

POLY- β -HYDROXY- BUTTERSÄURE – MIKROBIELL ERZEUG- BAR UND BIOLOGISCH ABBAUBAR

*Produktion von PHB mit hohem
Molekulargewicht aus Methan*

Karin-Dagmar Wendlandt, Mirko Jechorek,
Jana Helm, Ulrich Stottmeister

Es gibt Mikroorganismen, die die Eigenschaft besitzen, intrazellulär Polymerverbindungen anzureichern. Diese bakteriell erzeugten Biopolymere haben gegenüber chemisch synthetisierten Kunststoffen wie Polyethylen (PE) oder Polyvinylchlorid (PVC) den Vorteil, dass sie biokompatibel und durch Mikroorganismen abbaubar sind. Produkte aus Biopolymeren können also kompostiert werden und zerfallen letztendlich zu Kohlendioxid und Wasser. Noch sind die Kosten für die bakterielle Polymerproduktion gegenüber der chemischen Synthese konventioneller Massenkunststoffe zu hoch. Verpackungen aus Biopolymeren sind daher im Supermarktregal

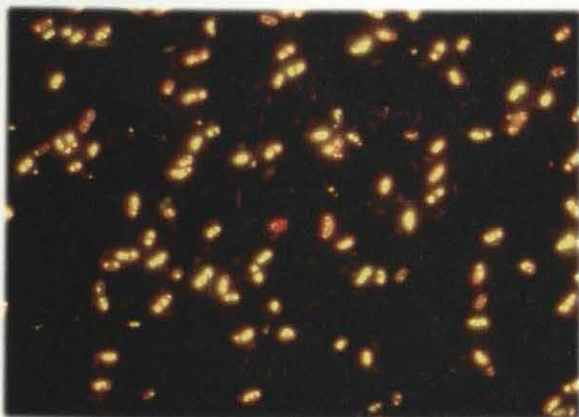


Bild 1: Fluoreszenzaufnahme von Zellen mit PHB-Granula

eher die Ausnahme. Für spezielle Anwendungen dagegen, zum Beispiel in der Medizin (Implantate, Nägel, Naht- und Verbandsmaterial), sind die spezifischen Eigenschaften – die Bioabbaubarkeit und Biokompatibilität – und nicht die Kosten das entscheidende Kriterium. Unter diesem Aspekt hat die Gruppe der Polyhydroxyalkansäuren (PHA) besonderes Interesse gefunden. Bisher sind 37 verschiedene Hydroxyfettsäuren als Bausteine bakterieller PHA bekannt, die sich nach Stellung der Hydroxylgruppe sowie nach Länge und Struktur der Seitenketten unterscheiden. Die in der Natur am meisten vorkommende bakterielle PHA ist die Poly- β -hydroxybuttersäure (PHB). Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie in großen Mengen innerhalb der Zelle akkumuliert wird und bis zu 80 Prozent des Zellgewichtes ausmachen kann.

Die Fähigkeit zur Synthese von PHA ist weit verbreitet, so können aerobe (Sauerstoff brauchende), anaerobe (ohne Sauerstoff lebende), heterotrophe (auf organische Nahrung angewiesene), autotrophe (sich ausschließlich von anorganischen Stoffen ernährende) und sogar Archaeobakterien PHA akkumulieren. Die Synthese der PHA erfolgt unter suboptimalen Wachstumsbedingungen, wenn die Kohlenstoffquelle im Überschuss und ein anderer essentieller Nährstoff limitierend für die Zellvermehrung ist. Zum Beispiel kann der Mangel an Ammonium-, Phosphat-, Sulfat-, Magnesium-, Eisen- oder Kaliumionen bewirken, dass sich die Zellen nicht vermehren, also keine Biomasse gebildet wird, sondern PHA in den Zellen synthetisiert wird.

