

Volker Gorenflo

Entwicklung und Optimierung eines Produktionsverfahrens  
zur Herstellung neuartiger 4HV-haltiger Biopolyester  
im Pilotmaßstab

1999

Mikrobiologie

Entwicklung und Optimierung eines Produktionsverfahrens  
zur Herstellung neuartiger 4HV-haltiger Biopolyester  
im Pilotmaßstab

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Volker Gorenflo  
aus Karlsruhe

1999

Dekan:

Prof. Dr. N. Schmitz

Erster Gutachter:

Prof. Dr. A. Steinbüchel

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. H. Pape

Tag der mündlichen Prüfung:

17., 20. und 22.12.1999

Tag der Promotion:

22.12.1999

Für meine Eltern  
und für Raoul

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Organismen und Plasmide</b>	<b>8</b>
<b>2.2 Medien</b>	<b>10</b>
2.2.1 Mineralmedium	10
2.2.2 Nutrient Broth Medium (NB-Medium)	11
2.2.3 Luria-Bertani Medium (LB-Medium)	11
2.2.4 M9-Medium	12
2.2.5 Antibiotika	12
2.2.6 Stammhaltung	12
<b>2.3 Herstellung von Substraten</b>	<b>13</b>
2.3.1 4-Hydroxyvaleriansäure	13
2.3.2 Na-Octanoat und Na-Lävulinat	14
2.3.3 Ammoniumhaltige Substratvorlagen	14
<b>2.4 Kultivierung von Mikroorganismen</b>	<b>14</b>
2.4.1 Zellanzucht im Schüttelkolben	14
2.4.2 Akkumulation von Polyhydroxyfettsäuren im Schüttelkolbenversuch	15
2.4.3 Zellanzucht im Fermenter	16
2.4.4 Akkumulation von Polyhydroxyfettsäuren unter kontrollierten Fermentationsbedingungen	17
2.4.5 Automatisierung der Fed-Batch-Fermentation	17
2.4.6 Trübungsmessung	18

2.4.7	Reinheits- und Plasmidkontrollen	18
2.4.7.1	Lebendkeimzahlbestimmung und Stempeltest	18
2.4.7.2	Plasmid-Präparation mit Restriktionsverdauung	19
2.4.7.3	Agarosegelelektrophorese	19
<b>2.5</b>	<b>Analyse von Substraten und Metaboliten</b>	<b>20</b>
2.5.1	Simultane Bestimmung von Glucose, Fructose, Gluconsäure, Acrylsäure, Lävulinsäure und deren Metaboliten	20
2.5.2	Simultane Bestimmung von Octansäure und Lävulinsäure	21
2.5.3	Schnelltest für Glucose und Ammonium	21
2.5.4	Gaschromatographische Analyse der Kulturüberstände	21
<b>2.6</b>	<b>Zellflockung und Zellernte</b>	<b>21</b>
<b>2.7</b>	<b>Isolierung von Polyhydroxyfettsäuren (PHF)</b>	<b>22</b>
<b>2.8</b>	<b>Analyse von Polyhydroxyfettsäuren</b>	<b>23</b>
2.8.1	Gaschromatographische Bestimmung von Polyhydroxyfettsäuren	24
2.8.2	Gelpermeationschromatographie	25
<b>2.9</b>	<b>Nachweis von Polyhydroxyfettsäuren durch Nilrot</b>	<b>25</b>
2.9.1	Isolierung nativer Poly(3HB)-Granula	26
2.9.2	Anfärben von Polyesterproben mit Nilrot	26
2.9.3	Anfärbung von Zellen mit Nilrot	27
2.9.4	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Polyestergranula	27
2.9.5	Flow Cytometry	27
<b>3</b>	<b>Experimente und Ergebnisse</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Optimierung der Produktion 4HV-haltiger Polyester</b>	<b>28</b>
3.1.1	Voruntersuchungen zur Akkumulation 4HV-haltiger Polyester	28
3.1.2	Optimierung der Zellanzucht	30

3.1.3	Übertragung der Kultivierung vom Schüttelkolben (50 ml) in den 15 l-Maßstab	30
3.1.4	Optimierung der Speicherbedingungen im Fermenter	36
3.1.5	Hochzelldichtefermentationen mit <i>P. putida</i> GPP104 (pHP1014::E156) im 20 l-Maßstab	39
3.1.5.1	Nicht automatisierte Fed-Batch-Fermentationen mit Octansäure als Substrat in der Wachstumsphase	39
3.1.5.2	Automatisierung der Fed-Batch-Fermentation mit Octansäure als Substrat in der Wachstumsphase	41
3.1.5.3	Kultivierungen mit Gluconsäure als Substrat in der Wachstumsphase	46
3.1.5.4	Fed-Batch-Fermentationen mit Glucose oder Gluconsäure als Substrat in der Wachstumsphase	54
3.1.6	Hochzelldichtefermentation von <i>Ralstonia eutropha</i> im 20 l-Maßstab	64
3.1.7	Herstellung 4HV-haltiger Polyesterproben für die Bestimmung ihrer Werkstoffeigenschaften	69
<b>3.2</b>	<b>Übertragung der Fermentation in den 500 l-Pilotmaßstab</b>	<b>70</b>
<b>3.3</b>	<b>Optimierung der Akkumulation 4HV-haltiger Polyester durch Eingriffe in den Lävulinsäurekatabolismus von <i>R. eutropha</i> HF39</b>	<b>75</b>
3.3.1	Phänotypische Charakterisierung der Tn5-Mutanten von <i>R. eutropha</i> HF39	75
3.3.2	Speicherversuche mit im Lävulinsäurekatabolismus defekten Tn5-Mutanten von <i>R. eutropha</i> HF39	77
3.3.3	Hemmung der $\beta$ -Oxidation in <i>R. eutropha</i> HF 39 durch Acrylsäure	82
3.3.4	Fed-Batch-Fermentation von <i>R. eutropha</i> SK7291 im 25 l-Maßstab	87
<b>3.4</b>	<b>Optimierung der Produktaufbereitung 4HV-enthaltender Polyester</b>	<b>90</b>
3.4.1	Optimierung der Fest-Flüssig-Trennung durch Flockung	91
3.4.2	Optimierung der Isolierung von Polyhydroxyfettsäuren	92
3.4.2.1	Lösungsmittlextraktion in einer Soxhlet Apparatur	92

3.4.2.2	Behandlung der Zellen mit Natronlauge	95
3.4.2.3	Sequentielle Extraktion mit siedendem Chloroform	96
<b>3.5</b>	<b>Nachweis von Polyhydroxyfettsäuren durch Nilrot</b>	<b>97</b>
3.5.1	2-D-Fluoreszenzspektren verschiedener Polyhydroxyfettsäuren	98
3.5.2	Quantifizierung von bakteriellen Polyhydroxyfettsäuren durch Anfärbung mit Nilrot	103
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>110</b>
<b>4.1</b>	<b>Optimierung der biotechnologischen Produktion 4HV-haltiger Polyester</b>	<b>111</b>
4.1.1	Entwicklung eines Fermentationsprozesses im 20 l-Maßstab	112
4.1.2	Optimierung der Fermentationsparameter im Batch-Prozeß	114
4.1.3	Erhöhung der Zelldichte durch die Entwicklung eines Fed-Batch-Prozesses	116
4.1.4	Automatisierung des Fed-Batch-Prozesses	117
4.1.5	Fed-Batch-Fermentation mit Gluconsäure oder Glucose als Substrat	119
4.1.6	Polyesterakkumulationsverhalten der rekombinanten Stämme von <i>P. putida</i> GPp104 auf Gluconsäure oder Glucose	119
4.1.7	Kultivierung mit Co-Substrat	121
4.1.8	Automatisierung der Zufuhr von Ammonium	122
4.1.9	Bildung von 2-Ketogluconsäure während der Fermentation von <i>Pseudomonas putida</i> auf Gluconsäure oder Glucose	123
4.1.10	Einfluß von rekombinanter DNA auf das Zellwachstum des Wirtsstammes	125
<b>4.2</b>	<b>Übertragung der Fermentation von <i>P. putida</i> in den 500 l-Maßstab</b>	<b>126</b>
4.2.1	Kultivierung von <i>P. putida</i> GPp104 (pHP1014::B28RV) im 650 l-Fermenter	126
4.2.2	Grenzen der Fermentation	127
4.2.2.1	Zelldichte	127

---

4.2.2.2	Polyestergehalt der Trockenmasse und 4HV-Gehalt des Polyesters	129
<b>4.3</b>	<b>Optimierung der Akkumulation 4HV-haltiger Polyester durch Eingriffe in den Lävulinsäurekatabolismus von <i>R. eutropha</i> HF39</b>	<b>131</b>
4.3.1	„Metabolic Engineering“ durch Tn5-induzierte Mutagenese von <i>R. eutropha</i> HF39	131
4.3.2	„Metabolic Engineering“ durch Hemmung der $\beta$ -Oxidation mittels Acrylsäure	136
<b>4.4</b>	<b>Produktgewinnung und -aufbereitung</b>	<b>137</b>
<b>4.5</b>	<b>Material- und Werkstoffeigenschaften 4HV-haltiger Polyester</b>	<b>141</b>
<b>4.6</b>	<b>Nachweis von Polyhydroxyfettsäuren durch Nilrot</b>	<b>143</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>146</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>149</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>162</b>
7.1	Fermentationssteuerprogramm BRC 1000 im PASCAL-Modus (modifiziert)	162

## Abkürzungsverzeichnis

<i>A</i> <sub>Zellen</sub>	Außenfläche der Zellen
Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Ap	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
c	zenti-
<i>C.</i>	<i>Chromobacterium</i>
<i>C</i> <sub>3HB</sub>	Konzentration von Poly(3HB) in der Küvette
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
<i>c<sub>p</sub></i>	spezifische Wärmekapazität
<i>c</i> <sub>Pol,Lösung</sub> ( <i>t</i> )	Polyesterkonzentration im Lösungsmittel
<i>c</i> <sub>Pol,Zellen</sub> ( <i>t</i> )	Polyesterkonzentration in den Zellen
d	Partikeldurchmesser
demin	demineralisiert
DI	Abbauindex
DMA	Dynamisch Mechanische Analyse
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSC	Differential Scanning Calorimetrie
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dt	differentielle Zeitänderung
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
etc.	et cetera
Fa.	Firma
FAD[H <sub>2</sub> ]	Flavinadenindinucleotid [reduziert]
FG	Fluoreszenzgleichgewicht

Freq	Frequenz
FSC	Vorwärtsstreulicht
$G'$	Scher-Speichermodul
$G''$	Scher-Verlustmodul
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Fluoreszenzintensität
k	Kilo
K	Korrelationskoeffizient
$k^*$	Extraktionskoeffizient
k.D.v.	keine Daten vorliegend
Km	Kanamycin
KU	Klett-Einheiten
Läv	Lävulinsäure
LB	Luria Bertani
m	Meter, milli-, Anfangssteigung
$m_{Pol,ges}$	Gesamtmenge des Polyesters
$m_{Pol,ext}$	Masse des aus den Zellen extrahierten Polyesters
$m_{Pol,Zellen}$	Masse des Polyesters in den Zellen
$\dot{m}_{Pol,Zellen}(t)$	Massenänderung des Polyesters in den Zellen
M	molar
MCC	2-Methylcitrat-Zyklus
MCL	Mittlere Kettenlänge
min	Minute
MM	Mineralmedium
$M_n$	Zahlenmittel des Molekulargewichtes
MS	Massenspektrometrie
$M_w$	Gewichtsmittel des Molekulargewichtes
$M_z$	Z-Mittelwert des Molekulargewichtes
n	nano
N	normal

n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar
NAD(P)[H]	Nicotinamidadenindinucleotid (phosphat) [reduziert]
NB	Nutrient Broth
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nr.	Nummer
Oct	Octansäure
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PEG	Polyethylenglycol
PHB	Poly(Hydroxybutyrat)
PHF	Polyhydroxyfettsäure
PHV	Poly(Hydroxyvalerat)
R	Regressionskoeffizient
r	Resisitenz
<i>R.</i>	<i>Ralstonia</i>
rel.	relative
$R_H$	Höchstkraft
RI	Brechungsindex
s	Sekunde
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SCL	Kurze Kettenlänge
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlußchromatographie
SK	Stammnummer Arbeitskreis Steinbüchel
t	Zeit
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tc	Tetracyclin
TCC	Tricarbonsäure-Zyklus
$T_g$	Glasübergangstemperatur
$T_m$	Schmelztemperatur
TM	Trockenmasse
$T_R$	Zersetzungstemperatur

Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra-Violett
v/v	Volumenprozent
vvm	Begasungsvolumen pro Kulturvolumen pro Minute
$V_{Zellen}$	Volumen der Zellen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Massenprozent
WT	Wachstumsphase
Wt	Wildtyp
$\sigma$	Bruchspannung
$\omega$	Frequenz
$\beta$	Stoffübergangskoeffizient
$\eta^*$	Schmelzeviskosität
$\varepsilon_H$	Bruchdehnung
$\Delta H_m$	Schmelzenthalpie
$\eta_{int}$	intrinsische Viskosität
$\Delta_m$	Schmelzbereich
$\eta_{rel}$	relative Viskosität
2D	Zweidimensional
3HB	3-Hydroxybuttersäure
3HD	3-Hydroxydekansäure
3HDD	3-Hydroxydodekansäure
3HHx	3-Hydroxyhexansäure
3HO	3-Hydroxyoctansäure
3HV	3-Hydroxyvaleriansäure
3-PS	3-Pentensäure
4HB	4-Hydroxybuttersäure
4HV	4-Hydroxyvaleriansäure

## 1 Einleitung

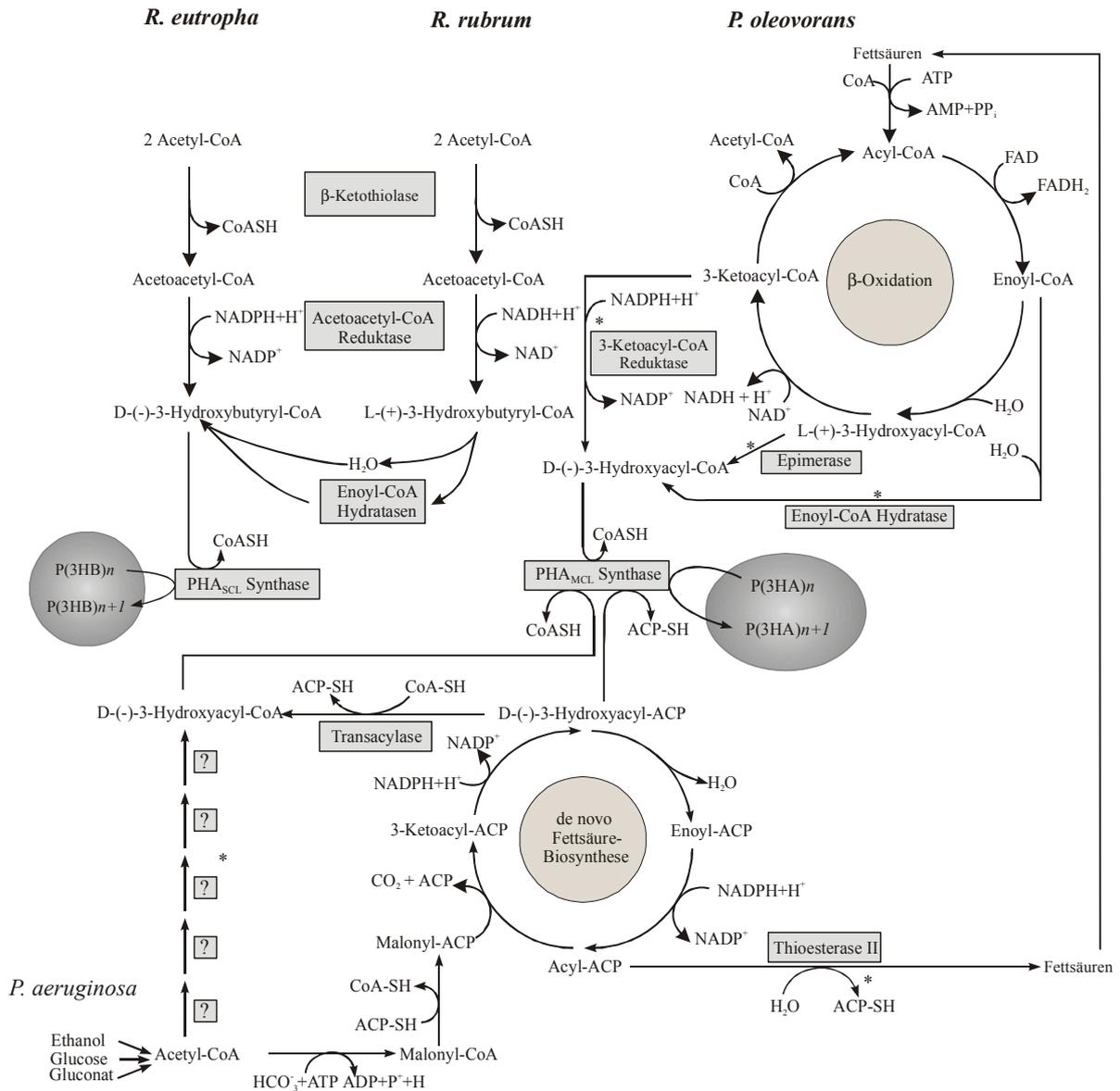
Biologisch erzeugte Polyhydroxyfettsäuren (PHF) gehören zur Klasse der thermoplastischen Werkstoffe und stellen eine der interessantesten Werkstoffentwicklungen der letzten Jahrzehnte auf dem Gebiet der Elastomere dar (Steinbüchel, 1991a; Hocking & Marchessault, 1994). Sie zeichnen sich insbesondere durch eine große Vielfalt bezüglich ihrer Zusammensetzung aus (Steinbüchel & Valentin, 1995). Viele dieser Biopolyester können bereits aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden, sind wasserunlöslich und biologisch abbaubar. Damit werden sie dem immer stärker werdenden Anspruch an moderne Werkstoffe nach Biokompatibilität gerecht. Durch ihre interessanten Eigenschaften ergeben sich vielfältige industrielle Anwendungsmöglichkeiten (Byrom, 1987, 1990, 1992; Hartley, 1987; Steinbüchel, 1995). Seit einigen Jahren wird beispielsweise ein Copolymer bestehend aus 3-Hydroxybutyrat und 3-Hydroxyvalerat, Poly(3HB-co-3HV), in großem Maßstab industriell produziert und unter dem Namen „Biopol“ vertrieben (Holmes et al., 1982; Anonymus, 1990). Aus diesem Polyester werden unter anderem bereits Verpackungen, wie Kosmetik- oder Shampooflaschen und mit Poly(3HB-co-3HV) beschichtete Trinkbecher aus Pappe hergestellt (Steinbüchel, 1995).

