Gehalt). Bei hohen PHB-Gehalten (80 %) hingegen ist der Einfluß von  $q$  stärker. Eine umfassenden Überblick über die Zusammenhänge der verschiedenen Größen geben BABEL et al. (2001), wobei auch eine Angabe der Startbiomassekonzentration ( $c_{x,0}$ ) für einen Vergleich von Produktivitäten empfohlen wird. Alle in der Literatur beschriebenen Prozesse werden mit sehr niedrigen Animpfkonzentrationen durchgeführt.

zentrationen ( $c_{x,0} < 1 \text{ g l}^{-1}$ ) gestartet. Bei einem Vergleich der mit der methanotrophen Mischkultur erzielten Produktivitäten mit anderen PHB-Prozessen (andere Substrate) muß berücksichtigt werden, daß die Prozesse mit sehr hohen Biomassekonzentrationen gestartet wurden und sich die oben genannten Werte nur auf den PHB-Prozeß beziehen. Da die Gesamtproduktionszeit 44–48 h Stunden betrug (Wachstum und Produktbildung), müssen die oben angegebenen Werte für Vergleichszwecke halbiert werden.

Die höchsten veröffentlichten Produktivitäten wurden für Organismen, die zur wachstumsassoziierten PHB-Bildung fähig sind, beschrieben: *A. latus*  $4,94 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [WANG und LEE 1997],  $4,69 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [LAFFERTY und BRAUNEGG 1984a] bzw.  $4,0 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [YAMANE et al. 1996]. Die Produktivitäten nichtwachstumsassoziiertes PHB-Bildungsprozesse liegen beispielsweise bei Werten von  $3,75 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (*R. eutropha*, Phosphorlimitation, [RYU et al. 1999]) oder  $2,63 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (*R. eutropha*, Stickstofflimitation, LEE et al. 1997). In einer von KIM et al. (1996b) veröffentlichten Arbeit ist die Produktivität eines Prozesses mit *M. organophilum* unter Kaliumlimitation angegeben:  $1,8\text{--}2,0 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Weitere Angaben finden sich unter 2.1.6.1.1.

Für Prozesse mit rekombinanten *E. coli* Stämmen wurden bisher u.a. Produktivitäten von  $1 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  [LIU et al. 1998] bis zu  $3,4 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  veröffentlicht [WANG und LEE 1997b]. Klone, die die Gene von *A. latus* exprimieren, zeigten ähnliche Produktivitäten wie der Wildtyp ( $4,63 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) [CHOI et al. 1998].

Zusammenfassend kann abgeschätzt werden, daß bei zusätzlicher Berücksichtigung der hohen Startkonzentrationen die eigenen Werte im Vergleich zu bekannten Verfahren niedriger sind. Für eine reale Gegenüberstellung müßte von gleichen Bedingungen ausgegangen werden. Einfacher wäre ein Vergleich bei kontinuierlichen Verfahren. Dabei könnte für Methan eine optimierte Prozeßvariante mit einem Reaktor zur kontinuierlichen Biomasseanzucht und paralleler PHB-Bildung in mehreren Produktbildungsreaktoren eine quasikontinuierliche PHB-Synthese realisiert werden.

In Bezug auf die aktuellen Ergebnisse können unter Stickstoffmangel ( $t=8 \text{ h}$ ) bzw. Phosphatmangel ( $t=12 \text{ h}$ ) die maximalen Produktivitäten erreicht werden, d.h. auch unter diesem Gesichtspunkt steht die Frage nach einer Verkürzung des Akkumulationsprozesses. Im Hinblick auf den Wachstumsprozeß ist unter entsprechenden Randbedingungen (wie optimale Sauerstoffversorgung, automatische Anpassung der Nährlösungsdosierung) eine Verkürzung auf  $12 \text{ h}$  denkbar. Die sich daraus ergebende Gesamtproduktionszeit von  $24 \text{ h}$  würde dann die o.g. Produktivitäten ermöglichen.

#### 5.2.4 SPEZIFISCHE AUSBEUTEKOEFFIZIENTEN

##### → Kapitel 2.2.3.1, Kapitel 4.4.3.1 und 4.4.3.2, Kapitel 4.4.2.4.3

Der Ausbeutekoeffizient  $Y_{\text{PHB/S}}$  für die Bildung von PHB bezogen auf das Kohlenstoffsubstrat stellt eine zentrale Größe bei der ökonomischen Bewertung eines Verfahrens dar, da die Substratkosten 30–50 % der Gesamtkosten eines Verfahrens ausmachen [CHOI und LEE 1997, CHOI und LEE 1999c]. Konkrete Angaben in der Literatur für PHB-Prozesse mit Methan liegen nicht vor.

In dieser Arbeit wurden Ausbeutekoeffizienten für die Bildung von PHB aus Methan in Abhängigkeit von den Mangelbedingungen bestimmt. Maximalwerte wurden unter Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel ( $Y_{\text{PHB/CH}_4} = 0,55\text{--}0,6 \text{ g g}^{-1}$ ) realisiert. Unter anderen Bedingungen verlief die PHB-Synthese mit Ausbeuten von  $\approx 0,4 \text{ g g}^{-1}$  weniger effizient. Der Ausbeutekoeffizient für Eisenmangel-Prozesse war mit nur  $0,2 \text{ g g}^{-1}$  am geringsten.

Auch SUZUKI et al. (1986) finden höhere Ausbeuten unter Stickstoffmangel verglichen mit Prozessen unter Sulfat-, Magnesium-, Eisenmangel. Der Einfluß von Phosphormangel wurde von diesen Autoren nicht untersucht.

Für einen Vergleich der Ausbeuten methanotropher Bakterien für die PHB-Synthese wurden in der Literatur keine experimentell ermittelten Werte gefunden. In der bereits mehrfach erwähnten Arbeit von ASENJO und SUK (1986b) wird lediglich ein theoretischer Wert berechnet, andere Autoren geben ebenfalls theoretische Ausbeuten für die Bildung von PHB aus Methan an (Tabelle V-9).

Tabelle V-9: Theoretische Ausbeuten für die Bildung von PHB aus Methan  
(AAR-Acetoacetyl-CoA-Reduktase, CMD-carbon metabolismus determinated)

| $Y_{\text{PHB/CH}_4}$<br>$\text{g g}^{-1}$ | Bedingungen/Annahmen   | Quelle               |
|--|--|----------------------|
| 0,54                                       | Serinweg, NAD(P)H-abhängige AAR, Regenerierung über TCA-Zyklus                                   | YAMANE 1993          |
| 0,67                                       | Serinweg, NADH-abhängige AAR Regenerierung über Oxidation zu $\text{CO}_2$                       | ASENJO und SUK 1986b |
| 0,73                                       | aus kohlenstoffdeterminierter Ausbeute ( $Y_{\text{CMD}} = 1,35$ ), korrigiert mit Energiebedarf | BABEL et al. 2001    |

Die Unterschiede ergeben sich aus der Berücksichtigung des Anteils von Kohlenstoff, der zur Regenerierung der Reduktionsäquivalente für die Bildung von D-Hydroxybutyryl-CoA benötigt wird, wenn diese Umsetzung, wie für *R. eutropha* beschrieben, NAD(P)H-abhängig ist [YAMANE 1993]. Wird NADH als Cofaktor genutzt, kann die Regenerierung über die dissimilatorische Sequenz (Oxidation von Formaldehyd zu  $\text{CO}_2$ ) erfolgen [ASENJO und SUK 1986b]. Da für die Enzyme der PHB-Synthese in methanotrophen Bakterien die entsprechenden Abhängigkeiten bisher nicht bekannt sind, wird von unterschiedlichen Mechanismen ausgegangen.

Für das methylotrophe Bakterium *M. rhodesianum* MB 126 (Formaldehydfixierung über den Serin-Weg) erfolgte die Isolierung und Charakterisierung der entsprechenden Enzyme [MOTHES 1997]. Es wurde gefunden, daß die Synthese von PHB nach dem ersten Schritt- Bildung von Kondensation zweier Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA ( $\beta$ -Ketothiolase), auf zwei verschiedenen Wegen ablaufen kann:

- Acetoacetyl-CoA wird über eine **NAD(P)H**-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase zu D-Hydroxybutyryl-CoA umgesetzt oder
- aus Acetoacetyl-CoA wird zunächst durch eine **NADH**-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase zu L-Hydroxybutyryl-CoA gebildet, das über zwei stereospezifische Crotonyl-CoA-Hydratasen weiter zu D-Hydroxybutyryl-CoA reagiert.

Der letzte Schritt der Verknüpfung der Monomere wird durch eine PHB-Synthase katalysiert [MOTHES 1997]. Bei Experimenten unter Ammoniumstickstoffmangel wurden für beide Acetoacetyl-CoA-Reductasen Aktivitäten bestimmt. Demzufolge liegen sie in einem Verhältnis von 1:7 vor ( $470 \text{ U mg Protein}^{-1}$ , NADH-abhängig bzw.  $3050 \text{ U mg Protein}^{-1}$ , NAD(P)H-abhängig) [BREUER und BABEL 1999]. In früheren Arbeiten wurde bei Messungen im Rohextrakt auch ein Verhältnis 3:1 gefunden [BABEL 1992]. Diese Untersuchungen unterstützen die These, daß die PHB-Synthese in C1-Verwertern bezüglich der Coenzymabhängigkeiten Besonderheiten aufweist [BREUER et al. 1995, BABEL 1990, 1992, TROTSENKO und BELOVA 2001]. Die für die methanverwertende Mischkultur ermittelten maximalen Ausbeutekoeffizienten sind deutlich höher als der Wert von  $0,54 \text{ g g}^{-1}$  und geben einen Hinweis darauf, daß die PHB-Synthese in *Methylocystis* sp. GB 25 nicht ausschließlich über die NAD(P)H-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase abläuft.

Einen Vergleich mit experimentell ermittelten Ausbeutekoeffizienten anderer Organismen und Substrate gibt Tabelle V-10.

Tabelle V-10: Vergleich von experimentell ermittelten spezifischen Ausbeutekoeffizienten für die PHB-Synthese mit verschiedenen Organismen und Substraten

| Organismus                         | Substrat      | $Y_{\text{PHB/S}}$ [ $\text{g g}^{-1}$ ] | Quelle                    |
|------------------------------------|---------------|--|---------------------------|
| <i>Ralstonia eutropha</i>          | Glucose       | 0,30                                     | KIM et al. 1994a          |
|                                    |               | 0,50                                     | GOSTOMSKY und BUNGAY 1996 |
|                                    |               | 0,38 ( $\text{PO}_4^{3-}$ )<br>0,30      | RYU et al. 1999           |
| <i>Alcaligenes latus</i>           | Saccharose    | 0,37                                     | YAMANE et al. 1996        |
|                                    | Maltose       | 0,151                                    | BRAUNEGG et al. 1999      |
|                                    | Green Sirup   | 0,22                                     |                           |
|                                    | Melasse       | 0,297                                    |                           |
| <i>Paracoccus dentrificans</i>     | Methanol      | 0,111                                    | UEDA et al. 1992          |
|                                    | n-Amylalkohol | 0,968                                    |                           |
| <i>Methylobacterium extorquens</i> | Methanol      | 0,18                                     | SUZUKI et al. 1986        |
|                                    |               | 0,2–0,22                                 | BOURQUE et al. 1995       |
|                                    | Biodiesel     | 0,23                                     | BRAUNEGG et al. 1999      |
| <i>M. organophilum</i>             | Methanol      | 0,19 ( $\text{K}^+$ )                    | KIM et al. 1996b          |
| <i>Azotobacter chroococcum</i>     | Glucose       | 0,24                                     | SAVENKOVA et al. 1999     |
| <i>Pseudomonas cepecia</i>         | Glucose       | 0,145                                    | YOUNG et al. 1994         |
|                                    | Xylose        | 0,11                                     |                           |
|                                    | Lactose       | 0,147                                    |                           |
| <i>Pseudomonas putida</i>          | Octanoate     | 0,4                                      | KIM et al. 1997           |
| rekombinante <i>E. coli</i>        | Glucose       | 0,369                                    | LEE et al. 1994           |
|                                    |               | 0,43                                     | YU et al. 2000            |
|                                    | Xylose        | 0,226                                    | LEE 1998                  |
|                                    | Lactose       | 0,33                                     | WONG und LEE 1998         |
| <i>Methylocystis</i> sp. GB 25     | Methan        | 0,55–0,6                                 | diese Arbeit              |

Die ermittelten Ausbeutekoeffizienten für die Bildung von PHB aus Methan, die maximal unter Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel sind, liegen im Bereich der für Methan angegebenen theoretischen Ausbeuten und zeigen im Vergleich mit anderen Kohlenstoffquellen die Attraktivität von Methan als potentiell Substrat für die PHB-Synthese.

Neben den Ausbeuten der PHB-Synthese kann für den Gesamtprozeß (Wachstum und Produktbildung) ein sog. *overall*-Ausbeutekoeffizient angegeben werden [BABEL et al. 2001], der neben der Effektivität der Biomassebildung ( $Y_{X/S}$ ) vom erreichten PHB-Gehalt (in  $\text{g g}^{-1}$ ) abhängt:

$$Y_{\text{PHB/S}}^{\text{ov}} = \frac{Y_{X/S} \cdot Y_{\text{PHB/S}}}{Y_{X/S} + Y_{\text{PHB/S}} \cdot \left( \frac{1}{\text{PHB}} - 1 \right)} \quad (5.2)$$

Berechnet mit den maximalen Werten für Biomasse  $Y_{X/\text{CH}_4} = 0,63 \text{ g g}^{-1}$ ,  $Y_{\text{PHB}/\text{CH}_4} = 0,6 \text{ g g}^{-1}$  und einem PHB-Anteil von  $0,5 \text{ g g}^{-1}$  ergibt sich für die untersuchte Mischkultur ein Wert von  $0,31 \text{ g g}^{-1}$ , der etwa dreimal höher ist als ein Wert für die PHB-Produktion aus Methanol von  $0,09\text{--}0,12 \text{ g g}^{-1}$  [BOURQUE et al. 1995].

## 5.2.5 MITTLERES MOLEKULARGEWICHT UND MOLEKULARGEWICHTSVERTEILUNG

### → Kapitel 4.2.2, Kapitel 4.4.6.1

Das PHB-Molekulargewicht wurde mit zwei Methoden bestimmt, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen und den relativen Bestimmungsmethoden zuzurechnen sind: Ausschlußchromatographie (GPC) und Viskosimetrie. Zur Umrechnung der Meßgrößen in das mittlere Molekulargewicht wurden Kalibrierungen mit Standards durchgeführt (GPC) oder Umrechnungsfaktoren benutzt, die in Grundlagenexperimenten bestimmt wurden (Viskosimetrie). Aus diesem Grund unterscheiden sich die absoluten Zahlenwerte der bestimmten Molekulargewichte, wobei jedoch die Ergebnisse beider Methoden korrelieren [siehe auch BRADEL et al. 1991, SUZUKI et al. 1988]. Für Molekulargewichte am Ende des PHB-Prozesses waren die mittels GPC bestimmten Werte generell etwa 2mal höher als die viskosimetrisch gemessenen. Damit kann die apparativ weniger aufwendige viskosimetrische Messung zur Charakterisierung der mittleren Molekulargewichte verwendet werden (siehe auch 4.2.2.). Zur Untersuchung der Molekulargewichtsverteilung, die durch die Uneinheitlichkeit beschrieben wird, ist jedoch die GPC-Analyse notwendig.

Da das native Polymer unter den Bedingungen von Aufarbeitung und Extraktion Veränderungen unterliegen kann (beispielsweise Hydrolyse) [RAMSAY et al. 1990, 1994, BRADEL et al. 1991, KIM et al. 2000a, CHEN et al. 2001b], wurde als besonders schonende Methode die Gefriertrocknung der Biomasse und nachfolgende Extraktion mit 1,2-Dichlorethan ausgewählt (Standardextraktionsverfahren für diese Arbeit siehe 4.2.2.1 bis 4.2.2.3). Die Extraktionsausbeuten lagen im Mittel bei 30–40 %. Dieser geringe Wert ist ein generelles Problem bei der Gewinnung von PHB aus Biomasse mit organischen Lösungsmitteln [SCHUMANN et al. 2000]. Dennoch war die Lösungsmittelextraktion die Methode der Wahl, da das Ziel die Gewinnung hochmolekularer PHB mit enger Massenverteilung war, wie sie mit alternativen Verfahren, die höhere Ausbeuten liefern, nicht zu erreichen ist.

Das mittlere Molekulargewicht und die Molekulargewichtsverteilung wurden sowohl nach Abschluß des Produktbildungsprozesses als auch über den gesamten Prozeßverlauf in Abhängigkeit von den Mangelbedingungen analysiert. Das mittlere Molekulargewicht der akkumulierten PHB nach 24stündiger Synthese ( $2,3 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ , GPC) war für Ammoniumstickstoff, Phosphat-, Magnesium- und Sulfatmangel unabhängig vom initiiierenden Faktor. Die unter Eisen- und Manganmangel akkumulierte PHB erreicht nur 70 bzw. 65 % dieser Molekulargewichte. Weiterhin gibt es Hinweise, daß unter Kaliummangel etwa 20 % höhere Werte ( $3 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ ) erreichbar sind. Die Ursachen für diese Unterschiede sind nicht bekannt. Da die PHB-Bildung in diesen Fällen weit weniger effektiv als bei Stickstoff- oder Phosphatmangel war, kamen diese Prozesse für ein leistungsfähiges Verfahren nicht in Frage und auf genauere Untersuchungen im Hinblick auf die Molekulargewichte wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Der Einfluß dieser Ionen auf die Enzyme der PHB-Synthese, besonders der PHB-Synthase, sollte in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Das mittlere Molekulargewicht und dessen Verteilung änderten sich in allen Prozessen in Abhängigkeit von der Prozeßdauer. In den ersten 6–10 h erfolgte eine deutliche Zunahme der mittleren Molmasse (auf mindestens 75 % des Endwertes) verbunden mit einer Verringerung der Uneinheitlichkeit; im weiteren Verlauf waren keine gravierenden Änderungen zu beobachten. Damit glich der Verlauf prinzipiell dem des PHB-Gehaltes. Ein Zusammenhang zwischen den maximal erreichbaren Werten von PHB-Gehalt und Molekulargewicht konnte nicht beobachtet werden. Bei Initiierung der PHB-Bildung durch Mangel an Kationen ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ), wurde das maximale mittlere Molekulargewicht (wie der PHB-Gehalt) in wesentlich kürzeren Zeiträumen erreicht als bei Mangel an Anionen ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

Die akkumulierte PHB wies unter allen Bedingungen<sup>1</sup> eine enge Molekulargewichtsverteilung auf, die durch Uneinheitlichkeiten von 1,9 bis 2,2 gekennzeichnet war. Die Uneinheitlichkeit nahm mit Prozeßdauer ab, wobei nach 8 h (außer Phosphatmangel) bereits das Niveau des Endwertes erreicht wurde.

Die Kenntnis der zeitlichen Abhängigkeit von Molekulargewicht und Uneinheitlichkeit erlaubt eine Synthese von PHB mit gezielten Kennwerten. Um PHB mit einem gewünschten Molekulargewicht herzustellen, könnte einerseits zu bestimmten Zeitpunkten der Prozeß abgebrochen werden. Andererseits leitet sich eine bestimmte Mindestdauer ab, um sehr hohe Molekulargewichte zu realisieren.

In der Literatur sind (außer den eigenen Arbeiten: WENDLANDT et al. 1998, WENDLANDT et al. 2001) keine Angaben über die Molekulargewichte von PHB aus methanotrophen Bakterien verfügbar. Ein Vergleich mit anderen Organismen und Substraten ist in Tabelle V-11 zeigt, daß die in dieser Arbeit ermittelten Molekulargewichte sehr hoch sind; nur für genetisch veränderte Organismen werden deutlich höhere Werte beschrieben. Das Molekulargewicht der akkumulierten PHB wird in erster Linie durch die spezifische Kombination von Organismus und Substrat bestimmt<sup>2</sup>. Dabei wurde nur von DANIEL et al. (1992) (*Pseudomonas* sp., Substrat: Metha-

<sup>1</sup> Keine Werte für Eisen- und Manganmangel.

<sup>2</sup> Zum Vergleich werden in den meisten Fällen GPC-Analysen auf der Basis von Polystyren-Standards verwendet [SUDESH et al. 2000].

no) zusätzlich die Abhängigkeit von den Mangelbedingungen untersucht. Im Unterschied zu den eigenen Ergebnissen wird bei Abwesenheit von Magnesium im Vergleich zu Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel ein deutlicher niedrigeres Molekulargewicht bei gleichzeitig höheren PHB-Gehalten erreicht.

Tabelle V-11: Charakterisierung von PHA aus verschiedenen Organismen durch mittlere Molekulargewichte und –verteilung  
[a) VAN DER WALLE et al. 2001, b) KUSAKA et al. 1997, c) VALENTIN und DENNIS 1997, d) REN et al. 2000, e) TAIDI et al. 1994, f) BOURQUE et al. 1995, g) DANIEL et al. 1992, h) GERNGROSS und MARTIN 1995, i) diese Arbeit]

| Organismus                             | Polymer / Substrat                        | M <sub>w</sub>         | PI   | Quelle             |
|--|---|------------------------|------|--------------------|
|  |   | g mol <sup>-1</sup>    | –    |                    |
| <i>R. eutropha</i>                     | PHB                                       | 1,4 × 10 <sup>6</sup>  | 1,9  | a)                 |
|  | P(HB-co-15 % HV)                          | 0,98 × 10 <sup>6</sup> | 2,5  |                    |
|  | P(HB-co-28 % HV)                          | 0,93 × 10 <sup>6</sup> | 3    |                    |
| <i>Pseudomonas</i> sp.                 | PHB (Methanol)                            | 3,73 × 10 <sup>5</sup> | 10,4 | g)                 |
|  | (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )          | 3,13 × 10 <sup>5</sup> | 11,1 |                    |
|  | (Mg <sup>2+</sup> )                       | 2,55 × 10 <sup>5</sup> | 10,4 |                    |
| <i>P. oleovorans</i>                   | <i>mcl</i> -PHA (n-Hexan)                 | 3,33 × 10 <sup>5</sup> | 1,8  | a)                 |
|  | <i>mcl</i> -PHA (n-Oktan)                 | 1,78 × 10 <sup>5</sup> | 1,8  |                    |
|  | <i>mcl</i> -PHA (n-Dekan)                 | 2,25 × 10 <sup>5</sup> | 2,0  |                    |
| <i>P. putida</i>                       | <i>mcl</i> -PHA (Ölsäure)                 | 1,12 × 10 <sup>5</sup> | 1,6  | a)                 |
|  | <i>mcl</i> -PHA (Tallöl-Fettsäuren)       | 0,56 × 10 <sup>5</sup> | 1,7  |                    |
| rekombinante <i>E. coli</i>            | PHB (LB-Medium + Glucose)                 | 20 × 10 <sup>6</sup> * |      | b) *M <sub>n</sub> |
|  | P(HB-co-4HB)<br>(Glucose + Komplexmedium) | 1,8 × 10 <sup>6</sup>  |      | c)                 |
|  | <i>mcl</i> -PHA (Hexadecanoat)            | 1,1 × 10 <sup>6</sup>  | 1,8  | d)                 |
| <i>Methylobacterium extorquens</i>     | PHB (Methanol)                            | 6,0 × 10 <sup>5</sup>  | 4,4  | e)                 |
|  |   | 1,8 × 10 <sup>6</sup>  |      | f)                 |
|  | PHB (Natriumsuccinat)                     | 1,7 × 10 <sup>6</sup>  | 2,8  | e)                 |
| <i>in vitro</i>                        | PHB                                       | 12 × 10 <sup>6</sup>   |      | h)                 |
| <i>Methylocystis</i> sp.<br>GB 25 (MK) | PHB (Methan) (K <sup>+</sup> )            | 3,0 × 10 <sup>6</sup>  | 3,0  | i)                 |

Übereinstimmend für verschiedene Organismen und Substrate wurde gefunden, daß die Konzentration der Kohlenstoffquelle die Charakteristik des Polymers beeinflusst. Mit steigender Substratkonzentration nimmt das mittlere Molekulargewicht des gebildeten Polymers ab [SUZUKI et al. 1988, KAWAGUCHI und DOI 1992, SHIMIZU et al. 1993, CHEN und PAGE 1994, HORI et al. 1994, TAIDI et al. 1994, KUSAKA et al 1997].

Die Abhängigkeit des Molekulargewichtes von der Prozeßdauer wurde für verschiedene PHB-Produzenten, jedoch keine methanotrophen Bakterien, beschrieben. Die Prozesse wurden dabei in der Regel über wesentlich längere Zeiträume geführt (*R. eutropha*, 200 h [BRADEL et al. 1991], *Methylobacterium extorquens*, 65 h, [ANDERSON et al. 1992]). Dadurch könnte es bereits zu Abbauprozessen und damit zur Abnahme des Molekulargewichtes bzw. Zunahme der Uneinheitlichkeit kommen. Insgesamt sind die Aussagen zur Entwicklung der Molekulargewichte in Abhängigkeit von der Prozeßdauer widersprüchlich. In den meisten Fällen lassen sie den Schluß zu, daß die Synthese von hochmolekularer PHB nur in den ersten Stunden der PHB-Bildung möglich ist [KAWAGUCHI und DOI 1992]. Mit Hilfe von <sup>14</sup>C-Analysen wurde außerdem festgestellt, daß auch nach Stagnation der PHB-Bildung (PHB-Gehalt der Biomasse konstant) ein Umbau der PHB erfolgt, in dem hochmolekulare PHB durch niedermolekulare Anteile ersetzt wird [TADI et al. 1995]. Hieraus leitet sich ein entscheidender Vorteil kurzer Produktbildungsprozesse ab, wie sie mit der untersuchten Mischkultur realisiert werden können. Weiterhin werden der Einfluß des pH-Wertes [BRADEL und REICHERT 1993, SHIMIZU et al. 1993, SUZUKI et al. 1998] sowie der Konzentrationen bestimmter Ionen [ASENJO et al. 1995] auf das Molekulargewicht und dessen Verteilung diskutiert. Bei der PHB-Synthese mit *R. eutropha* (Glucose, Stickstoffmangel) führte das Absenken der Magnesiumkonzentration unter 50 % der Ausgangskonzentration zu einer Erniedrigung des mittleren Molekulargewichtes um 50 % auf  $0,9 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  und zu einer größeren Uneinheitlichkeit des Polymers (von 1,3 auf 4,0). Es wurde geschlußfolgert, daß die Einhaltung definierter Konzentrationsbereiche während der PHB-Bildungsphase die Steuerung des Molekulargewichtes ermöglicht.

Die Mechanismen der PHB-Synthese, genauer gesagt die Regulierung der Kettenlänge und Anzahl der Polymerketten *in vivo*, wurden detailliert erforscht, auch diese Ergebnisse sind widersprüchlich. Bei einer nanoskopischen Betrachtung der Prozesse *in vivo* spielen die Mechanismen der Granulabildung eine Rolle, besonders die Aktivität und Anzahl der PHA-Synthase-Moleküle, die gemeinsam mit anderen Proteinen (Phasinen) an der Granulaoberfläche lokalisiert sind. Dieses Enzym katalysiert die Kettenverlängerung, daher war der beobachtete Zusammenhang zwischen Anzahl der Moleküle/Aktivität des Enzyms und dem Molekulargewicht bzw. der Verteilung des Polymers nicht überraschend. Mit steigender Anzahl an Synthase-Molekülen war das Molekulargewicht des Polymers *in vivo* niedriger für rekombinante *E. coli* [SIM et al. 1997] und *Pseudomonas* sp. [HUIJBERTS et al. 1992]. *In vitro*-Untersuchungen mit isolierten Enzymen bestätigten dies [GERNGROSS und MARTIN 1995]. Im Gegensatz dazu wurde für einen rekombinanten *R. eutropha*-Stamm keine Abhängigkeit des mittleren Molekulargewichtes und der -verteilung von der PHA-Synthase-Aktivität gefunden. Nach Ansicht der Autoren existieren Substanzen (sog. *chain-transfer agents*), die die Kettenlänge der Polymere regulieren (Polymerketten untereinander verknüpfen) [KICHISE et al. 1999, MADDEN et al. 1999]. In diesem Zusammenhang wird auch die Rolle der granulaassoziierten 16 kD-Proteine diskutiert [STUART et al. 1998; *Paracoccus denitrificans*, MAEHARA et al. 1999; *Pseudomonas putida*, VALENTIN et al. 1998].

Weitere interessante Aspekte sind der vermutete Zusammenhang zwischen Granulagröße und Molekulargewicht [MIDDELBERG et al. 1995, NOBES et al. 2000] sowie die Möglichkeit der

gezielten Steuerung des Molekulargewichtes durch Zugabe von Ethylenglycol (*R. eutropha*, *A. latus*) [ASHBY et al. 1999].