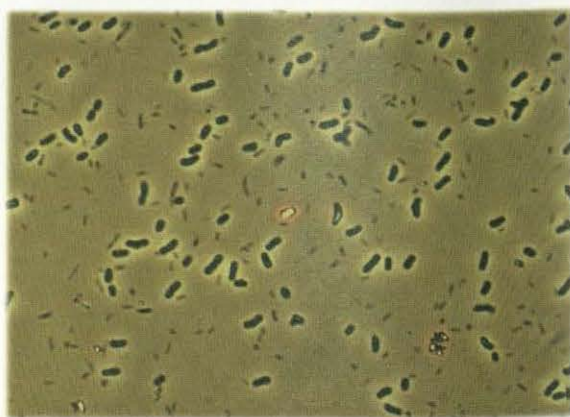


Bild 2: Entsprechender Objektausschnitt im Phasenkontrast

Kohlenstoffquelle	Assimilationsweg	NADPH-Regeneration	$Y^{(theor.)}$ (kg/kg)	Marktpreis (€/kg)
Glucose	Entner-Doudoroff	Glucose-6-Phosphat	0,48	120
	Pentose-Phosphat-Zyklus	Glucose-6-Phosphat + 6-Phosphogluconat	0,44	
	Glycolyse + TCA	Isocitrat	0,32	
Sucrose	Entner-Doudoroff	Glucose-6-Phosphat	0,50	28 ^a
Methanol	Serin	Isocitrat	0,54	55
Methan	Serin	Isocitrat	0,54	
Methan	Serin		0,67 ⁽²⁾	
Essigsäure	–	Isocitrat	0,48 ^b	200
Ethanol	–	Isocitrat	0,62 ^b	110
Buttersäure	<i>A. eutrophus</i> type	Isocitrat	0,65	650
	<i>R. rubrum</i> type	nicht erforderlich	0,98	
Butanol	<i>A. eutrophus</i> type	Isocitrat	0,77	160
	<i>R. rubrum</i> type	nicht erforderlich	1,16	

Tabelle 1: Theoretische Ausbeuten $Y^{(theor.)}$ von PHB aus verschiedenen Kohlenstoffquellen, basierend auf der biochemischen Stöchiometrie und den Marktpreisen [1], ^a Internationaler Preis für Rohrzucker, ^b Regeneration von NADPH via trans-Hydrierung ist nicht berücksichtigt

Genauso groß wie das Spektrum der PHA-bildenden Bakterien ist die Auswahl der möglichen Kohlenstoffquellen. In Tabelle 1 sind theoretische Ausbeuten und einige Preise für ausgewählte Substrate zusammengestellt. Wenn man berücksichtigt, dass die Rohstoffkosten 30–45 Prozent der Gesamtkostenverteilung der fermentativen Herstellung von PHB ausmachen, kommt den Substratausbeuten und den Rohstoffpreisen eine große Bedeutung zu.

Aus Tabelle 1 folgt, dass Methan ein bevorzugter Ausgangsstoff für die PHB-Synthese sein sollte, weil es hohe Ausbeuten verspricht und in Form von Erd- oder besonders Biogas eine relativ billige Rohstoffquelle ist. Der Vorteil dieses Substrates begründet sich weiterhin darin, dass man durch Stoffkreisläufe sowohl ökonomisch als auch ökologisch günstige Varianten gestalten kann.

Eigenschaften und Verwendung von Polyhydroxyalkansäuren

Die physikalischen Eigenschaften der PHA werden sowohl von der chemischen Zusammensetzung als auch vom Polymerisationsgrad bestimmt, wobei diese wiederum von dem jeweiligen Bakterienstamm und der Kohlenstoffquelle abhängen. Die Molmassen von PHA liegen zwischen 10000 und $3 \cdot 10^6$.

Die herausragende Eigenschaft von PHB ist ihre Biokompatibilität. Sie ist biologisch abbaubar und daher zur Kompostierung geeignet. Sie lässt sich in herkömmlichen Spritzguss-, Extrusions-, Faserspinn- und Walzverfahren zu Folien, Hohlkörpern und Fasern verarbeiten. Anwen-

dungsmöglichkeiten ergeben sich daher in der Medizin (Implantate, Gewebeaufwuchsmaterial, Verbandsmaterial), Pharmazie (Retardpräparate), Landwirtschaft (Retardmaterial für Dünger, Samen, Pestizide, Herbizide, Frühbeetfolien, Bewässerungsschläuche), Trinkwasseraufbereitung (Nitrateliminierung) und Verpackungsindustrie (insbesondere Beschichtungen).

Bis zur industriellen Reife wurde von der Firma ICI (Imperial Chemical Industries) ein Prozess unter Nutzung von *Alcaligenes eutrophus* und Glucose/Propionsäure entwickelt. Das Produkt wurde überwiegend als biologisch abbaubares Verpackungsmaterial eingesetzt. Das »Biopol« genannte Produkt ist ein Copolymerisat aus PHB und Polyhydroxyvaleriansäure (PHV).