Biosynthetische Polyhydroxyfettsäuren sind seit der Identifizierung von Poly(3-Hydroxybuttersäure), Poly(3HB), als Zellinhaltsstoff von *Bacillus megaterium* bekannt (Lemoigne, 1926). Seitdem wurden weitreichende Erkenntnisse über die Verbreitung der Syntheseorganismen sowie die physiologischen und molekulargenetischen Grundlagen der Polyesterbiosynthese gewonnen. So werden Polyhydroxyfettsäuren in zahlreichen Gram-positiven wie auch Gram-negativen Bakterien aus verschiedenen taxonomischen und physiologischen Gruppen als Speicherstoffe gebildet (Lafferty et al., 1988; Anderson & Dawes, 1990; Steinbüchel, 1991a; Steinbüchel et al., 1992; Steinbüchel, 1996). Die Hauptfunktion der PHF liegt in ihrer Rolle als Kohlenstoff- und Energiereserve für die Zelle (Dawes, 1976, 1985, 1989; Dawes & Senior, 1973; Merrik, 1978; Preiss, 1989). Speicherstoffe werden von den Zellen im allgemeinen dann gebildet, wenn ein Ungleichgewicht im Nährstoffangebot vorliegt (Lafferty et al., 1988). Die Einlagerung von Polyhydroxyfettsäuren als intrazelluläre Speicherstoffe wird durch den Überschuß einer Kohlenstoffquelle stimuliert, wenn gleichzeitig ein anderer essentieller Nährstoff, wie zum Beispiel Stickstoff, Phosphor, Eisen, Magnesium, Schwefel oder Kalium limitiert ist (Schlegel et al., 1961; Kaltwasser, 1962; Repaske & Repaske; Steinbüchel & Schlegel, 1989). Bei aeroben Bakterien kann auch eine Limitation der Sauerstoffversorgung zur Stimulation der Bildung von PHF führen (Schuster & Schlegel, 1967; Ward et al., 1977; Vollbrecht et al., 1979; Schlegel & Steinbüchel, 1981; Steinbüchel et al., 1983; Kim et al., 1997). Neben ihrer Hauptfunktion als Energie- und Kohlenstoffspeicher wird auch die Beteiligung von

Polyhydroxyfettsäuren an der Sporen- bzw. Zystenbildung in *Bacillus*- und *Azotobacter*-Arten oder die Funktion als Reduktionsmittel zum Schutz der sauerstoffempfindlichen Nitrogenase in *Bacillus* und *Rhizobium* sp. diskutiert (Slepeky & Law, 1961; Senior & Dawes, 1971; Stam et al., 1986).

Bei Bakterien und eukaryotischen Zellen, die nicht in der Lage sind, Polyhydroxyfettsäuren als Speicherstoff zu bilden, wurde niedermolekulares Polyhydroxybutyrat nachgewiesen. Hier sind die Polyester-moleküle hauptsächlich in der Plasmamembran bzw. mitochondrialen und microsomalen Membran lokalisiert und treten in Assoziation mit Calcium und Polyphosphat auf, wobei eine Beteiligung dieser Komplexe an der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration angenommen wird (Reusch, 1989).

In Bakterienzellen werden Polyhydroxyfettsäuren in Form von Granula eingelagert, wobei deren Größe, Form und Anzahl vom jeweiligen Organismus und den Kultivierungsbedingungen abhängt. In *Ralstonia eutropha* (früher *Alcaligenes eutrophus*) findet man typischerweise 8 bis 13 PHF-Granula pro Zelle mit einem Durchmesser von 0,2 bis 0,5  $\mu\text{m}$  (Steinbüchel & Valentin, 1995; Anderson & Dawes, 1990). Der Kern der Granula besteht aus Polyester-molekülen, wobei ein Granulum jeweils von einer 6 bis 8 nm starken Grenzschicht aus Phospholipiden und Proteinen umgeben ist, welche den hydrophoben Kern vom Zytoplasma trennt (Lundgren et al., 1964; Preusting et al., 1991; Mayer, 1992; Steinbüchel et al., 1995, 1997). Die Zusammensetzung der Poly(3HB)-Granula in *Bacillus megaterium* wird mit 97,7 % Poly(3HB), 1,9 % Proteinen und 0,4 % Lipiden und Phospholipiden angegeben (Griebel et al., 1968). Die auftretenden Proteine kann man in zwei Klassen einteilen: Die katalytisch aktiven Proteine, PHF-Synthase und PHF-Depolymerase, und die sogenannten Granula-assoziierten Proteine. Den größten Anteil dieser Granula-assoziierten Proteine machen die Phasine aus; deren Hauptfunktion wahrscheinlich in der Stabilisierung der Granula im Zytoplasma liegt, wobei sie eine amphipatische Grenzschicht zwischen den hydrophilen Bestandteilen des Zytoplasmas und dem hydrophoben Kern der PHF-Granula ausbilden (Föllner et al., 1995; Pieper-Fürst et al., 1995; Steinbüchel, 1995; Wieczorek et al., 1996). Die PHF-Synthase (oder auch PHF-Polymerase) spielt die Hauptrolle bei der Polyestersynthese. Sie verlängert die Polyesterkette um jeweils ein Hydroxyacyl-CoA-Molekül unter Abspaltung von CoA-SH (siehe z.B. Steinbüchel & Fuchtenbusch, 1998). Die Synthase ist eng an das Granulum gebunden und möglicherweise über Phasine in der Granula-Oberfläche verankert (Steinbüchel, 1995; Steinbüchel et al., 1995; 1997). Die für die Synthase als Substrat dienenden Hydroxyacyl-CoA-Thioester werden im zentralen Stoffwechsel der Bakterien gebildet, wobei bisher vier prinzipielle Synthesewege in Abhängigkeit vom jeweiligen bakteriellen Metabolismus identifiziert wurden (Abb. 1) (Steinbüchel, 1991a). Die Bezeichnungen dieser Synthesewege sind von den Namen der Bakterienarten abgeleitet, bei denen sie erstmals identifiziert wurden.



**Abb. 1: Stoffwechselwege zur Synthese von Polyhydroxyfettsäuren ausgehend von zentralen Metaboliten in Bakterien** (modifiziert nach Steinbüchel, 1991a; Wieczorek, 1997). Die mit einem Stern gekennzeichneten Reaktionen sind bislang experimentell nicht vollständig nachgewiesen.

Nach dem *Alcaligenes eutrophus*-Syntheseweg werden zwei Moleküle Acetyl-CoA durch eine  $\beta$ -Ketothiolase zu Acetoacetyl-CoA umgesetzt, wobei ein Molekül CoA freigesetzt wird (Gottschalk, 1964a, 1964b). Anschließend wird Acetoacetyl-CoA durch eine NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA Reduktase stereospezifisch zu D-(-)-3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert, welches dann durch die PHB-Synthase zu Poly(3HB) polymerisiert wird (Steinbüchel & Schlegel, 1991). Poly(3HB)-speichernde Bakterien nutzen vorwiegend diesen Syntheseweg.

*Rhodospirillum rubrum* kondensiert zunächst, wie auch *R. eutropha* (früher: *Alcaligenes eutrophus*) zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA, das jedoch durch eine NADH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase zu L-(+)-3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert wird. Das so entstandene L-(+)-Enantiomer wird dann durch zwei Enoyl-CoA-Hydratasen in das D-(-)-Enantiomer umgewandelt, so daß es von der PHF-Synthase akzeptiert und in den Polyester integriert werden kann (Moskowitz & Merrick, 1969).

*Pseudomonas oleovorans* und andere Pseudomonaden der rRNA-Homologiegruppe I (wie z.B. *P. putida* und *P. aeruginosa*) akkumulieren bei Wachstum auf Fettsäuren, Alkanen oder Alkanolen mittlerer Kettenlänge (C<sub>6</sub> bis C<sub>12</sub>) Polyhydroxyfettsäuren mit einer den Substraten entsprechenden Kettenlänge. Die Vorstufen für die Polyestersynthese entstehen vermutlich während des Fettsäure-Katabolismus durch die  $\beta$ -Oxidation, so daß auch um jeweils eine oder mehrere C<sub>2</sub>-Einheiten verkürzte Monomere in den Polyester eingebaut werden können (De Smet, 1983; Brandl et al., 1988; Lageveen et al., 1988; Haywood et al., 1989a; 1990; Gross et al., 1989; Huisman et al., 1989; Timm & Steinbüchel, 1990). Die für die PHF-Synthase notwendigen D-(-)-Enantiomere könnten ausgehend von Metaboliten der  $\beta$ -Oxidation, durch die Epimerisierung von L-(+)-3-Hydroxyacyl-CoA, durch die Reduktion von 3-Ketoacyl-CoA oder durch die stereospezifische Hydratisierung von Enoyl-CoA bereitgestellt werden. Die Beteiligung einer Enoyl-CoA-Hydratase an der PHF-Synthase ausgehend von Intermediaten der  $\beta$ -Oxidation wurde kürzlich bei *Aeromonas caviae* nachgewiesen (Fukui et al., 1998).

Ein weiterer Syntheseweg für Polyhydroxyfettsäuren, der sogenannte ***Pseudomonas aeruginosa*-Syntheseweg** ist bei Pseudomonaden der rRNA-Homologiegruppe I bekannt. Diese Organismen sind in der Lage, ausgehend von einfachen Kohlenstoffquellen, wie Glucose oder Acetat, 3-Hydroxyfettsäuren mittlerer Kettenlänge in den Polyester zu integrieren (Haywood et al., 1990; Timm & Steinbüchel, 1990). Vermutlich ist an der Synthese der notwendigen Vorstufen die Fettsäure-de novo-Synthese beteiligt (Eggink et al., 1992; Huijberts et al., 1992, 1994; Saito & Doi, 1993). Möglicherweise ist eine 3-Hydroxyacyl-CoA-Acyl-Carrier-Protein-Transferase für die Bereitstellung der für die PHF-Synthase notwendigen D-(-)-3-Hydroxyacyl-CoA-Intermediate verantwortlich (Rehm et al., 1998).

Die von den Organismen im zentralen Stoffwechsel bereitgestellten D-(-)-3-Hydroxyacyl-CoA-Thioester können von der jeweiligen, in der Zelle vorhandenen PHF-Synthase unter Abspaltung von Coenzym A in den Polyester integriert werden. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür ist jedoch die passende Substratspezifität der im jeweiligen Organismus vorhandenen Synthase. Man kann auf Basis ihrer Primärstruktur in Kombination mit physiologischen Untersuchungen vier Klassen von PHF-Synthasen unterscheiden (Steinbüchel et al., 1992; Hustede & Steinbüchel, 1993; Schembri et al., 1994).

Die **Klasse I** wird durch die PHF-Synthase von *R. eutropha* repräsentiert. Diese Synthasen setzen bevorzugt kurzkettige Hydroxyfettsäuren ( $C_3$  bis  $C_5$ ) um, bestehen aus einer einzigen Untereinheit und kommen beispielsweise auch in *Methylobacterium extorquens* und *Rhodococcus ruber* vor (Peoples & Sinskey, 1989; Pieper & Steinbüchel, 1992; Valentin & Steinbüchel, 1993; Steinbüchel, 1996).

Die PHF-Synthase aus *P. oleovorans* vertritt die **Klasse II** der PHF-Synthasen. Sie akzeptieren hauptsächlich Coenzym A-Thioester mittellangkettiger Hydroxyfettsäuren ( $C_6$  bis  $C_{12}$ ) als Substrate, wobei es bisher keinen Hinweis darauf gibt, daß sie neben den Thioestern von 3-Hydroxyfettsäuren auch die von 4- und 5-Hydroxyfettsäuren akzeptieren (Steinbüchel, 1996). Viele Pseudomonaden der rRNA-Homologiegruppe I besitzen eine Synthase der Klasse II.

PHF-Synthasen der **Klasse III** werden durch die Synthase von *Chromatium vinosum* repräsentiert. Sie zeigen das gleiche Substratspektrum wie die Synthasen der Klasse I, bestehen jedoch aus zwei Untereinheiten, PhaC<sub>CV</sub> und PhaE<sub>CV</sub>, die für die Synthese eines katalytisch aktiven PHF-Synthase-Komplexes (PhaE<sub>CV</sub>) notwendig sind (Liebergesell et al., 1992, 1994).

Die PHF-Synthase von *Thiocapsa pfennigii* steht für die **Klasse IV** der Synthasen und gleicht in ihrer molekularen Struktur denen der Klasse III. Sie setzt sich ebenfalls aus zwei verschiedenen Untereinheiten, PhaC<sub>TP</sub> und PhaE<sub>TP</sub>, zu einem katalytisch aktiven Komplex (PhaE<sub>TP</sub>) zusammen, unterscheidet sich jedoch in ihrer Substratspezifität von allen anderen beschriebenen Synthasen. Sie kann sowohl Coenzym A-Thioester verschiedener kurzkettiger, als auch mittellangkettiger 3-, 4-, und 5-Hydroxyfettsäuren als Substrat akzeptieren (Liebergesell et al., 1993; Steinbüchel, 1996).

Durch gentechnische Methoden in Kombination mit PHF-negativen Mutanten stehen vielfältige Variationsmöglichkeiten von Syntheseorganismus und Synthase zur Verfügung, so daß eine immer größer werdende Vielfalt von biologisch erzeugten Polyestern mit unterschiedlicher Zusammensetzung und neuen, interessanten Materialeigenschaften erzeugt werden kann. In Kombination mit der Kontrolle der Fermentationsbedingungen konnte eine Vielzahl neuer Polyhydroxyfettsäuren synthetisiert werden, wobei bisher mehr als 100 verschiedene Hydroxyfettsäuren als Bausteine mikrobiell gebildeter Polyester identifiziert wurden (Steinbüchel & Valentin, 1995). Copolyester, die sich aus verschiedenen Bausteinen zusammensetzen, können interessante neue Materialeigenschaften aufweisen, die sehr stark von der Zusammensetzung und damit vom Verhältnis der einzelnen Komponenten im Polyester abhängen (Hocking & Marchessault, 1994). Während z.B. der Homopolyester Poly(3HB) ein relativ sprödes Material ist, wodurch die technischen Anwendungsmöglichkeiten stark eingeschränkt sind, zeigt der Copolyester Poly(3HB-co-3HV) wesentlich größere Elastizität, die sehr stark vom 3HV-Anteil am

Polyester abhängt, und ist damit wesentlich besser mit herkömmlichen thermoplastischen Methoden zu verarbeiten (Holmes, 1985; Doi et al., 1988).

Der Erfolg eines neuen Werkstoffes auf dem Markt hängt nicht nur von seinen Materialeigenschaften sondern auch von seinen Produktionskosten ab. Die drei wesentlichen Beiträge zu den Gesamtkosten eines biotechnologischen Produktionsprozesses sind die Rohstoffkosten, die Fermentationskosten und die Aufbereitungskosten des Produktes, die in einem PHF-Produktionsprozeß mit *P. putida* KT2442 und Octansäure als Substrat jeweils etwa ein Drittel der Gesamtkosten betragen (deKoning et al., 1997). Bei der Entwicklung eines neuen bakteriell erzeugten Werkstoffes sollte folglich möglichst von einem günstigen Substrat ausgegangen werden, wobei die Kultivierung in den Produktionsmaßstab übertragbar sein sollte. Bei einigen wenigen Prozessen zur Erzeugung biologischer Polyhydroxyfettsäuren ist die Übertragung der Kultivierung in den großen Maßstab gelungen, so daß sie bereits technisch angewendet werden (Byrom, 1990; Hocking, & Marchessault, 1994; Steinbüchel et al., 1995). In der Regel sind Hochzelldichtefermentationen und die damit meist verbundenen hohen Produktkonzentrationen eine wichtige Voraussetzung für die wirtschaftliche Produktion biotechnologisch erzeugter Substanzen (Riesenberg & Guthke, 1999). deKoning et al. (1997) stellten jedoch bei der Bilanzierung des oben erwähnten Beispielprozesses fest, daß die Erhöhung der Zelldichte über eine Trockenmassekonzentration von 20 g/l hinaus keinen entscheidenden Einfluß auf die Reduktion der Produktionskosten hatte. Die Erhöhung des PHF-Gehaltes der Zellen bewirkte allerdings eine deutliche Reduktion der Kosten, die sich insbesondere im Bereich von unter etwa 50 % (w/w) stark auswirkte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Prozeß zur biotechnologischen Erzeugung 4-Hydroxyvaleriansäure (4HV) enthaltender Polyester zu entwickeln, der die Produktion größerer Mengen (ca. 100 g) dieser Polyester aus einer Fermentation ermöglicht, wobei dessen Material- und Verarbeitungseigenschaften charakterisiert werden sollten, um mögliche Anwendungsbereiche dieses neuen Materials zu finden.