Die mit der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) unter Ammoniumstickstoff-, Phosphat-, Magnesium-, Sulfat- und Kaliummangel akkumulierte PHB ist durch ein reproduzierbar hohes Molekulargewicht von  $\overline{M}_w \geq 2,3 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  und eine Uneinheitlichkeit von 2 gekennzeichnet. PHB aus Methan mit dieser Spezifikation stellt ein *high-tech*-Produkt mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten dar, daher wurde der Name Methanomer<sup>®</sup> geschützt. In ersten Untersuchungen wurde die Eignung des Materials für den Einsatz als Implantatmaterial erbracht [BEHREND et al. 1999, FREIER et al. 2000].

#### 5.2.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR CHEMISCHEN ZUSAMMENSETZUNG DER BIOMASSE

##### → Kapitel 4.4.4.2

Die Untersuchungen der chemischen Zusammensetzung der Biomasse während der PHB-Bildung erbrachte zwei wesentliche Ergebnisse:

- Es existiert eine lineare Korrelation zwischen PHB- und Stickstoffgehalt der Gesamtbio-masse.
- Für Kalium, Phosphat und Eisen existieren intrazelluläre Speicher, die bei entsprechenden Mangelbedingungen im Medium mobilisiert werden können.

Die erste Aussage beruht auf den Analysen der Gesamtbio-masse, die zweite Aussage konnte durch die Betrachtung der berechneten Gehalte in der Restbio-masse gewonnen werden. Wenn man den Einfluß der nur C, H und O enthaltenden PHB auf den Gehalt der Gesamtbio-masse an den anderen Elementen berücksichtigt (also quasi ein „Verdünnungseffekt“), würde man eine konstante Zusammensetzung der Restbio-masse erwarten, was aber nicht für alle Elemente gefunden wurde.

Der direkte Zusammenhang zwischen PHB- und Stickstoffgehalt, der auch als Maß für den Proteingehalt der Zellen steht, deutet auf die gegensätzlich ablaufenden Prozesse hin. Wachstum und Vermehrung sind durch ständige Bildung von Proteinen gekennzeichnet. Unter Nährstoffmangelbedingungen erfolgt die Bildung von PHB, einem intrazellulären, N-freiem Kohlenstoff- und Energiespeicher. Die lineare Korrelation bedeutet, daß die Proteinsynthese unabhängig von den Mangelbedingungen praktisch zum Erliegen kommt, und die somit ungenutzten Kohlenstoffintermediate (wie Acetyl-CoA) für die Synthese von PHB-Monomeren verwendet werden. Dies gilt nicht nur unter Stickstoffmangel, der einen strukturellen Baustein von Aminosäuren betrifft, sondern auch für Mangelbedingungen von Ionen, die als Cofaktoren zahlreicher Enzyme fungieren (Eisen, Magnesium). Die in der Restbio-masse beobachtete Abnahme des Stickstoffanteils um 10–15 % in Prozessen mit hoher PHB-Akkumulation (ca. 50 %) ist schwer zu interpretieren. Denkbar ist, daß sich bei Einlagerung von bedeutenden Mengen PHB (>40 %) unabhängig von den Kultivierungsbedingungen auch geringfügige Änderungen in der Zusammensetzung der PHB-freien Biomasse ergeben.

Der Gehalt der anderen Elemente in der Gesamtbio-masse verringerte sich in allen Fällen mit zunehmendem PHB-Gehalt, eine lineare Korrelation ( $R^2=0,96$ ) wurde jedoch nur für Schwefel

beobachtet. Für Phosphat, Eisen und Kalium sind die Zusammenhänge komplexer, die Abnahme in der Gesamtbiomasse wird also neben dem PHB-Gehalt auch von anderen Prozessen beeinflusst. Stellvertretend sollen hier die Änderungen des Kalium- und Eisengehaltes in Gesamt- und Restbiomasse diskutiert werden.

Kaliumionen sind Bestandteil des Cytosols und befinden sich daher in einem vergleichsweise mobilen Zustand [TEMPEST und WOUTERS 1981]. Zur Aufrechterhaltung der hohen interzellulären Konzentration (i.d.R. 50 mM<sup>1</sup>) existieren sog. Ionenpumpen, die entgegen dem Konzentrationsgradienten ständig Ionen aus dem Medium ins Zellinnere fördern, um die physiologische Kaliumkonzentration in der Zelle aufrechtzuerhalten. Diese transmembranen Ionenflüsse sind meßbar, z.B. mit ionensensitiven Mikroelektroden [SHABALA et al. 2001]. Wird dieser Transport z.B. durch sinkende Kaliumkonzentrationen im Medium erschwert, kann es zu Störungen dieses Gleichgewichtes kommen, verbunden mit einer verstärkten Abgabe von Kalium ins Medium. Bei zu niedriger Konzentration im Cytosol ist mit einer verminderter Stoffwechselaktivität zu rechnen [TEMPEST und WOUTERS 1981, MADIGAN et al. 2001]. Die eigenen Ergebnisse bestätigen diese Aussagen: sowohl in der Gesamt- als auch in der Restbiomasse verringerte sich der Kaliumgehalt. Letzterer Effekt ist im Vergleich zu den oben erwähnten Änderungen für Stickstoff in der Restbiomasse erheblich größer und wird eindeutig durch die Abgabe von Ionen ins Medium verursacht. Durch Verschiebungen im osmotischen Gleichgewicht der Zelle (wahrscheinlich durch das Unterschreiten einer intrazellulär kritischen Kaliumkonzentration) ist die Stoffwechselaktivität so gering, daß es zu einer deutlich meßbaren Akkumulation von Kaliumionen im Medium kommt und nicht zu deren Wiederaufnahme, verbunden mit erneutem Biomassewachstum.

Eisen ist essentieller Bestandteil der MMO, von Cytochromen und vielen anderen Enzymen der Bakterienzelle. In der Gesamtbiomasse war unter Eisenmangel bei geringer Akkumulation von PHB (11 %) eine deutliche Abnahme des Eisengehaltes zu erkennen (um 50 %). Bei Unterschreitung eines kritischen Niveaus ( $c_{\text{Fe,R}}/c_{\text{Fe,R,0}} < 0,5$ ) in der Gesamtbiomasse kam es zu keiner weiteren Konzentrationsänderung. Dies spricht für die Annahme, daß beim Unterschreiten einer essentiellen Eisenkonzentration sämtliche Stoffwechselaktivitäten fast vollständig eingestellt wurden, wobei auch die PHB-Synthese stagnierte. In der Restbiomasse sanken die Eisengehalte ebenfalls (auf ca. 60 %), die mobilisierten Ionen wurden jedoch offenbar zur Bildung neuer Biomasse genutzt (Zunahme der Restbiomasse über den aus dem zu Beginn vorhandenen Überschuß an Eisenionen im Medium ( $c_{\text{Fe,L}}/Y_{\text{Fe/X}}$ ) berechneten Wert hinaus), und die Eisenkonzentration im Medium blieb unverändert.

### 5.3 Prozeßmodell

#### → Kapitel 2.3 und Kapitel 4.5

Mit dem für den untersuchten Prozeß erarbeiteten strukturierten Modell können die wichtigsten Reaktionen beschrieben und Veränderungen bei Variation der verfahrenstechnischen Einflußgrößen simuliert werden. Trotz der getroffenen Vereinfachungen zeigte der Vergleich mit

---

<sup>1</sup> entspricht 1950 mg K<sup>+</sup> l<sup>-1</sup> [TEMPEST und WOUTERS 1981]

experimentellen Daten gute Übereinstimmung. Auf der Basis des dargestellten Modells ist eine Erweiterung zu einem strukturierten, segregierten Modell möglich, mit dem auch die Wechselwirkungen der Einzelkomponenten der Mischkultur beschrieben werden könnten. Bei Kenntnis der entsprechenden kinetischen Parameter wäre außerdem die Darstellung der Stickstoffumwandlungsprozesse in Abhängigkeit der entsprechenden Einflußparameter denkbar. Als Anhaltspunkt könnte dabei ein von FURIGO und JORGENSEN (1993) beschriebenes Modell dienen.

#### 5.4 Charakterisierung und Stabilität der methanverwertenden Mischkultur GB 25

##### → Kapitel 2.2.3.3, Kapitel 4.6

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) durchgeführt. Der Einsatz von Methan als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle schafft einen Selektionsvorteil für methanotrophe Bakterien und ermöglicht so die Kultivierung unter unsterilen Bedingungen. Unter den definierten Kultivierungsbedingungen ( $T=38^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=5,7$ ,  $\gamma_{\text{CH}_4/\text{O}_2}=1,35-1,45$ ) einer chemostatischen Sauerstofflimitation ( $D=0,167\text{ h}^{-1}$ ) wurde die Existenz einer über mehrere Jahre stabilen Mischkultur nachgewiesen. Dieser Vorteil ermöglicht eine ungewöhnliche Variante der Herstellung von Impfmateriäl. Die in den Bioreaktoren UD 5 und UD 50 angezogene Biomasse mit hohen Zelldichten ( $15$  bzw.  $18\text{ g l}^{-1}$ ) kann nach Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zu drei Monate ohne Aktivitätsverlust, *lag*-Phase und Veränderungen der Zusammensetzung eingesetzt werden.

Auf der Basis von mikrobiologischen, Fettsäure- und molekularbiologischen Analysen wurden folgende Ergebnisse erreicht:

- In der Mischkultur wurde der methanotrophe Stamm *Methylocystis* sp. GB 25 mittels polyklonaler Antikörper nachgewiesen. Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde durch Kreuztests mit sechs Reinkulturen nachgewiesen.
- GB 25 nimmt an der Gesamtbiomasse einen Anteil von  $> 86\%$  ein, nach Zellzahl beträgt dieser Anteil  $60\%$ .
- Am Gesamtzellvolumen hat *Methylocystis* sp. GB 25 einen Anteil von über  $95\%$ .
- Neben GB 25 wurde in der Mischkultur eine weitere methanotrophe Komponente gefunden (MA1, Anteil ca.  $1\%$ ).
- Die Begleitorganismen können auf Grund der Substratspezifität in zwei Gruppen eingeteilt werden: methylootrophe Bakterien (MO) und andere heterotrophe Bakterien (NA), deren Anteile etwa gleich waren.
- Die Stabilität dieser Mischkultur wurde für den Zeitraum November 1997 bis April 2000 nachgewiesen.

Die Zusammensetzung der Mischkultur ist in Abb. 5-3 veranschaulicht.



kultur konnte in der Kulturflüssigkeit jedoch kein Methanol nachgewiesen werden [WENDLANDT 1997]. Dies könnte mit sehr niedrigen  $K_S$ -Werten der Methanolverwerter begründet werden, wie sie z.B. von HARRISON (1978) angegeben werden (Tabelle V-12).

Tabelle V-12: Sättigungskonstanten für die enzymatische Verwertung von Methan und Methanol durch eine methanverwertende Mischkultur bzw. einen methylo- trophen Stamm

| Substrat | Sättigungskonstante $K_{S,i}$ [mM] |   |
|----------|------------------------------------|---|
|          | Methanverwertende Mischkultur      | Methylo- tropher Begleitorganismus ( <i>Hyphomicrobium</i> sp.) |
| Methan   | 0,019                              | –   |
| Methanol | 2,9                                | 0,008   |

Der Stamm *Methylocystis* sp. GB 25 ist nicht vitamin- und wachsstoffabhängig [WENDLANDT et al. 1981], daher könnten die Wechselwirkungen in der Mischkultur folgender Struktur sein (Abb. 5-4):

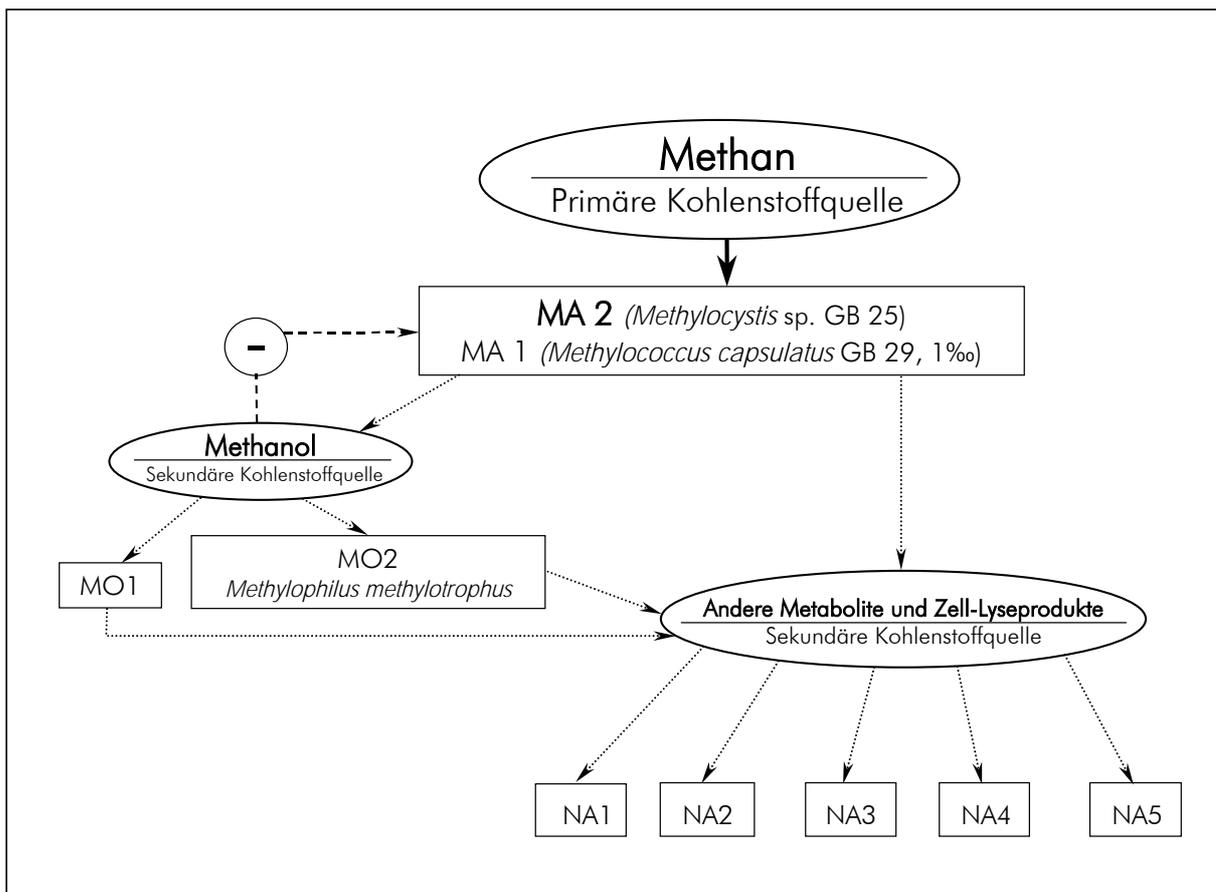


Abb. 5-4: Vorgeschlagene Struktur der Wechselwirkungen in der untersuchten methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25)

Durch verschiedene mikrobiologische Untersuchungen sollte die Zusammensetzung der Mischkultur quantitativ erfaßt werden. Dies war schließlich möglich, weil durch Kombination verschiedener Methoden auch zunächst uneindeutige Ergebnisse interpretiert werden konnten. So konnten die Ergebnisse der mikroskopischen Zellzahlbestimmungen während der kontinuierlichen Wachstumsprozesse trotz großer Standardabweichungen durch spätere Messungen am Coulter-Counter bestätigt werden. Der Coulter-Counter sollte in zukünftigen Untersuchungen unbedingt genutzt werden, da so schnelle und präzise Aussagen über Zellzahl und (anhand der Größenverteilung) Kulturzusammensetzung getroffen werden können. Die KBE für die methanotrophen Hauptkomponente wurde wegen mangelnder Einzelkoloniebildung nicht bestimmt. Die Quantifizierung der Begleitflora dagegen, durch Coulter-Counter-Messungen bzw. mikroskopisch nicht möglich, konnte durch die Bestimmung der KBE erfolgen, wie auch die Detektion des zweiten methanotrophen Isolates. Durch orientierende MPN-Analysen wurde ein Verhältnis der drei Substratverwertungstypen MA:MO:NA von 1:1:1 abgeschätzt. Zusammenfassend kann abgeleitet werden, daß Methanolverwertende und andere Heterotrophe je einen Anteil von 50 % an der Zellzahl der **Begleitorganismen** haben. Den mikroskopisch gezählten Anteil der Methanotrophen (60 % nach Zellzahl) spiegeln diese Analysen jedoch nicht wider (nur 33 % nach MPN). Da die Methode der MPN vorrangig für Proben mit insgesamt niedrigen Keimzahlen, wie Wasserproben, eingesetzt wird und außerdem nur wenig experimentelle Daten vorliegen, sollten die gefundenen Ergebnisse kritisch betrachtet und diese Methode in zukünftigen Untersuchungen nicht eingesetzt werden. Bei der Interpretation muß weiterhin beachtet werden, daß die Analysen der Volumen- und Biomasseanteile eine größere Bedeutung haben. Daher wurden Größenanalysen und Messungen zur Bestimmung der **Volumen**verteilung durchgeführt, wobei die Dominanz von *Methylocystis* sp. GB 25 mit einem Anteil von > 95 % eindeutig nachgewiesen wurde. Ähnliche Größenordnungen werden für andere Mischkulturen methanotropher Bakterien in kontinuierlichen Prozessen angegeben: für *M. capsulatus* ein Biomasseanteil > 91 % [FURIGO und JÓRGENSEN 1993], für *Methylomonas* sp. ein Anteil von 94,2 % nach Zellzahl. In letzterem Beispiel sind die Begleitorganismen nach KBE zu 4,7 % Methanolverwerter und zu 1,1 % andere heterotrophe Species [WILKINSON et al. 1994].

Der Nachweis der methanotrophen Hauptkomponente durch GB 25-spezifische polyklonale Antikörper in Kombination mit Immunofluoreszenz war verläßlich möglich, da in Kreuzreaktionen die Spezifität der Antikörper nachgewiesen wurde (Tabelle IV-38). Auch von anderen Autoren wird diese Methode genutzt, um spezifische Organismen in Mischkulturen zu detektieren [PELZ et al. 1999]. Die Anwendung von FISH (*fluorescence in situ hybridisation*) ist für diesen Zweck ungeeignet, da hier nur in den seltensten Fällen Species unterschieden werden können [AMANN et al. 2001]. Für Methanotrophe des Typ II waren außerdem bis zum Jahr 2000 Sonden verfügbar, mit denen eine Differenzierung der Gattungen *Methylocystis* und *Methylosinus* möglich war. Die dann von BOURNE et al. (2000) beschriebene Sonde für *Methylocystis* lieferte mit der Mischkultur GB 25 ein negatives Ergebnis. In jüngsten Veröffentlichungen werden ebenfalls Probleme beim Einsatz dieser Sonde beschrieben und neue Varianten vorgestellt [ELLER et al. 2001, ELLER und FRENZEL 2001, GULLEDGE et al. 2001].

Wie allerdings in den Untersuchungen mit dem Stamm GB 14 gezeigt wurde, ist die Fähigkeit zur PHB-Bildung zweier Vertreter der Gattung *Methylocystis* deutlich unterschiedlich, so daß eine speciesspezifische Identifizierung erfolgen muß.

Die Fettsäureanalysen von Proben der Mischkultur, zu verschiedenen Zeitpunkten aus Wachstumsprozessen gewonnen, erbrachten zwei wichtige Ergebnisse:

- Hauptkomponente der Mischkultur ist ein Typ II-Methanotropher (Anteil von > 86 % der Gesamtfettsäuren).
- Das spezifische Fettsäuremuster der Mischkultur zeigte über den Untersuchungszeitraum 11/97–04/00 keine Änderungen.

Mit dem Nachweis der für Typ II-Methanotrophe charakteristischen ungesättigten 18:1-Fettsäuren wurden Befunde aus der Literatur bestätigt und so die methanotrophe Hauptkomponente in der Mischkultur identifiziert. Tabelle V-13 zeigt einen Vergleich von publizierten und eigenen Ergebnissen. Die Resultate werden außerdem durch Befunde einer sterilen Kultivierung der methanotrophen Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25 bestätigt. Über die Detektion methanotropher Bakterien in mikrobiellen Gemeinschaften unter Umwelbedingungen durch FAME-Analysen wird in zahlreichen Veröffentlichungen berichtet [BAI et al. 2000, BULL et al. 2000, FANG et al. 2000].

Tabelle V-13: Fettsäuren methanotropher Bakterien (bestimmt als #FAME oder \*PLFA)  
[a) NICHOLS et al. 1985; b) GUCKERT et al. 1991; c) BOWMAN et al. 1991]

| Organismus                        | Anteil an Gesamtfraktion [%] |                  |                  |                  |                  |                  | Quelle       |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|
|                                   | 16:1 $\omega$ 8c             | 16:1 $\omega$ 7c | 16:1 $\omega$ 5c | 18:1 $\omega$ 9c | 18:1 $\omega$ 8c | 18:1 $\omega$ 7c |              |
| Typ I                             |                              |                  |                  |                  |                  |                  |              |
| <i>Methylomonas</i> sp.           | 30,0                         | 17,8             | 16,3             | 0,3              |                  | 1,5              | a)#          |
| <i>Mm. methanica</i>              | 40,9                         | 10,8             | 0,8              |                  |                  | 0,2              | b)*          |
| <i>Mm. methanica</i>              | 41,3                         | 9,8              | 1,9              |                  |                  | 0,1              | c)*          |
| <i>Methylococcus capsulatus</i>   |                              | 18,7             | 12,4             |                  |                  | 0,8              | b)*          |
| <i>Mc. luteus</i>                 |                              | 57,4             | 7,8              |                  |                  | 3,1              | c)*          |
| Typ II                            |                              |                  |                  |                  |                  |                  |              |
| <i>Methylosinus trichosporium</i> |                              | 9,0              |                  |                  | 49,2             | 25,1             | a)#          |
| <i>Ms. trichosporium</i>          |                              | 10,7             |                  |                  | 62,0             | 17,4             | b)*          |
| <i>Ms. trichosporium</i>          |                              | 14,2             |                  |                  | 67,5             | 1,31             | c)*          |
| <i>Ms. sp.</i>                    |                              | 15,2             |                  | 32,3             | 32,3             | 10,5             | b)*          |
| <i>Ms. sporium</i>                |                              | 9,3              |                  | 0,2              |                  | 78,7             | c)*          |
| <i>Methylocystis parvus</i>       |                              | 0,7              |                  |                  | 64,7             | 12,5             | b)*          |
| <i>Methylocystis</i> sp.<br>GB 25 |                              |                  |                  |                  | 63,6             | 35,3             | diese Arbeit |

Auf der Grundlage des Anteils spezifischer Fettsäuren an der Gesamtmenge können Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der gesamten Biomasse gezogen und Änderungen durch Verschiebungen im Fettsäurespektrum erkannt werden [NICHOLS et al. 1987, SUNDH et al. 1995, WHITE et al. 1996, MACNAUGHTON et al. 1999]. Daher kann abgeleitet werden, daß die dominante methanotrophe Species einen Anteil von > 86 % an der Gesamtbiomasse einnahm und die Zusammensetzung der Gemeinschaft über den beobachteten Zeitraum stabil (im Sinne von gleich) war.

Die Befunde der  $^{13}\text{C}$ -Analysen stimmen mit der Theorie der Fraktionierung überein und bestätigen somit die Ergebnisse der Fettsäureanalytik. Die gemessene Erhöhung des Anteil von  $^{13}\text{C}$  im Methan-Abgas sowie eine unterschiedliche  $^{13}\text{C}$ -Abreicherung in den Bestandteilen der Zellbiomasse (die z.B. in Lipiden höher ist im Vergleich zu Proteinen) werden ebenfalls in einem Übersichtsartikel über die Kohlenstofffraktionierung durch Methanotrophie beschrieben [ZYAKUN und ZAKHARCHENKO 1998]. Die für *Methylocystis* sp. GB 25-Mischkultur berechnete Isotopenfraktionierung von  $\alpha=1,036$  ist mit einem Fraktionierungsgrad von  $\alpha=1,033-1,039$  für *Methylomonas methanica* ( $c_x > 15 \text{ g l}^{-1}$ ) vergleichbar [ZYAKUN und ZAKHARCHENKO 1998]. Ähnliche Befunde sind in weiteren Arbeiten zu finden [BOSCHKER et al. 1998, NOLD et al. 1999, BULL et al. 2000]. Die eigenen Ergebnisse stimmen zudem gut mit Literaturdaten von JAHNKE et al. (1999) überein, wenn man die Differenz in den  $\delta\text{-}^{13}\text{C}$ -Werten zwischen Methan und Biomasse bzw. Fettsäure (Tabelle V-14) betrachtet und unterstreichen die Eignung dieser Methode zur Detektion von Methanotrophen in mikrobiellen Gemeinschaften anhand der Fettsäuren als spezifische Biomarker.

Tabelle V-14: Vergleich der Änderungen der  $^{13}\text{C}$ -Isotopensignatur von Methan (Substrat) und Biomasse bzw. C18:1-Fettsäuren methanotropher Bakterien (Produkt)

| Differenz in $\delta\text{-}^{13}\text{C}$ -Werten |                               | Anteil C18:1<br>an Gesamt-FAME | Mikroorganismus<br>[Quelle]                          |
|--|-------------------------------|--------------------------------|--|
| CH <sub>4</sub> zu Biomasse                        | CH <sub>4</sub> zu C18:1-FAME |                                |  |
| ‰  | ‰                             | %                              |  |
| -14,1  | -26,8                         | 85,9                           | <i>Ms. trichosporium</i><br>[JAHNKE et al. 1999]     |
| -9,8   | -20,5                         | 90,1                           | <i>Methylocystis</i> sp. GB 25<br>(MK), diese Arbeit |

Molekularbiologische Untersuchungen unterstützten in erster Linie die Aussage zur Stabilität der Mischkulturzusammensetzung. Weiterhin wurden die 16S-rDNA-Sequenzen der methanotrophen Hauptkomponente GB 25 (als Reinkultur und als Rückisolat MA2), des methanotrophen Isolates MA1 und des dominierenden Methanolverwerters MO2 bestimmt und mit Hilfe von ARB eine phylogenetische Einordnung in die Gruppen der  $\alpha$ -Proteobakterien (GB25, MA2),  $\gamma$ -Proteobakterien (MA1) bzw.  $\beta$ -Proteobakterien (MO2) ermittelt. BLAST-Sequenzvergleiche auf Basis der Gendatenbank des NCBI bestätigten diese Zuordnung der Bakterien und ergaben die höchsten Ähnlichkeiten für die Gattung *Methylocystis* (*M. parvus*: 98 %) für GB 25

und MA2, *Methylococcus* (*M. capsulatus*: 97 %) für MA1 bzw. *Methylophilus* (*M. methylophilus*: 97 %) für MO2.

Die DGGE ist eine etablierte Methode zur Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften, auch von methanotrophen Bakterien. Dabei können universelle Bereiche der 16S-rDNA analysiert (meist V3-Region) oder auch spezifische Primer für funktionelle Gene (MMO, MDH) verwendet werden [JENSEN et al. 1998 (V3), HENCKEL et al. 1999 (V3, MMO, MDH), WISE et al. 1999 (V3), IWAMOTO et al. 2000 (MMO), HENCKEL et al. 2000 (MMO), GILBERT et al. 2000 (V3, MMO)].

Die eigenen Untersuchungen mittels PCR-DGGE waren besonders zu Beginn von methodischen Schwierigkeiten begleitet. Die Hauptprobleme waren:

- die Reproduzierbarkeit des Gradienten,
- teilweise schwaches Auftreten oder Ausbleiben der Bande, die der methanotrophen Species MA2 zugeordnet wurde,
- das Auftreten von Doppelbanden bei Isolaten und Reinkulturen.

Die Proben der Mischkultur ergaben ein spezifisches Bandenmuster aus (je nach Gel und Gradient) 5–10 Einzelbanden. Innerhalb eines Geles waren dabei keine Unterschiede für zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommene Proben zu erkennen, was ein weiteres Indiz für die Stabilität der untersuchten Mischkultur ist.