Es existiert eine Vielzahl von Literaturbeschreibungen zu diesem wissenschaftlich interessanten und technisch bedeutsamen Teilgebiet der Polymerforschung, das eine Verbindung zwischen Mikrobiologie, Biotechnologie und Werkstoffforschung darstellt.

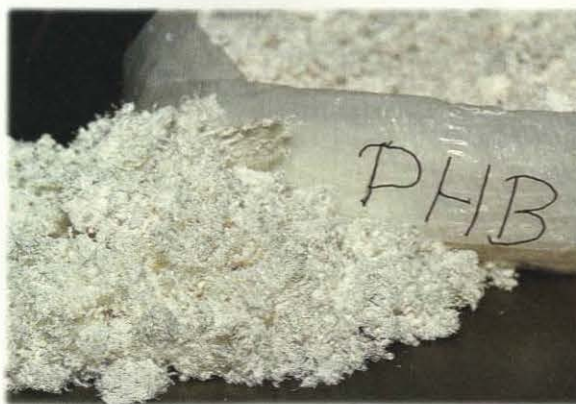


Bild 3 (Foto: Norma Neuheiser)

Dennoch ist der Durchbruch der Verwendung der PHA als Massenprodukt noch nicht gelungen. Der Grund dafür dürfte in erster Linie der Preis sein, der derzeit noch deutlich über dem konventioneller Polymere liegt. Gebrauchseigenschaften und Firmenpolitik (Recyclingwirtschaft) dürften ebenso eine Rolle spielen wie die noch notwendige Forschung zu Einzelschritten eines Gesamtverfahrens.

Versuche im Labor- und kleintechnischen Maßstab

Fermentorsystem zur Kultivierung von methanotrophen Bakterien

Voraussetzung für eine schnelle Produktbildung ist eine hohe Zelldichte. Daher war es notwendig, die Bedingungen



Bild 4: Druckfermentor mit 4 Litern Arbeitsvolumen (Foto: Norma Neuheiser)

für einen optimalen Stoffübergang in den Fermentoren unter Berücksichtigung aller Sicherheitsaspekte und der Möglichkeit der Stoffbilanzierung zu schaffen. Die beiden verwendeten Fermentoren mit 4 beziehungsweise 40 Litern Arbeitsvolumen sind für Drücke bis zu 0,6 Megapascal geeignet. Die Fermentoren sind ausgerüstet mit Mess- und Regelsystemen für pH-Wert, Druck, Temperatur, Gewicht, Rührgeschwindigkeit, Gelöstsauerstoffkonzentra-

tion, Gasmenge und Verhältnis Methan/Luft. Alle Daten werden durch ein digitales Mess- und Kontrollsystem und mit einem Computer (Multi Fermentor Control System, MFCS) erfasst, kontrolliert und ausgewertet. Das Ein- und Ausgangsgas wurde mit einem Gasanalysensystem paramagnetisch für Sauerstoff und durch Infrarotabsorption für Methan und Kohlendioxid analysiert. Außerdem können die Fermentoren wahlweise mit einem Quadrupolmassenspektrometer gekoppelt werden.

Kultur und Kultivierungsbedingungen

Als Bakterienkultur wird eine Mischkultur mit der Hauptkomponente (kleiner oder gleich 90 Prozent der Biomasse)

Parameter des Stammes <i>Methylocystis spec.</i> GB 25	
pH-Optimum	5,7
Temperaturoptimum	38°C
spezifische Ausbeutekoeffizienten	0,80 g/g CH ₄
	0,28 g/g O ₂
maximale Wachstumsrate	0,29 h ⁻¹
Stoffwechsel	Serinweg

Tabelle 2: Parameter des Stammes *Methylocystis spec.* GB 25

des methanotrophen Stammes *Methylocystis spec.* GB 25 eingesetzt. Die wesentlichen Parameter dieses Stammes enthält Tabelle 2.

Die Fermentation wird unsteril durchgeführt, die Stabilität der Fermentorbiozönose wird durch Plattenausstriche und durch Immunofluoreszenz (polyklonale Antikörper für den methanotrophen Stamm) kontrolliert.