Verschiedene biologisch produzierte Polyester wurden bereits auf ihre Werkstoff- und Verarbeitungseigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Materialeigenschaften dieser Polyester stark von ihrer Zusammensetzung abhängen (Gagnon et al., 1992; deKoning et al., 1994; Hocking & Marchessault, 1994; Steinbüchel & Schmack, 1995; Jendrossek et al., 1997). Um den Einfluß des Monomers 4HV auf die Eigenschaften des neuen Materials bestimmen zu können, wäre folglich ein hoher 4HV-Anteil am Polyester wünschenswert.

4-Hydroxyvaleriansäure wurde erstmals von Valentin (Valentin et al., 1992; Valentin et al., 1995) als Bestandteil bakterieller Polyhydroxyfettsäuren in verschiedenen Stämmen von *R. eutropha* und *Pseudomonas* nachgewiesen. 4HV wurde mit einem molaren Anteil von 3 bis 20 % in den Polyester integriert, wenn die Bakterien auf Mineralmedium mit 4HV als alleiniger Kohlenstoffquelle unter Speicherbedingungen im kleinen Maßstab angezogen

wurden. Da 4HV käuflich nicht erhältlich ist, wurde sie zunächst durch alkalische Hydrolyse des korrespondierenden Lactons, 4-Hydroxyvaleriansäurelacton, hergestellt. Der Preis für dieses Lacton beträgt etwa 500 DM pro kg (Fa. Sigma) und ist somit für die großtechnische Produktion 4HV-haltiger Polyester zu hoch. Um diesen aufwendigen und teuren Schritt zu umgehen, wurden Untersuchungen mit 4-Ketovaleriansäure (Lävulinsäure) als potentielle Vorstufe zur Speicherung 4HV-haltiger Polyester durchgeführt. Lävulinsäure ist mit ca. 65 DM pro kg (Fa. Sigma) wesentlich günstiger als 4-Hydroxyvaleriansäurelacton und außerdem aus nachwachsenden Rohstoffen durch saure Hydrolyse von Hexosen, wie z.B. Fructose, herstellbar. Außerdem fällt sie bei der Holzverarbeitenden Industrie als Abfallprodukt an (Neumüller, 1983) und stellt damit einen kostengünstigen und nachwachsenden Rohstoff für die Produktion von Polyestern dar. Weiterhin tritt sie beim Abbau von Steroiden durch *Nocardia opaca* (Schubert et al., 1975) und als Nebenprodukt der Mycophenolat-Synthese in *Penicillium brevicompactum* (Nulton & Campbell, 1978) auf.

Neben der Optimierung der Fermentationsbedingungen sollte durch den Einsatz von Mutanten mit Defekten im Lävulinsäurekatabolismus der Anteil von 4HV am Polyester erhöht werden. Genetische Untersuchungen der Mutationsorte sollten im Rahmen einer Diplomarbeit Aufschluß über den bakteriellen Abbau von Lävulinsäure geben. Abschließend sollte die optimierte Fermentationsstrategie zur Erzeugung 4HV-haltiger Polyester in den 500 Liter-Pilotmaßstab übertragen werden, um die Möglichkeit einer großtechnischen Produktion dieser Polyester aufzuzeigen. Neben der bakteriellen Produktion der Polyester sollte auch die Gewinnung des Produktes, das sog. „Downstream Processing“, untersucht und optimiert werden. Parallel hierzu sollte eine verlässliche, schnelle und kostengünstige Überwachungsmethode der Produktkonzentration entwickelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme**

Stamm	DSMZ	SK	Relevanter Phänotyp	Referenz
	Nr.	Nr.		
<b><i>Ralstonia eutropha</i></b>				
H16	428	1111	Wt, prototroph	Wilde, 1962
H16-PHB <sup>-</sup> 4	541	4035	PHF <sup>-</sup> Mutante von H16	Schlegel et al., 1970
HF39	-	1217	Sm <sup>r</sup> Mutante von H16	Srivastava et al., 1982
H2275	-	2275	PHF-leaky-Mutante von H16, PhaP <sup>-</sup>	Pries et al., 1992
<b><i>Pseudomonas putida</i></b>				
KT2440	-	5145	Mt-2, <i>hsdRI</i> (r <sup>-</sup> m <sup>+</sup> ), ohne TOL-Plasmid	Worsey & Williams, 1975
GPp104	-	3983	PHF <sup>-</sup> Mutante von <i>P. putida</i> KT2442	Huisman et al., 1991
<b><i>Pseudomonas oleovorans</i></b>				
ATCC 29347	-	6731	OCT-Plasmid	ATCC 29347
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>				
PAO1	1707	2702	Prototroph, Alg <sup>-</sup>	ATCC15692
<b><i>Chromobacterium violaceum</i></b>				
	30191	1354	Wt	DSMZ 30191
<b><i>Escherichia coli</i></b>				
XL1-Blue	-	2472	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\lambda^-$ , <i>lac^-</i> . [F <sup>c</sup> <i>proA</i> <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, Tn10(Tc <sup>r</sup> )]	Bullock et al., 1987
S17-1	-	1120	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> <sup>-</sup> , <i>hsdM</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>-</sup> , <i>tra</i> -Gene des RP4 Plasmids chromosomal verankert	Simon et al., 1983,

Abkürzungen: Alg, Bildung von Alginat; PhaP, Fähigkeit, das GA24-Protein zu bilden; PHF, Fähigkeit zur Akkumulation von Polyhydroxyfettsäuren; + bzw. -, Eigenschaft vorhanden, bzw. fehlend; Sm<sup>r</sup>, Streptomycinresistenz. Abkürzungen: SK Nr., Stammkulturnummer in der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Steinbüchel; Wt, Wildtyp.

**Tabelle 2: Verwendete Tn5-induzierten Mutanten von *R. eutropha* HF39 (Brämer et al., 1998).**

Stamm	Klasse	Höchste Identität des Tn5- Integrationsortes zu:	Identität (mol %)	Referenz
VG3 (SK7532)	I	<i>prpR</i> aus <i>S. typhimurium</i>	40,0	Horswill et al., 1997
VG17 (SK7545)	I	<i>acn</i> aus <i>M. tuberculosis</i>	55,0	Cole et al., 1998
P2 (SK7167)	I	<i>acn</i> aus <i>M. tuberculosis</i>	55,0	Cole et al., 1998
SK7286	I	<i>prpC</i> aus <i>E. coli</i>	78,0	Textor et al., 1997
SK7290	I	<i>prpC</i> aus <i>E. coli</i>	78,0	Textor et al., 1997
SK7287	I	„upstream“ von <i>prpD</i>	---	Brämer, 1999a
VG13 (SK7538)	II	<i>hydG</i> aus <i>S. typhimurium</i>	61,5	Chopray et al., 1991
VG16 (SK7541)	II	<i>hydG</i> aus <i>S. typhimurium</i>	61,5	Chopray et al., 1991
G1 (SK7205)	II	<i>mexT</i> aus <i>P. aeruginosa</i>	58,5	Kohler et al., 1998
SK7291	II	<i>fadE2</i> aus <i>M. tuberculosis</i>	57,5	Cole et al., 1998
SK4491	II	<i>fadE2</i> aus <i>M. tuberculosis</i>	57,5	Cole et al., 1998
SK4525	II	<i>fadE2</i> aus <i>M. tuberculosis</i>	57,5	Cole et al., 1998
SK4416	II	<i>fadE2</i> aus <i>M. tuberculosis</i>	57,5	Cole et al., 1998
SK4508	-	<i>capP</i> aus <i>M. leprae</i>	60,0	„Accession No.“: 46710, Brämer, 1999b

Die prozentualen Identitätswerte sind Durchschnittswerte der aufgeführten Identitätsbereiche der analysierten Sequenz und beziehen sich auf die entsprechende Aminosäuresequenz. Abkürzungen: *S.*, *Salmonella*; *E.*, *Escherichia*; *M.*, *Mycobacterium*; *prpR*, Regulatorprotein des Propionat-Operons; *acn*; Aconitat-Hydratasegen; *prpC*, Methylcitrat-Synthasegen; *prpD*, Gen aus *S. typhimurium* mit noch nicht bekannter Funktion; *hydG*, Regulatorprotein von Hydrogenasen; *mexT*, Aktivatorprotein eines „multidrug“- Efflux-Systems; *fadE2*, Acyl-CoA-Dehydrogenasegen für Acyl-CoA-Thioester mittlerer Kettenlänge; *capP*, Phosphoenolpyruvat-Carboxylasegen; SK/VG, Stammkulturnummer in der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Steinbüchel.

**Tabelle 3: Plasmide und Hybridplasmide der verwendeten Bakterienstämme**

Plasmid	Größe (kbp)	Relevanter Phäno- oder Genotyp	Referenz
pHP1014	22,9	Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Pries et al., 1991
pHP1014::E156	38,5	<i>phaC</i> und <i>phaE</i> aus <i>Thiocapsa pfennigii</i>	Liebergesell et al., 1993
pHP1014::B28	25,7	<i>phaC</i> und <i>phaE</i> aus <i>Thiocapsa pfennigii</i>	Liebergesell et al., 1993
pHP1014::B28RV	25,7	<i>phaC</i> und <i>phaE</i> aus <i>Thiocapsa pfennigii</i>	Liebergesell et al., 1993
pKSSE5.3	8,3	<i>phaC</i> , aus <i>R. eutropha</i> , ORF <sup>Z</sup> , 4HB-CoA-CoA-Transferase aus <i>Clostridium Kluveri</i> , Ap <sup>r</sup>	Hein et al., 1997
pSUP5011	13,0	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Tn5:: <i>mob</i>	Simon, 1984

Abkürzungen: Ap<sup>r</sup>, Ampicillinresistenz; Cm<sup>r</sup>, Chloramphenicolresistenz; Km<sup>r</sup>, Kanamycinresistenz; Tc<sup>r</sup>, Tetracyclinresistenz. *phaC*, *phaE*, Untereinheiten des PHF-Synthasegens; Tn5::*mob*, Transposon Tn5 mit *mob*-Sequenz für konjugativen Transfer.

## 2.2 Medien

Die Nährlösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, für 20 min bei 121°C autoklaviert. Feste Nährmedien wurden durch Zusatz von 1,5 % (w/v) Agar zur Nährlösung hergestellt. Die Kohlenstoffquellen und Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und den auf 45°C abgekühlten Medien zugesetzt.

### 2.2.1 Mineralmedium (Schlegel et al., 1961)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	9,00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,50 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,00 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,20 g
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0,02 g
Fe(III) NH <sub>4</sub> -Citrat	1,20 mg
SL6 (100 fach)	0,10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1,0 l
pH 7,0	

Spurenelementlösung SL6 (Pfennig, 1974)

ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	3 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	20 mg
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1 mg
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	3 mg
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1,0 l

Die Spurenelementlösung wurde 100fach konzentriert angesetzt, autoklaviert und dem Mineralmedium unter sterilen Bedingungen zugegeben.

**2.2.2 Nutrient Broth Medium (NB-Medium) (Sambrook et al., 1989)**

Nutrient Broth	8,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1,0 l

**2.2.3 Luria-Bertani Medium (LB-Medium) (Sambrook et al., 1989)**

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1,0 l
pH 7,5	

### 2.2.4 M9-Medium (Miller, 1972, modifiziert)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	6,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g
NB-Medium	20,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>	ad 1,0 l

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 2 ml einer sterilfiltrierten 1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung (Endkonzentration 2 mM) sowie 0,1 ml einer sterilfiltrierten 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung (Endkonzentration 0,1 mM) zugesetzt.

### 2.2.5 Antibiotika

Antibiotika-Stammlösungen wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt und den Medien nach dem Autoklavieren zugegeben. Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert. Die Konzentrationen der Stammlösungen und die Endkonzentrationen im Medium sind in Tabelle 4 angegeben.

**Tabelle 4: Antibiotika**

Antibiotikum	Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration	
			(µg/ml)
Tetracyclin (Tc)	12,5	<i>R. eutropha</i> :	12,5
		<i>P. putida</i> :	50,0
Streptomycin (Sm)	100,0	<i>R. eutropha</i> HF39:	500,0
Kanamycin (Km)	100,0	<i>R. eutropha</i> :	160,0
		<i>E. coli</i> :	50,0

### 2.2.6 Stammhaltung

Die Stämme der Gattungen *Ralstonia*, *Pseudomonas* und *Chromobacterium* wurden konserviert, indem entsprechende Kolonien auf NB-Agarplatten mit 2 ml einer autoklavierten Mischung aus Magermilch (10 %, w/v) und meso-Inosit (5 %, w/v) abgeschwemmt, auf Testplättchen (Nr. 321260/6 mm, Schleicher & Schüll, Dassel) überführt und in sterilen

Zentrifugenröhrchen lyophilisiert wurden (LSL Secfroid, Zirbus, Osterode). Die lyophilisierten Testplättchen wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  in sterilen Schraubdeckelröhrchen, die getrocknetes Kieselgel enthielten, gelagert.

*E. coli*-Stämme wurden über Nacht in 10 ml LB-Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  angezogen. Aliquots dieser Kulturen wurden mit Glycerin (20 %, w/v) versetzt und in Schraubdeckelröhrchen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Stämme der Gattungen *Ralstonia*, *Pseudomonas* und *Chromobacterium* wurden reaktiviert, indem ein bis zwei Filterplättchen in 10 ml NB-Medium, das erforderlichenfalls Antibiotika enthielt (Tabelle 4), über Nacht bei  $30^{\circ}\text{C}$  auf einem Rotationsschüttler inkubiert wurden (Pilotshake RC-4/6-W, Kühner AG, Birsfelden, Schweiz). *E. coli*-Stämme wurden reaktiviert, indem 10 ml LB-Medium mit entsprechenden Zusätzen durch ein Aliquot der konservierten Zellsuspensionen angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf einem Schüttelinkubator inkubiert wurden (Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N. J., U.S.A.). Nach einem Vereinzelungsausstrich auf Agarplatten wurden entsprechende homogene Einzelkolonien zur weiteren Stammhaltung erneut auf Agarplatten ausgestrichen, mikroskopisch auf Reinheit geprüft und im Kühlschrank bei  $+4$  bis  $+7^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.3 Herstellung von Substraten

4-Hydroxyvaleriansäure (4HV) ist im Handel nicht erhältlich und mußte deshalb hergestellt werden. Die Na-Salze von Octansäure und Lävulinsäure wurden durch Titration der Säuren mit NaOH ebenfalls selbst hergestellt, da sie in größeren Mengen benötigt wurden und im Handel vergleichsweise teuer sind.

### 2.3.1 4-Hydroxyvaleriansäure

4-Hydroxyvaleriansäure (4HV) wurde durch alkalische Hydrolyse des korrespondierenden Lactons (4-Hydroxyvaleriansäurelacton) hergestellt (Valentin et al., 1992). Die Hydrolyse erfolgte unter Rühren durch Zusatz von 10 N NaOH zu einer eisgekühlten wäßrigen Lösung von 4-Hydroxyvaleriansäurelacton (50 % ,v/v) bis ein pH-Wert von 11 erreicht war. Die Umsetzung war vollständig, wenn der eingestellte pH-Wert stabil blieb. Danach wurde der pH-Wert mit 1 N HCl auf pH 7 eingestellt.

### 2.3.2 Na-Octanoat und Na-Lävulinat

Na-Octanoat und Na-Lävulinat wurden durch Säure-Neutralisation mit NaOH-Plätzchen unter Rühren hergestellt. Dabei wurde für Na-Octanoat eine wäßrige Suspension von Octansäure (30 %, w/v) und für Na-Lävulinat eine eisgekühlte, wäßrige Lösung von Lävulinsäure (50 %, w/v) verwendet. Die Neutralisation war abgeschlossen, wenn keine Phasentrennung mehr zu erkennen war und sich der pH-Wert im neutralen Bereich befand.

### 2.3.3 Ammoniumhaltige Substratvorlagen

Zur Herstellung von ammoniumhaltigen Substratvorlagen mit Gluconsäure oder Octansäure für Fed-Batch-Fermentationen wurden äquimolare Mengen von Ammoniaklösung (32 %, w/v) und Gluconsäure (50 %, w/v) oder Octansäure (30 %, w/v) gemischt, so daß der pH-Wert der Vorlage 7,0 betrug. Anschließend wurde durch entsprechende Zugabe von Na-Gluconat oder Na-Octanoat-Lösung und Wasser die gewünschte Gluconsäure bzw. Octansäure- und Ammonium-Endkonzentration eingestellt.

## 2.4 Kultivierung von Mikroorganismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien zur Zellanzucht verfolgt. Vergleichende physiologische Untersuchungen wurden im 50 ml-Maßstab in Schüttelkolben durchgeführt, während die Wachstums- und Speicherbedingungen, die Versuche zur Maßstabsvergrößerung und die Hochzelldichtefermentationen in Fermentern im 15 bis 500 l-Maßstab optimiert wurden.