Die Zuordnung von Banden in der Mischkultur gelang auf Grund der genannten Probleme nur teilweise, in gelungenen Gelen konnten zwei Isolate auf Nähragar, zwei Methanolverwerter und eine Bande methanotropher Bakterien detektiert werden. Um die entsprechenden Banden sicher zuzuordnen, hätten diese ausgeschnitten und die DNA eluiert werden müssen, um über Klonierungs- bzw. Reamplifizierungsschritte sequenzierungsfähige DNA gewinnen zu können und in Sequenzvergleichen eine zweifelsfreie Zuordnung zu sichern. Diese zeit- und arbeitsaufwendigen Schritte waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Das Auftreten von Doppelbanden wurde bei der Verwendung von universellen Primern auch von anderen Autoren beschrieben [u.a. FÜHR 1996, SMALLA et al. 1998]. SMALLA et al. (1998) führen das Auftreten von mehreren Banden bei einem Stamm auf die Heterogenität der 16S-rDNA Operone zurück, d.h. bei unterschiedlicher Anzahl von Operonen können DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge amplifiziert werden. Eine Ursache für Doppelbanden bei der Verwendung von spezifischen Primern könnten Polymorphismen sein. So wurde die Existenz von mindestens zwei Genen zur Kodierung der pMMO-Sequenzen in *Methylococcus capsulatus* [STOYLER et al. 1999], *Methylosinus trichosporium OB3b* und *Methylocystis* sp. M [GILBERT et al. 2000] beschrieben.

Ein Vergleich der Ergebnisse der molekularbiologischen und der klassischen mikrobiologischen Untersuchungen ist problematisch. Die DGGE zeigte fünf bis sieben Hauptbanden – die Anzahl der Isolate und Anreicherungskulturen nach vierwöchiger Kultivierung betrug neun. Dabei traten bei wiederholter Überimpfung Probleme auf, weil einzelne Isolate nach mehreren Passagen das Wachstum einstellten. Das könnte ein Hinweis darauf sein, daß diese nur einen unbedeutenden Anteil der Mischkultur ausmachen. Bei höheren Verdünnungsstufen konnten

nur noch 2–3 Kolonietypen identifiziert werden. Diese stellten den Hauptteil der Begleitorganismen dar und waren im DGGE-Bandenmuster deutlich ausgeprägt.

Die PCR-DGGE war prinzipiell zur Charakterisierung der Mischkultur und zum Nachweis der Stabilität der Zusammensetzung im Bioreaktor geeignet. Mit den verwendeten universellen Primern wurden zahlreiche Bakterienarten erfasst, und den wichtigsten Komponenten konnten bestimmte Banden zugeordnet werden. Bei Lösung der technischen Probleme und bei Vorhandensein eines kompletten Satzes von Isolatentypen könnte nach Probenahme, DNA-Extraktion und PCR in kurzer Zeit (24–48 h) eine Analyse der Mischkultur im Vergleich zu den definierten Standardkomponenten erfolgen. Dabei wären Aussagen sowohl über die Stabilität als auch Dynamik, z.B. bei Prozessstörungen, in der Zusammensetzung möglich. Bei Betrachtung aller Einflusfaktoren scheint die Etablierung der DGGE als Standardkontrollverfahren jedoch mit erheblichem materiellem und personellem Aufwand verbunden und hinge nicht zuletzt von administrativen Erfordernissen ab (z.B. Validierung des Verfahrens für die zertifizierte Herstellung von PHB als Medizinprodukt).

Zusammenfassend können aus der Gesamtheit aller angewandten Methoden aus den Bereichen der Mikrobiologie, chemischen Analytik und Molekularbiologie klare Aussagen über die Zusammensetzung und Stabilität der Mischkultur abgeleitet werden. Die Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25 nimmt an der Biomasse einen Anteil von > 86 % ein. Die Begleitorganismen bilden zwei Gruppen bezüglich der Substratverwertung. Die methanverwertende Mischkultur GB 25 war über den Zeitraum der Bearbeitung stabil zusammengesetzt. Diese Tatsache spiegelt sich auch in den reproduzierbaren Leistungen (maximaler PHB-Gehalt, Effektivität der Produktbildung, Molekulargewicht des Polymers) wider.

Im Gegensatz zu Prozessen der Abwasserreinigung, des Schadstoffabbaus in der Umwelt [ROGERS et al. 2000] oder zur Herstellung von Lebensmitteln [SODINI et al. 2000] werden stabile Mischkulturen für Prozesse zur Gewinnung von Wertstoffen, wie z.B. PHB, äußerst selten genutzt. Beschrieben wurde die Möglichkeit, eine Mischkultur aus *Propiobacterium freudenreichii* und *R. eutropha* für die biotechnologische Herstellung von Vitamin B12 einzusetzen, wobei *R. eutropha* Stoffwechselprodukte mit inhibierender Wirkung (Propionsäure, Essigsäure) auf *P. freudenreichii* assimiliert [MIYANO et al. 2000]. Während die Produktivität der Produktsynthese mit der Mischkultur nur etwa 50 % im Vergleich zu einem alternativen Verfahren (Zellrecycling) beträgt, konnte die Ausbeute um den Faktor 4 erhöht werden.

Ein anderes Konzept zur Synthese von P(3-HB) unter Verwendung einer aus zwei Organismen bestehenden Mischkultur verfolgen KATOH et al. (1999), TOHYAMA und SHIMIZU (1999) und TOHYAMA et al. (2000). *R. eutropha* wird dabei zusammen mit *Lactobacillus delbrueckii* in einem Bioreaktor kultiviert, wobei Glucose durch *L. delbrueckii* zu Lactat umgewandelt wird, welches dann als Substrat für *R. eutropha* dient. Die von TOHYAMA et al. (2000) angegebenen maximalen Werte der Produktivität  $r_{\text{PHB}} = 0,3 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bei PHB-Konzentrationen von  $12 \text{ g l}^{-1}$  und Ausbeutekoeffizienten von  $Y_{\text{PHB/S}} = 0,24 \text{ g g}^{-1}$  sind deutlich niedriger im Vergleich zu den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen. Insgesamt ist fraglich, ob das verfolgte Konzept der Umwandlung von Glucose (die zuvor enzymatisch aus Lebensmittelabfällen gewonnen werden

soll) in Lactat ein effektiveres Verfahren ermöglicht als der Einsatz von lactathaltigen Abprodukten.

## 5.5 Eigenschaften des Polymers

### → Kapitel 4.4.6

Das unter Ammoniumstickstoff-, Phosphat-, Sulfat-, Kalium- und Magnesiummangel in 12–24 h gebildete Biopolymer aus Methan zeichnet sich durch ein hohes Molekulargewicht ( $\bar{M}_w > 2 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ ) und eine enge Molekulargewichtsverteilung (nach Gleichung 2.4,  $U \leq 2,5$ ) aus. Es handelt sich um ein Homopolymer der 3-Hydroxybuttersäure. Die Gewinnung einer hochreinen PHB, die bezüglich Stickstoff- und Schwermetallgehalten den Anforderungen<sup>1</sup> an den Einsatz in der Medizin erfüllt, ist momentan nur mittels Lösungsmittelextraktion (1,2-Dichlorethan)<sup>2</sup> möglich. Für ein Produkt dieser Spezifikation, wie es reproduzierbar aus Methan hergestellt werden kann, wurde der Markenname Methanomer<sup>®</sup> eingetragen. Die Biokompatibilität dieses Materials wurde durch Kooperationspartner nachgewiesen und ist auch gegeben, wenn ein Ergas-Modellgemisch anstelle von Methan als Kohlenstoffsubstrat eingesetzt wurde. Die Schmelztemperatur und die mechanischen Kennwerte (Elastizitätsmodul, Zugdehnung) von Methanomer sind mit für PHB veröffentlichten Eigenschaften vergleichbar [DOI 1990, VAN DER WALLE et al. 2001].

Die Verarbeitbarkeit und verschiedene potentielle Anwendungsmöglichkeiten wurden in Kooperation untersucht. Erste positive Ergebnisse wurden bei der Herstellung von Koronar-Stents, *patches* für den Gastrointestinalbereich und der Herstellung bzw. Beschichtung von resorbierbaren Zellträgern (*scaffolds*) für *tissue engineering* erzielt. Methanomer<sup>®</sup> kann zu Fäden versponnen und zu Flächegebilden gestrickt werden [IPF 2000, FREIER et al. 2000, 2000a, LÖBLER et al. 2000].

## 5.6 Alternativkulturen zur PHB-Synthese

### → Kapitel 4.7.3

Im Screening weiterer methanotropher Bakterien bezüglich des PHB-Bildungspotentials bestätigte sich prinzipiell, daß Vertreter des Serin-Stoffwechsels durch höhere PHB-Akkumulation gekennzeichnet sind [TROTSENKO et al. 1992]. Diese war für die Stämme GB 4 und GB 12 (Typ II) maximal (20,3 bzw. 18,4 %), die zwei untersuchten Vertreter des Typ I (MA 1, GB 130) wiesen PHB-Gehalte von < 1 % auf.

Für die weiteren Untersuchungen wurde jedoch der Stamm *Methylocystis* sp. GB 14 ausgewählt, dessen Fähigkeit, PHB zu bilden, außerdem im Zusammenhang mit dem cometabolischen Abbau von TCE interessant sein könnte. In orientierenden Voruntersuchungen in Kleinstbioreaktoren (200 ml-Maßstab) konnten PHB-Gehalte bis 34 % realisiert werden.

Kultivierungen im UD 5 erfolgten mit zwei verschiedenen Stickstoffquellen mit dem Ziel, orientierende Werte für Ausbeutekoeffizienten zu bestimmen und eine Charakterisierung des Poly-

---

<sup>1</sup> Anforderungsprofil des Instituts für Biomedizinische Technik der Universität Rostock.

<sup>2</sup> nach Gefriertrocknung der Biomasse

mers hinsichtlich des erreichbaren Molekulargewichts durchzuführen. Schon während der Wachstumsprozesse war ein deutlicher Unterschied zwischen Ammonium- und Nitrationen als Stickstoffquelle erkennbar, der sich bereits in theoretischen Ableitungen zum Energiebedarf der Biomassebildung ergibt [ROELS 1980, HEIJNEN und VANDIJKEN 1992] und u.a. für Methanotrophe experimentell ermittelt wurde (*Methylococcus capsulatus*) [LEAK et al. 1985, LEAK und DALTON 1986a, 1986b].

Die beobachteten Differenzen spiegeln sich auch in den ermittelten Ausbeuten für die Biomassebildung wider ( $Y_{X/CH_4}$ : 0,56 ( $NH_4^+$ ) bzw. 0,36  $g\ g^{-1}$  ( $NO_3^-$ )). Die PHB-Gehalte für Prozesse unter Ammoniumstickstoffmangel<sup>1</sup> waren höher (33 % gegenüber 23 %), ebenso wie die spezifischen PHB-Bildungsraten. Hierbei muß angemerkt werden, daß die Datenbasis zur endgültigen Beurteilung der gefundenen Unterschiede nicht ausreicht.

Die Kultivierungen im Bioreaktor bestätigen frühere Befunde aus Schüttelkolbenexperimenten, nach denen *Methylocystis* sp. GB 14 gegenüber *Methylocystis* sp. GB 25 ein geringeres Leistungspotential (d.h. eine geringere Wachstumsrate) besitzt (Tabelle V-15). Die wesentlich höheren Wachstumsraten im Bioreaktor können mit den deutlich verbesserten Stoffübergangsraten und der Möglichkeit der pH-Wert-Regelung erklärt werden, weiterhin ist der positive Einfluß der Kultivierung als Mischkultur denkbar.

Tabelle V-15: Vergleich der maximalen spezifischen Wachstumsraten der untersuchten methanotrophen Stämme *Methylocystis* sp. GB 25 und GB 14 bei Kultivierungen unter verschiedenen Bedingungen

| Bedingungen    |             | GB 25 | GB 14              | Quelle                                  |
|----------------|-------------|-------|--------------------|---|
| Schüttelkolben | Reinkultur  | 0,147 | 0,068              | GROBE 1998                              |
| Bioreaktor     | Mischkultur | 0,29* | 0,125 <sup>#</sup> | *SCHNEIDER et al. 1983<br>#diese Arbeit |

Das gewonnene Polymer aus Prozessen mit der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponenten *Methylocystis* sp. GB 14) mit verschiedenen Stickstoffquellen zeigte (für  $t=12$  h) mit durchschnittlich  $1,5 \times 10^6\ g\ mol^{-1}$  und  $U=3,75$  keine Unterschiede in Molekulargewicht und -verteilung. Im Vergleich zu PHB aus *Methylocystis* sp. GB 25 waren die Werte, bestimmt mit GPC und Viskosimetrie, 30–35 % niedriger. Das ist ein Hinweis darauf, daß hohe Molekulargewichte wie  $2,3 \times 10^6\ g\ mol^{-1}$  und niedrige Uneinheitlichkeiten von  $U=2$  (GB 25 unter Stickstoffmangel) nicht mit allen Vertretern der Gattung *Methylocystis* erreichbar sind.

Zusammenfassend kann abgeleitet werden, daß in orientierenden Untersuchungen mit der alternativen Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 14) keine Verbesserungen der Ergebnisse bezüglich Wachstumsrate, PHB-Gehalt, spezifischen Ausbeutekoeffizienten für Bildung von Biomasse und PHB sowie Molekulargewicht des Polymers gegenüber der bisher verwendeten Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25) erzielt werden konnten.

<sup>1</sup> Anzucht mit Ammonium. Während der PHB-Synthese waren weder Nitrat noch Nitrit im Medium nachweisbar.

## 5.7 Ableitung von Empfehlungen für die Prozeßführung zur PHB-Synthese aus Methan

Basierend auf den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen und der in Kapitel 4.1 festgelegten Kriterien lassen sich Empfehlungen für die Prozeßführung zur Synthese von PHB aus Methan mit der Mischkultur *Methylocystis* sp. GB 25 ableiten.

Das Gesamtverfahren wird zweistufig durchgeführt. Der Wachstumsprozeß unter kontinuierlichen (siehe Kapitel 4.3.2, Seite 93); die PHB-Synthese unter diskontinuierlichen Bedingungen (siehe Tabelle IV-15). Wachstum und PHB-Synthese sollten in getrennten Bioreaktoren realisiert werden. Durch Verschaltung dieser wäre es möglich, mit einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor zur Anzucht der Biomasse mehrere Produktbildungsreaktoren zu versorgen und damit eine quasikontinuierliche PHB-Produktion zu realisieren. Dabei müßte die Anzahl und Volumen der Reaktoren entsprechend der Durchflußrate und des Zeitraums der PHB-Synthese angepaßt werden. In Abb. 5-5 ist ein fiktives Schema für die Herstellung von 2,2 t/a PHB höchster Reinheit für medizinische Anwendungen (Variante A) bzw. 5,66 t/a PHB einer Reinheit von  $\leq 98$  % für andere Zwecke (Variante B) dargestellt.

Bei der Entscheidung über die Art der Mangelbedingung und die Dauer der einzelnen Phasen müssen verschiedenen Aspekte berücksichtigt werden. Legt man eine Prozeßdauer von 24 h zu Grunde sollte die PHB-Synthese unter Phosphatmangelbedingungen durchgeführt werden, da im Vergleich zu Prozessen unter Ammoniumstickstoffmangel trotz gleicher maximaler PHB-Gehalte, spezifischer Bildungsraten und methanbezogener Ausbeutekoeffizienten höhere mittlere Produktivitäten (Abb. 5-2) realisierbar sind.

Aus dem Vergleich der mittleren spezifischen PHB-Bildungsraten (Abb. 5-1) bzw. Produktivitäten (Abb. 5-2) leitet sich bei einer Verkürzung der PHB-Synthese auf 12 h eine potentielle Steigerung der Kennziffern um 30 % ab. Dies kann jedoch nicht endgültig empfohlen werden, da der PHB-Gehalt nach 12 h unter Phosphatmangel erst 75–80 % des Maximalwertes erreicht. Im Hinblick auf das Gesamtverfahren bedeutet das eine Erhöhung der Kosten für die Aufarbeitung/Extraktion des Polymers. Weil nach 12 h unter Ammoniumstickstoffmangel der Endwert des PHB-Gehaltes bereits zu 90 % realisiert, die mittlere Produktivität jedoch niedriger ist, müßte die Entscheidung zwischen den Varianten:

- a) Ammoniumstickstoffmangel, Dauer: 12 h
- b) Phosphatmangel, Dauer: 24 h

getroffen werden. Ein wichtiges Entscheidungskriterium ist dabei die Höhe der Aufarbeitungskosten für die Biomasse in Abhängigkeit vom PHB-Gehalt.

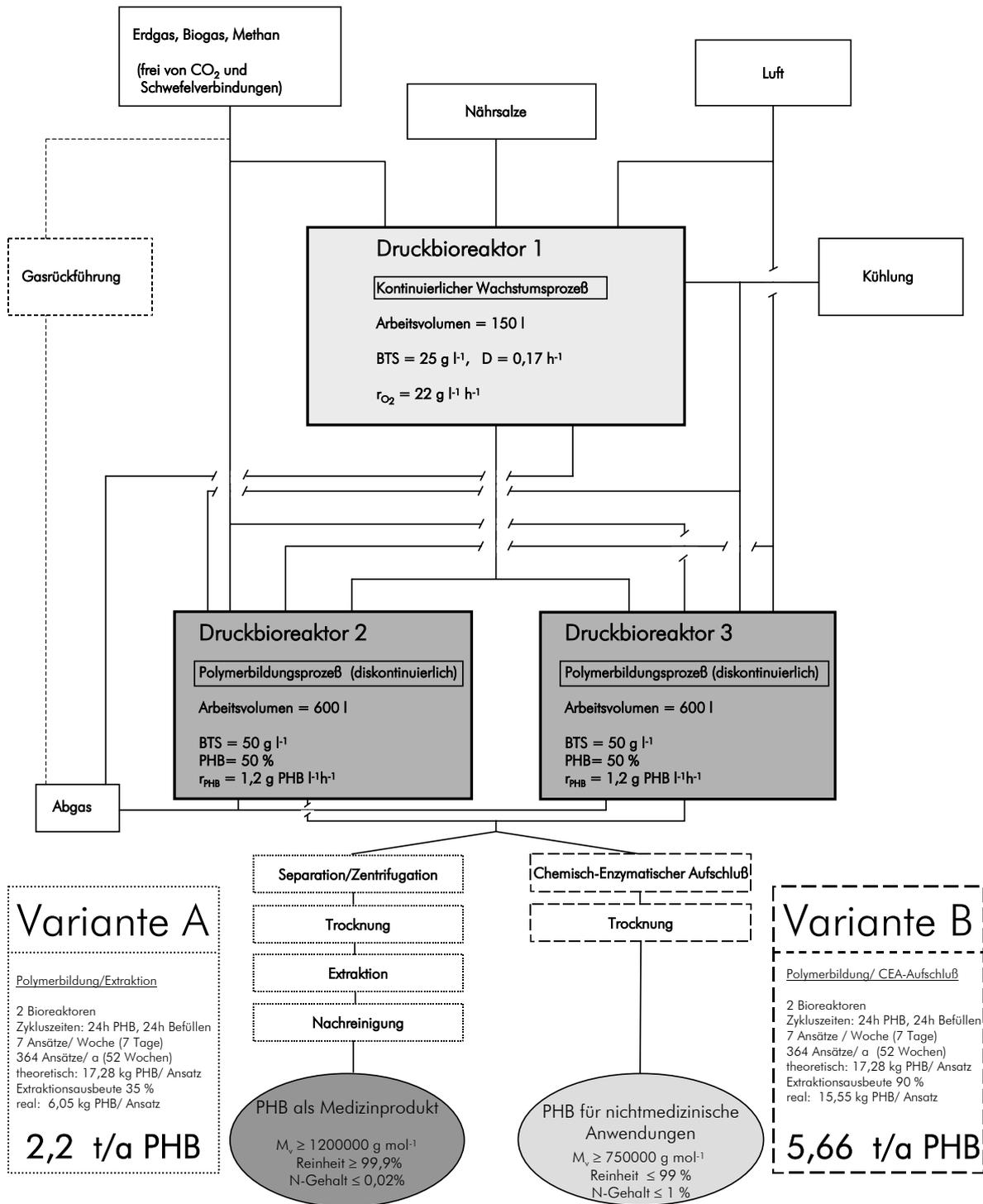


Abb. 5-5: Fiktives Modellschema zur kleintonnagigen PHB-Produktion aus Methan

## 5.8 Ausblick auf weiteren Forschungsbedarf

In der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende prozeßspezifische Parameter für die Synthese von PHB aus Methan bestimmt und die Stabilität der verwendeten Mischkultur *Methylocystis* sp. GB 25 nachgewiesen.

In nachfolgenden Untersuchungen sollten sowohl weitere wissenschaftliche Fragestellungen als auch praxisrelevante Aspekte untersucht werden.

### Schwerpunkte für wissenschaftliche Untersuchungen

Stickstoffumsetzungen (Problematik der Nitrit- und Nitratbildung):

- systematische Untersuchungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter (Inhibierungskonstanten, maximale Umsatzgeschwindigkeiten) für die einzelnen Produkte der Ammoniumoxidation (Nitrit, Nitrat)
- Bestimmung möglicher Einflußgrößen (u.a. Verhältnis Ammonium-/Gelöstmethan-konzentration, Verfügbarkeit von Sauerstoff)
- Aufklärung der Rolle der Methanotrophen und Begleitorganismen bei den Stickstoffumsetzungen

Enzyme der PHB-Synthese

- Isolierung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme (insbesondere Coenzym-abhängigkeiten, Einfluß verschiedener Ionen auf die Enzymaktivität)
- Bestimmung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen (CoA, Acetyl-CoA, NAD/NADH, NAD(P)/NAD(P)H) zur Analyse der Regulationsmechanismen

Mischkultur

- Identifizierung aller Species der Mischkultur, eventuell Sequenzierung der DNA und Nutzung dieser Daten zur Konstruktion eines Gen-Chips zur Prozeßkontrolle
- Detaillierte Untersuchungen zu den bestehenden Wechselwirkungen (spezifische Bildungsraten der Methanotrophen für Methanol und weitere Oxidationsprodukte, Charakterisierung der Begleitorganismen bezüglich Substrataffinitäten, maximaler Wachstumsraten und spezifischen Ausbeutekoeffizienten)

Weitere Ansatzpunkte

- Identifizierung der Stoffwechselprodukte, die bisher als Summenparameter (CSB) erfaßt werden
- systematische Untersuchungen zum Zusammenhang PHB-Bildung und spezifische Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit

### Schwerpunkte praxisrelevanter Forschungen

#### Optimale Versorgung mit Sauerstoff und Methan

- Studium der Prozeßführung mit *online*-Meßsystemen für die Gelöstsauerstoff- und Gelöstmethankonzentration unter Berücksichtigung des gegenseitigen Einflusses
- Optimierung der Regelungsstrategien
- Untersuchungen zum Einsatz von reinem Sauerstoff unter dem Aspekt der Partialdruckerhöhung für Sauerstoff und Methan
- Etablierung und Optimierung eines Systems zur Gasrückführung des von CO<sub>2</sub> gereinigten Fermentorabgases.

#### Verbesserung der Gesamteffektivität des Prozesses

- *scale-up* in den 400 l-Maßstab
- Untersuchungen zur Aufarbeitung der PHB-haltigen Biomassen zur Gewinnung eines Polymers höchster Reinheit
- Kostenabschätzungen für den Gesamtprozeß in Abhängigkeit vom PHB-Gehalt
- Entscheidung über die bevorzugten Mangelbedingungen und die Prozeßdauer in Abhängigkeit von den technologischen Bedingungen und Marktanforderungen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die biotechnologische Herstellung von Poly( $\beta$ -hydroxybutyrat) (PHB) mit methanotrophen Bakterien ist ein attraktiver Ansatz, da Methan ein Substrat darstellt, das hohe Ausbeuten erlaubt und kostengünstig als Erdgas oder Biogas zur Verfügung steht. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, mit stabilen Mischkulturen zu arbeiten.

Im Mittelpunkt der durchgeführten Arbeiten standen die Bestimmung der prozeßspezifischen Kennziffern der mikrobiellen PHB-Synthese, die Charakterisierung des akkumulierten Polymers sowie die Analyse von Zusammensetzung und Stabilität der methanverwertenden Mischkultur (Hauptkomponente *Methylocystis* sp. GB 25). Auf der Grundlage einer Systemanalyse und experimentell ermittelter Parameter wurde ein Prozeßmodell erarbeitet. Die im Vorfeld definierten Kenngrößen waren Grundlage für die Ableitung von Empfehlungen für die Prozeßführung zur Gewinnung von PHB aus Methan (z.B. die Initiierung der PHB-Synthese durch Phosphatmangel).

Der Einsatz von Methan als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle schafft einen Selektionsvorteil für methanotrophe Bakterien und ermöglichte so die Kultivierung dieser Mischkultur unter unsterilen Bedingungen, die in zwei Schritte unterteilt werden kann:

1. Kontinuierlicher Wachstumsprozeß zur Gewinnung von Impfmateriäl bzw. Anzucht von Biomasse zur PHB-Bildung
2. Diskontinuierlicher PHB-Syntheseprozess.

Durch die mögliche Kultivierung unter unsterilen Bedingungen kann mit diesem Verfahren eine aufwendige Impfstrecke eingespart, die Kultivierungszeit verkürzt und damit Kosten eingespart werden. Die Gewinnung von Impfmateriäl erfolgte in einem kontinuierlichen ( $D = 0,167 \text{ h}^{-1}$ ) Verfahren unter Sauerstofflimitation, wobei hohe Biomassekonzentrationen ( $> 15 \text{ g l}^{-1}$ ) realisiert wurden. Bei Lagerung bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  konnte dieses Inoculum innerhalb von drei Monaten ohne *lag*-Phase und ohne Veränderungen der Kulturzusammensetzung eingesetzt werden.

Die Stoffübergangsraten für Sauerstoff und Methan sind entscheidende Einflußfaktoren bei der Kultivierung methanotropher Bakterien. Hohe Zelldichten und Produktivitäten sind nur durch Kultivierung unter Druck realisierbar. So konnten z.B. bei der Anzucht der Mischkultur im Bioreaktor UD 50 (Arbeitsvolumen 40 l) zur Vorbereitung der PHB-Bildung unter Druck (max. 3750 mbar) Produktivitäten von  $5 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und Biomassekonzentrationen bis  $30 \text{ g l}^{-1}$  erreicht werden. Die ermittelten Ausbeutekoeffizienten für die Bildung von Biomasse bezogen auf Methan und Sauerstoff betragen unter Standardfermentationsbedingungen  $Y_{X/\text{CH}_4} = 0,63 \text{ g g}^{-1}$  bzw.  $Y_{X/\text{O}_2} = 0,2 \text{ g g}^{-1}$  und sind vergleichbar mit in der Literatur angegebenen Ausbeuten methanotropher Bakterien.

Die PHB-Bildung bei *Methylocystis* sp. erfolgt nicht wachstumsassoziiert und wurde deshalb in einem vom kontinuierlichen Wachstumsprozeß abgekoppelten *batch*-Verfahren durchgeführt. Die PHB-Synthese konnte in den durchgeführten Experimenten durch Stickstoff-, Phosphat-, Magnesium-, Kalium-, Sulfat-, Eisen- und Manganmangel induziert werden, nicht jedoch durch Sauerstofflimitation allein.

Die erreichten PHB-Gehalte in der Biomasse betragen maximal 50 % in Prozessen unter Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel. Die weiterhin untersuchten Bedingungen führten zu niedrigeren PHB-Gehalten, wobei unter Eisenmangel mit 11 % die geringste Akkumulation erfolgte.

Die spezifische PHB-Bildungsrate variierte in Abhängigkeit von den untersuchten Mangelbedingungen sowohl in den Maximalwerten als auch in den Mittelwerten über die gesamte Prozeßdauer von 24 h. Die mittleren spezifischen Bildungsraten betragen 0,036–0,039 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> unter Ammonium- und Phosphatmangel mit maximalen Werten von 0,145 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> unter Ammoniummangel. Alle anderen Prozesse waren durch niedrigere Bildungsraten charakterisiert. Die zeitlichen Verläufe der PHB-Akkumulation unterschieden sich dabei für Kationen- und Anionenmangel. Unabhängig von der Mangelbedingung verlief die PHB-Bildung in den ersten zwölf Stunden nach Induktion mit maximaler Effektivität.

Die ermittelten Ausbeutekoeffizienten für die PHB-Bildung aus Methan, die maximal unter Ammoniumstickstoff- und Phosphatmangel waren (0,55–0,6 g g<sup>-1</sup>), lagen im Bereich der für Methan angegebenen theoretischen Ausbeuten und zeigen im Vergleich mit anderen Kohlenstoffquellen die Attraktivität von Methan als Substrat für die PHB-Synthese.

Die unter Ammoniumstickstoff-, Phosphat-, Magnesium- und Sulfatmangel akkumulierte PHB war nach 24stündigem Akkumulationsprozeß durch ein reproduzierbar hohes mittleres Molekulargewicht von  $\geq 2,3 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup> und eine enge Molekulargewichtsverteilung mit einer Uneinheitlichkeit von  $\leq 2,5$  gekennzeichnet. Bei Kaliummangel sind wahrscheinlich 20 % höhere Werte erzielbar. In Abhängigkeit von der Prozeßdauer ist es weiterhin möglich, PHB verschiedener Molekulargewichtsfractionen zu gewinnen, d.h., ein für spezifische Anwendungszwecke „maßgeschneidertes“ Polymer.