Der Prozess zur PHB-Gewinnung ist zweistufig (kontinuierlicher Wachstumsprozess $D = 0,17$ je Stunde, vorzugsweise diskontinuierlicher Produktbildungsprozess). Beide Prozesse können zyklisch gestaltet oder nebeneinander in zwei Fermentoren gefahren werden. Bei überschüssigem Methanangebot wird der Produktbildungsprozess vorzugsweise durch Ammonium- oder Phosphatmangel initiiert.

Versuchsergebnisse

Die Versuche im 4 Liter- und 40 Liter-Fermentor zeigen reproduzierbar, dass für hohe Ausbeuten ein unsteriler, semi-kontinuierlicher Prozess mit hohen Produktivitäten unter Nutzung von Methan als Kohlenstoffquelle zu führen ist.

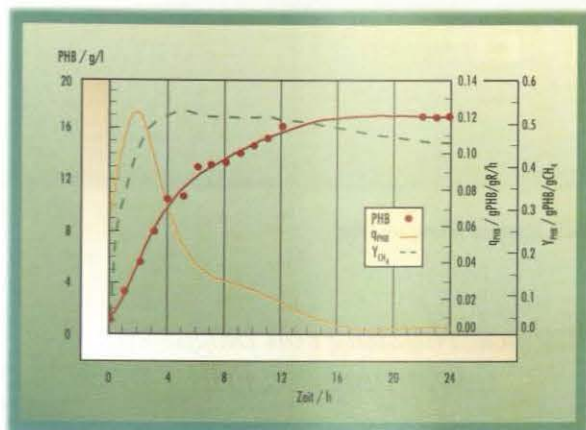


Bild 5: Spezifische PHB-Bildungsrate q_{PHB} , PHB-Konzentration und Ausbeute Y_{PHB} während eines 24-stündigen Produktbildungsprozesses

Einen typischen Verlauf des Produktbildungsprozesses zeigt Bild 5. Die Produktbildungsphase ist gegenüber anderen Verfahren sehr kurz. Sie beträgt nur 24 Stunden, im ICI-Prozess dagegen beispielsweise 60 Stunden. Weiterhin wird deutlich, dass der Prozess während der ersten 8 Stunden am effektivsten verläuft und spezifische PHB-Ausbeuten erreicht werden, die den theoretischen nahekommen. Die gesamte Prozessdauer für Wachstum und Produktbildung von 48 Stunden - der ICI-Prozess benötigt auch für die Anzucht der Biomasse im fed-batch-Verfahren mehr als 60 Stunden - ließe sich noch verkürzen, wenn zwei Fermentoren gleichzeitig produzieren.

Eine andere Möglichkeit, den PHB-Bildungsprozess zu intensivieren, besteht in einem zyklischen Regime: alternierend wird ein kontinuierlicher Wachstumsprozess mit hoher Durchflussrate und ein kontinuierlicher Produktbildungsprozess bei sehr niedriger Durchflussrate durchgeführt. Die »Schaltzeiten« wurden so gewählt, dass einem Wachstumsprozess von 16 Stunden ein Produktbildungsprozess von 8 Stunden nachgeschaltet wurde. Nach der Produktbildungsphase wurde jeweils die Hälfte des Fermentorinhaltes geerntet und das Volumen mit Wasser wieder aufgefüllt. Diese Zyklen können beliebig oft wiederholt werden. Bild 6 zeigt den Verlauf der Biomasse- und PHB-Konzentration während einer solchen alternierenden Prozessführung.

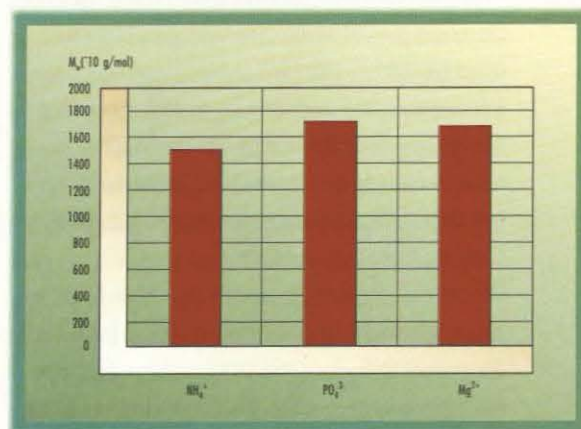


Bild 7: Durchschnittliche Molmassen M_w (bestimmt nach einer viskosimetrischen Methode) unter Ammonium-, Phosphat- und Magnesiummangel