### 2.4.1 Zellanzucht im Schüttelkolben

Die Kulturen der Gattungen *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium* oder *Escherichia coli* wurden, wenn nicht anders angegeben, in Erlenmeyerkolben (EK) angezogen, die zu 10 % (v/v) des Nennvolumens mit Medium gefüllt waren. Hauptkulturen wurden mit ca. 1 % (v/v) aus Vorkulturen, die sich in der späten exponentiellen Phase befanden, beimpft. Kultiviert wurde bei 30°C auf einem Rotationsschüttler oder für *E. coli* bei 37°C in einem Schüttelinkubator (Pilotshake RC-4/6-W, Kühner AG, Birsfelden, Schweiz, bzw. Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N. J., U.S.A.).

Die Zellen aus Fermentationsproben bis 2 ml wurden geerntet, indem sie 2 min lang mit einer Tischzentrifuge bei 13 000 Upm zentrifugiert wurden (Biofuge A, Heraeus, Osterode). Für größere Volumina wurde eine Laborzentrifuge mit 5 000 bis 8 000 Upm verwendet (Laborzentrifuge Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments, Newton, USA, Rotor GSA oder GS3).

#### 2.4.2 Akkumulation von Polyhydroxyfettsäuren im Schüttelkolbenversuch

Die Akkumulation von Polyhydroxyfettsäuren bei den Gattungen *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium* und *E. coli* wurde mittels Speicherversuchen im Schüttelkolben untersucht. Als Medium für *Ralstonia*, *Pseudomonas* und *Chromobacterium* diente Mineralmedium nach Schlegel et al. (1961); *E. coli* wurde in M9-Medium angezogen (2.4.1), wobei den Medien 0,05 bis 0,10 % (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  zugesetzt wurde (Miller, 1972, modifiziert, siehe 2.2.4). Bei einstufigen Speicherversuchen diente die selbe Kohlenstoffquelle sowohl als Wachstums- als auch als Speichersubstrat. Bei zweistufigen Speicherversuchen wurden die Zellen zunächst für 24 h auf Mineralmedium mit 0,10 % (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und 0,7 % (w/v) Gluconsäure, Fructose oder Succinat für *R. eutropha* und 0,7 % (w/v) Glucose oder Gluconsäure für *P. putida* angezogen, so daß der gesamte Stickstoff und die Kohlenstoffquelle am Ende der Wachstumsphase verbraucht war. Bei sogenannten Umsetzversuchen wurden die Bakterien mit einer reduzierten Konzentration an Kohlenstoffquelle angezogen und anschließend unter aseptischen Bedingungen geerntet, mit stickstofffreiem Mineralmedium gewaschen und in einem der Vorkultur äquivalenten Volumen an stickstofffreiem Mineralmedium resuspendiert.

Im folgenden wurden die Zellen unter Speicherbedingungen für eine Dauer von drei bis vier Tagen inkubiert. Die Gesamtmenge der in dieser Phase zugegebenen Speicher-Kohlenstoffquelle variierte zwischen 0,5 und 2,0 % (w/v). Substrate mit wachstumshemmenden Eigenschaften (insbesondere aliphatische Fettsäuren) wurden fraktioniert gefüttert (4 bis 5 Fraktionen zu je 0,2 %, w/v), wobei der pH-Wert der Kultur bei jeder Fütterung kontrolliert und mittels der Kohlenstoffquelle beziehungsweise HCl oder NaOH auf ca. 7,0 eingestellt wurde. Bei rekombinanten Stämmen oder Tn5-induzierten Mutanten wurden zur Aufrechterhaltung eines Selektionsdruckes Antibiotika, wie in Tabelle 4 angegeben, zugefügt.

### 2.4.3 Zellanzucht im Fermenter

Bei Fermentationen im größeren Maßstab wurden die Kulturmedien jeweils mit 5 bis 10 % (v/v) einer Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befand, angeimpft.

Zweistufige Batch-Fermentationen der Gattungen *Ralstonia* und *Pseudomonas* im 15 l-Maßstab wurden, wenn nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 28°C bzw. 30°C in einem 20 l-Laborfermenter durchgeführt (p.e.c. Fermenter, Chemap AG, Männedorf, Schweiz). Die Begasungsrate betrug 1 vvm, und es wurde mit 500 Upm gerührt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 2N HCl bzw. NaOH auf im Text angegebene Werte automatisch eingestellt. Das Verhältnis von Kohlenstoffquelle zu Stickstoffquelle wurde so gewählt, daß beide nach einer Wachstumsphase von ca. 24 h metabolisiert waren.

Für zweistufige Fed-Batch-Fermentationen von *Pseudomonas putida* im 20 l-Maßstab wurde ein 25 l-Laborfermenter verwendet, wobei die Kultivierungen mit einer computergesteuerten Kontrolleinheit ausgewertet und geregelt wurden (Apparate- und Behältertechnik Harrislee GmbH, bzw. EPSS, Industrie Technik GmbH, Flensburg).

Zweistufige Fed-Batch-Fermentationen von *Ralstonia eutropha* im 25 l-Maßstab wurden in einem 30 l-Laborfermenter, der mit einer DCU-Kontrolleinheit ausgerüstet war, durchgeführt (Biostat UD 30, B. Braun, Biotech International, Melsungen).

Bei den Großfermentationen im 500 l-Maßstab (Fermenter Biostat D 650, B. Braun, Biotech International, Melsungen) wurden als Inoculum Zellen aus einer einstufigen Batch-Fermentation im 25 l-Maßstab, die sich in der späten exponentiellen Phase befanden, durch eine Transferleitung steril in den Großfermenter überführt.

Bei allen Fed-Batch-Fermentationen wurden die Fermentationsparameter Temperatur, pH-Wert, Gelöstsauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) und Schaumniveau mit Einschub-Meßsonden gemessen (Mettler-Toledo GmbH, Steinbach und B. Braun, Biotech International, Melsungen). Als Kohlenstoffquelle während des Wachstums diente bei Fermentationen von *P. putida* Octansäure, Glucose oder Gluconsäure, bei *R. eutropha* Fructose oder Gluconsäure. Die in höheren Konzentrationen wachstumshemmende Octansäure wurde als Na-Octanoat in Portionen zu je 0,05 bis 0,2 % (w/v) gefüttert, Glucose, Gluconsäure oder Fructose in Portionen zu je 0,1 bis 2,0 % (w/v). Als Stickstoffquelle dienten Lösungen von  $NH_4Cl$  oder Ammoniak.  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ , und  $Fe(III) NH_4$ -Citrat wurden während der Wachstumsphase jeweils bei einer Zunahme der OD um ca. 5 bis 10 Einheiten in entsprechender Menge steril nachgefüttert (2.2.1). Die Konzentrationen der Kohlenstoffquellen und Metabolite sowie der Stickstoffquelle im Fermentationsmedium wurden mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) bzw. Teststäbchen bestimmt (2.5) und auf im Text angegebene Werte nachgefüttert. Bei der Fermentation von

rekombinanten Stämmen oder Tn5-induzierten Mutanten wurden, soweit nicht anders angegeben, Antibiotika wie in Tabelle 4 aufgeführt, zugegeben.

Während der Fermentation entstandener Schaum wurde durch eine Schaumzentrifuge zerstört und gegebenenfalls zusätzlich durch Zugabe von Siliconentschäumer unterdrückt (Funda-Foam, B. Braun, Biotech International, Melsungen, bzw. Wacker Silicon Antischaum Emulsion SLE, Darwin Vertriebs GmbH, Ottobrunn).

#### **2.4.4 Akkumulation von Polyhydroxyfettsäuren unter kontrollierten Fermentationsbedingungen**

Speicherversuche im Fermenter wurden als zweistufige Fed-Batch-Fermentationen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst wie unter 2.4.3 beschrieben angezogen, so daß die Kohlenstoffquelle und der gesamte Stickstoff am Ende der Wachstumsphase verbraucht waren. Anschließend wurden die jeweiligen Speicherbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Drehzahl und Begasungsvolumenstrom) eingestellt. Als Substrat in der Speicherphase diente Lävulinsäure, deren pH-Wert so eingestellt wurde, daß sie gleichzeitig zur Justierung des pH-Wertes und zum Nachfüttern geeignet war.

#### **2.4.5 Automatisierung der Fed-Batch-Fermentation**

Bei automatisierten Fed-Batch-Fermentationen mit Glucose oder Fructose wurde zur Regulierung des pH-Wertes während der Wachstumsphase Ammoniaklösung eingesetzt (Kim et al., 1997). Hierdurch wurde die Stickstoffkonzentration im Medium automatisch konstant gehalten. Die durch die Bakterien während des Wachstums verbrauchte Kohlenstoffquelle wurde über eine Schlauchpumpe aus einer Substratvorlage nachgeliefert (Schlauchpumpe Typ 502S, Watson Marlow, Falmouth, Cornwall, England). Zur Steuerung der Pumpe diente die Konzentration an Gelöstsauerstoff im Medium. Um eine automatisierte Regelung zu erreichen, wurde das Fermentationssteuerprogramm im PASCAL-Modus modifiziert (BRC 1000, IMA GmbH, Zeppelinheim, siehe Anhang, Kapitel 7).

Die von den Bakterien benötigten Mineralstoffe und Spurenelemente wurden der Substratvorlage zugefügt (2.4.3). Bei Fermentationen, bei denen Säuren (Gluconsäure oder Octansäure) als Wachstums-Kohlenstoffquelle dienten, wurde die Stickstoffquelle in der im Text angegebenen Menge ebenfalls der Substratvorlage zugefügt (2.3.3).

### 2.4.6 Trübungsmessung

Das Wachstum der Kulturen wurde durch Trübungsmessung in einem Klett-Summerson-Filterphotometer bei 520-580 nm (Filter Nr. 54) oder durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (UV/Vis Spectrophotometer Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) verfolgt; dabei wurden die Proben bis in den linearen Absorptionsbereich (OD 0,1 bis 0,3) verdünnt.

### 2.4.7 Reinheits- und Plasmidkontrollen

Die Kulturen wurden in jeder Kultivierungsstufe mikroskopisch auf Kontaminationen überprüft. Am Ende einer Kultivierung mit rekombinanten Organismen wurde der Erhalt des Plasmids durch einen Stempeltest nachgewiesen. Um sicherzugehen, daß die Antibiotikaresistenz auf den Erhalt des Plasmids und nicht auf eine spontane Anpassung zurückzuführen ist, wurde zusätzlich bei einigen Kultivierungen eine Plasmid-Präparation mit Restriktionsverdauung und anschließender Auftrennung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

#### 2.4.7.1 Lebendkeimzahlbestimmung und Stempeltest

Stämme der Gattungen *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium* und *E. coli* wurden durch Ausstrich auf Agarplatten mit selektiven Substraten oder auf NB bzw. LB-Medium mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz angezogen und durch mikroskopische Kontrolle von Einzelkolonien auf Kontaminationen überprüft.

Der Erhalt des Plasmids in rekombinanten Stämmen der Gattungen *Ralstonia*, *Pseudomonas* und *E. coli* wurde durch einen Vergleich der Lebendkeimzahlen mit und ohne Antibiotika-Selektionsdruck überprüft. Hierzu wurden die Kulturen unter sterilen Bedingungen geerntet und eine Verdünnungsreihe in Saline (0,9 %, w/v NaCl in H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Durch anschließendes Ausplattieren eines Aliquots (100 µl) der Verdünnungsansätze auf NB- bzw. LB-Agarplatten mit und ohne Antibiotika-Selektionsdruck und Bestimmung der jeweiligen Lebendkeimzahlen nach Inkubation von 24 bis 48 h wurde der Anteil der Kultur bestimmt, der das Plasmid verloren hatte. Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe der Stempelmethode nach Lederberg überprüft (Lederberg & Lederberg, 1962).

### 2.4.7.2 Plasmid-Präparation mit Restriktionsverdauung

Um zu prüfen, ob die Antibiotikaresistenz auf den Erhalt des Plasmids zurückzuführen ist und nicht auf eine spontane Anpassung oder den Einbau des Antibiotika-Resistenzgens in die genomische DNA des Wirtsbakteriums, wurde eine Plasmid-Präparation mit Restriktionsverdauung der Plasmid-DNA nach Birnboim und Doly (1979) und anschließender elektrophoretischer Trennung der DNA-Fragmente durchgeführt (2.4.7.3).

Jeweils 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden für 3 min bei 13 000 Upm zentrifugiert (Biofuge A, Heraeus Christ, Osterode). Das Pellet wurde in 100 µl eiskalter GETL-Lösung resuspendiert (25,0 mM TRIS-HCl, pH 8,0; 10,0 mM EDTA; 50,0 mM Glucose; 0,4 %, w/v Lysozym). Zur Zell-Lysis wurden 200 µl einer frisch angesetzten SDS-Lösung zugegeben (200,0 mM NaOH, 1,0 % (w/v) SDS). Nach Aufklaren der Lösung während einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proteine durch Zugabe von 150 µl eiskalter Kaliumacetat-Lösung (60,0 ml 5 M K-Acetat; 11,5 ml Eisessig; 28,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>; pH 4,8) gefällt und für 15 min bei 13 000 Upm zentrifugiert. Die Überstände wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt.

Die DNA-Lösungen wurden durch sukzessive Extraktion mit 1,0 % (v/v) TRIS-gesättigtem Phenol, zweimal 1,0 % (v/v) Phenol-Chloroform und einmal 1,0 % (v/v) Chloroform/Isoamylalkohol deprotoniert. Um die Phasentrennung zu beschleunigen, wurde die Suspension in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (30 s, 13 000 Upm, Biofuge A). Die DNA-Lösung (wässrige Oberphase) wurde anschließend durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol (96 %, v/v) und 15-minütiger Inkubation auf Eis gefällt. Die DNA wurde in einer Tischzentrifuge pelletiert (30 min, 13 000 Upm). Das Pellet wurde einmal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das so erhaltene DNA-Pellet wurde getrocknet und in 50 µl autoklaviertem TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) mit 0,1 mg/ml RNase inkubiert.

Zur Restriktionsverdauung der Plasmid-DNA wurden 10 µl Plasmid-Isolat mit 1 µl Eco RI-Restriktionsendonuklease nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen für 1 h bei 37°C inkubiert.

### 2.4.7.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Elektrophorese der Plasmid-DNA in Minigelen (7 x 10 x 0,3 cm<sup>3</sup>) wurde eine horizontale Flachbettapparatur benutzt. Die Agarose wurde 0,8 %ig (w/v) in TBE-Puffer geschmolzen, auf 50°C bis 60°C abgekühlt und in die Gelkammer gegossen (TBE-Puffer: pH 8,3; 50 mM Tris; 50 mM Borsäure; 1 mM EDTA). Nachdem die Schmelze erkaltet war, wurde der

Gelkamm entfernt und das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen Stop-Mix (50 %, w/v Saccharose; 7 M Harnstoff; 1 mM EDTA; 0,1 % ,w/v Bromphenolblau) vermischt und aufgetragen. Nach der Elektrophorese (120 V für 60 min) wurden die Gele für 10 bis 20 min in einer wäßrigen Ethidiumbromidlösung (1,0 µg/ml) gefärbt. Nach Entfärben der Gele mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> wurden die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar gemacht.

## **2.5 Analyse von Substraten und Metaboliten**

Zur Analyse von Substraten und Metaboliten im Kulturüberstand wurden während der Kultivierung unter aseptischen Bedingungen Proben entnommen, zentrifugiert, filtriert (Minisart RC4, Sartorius, Göttingen) und analysiert.

### **2.5.1 Simultane Bestimmung von Glucose, Fructose, Gluconsäure, Acrylsäure, Lävulinsäure und deren Metaboliten**

Glucose, Fructose, Gluconsäure, Acrylsäure und Lävulinsäure sowie deren Abbauprodukte wurden simultan im Medium bestimmt, in dem die Kulturüberstände mittels Ionenausschluß-Chromatographie an einer HPLC-Anlage untersucht wurden (Knauer GmbH, Berlin). Hierzu wurden die Kulturüberstände mit einem Volumenanteil verdünnter Schwefelsäure (5 %, v/v) für drei Stunden bei 70°C inkubiert und anschließend 20 min bei 13 000 Upm zentrifugiert (Biofuge A, Heraeus Christ, Osterode). Bei der HPLC-Analyse der Überstände diente als Laufmittel entgaste und verdünnte Schwefelsäure (6,5 mM) bei einer Flußrate von 0,5 ml/min (Erma Entgasungsgerät ERC-3512, ERC, Alteglofsheim bei Regensburg, bzw. Gradienten Pumpe L-6200, Lichrograph, Merck, Darmstadt). Die Proben mit einem Injektionsvolumen von 10 µl (Marathon Autosampler, Spark, Friedrichsdorf) wurden mittels einer Aminex Ionenausschluß-Säule bei einer Temperatur von 65°C aufgetrennt (Säule: HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm, Biorad, Richmond, U.S.A., bzw. Säulenofen T-6300, Merck, Darmstadt). Glucose und Gluconsäure konnten nicht getrennt werden und wurden gemeinsam erfaßt, wenn sie zusammen vorkamen. Die Detektion erfolgte mit einem RI-Detektor, dessen Daten von einem Integrator ausgewertet wurden (RI-71, Merck, Darmstadt, bzw. Chromatopac C-R3A, Shimadzu, Duisburg).