Für den untersuchten Prozeß zur Gewinnung von PHB aus Methan wurde ein strukturiertes Prozeßmodell erarbeitet. Auf der Grundlage der erstellten Massenbilanzen können die zeitlichen Änderungen der wichtigsten Komponenten im Bilanzraum berechnet und Prozeßverläufe bei Variation der verfahrenstechnischen Parameter simuliert werden.

Zur Prozeßkontrolle wurde eine Schnellmethode zur Bestimmung der PHB-Gehaltes mit Natriumhypochlorit etabliert, die innerhalb von 40 min eine zuverlässige Aussage erlaubte. Das mittlere Molekulargewicht der PHB kann sicher und verhältnismäßig unkompliziert durch viskosimetrische Messungen bestimmt werden.

Das gewonnene Polymer war, wie in NMR-Untersuchungen, GC- und Elementaranalysen gezeigt werden konnte, ein Homopolyester der 3-Hydroxybuttersäure hoher Reinheit mit sehr niedrigen Stickstoff- und Schwermetallgehalten. PHB dieser Qualität, unter dem Namen METHANOMER<sup>®</sup> geschützt, kann momentan nur durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln aus der Biomasse gewonnen werden und stellt ein *high-tech*-Produkt mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten dar. Produktmuster wurden als Implantatmaterial getestet, wobei deren hervorragende Biokompatibilität nachgewiesen wurde.

Durch Kombination von mikrobiologischen, FAME- (*fatty acid methyl ester*) und molekularbiologischen Analysen wurde die Existenz einer über mehrere Jahre (11/1997–04/2000) unter Wachstums- und PHB-Bildungsbedingungen stabilen Mischkultur nachgewiesen, deren

Bestandteile teilweise charakterisiert wurden. Dabei wurde der methanotrophe Stamm *Methylocystis* sp. GB 25 mittels polyklonaler Antikörper und Immunofluoreszenz identifiziert. Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurden in Kreuztests mit sechs methanotrophen Stämmen belegt. Anhand des Vergleiches der 16S-rDNA-Sequenzen eines aus der Mischkultur gewonnenen Isolates der dominanten Species mit der Reinkultur *Methylocystis* sp. GB 25 DSM 7674 wurde die Identität auf genetischer Ebene bestätigt. Bezüglich der quantitativen Zusammensetzung der Gesamtbioasse waren FAME-Analysen der bakteriellen Membranlipide besonders aussagekräftig, sie zeigten die Dominanz des methanotrophen Stammes *Methylocystis* sp. GB 25 ( $\geq 86\%$ ). Messungen der Größen- und Volumenverteilung<sup>1</sup> mittels Coulter-Counter ergaben in guter Übereinstimmung einen Anteil am Gesamtvolumen von  $\geq 95\%$ . Die Begleitorganismen konnten auf Grund der Substratspezifität in zwei Gruppen eingeteilt werden: methylotrophe Bakterien und andere heterotrophe Bakterien, deren Anteile nach Zellzahl (bestimmt als KBE bzw. MPN) etwa gleich waren. Unter den sieben isolierten Begleitorganismen befanden sich zwei methylotrophe Stämme.

Die Stabilität der Mischkultur wurde durch die FAME-Analysen und über PCR-DGGE nachgewiesen. Das in den Gelen der DGGE beobachtete charakteristische Bandenmuster der Mischkultur blieb über den Untersuchungszeitraum nahezu unverändert und setzte sich aus den Banden der methanotrophen Hauptkomponente und der wichtigsten Begleitorganismen zusammen.

In anwendungsorientierten Versuchen zur Substitution von Methan durch Erdgas konnte die prinzipielle Möglichkeit zur Herstellung von PHB gleicher Qualität gezeigt werden. Dabei waren die Kennziffern der Prozeßführung, die Zusammensetzung der Mischkultur und die Biokompatibilität des Polymers unbeeinflusst.

Das Screening weiterer methanotropher Stämme zeigte keine Vorteile gegenüber den mit der untersuchten Mischkultur erzielten Ergebnissen hinsichtlich PHB-Gehalt und mittlerem Molekulargewicht des Polymers.

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Prozeß zur Herstellung von PHB aus Methan mit einer stabilen methanverwertenden Mischkultur unter unsterilen Bedingungen im Maßstab bis 40 Liter kann das gewünschte Biopolymer reproduzierbar in hoher Qualität und Ausbeute gewonnen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können Grundlage für die Entwicklung kleintonniger Verfahren zur Gewinnung von PHB für biomedizinische Anwendungen sein. Erstmals wurde eine zur Gewinnung eines biotechnologischen Wertstoffes geeignete stabile Mischkultur mittels molekularbiologischer Methoden und Fettsäureanalytik umfassend charakterisiert.

---

<sup>1</sup> Die Zellen der Methanotrophen und Begleitorganismen unterscheiden sich deutlich in ihrer Größe.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- ABE, H., DOI, Y., KUMAGAI, Y. (1994) Synthesis and Charakterization of Poly[(R, S)-3-hydroxybutyrate- $\beta$ -6-hydroxyhexanoate] as a compatibilizer for a Biodegradable Blend of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and Poly(6-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*. 27, 6012-6017
- ACKERMANN, J.-U., MÜLLER, S., LÖSCHE, A., BLEY, T., BABEL, W. (1995) *Methylobacterium rhodesianum* cells tend to double the DNA content under growth limitations and accumulate PHB. *J. Biotechnol.* 39, 9-20
- ACKERMANN, J.-U., BABEL, W. (1997) Growth-associated synthesis of poly(hydroxybutyric acid) in *Methylobacterium rhodesianum* as an expression of an internal bottleneck. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 144-147
- AHN, W.S., PARK, S.J., LEE, S.Y. (2000) Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey Solution. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3624-3627
- ALBERTSSON, A.-C., KARLSSON, S. (1994) Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers. Blackie. Glasgow, 48
- ALLENBACH, L., POIRIER, Y. (2000) Analysis of the alternative pathways for the  $\beta$ -oxidation of unsaturated fatty acids using transgenic plants synthesizing polyhydroxyalkanoates in peroxisomes. *Plant Physiol.* 124, 1159-1168
- AMANN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169
- AMANN, R.I., FUCHS, B.M., BEHRENS, S. (2001) The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 231-236
- AMASS, W., AMASS, A., TIGHE, B. (1998) A review of Biodegradable Polymers: Uses, Current Developments in the Synthesis and Charakterization of Biodegradable Polyesters, Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradation Studies. *Polym. Int.* 47, 89-144
- AN, Y.H., WOOLF, S.K., FRIEDMAN, R.J. (2000) Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*. 21, 2635-2652
- ANDERSON, A.J., DAWES, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54, 450-472
- ANDERSON, A.J., WILLIAMS, D.R., TAIDI, B., DAWES, E.A., EWING, D.F. (1992) Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 93-102
- ANONYM (1990) Biodegradable plastics hits the production line. *New Scientist* 05.05.1990
- ANTHONY, C. (1986) Bacterial Oxidation of Methane and Methanol. *Adv. Microbiol. Physiol.* 27, 113-210
- ANTONIO, R.V., STEINBÜCHEL, A., REHM, B.H.A. (2000) Analysis of *in vivo* substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 111-117
- ARAGAO, G.M.F., LINDLEY, N.D., URIBELARREA, J.L., PAREILLEUX, A. (1996) Maintaining A Controlled Residual Growth Capacity Increases the Production of Polyhydroxyalkanoate Copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* 18, 937-942
- ASADA, Y., MIYAKE, M., MIYAKE, J., KURANE, R., TOKIWA, Y. (1999) Photosynthetic accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by cyanobacteria - the metabolism and potential for CO<sub>2</sub> recycling. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 37-42
- ASENJO, J.A., SUK, J.S. (1986a) Kinetics and Models for the Bioconversion of Methane into an Intracellular Polymer, Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate (PHB). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 15, 225-234

- ASENJO, J.A., SUK, J.S. (1986b) Microbial Conversion of Methane into Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate (PHB): Growth and Intracellular Product Accumulation in a Type II Methanotrophs. *J. Ferment. Bioeng.* 64, 271-278
- ASENJO, J.A., SCHMIDT, A.S., ANDERSEN, P.R., ANDREWS, B.A. (1995) Effect of Single Nutrient Limitation on Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Molecular Weight Distribution in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 497-502
- ASHBY, R.D., FOGLIA, T.A. (1998) Poly(hydroxyalkanoates) biosynthesis from triglyceride substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 431-437
- ASHBY, R.D., CROMWICK, A.-M., FOGLIA, T.A. (1998) Radiation crosslinking of a bacterial medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) elastomer from tallow. *Int. J. Biol. Macromol.* 23, 61-72
- ASHBY, R.A., SHI, F., GROSS, R.A. (1999) A Tunable Switch to Regulate the Synthesis of Low and High Molecular Weight Microbial Polyesters. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 107-113
- ATHANASIOU, K.A., NIEDERAUER, G.G., AGRAWAL, C.M. (1996) Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials.* 17, 93-102
- ATIKA, S., EINAGA, Y., MIYAKI, Y., FUJITA, H. (1976) Solution Properties of Poly(D- $\beta$ -hydroxybutyrate) 1. Biosynthesis and Characterization. *Macromolecules.* 9, 774-780
- AYORINDE, F.O., SAEED, K.A., PRICE, E., MORROW, A., COLLINS, W.E., MC INNES, F., POLLACK, S.K., ERIBO, B.E. (1998) Production of poly-(beta-hydroxybutyrate) from saponified *Vernonia galamensis* oil by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21, 46-50
- BABEL, W. (1990) The Mixed Substrate Concept, Applied for microbial synthesis of Metabolites. *Biotechnol. Adv.* 8, 261-275
- BABEL, W., RIIS, V., HAINICH, E. (1990) Mikrobielle Thermoplaste: Biosynthese, Eigenschaften und Anwendung. *Plaste, Kautschuk.* 37, 109-115
- BABEL, W. (1992) Peculiarities of methylotrophs concerning overflow metabolism, especially the synthesis of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 141-148
- BABEL, W., ACKERMANN, J.-U., BREUER, U. (2001) Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71, 125-158
- BAI, Q., GATTINGER, A., ZELLES, L. (2000) Characterization of microbial consortia in paddy rice soil by phospholipid analysis. *Microb. Ecol.* 39, 273-281
- BALLISTRERI, A., GIUFFRIDA, M., IMPALLOMENI, G., LENZ, R.W., FULLER, R.C. (1999) Characterization by mass spectrometry of poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Rhodospirillum rubrum* from 3-hydroxyacids. *J. Biomed. Mater. Res.* 47, 324-325
- BAPTIST, J.N. (1962) Process for preparing poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. US-Patent 3044942
- BARKER, J.F., FRITZ, P. (1981) Carbon isotop fractionation during microbial methane oxidation. *Nature.* 293, 289-291
- BARNARD, G.N., SANDERS, J.K.M. (1988) Observation of mobile poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) in the storage granules of *Methylobacterium* AM1 by *in vivo*  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* 231, 16-18
- BARNARD, G.N., SANDERS, J.K.M. (1989) The Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Granule *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* 264, 3286-3291
- BAST, E. (1999) Mikrobiologische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg Berlin
- BECK, M. (2000) Cometabolische Degradation von Trichlorethen in Wässern mittels methanotropher Bakterien. Dissertation. Universität Leipzig
- BECKER, P.M., WAND, H., MARTIUS, G., WEIBRODT, E., STOTTMEISTER, U. (1998) Functional and structural successions in arbitrary samples of heterotrophic bacteria during aerobic treatments of lignite-carbonization wastewater in situ enclosures. *Can. J. Microbiol.* 44, 211-220
- BEDARD, C., KNOWLES, R. (1989) Physiology, Biochemistry, and Specific Inhibitors of  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_4$ , and  $\text{CO}$  Oxidation by Methanotrophs and Nitrifiers. *Microbiol. Rev.* 53, 68-84

- BEHREND, D., SCHMITZ, K.-P., WERNER, C. (1999) Resorbable Surgical Textiles. Techtexil Symposium „Textiles Biomaterial in der Medizin“. Frankfurt 15.04.99, Abstractband 2, Vortrag 624
- BERGTER, F. (1983) Wachstum von Mikroorganismen. Gustav Fischer Verlag Jena.
- BEUN, J.J., PALETTA, F., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J. (2000a) Stoichiometry and kinetics of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 379-389
- BEUN, J.J., VERHOEF, E.V., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J. (2000b) Stoichiometry and kinetics of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism under denitrifying conditions in activated sludge cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 68, 496-507
- BIOMER (2001) <http://www.biomer.de>
- BLEDZKI, A.K., GASSAN, J., HEYNE, M. (1994) Auswirkungen von Sterilisationsverfahren auf biologisch abbaubare Kunststoffe. *Angew. Makromol. Chem.* 219, 11-26
- BLEY, T. (1990) State-structure Models- A base for efficient control of fermentation process. *Biotechnol. Adv.* 8, 233-259
- BODELIER, P.L.E., FRENZEL, P. (1999) Contribution of Methanotrophic and Nitrifying Bacteria to  $\text{CH}_4$ - and  $\text{NH}_4^+$ -Oxidation in the Rhizosphere of Rice Plants as Determined by New Methods of Discrimination. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1826-1833
- BODELIER, P.L.E., ROSLEV, P., HENCKEL, T., FRENZEL, P. (2000) Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature.* 403, 421-424
- BODELIER, P.L.E., HAHN, A.P., ARTH, I.R., FRENZEL, P. (2000b) Effects of ammonium-based fertilisation on microbial processes involved in methane emission from soils planted with rice. *Biogeochemistry.* 51, 225-257
- BOHMERT, K., BALBO, I., MITTENDORF, V., NAWRATH, C., POIRIER, Y., TISCHENDORF, G., TRETHERWEY, R.N., WILLMITZER, L. (2000) Transgenic *Arabidopsis* plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up 4% of their fresh weight. *Planta.* 211, 841-845
- BONTRHONE, K.M., CLAUSS, J., HOROWITZ, HUNTER, B.K., SANDERS, J.K.M. (1992) The biological and physical chemistry of polyhydroxyalkanoates as seen by NMR spectroscopy. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 269-278
- BORMANN, E.J., LEIBNER, M., BEER, B. (1998) Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 84-88
- BORMANN, E.J., ROTH, M. (1999) The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. *J. Biotechnol.* 21, 1059-1063
- BOSCHKER, H.T.S., NOLD, S.C., WELLSBURY, P., BOS, D., DE GRAAF, W., PEL, R., PARKES, R.J., CAPPENBERG, T.E. (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by  $^{13}\text{C}$ -labelling of biomarkers. *Nature.* 392, 801-805
- BOTHE, H., JOST, G., SCHLOTTER, M., WARD, B.B., WITZEL, K.-P. (2000) Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 673-690
- BOURNE, D.G., HOLMES, A.J., IVERSEN, N., MURRELL, C.J. (2000) Fluorescent oligonucleotide rDNA probes for specific detection of methane oxidising bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 29-38
- BOURQUE, D., POMERLEAU, Y., GROLEAU, D. (1995) High-cell-density production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 367-376
- BOWMAN, J.P., SKERRATT, J.H., NICHOLS, P.D., SLY, L.I. (1991) Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 15-22
- BOWMANN, J.P. (1999) The Methanotrophs-The families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*. In: *The Prokaryotes (online)* Springer-Verlag. <http://link.springer-ny.com>

- BRADEL, R., KLEINKE, A., REICHERT, K.-H. (1991) Molar mass distribution of microbial poly(D(-)-3-hydroxybutyrate) in the course of intracellular synthesis and degradation. *Makromol. Chem./ Rapid Commun.* 12, 583-590
- BRADEL, R., REICHERT, K.-H. (1993) Modelling of molar mass distribution of poly(D(-)-3-hydroxybutyrate) during bacterial synthesis. *Makromol. Chem.* 194, 1983-1990
- BRANDL, H., GROSS, R.A., LENZ, R.W., FULLER, R.C. (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly( $\beta$ -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1977-1982
- BRANDL, H., PÜCHNER, P. (1990) The biodegradation of shampoo bottles in a lake. In: E.A. Dawes (Ed.), Novel biodegradable microbial polymers. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 421-422
- BRANDL, H., BACHOFEN, R., MAYER, J., WINTERMANTEL, E. (1995) Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 143-153
- BRANDRUP, J. (1995) (Hrsg.) Die Wiederverwertung von Kunststoffen. Carl Hanser Verlag.
- BRAUNEGG, G., SONNLEITNER, B., LAFFERTY, R.M. (1978) A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6, 29-37
- BRAUNEGG, G., BOGENBERGER, B. (1985) Zur Kinetik des Wachstums und der Speicherung von Poly-D(-)-3-hydroxybuttersäure bei *Alcaligenes latus*. *Acta Biotechnol.* 5, 339-345
- BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G., GENSER, K.F. (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65, 127-161
- BRAUNEGG, G., GENSER, K., BONA, R., HAAGE, G., SCHELLAUF, F., WINKLER, E. (1999) Production of PHAs from Agricultural Waste Material. *Macromol. Symp.* 144, 375-383
- BREUER, U., ACKERMANN, J.-U., BABEL, W. (1995) Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) and overproduction of exopolysaccharides in a mutant of a methylotrophic bacterium. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl.1), 55-59
- BREUER, U., BABEL, W. (1999) *Methylobacterium rhodesianum* Produces Poly-3-Hydroxybutyrate and after Mutagenesis in Addition Exopolysaccharides. *Acta Biotechnol.* 19, 76-86
- BRIONES, A.M., REICHARDT, W. (1999) Estimating microbial population counts by "most probable number" using Microsoft Excel®. *J. Microbiol. Methods.* 35, 157-161
- BULL, I.D., PAREKH, N.R., HALL, G.H., INESON, P., EVERSLED, R.P. (2000) Detection and classification of atmospheric methane oxidizing bacteria in soil. *Nature.* 405, 175-178
- BURGHARDT, F. (1992) Mikrobiologische Diagnostik. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart. New York. 580-581
- BYROM, D. (1987) Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol.* 5, 246-250
- CAI, Z., YAN, X. (1999) Kinetic model for methane oxidation by paddy soil as affected by temperature, moisture and N addition. *Soil Biol. Biochem.* 31, 715-725
- CAI, Z.C., MOSIER, A.R. (2000) Effect of NH<sub>4</sub>Cl addition on methane oxidation by paddy soils. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1537-1545
- CARLSEN, H.N., JOERGENSEN, L., DEGN, H. (1991) Inhibition by ammonia of methane utilization in *Methylobacterium capsulatus* (Bath). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 124-127
- CHEN, G.Q., PAGE, W.J. (1994) The effect of substrate on the molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnol. Lett.* 16, 155-160
- CHEN, G.Q., PAGE, W.J. (1997) Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. *Biotechnol. Tech.* 11, 347-350

- CHEN, G.Q., ZHANG, G., PARK, S.J., LEE, S.Y. (2001) Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 50-55
- CHEN, Y.G., XU, Q., YANG, H.Z., GU, G.W. (2001b) Effects of cell fermentation time and biomass drying strategies on the recovery of poly-3-hydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactant-chelate aqueous system. *Process Biochem.* 36, 773-779
- CHENG, Y.S., HALSEY, J.L., FODE, K.A., REMSEN, C.C., COLLINS, M.L.P. (1999) Detection of Methanotrophs in Groundwater by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 648-651
- CHOI, J.-I., LEE, S.Y. (1997) Process analysis and economic evaluation for Poly(3-Hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Eng.* 17, 335-342
- CHOI, J.-I., LEE, S.Y., HAN, K. (1998) Cloning of the *Alcaligenes latus* Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Genes and Use of These Genes for Enhanced Production of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4897-4903
- CHOI, J.-I., LEE, S.Y. (1999a) Production of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] with high P(3HB) content by recombinant *Escherichia coli* harboring the *Alcaligenes latus* P(3HB) biosynthesis genes and the *E. coli* *ftsZ* gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 722-725
- CHOI, J.-I., LEE, S.Y. (1999b) High-Level Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4363-4368
- CHOI, J.-I., LEE, S.Y. (1999c) Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 13-21
- CHOI, J.-I., LEE, S.Y. (1999d) Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 546-553
- CHOI, J.-I., LEE, S. Y. (2000) Short contribution: Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 646-649
- CHU, K.-H., ALVAREZ-COHEN, L. (1998) Effect of Nitrogen Source on Growth and Trichloroethylen Degradation by Methane-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3451-3457
- CHU, K.H., ALVAREZ-COHEN, L. (1999) Evaluation of toxic effects of aeration and trichloroethylene oxidation on methanotrophic bacteria grown with different nitrogen sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 766-772
- CHUA, H., YU, P.H.F. (1999) Production of Biodegradable Plastics from Chemical Wastewater - A Novel Method to Reduce Excess Activated Sludge Generated From Industrial Wastewater Treatment. *Water Sci. Technol.* 39, 273-280
- CLEMENTE, T., SHAH, D., TRAN, M., STARK, D., PADGETTE, S., DENNIS, D., BRÜCKENER, K., STEINBÜCHEL, A., MITSKY, T. (2000) Sequence of PHA synthase gene from two strains of *Rhodospirillum rubrum* and in vivo substrate specificity of four PHA synthases across two heterologous expression systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 420-429
- CONRAD, R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O and NO). *Microbiol. Rev.* 60, 609-640
- COOK, S.A., SHIEMKE, A.K. (1996) Evidence that Copper is a Required Cofactor for the Membrane-Bound Form of Methane Monooxygenase. *J. Inorg. Biochem.* 63, 273-284
- CORNIBERT, J., MARCHESSAULT, R.H., BENOIT, H., WEILL, G. (1970) Physical Properties of Poly(β-hydroxybutyrate) III. Folding of Helical Segments in 2,2,2-Trifluorethanol. *Macromolecules.* 3, 741-745
- COSTA, C., DIJKEMA, C., FRIEDRICH, M., GARCÍA-ENCINA, P., FERNÁNDEZ-POLANCO, F., STAMS, A. J. M. (2000) Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 754-762
- COSTA, C., VECHERSKAYA, M., DIJKEMA, C., STAMS, A.J.M. (2001) The effect of oxygen on methanol oxidation by an obligate methanotrophic bacterium studied by in vivo <sup>13</sup>C- nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 9-14

- CROMWICK, A.-M., FOGLIA, T., LENZ, R.W. (1996) The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from tallow. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 464-469
- DALTON, H., LEAK, D.J. (1985) Methane Oxidation by Microorganisms. In: Poole, R.K., Dow, C.S. (Eds.) *Microbial Gas Metabolism*. Academic Press, 173-200
- DANIEL, M., BARBOTIN, J.N., KIM, J.H., LEBEAULT, J.M. (1992) Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas* 135. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 702-706
- DE KONING, G.M.J. (1995) Physical properties of bacterial poly((R)-3-hydroxyalkanoates). *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 303-309
- DE KONING, G.J.M., VAN BILSEN, H.M.M., LEMSTRA, P.J., HAZENBERG, W., WITHOLT, B., VAN DER GALIEN, J.G., SCHIRMER, A., JENDROSSEK, D. (1994) A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoate) from *Pseudomonas oleovorans*. *Polymer.* 35, 2090-2097
- DE KONING, G.M.J., LEMSTRA, P.J. (1993) Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 2. Embrittlement and rejuvenation. *Polymer.* 34, 4089-4094
- DE SMET, M., EGGINK, G., WITHOLT, B., KINGMA, J., WYNBERG, H. (1983) Characterization of Intracellular Inclusions Formed by *Pseudomonas oleovorans* During Growth on Octane. *J. Bacteriol.* 154, 870-878
- DEGELAU, A., SCHEPER, T., BAILEY, J.E., GUSKE, C. (1995) Fluorometric measurement of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 653-657
- DEMAIN, A.L. (2000) Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnol. Adv.* 18, 499-514
- DOI, Y. (1990) *Microbial Polyesters*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim
- DOI, Y., KAWAGUUCHI, Y., NAKAMURA, Y., KUNIOKA, M. (1989) Nuclear Magnetic Resonance Studies of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Polyphosphate Metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2932-2938
- DOYLE, C., TANNER, E.T., BONFIELD, W. (1991) In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials.* 12, 841-847
- DRIESSEN, F.M. (1981) Protocooperation of Yogurt Bacteria in Continuous Culture. In: Bushell, M.E., Slater, J.H. (Eds.) *Mixed Culture Fermentations*, Academic Press London, New York, 99-120
- DUNFIELD, P., KNOWLES, R. (1995) Kinetics of Inhibition of Methane Oxidation by Nitrate, Nitrite, and Ammonium in a Humisol. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3129-3135
- DUNFIELD, P.F., LIESACK, W., HENCKEL, T., KNOWLES, R., CONRAD, R. (1999) High-Affinity Methane Oxidation by a Soil Enrichment Culture Containing a Type II Methanotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1009-1014
- DUNN, I.J., HEINZLE, E., INGHAM, J., PRESOSIL, J.E. (1992) *Biological Reaction Engineering*. VCH Weinheim.
- DURNER, R., WITHOLT, B., EGLI, T. (2000) Accumulation of Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during Growth with Octanoate in Continuous Culture at Different Dilution Rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3408-3414
- EGGINK, G., DE WAARD, P., HUIJBERTS, G.N.M. (1992) The role of fatty acid biosynthesis and degradation in the supply of substrates for poly(3-hydroxyalkanoate) formation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 159-164
- EISENTRÄGER, A., KLAG, P., VANSBOTTER, B., HEYMAN, E., DOTT, W. (2001) Denitrification of groundwater with methane as sole hydrogen donor. *Water Res.* 35, 2261-2267
- ELLAR, D., LUNDGREN, D.G., OKAMURA, K., MARCHESSAULT, R.H. (1968) Morphology of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Granules. *J. Mol. Biol.* 35, 489-502

- ELLER, G., FRENZEL, P. (2001) Changes in Activity and Community Structure of Methane-Oxidizing Bacteria over the Growth Period of Rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2395-2403
- ELLER, G., STUBNER, S., FRENZEL, P. (2001) Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 198, 91-97
- EU (2000) Erdgaspreise in der EU zwischen 1998 und 2000. *Eurostat News release.* 84 (20.07.2000) <http://europa.eu.int/comm/eurostat>
- FALCH, K. (2000) Gas could increase salmon production. <http://www.fis.com/fis/worldnews/worldnews.asp?l=e&id=15174>
- FANG, J., BARCELONA, M.J., SEMRAU, J.D. (2000) Characterization of methanotrophic bacteria on the basis of intact phospholipid profiles. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 67-72
- FAUST, U. (1987) Production of Microbial Biomass. In: Prave, P., Faust, U., Sittig, W., Sukatsch, D.A. (Eds.) *Fundamentals of Biotechnology*. VCH Weinheim. Chapter 15, 601-622
- FAUST, U., PRÄVE, H. (1991) Biomass from Methane and Methanol. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.) *Biotechnology*. VCH Weinheim. Volume 3/Chapter 1c, 84-108
- FIDLER, S., DENNIS, D. (1992) Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 231-236
- FISCHER, S.G., LERMAN, L.S. (1983) DNA fragments differing by single basepair substitution are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 1579-1383
- FOGG, P.G.T., GERRAD, W. (1991) *Solubility of Gases in Liquids*. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex
- FOSTER, L.J.R., STUART, E.S., TEHRANI, A., LENZ, R.W., FULLER, R.C. (1996) Intracellular depolymerase and polyhydroxyoctanoate granule integrity in *Pseudomonas oleovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 19, 177-183
- FOWLER, S.D., GREENSPAN, P. (1985) Application of Nile Red, a Fluorescent Hydrophobic Probe, for the Detection of Neutral Lipid Deposits in Tissue Sections: Comparison with Oil Red O. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 833-836
- FREIER, T. (1999a) Elementaranalysen und Kernresonanzuntersuchungen der Proben PHB-1 und PHB-2. Bericht. Universität Rostock (14.09.1999)
- FREIER, T. (1999b) Elementaranalysen und Kernresonanzuntersuchungen der Proben PHB-3 und PHB-4 und XTT-Biokompatibilitatstests der Proben PHB1-4. Bericht. Universität Rostock (20.10.1999)
- FREIER, T., STERNBERG, K., SCHMITZ, K.-P. (2000) Bioresorbierbare Polymere auf Basis nachwachsender Rohstoffe in der Medizintechnik. Transferworkshop „Moderne Biopolymere“. Kassel 27./28.11.2000, Vortrag
- FREIER, T., KUNZE, C., NISCHAN, C., KRAMER, S., SCHMITZ, K.-P. (2000a) *In vitro*- und *in vivo*-Degradationsuntersuchungen zur Auswahl von PHB-Patchmaterialien für den Gastrointestinalbereich. In: Tagungsband Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) und Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien (CAB), 3. Kolloquium der Kompetenzzentren für Biomaterialien, 24./25.11.2000. Ulm, 104
- FRITSCHKE, W. (1998) *Umwelt-Mikrobiologie: Grundlagen und Anwendungen*. Gustav Fischer Verlag. Jena
- FÜHR, A. (1996) Untersuchungen zu der Biodiversität natürlicher Bakterienpopulationen im Boden mit der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) von 16S rDNA Sequenzen. Dissertation. Universität Kaiserslautern
- FUKADA, E., ANDO, Y. (1986) Piezoelectric properties of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and copolymers of  $\beta$ -hydroxybutyrate and  $\beta$ -hydroxyvalerate. *Int. J. Biol. Macromol.* 8, 361-366
- FUKUI, T., DOI, Y. (1998) Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 333-336