Ein weiterer Vorteil der Synthese von PHB aus Methan besteht darin, dass die akkumulierte PHB ein sehr hohes Molekulargewicht aufweist. In Bild 7 sind durchschnittliche

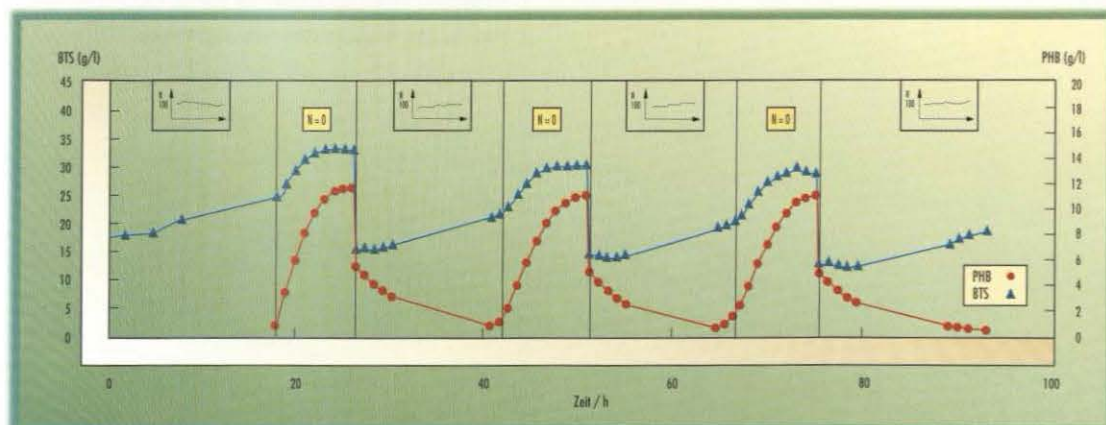


Bild 6: Zyklisches Regime für die Gewinnung von PHB

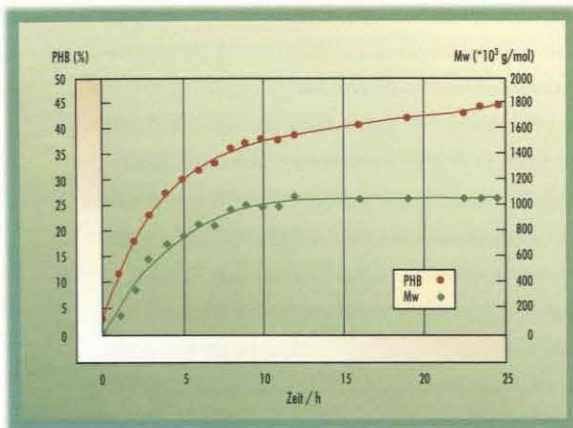


Bild 8: Entwicklung der Molmasse während des Produktbildungsprozesses unter Ammoniummangel

Molmassen dargestellt, die unter verschiedenen Mangelbedingungen erreicht wurden. Die Molmassen lagen zwischen 1,5 und $1,7 \cdot 10^6$.

Interessant ist auch die Verfolgung der Molmassen über den Prozessverlauf. Ein Beispiel verdeutlicht Bild 8. Das Molekulargewicht der akkumulierten PHB steigt bis zur 8./9. Versuchsstunde stetig an und bleibt danach bis zum Versuchsende nahezu konstant.

Die großen Molmassen der in methanotrophen Bakterien akkumulierten PHB geben die Möglichkeit, je nach Anwendungszweck PHB »nach Maß zu schneiden«. Dies wäre einmal möglich, wenn man schon im Prozess bestimmte Molmassenfraktionen selektieren würde, zum anderen ist die Lösungsmittelextraktion aus der Biomasse stets von einem Abbau des Molekulargewichts begleitet und kann ebenfalls auf die Erlangung bestimmter Molmassen gerichtet werden.