### 2.5.2 Simultane Bestimmung von Octansäure und Lävulinsäure

Zur simultanen Bestimmung von Octansäure und Lävulinsäure wurden die Kulturüberstände mittels HPLC an einer Nucleosil-100 C18 Säule (7µm, 250 mm x 4 mm), bei Raumtemperatur aufgetrennt (Knauer GmbH, Berlin) und mittels eines Diodenarray-Detectors detektiert (J&M, Analytische Meß- und Regeltechnik, Aachen). Als Laufmittel diente ein Gemisch aus 47 % (v/v) Acetonitril (gradient grade) und 53 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, pH 7,1 (Kalium Phosphat Puffer, 0,01 M) mit einer Flußrate von 1,0 ml/min. Die Daten wurden unter Verwendung der Eurochrom 2000-Software (Knauer GmbH, Berlin) aufgenommen und ausgewertet.

### 2.5.3 Schnelltest für Glucose und Ammonium

Die Ammoniumkonzentration in den Kulturüberständen wurde mit Hilfe von Analysestäbchen bestimmt (Ammonium-Test, Merck, Darmstadt).

Zur schnellen Bestimmung der Glucosekonzentration in den Kulturüberständen dienten Glucose-Teststäbchen (Diaben Test 5000, Boehringer, Mannheim). Die exakte Konzentration der Glucose in den Überständen wurde anschließend mittels HPLC bestimmt (2.5.1).

### 2.5.4 Gaschromatographische Analyse der Kulturüberstände

Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren wurden im Kulturüberstand nachgewiesen, indem Aliquots der Überstände lyophilisiert und nach saurer Methanolyse gaschromatographisch analysiert wurden (2.8.1).

## 2.6 Zellflockung und Zellernte

Aus größeren Kulturvolumina (5 Liter und mehr) wurden die Zellen mittels Durchlaufzentrifugation geerntet (CEPA, Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr, Typ Z41 für Fermentationen bis zum 25 l-Maßstab und Typ Z61 für Fermentationen im 500 l-Maßstab). Zur Erhöhung der Zellausbeute wurde bei Kultivierungen mit *P. putida* vor der Zellernte eine Flockung der Zellen im Fermenter durchgeführt (modifiziert nach Walker et al., 1982). Hierzu wurde zunächst der pH-Wert durch Zugabe von NaOH (50 %, w/v) auf pH 8,5 eingestellt und die Temperatur auf 70°C erhöht, für 15 min gehalten und anschließend

auf 25°C reduziert, wobei der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure (37 %, w/v) auf pH 4,0 eingestellt wurde. Die Rührerdrehzahl wurde bei Fermentationen im 15- bis 25 l-Maßstab auf 200 Upm und bei Fermentationen im 500 l-Maßstab auf 50 Upm eingestellt. Eine Begasung fand nicht statt. Nach der Ernte wurden die Zellen bei -30°C eingefroren und in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert (Beta 1-16, Christ, Osterode).

## 2.7 Isolierung von Polyhydroxyfettsäuren (PHF)

Zur Isolierung von Polyhydroxyfettsäuren aus geernteten Zellen (2.6) wurden verschiedene Verfahren angewandt. Zunächst wurden die lyophilisierten Zellen mit einem Pistill in einer Reibschale fein zerrieben, gegebenenfalls mit Methanol gewaschen und dann extrahiert.

### Arbeitsstufen der Isolierung von Polyhydroxyfettsäuren

#### a) Waschen der Zellen:

Die gefriergetrockneten und zerkleinerten Zellen wurden vor der Extraktion für 15 min in siedendem Methanol gewaschen (Zellkonzentration: 50 %, w/v), um größere Mengen an zelleigenen Fettsäuren abzutrennen und die Permeabilität der Zellen für die anschließende Extraktion zu erhöhen.

#### b) Vorbehandlung der Zellen durch Natronlauge

Die lyophilisierten Zellen wurden in 0,5 N Natronlauge resuspendiert, so daß eine Zellkonzentration von 50 g/l entstand, und unter Rühren auf 30°C erhitzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde die Natronlauge durch Salzsäure (37 %, w/w) neutralisiert. Nachdem die Suspension auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, zweimal mit Saline (NaCl 0,9 %, w/v) gewaschen und lyophilisiert.

#### c) Extraktion in einer Soxhlet-Apparatur:

Die lyophilisierten Zellen wurden in einer Soxhlet-Apparatur (Eigenbau, 0,3 bis 5,0 Liter) unter Verwendung von Cellulose-Extraktionshülsen (Schleicher & Schüll, Dassel) mittels Chloroform oder Aceton unter Rückfluß extrahiert (Lageveen et al., 1988).

#### d) Extraktion durch siedendes Chloroform:

Gefriergetrocknete Zellen wurden in Chloroform unter Rückfluß für bis zu 7 h in einem Rundkolben gekocht (Zellkonzentration ca. 30 %, w/v). Wenn das zur Extraktion eingesetzte Chloroform mit PHF gesättigt war (sichtbar durch starke Schaumentwicklung und eine stark erhöhte Viskosität der Lösung), wurde die Extraktion unterbrochen und die Zellen mittels

eines handelsüblichen Stahlküchensiebes (Maschenweite 1,0 mm) zunächst grob abgetrennt und, wenn erforderlich, erneut extrahiert. Das Grobfiltrat wurde anschließend mit einem Feinfilter filtriert (siehe unten, Abschnitt g).

#### e) Kalte Extraktion in Chloroform:

Kleinere Mengen von Polyhydroxyfettsäuren wurden durch Schütteln in verschraubten 100 ml Glasflaschen für 72 bis 96 h bei 30°C auf dem Rotationsschüttler (150 Umdrehungen pro Minute) durch Chloroform extrahiert.

#### f) Fällung und Reinigung der Polyester:

Nachdem die in Chloroform gelösten Polyester mittels eines Rotationsverdampfers eingeeengt waren, wurden sie langsam in das zehnfache Volumen von Ethanol eingerührt und gefällt. Die mit dem Polyester aus den Zellen extrahierten freien Fettsäuren lösten sich dabei im Ethanol. Nachdem sich das PHF-Präzipitat am Boden des Gefäßes abgesetzt hatte, wurde der Überstand dekantiert, die verbleibende PHF-Suspension filtriert (siehe unten, Abschnitt g) und unter einem Luftstrom getrocknet. Der Vorgang wurde bis zu dreimal wiederholt, um möglichst reine Polyesterproben zu erhalten.

#### g) Filtration der Polyesterlösungen:

Größere Zellreste, die bei der weiteren Untersuchung der Eigenschaften der Polyester störten, wurden durch Filtration von den in Chloroform gelösten PHF mittels eines Edelstahl-Feinfilters abgetrennt (SIKA-FIL 3, Krebsöge GmbH, Radevormwald). Hierzu wurde der Filter in eine Sterilfiltrationsapparatur (Masch. Nr.: 8879, Filter EKSI-14, Seitz) eingespannt und die Lösung mit leichtem Überdruck filtriert (ca. 50 mbar). Die Trenngrenze des Filters lag zwischen 3 und 7 µm (Produktinformation Krebsöge GmbH).

#### h) Herstellung von Polyesterfilmen

Unter einem Luftstrom wurden die filtrierten Polyesterlösungen je nach Menge in Glas- oder Stahlschalen unterschiedlicher Größe getrocknet, die so weit gefüllt waren, daß 1 bis 5 mm dicke trockene Polyesterfilme entstanden.

## **2.8 Analyse von Polyhydroxyfettsäuren**

Die von den Bakterien akkumulierten Polyhydroxyfettsäuren wurden zunächst routinemäßig qualitativ und quantitativ gaschromatographisch analysiert und danach durch massenspektrometrische Analysen eindeutig identifiziert. Zur Überprüfung, ob die nach saurer Methanolyse gemessenen Monomere in den Polyester integriert waren, wurden die

Polyhydroxyfettsäuren zuvor nach Kapitel 2.7 isoliert und gereinigt. Das Molekulargewicht der Polyester wurden bestimmt, indem die extrahierten und gefällten Proben durch eine Gelpermeationschromatographie analysiert wurden.

### 2.8.1 Gaschromatographische Bestimmung von Polyhydroxyfettsäuren

Um den Anteil der PHF an der Zelltrockenmasse und deren Zusammensetzung zu bestimmen, wurden gewaschene Zellen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und für 24 bis 48 h lyophilisiert (LSL Secfroid, Zirbus, Osterode). Nachdem die Polyester säurekatalytisch methanolysiert waren (siehe unten), wurden die erhaltenen Methylester der Hydroxyfettsäuren gaschromatographisch nachgewiesen (Brandl et al., 1989; Brandl et al., 1988; Timm et al., 1990).

Die Methanolyse erfolgte durch Inkubation von 3 bis 5 mg getrockneten Zellen oder 2 bis 3 mg extrahierten Polyesters (2.7) in Schraubdeckelröhrchen mit 1 ml wasserfreiem Chloroform und 1 ml Methanol/Schwefelsäure (15 % ,v/v Schwefelsäure in getrocknetem Methanol) für 5 h bei  $100^{\circ}\text{C}$  im Ölbad (Typ Ö270, Memmert, Schwabach). Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt waren, wurden die Ansätze mit 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$  für 30 s extrahiert.

Nach der Phasentrennung wurde die Chloroformphase in Autosamplergefäße abgefüllt (Typ 08-CV, Verschlusskappen mit PTFE-beschichteten Butylgummi-Septen Typ 8-AC4, Chromacol, LTD., England) und die Methylester und Lactone mit einem Gaschromatographen analysiert (GC-Typ 820, mit Autosampler AS-Typ 8300, Perkin Elmer, Überlingen). Bei  $230^{\circ}\text{C}$  wurden 3  $\mu\text{l}$  Probe mit einem Split-Verhältnis von 1:40 injiziert. Die Chromatographie wurde an einer Permaphase PEG Säule (Länge: 60 m, Innendurchmesser: 0,32 m, Dicke der stationären Phase: 0,5  $\mu\text{m}$ , Restek GmbH, Bad Soden) mit Helium als Trägergas (Flußrate: 32 ml/min) durchgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor bei einer Temperatur von  $275^{\circ}\text{C}$  (FID 8420, Perkin Elmer). Ein Temperaturprogramm erhöhte die Effizienz der Trennung ( $120^{\circ}\text{C}$  für 5 min, Erwärmung auf eine Temperatur von  $180^{\circ}\text{C}$  mit einem Gradienten von  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , weitere Erwärmung auf eine Temperatur von  $220^{\circ}\text{C}$  mit einem Gradienten von  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , Halten von  $220^{\circ}\text{C}$  für 31 min). Weitere Details der Analysebedingungen, und der Konfiguration des Gerätes sind von Timm (1990) beschrieben.

Die Identifizierung und Quantifizierung der Hydroxyfettsäuremethylester, Fettsäuremethylester und Lactone erfolgte mit Hilfe käuflicher oder chemisch synthetisierter Standardsubstanzen (Gross et al., 1989; Valentin et al., 1992; Valentin & Steinbüchel, 1993). 3-Hydroxyfettsäuren wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. R. C. Fuller und Prof. Dr. R. W. Lenz (University of Massachusetts, Amherst, U.S.A.) zur Verfügung gestellt oder durch

Kultivierung der entsprechenden Mikroorganismen hergestellt (2.4) und isoliert (2.7). Heptansäure diente als interner Standard und wurde vor der Veresterung der Proben zugegeben (1 µl Heptansäure pro ml Chloroform).

Zur eindeutigen Identifizierung der gemessenen Substanzen wurden massenspektrometrische Analysen der veresterten Proben (siehe oben) durchgeführt. Die Substanzen wurden unter Verwendung eines Gaschromatographen (HP 6890 GC System, Hewlet Packard, Waldbronn) an einer Permaphase PEG Säule (Spezifikation siehe oben) mit Helium als Trägergas getrennt (Temperaturprogramm: siehe oben) und mittels eines massenselektiven Detektors detektiert (Mass Selective Detector 5973, Hewlet Packard, Waldbronn). Die Daten wurden unter Verwendung der HP-MSD Productivity ChemStation Software erfaßt und ausgewertet (Hewlet Packard, Waldbronn).

### 2.8.2 Gelpermeationschromatographie

Das Molekulargewicht der durch Chloroform- oder Aceton-Extraktion isolierten Polyester wurde durch Gelpermeationschromatographie (GPC) bestimmt. Zur Probenvorbereitung wurde der isolierte Polyester in Chloroform gelöst (1 bis 10 mg/ml) und filtriert (Minisart SRP4, Sartorius, Göttingen). Die Chromatographie wurde an einer HPLC-Apparatur durchgeführt (Waters, Milford, U.S.A.). Das Injektionsvolumen betrug 20 bis 120 µl (717plus Autosampler, Rheodyne 7725i). Die Trennung erfolgte mit Chloroform als Laufmittel bei einer Flußrate von 1 ml/min (515 HPLC Pumpe) und einer Temperatur von 35°C (Jetstream 2 Säulenofen) an vier in Reihe geschalteten Styragel-Säulen (HR3, HR4, HR5, HR6). Die eluierten Substanzen wurden durch einen RI-Detektor erfaßt (419 Differential Refractometer). Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte unter Verwendung der Millennium Chromatography Manager GPC Software (Waters, Milford, U.S.A.). Das Gewichtsmittel ( $M_w$ ), Zahlenmittel ( $M_n$ ) sowie die Verteilung der molaren Masse ( $M_w/M_n$ ) wurde relativ zu Polystyrol-Standards ermittelt (Polymer Standards Service, Mainz).

## 2.9 Nachweis von Polyhydroxyfettsäuren durch Nilrot (Gorenflo et al., 1999)

Zum Nachweis von Polyhydroxyfettsäuren wurde eine fluoreszenzspektroskopische Methode in Zusammenarbeit mit Stefan Marose (Institut für Technische Chemie, Universität Hannover) entwickelt, die auf einer Anfärbung hydrophober Einschlüsse in Bakterien mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot beruht. Erste Ergebnisse für Polyhydroxybuttersäure sind

bereits mit der Durchflußzytometrie erhalten worden (Akerlund et al., 1995; Deglau et al., 1995). Sowohl isolierte Filme und Granula als auch Polyester in lebenden Zellen wurden durch Nilrot angefärbt und mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie und Flow Cytometry untersucht.

### **2.9.1 Isolierung nativer Poly(3HB)-Granula** (modifiziert nach Preusting et al., 1993a)

Unter Speicherbedingungen kultivierte, geerntete und mit Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,5) gewaschene Zellen von *R. eutropha* (2.4) wurden in Tris-Puffer resuspendiert und durch eine zweimalige Passage durch eine „French Pressure Cell Press“ bei einem Druck von 16 000 Psi aufgeschlossen (American Instrument Company, Silver Spring, U.S.A). Der so entstandene Rohextrakt wurde auf einen linearen Glycerin-Gradienten geladen, der durch Einfrieren (-70°C) eines diskontinuierlichen Gradienten aus drei Anteilen 88 % (v/v) und einem Anteil 44 % (v/v) Glycerin in 100 mM Tris/HCl (pH 7,5) hergestellt wurde. Nach dreißigminütiger Zentrifugation bei 210 000 g und 4°C reicherten sich die Granula in einer Bande bei ca. 88 % Glycerin an. Die Granula wurden abgenommen und mit Tris-Puffer gewaschen. Nach erneuter Aufnahme der Granula in Tris-Puffer wurde die Suspension auf einen Saccharose-Gradienten, gebildet durch die Schichtung von 2,00 M; 1,66 M; 1,33 M und 1,00 M Saccharose in 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), geladen und 2 h lang bei 210 000 g und 40°C zentrifugiert. Die Granula, die sich bei einer Dichte von ca. 1,2 g/ml anlagerten, wurden abgenommen, zweimal mit Tris-Puffer gewaschen und bei -20°C gelagert.

### **2.9.2 Anfärben von Polyesterproben mit Nilrot**

Die PHF-Proben wurden als Film auf die Innenseite einer dreieckigen Fluoreszenzküvette (Hellma, Mühlheim) aufgetragen, indem 2 ml einer PHF-Lösung in Chloroform (5,0 g/l) durch einen Luftstrom getrocknet wurden. Nachdem das Chloroform vollständig verdunstet war, wurden 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> in die Küvette gefüllt und die Probe nach Hinzufügen von 60 µl einer Nilrot-Stammlösung (1 mg/ml Nilrot in Aceton) für 10 min. inkubiert (Endkonzentration an Nilrot 30 µg/ml). Anschließend wurden die Proben durch 2D-Fluoreszenzspektroskopie in einem 2D-Fluoreszenzspektrometer untersucht (F-4500, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan).

### 2.9.3 Anfärbung von Zellen mit Nilrot

Die nach Kapitel 2.4 kultivierten Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in Saline (0,9 %, w/v NaCl in H<sub>2</sub>O) resuspendiert, so daß die optische Dichte bei 600 nm zwischen 0,3 und 0,5 lag. 60 µl einer Nilrot-Stammlösung (1 mg/ml Nilrot in Aceton) wurden zu 2 ml Zellsuspension zugefügt (Endkonzentration an Nilrot 30 µg/ml) und unter ständigem Rühren bei einer konstanten Temperatur von 20°C fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Für Untersuchungen während Fermentationen von Mikroorganismen wurde ein SFM 25-Fluoreszenzspektrometer (Kontron AG, Zürich, Schweiz) verwendet, wobei der Exzitations- und Emissionsschlitz 10 nm und die Verstärkerspannung 618 V betrug.