- FURIGO, A., JØRGENSEN, M.H. (1993) Nitrogen limited growth of a methanotrophic culture. *Bioprocess Eng.* 9, 119-127
- GALIMOV, E.M. (1985) The biological fractionation of Isotopes. Academic Press Inc.
- GERNGROSS, T.U., REILLY, P., STUBBE, J., SINSKEY, A.J., PEOPLES, O.P. (1993) Immunocytochemical Analysis of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate (PHB) Synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: Localisation of the Synthase Enzyme at the Surface of PHB Granules. *J. Bacteriol.* 175, 5289-5393
- GERNGROSS, T.U., MARTIN, D.P. (1995) Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: Formation of macroscopic granules in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 6972-6283
- GERNGROSS, T.U. (1999) Can biotechnology move us toward a sustainable society? *Nat. Biotechnol.* 17, 541-544
- GERNGROSS T.U., SLATER, S. (2000) How green are green plastics? *Sci. Am.* 283, 36-41
- GILBERT, B., McDONALD, I.R., FINCH, R., STAFFORD, G.P., NIELSEN, A.K., MURRELL, C.J. (2000) Molecular Analysis of the pmmo (Particulate Methane Monooxygenase) Operons from Two Type II Methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 966-975
- GILMORE, D.F., FULLER, R.C., LENZ, R. (1990) Biodegradation of poly(beta)hydroxyalkanoates. In: Barenberg, S.A., Brash, J.L., Narayan, R., Redpath, A.E. (Eds.) Degradable materials. Proceedings of the First International Scientific Consensus Workshop. CRC Press. Boca Raton. 481-507
- GONZALEZ-LOPEZ, J., POZO, C., MARTINEZ-TOLEDO, M.V., RODELAS, B., SALMERON, V. (1996) Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in Wastewater from Olive Oil Mills (Alpechin). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 38, 271-276
- GOODFELLOW (2001) <http://www.goodfellow.com>
- GORENFLO, V., STEINBÜCHEL, A., MAROSE, S., RIESEBERG, M., SCHEPER, T. (1999) Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 765-772
- GOSTOMSKY, A.P., BUNGAY, R.H. (1996) Effect of glucose and ammonium levels on poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production and growth in continuous culture of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Prog.* 12, 234-239
- GOTTSCALL, R., RECHT, R., VOGTMANN, H., BILDINGMAIER, W. (1994) Kompostierung biologisch abbaubarer Werkstoffe (BAW) - Anforderungsprofil, Prüfraster und exemplarische Untersuchungen mit Biopol. In: *Verband Kommunale Abfallwirtschaft und Stadtreinigung e.V., Kongreß Kompostierung im Trend Dokument.* (2/94)
- GRAHAM, D.W., CHAUDHARY, J.A., HANSON, R.S., ARNHOLD, R.G. (1993) Factors Affecting Competition Between Type I and Type II Methanotrophs in Two-organism, Continuous-flow Reactors. *Microb. Ecol.* 25, 1-17
- GREEN, C.T., SCOW, K.M. (2000) Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeol. J.* 8, 126-141
- GROBE, S. (1998) Methanmonooxygenase-Charakterisierung aus Typ II-Methanotrophen. Dissertation. Universität Leipzig
- GROBE-UHLMANN, R., BLEY, T. (1999) A modular approach to situation identification of the dynamics of bacterial populations synthesizing poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Bioprocess Eng.* 21, 191-200
- GUCKERT, J.B., RINGELBERG, D.B., WHITE, D.C., HANSON, R.S., BRATINA, B.J. (1991) Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the Proteobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2631-2641
- GULLEDGE, J., AHMAD, A., STEUDLER, P.A., POMERANTZ, W.J., CAVANAUGH, C.M. (2001) Family- and Genus-Level 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Ecological Studies of Methanotrophic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4726-4733
- HALL, B., BALDWIN, J., RHIE, H.G., DENNIS, D. (1998) Cloning of the *Nocardia coriillina* polyhydroxyalkanoate synthase gene and production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) and poly(3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyheptanoate). *Can. J. Microbiol.* 44, 687-691

- HAMER, G. (1979) Biomass from Natural Gas. *Econ. Microbiol.* 4, 315-360
- HAN, M.J., YOON, S.S., LEE, S.Y. (2001) Proteome Analysis of Metabolically Engineered *Escherichia coli* Producing Poly(3-Hydroxybutyrate). *J. Bacteriol.* 183, 301-308
- HANDRICK, R., REINHARDT, S., JENDROSSEK, D. (2000) Mobilization of Poly(3-Hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* 182, 5916-5918
- HÄNGGI, U. (1995) Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 213-220
- HANSON, R.S., HANSON, T.E. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439-474
- HARDER, J. (1997) Species-independent maintenance energy and natural population sizes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 39-44
- HARRISON, D.E. (1978) Mixed Cultures in Industrial Fermentation Processes. *Adv. Appl. Microbiol.* 24, 129-164
- HASCHKE, T., TOMKA, I., KEILBACH, A. (1998a) Systematische Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit von Verpackungsmaterial, 1. Mitteilung: Zur tatsächlichen biologischen Abbaubarkeit von sogenannten bioabbaubaren Kunststoffolien. *Mon. Chem.* 129, 253-279
- HASCHKE, H., TOMKA, I., KEILBACH, A. (1998b) Systematische Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit von Verpackungsmaterial, 2. Mitteilung: Zur biologischen Abbaubarkeit von auf Polyvinylalkohol basierenden Verpackungsfolien. *Mon. Chem.* 129, 365-386
- HASCHKE, H., TOMKA, I., KEILBACH, A. (1998c) Systematische Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit von Verpackungsmaterial, 3. Mitteilung: Neue Polyvinylalkohol-Stärke-Acetal-Folien. *Mon. Chem.* 129, 487-507
- HAYWOOD, G.W., ANDERSON, A.J., CHU, L., DAWES, E.A. (1988a) Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 52, 91-96
- HAYWOOD, G.W., ANDERSON, A.J., CHU, L., DAWES, E.A. (1988b) The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 52, 259-264
- HAYWOOD G.W., ANDERSON A.J., DAWES, E.A. (1989) The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 57, 1-6
- HAZENBERG, W., WITHOLT, B. (1997) Efficient production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from octane by *Pseudomonas oleovorans*: economic considerations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 588-596
- HEDRICK, D.B., PEACOCK, A., STEPHEN, J.R., MACNAUGHTON, S.J., BRUGGEMANN, J., WHITE, D.C. (2000) Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *J. Microbiol. Methods.* 41, 235-248
- HEIJNEN, J.J., VANDIJKEN, J.P. (1992) In search of a thermodynamic description of biomass yields for the chemotrophic growth of microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 833-858
- HEIN, S., SÖHLING, B., GOTTSCHALK, G., STEINBÜCHEL, A. (1997) Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 153, 411-418
- HEINZLE, E., LAFFERTY, R.M. (1980) A Kinetic Model for Growth and Synthesis of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11, 8-16
- HENCKEL, T., FRIEDRICH, M., CONRAD, R. (1999) Molecular Analyses of the Methane-Oxidizing Microbial Community in Rice Field Soil by Targeting the Genes of the 16S rRNA, Particulate Methane Monooxygenase, and Methanol Dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1980-1990
- HENCKEL, T., JÄCKEL, U., SCHNELL, S., CONRAD, R. (2000) Molecular Analyses of Novel Methanotrophic Communities in Forest Soil That Oxidize Atmospheric Methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1801-1808

- HENDERSON, R.A., JONES, C.W. (1997) Physiology of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus* growing in continuous culture. *Microbiology*. 143, 2361-2371
- HENDERSON, R.A., JONES, C.W. (1997a) Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus*, purification, characterisation and potential regulatory role of citrate synthase. *Arch. Microbiol.* 168, 486-492
- HIGGINS, I.J., BEST, D.J., HAMMOND, R.C., SCOTT, D. (1981) Methane-Oxidising Microorganisms. *Microbiol. Rev.* 45, 556-590
- HOFFMANN, N., STEINBÜCHEL, A., REHM, B.H.A. (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* phaG gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS Microbiol. Lett.* 184, 253-259
- HOLMES, P.A., WRIGHT, L.F., COLLINS, F.H. (1981) 3-hydroxybutyrate polymers. Patent EP 0052459
- HOLMES, P.A. (1988) Biological produced (R)-3-Hydroxyalkanoate Polymers and Copolymers. In: Basset, D.C. (Ed.) Developments in Crystalline Polymers-2. Elsevier Applied Sciences London. New York
- HONG, K., LEUNG, Y.C., KWOK, S.Y., LAW, K.H., LO, W.H., CHUA, H., YU, P.H.F. (2000) Construction of recombinant *Escherichia coli* strains for polyhydroxybutyrate production using soy waste as nutrient. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84, 381-390
- HORI, K., SOGA, K., DOI, Y. (1994) Effect of Culture Conditions on Molecular Weights of Poly(3-Hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from Octanoate. *Biotechnol. Lett.* 16, 709-714
- HOROWITZ, D.M., SANDERS, J.K.M. (1995) Biomimetic, amorphous granules of polyhydroxyalkanoates: composition, mobility, and stabilisation *in vivo* by proteins. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 115-123
- HORZ, H.-P. (2000) Entwicklung und Anwendung molekularer Techniken zur Charakterisierung von nitrifizierenden und methanotrophen Populationen in natürlichen Ökosystemen. Dissertation. Philipps-Universität Marburg
- HOU, C.T., LASKIN, A.I., PATEL, R.N. (1978) Growth and Polysaccharide Production by *Methylocystis pravus* OBBP on Methanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 800-804
- HOUBRON, E., TORRIJOS, M., CAPDEVILLE, B. (1999) An Alternative Use of Biogas Applied at the Water Denitrification. *Water Sci. Technol.* 40, 115-122
- HOUMIEL, K.L., SLATER, S., BROYLES, D., CASAGRANDE, L., COLBURN, S., GONZALEZ, K., MITSKY, T.A., REISER, S.E., SHAH, D., TAYLOR, N.B., TRAN, M., VALENTIN, H.E., GRUYS, K.J. (1999) Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production in oilseed leukoplasts of *Brassica napus*. *Planta*. 209, 547-550
- HRABAK, O. (1992) Industrial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 251-256
- HU, W.F., CHUA, H., YU, P.H.F. (1997) Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from activated sludge. *Biotechnol. Lett.* 19, 695-698
- HUGLIN, M.B., RADWANN, M.A. (1991) Behaviour of Poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) in Dilute Solution. *Polym. Int.* 24, 119-123
- HUIJBERTS, G.N.M., EGGINK, G., DE WAARD, P., HUISMAN, G.W., WITHOLT, B. (1992) *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 536-544
- HUIJBERTS, G.N.M., DE RIJK, T.C., DE WAARD, P., EGGINK, G. (1994) <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *J. Bacteriol.* 176, 1661-1666
- HUIJBERTS, G.N.M., VAN DER WAL, H., WILKINSON, C., EGGINK, G. (1994b) Gas-chromatographic Analysis of Poly-(3-Hydroxyalkanoates) in Bacteria. *Biotechnol. Techn.* 8, 187-192
- HUIJBERTS, G.N.M., EGGINK, G. (1996) Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT2442 in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 233-239
- HUQ, M.N., RALPH, B.J., RICKWARD, P.A.D. (1978) The extracellular Polysaccharide of a Methylo-trophic Culture. *Aust. J. Biol. Sci.* 31, 311-316

- IBAW (2000) <http://www.ibaw.org>
- IBEKWE, A.M., KENNEDY, A.C. (1998) Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 151-163
- IGNARRO, L.J., FUKUTO, J.M., GRISCAVAGE, J.M., ROGERS, N.E., BYRNS, R.E. (1993) Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8103-8107
- IORDANSKII, A.L., KAMAEV, P.P., HÄNGGI, U.J. (2000) Modification via preparation for poly(3-hydroxybutyrate) films: Water-transport phenomena and sorption. *J. Appl. Polym. Sci.* 76, 475-480
- IPF (2000) Verarbeitung und Oberflächenmodifizierung von Polyhydroxybuttersäure zur Entwicklung von resorbierbaren Zellträgern für *tissue engineering*. In: Jahresbericht 2000. Institut für Polymerforschung Dresden e.V., 23-29
- ISHIZAKI, A., TANAKA, K., TAGA, N. (2001) Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO<sub>2</sub>. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 6-12
- IWAMOTO, T., TANI, K., NAKAMURA, K., SUZUKI, Y., KITAGAWA, M., EGUCHI, M., MASAO, N. (2000) Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 129-141
- JACKSON, F.A., DAWES, E.A. (1976) Regulation of the Tricarboxylic Acid Cycle and Poly-β-hydroxybutyrate Metabolism in *Azotobacter beijerinckii* Grown under Nitrogen or Oxygen Limitation. *J. Gen. Microbiol.* 97, 303-312
- JAHNKE, L.L., SUMMONS, R.E., HOPE, J.M., DES MARAIS, D.J. (1999) Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria II: The effects of physiology and environmental parameters on the biosynthesis and isotopic signatures of biomarkers. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 63, 79-93
- JAMES, B.W., MAUCLINE, W.S., DENNIS, P.J., KEEVIL, C.W., WAIT, R. (1999) Poly-3-Hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an Energy Source for Survival in Low-Nutrient Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 822-827
- JANDER, G., BLASIUS, E. (1962) Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie. S. Hirzel Verlag. Leipzig
- JENSEN, S., ØVREÅS, L., DAAE, F.L., TORSVIK, V. (1998) Diversity in methane enrichments from agricultural soil revealed by DGGE separation of PCR amplified 16S rDNA fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 17-26
- JUNG, Y.M., PARK, J.S., LEE, Y.H. (2000) Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned phbCAB genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 201-208
- JUNG, C., STEINBÜCHEL, A. (2001) Bioplastik aus Nutzpflanzen. *Biologie in unserer Zeit.* 31, 250-258
- JUNG, K., HAZENBERG, W., PRIETO, M., WITHOLT, B. (2001) Two-stage continuous process development for the production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates). *Biotechnol. Bioeng.* 72, 19-25
- KAMAEV, P.P., ALIEV, I.I., IORDANSKII, A.L., WASSERMAN, A.M. (2000) Molecular dynamics of the spin probes in dry and wet poly(3-hydroxybutyrate) films with different morphology. *Polymer.* 42, 515-520
- KAPPELMEYER, U., KUSCHK, P., STOTTMEISTER, U. (2001) Model experiments on the influence of artificial humic compounds on chemodenitrification. *Water Air Soil Pollut.* Akzeptiert 18.5.01
- KARAYINNIS, V.G., MADIGAN, M.T. (1990) Aceton as a Substrate for poly-β-hydroxybutyrate production by phototrophic purple bacteria. In: Dawes, E.A. (Ed.) *Novel Biodegradable Microbial Polymers*. Kluwer Academic Publishers, Netherland. 427-430
- KATOH, T., YUGUCHI, D., YOSHII, H., SHI, H., SHIMIZU, K. (1999) Dynamics and modeling on fermentative production of poly (β-hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a mixed culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biotechnol.* 67, 113-134

- KAWAGUCHI, Y., DOI, Y. (1990) Structure of native poly(3-hydroxybutyrate) granules characterized by X-ray diffraction. *FEMS Microbiol. Lett.* 70, 151-156
- KAWAGUCHI, Y., DOI, Y. (1992) Kinetics and Mechanism of Synthesis and Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *Macromolecules.* 25, 2324-2329
- KELLERHALS, M. B., KESSLER, B., WITHOLT, B., TCHOUBOUKOV, A., BRANDL, H. (2000) Renewable long-chain fatty acids for production of biodegradable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) at laboratory and pilot plant scales. *Macromolecules.* 33, 4690-4698
- KESSLER, B., WEUSTHUIS, R., WITHOLT, B., EGGINK, G. (2001) Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71, 159-182
- KICHISE, T., FUKUI, T., YOSHIDA, Y., DOI, Y. (1999) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 69-77
- KIM, B.S., LEE, S.Y., CHANG, H.N. (1992) Production of Poly-beta-Hydroxybutyrate by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 14, 811-816
- KIM, D., DAY, D.F. (1994) A new process for the production of clinical Dextran by mixed-culture fermentation of *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 844-848
- KIM, B.S., LEE, S.C., CHANG, H.N., CHANG, Y.K., WOO, S.I. (1994a) Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) by Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Glucose Concentration Control. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 892-898
- KIM, B.S., LEE, S.C., LEE, S.Y., CHANG, H.N., Y. CHANG, K., WOO, S.I. (1994b) Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyser. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 556-561
- KIM, D.M., JHON, D.Y., PARK, K.H., DAY, D.F. (1996) Mixed culture fermentation for the production of clinical quality dextran with starch and sucrose. *Biotechnol. Lett.* 18, 1031-1034
- KIM, S.W., KIM, P., LEE, H.S., KIM, J.H. (1996b) High Production of Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under Potassium Limitation. *Biotechnol. Lett.* 18, 25-30
- KIM, G.J., LEE, I.Y., YOON, S.C., SHIN, Y.C., PARK, Y.H. (1997) Enhanced yield and a high production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in a two-step fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* by combined use of glucose and octanoate. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 500-505
- KIM, B.S., CHANG, H.N. (1998) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. *Biotechnol. Lett.* 20, 109-112
- KIM, S.W., KIM, P., KIM, J.H. (1998) PHB accumulation stimulated by ammonium ions in potassium-limited cultures of *Methylobacterium organophilum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 301-304
- KIM, S.-W., KIM, P., KIM, H.J. (1999) Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Methylobacterium organophilum* by potassium-limited fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 555-560
- KIM, B.S. (2000) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 774-777
- KIM, G.J., BANG, K.H., KIM, Y.B., RHEE, Y.H. (2000a) Preparation and characterization of native poly(3-hydroxybutyrate) microspheres from *Ralstonia eutropha*. *Biotechnol. Lett.* 22, 1487-1492
- KIM, D.Y., KIM, Y.B., RHEE, Y.H. (2000b) Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. *Int. J. Biol. Macromol.* 28, 23-29
- KIM, Y.B., LENZ, R.W. (2001) Polyesters from Microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71, 51-79
- KIMURA, H., OHURA, T., TAKEISHI, M., NAKAMURA, S., DOI, Y. (1999) Effective microbial production of poly(4-hydroxybutyrate) homopolymer by *Ralstonia eutropha* H16. *Polym. Int.* 48, 1073-1079

- KING, G.M., SCHNELL, S. (1994) Ammonium and Nitrite Inhibition of Methane Oxidation by *Methylobacter albus* BG8 and *Methylosinus trichosporium* OB3b at Low Methane Concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3508-3513
- KORSATKO, W., WABNEGG, B., TILLIAN, H.M., EGGER, G., PFRAGNER, R., WALSER, V. (1984) Poly-D(-)-3-hydroxybuttersäure - ein biologisch abbaubarer Arzneistoffträger zur Liberationsverzögerung. *Pharm. Ind.* 46, 952-954
- KRAUSE, K. (1998) Vergleichende Untersuchungen zum PHB-Bildungspotential methanotropher Bakterien. Praktikumsarbeit. Fachhochschule Anhalt/Köthen
- KRÜGER, M., FRENZEL, P., CONRAD, R. (2001) Microbial processes influencing methane emission from rice fields. *Glob. Change Biol.* 7, 49-63
- KUMARASWAMY, S., KUMAR, A., RAMAKRISHNAN, B., SETHUNATHAN, N. (2000) Wetland rice soils as sources and sinks of methane: a review and prospects for research. *Biol. Fertility Soils.* 31, 449-461
- KUNIOKA, M., NAKAMURA, Y., DOI, Y. (1988) New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids. *Polymer Comm.* 29, 174-176
- KUSAKA, S., ABE, H., LEE, S.Y., DOI, Y. (1997) Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 140-143
- KUSAKA, S., IWATA, T., DOI, Y. (1998) Microbial Synthesis and Physical Properties of Ultra-High-Molecular-Weight Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate]. *J. Mater. Sci.* 35, 319-335
- KUSAKA, S., IWATA, T., DOI, Y. (1999) Properties and biodegradability of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] produced by a recombinant *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 87-94
- LAFFERTY, R.M., BRAUNEGG, G. (1984a) Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Poly(D(-)-3-hydroxybuttersäure. EP 149744
- LAFFERTY, R.M., BRAUNEGG, G. (1984b) Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Poly(D(-)-3-hydroxybuttersäure. EP 144017
- LAFFERTY, R.M., KORSATKO, B., KORSATKO, W. (1988) Microbial Production of Poly- $\beta$ - Hydroxybutyric Acid. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.) *Biotechnology*. VCH Weinheim. Volume 6b/Chapter 6, 135-176
- LAGEVEEN, R.G., HUISMAN, G.W., PREUSTING, H., KETELAAR, P., EGGINK, G., WITHOLT, B. (1988) Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2924-2932
- LAMB, S.C., GARVER, J.C. (1980) Batch- and Continuous-Culture Studies of a Methane-Utilizing Mixed Culture. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 2097-2118
- LAMB, S.C., GARVER, J.C. (1980b) Interspecific Interactions in a Methane-Utilizing Mixed Culture. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 2119-2135
- LANE, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd.. 115-147
- LAW, J.H., SLEPECKY, R.A. (1961) Assay of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 82, 33-36
- LEAK, D.J., STANLEY, S.H., DALTON, H. (1985) Implications of the Nature of Methane Monooxygenase on Carbon Assimilation in Methanotrophs. In: Poole, R.K., Dow, C.S. (Eds.) *Microbial Gas Metabolism*. Academic Press, 201-208
- LEAK, D.J., DALTON, H. (1986a) Growth yields of methanotrophs. Effect of copper on the energetics of methane oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 470-476
- LEAK, D.J., DALTON, H. (1986b) Growth Yields of methanotrophs. A theoretical analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 477-481
- LEE, Y.-K. (1981) The Use of Algal-Bacterial Mixed Cultures in the Photosynthetic Production of Biomass. In: Bushell, M.E., Slater, J.H. (Eds.) *Mixed Culture Fermentations*, Academic Press London, New York, 151-169

- LEE, I.Y., NAM, S.W., CHOI, E.S., CHANG, H.N., PARK Y.H. (1993) Production of Poly-beta-hydroxybutyrate and Measurement of Related Enzyme Activities in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Ferment. Bioeng.* 76, 416-418
- LEE, S.Y., LEE, K.M., CHANG, H.N., STEINBÜCHEL, A. (1994) Comparison of Recombinant *E. coli* Strains for Synthesis and Accumulation of Poly-(3-Hydroxybutyric Acid) and Morphological Changes. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1337-1347
- LEE, S.Y., CHANG, H.N. (1995) Production of poly(hydroxyalkanoic acid). *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 52, 27-58
- LEE, S.Y., CHANG, H.N. (1995a) Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: genetic and fermentation studies. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 207-215
- LEE, I.Y., KIM, M.K., KIM, G.J., CHANG, H.N., PARK, Y.H. (1995) Production of Poly(beta-hydroxybutyrate-co-beta-Hydroxyvalerate) from Glucose and Valerate in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* 17, 571-574
- LEE, I.Y., KIM, M.K., CHANG, H.N., PARK, Y.H. (1995a) Regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 35-39
- LEE, S.Y. (1996) Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 1-14
- LEE, J.H., HONG, J., LIM, H.C. (1997) Experimental optimization of fed-batch culture for poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid production. *Biotechnol. Bioeng.* 56, 697-705
- LEE, S.Y. (1998) Poly(3-hydroxybutyrate) production from xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess Eng.* 18, 397-399
- LEE, S.Y., CHOI, J.-I. (1998) Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polym. Degrad. Stabil.* 59, 387-393
- LEE, S.Y., CHOI, J.-I., HAN, K., SONG, J.Y. (1999) Removal of Endotoxin during Purification of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Gram-Negative Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2762-2764
- LEE, S.Y., WONG, H.H., CHOI, J.-I., LEE, S.H., LEE, S.C., HAN, C.S. (2000a) Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation. *Biotechnol. Bioeng.* 68, 466-470
- LEE, S.H., OH, D.H., AHN, W.S., LEE, Y., CHOI, J.-I., LEE, S.Y. (2000b) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 240-244
- LEE, Y.H., SEO, I.S., JUNG, Y.M., HUH, T.L. (2000c) Construction of transformant *Alcaligenes latus* enforcing its own cloned phbC gene and characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis. *Biotechnol. Lett.* 22, 961-967
- LEE, H.-J., BAE, J.-H., CHO, K.-M. (2001) Simultaneous nitrification and denitrification in a mixed methanotrophic culture. *Biotechnol. Lett.* 23, 935-941
- LEHMANN, O., MAYER, T., RAPHEL, I., RAUCHSTEIN, K., RUNKEL, D., SCHAFFER, J. (1993) Verfahren zur Gewinnung von farbstofffreien Polyhydroxyalkanoaten. Patent DE 4215860. Buna SOW Leuna Olefinverbund GmbH
- LEMOIGNE, M. (1926) Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8, 770-782
- LENDLEIN, A. (2001) Polymere als Implantatwerkstoffe. *Chem. Unserer Zeit.* 33, 279-295
- LINTON, J.D., BUCKEE, J.C. (1977) Interactions in a Methane-utilizing Mixed Bacterial Culture in a Chemostat. *J. Gen. Microbiol.* 101, 219-225
- LINDE (1999) VZA Leuna, persönliche Mitteilung Hr. Krieg, 30.06.99
- LIU, F., LI, W., RIDWAY, D., GU, T. (1998) Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *E. coli*. *Biotechnol. Lett.* 20, 345-348

- LÖBLER, M., SASS, M., KUNZE, C., MICHEL, P., SCHMITZ, K.-P., HOPT, U.T. (2000) Biomaterialimplantation am Rattenmagen induziert Hydrolasen des Pankreas und hepatocytenspezifische Proteine. In: Tagungsband Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) und Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien (CAB), 3. Kolloquium der Kompetenzzentren für Biomaterialien, 24./25.11.2000. Ulm, 50
- LOOTZ, D., KOBOW, M., ZINBER, G., MICHALIK, I., BEHREND, D., SCHMITZ, K.-P. (1997) Untersuchungen zur Eigenschaftsveränderungen von Polyhydroxybuttersäure infolge Sterilisation. *Biomed. Tech.* 42, 53-54
- LOOTZ, D., BEHREND, D., KRAMER, S., FREIER, T., HAUBOLD, A., BENKIESSER, G., SCHMITZ, K.P., BECHER, B. (2001) Laser cutting: influence on morphological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate. *Biomaterials.* 22, 2447-2452
- LUNDGREN, D.G., PFISTER, R.M., MERRICK, J.M. (1964) Structure of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric Acid Granules. *J. Gen. Microbiol.* 34, 441-446
- LÜPKE, T., RADUSCH, H.-J., METZNER, K. (1998) Solid State processing of PHB-powder. *Macromol. Symp.* 127, 227-240
- LÜTKE-EVERSLÖH, T., BERGANDER, K., LUFTMANN, H., STEINBÜCHEL, A. (2001) Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages. *Microbiology.* 147, 11-19
- MA, C.K., CHUA, H., YU, P.H.F., HONG, K. (2000) Optimal production of polyhydroxyalkanoates in activated sludge biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84, 981-989
- MACNAUGHTON, S.J., STEPHEN, J.R., VENOSA, A.D., DAVIS, G.A., CHANG, Y.J., WHITE, D.C. (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3566-3574
- MADDEN, L.A., ANDERSON, A.J., SHAH, D.T., ASRAR, J. (1999) Chain termination in polyhydroxyalkanoate synthesis: involvement of exogenous hydroxy-compounds as chain transfer agents. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 43-53
- MADDEN, L. A., ANDERSON, A. J., ASRAR, J., BERGER, P., GARRETT, P. (2000) Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures. *Polymer.* 41, 3499-3505
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. (2001) Brock. Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg Berlin
- MADISON, L.L., HUISMAN, G.W. (1999) Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 23-51
- MAEHARA, A., UEDA, S., NAKANO, H., YAMANE, T. (1999) Analysis of a Polyhydroxyalkanoic Acid Granule-Associated 16-Kilodalton Protein and Its Putative Regulator in the pha Locus of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bacteriol.* 181, 2914-2921
- MAKULA, R.A. (1978) Phospholipid Composition of Methane-Utilizing Bacteria. *J. Bacteriol.* 134, 771-777
- MALLARDÉ, D., VALIÈRE, M., DAVID, C., MENET, M., GUÉRIN, P. (1998) Hydrolytic degradability of poly(3-hydroxyoctanoate) and of a poly(3-hydroxyoctanoate)/poly(R,S-lactic acid) blend. *Polymer.* 39, 3387-3392
- MARCHESSAULT, R.H., OKAMURA, K., SU, C.J. (1970) Physical Properties of Poly( $\beta$ -hydroxy butyrate) II. Conformational Aspects in Solution. *Macromolecules.* 3, 735-740
- MARCHESSAULT, R.H., BLUHM, T.L., DESLANDES, Y., HAMER, G.K., ORTS, W.J., SUNDARARAJAN, P.R., TAYLOR, M.G., BLOEMBERGEN, S., HOLDEN, D.A. (1988) Poly-( $\beta$ -hydroxyalkanoates): biorefinery polymers in search of applications. *Macromol. Chem. Macromol. Symp.* 19, 235-254
- MAROIS, Y., ZHANG, Z., VERT, M., DENG, X., LENZ, R., GUIDOIN, R. (1999) Hydrolytic and enzymatic incubation of polyhydroxyoctanoate (PHO): A short-term *in vitro* study of a degradable bacterial polyester. *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.* 10, 483-499