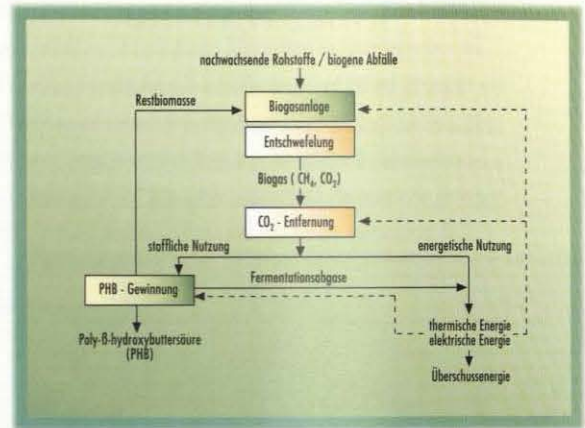


Bild 9: Schema zur Nutzung von Biogas

Ausblick: Nutzung von Biogas zur Gewinnung von PHB

Eine aussichtsreiche Möglichkeit, den Preis für PHB zu senken, ist die Gestaltung von Stoffkreisläufen in integrierten Verfahren zur Erzeugung von Biogas, seiner energetischen und stofflichen Nutzung. Einen Vorschlag für ein solches Gesamtverfahren ist in Bild 9 dargestellt. Das in einer herkömmlichen Biogasanlage erzeugte Biogas wird nach entsprechenden Reinigungsprozessen (Entfernung von Schwefelwasserstoff und Kohlendioxid) neben der energetischen Nutzung stofflich für die PHB-Synthese genutzt.

Die notwendig anfallenden Fermentorabgase können in den Energiegewinnungskreislauf geführt werden, und die nach der PHB-Gewinnung (Isolierung aus den Zellen durch extraktive oder enzymatische Aufschlüsse) verbleibende Restbiomasse kann ebenso wie Abwasserströme in den Biogasreaktor zurückgeführt werden. Die in der PHB-Fermentationsanlage anfallende Wärme kann nötigenfalls auch in dem Biogasprozess verwertet werden.

Literatur

- [1] Yamane, T. (1993). *Biotechnol. Bioeng.* 41: 165-170
- [2] Asenjo, J.A., Suk, J.S. (1986). *J. Ferment. Technol.* 64: 271-278

English Abstract

Poly- β -hydroxybutyrate – a biodegradable substance produced by microbes Producing PHB with a high molecular weight from methane

Microorganisms exist whose properties include the intracellular accumulation of polymer compounds. Compared to chemically synthesised plastics such as polyethylene (PE) or polyvinyl chloride (PVC), these bacterially produced biopolymers have the advantage that they are biocompatible and biodegradable. Products made of biopolymers can thus be composted and eventually decay into carbon dioxide and water. The excessive costs of bacterial polymer production compared to the chemical synthesis of conventional mass plastics mean that biopolymer packaging is still a rare sight in the supermarket. Nevertheless, in certain other fields such as medical applications (implants, pins, suture and dressing materials), the material's specific properties – chiefly biodegradability and biocompatibility – take priority over production costs.

The group of polyhydroxyalkane acids (PHA) has been the focus of particular attention in this respect. So far, 37 different hydroxy fatty acids have been identified as components of bacterial PHA; they differ in terms of the position of the hydroxyl group, as well as the length and structure of the lateral chains. The most common naturally occurring bacterial PHA is poly- β -hydroxybutyrate (PHB). PHB is distinguished by the fact that it is accumulated in large quantities within the cell and can account for as much as 80% of the cell weight.

JAHRESBERICHT / ANNUAL REPORT

1996 - 1997

Gewässerforschung Magdeburg

RS

Jahresbericht 1996-1997

Herausgeber:

UFZ-Umweltforschungszentrum
Leipzig-Halle GmbH
Mitglied der Hermann von Helmholtz-
Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren
(HGF)
Permoserstraße 15
04318 Leipzig
Telefon 0341/235-0

Konzept und Redaktion:

Dipl.-Chem. Doris Böhme
Dipl.-Agr.-Päd. Susanne Hufe
Telefon 0341/235-2278

Translation:

Abbey & Friedrich GbR
»The english people«, Leipzig

Fotos:

Norma Neuheiser u.a.

Luftbilder S. 118, 128:

Aerokart Delitzsch

Titel- und Layoutgestaltung,

Foto S. 8/16 und Produktion:
Peter Barczewski

Satz:

Silvio André
Karsten Heim
Bernd Jünger
Kerstin Kummer

Belichtung:

Design To Print GmbH

Druck und Verarbeitung:

Messedruck Leipzig GmbH

© August 1998

Abdruck (auch von Teilen) oder sonstige
Verwendung nur nach vorheriger Absprache
mit dem UFZ gestattet.

Gedruckt auf umweltfreundlichem,
chlorfrei gebleichtem Papier

ISSN 0948-6925