### 2.9.4 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Polyestergranula

Nach Kapitel 2.4 kultivierte Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in Saline (0,9 %, w/v NaCl in H<sub>2</sub>O) gewaschen und mit Nilrot angefärbt (2.9.3). Etwa 3 µl der angefärbten Zellsuspension wurden auf einen Objektträger gegeben und mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Laborlux D, Leitz, Wetzlar) bei einer Exzitationswellenlänge von 340 bis 380 nm untersucht. Die Ergebnisse wurden mit einem Photoaufsatz (MPS48, MPS52, Leitz, Wetzlar) unter Verwendung eines Kunstlichtfilmes dargestellt (320 ASA, Kodak).

### 2.9.5 Flow Cytometry

Die Fluoreszenzintensität und die Größe einzelner, mit Nilrot angefärbter Poly(3HB)-Granula, wurden mit einem Coulter Epics XL flow cytometer (Coulter Inc., Miami, USA), der mit einem 15 mW Argon-Ionen-Laser ausgerüstet war, gemessen. Die Kalibrierung des Vorwärtsstreulichts auf die Partikelgröße wurde mit 0,56 und 1,12 µm Polystyrol Standards durchgeführt (Polysciences, Warrington, USA). Die Nilrot-Fluoreszenzsignale wurden mittels eines 620 nm Breitbandfilters detektiert. In jeder Probe wurden mindestens 50 000 Poly(3HB)-Granula analysiert, um reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen. Einzelpartikel wurden erfaßt, indem die Peakhöhe und Peakbreite simultan ausgewertet wurde.

### 3 Experimente und Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Systems, mit dem 4HV-haltige Polyester im großen Maßstab produziert und ihre Materialeigenschaften sowie ihr Verarbeitungsverhalten in technischen Prozessen experimentell ermittelt werden konnten. Nach der Entwicklung eines Systems zur Produktion dieser Polyester ausgehend von Lävulinsäure sollten die Kultivierungsbedingungen im Fermenter optimiert werden. Die Übertragung dieses Fermentationsprozesses in den 500 l-Pilotmaßstab und eine Optimierung des Produktaufbereitung sollte die effektive Gewinnung 4HV-haltiger Polyester im Technikumsmaßstab ermöglichen. Zur Überwachung der Produktkonzentration während des Produktionsprozesses sollte eine Analytik entwickelt werden, mit der der Polyestergehalt der Zellen rasch quantitativ bestimmt werden kann. Der Einsatz von Mutanten des Stammes *R. eutropha* HF39 mit Defekten im Lävulinsäurekatabolismus sollte den Anteil von 4HV in den von diesem Stamm akkumulierten Polyester erhöhen und Rückschlüsse auf den Abbau von Lävulinsäure und die Bildung von 4HV in *R. eutropha* HF39 ermöglichen.

#### 3.1 Optimierung der Produktion 4HV-haltiger Polyester

Zur Untersuchung der Materialeigenschaften 4HV-haltiger Polyester sollten Proben dieses Polyesters im 100 g-Maßstab mit einem möglichst hohen Anteil an 4HV und homogenen, reproduzierbaren und definierten Materialeigenschaften zur Verfügung gestellt werden. Diese Proben sollten jeweils aus einer einzigen, unabhängigen Fermentation gewonnen werden. Um diese relativ großen Mengen des Polyesters aus einer Kultivierung zu erhalten, wurden zunächst die Wachstums- und Speicherbedingungen optimiert und die Fermentation vom Erlenmeyerkolben in den 20 l-Maßstab übertragen.

##### 3.1.1 Voruntersuchungen zur Akkumulation 4HV-haltiger Polyester

Speicherversuche mit *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) im Erlenmeyerkolben mit Lävulinsäure als Substrat in der Speicherphase führten zur Bildung von Poly(3HB-co-3HV-co-4HV) (Steinbüchel & Gorenflo, 1997; Steinbüchel et al., 1998). Die Akkumulation 4HV-haltiger Polyester ausgehend von Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle wurde in einstufigen Speicherversuchen (2.4.2) mit den in Tabelle 5 aufgeführten Stämmen von *P. putida* und *R. eutropha* untersucht.

**Tabelle 5: Bildung von Polyhydroxyfettsäuren durch Stämme von *Ralstonia eutropha* und *Pseudomonas putida* im einstufigen Speicherversuch mit Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle.**

Stamm	PHF-Gehalt (% TM)	Zusammensetzung des Polyesters (mol %)						
		3HB	3HV	4HV	3HHx	3HO	3HD	3HDD
<i>R. eutropha</i>								
HF 39	66,2	46,4	51,5	2,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H16-PHB <sup>4</sup> (pHP1014::E156)	60,3	73,6	22,6	3,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H16-PHB <sup>4</sup> (pHP1014::B28)	57,5	85,5	13,0	1,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>P. putida</i>								
KT2440	22,3	3,2	22,7	0,8	10,7	23,2	36,4	3,0
GpP104 (pHP1014::E156)	41,8	0,8	69,2	30,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
GpP104 (pHP1014::B28RV)	54,7	0,7	80,4	18,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Die Zellen wurden im 50 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben mit MM(2.2.1) bei 30°C und 150 Umdrehungen pro Minute für 72 h mit Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle kultiviert (insgesamt 1,2 %, w/v in Portionen zu je 0,1-0,4 %, w/v), anschließend geerntet, gewaschen und analysiert (2.8). Abkürzungen: PHF, Polyhydroxyfettsäure; TM, Trockenmasse; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure; 3HHx, 3-Hydroxyhexansäure; 3HO, 3-Hydroxyoctansäure; 3HD, 3-Hydroxydekansäure; 3HDD, 3-Hydroxydodekansäure; n.n., nicht nachweisbar.

Während der gesamten Kultivierung wurden insgesamt 0,7 % (w/v) Lävulinsäure zugegeben. Die Zellen wurden nach 4 Tagen geerntet. Anschließend wurde jeweils der PHF-Gehalt sowie die PHF-Zusammensetzung bestimmt (2.8). Alle untersuchten Stämme waren in der Lage, ausgehend von Lävulinsäure 4HV als Baustein in den Polyester einzubauen, wobei die rekombinanten Stämme der Gattung *Pseudomonas* einen Polyester mit einem wesentlich höheren Anteil an 4HV akkumulierten, als die der Gattung *Ralstonia*. Der Polyesteranteil an der Zelltrockenmasse lag bei allen drei Stämmen von *Ralstonia* mit Werten zwischen 66,2 und 57,5 % (w/w) etwa im gleichen Bereich. Der Wildtyp *P. putida* KT2440 speicherte einen Polyester, der aus sieben Bausteinen bestand, wobei der Anteil an 4HV mit 0,8 mol % sehr gering war. *P. putida* GpP104 (pHP1014::E156) wies mit 30,0 mol % den höchsten Anteil an 4HV auf, zeigte jedoch mit 41,8 % (w/w) eine geringere PHF-Akkumulation als *P. putida* GpP104 (pHP1014::B28RV), der mit 54,7 % (w/v) knapp unter der Speicherrate von *Ralstonia* lag. Allerdings war der Anteil an 4HV bei diesem Stamm mit 18,9 mol % geringer als bei *P. putida* GpP104 (pHP1014::E156).

### 3.1.2 Optimierung der Zellanzucht

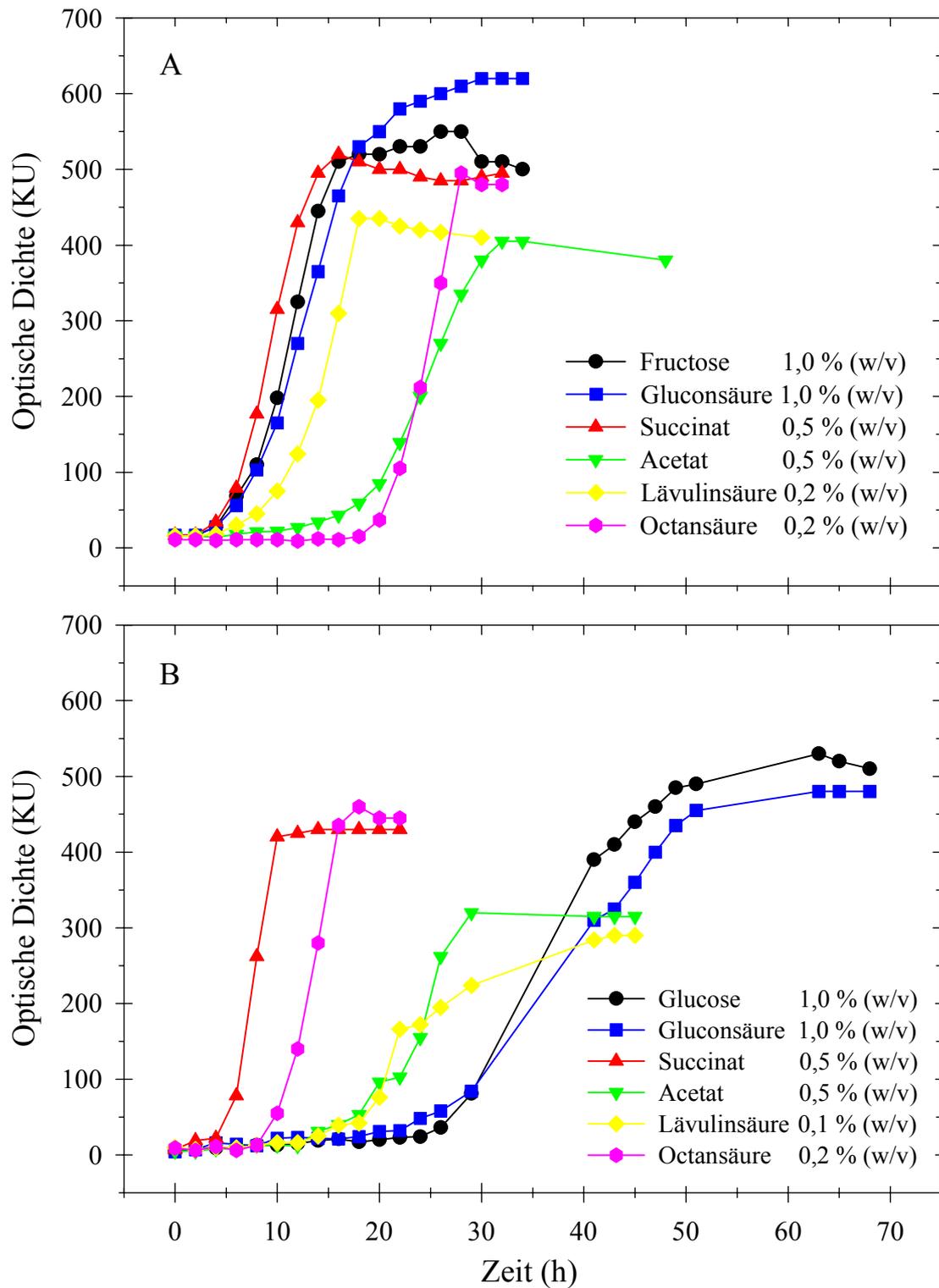
Die Optimierung der Zellanzucht wird anhand von Wachstumsversuchen mit *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) exemplarisch beschrieben, die in 300 ml-Klettkolben mit MM und verschiedenen Kohlenstoffquellen durchgeführt wurden (2.4.1). Die Ergebnisse sind in Abb. 2 durch die zeitliche Zunahme der optischen Dichte dargestellt, die mit einem Klett-Photometer bestimmt wurde (2.4.6). Als Inoculum dienten jeweils Zellen einer NB-Vorkultur die sich in der späten exponentiellen Phase befanden. Substrate mit wachstumshemmenden Eigenschaften wurden in so geringen Konzentrationen zugegeben, daß noch ein deutliches Wachstum zu messen war.

Die Diagramme zeigen, daß die lag-Phase von *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::E156) auf Lävulinsäure bereits bei einer Konzentration von 0,2 % (w/v) gegenüber Succinat, Fructose und Gluconsäure leicht verlängert war. Auf Octansäure und Acetat wiesen die Zellen ein deutlich verzögertes Wachstum auf. *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) zeigte bereits bei Wachstum auf 0,1 % (w/v) Lävulinsäure eine gegenüber Succinat und Octansäure wesentlich verlängerte lag-Phase. Auffällig war ein stark verzögertes Wachstum dieses Stammes auf Glucose und Gluconsäure mit einer lag-Phase von etwa 25 h. Octansäure erwies sich für *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) als wesentlich besseres Substrat als für *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::E156).

Aus weiteren Versuchen, die in Abb. 2 nicht dargestellt sind, geht hervor, daß *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::E156) ab einer Lävulinsäurekonzentration von 0,5 % (w/v) nicht mehr wuchs. *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) hingegen war bereits ab einer Lävulinsäurekonzentration von 0,2 % (w/v) nicht mehr in der Lage, auf Lävulinsäure als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen.

### 3.1.3 Übertragung der Kultivierung vom Schüttelkolben (50 ml) in den 15 l-Maßstab

Die Kultivierung von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) wurde in den 15 l-Maßstab übertragen, um das Speicherverhalten der Zellen unter definierten Fermentationsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert und Belüftung zu untersuchen und um größere Mengen 4HV-haltiger Polyester aus einer Charge zu erhalten. Hierzu wurde *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) verwendet, da der von ihm bei einstufigen Speicherversuchen akkumulierte Polyester den höchsten Anteil an 4HV aufwies (Tabelle 5). Da Lävulinsäure ein im Vergleich zu Octansäure relativ teures und schlechtes Wachstumssubstrat darstellt (Abb. 2 B), wurde eine zweistufige Fed-Batch-Fermentation im 15 l-Maßstab mit Octansäure als Wachstumssubstrat entwickelt (2.4.4).



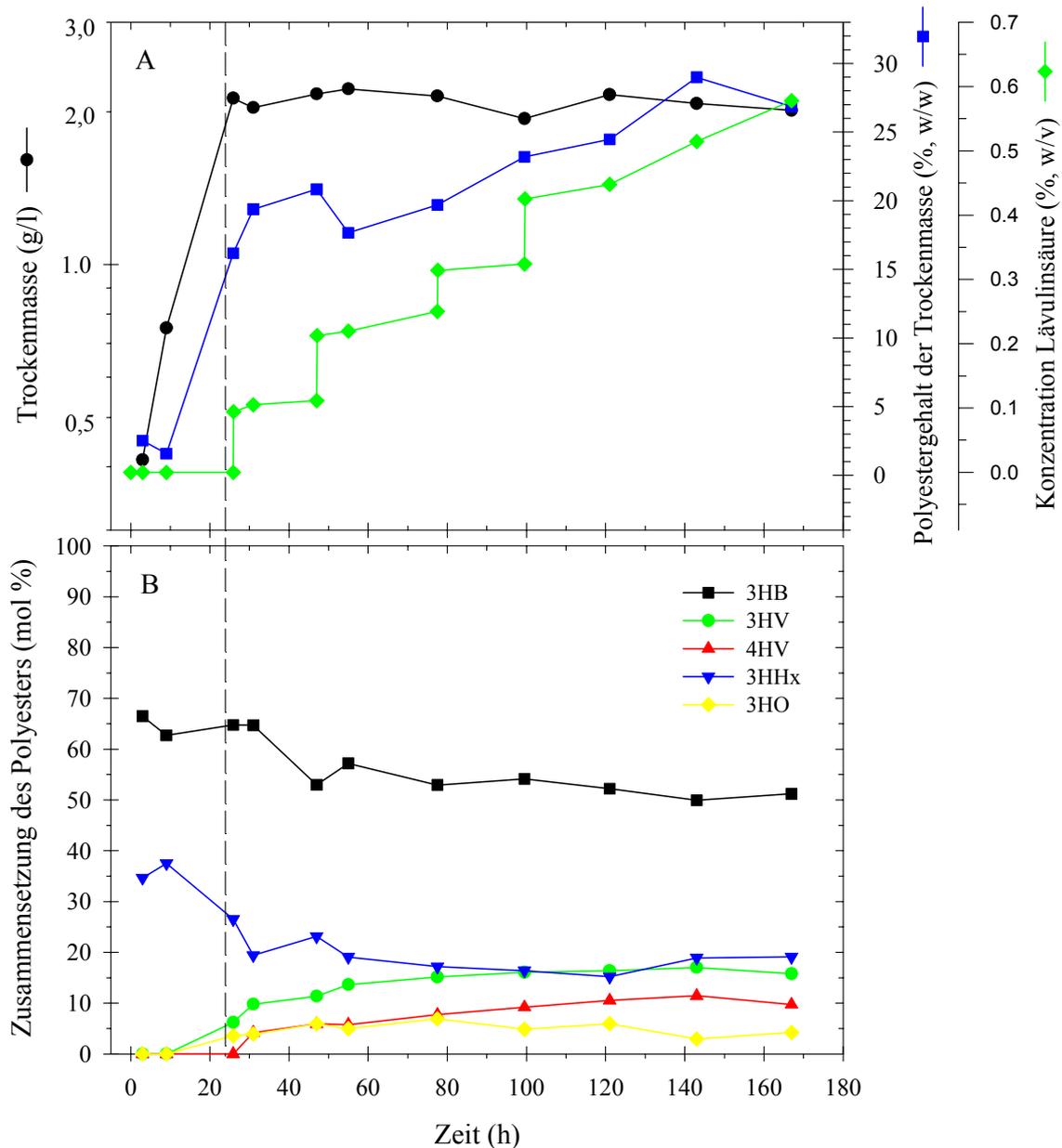
**Abb. 2:** Wachstumsvergleiche von *R. eutropha* H16-PHB<sup>-</sup>4 (pHP1014::E156) (A) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) (B) in Mineralmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Das Wachstum wurde während der Kultivierung bei 30°C auf einem Rotationsschüttler mit 150 Umdrehungen pro Minute durch Bestimmung der optischen Dichte mit einem Klett-Photometer verfolgt (2.4.6). Abkürzungen: KU, Klett-Einheiten.