- MAROIS, Y., ZHANG, Z., VERT, M., DENG, X., LENZ, R., GUIDOIN, R. (2000) Mechanism and rate of degradation of polyhydroxyoctanoate films in aqueous media: A long-term *in vitro* study. *J. Biomed. Mater. Res.* 49, 216-244
- MASKOW, T., BABEL, W. (2001) A calorimetrically based method to convert toxic compounds into poly-3-hydroxybutyrate and to determine the efficiency and velocity of conversion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 234-238
- MATSUSAKI, H., ABE, H., TAGUCHI, K., FUKUI, T., DOI, Y. (2000) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas* sp. 61-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 401-409
- MATSUSAKI, H., MANJI, S., TAGUCHI, K., KATO, M., FUKUI, T., DOI, Y. (1998) Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Biosynthesis Genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J. Bacteriol.* 180, 6459-6467
- MCCOOL, G. J., FERNANDEZ, T., LI, N., CANNON, M.C. (1996) Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 41-48
- MENNER, M.; LUCK, T. (1996) Naschen und Nischen. *Chemische Industrie* 119, 16-17
- MENNER, M.; LUCK, T. (1997) Biologische Vielfalt bakterieller Kunststoffe. *BIO WORLD*. 1, 2-7
- MERCK (2000) <http://www.merck.de>
- MERGAERT, J., WEBB, A., ANDERSON, C., WOUTERS, A., SWINGS, J. (1993) Microbial Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) in Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3233-3238
- MERGAERT, J., ANDERSON, C., WOUTERS, A., SWINGS, J., KERSTERS, K. (1992) Biodegradation of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 317-322
- MERGAERT, J., WOUTERS, A., ANDERSON, C., SWINGS, J. (1995) In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 154-159
- METZNER, K. (1998) Persönliche Mitteilung. Buna SOW Leuna Olefinverbund GmbH
- MIDDELBERG, A.P.J., LEE, S.Y., MARTIN, J., WILLIAMS, D.R.G., CHANG, H.N. (1995) Size analysis of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Granules Produced in Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 17, 205-210
- MIDDLETON, J.C., TIPTON, A.J. (2000) Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 21, 2335-2346
- MIGUEL, O., FERNANDEZ-BERRIDI, M.J., IRUIN, J.J. (1997) Survey on transport properties of liquids, vapors, and gases in biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). *J. Appl. Polym. Sci.* 64, 1849-1859
- MIGUEL, O., IRUIN, J.J. (1999a) Evaluation of the transport properties of poly(3-hydroxybutyrate) and its 3-hydroxyvalerate copolymers for packing applications. *Macromol. Symp.* 144, 427-438
- MIGUEL, O., IRUIN, J.J. (1999b) Water Transport Properties in Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Biopolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 73, 455-468
- MIGUEL, O., EGIBURU, J.L., IRUIN, J.J. (2000) Blends of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) with synthetic poly(3-hydroxybutyrate) and poly(epichlorohydrin): transport properties of carbon dioxide and water vapour. *Polymer.* 42, 953-962
- MITTENDORF, V., ROBERTSON, E.J., LEECH, R.M., KRUGER, N., STEINBÜCHEL, A., POIRIER, Y. (1999) Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 13397-13402
- MIYAKE, M., ERATA, M., ASADA, Y. (1996) A Thermophilic Cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, Capable of Accumulating Poly-β-Hydroxybutyrate. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 512-514
- MIYAKE, M., TAKASE, K., NARATO, M., KHATIPPOV, E., SCHNACKENBERG, J., SHIRAI, M., KURANE, R., ASADA, Y. (2000) Polyhydroxybutyrate production from carbon dioxide by cyanobacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84, 991-1002

- MIYAKI, Y., EINAGA, Y., HIROSE, T., FUJITA, H. (1977) Solution Properties of Poly(3- $\beta$ -hydroxybutyrate). 2. Light Scattering and Viskosity in Trifluorethanol and Behaviour of Highly Expanded Polymer Coils. *Macromolecules*. 10, 1356-1364
- MIYANO, K., YE, K.M., SHIMIZU, K. (2000) Improvement of vitamin B-12 fermentation by reducing the inhibitory metabolites by cell recycle system and a mixed culture. *Biochem. Eng. J.* 6, 207-214
- MOHANTY, A.K., MISRA, M., HINRICHSEN, G. (2000) Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. *Macromol. Mater. Eng.* 276/277, 1-24
- MORAN, B.N., HICKEY, W.J. (1997) Trichlorethylene Biodegradation by Mesophilic and Psychrophilic Ammonia Oxidizers and Methanotrophs in Groundwater Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3866-3870
- MOTHES, G., BABEL, W. (1995) *Methylobacterium rhodesianum* MB 126 possesses two stereospecific crotonyl-CoA hydratases. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 68-71
- MOTHES, G. (1997) Synthese von Polyhydroxybuttersäure (PHB) und ihre Regulation in methylotherphen „Serinwegbakterien“. Dissertation. Universität Leipzig
- MOTHES, G., SKINFILL-RIVERA, I., BABEL, W. (1997) Competition between  $\beta$ -ketothiolase and citrate synthase during poly(-hydroxybutyrate) synthesis in *Methylobacterium rhodesianum*. *Arch. Microbiol.* 166, 405-410
- MOTHES, G., ACKERMANN, J.-U., BABEL, W. (1998) Regulation of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) synthesis in *Methylobacterium rhodesianum* MB 126 growing on methanol or fructose. *Arch. Microbiol.* 169, 360-363
- MÜLLER, H.-M., SEEBACH, D. (1993) Poly(hydroxyfettsäureester), eine fünfte Klasse von physiologisch bedeutsamen organischen Biopolymeren *Angew. Chem.* 105, 483-509
- MÜLLER, S., LÖSCHE, A., BLEY, T., SCHEPER, T. (1995) A flow cytometric approach for characterization and differentiation of bacteria during microbial processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 93-101
- MÜLLER, R.H., BABEL, W. (1996) Measurement of growth at very low rates ( $\mu \geq 0$ ), an approach to study the energy requirement for the survival of *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 147-151
- MÜLLER, S., BLEY, T., BABEL, W. (1999) Adaptive responses of *Ralstonia eutropha* to feast and famine conditions analysed by flow cytometry. *J. Biotechnol.* 75, 81-97
- MURRELL, C.J., RADAJEWSKI, S. (2000) Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. *Res. Microbiol.* 115, 807-814
- MURRELL, C.J., McDONALD, I.R., GILBERT, B. (2000) Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. *Trends Microbiol.* 8, 221-225
- MUSMANNO, R.A., Di MAGGIO, T., CORATZA, G. (1999) Studies on strong and weak killer phenotypes of wine yeasts: production, activity of toxin in must, and its effect in mixed culture fermentation. *J. Appl. Biotechnol.* 87, 932-938
- MUTZALL, K. (1993) Einführung in die Fermentationstechnik. Behr's Verlag. Hamburg
- MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700
- MUYZER, G., SMALLA, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 127-141
- NAKAMURA, S., DOI, Y., SCANDOLA, M. (1992) Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules*. 25, 4237-4241
- NAWRATH, C., POIRIER, Y., SOMERVILLE, C. (1994) Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91, 12760-12764

- NGUYEN, H.-H.T., ELLIOTT, S.J., YIP, J.H.-K., CHAN, S.I. (1998) The Particulate Methane Monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) Is a Novel Copper-containing Three-subunit Enzyme. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 273, 7957-7966
- NICHOLS, P.D., SMITH, G.A., ANTWORTH, C.P., HANSON, R.S., WHITE, D.C. (1985) Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signatures for methane-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 327-335
- NICHOLS, P.D., HENSON, J.M., ANTWORTH, C.P., PARSONS, J., WILSON, J.T., WHITE, D.C. (1987) Detection of a microbial consortium, including Type II Methanotrophs, by use of Phospholipid Fatty Acids in an Aerobic Halogenated Hydrocarbon-Degrading Soil Column enriched with natural gas. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 89-97
- NIELSEN, J. (2001) Microbial process kinetics. In: Ratledge, C., Kristiansen, B. (Eds.) Basic Biotechnology. Cambridge University Press, 127-149
- NOBES, G. A. R., JURASEK, L., MARCHESSAULT, R.H., MARTIN, D.P., PUTAUX, J.L., CHANZY, H. (2000) Growth and kinetics of *in vitro* poly([R]-(-)-3-hydroxybutyrate) granules interpreted as particulate polymerization with coalescence. *Macromol. Rapid Commun.* 21, 77-84
- NOLD, S.C., BOSCHKER, H.T.S., PEL, R., LAANBROEK, H.J. (1999) Ammonium addition inhibits <sup>13</sup>C-methane incorporation into methanotroph membrane lipids in a freshwater sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 81-89
- NONATO, R.V., MANTELATTO, P.E., ROSSELL, C.E.V. (2001) Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 1-5
- NORFERM (2001) <http://www.norferm.no>
- OEDING, V., SCHLEGEL, H.G. (1973)  $\beta$ -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its Significance in the Regulation of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Metabolism. *Biochem. J.* 134, 239-248
- O'NEILL, J.G., WILKINSON, J.F. (1977) Oxidation of Ammonium by methane-oxidizing Bacteria and the Effects of Ammonia on Methane Oxidation. *J. Gen. Microbiol.* 100, 407-412
- OSTLE, A.G., HOLT, J.G. (1982) Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 238-241
- PAGE, W.J., KNOSP, O. (1989) Hyperproduction of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate during Exponential Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1334-1339
- PAGE, W.J., MANCHAK, B., RUDY, J. (1992) Formation of Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2866-2873
- PAGE, W. (1992a) Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses cultures. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 149-158
- PAGE, W.J. (1992b) Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 117-121
- PAGE, W.J. (1995) Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 1-3
- PAGE, W.J., SHERBURNE, R., D'ELIA, L., GRAHAM, L.L. (1995) Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 22-31
- PAGE, W.J., TENOVE, C.J. (1997) Quantification of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by fluorescence of bacteria and granules stained with nile blue A. *Biotechnol. Tech.* 10, 215-220
- PARK, S.J., AHN, W.S., GREEN, P.R., LEE, S.Y. (2001) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Biotechnol. Bioeng.* 74, 81-86
- PARRER, G., SCHROLL, G., GAPES, J.R., LUBITZ, W., SCHUSTER, K.C. (2000) Conversion of solvent evaporation residues from the AB-(acetone-butanol) bioprocess into bacterial cells accumulating thermoplastic polyesters. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 81-86

- PELZ, O., TESAR, M., WITTICH, R.-M., MOORE, E.R.B., TIMMINS, K.N., ABRAHAM, R. (1999) Towards elucidation of microbial community metabolic pathways: unravelling the network of carbon sharing in a pollutant-degrading bacterial consortium by immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry. *Environ. Microbiol.* 1, 167-174
- PEOPLES, O.P., SINSKEY, A.J. (1989) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothialase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 264, 15293-15297
- PERRY, R.H., GREEN, D. (1985) Perry's Chemical Engineers' Handbook. 6<sup>th</sup> Edition. University Graphics Inc. Caledonia
- PETERSEN, K., NIELSEN, P.V., BERTELSEN, G., LAWTHOR, M., OLSEN, M.B., NILSSON, N.H., MORTENSEN, G. (1999) Potential of biobased materials for food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 52-68
- PIEPER, D.H., REINEKE, W. (2000) Engineering bacteria for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 262-270
- PILKINGTON, S.J., DALTON, H. (1990) Soluble Methane Monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* Bath. *Methods Enzymol.* 188, 181-190
- PÖHLAND, H.D., HÜHN, H.J., KLARMANN, H., PRAUSE, M., SOYEZ, K. (1992) High Performance Bacterial Fermentation Process with two Gaseous Substrates. *Acta Biotechnol.* 12, 17-25
- POIRIER, Y., DENNIS, D.E., KLOMPARENS, K., SOMERVILLE, C. (1992) Polyhydroxybutyrate, a Biodegradable Thermoplastic, Produced in Transgenic Plants. *Science.* 256, 520-523
- POIRIER, Y. (1999) Production of new polymeric compounds in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 181-185
- POOL, R. (1989) In Search of the Plastic Potato. *Science.* 245, 1187-1189
- POUTON, C.W., AKHTAR, S. (1996) Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 18, 133-162
- PREUSTING, H., HAZENBERG, W., WITHOLT, B. (1993) Continuous production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans* in a high-cell-density, two-liquid-phase chemostat. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 311-316
- QI, Q., STEINBÜCHEL, A., REHM, B.H.A. (2000) In vitro synthesis of poly(3-hydroxydecanoate): purification and enzymatic characterization of type II polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 37-43
- RAJAPAKSE, J.P., SCUTT, J.E. (1999) Denitrification with natural gas and various new growth media. *Water Res.* 33, 3723-3734
- RAMSAY, J.A., BERGER, E., RAMSAY, B.A., CHAVARIE, C. (1990) Recovery of Poly-3-Hydroxyalkanoic Acid Granules by a Surfactant-Hypochlorite Treatment. *Biotechnol. Tech.* 4, 221-226
- RAMSAY, J.A., BERGER, E., VOYER, R., CHAVARIE, C., RAMSAY, B.A. (1994) Extraction of Poly-3-Hydroxybutyrate using Chlorinated Solvents. *Biotechnol. Tech.* 8, 589-594
- RAMSAY, J.A., ALY HASSAN, M.-C., RAMSAY, B.A. (1995) Hemicellulose as a potential substrate for production of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates). *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 262-266
- RASCHKE, M., MAREK, A., OTTEN, A., WIDDECKE, H. (2001) Kunststoffe aus nachwachsenden Rohstoffen - Ein Vergleich. Aufsatz. FH Braunschweig/Wolfenbüttel (Institut für Recycling)
- RATLEDGE, C. (2001) Biochemistry and physiology of growth and metabolism. In: Ratledge, C., Kristiansen, B. (Eds.) Basic Biotechnology. Cambridge University Press, 21-44
- RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. (1996) (Eds.) Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine. Academic Press. London.
- REHM, B.H.A., STEINBÜCHEL, A. (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 3-19

- REN, Q., SIERRA, N., KELLERHALS, M., KESSLER, B., WITHOLT, B. (2000) Properties of Engineered Poly-3-Hydroxyalkanoates Produced in Recombinant *Escherichia coli* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1311-1320
- REN, T., ROY, R., KNOWLES, R. (2000b) Production and Consumption of Nitric Oxide by Three Methanotropic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3891-3897
- RESCH, G., GRUBER, K., WANNER, SLATER, S., DENNIS, D., LUBITZ, W. (1998) Aqueous release and purification of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) from *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 65, 173-182
- REUSCH, R.N., SADOFF, H.L. (1983) D-(-)-Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in Membranes of Genetically Competent Bacteria. *J. Bacteriol.* 156, 778-788
- REUSCH, R.N. (1989) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eucaryotic membranes. *Proc. Soc. Exp. Med. Biol.* 191, 377-381
- REUSCH, R.N. (1992) Biological complexes of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 119-130
- REUSCH, R.N. (1995) Low molecular weight complexed poly(3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl.1), 50-54
- REUSS, M. (1993) Oxygen Transfer and Mixing: Scale-Up Implications. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.) *Biotechnology*. VCH Weinheim. Volume 3/Chapter 10, 188-216
- RIIS, V., MAI, W. (1988) Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *J. Chromatogr.* 445, 285-289
- ROGERS, J.B., DUTEAU, N.M., REARDON, K.F. (2000) Use of 16S-rRNA to investigate microbial population dynamics during biodegradation of toluene and phenol by a binary culture. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 436-445
- ROGGE, G., KLEBER, H.P. (2001) Charakterisierung der Diversität, Struktur und Stabilität methanverwertender Mischkulturen mit molekularbiologischen Methoden an ausgewählten Applikationsvorhaben. Zwischenbericht 01/01-06/01. Projekt UFZ-11/2000.
- ROELS, J.A. (1980) Application of Macroscopic Principles to Microbial Metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 2457-2514
- RUIZ, J. A., LÓPEZ, N.I., FERNÁNDEZ, R.O., MÉNDEZ, B.S. (2001) Polyhydroxyalkanoate Degradation Is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 225-230
- RUSENDI, D., SHEPPARD, J.D. (1995) Hydrolysis of Potato Processing Waste for the Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Bioresour. Technol.* 54, 191-196
- RUSSELL, J.B., COOK, G.M. (1995) Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* 59, 48-62
- RYU, H.W., HAHN, S.K., CHANG, Y.K., CHANG, H.N. RYU, H.W., HAHN, S.K., CHANG, Y.K., CHANG, H.N. (1997) Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by High Density Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Phosphate Limitation. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 28-32
- RYU, H.W., CHO, K.S., KIM, B.S., CHANG, Y.K., CHANG, H.N., SHIM, H.J. (1999) Mass production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha* with nitrogen and phosphate limitation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 751-756
- SAAD, B., CIARDELLI, G., MATTER, S., WELTI, M., UHLSCHMID, G.K., NEUENSCHWANDER, P., SUTER, U.W. (1996) Characterisation of the cell response of cultured macrophages and fibroblasts to particles of short-chain poly[(R)-3-hydroxybutyric acid]. *J. Biomed. Mater. Res.* 30, 429-439
- SAITO, Y., NAKAMURA, S., HIRAMITSU, M., DOI, Y. (1996) Microbial Synthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polym. Int.* 39, 169-174
- SANDER, R. (1999) Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry (Version 3).  
<http://www.mpch-mainz.mpg.de/~sander/res/henry.html>

- SATOH, H., MINO, T., MATSUO, T. (1999) PHA production by activated sludge. *Int. J. Biol. Macromol.* **25**, 105-109
- SAVENKOVA, L., GERBERGA, Z., KIZHLO, Z., STEGANTSEVA, E. (1999) Effect of phosphate supply and aeration on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in *Azotobacter chroococcum*. *Process Biochem.* **34**, 109-113
- SCHIMEL, J. (2000) Rice, microbes and methane. *Nature* **403**, 375-376
- SCHLEGEL, H.G., GOTTSCHALK, G., VON BARTHA, R. (1961) Formation and utilization of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature*. **191**, 463-465
- SCHMACK, G., GORENFLO, V., STEINBÜCHEL, A. (1998) Biotechnological production and characterization of polyesters containing 4-hydroxyvaleric acid and medium-chain-length hydroxyalkanoic acids. *Macromolecules*. **31**, 644-649
- SCHMACK, G., JEHNICHEN, D., VOGEL, R., TÄNDLER, B. (2000) Biodegradable fibers of poly(3-hydroxybutyrate) produced by high-speed melt spinning and spin drawing. *J. Polym. Sci. B - Polym. Phys.* **38**, 2841-2850
- SCHMITZ, K.-P., BEHREND, D., KRAMER, S. (2000) Molekulargewichtsbestimmung und Biokompatibilitätsuntersuchungen von PHB (Methanomer<sup>®</sup>) Bericht IBMT (R) 011/2000. Universität Rostock (08.05.2000)
- SCHNEIDER, J.D., WENDLANDT, K.-D., BRÜHL, E., MIRSCHEL, G. (1983) Effektorwirkung von sauerstoffhaltigen C1-Verbindungen bei der Kultivierung des methanotrophen Bakterienstammes GB 25. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*. **23**, 259-268
- SCHNELL, S., KING, G.M. (1994) Mechanistic Analysis of Ammonium Inhibition of Atmospheric Methane Consumption in Forest Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3514-3521
- SCHUBERT, P., STEINBÜCHEL, A., SCHLEGEL, H.G. (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* Genes for Synthesis of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid (PHB) and Synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 5837-5847
- SCHULZ, R. (1999) Untersuchung der PHB-Bildung ausgewählter methanotropher Stämme in Kleinstfermentoren. Praktikumsarbeit. Fachhochschule Anhalt/Köthen
- SCHUMANN, D., WENDLANDT, K.-D. (1999) Verfahren zur Gewinnung eines Homo- oder Copolymers einer Poly- $\beta$ -hydroxyalkansäure (PHA) aus Biomasse. Patent DE 199 55 381. UFZ Leipzig-Halle GmbH.
- SCHUMANN, D., MÜLLER, R.-A. (2000) Verfahren zur Gewinnung von Polyhydroxyalkanoaten (PHA) oder deren Copolymeren. Patentanmeldung Aktenzeichen 100 13 514.5. UFZ Leipzig-Halle GmbH.
- SCHUMANN, D., MÜLLER, R.-A., WENDLANDT, K.-D. (2000) Optimierung der Aufarbeitung von PHB/PHA-Biomassen (Teilprojekt III). In: Abschlußbericht zum SMWK-Forschungsprojekt „Biotechnologische Herstellung von Polymeren mit spezifischen Werkstoffeigenschaften“ (AZ 7531.90-03-UFZ/702)
- SCHURZ, J. (1972) Viskositätsmessungen an Hochpolymeren. Verlag W. Kohlhammer Berliner Union GmbH. Stuttgart
- SEITER, H., SCHMITZ, K.-P., BEHREND, D. (2000) Biowerkstoffe in der Urologie. *Urologe A*. **39**, 463-468
- SENIOR, P.J., DAWES, E.A. (1971) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Biosynthesis and the Regulation of Glucose Metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **125**, 55-66
- SENIOR, P.J., BEECH, G.A., RICHIE, G.A.F, DAWES, E.A. (1972) The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **128**, 1193-1201
- SENIOR, P.J., DAWES, E.A. (1973) The Regulation of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **134**, 225-238
- SHABALA, L., ROSS, T., NEWMAN, I., MCMEEKIN, T., SHABALA, S. (2001) Measurements of net fluxes and extracellular changes of  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ , and  $NH_4^+$  in *Escherichia coli* using ion-selective microelectrodes. *J. Microbiol. Methods*. **46**, 119-129

- SHAH, N.N., HANNA, M.L., TAYLOR, R.T. (1996) Batch Cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b: V. Characterization of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Production under Methane-Dependent Growth Conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 161-71
- SHEEHAN, B.T., JOHNSON, M.J. (1971) Production of Bacterial Cells from Methane. *Appl. Microbiol.* 21, 511-515
- SHIMIZU, H., TAMURA, S., SHIOYA, S., SUGA, K.-I. (1993) Kinetic Study of Poly-D(-)-3-Hydroxybutyric Acid (PHB) Production and Its Molecular Weight Distribution Control in an Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Ferment. Bioeng.* 76, 465-469
- SIM, J.S., SNELL, K.D., HOGAN, S.A., STUBBE, J., RHA, C., SINSKEY, A.J. (1997) PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 15, 63-67
- SIMON, C.J. (1999) Verbrauch von Kunststoffen für Verpackungen in Westeuropa 1998. Verband Kunststoff-erzeugende Industrie. <http://www.vke.de>
- SIPKEMA, E.M., DE KONING, W., GANZVELD, K.J., JANSSEN, D.B., BEENACKERS, A.A.C.M. (1998) Experimental pulse technique for the study of microbial kinetics in continuous culture. *J. Biotechnol.* 64, 159-176
- SIPKEMA, E.M., DE KONING, W., GANZVELD, K.J., JANSSEN, D.B., BEENACKERS, A.A.C.M. (2000) NADH-regulated metabolic model for growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b. Model presentation, parameter estimation, and model validation. *Biotechnol. Prog.* 16, 176-188
- SKROWNY, H. (1996) Extraktion von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure (PHB) aus methanotrophen Bakterien. Ergebnisprotokoll
- SLATER, J.H. (1981) Mixed Cultures and Microbial Communities. In: Bushell, M.E., Slater, J.H. (Eds.) Mixed Culture Fermentations, Academic Press London, New York, 1-24
- SLATER, S.C., VOIGE, W.H., DENNIS, D.E. (1988) Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Biosynthetic Pathway. *J. Bacteriol.* 170, 4431-4436
- SLATER, S., MITSKY, T.A., HOUMIEL, K.L., HAO, M., REISER, S.E., TAYLOR, N.B., TRAN, M., VALENTIN, H.E., RODRIQUEZ, D.J., STONE, D.A., PADGETTE, S.R., KISHORE, G., GRUYS, K.S. (1999) Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. *Nat. Biotechnol.* 17, 1011-1016
- SMALLA, K., WACHTENDORF, U., HEUER, H., LIU, W.-T., FORNEY, L. (1998) Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1220-1225
- SMITH, L.H., KITANIDIS, P.K., MCCARTY, P.L. (1997) Numerical modeling and uncertainties in rate coefficients for methane utilization and TCE cometabolism by a methane-oxidizing mixed culture. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 320-331
- SODIAN, R., HOERSTRUP, S.P., SPERLING, J.S., DAEBRITZ, S.H., MARTIN, D.P., SCHOEN, F.J., VACANTI, J., MAYER, J.E. (2000) Tissue engineering of heart valves: *in vitro* experiences. *Ann. Thorac. Surg.* 70, 140-144
- SODINI, I., LATRILLE, E., CORRIEU, G. (2000) Identification of interacting mixed cultures of lactic acid bacteria by their exclusion from a model predicting the acidifying activity of non-interacting mixed cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 715-718
- SON, H., PARK, G., LEE, S. (1996) Growth-associated production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from glucose or alcoholic distillery wastewater by *Actinobacillus* sp. EL-9. *Biotechnol. Lett.* 18, 1229-1234
- SONG, S., HEIN, S., STEINBÜCHEL, A. (1999) Production of poly(4-hydroxybutyric acid) by fed-batch cultures of recombinant strains of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 21, 193-197
- STARKE, C., VOIGT, D., SCHMACK, G. (1998) Untersuchungen zum thermoplastischen Verarbeitungsverhalten und Charakterisierung der Struktur-Eigenschaftsrelationen von PHB/PHA (Teilprojekt IV). In: 2. Zwischenbericht zum SMWK-Forschungsprojekt "Biotechnologische Herstellung von Polymeren mit spezifischen Werkstoffeigenschaften" (AZ 7531.90-03-UFZ/702)

- STARKE, C., HOFFMANN, M., SCHMACK, G. (2000) Untersuchungen zum thermoplastischen Verarbeitungsverhalten und Charakterisierung der Struktur-Eigenschaftsreaktionen von PHB/PHA (Teilprojekt IV). In: Abschlußbericht zum SMWK-Forschungsprojekt "Biotechnologische Herstellung von Polymeren mit spezifischen Werkstoffeigenschaften" (AZ 7531.90-03-UFZ/702)
- STAROSTINA, N.G., WENDLANDT, K.-D., ROGGE, G., JECHOREK, M. (1995) Interactions between Populations of methanotrophic Bacteria in a Two-Component Culture. *Mikrobiologia*. 64, 722-724
- STEINBÜCHEL, A., SCHLEGEL, H.G. (1989) Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus*, which are impaired in the accumulation of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 168-175
- STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H.E., SCHÖNEBAUM, A. (1994) Application of Recombinant Gene Technology for Production of Polyhydroxyalkanoic Acids: Biosynthesis of Poly(4-Hydroxybutyric Acid) Homopolymer. *J. Environ. Polym. Degrad.* 2, 67-74
- STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H.E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 128, 219-228
- STEINBÜCHEL, A., AERTS, K., BABEL, W., FÖLLNER, C., LIEBERGESELL, M., MADKOUR, M.H., MAYER, F., PIEPER-FÜRST, U., PRIES, A., VALENTIN, H.E., WIECZOREK, R. (1995) Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 94-105
- STEINBÜCHEL, A. (1996) PHB and other Polyhydroxyalkanoic Acids. In: Rehm, H.-J., Reed, G., Roehr, M. (Eds.) *Biotechnology*. VCH Weinheim. Volume 6/Chapter 13, 404-464
- STEINBÜCHEL, A., FÜCHTENBUSCH, B. (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol.* 16, 419-427
- STEINBÜCHEL, A. (2001) Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromol. Biosci.* 1, 1-24
- STEINBÜCHEL, A., HEIN, S. (2001) Biochemical and Molecular Basis of Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71, 81-123
- STOYLER, S., COSTELLO, A.M., PEEPLES, T.L., LIDSTROM, M.E. (1999) Role of multiple gene copies in particulate methane monooxygenase activity in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath. *Microbiology*. 145, 1235-1244
- STUART, E.S., THERANI, A., VALENTIN, H.E., DENNIS, D., LENZ, R.W., FULLER, R.C. (1998) Protein organization on the PHA inclusion cytoplasmic boundary. *J. Biotechnol.* 64, 137-144
- SUDES, K., FUKUI, T., DOI, Y. (1998) Genetic Analysis of *Comamonas acidovorans* Polyhydroxyalkanoate Synthase and Factors Affecting the Incorporation of 4-Hydroxybutyrate Monomer. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3437-3443
- SUDES, K., FUKUI, T., TAGUCHI, K., IWATA, T., DOI, Y. (1999) Improved production of poly(4-hydroxybutyrate) by *Comamonas acidovorans* and its freeze-fracture morphology. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 79-85
- SUDES, K., DOI, Y. (2000) Molecular design and biosynthesis of biodegradable polyesters. *Polym. Adv. Technol.* 11, 865-872
- SUDES, K., ABE, H., DOI, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 10, 1503-1555
- SUNDH, I., BORGÅ, P., NILSSON, M., SVENSSON, B.H. (1995) Estimation of cell numbers of methanotrophic bacteria in boreal peatlands based on analysis of specific phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 18, 103-112
- SUZUKI, T., YAMANE, T., SHIMIZU, S. (1986) Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 322-329
- SUZUKI, T., YAMANE, T., SHIMIZU, S. (1986a) Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 370-374

- SUZUKI, T., YAMANE, T., SHIMIZU, S. (1986b) Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 366-369
- SUZUKI, T., DEGUCHI, H., YAMANE, T., SHIMIZU, S., GEKKO, K. (1988) Control of molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 487-491
- SWIFT, G. (1992) Biodegradability of polymers in the environment: complexities and significance of definitions and measurement. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 339-346
- TAIDI, B., ANDERSON, A.J., DAWES, E.A., BYROM, D. (1994) Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 786-90
- TAIDI, B., MANSFIELD, D.A., ANDERSON, A.J. (1995) Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 201-206
- TAKABATAKE, H., SATOH, H., MINO, T., MATSUO, T. (2000) Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process. *Water Sci. Technol.* 42, 351-356
- TAKEDA, M., MATSUOKA, H., HAMANA, H., HIKUMA, M. (1995) Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Spaerotilus natans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 31-34
- TAKEGUCHI, M., OHASHI, M., OKURA, I. (1999) Role of iron in particulate methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biomaterials.* 12, 123-129
- TANAKA, K., ISHIZAKI, A., KANAMARU, T., KANANO, T. (1995) Production of Poly(D-3-Hydroxybutyrate) from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub> by High Cell Density Autotrophic Cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.* 45, 268-275
- TEMPEST, D.W., WOUTERS, J.T.M. (1981) Properties and performance of microorganisms in chemostat culture. *Enzyme Microb. Technol.* 3, 283-290
- TERADA, M., MARCHESSAULT, R.H. (1999) Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 207-215
- THALASSO, F., VALLECILLO, A., GARCÍA-ENCINA, P., FDZ-POLANCO, F. (1997) The use of methane as a sole carbon source for wastewater denitrification. *Water Res.* 31, 55-60
- THIEL, V., PECKMANN, J., RICHNOW, H.H., LUTH, U., REITNER, J., MICHAELIS, M. (2001) Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonates and a microbial mat. *Mar. Chem.* 73, 97-112
- TIMM, A., STEINBÜCHEL, A. (1990) Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by wild type and recombinant *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. In: Dawes, E.A. (Ed.) Novel Biodegradable Microbial Polymers. 445-446
- TOHYAMA, M., SHIMIZU, K. (1999) Control of a mixed culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Ralstonia eutropha* for the production of PHB from glucose via lactate. *Biochem. Eng. J.* 4, 45-53
- TOHYAMA, M., TAKAGI, S., SHIMIZU, K. (2000) Effect of Controlling Lactate Concentration and Periodic Change in DO Concentration on Fermentation Characteristics of a Mixed Culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Ralstonia eutropha* for PHB production. *J. Biosci. Bioeng.* 89, 323-328
- TROTSSENKO, Y.A., DORONINA, N.V., SOKOLOV, A.P., OSTAFIN, M. (1992) PHB Synthesis by Methane- and Methanol-Utilizing Bacteria. *Internat. Symp. on Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Göttingen.* 108
- TROTSSENKO, Y.A., BELOVA, L.L. (2000) Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and Its Regulation in Bacteria. *Mikrobiologia.* 69, 635-645
- UEDA, S., MATSUMOTO, S., TAKAGI, A., YAMANE, T. (1992) Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) from Methanol and n-Amyl Alcohol by the Methylotrophic Bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Methylobacterium extorquens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3574-3579
- UMWELTBUNDESAMT (2001) <http://www.umweltbundesamt.de>

- VALENTIN, H.E., LEE, E.Y., CHOI, C.Y., STEINBÜCHEL, A. (1994) Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 710-716
- VALENTIN, E.H., DENNIS, D. (1997) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. *J. Biotechnol.* 58, 33-38
- VALENTIN, H.E., STUART, E.S., FULLER, R.C., LENZ, R.W., DENNIS, D. (1998) Investigation of the function of proteins associated to polyhydroxyalkanoate inclusions in *Pseudomonas putida* BMO1. *J. Biotechnol.* 64, 145-157
- VALENTIN, H.E., BROYLES, D.L., CASAGRANDE, L.A., COLBURN, S.M., CREELY, W.L., DELAQUIL, P.A., FELTON, H.M., GONZALEZ, K.A., HOUMIEL, K.L., LUTKE, K., MAHADEO, D.A., MITSKY, T.A., PADGETTE, S.R., REISER, S.E., SLATER, S., STARK, D.M., STOCK, R.T., STONE, D.A., TAYLOR, N.B., THORNE, G.M., TRAN, M., GRUYS, K.J. (1999) PHA production, from bacteria to plants. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 303-306
- VALENTIN, H.E., REISER, S., GRUYS, K.J. (2000) Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) formation from gamma-aminobutyrate (GABA) and glutamate. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 291-299
- VALLAeYS, T., TOPP, E., MUYZER, G., MACHERET, V., LAGUERRE, G., RIGAUD, A., SOULAS, G. (1997) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 279-285
- VAN BODEGOM, P., GOUDRIAAN, J., LEFFELAAR, P. (2001) A mechanistic model on methane oxidation in a rice rhizosphere. *Biogeochemistry.* 55, 145-177
- VAN DER ELST, M., PATKA, P., VAN DER WERKEN, C. (2000) Resorbierbare Implantate für Frakturfixierungen. Aktueller Stand. *Unfallchirurg.* 103, 178-182
- VAN DER WALLE, G.A.M., BUISMAN, G.J.H., WEUSTHUIS, R.A., EGGINK, G. (1999) Development of environmentally friendly coatings and paints using medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 123-128
- VAN DER WALLE, G.A.M., DE KONING, G.J.M., WEUSTHUIS, R.A., EGGINK, G. (2001) Properties, Modifications and Applications of Biopolyesters. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71, 263-291
- VAN TUIL, R., FOWLER, P., LAWTHORP, M., WEBER, C.J. (2000) Properties of biobased packing materials. In: WEBER, C.J. (Ed.) Biobased Packing Materials for the Food Industry – Status and perspectives. EU-Statusbericht
- VAN WEGEN, R.J., LEE, S.Y., MIDDELBERG, A.P.J. (2001) Metabolic and kinetic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 74, 70-80
- VARY, P.S., JOHNSON, M.J. (1967) Cell Yields of Bacteria Grown on Methane. *Appl. Microbiol.* 15, 1473-1478
- VECHERSKAYA, M., DIJKEMA, C., STAMS, A.J.M. (2001) Intracellular PHB conversion in a Type II methanotroph studied by <sup>13</sup>C-NMR. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 15-21
- VON STOCKAR, U., LIU, J.-S. (1999) Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* 1412, 191-211
- VOSGERAU, D. (1998) Optimierung eines Verfahrens zur Aufarbeitung PHB-haltiger Biomassen. Diplomarbeit. Technische Universität Hamburg-Harburg
- WACKETT, L.P. (2000) Environmental biotechnology. *Trends Biotechnol.* 18, 19-21
- WAGLER, D., WENDLANDT, K.-D., PRAUSE, M., WAGNER, M., TEUMER, P. (1983) Verfahren zur Züchtung methanotropher Bakterien. Patent DD 286 372
- WALKER, J., WHITTON, J.R., ALDERSON, B. (1981) Extraction of PHB. Patent EP 46017. ICI.
- WALLEN, L.L., ROHWEDDER, R.K. (1974) Poly-β-hydroxyalkanoate from Activated Sludge. *Environ. Sci. Technol.* 8, 576-579

- WANG, F., LEE, S.Y. (1997) Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3703-3706
- WANG, F., LEE, S.Y. (1997b) Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Filamentation-Suppressed Recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4765-4769
- WEBER, H. (1997) (Hrsg.) Wörterbuch der Mikrobiologie. Gustav-Fischer-Verlag Jena
- WENDLANDT, K.-D. (1979) Grundlagenuntersuchungen zur mikrobiellen Eiweißsynthese aus Methan/Erdgas. Dissertation. Akademie der Wissenschaften der DDR
- WENDLANDT, K.-D., BRÜHL, E., AMBROSIUS, J., KRANZ, E., KARBAUM, K., LINGNER, G. (1981) Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen. Patent. DDR 148 465
- WENDLANDT, K.-D., JECHOREK, M., BRÜHL, E., WITTIG, H., OSOKINA, N.V., LALAOV, V.V. (1987) Einfluß ausgewählter Nährsalzonen auf die Wachstumskinetik des methanotrophen Bakteriums GB 25. *Acta Biotechnol.* 7, 521-527
- WENDLANDT, K.-D., JECHOREK, M., BRÜHL, E. (1993) The influence of Pressure on the Growth of Methanotrophic Bacteria. *Acta Biotechnol.* 13, 111-115
- WENDLANDT, K.-D., JECHOREK, M., STOTTMEISTER, U., HELM, J., ROGGE, G., KNAAK, E. (1996) Verfahren zur Herstellung von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure und Copolymeren. Patent DE 196 19 084. UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
- WENDLANDT, K.-D. (1997) Persönliche Mitteilung
- WENDLANDT, K.-D., JECHOREK, M., STOTTMEISTER, U., MÜNKER, T., KRETSCHMER, A., MENSCHEL, C., PANNING, F., SCHARR, S. (1998) Method for the material- and energy efficient use of biogas and installation for carrying out said method. Patent WO 98/51814. UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Energy of Nature.
- WENDLANDT, K.-D., JECHOREK, M., HELM, J., STOTTMEISTER, U. (1998) Production of PHB with a high molecular mass from methane. *Polym. Degrad. Stabil.* 59, 191-194
- WENDLANDT, K.-D., JECHOREK, M., HELM, J., STOTTMEISTER, U. (2001) Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *J. Biotechnol.* 86, 127-133
- WHITE, D.C., STAIR, J.O., RINGELBERG, D.B. (1996) Quantitative comparisons of *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *J. Ind. Microbiol.* 17, 185-196
- WHITE, D.C., FLEMMING, C.A., LEUNG, K.T., MACNAUGHTON, S.J. (1998) *In situ* microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *J. Microbiol. Methods.* 92, 93-105
- WHITE, D.C. (1999) Environmental biotechnology Better living through biochemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 217-219
- WHITTENBURY, R., PHILLIPS, K.C., WILKINSON, J.E. (1970) Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61, 205-218
- WIDMER, F., FLIESSBACH, A., LACZKO, E., SCHULZE-AURICH, J., ZEYER, J. (2001) Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog(TM)-analyses. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1029-1036
- WILKINSON, T.G., TOPIWALA, H.H., HAMER, G. (1974) Interactions in a Mixed Bacterial Population Growing on Methane in Continuous Culture. *Biotechnol. Bioeng.* 16, 41-59
- WILLIAMSON, D.H., WILKINSON, J.F. (1958) The Isolation and Estimation of the Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Inclusions of *Bacillus* Species. *J. Gen. Microbiol.* 19, 198-209
- WINTERMANTEL, E., HA, S.W. (1998) Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen. Implantate für Medizin und Umwelt. Springer Verlag. Berlin Heidelberg

- WISE, M.G., MCARTHUR, J.V., SHIMKETS, L.J. (1999) Methanotroph Diversity in Landfill Soil: Isolation of Novel Type I and Type II Methanotrophs Whose Presence Was Suggested by Culture-Independent 16S Ribosomal DNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4887-4897
- WITHOLT, B., KESSLER, B. (1999) Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 279-285
- WITT, U., MÜLLER, R.-J., DECKWER, W.-D. (1995) Biologisch abbaubare Polyester-Copolymere mit einstellbaren Anwendungseigenschaften auf Basis chemischer Massenprodukte. *Chem. Ing. Tech.* 67, 904-907
- WITT, U., YAMAMOTO, M., SEELIGER, U., MÜLLER, R.-J., WARZELHAN, V. (1999) Biodegradable Polymeric Materials-Not the Origin but the Chemical Structure Determines Biodegradability. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 38, 1438-1442
- WONG, H.H., LEE, S.Y. (1998) Poly-(3-hydroxybutyrate)production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 30-33
- WONG, A.L., CHUA, H., LO, W.H., YU, P.H. (2000) Synthesis of bioplastics from food industry wastes with activated sludge biomass. *Water Sci. Technol.* 41, 55-59
- YAMANE, T. (1992) Cultivation engineering of microbial bioplastics production. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 257-264
- YAMANE, T. (1993) Yield of Poly-D(-)-3-Hydroxybutyrate from Various Carbon Sources: A Theoretical Study. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 165-170
- YAMANE, T., FUKUNAGA, M., LEE, Y.W. (1996) Increased PHB Productivity by High-Cell-Density Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus*, a Growth-Associated PHB Producer. *Biotechnol. Bioeng.* 50, 197-202
- YAMANE, T., CHEN, X.-F., UEDA, S. (1996b) Polyhydroxyalkanoate synthesis from alcohols during the growth of *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135, 207-211
- YIM, K.S., LEE, S.Y., CHANG, H.N. (1996) Synthesis of Poly-(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 495-503
- YORK, G.M., STUBBE, J., SINSKEY, A.J. (2001) New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 183, 2394-2397
- YOSHINARI, T. (1985) Nitrite and nitrous oxide production by *Methylosinus trichosporium*. *Can. J. Microbiol.* 31, 139-144
- YOUNG, F.K., KASTNER, J.R., MAY, S.W. (1994) Microbial Production of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid from D-Xylose and Lactose by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4195-4198
- YU, P.H., CHUA H., HUANG, A.L., LO, W., CHEN, G.Q. (1998) Conversion of food industrial wastes into bioplastics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70, 603-614
- YU, H., LI, H., YANG, S., SHEN, Z. (2000) Construction and Selection of the Novel Recombinant *Escherichia coli* Strain for Poly-(Hydroxybutyrate) Production. *J. Biosci. Bioeng.* 89, 307-311
- YU, J. (2001) Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *J. Biotechnol.* 86, 105-112
- ZAHN, J.A., DI SPIRITO, A.A. (1996) Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Bacteriol.* 178, 1018-1029
- ZYAKUN, A.M., ZAKHARCHENKO, V.N. (1998) Carbon Isotop Discrimination by Methanotrophic Bacteria: Practical Use in Biotechnological Research. *Appl. Biochem. Microbiol.* 34, 207-219

ANHANG 0 ZEITLICHE VERLÄUFE

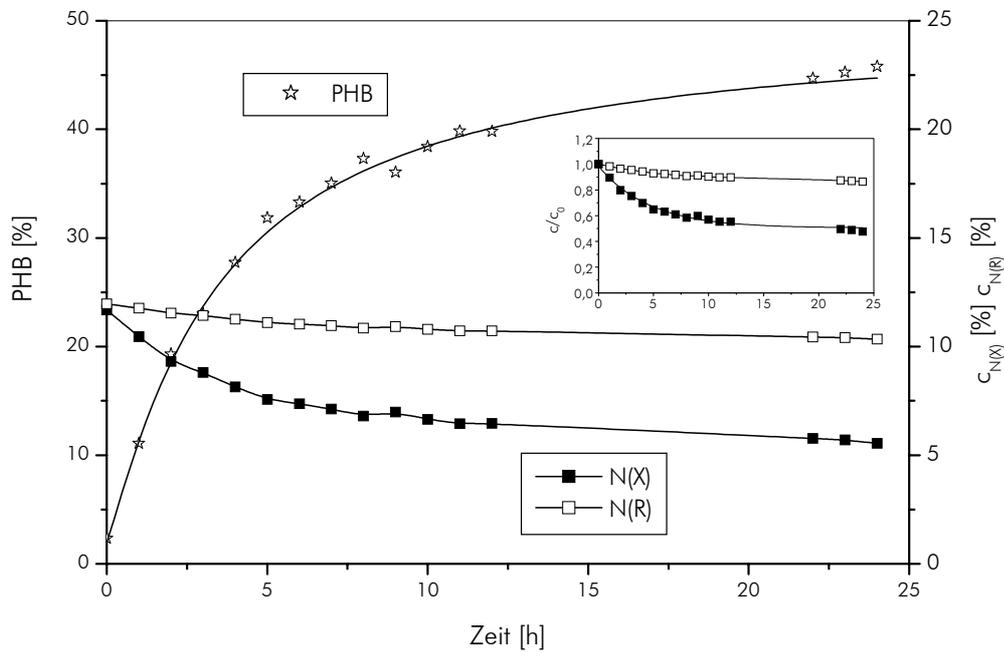


Abb. A-1: Zeitlicher Verlauf des Stickstoffgehaltes in der Gesamt- (■) bzw. Restbiomasse (□) und PHB-Gehalt der Biomasse (☆) während der Produktbildung unter Ammoniumstickstoffmangel

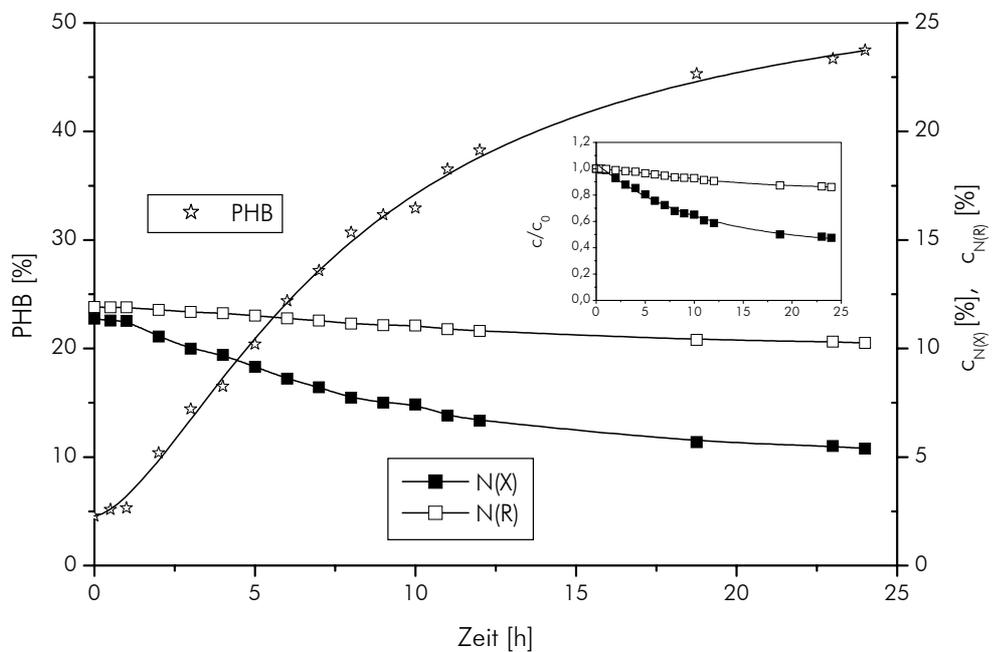


Abb. A-2: Zeitlicher Verlauf des Stickstoffgehaltes in der Gesamt- (■) bzw. Restbiomasse (□) und PHB-Gehalt der Biomasse (☆) während der Produktbildung unter Phosphatmangel

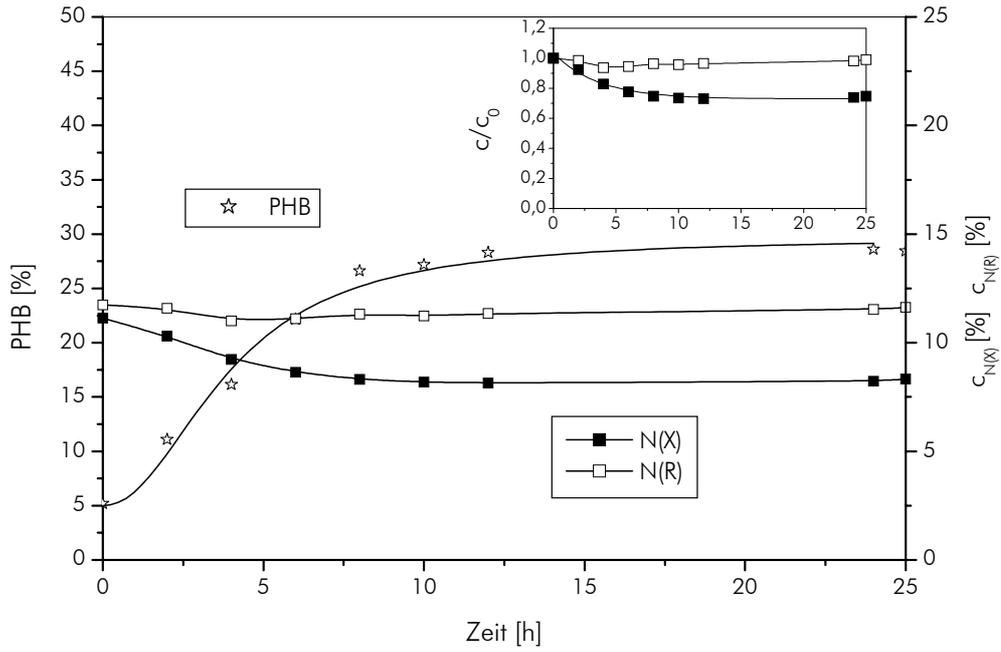


Abb. A-3: Zeitlicher Verlauf des Stickstoffgehaltes in der Gesamt- (■) bzw. Restbiomasse (□) und PHB-Gehalt der Biomasse (☆) während der Produktbildung unter Magnesiummangel

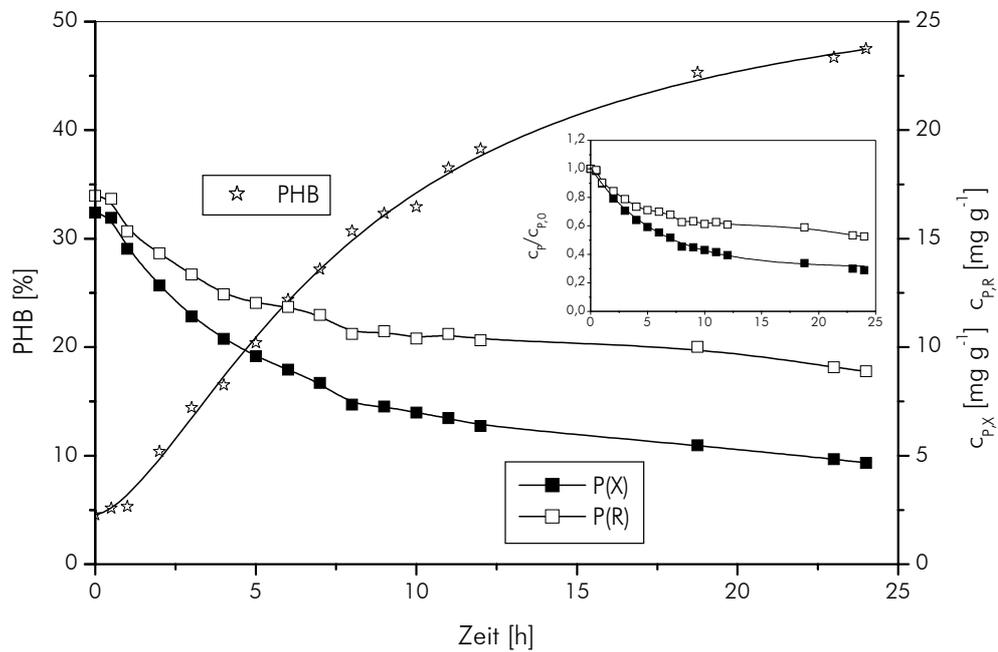


Abb. A-4: Zeitlicher Verlauf des Phosphorgehaltes in der Gesamt- (■) bzw. Restbiomasse (□) und PHB-Gehalt der Biomasse (☆) während der Produktbildung unter Phosphatmangel

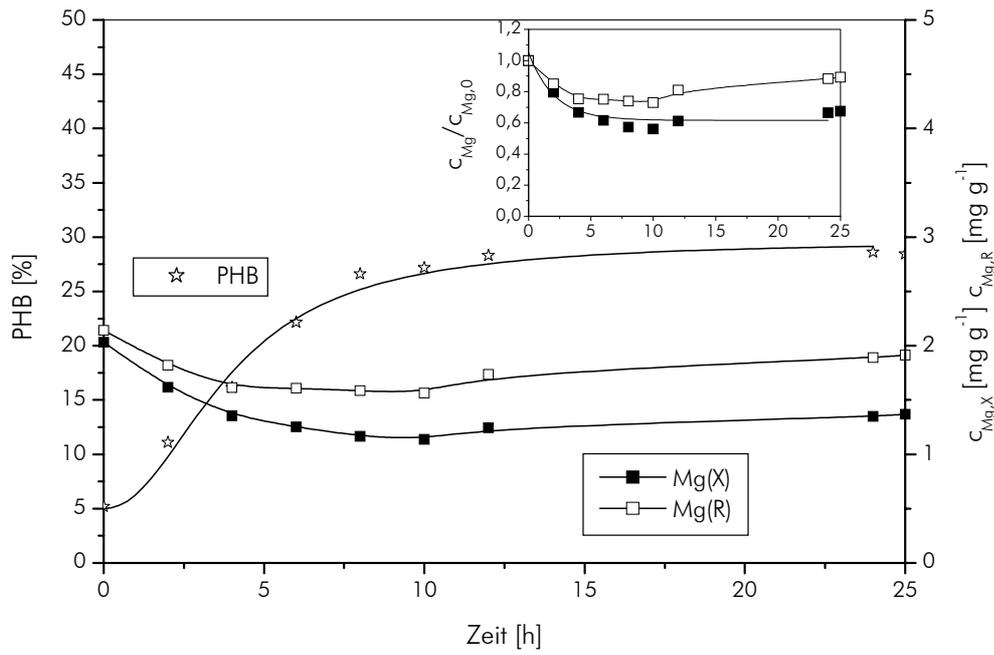


Abb. A-5: Zeitlicher Verlauf des Magnesiumgehaltes in der Gesamt- (■) bzw. Restbiomasse (□) und PHB-Gehalt der Biomasse (☆) während der Produktbildung unter Magnesiummangel

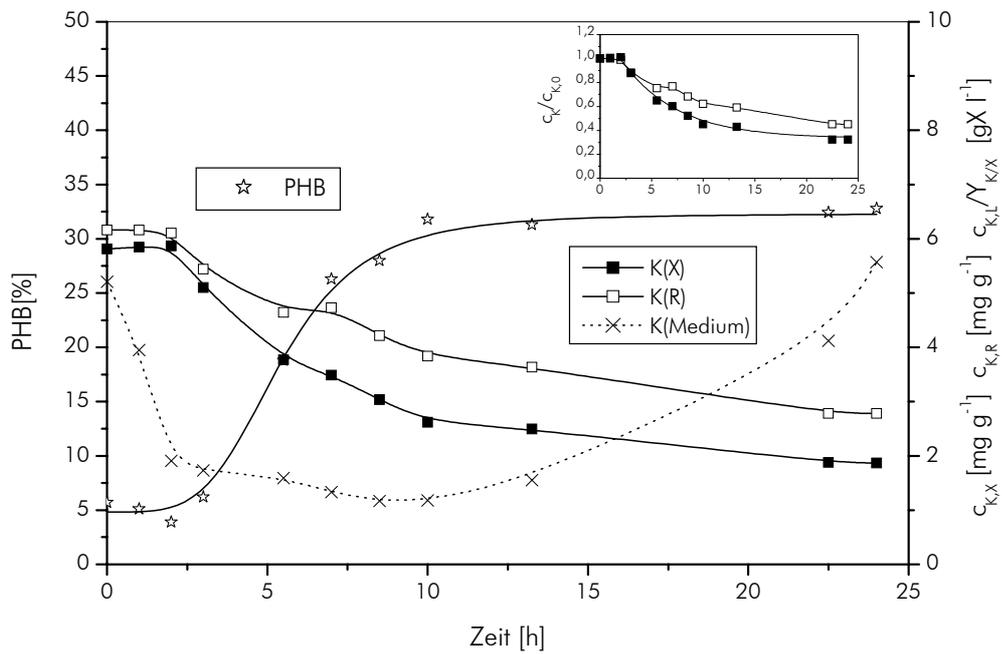


Abb. A-6: Zeitlicher Verlauf des Kaliumgehaltes in der Gesamt- (■) bzw. Restbiomasse (□) bzw. Kaliumkonzentration in der Kulturflüssigkeit (normiert, ×) und PHB-Gehalt der Biomasse (☆) während der Produktbildung unter Kaliummangel