Obwohl *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) mit Succinat als C-Quelle ein ähnliches Wachstumsverhalten aufwies wie mit Octansäure (Abb. 2 B), wurde Octansäure für die Fed-Batch-Fermentation verwendet, da angenommen wird, daß die Enzyme des Fettsäure-Katabolismus durch Octansäure induziert werden (Kim et al., 1997), die auch zum Abbau der Lävulinsäure in der Speicherphase notwendig sind (3.3.3).

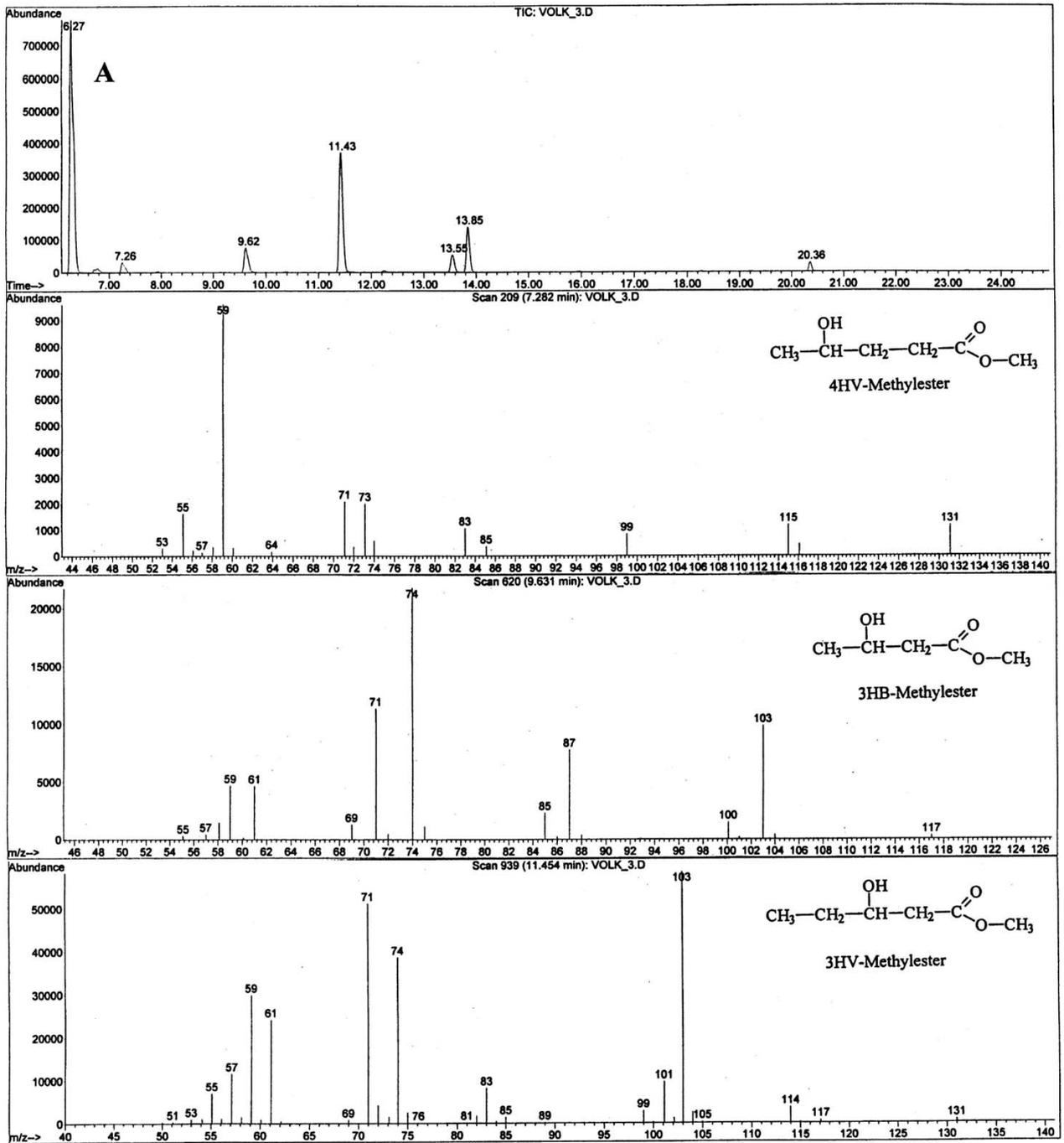
Als Inoculum diente 1 l einer in MM und Octansäure für 20 h gewachsenen Vorkultur (MM, siehe 2.2.1, Octansäure, 0,3 % w/v; NH<sub>4</sub>Cl, 0,13 % w/v und Tetracyclin, 50 mg/l). Die Vorkultur wurde in den mit 14 l Mineralmedium, Octansäure (0,3 % w/v), NH<sub>4</sub>Cl (0,13 % w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllten 20-l Fermenter unter sterilen Bedingungen überführt. Während der gesamten Kultivierungsphase von 164 h wurde die Kultur mit 500 Upm gerührt und mit 1 vvm begast. Dabei wurde der pH-Wert während der Wachstumsphase durch automatische Zugabe von 2 N HCl auf pH 7,2 konstant gehalten. Nach einer Wachstumsphase von 24 h und Verbrauch der gesamten Octansäure und des Ammoniumchlorids gingen die Zellen in die stationäre Phase über (Abb. 3 A), in der durch die Zugabe einer sterilfiltrierten Lösung von Lävulinsäure Na-Salz (50 % w/v) eine Lävulinsäurekonzentration von 0,1 % (w/v) im Fermenter eingestellt wurde, um den Einbau von 4HV in den Polyester zu ermöglichen. Während der folgenden 140-stündigen Speicherphase wurde der pH-Wert durch automatische Zugabe von Lävulinsäure (50 % w/v), die mittels NaOH auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt war, konstant auf pH 6,0 gehalten, so daß die von den Zellen aufgenommene Lävulinsäure automatisch ersetzt wurde. Während der gesamten Speicherphase wurde die Konzentration an Lävulinsäure im Medium schrittweise durch manuelle Zugabe bis auf ca. 0,6 % (w/v) gesteigert, um den Lävulinsäure Überschuß und damit den Druck der Kohlenstoffquelle auf die Organismen kontinuierlich zu erhöhen.

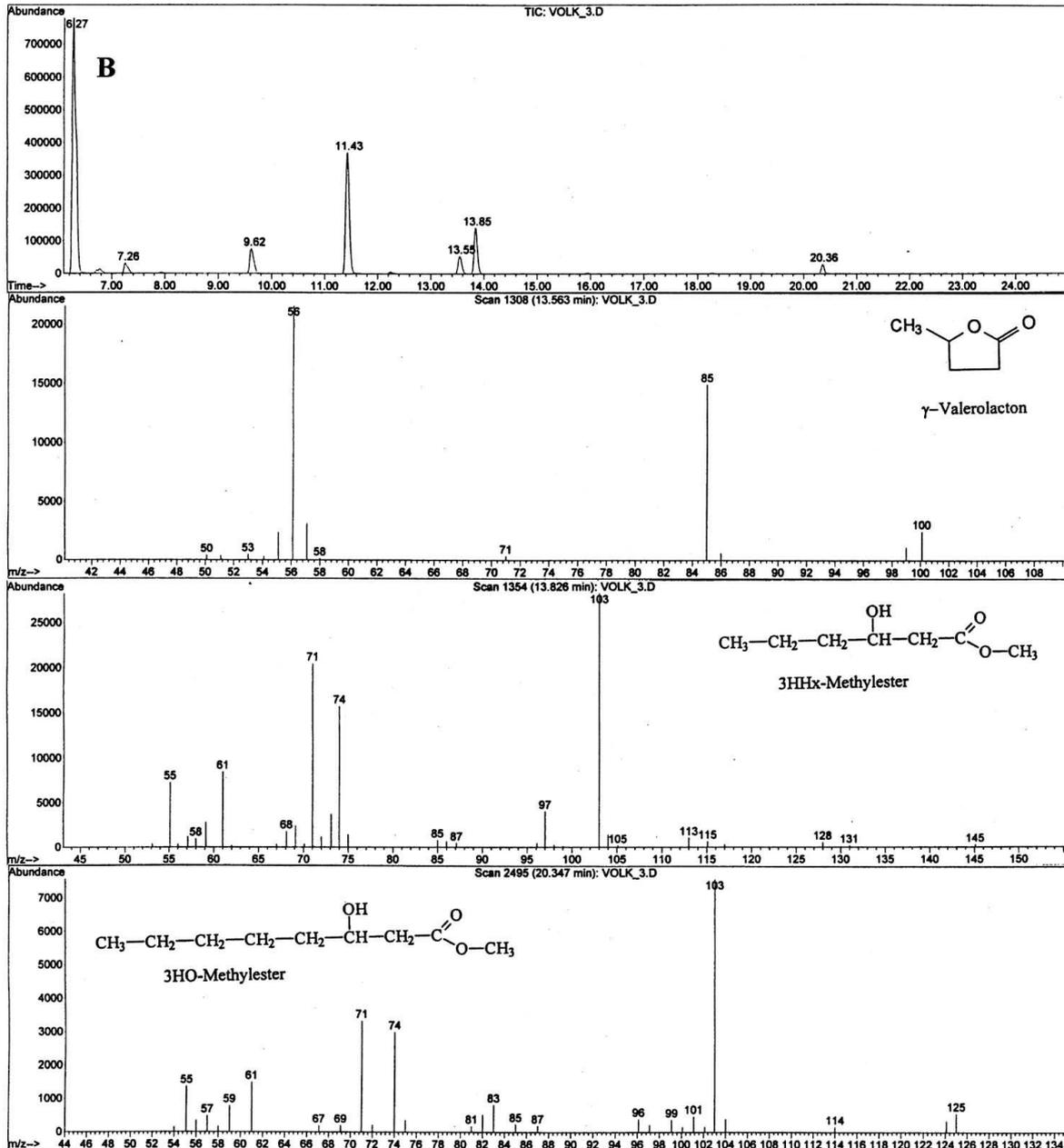
Die Trockenmassekonzentration im Fermenter stieg während der Wachstumsphase auf ca. 2 g/l an und blieb bis zum Ende der Kultivierung nahezu konstant. Der Polymeranteil an der Zelltrockenmasse erreichte am Ende der Kultivierung ca. 27 % (w/w), wobei die Organismen bereits in der Wachstumsphase mehr als die Hälfte des während der gesamten Kultivierung gebildeten Polyesters gespeichert hatten (Abb. 3 A). Der in der Wachstumsphase (0 bis 24 h) auf Octansäure gebildete Polyester enthielt die durch die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäure entstandenen Metabolite: 3-Hydroxyoctansäure (3HO), 3-Hydroxyhexansäure (3HHx) und 3-Hydroxybuttersäure (3HB) (Abb. 3 B). Mit Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle wurde in der Speicherphase (ab einer Kultivierungsdauer von 24 h) zusätzlich 4-Hydroxyvaleriansäure (4HV) und 3-Hydroxyvaleriansäure (3HV) in den Polyester eingebaut, wobei der Anteil des Polyesters an der Zelltrockenmasse bis zum Ende der Kultivierung auf 27 % (w/w) anstieg und der Anteil an 4HV 9,7 mol % betrug.



**Abb. 3: Zweistufige Fermentation von *P. putida* Gp104 (pHP1014::E156) mit Octansäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase.**

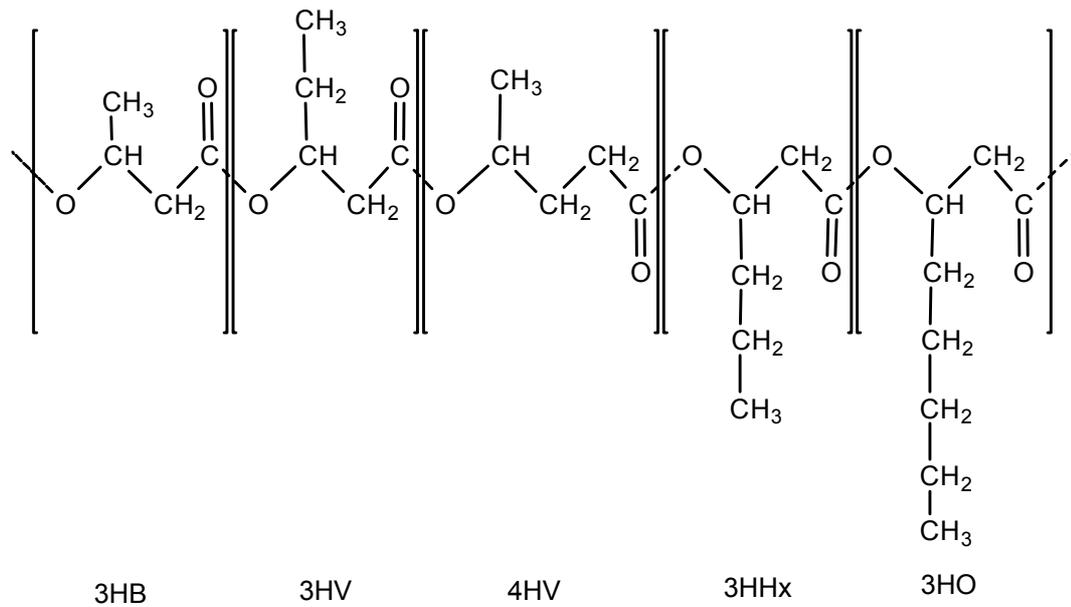
Der mit 14 l Mineralmedium (2.2.1) Octansäure (0,3 % w/v),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,13 % w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte 20-l Fermenter wurde mit 1 l einer auf Octansäure gewachsenen Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befand, angeimpft (2.4.1). Der Fermenter wurde mit 500 Umdrehungen pro Minute gerührt und mit 1 vvm Luft begast, der pH-Wert wurde während der Wachstumsphase (0 bis 24 h) auf pH 7,2 und während der Speicherphase (24 bis 164 h) auf pH 6,0, die Temperatur auf 30°C eingestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Beginn der Speicherphase an. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Analyse des Überstandes (2.5), zur Bestimmung der Trockenmasskonzentration, des PHF-Gehaltes sowie zur PHF-Zusammensetzung (2.8.1) entnommen. Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure; 3HHx, 3-Hydroxyhexansäure; 3HO, 3-Hydroxyoctansäure. **A)** Entwicklung der Konzentration an Zelltrockenmasse, deren Polymergehalt und der Konzentration an Lävulinsäure im Medium. **B)** Molare Zusammensetzung des während der Fermentation gebildeten Polyesters.





**Abb. 4:** GC/MS-Diagramm des durch saure Methanolyse veresterten Polyesters

Der Polyester wurde aus den Zellen extrahiert, zweimal gefällt (2.7) und nach saurer Methanolyse mittels GC/MS analysiert (2.8.1). Peak bei 6,3 min: Interner Standard (Heptansäure).  
 A) Gesamtchromatogramm und Massenspektren der Peaks bei 7,3; 9,6 und 11,5 Minuten.  
 B) Gesamtchromatogramm und Massenspektren der Peaks bei 13,6; 13,9 und 20,4 Minuten.