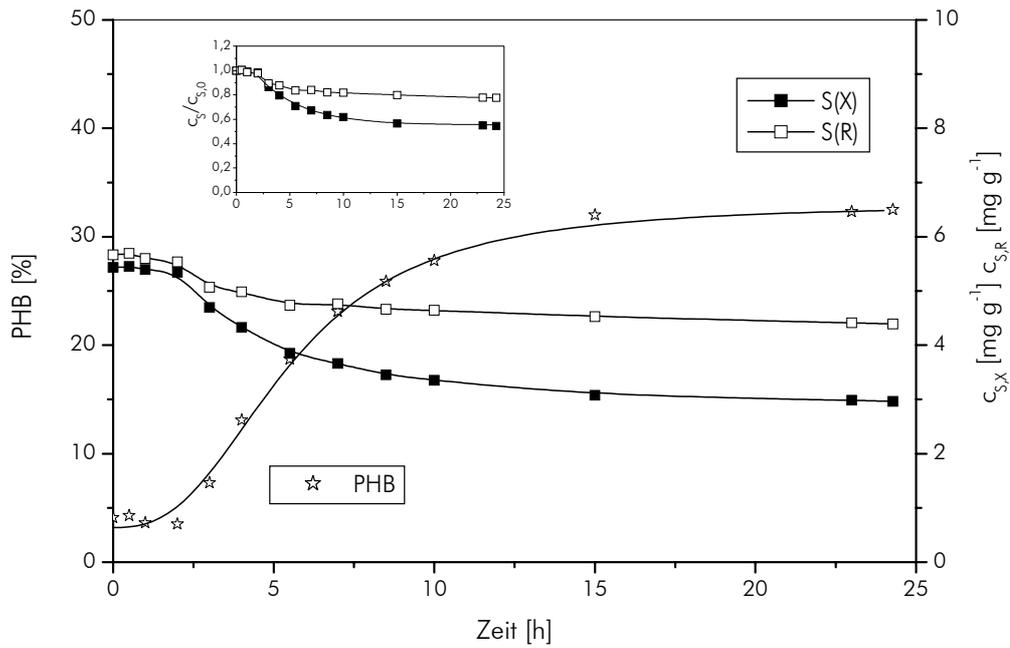


Abb. A-7: Zeitlicher Verlauf des Schwefelgehaltes in der Gesamt- (■) bzw. Restbiomasse (□) und PHB-Gehalt der Biomasse (☆) während der Produktbildung unter Sulfatmangel

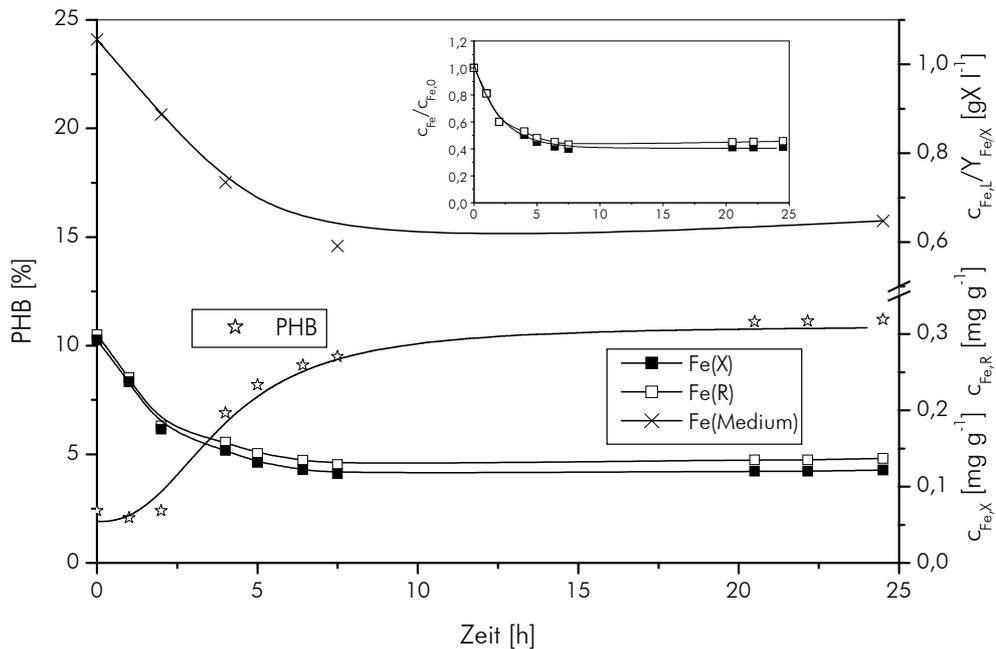


Abb. A-8: Zeitlicher Verlauf des Eisengehaltes in der Gesamt- (■) bzw. Restbiomasse (□) bzw. Eisenkonzentration in der Kulturflüssigkeit (normiert, ×) und PHB-Gehalt der Biomasse (☆) während der Produktbildung unter Eisenmangel

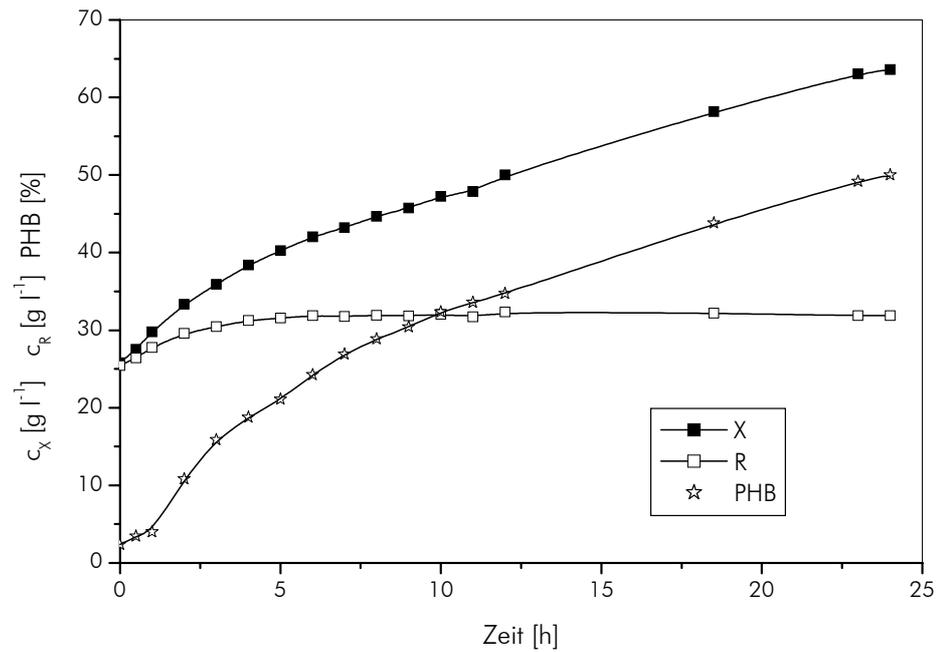


Abb. A-9: Zeitlicher Verlauf der Gesamt- (■) bzw. Restbiomassekonzentration (□) und des PHB-Gehaltes der Biomasse (☆) während der Produktbildung unter Phosphatmangel (Versuch 1 mit Erdgasmodellgemisch)

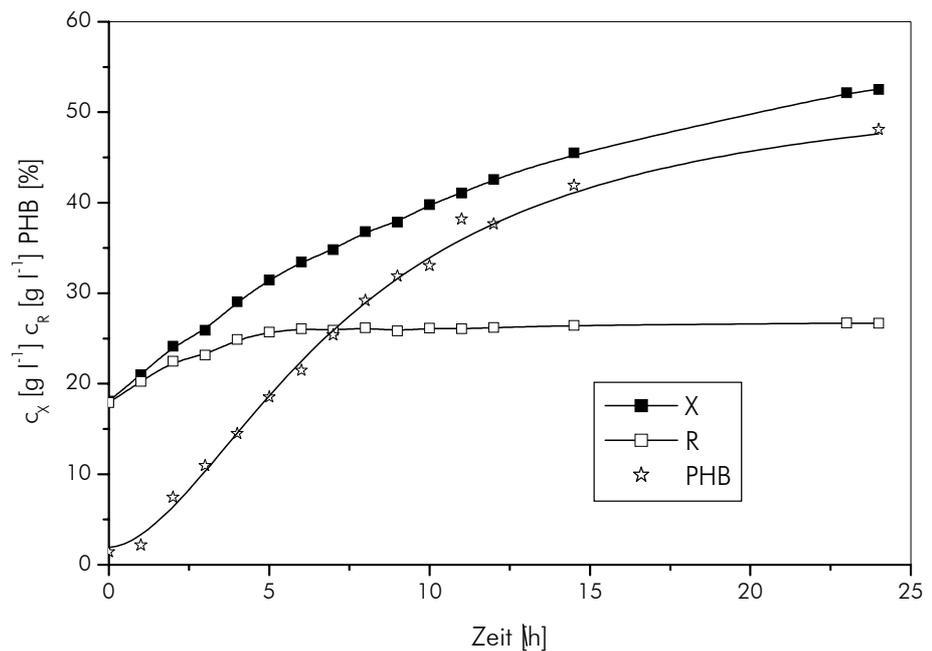


Abb. A-10: Zeitlicher Verlauf der Gesamt- (■) bzw. Restbiomassekonzentration (□) und des PHB-Gehaltes der Biomasse (☆) während der Produktbildung unter Phosphatmangel (Versuch 2 mit Erdgasmodellgemisch)

## ANHANG 1 ABLEITUNG DER BILANZGLEICHUNG FÜR DIE FLÜSSIGPHASE

Für die Änderung der Masse einer Komponente in der Flüssigphase gilt:

$$\frac{dm_{i,L}}{dt} = \dot{m}_{i,L,0} - \dot{m}_{i,L,1} + \left( \frac{dm_i}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} + (\dot{m}_i)_{\text{Phasenübergang G} \rightarrow \text{L}} \quad (\text{A1-1})$$

Zur Vereinfachung wird nun von der Bilanzierung der Massenänderung zu der Konzentrationsänderung übergegangen, mit Einführung der allgemeinen Gleichungen:

$$m_{i,L} = c_{i,L} \cdot V_L \quad (\text{A1-2})$$

$$m_{i,L} = c_{i,L} \cdot F_L \quad (\text{A1-3})$$

ergibt sich für die Betrachtung der Flüssigphase:

$$\frac{d(c_{i,L} \cdot V_L)}{dt} = c_{i,L,0} \cdot F_{L,0} - c_{i,L} \cdot F_{L,1} + \left( \frac{dm_i}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} + (\dot{m}_i)_{\text{PÜ(G} \rightarrow \text{L)}} \quad (\text{A1-4})$$

mit Anwendung der Produktregel:

$$V_L \frac{dc_{i,L}}{dt} + c_{i,L} \frac{dV_L}{dt} = c_{i,L,0} \cdot F_{L,0} - c_{i,L} \cdot F_{L,1} + \left( \frac{dm_i}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} + (\dot{m}_i)_{\text{PÜ(G} \rightarrow \text{L)}} \quad (\text{A1-5})$$

und Trennung der Variablen ergibt sich:

$$V_L \cdot \frac{dc_{i,L}}{dt} = c_{i,L,0} \cdot F_{L,0} - c_{i,L} \cdot F_{L,1} - c_{i,L} \cdot \frac{dV_L}{dt} + \left( \frac{dm_i}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} + (\dot{m}_i)_{\text{PÜ(G} \rightarrow \text{L)}} \quad (\text{A1-6})$$

Für die Berechnung wird der Term  $\left( \frac{dV_L}{dt} \right)$  benötigt, der sich aus analog aus der Bilanz der Zu- und Abläufe und den Änderungen durch Reaktion und Phasenübergang ergibt:

$$\frac{dV_L}{dt} = F_{L,0} - F_{L,1} + \left( \frac{dV_L}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} + (\dot{V}_L)_{\text{PÜ(G} \rightarrow \text{L)}} \quad (\text{A1-7})$$

Die Volumenänderung durch Reaktion erfolgt in erster Linie durch Bildung von Biomasse und Reaktionswasser (entsprechend der stöchiometrische Umsatzgleichung) und ist positiv (Volumenzunahme):

$$\left( \frac{dV_L}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} = \sum \left[ V_L \cdot \left( \frac{dc_i}{dt} \right)_{\text{Reaktion}} \cdot \frac{1}{\rho_{i,L}} \right] \quad (\text{A1-8})$$

Die Volumenänderung durch Phasenübergang wird theoretisch durch Verdunstung verursacht, da das Kondensat zurückgeführt wird, kann dies bei den folgenden Betrachtungen ignoriert werden.

Weiterhin wird nur die Volumenänderung durch Bildung von Reaktionswasser berücksichtigt, daraus folgt:

$$\frac{dV_L}{dt} = F_{L,0} - F_{L,1} + V_L \cdot \left( \frac{dc_{H_2O}}{dt} \right) \cdot \frac{1}{\rho_{H_2O}} \quad (A1-9)$$

Unter Berücksichtigung der Terme die für Volumenänderung, der Änderung durch Phasenübergang [Anhang 3] und Reaktion ergibt sich:

$$V_L \cdot \frac{dc_{i,L}}{dt} = c_{i,L,0} \cdot F_{L,0} - c_{i,L} \cdot F_{L,1} - c_{i,L} \cdot F_{L,0} + c_{i,L} \cdot F_{L,1} - c_{i,L} \cdot V_L \cdot \left( \frac{dc_{H_2O}}{dt} \right) \cdot \frac{1}{\rho_{H_2O}} + V_L \cdot r_i + [k_L a_i \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{G,i} - c_{i,L})] \cdot V_L \quad (A1-10)$$

$$V_L \cdot \frac{dc_{i,L}}{dt} = (c_{i,L,0} - c_{i,L}) \cdot F_{L,0} - c_{i,L} \cdot V_L \cdot \frac{dc_{H_2O}}{dt} \cdot \frac{1}{\rho_{H_2O}} + V_L \cdot r_i + [k_L a_i \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{G,i} - c_{i,L})] \cdot V_L \quad (A1-11)$$

$$\frac{dc_{i,L}}{dt} = (c_{i,L,0} - c_{i,L}) \cdot \frac{F_{L,0}}{V_L} - c_{i,L} \cdot \frac{dc_{H_2O}}{dt} \cdot \frac{1}{\rho_{H_2O}} + r_i + [k_L a_i \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{G,i} - c_{i,L})] \quad (A1-12)$$

$$\text{mit } D = \frac{F_{L,0}}{V_L} \quad (A1-13)$$

$$\boxed{\frac{dc_{i,L}}{dt} = (c_{i,L,0} - c_{i,L}) \cdot D - c_{i,L} \cdot \frac{dc_{H_2O}}{dt} \cdot \frac{1}{\rho_{H_2O}} + r_i + [k_L a_i \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{G,i} - c_{i,L})]} \quad (A1-14)$$

## ANHANG 2 ABLEITUNG DER BILANZGLEICHUNG FÜR DIE GASPHASE

Unter der Bedingung, daß in der Gasphase keine Reaktion stattfindet, wird die Massenänderung der Komponente  $i$  durch folgende Bilanz beschrieben:

$$\frac{dm_{i,G}}{dt} = \dot{m}_{i,G,0} - \dot{m}_{i,G,1} - (\dot{m}_i)_{P\ddot{U}(G \rightarrow L)} \quad (\text{A2-1})$$

Zur Substitution der Masse können die Molenbrüche  $x_i$  bzw. Volumenanteile und die Dichte der Komponente  $\rho$  oder die entsprechende Konzentration in der Gasphase  $c_{i,G}$  unter Anwendung der folgenden Gleichungen eingeführt werden:

$$m_{i,G} = c_{i,G} \cdot V_G \quad (\text{A2-2})$$

$$\text{bzw.} \quad \dot{m}_{i,G} = c_{i,G} \cdot F_G \quad (\text{A2-3})$$

$$\text{mit } c_{i,G} = x_i \cdot \rho_{i,G} \quad \rho_{i,G} = f(T, p) \quad (\text{A2-4})$$

Mit diesen Gleichungen ergibt sich nun:

$$\frac{d(c_{i,G} \cdot V_G)}{dt} = c_{i,G,0} \cdot F_{G,0} - c_{i,G,1} \cdot F_{G,1} - (\dot{m}_i)_{P\ddot{U}(G \rightarrow L)} \quad (\text{A2-5})$$

unter Anwendung der Produktregel:

$$V_G \cdot \frac{dc_{i,G}}{dt} + c_{i,G} \cdot \frac{dV_G}{dt} = c_{i,G,0} \cdot F_{G,0} - c_{i,G,1} \cdot F_{G,1} - (\dot{m}_i)_{P\ddot{U}(G \rightarrow L)} \quad (\text{A2-6})$$

Unter der Annahme, daß die Volumenänderung der Gasphase zu vernachlässigen ist:

$$\frac{dV_G}{dt} \approx 0 \quad \text{folgt:} \quad (\text{A2-7})$$

$$V_G \cdot \frac{dc_{i,G}}{dt} = c_{i,G,0} \cdot F_{G,0} - c_{i,G,1} \cdot F_{G,1} - (\dot{m}_i)_{P\ddot{U}(G \rightarrow L)} \quad (\text{A2-8})$$

Für die Konzentrationsänderung der Komponente  $i$  in der Gasphase gilt somit:

$$\boxed{\frac{dc_{i,G}}{dt} = c_{i,G,0} \cdot \frac{F_{G,0}}{V_G} - c_{i,G,1} \cdot \frac{F_{G,1}}{V_G} - [k_L a_i \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{i,G} - c_{i,L})] \cdot \frac{V_L}{V_G}} \quad (\text{A2-9})$$

### ANHANG 3 ABLEITUNG DER BILANZGLEICHUNG FÜR DEN PHASENÜBERGANG

Der Übergang des Massenstrom ( $\dot{m}_i$ )<sub>PÜ</sub> bewirkt eine Konzentrationsänderung in der wäßrigen Phase und gleichzeitig eine Gehaltsänderung in der Gasphase (und damit auch eine Änderung des Volumenstroms in der Gasphase)

$$(\dot{m}_i)_{PÜ(G \rightarrow L)} = V_L \cdot \left( \frac{dc_{i,L}}{dt} \right) \quad (\text{A3-1})$$

Unter Berücksichtigung des Fick'schen Gesetzes, wonach der Phasenübergang einer Komponente  $i$  der zur Verfügung stehenden Phasengrenzfläche, dem spezifischen Diffusionskoeffizienten der Komponente und der Konzentrationsdifferenz proportional bzw. der Dicke der laminaren Grenzschicht indirekt proportional ist:

$$\dot{m}_i = A \cdot D_{i,L} \cdot \frac{dc_{i,L}}{dx} \quad (\text{A3-2})$$

und der Zweifilmtheorie, wonach die Gesamtgeschwindigkeit des Stoffübergangs von den Prozessen in der Flüssigkeit bestimmt wird und die maximal erreichbare Konzentration die Sättigungskonzentration  $c_L^*$  ist, ergibt sich:

$$(\dot{m}_i)_{PÜ(G \rightarrow L)} = A \cdot D_{i,L} \cdot \frac{dc_{i,L}}{dx} \quad (\text{A3-3})$$

$$(\dot{m}_i)_{PÜ(G \rightarrow L)} = A \cdot \frac{D_{i,L}}{\Delta x} \cdot (c_{i,L}^* - c_{i,L}) \quad (\text{A3-4})$$

Mit der Einführung des spezifischen Stoffübergangskoeffizienten für die Flüssigphase  $k_{i,L}$  und dem Verteilungskoeffizienten (Flüssigkeit-Gas, auch Henry-Koeffizient)  $K_{H,i,L/G}$  als Verhältnis der Sättigungskonzentrationen in Gas und Flüssigkeit sowie der Annahme, daß die Konzentration in der Gasphase näherungsweise der Sättigungskonzentration entspricht,

$$K_{H,i,L/G} = \frac{c_{i,L}^*}{c_{i,G}^*} = f(T) \quad (\text{A3-5})$$

$$c_{i,G}^* \approx c_{i,G} \quad (\text{A3-6})$$

ergibt sich:

$$(\dot{m}_i)_{PÜ(G \rightarrow L)} = A \cdot k_{i,L} \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{i,G} - c_{i,L}) \quad (\text{A3-7})$$

$$\text{bzw. mit } c_{i,G} = x_{i,G} \cdot \rho_{i,G} = x_i \cdot \rho_{i,G} \quad (\text{A3-8})$$

$$(\dot{m}_i)_{PÜ(G \rightarrow L)} = A \cdot k_{i,L} \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot x_i \cdot \rho_{i,G} - c_{i,L}) \quad (\text{A3-9})$$

Wird der Massenstrom des Phasenübergangs auf das Flüssigkeitsvolumen  $V_L$  im Bilanzraum bezogen, ergibt sich ein spezifischer Phasenübergang:

$$\text{mit } a = \frac{A}{V_L} \text{ als spezifische Oberfläche } \left[ \frac{\text{m}^2}{\text{m}^3} \right] \quad (\text{A3-10})$$

$$\frac{(\dot{m}_i)_{\text{PÜ}(G \rightarrow L)}}{V_L} = k_{i,L} \cdot a \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{G,i} - c_{i,L}) \quad (\text{A3-11})$$

wobei das Produkt  $(k_{i,L} \cdot a)$  als sog.  $k_L a_i$ -Wert definiert wird und somit für den spezifischen Massenstrom durch Phasenübergang gilt:

$$\frac{(\dot{m}_i)_{\text{PÜ}(G \rightarrow L)}}{V_L} = k_L a_i \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{G,i} - c_{i,L}) \quad (\text{A3-12})$$

$$\boxed{(\dot{m}_i)_{\text{PÜ}(G \rightarrow L)} = [k_L a_i \cdot (K_{H,i,L/G} \cdot c_{G,i} - c_{i,L})] \cdot V_L} \quad (\text{A3-13})$$

## ANHANG 4 ZUR MODELLIERUNG VERWENDETE PARAMETER UND KONSTANTEN

| Konstante        | Einheit             | Wert    | Quelle/Bemerkungen   |
|------------------|---------------------|---------|--|
| $k_L a_{O_2}$    | $h^{-1}$            | 2700    | diese Arbeit, ermittelt nach Gl. 3.1 und 3.2   |
| $k_L a_{CH_4}$   | $h^{-1}$            | 1854    | Berechnung nach: $k_L a_i = k_L a_{O_2} \cdot \frac{D_{i,L}}{D_{O_2,L}}$<br>$D_{O_2,L} = 3,25 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , $D_{CH_4,L} = 2,36 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$   |
| $k_L a_{CO_2}$   | $h^{-1}$            | 2033    | [WENDLANDT 1979, SHEEHAN und JOHNSON 1971],<br>(intrapoliert aus Werten für $T=34^\circ\text{C}$ und $T=45^\circ\text{C}$ )<br>$D_{CO_2,L} = 2,45 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [PERRY und GREEN 1985],<br>(extrapoliert aus Wert für $T=25^\circ\text{C}$ ) |
| $\rho_{O_2}$     | $g \text{ l}^{-1}$  | 1,42857 | PERRY UND GREEN 1985<br><br>(Werte für $T=0^\circ\text{C}$ )   |
| $\rho_{CH_4}$    | $g \text{ l}^{-1}$  | 0,7143  |  |
| $\rho_{CO_2}$    | $g \text{ l}^{-1}$  | 1,96428 |  |
| $K_{H,O_2,L/G}$  | –                   | 0,0291  | SANDER 1999<br><br>Werte für $T=38^\circ\text{C}$ $\left( K_{H,i} = \frac{c_{L,i}^*}{c_{G,i}^*} \right)$   |
| $K_{H,CH_4,L/G}$ | –                   | 0,0274  |  |
| $K_{H,CO_2,L/G}$ | –                   | 0,594   |  |
| $Y_{R/O_2}$      | $g \text{ g}^{-1}$  | 0,20    | diese Arbeit   |
| $Y_{R/CH_4}$     | $g \text{ g}^{-1}$  | 0,63    |  |
| $Y_{CO_2/R}$     | $g \text{ g}^{-1}$  | 2,40    |  |
| $Y_{PHB/O_2}$    | $g \text{ g}^{-1}$  | 0,18    |  |
| $Y_{PHB/CH_4}$   | $g \text{ g}^{-1}$  | 0,59    |  |
| $Y_{CO_2/PHB}$   | $g \text{ g}^{-1}$  | 2,66    |  |
| $Y_{R/N}$        | $g \text{ g}^{-1}$  | 8,14    |  |
| $K_{S,CH_4}$     | $mg \text{ l}^{-1}$ | 0,033   | ASENJO und SUK1986a  |
| $K_{S,N}$        | $mg \text{ l}^{-1}$ | 20      |  |
| $K_{S,O_2}$      | $mg \text{ l}^{-1}$ | 0,044   | WENDLANDT et al. 1993  |
| $\mu_{max.}$     | $h^{-1}$            | 0,29    |  |
| $q_{max.}$       | $h^{-1}$            | 0,145   | diese Arbeit (unter Ammoniumstickstoffmangel)  |
| $PHB_{max.}$     |                     | 0,5     |  |
| EPS              |                     | 0,15    | MUTTZALL 1983  |
| $V_L$            | l                   | 40      |  |
| $c_{N,0}$        | $g \text{ l}^{-1}$  | 2,7     |  |
| ! $F_{G,0}$      | l h <sup>-1</sup>   | 6000    | ! Diese Parameter können variiert werden!  |
| ! $c_{O_2,G,0}$  | $mg \text{ l}^{-1}$ | 228,57  | $c_{O_2,G,0} = x_{O_2,0} \cdot \rho_{O_2} \cdot 1000$ ( $x_{O_2,0}=0,16$ )   |
| ! $c_{CH_4,G,0}$ | $mg \text{ l}^{-1}$ | 162,86  | $c_{CH_4,G,0} = x_{CH_4,0} \cdot \rho_{CH_4} \cdot 1000$ ( $x_{CH_4,0}=0,23$ )   |
| ! $D$            | $h^{-1}$            | 0,167   |  |

Startbedingungen:

$c_{O_2,L}(0) = 4 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $c_{CH_4,L}(0) = 3 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $c_{CO_2,L}(0) = 0$ ,  $c_{O_2,G}(0) = 228 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $c_{CH_4,G}(0) = 163 \text{ mg l}^{-1}$ ,  
 $c_{CO_2,G}(0) = 0$ ,  $c_R(0) = 19,1 \text{ g l}^{-1}$ ,  $c_{PHB}(0) = 0,3 \text{ g l}^{-1}$ ,  $c_N(0) = 0,12 \text{ g l}^{-1}$



## LEBENS LAUF

Name, Vorname: Helm, Jana  
Geburtsdatum: 09.03.70  
Geburtsort: Wolfen  
Familienstand: ledig

---

**Schulbildung:** 1976 – 1986 Polytechnische Oberschule, Laucha  
1986 – 1988 Erweiterte Oberschule, Schulpforte

**Studium:** 1989 – 1992 Biotechnologie, Technische Hochschule Köthen  
1992 – 1994 Biotechnologie Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
10.08.1994 Dipl.-Ing. für Biotechnologie  
Diplomarbeit: „Wirkung zellwandlytischer Enzyme auf  
Blattmaterial von *Digitalis lanata*“  
(Betreuer: Prof. G. Klappach)

**Dissertation:** 1997 – 2001 UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH;  
Sektion Sanierungsforschung  
(Betreuer: Dr. K.-D. Wendlandt und Prof. U. Stottmeister)

**Weiterbildung:** 1988 – 1989 Qualifizierung zum „Facharbeiter für chemische  
Produktion“  
1998 – 2000 Aufbaustudium „Toxikologie und Umweltschutz“,  
Universität Leipzig

**Berufstätigkeit:** 1988 – 1989 Praktikum, Chemiekombinat Bitterfeld  
1994 – 1997 Forschungsingenieur  
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH,  
Sektion Sanierungsforschung