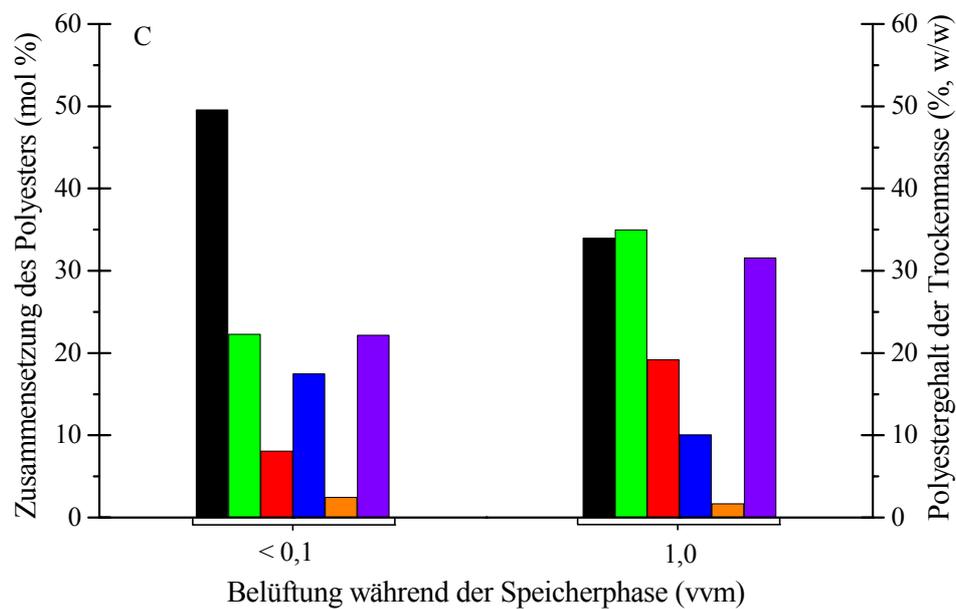
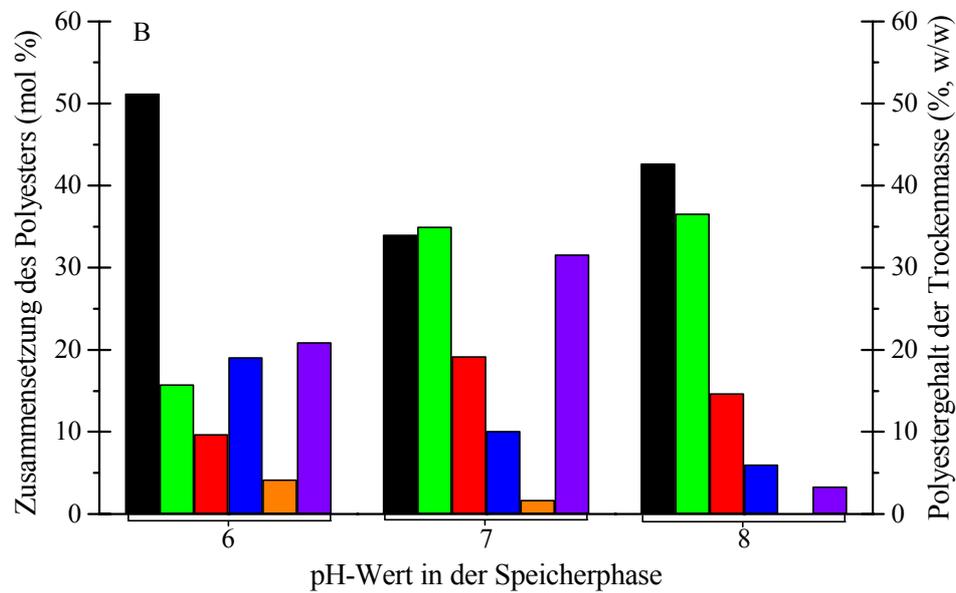
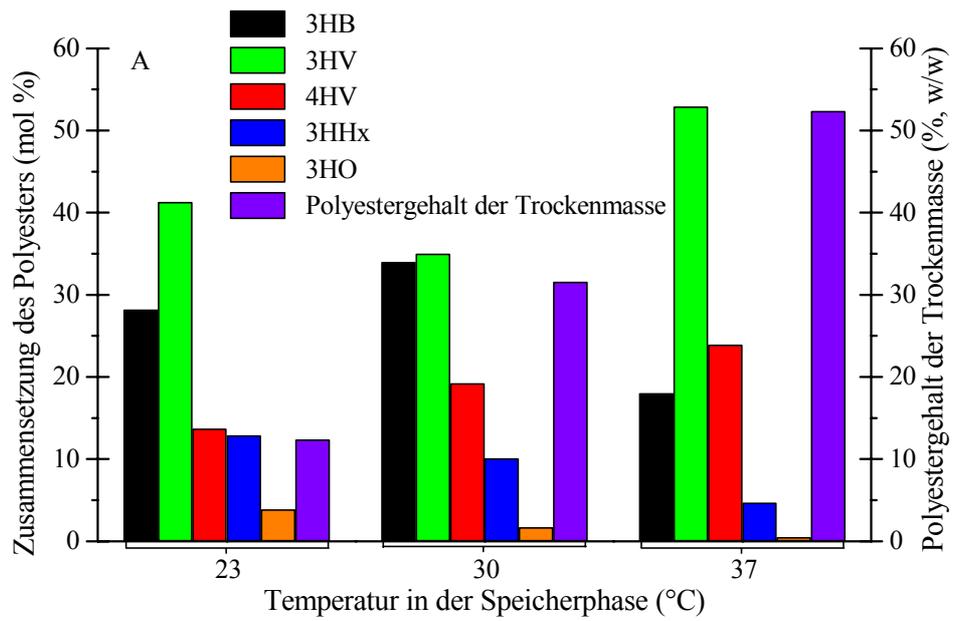


**Abb. 5:** Strukturformel des während einer Fermentation im 15 l-Maßstab mit Octansäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase von *P. putida* GPP104 (pHP1014::E156) akkumulierten Polyesters.

Der als Ergebnis akkumulierte Polyester wurde extrahiert, gefällt (2.7) und gaschromatographisch analysiert (2.8.1). Dabei ergab sich im einzelnen eine Zusammensetzung von 51,2 mol % 3HB; 15,8 mol % 3HV; 9,7 mol % 4HV; 19,1 mol % 3HHx und 4,2 mol % 3HO. Abb. 4 zeigt das Chromatogramm und die Massenspektren der mittels Gaschromatographie getrennten Methylester der einzelnen Polyesterbausteine. Die Strukturformel des so gebildeten Polyesters ist in Abb. 5 wiedergegeben.

### 3.1.4 Optimierung der Speicherbedingungen im Fermenter

Zur Optimierung der Bedingungen während der Speicherphase der zweistufigen Fed-Batch-Fermentationen im 15 l-Maßstab (2.4.4 und 3.1.3) wurden jeweils die Temperatur, der pH-Wert oder die Belüftung variiert (Abb. 6). Am Ende der Speicherphase (nach 140 h) wurde der akkumulierte Polyester extrahiert, gefällt (2.7) und einer gaschromatographischen Analyse unterworfen (2.8.1).



**Abb. 6: Polyestergehalt der Zellen und Zusammensetzung des extrahierten Polyesters nach der Fermentation von *P. putida* GPP104 (pHP1014::E156) im 15 l-Maßstab mit Octansäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase (vorherige Seite)**

Der mit 14 l Mineralmedium (MM, siehe 2.2.1), Octansäure (0,3 % ,w/v), NH<sub>4</sub>Cl (0,13 % ,w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte 20-l Fermenter wurde mit 1 l einer Octansäure-Vorkultur, angeimpft (2.4.1). Der Fermenter wurde mit 500 Umdrehungen pro Minute gerührt und mit 1 vvm Luft begast, der pH-Wert wurde während der Wachstumsphase (0-24 h) auf pH 7,2, die Temperatur auf 30°C eingestellt. Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure; 3HHx, 3-Hydroxyhexansäure; 3HO, 3-Hydroxyoctansäure. A) Speicherparameter: pH 7,0; Belüftung 1 vvm; Temperatur 23°C; 30°C; 37°C. B) Speicherparameter: Temperatur 30°C; Belüftung 1 vvm; pH 6,0; 7,0; 8,0. C) Speicherparameter: Temperatur 30°C; pH 7,0; Belüftung < 0,1 vvm; 1,0 vvm.

---

Zunächst wurde der Einfluß der Temperatur auf das Speicherverhalten der Bakterien untersucht. Hierzu wurden in getrennten Versuchen drei verschiedene Temperaturen (23°C, 30°C und 37°C) in der Speicherphase eingestellt, wobei der pH-Wert mittels automatischer Zugabe von Lävulinsäure auf pH 7,0 konstant gehalten wurde. Die Kultur wurde mit 1 vvm begast und mit 500 Umdrehungen pro Minute gerührt.

Bei einer Temperatur von 23°C während der Speicherphase betrug der Polymeranteil an der Zelltrockenmasse am Ende der Speicherphase 12 % (w/w), wobei 4HV mit einem molaren Anteil von 13 mol % zum Polyester beitrug. Bei einer Erhöhung der Temperatur nahm der Polymeranteil und der Anteil an 4HV zu, wohingegen der Anteil der Octansäureabbauprodukte 3HHx und 3HO abnahm. Bei einer Temperatur von 37°C in der Speicherphase stieg der Polymeranteil an der Zelltrockenmasse auf über 50 % (w/w) an, wobei der molare Anteil an 4HV auf 23 mol % anstieg (Abb. 6 A).

Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Speicherverhalten der Zellen wurden in getrennten Versuchen drei verschiedene pH-Werte in der Speicherphase eingestellt (6, 7 und 8) und mittels automatischer Zugabe von Lävulinsäure konstant gehalten. Die Temperatur betrug während dieser Experimente 30°C, wobei die Kultur mit 1 vvm begast und mit 500 Upm gerührt wurde. Der Polymeranteil an der Zelltrockenmasse war bei einem pH-Wert von 7,0 mit 31,6 % (w/w) am größten und nahm bei pH 8,0 um 90 % auf 3,0 % (w/w) ab. Gleichzeitig verringerte sich der molare Anteil von 4HV am Polymer von 18 mol % auf 14 mol %. Auch bei einer Erniedrigung des pH-Wertes von pH 7,0 auf 6,0 verringerte sich der Polymeranteil und der Anteil an 4HV gegenüber den Werten bei pH 7,0, jedoch mit einem resultierenden Polymeranteil von 21 % (w/w) nicht so stark wie bei einer Erhöhung des pH-Wertes auf pH 8,0. Der molare Anteil von 4HV nahm dabei auf 10 mol % ab (Abb. 6 B).

Eine Verminderung der Sauerstoffzufuhr durch die Reduzierung der Belüftung von 1 vvm auf unter 0,1 vvm führte zu einem Rückgang des Polyestergehaltes von 31,6 % (w/w)

auf 22,2 % (w/w) und zu einer deutlichen Reduktion des molaren Anteils von 4HV am Polyester von 19,2 mol % auf 8,1 mol % (Abb. 6 C).

### **3.1.5 Hochzellichtefermentationen mit *P. putida* GPP104 (pHP1014::E156) im 20 l-Maßstab**

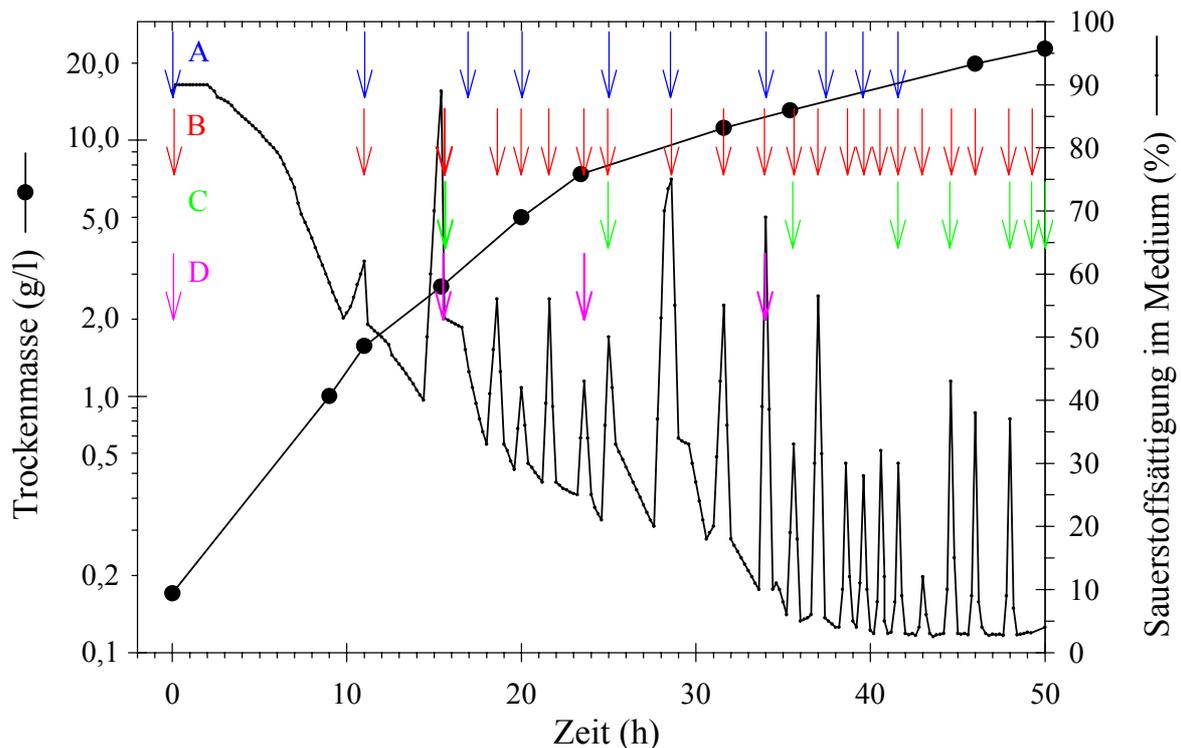
Aus den in den Speicherbedingungen optimierten Batch-Fermentationen (3.1.4) konnte Polymer im 10 g-Maßstab isoliert werden (maximal 30 g). Um die Trockenmassekonzentration während der Wachstumsphase und somit die Polymerausbeute zu erhöhen, wurden zweistufige Fed-Batch-Fermentationen im 20 l-Maßstab durchgeführt (2.4.3).

Diese Fermentationen unterscheiden sich von einfachen Batch-Fermentationen dadurch, daß während der Wachstumsphase verbrauchte Nährstoffe wie Stickstoff, Kohlenstoff oder Mineralstoffe und Spurenelemente durch sterile Zugabe ersetzt wurden. Nach einer Analyse des Kulturüberstandes (2.5) wurden die verbrauchten Nährstoffe so zugeführt, daß keine Limitierung des Wachstums durch Nährstoffmangel erfolgte.

Zunächst wurden Fermentationen mit manueller Zugabe der Nährstoffe durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurde diese Zugabe teilweise automatisiert.

#### **3.1.5.1 Nicht automatisierte Fed-Batch-Fermentationen mit Octansäure als Substrat in der Wachstumsphase**

Zur Verdeutlichung der Fermentationsführung nicht automatisierter Fed-Batch-Fermentationen ist in Abb. 7 der Verlauf des Zellwachstums und die Fütterungszeitpunkte während der Wachstumsphase einer nicht automatisierten Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* GPP104 (pHP1014::E156) im 20 l-Maßstab mit Octansäure als Kohlenstoffquelle dargestellt. Der mit 14 l Mineralmedium (2.2.1), Octansäure (0,15 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,15 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Octansäure gewachsenen Vorkultur, angeimpft. Der pH-Wert wurde während der Wachstumsphase auf pH 7,8 eingestellt, um den unerwünschten Einbau von Octansäureabbauprodukten möglichst gering zu halten (weitere Versuchsparameter siehe Abb. 7). In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Bestimmung des PHF-Gehaltes (2.8.1), zur Analyse des Überstandes (2.5) sowie zur Bestimmung der Trockenmassekonzentration entnommen.



**Abb. 7: Entwicklung der Zelltrockenmasse und der Sauerstoffkonzentration im Medium während der Wachstumsphase einer Kultivierung von *P. putida* Gp104 (pHP1014::E156) mit Octansäure als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von Polyhydroxyfettsäure.**

Der mit 14 l Mineralmedium (2.2.1); Octansäure (0,15 %, w/v); Ammoniumchlorid (0,15 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Octansäure gewachsenen Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befand, angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,8; Rührerdrehzahl, 500-700 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 1-1,5 vvm. Die Angabe der relativen Sauerstoffsättigung bezieht sich auf % Luftsättigung. Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Nährstoffzugaben an. A, Ammoniumchlorid (blaue Pfeile); B, Octansäure (rote Pfeile); C, Lävulinsäure (grüne Pfeile); D, Mineralstoffe (Eisen, Magnesium) und Spurenelemente (SL6) (violette Pfeile).

Während der Wachstumsphase wurden insgesamt 540 g Octansäure in Portionen von 25 g, 200 g Ammoniumchlorid in Portionen von 20 g, 120 g Lävulinsäure in Portionen von 15 g und Mineralstoffe und Spurenelemente in jeweils doppelter Konzentration wie unter 2.2.1 beschrieben zugegeben. Die Pfeile in Abb. 7 markieren jeweils den Zeitpunkt einer entsprechenden Zugabe. Phosphat mußte bei diesen Fermentationen nicht zugegeben werden, da das verwendete Mineralmedium ein durch Phosphat gepuffertes System darstellt und diese Komponente in großem Überschuß enthält, wie HPLC-Analysen des Kulturüberstandes während der Fermentationen zeigten.

Vor und nach jeder Zugabe von Nährstoffen wurde der Kulturüberstand analysiert und die Octansäure-, Lävulinsäure- und Ammoniumkonzentration bestimmt. Bei dem Verbrauch einer dieser drei Substanzen wurde sie durch entsprechendes manuelles

Nachdosieren ersetzt, wobei die Fermentation so durchgeführt wurde, daß die Ammoniumchloridkonzentration im Medium nie unter 0,05 % (w/v) lag. Dadurch wurde eine Stickstoffmangelsituation und eine damit verbundene erhöhte Speicherung von unerwünschten Octansäureabbauprodukten während der Wachstumsphase verhindert.

Die logarithmische Auftragung des Verlaufs der Zelltrockenmasse während der Fermentation läßt zwei Bereiche unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeit erkennen: Einen Bereich mit exponentiellem Wachstum bis zu einer Kultivierungszeit von 24 h und einen zweiten anschließenden Bereich mit verlangsamtem exponentiellen Wachstum von 24 bis 51 h (Abb. 7). Während der gesamten Wachstumsphase nahm die Trockenmassekonzentration von 0,2 g/l bis auf 23 g/l zu.

Zu Beginn der Wachstumsphase betrug die Sauerstoffsättigung im Medium etwa 90 % bezogen auf Luftsättigung (100 %). Sie nahm während der ersten 10 h der Kultivierung bis auf 53 % ab und stieg daraufhin innerhalb von 1 h auf 62 % an (Abb. 7). Nach der dann erfolgten Zugabe von 30 g Octansäure nahm die Sauerstoffkonzentration rasch auf 52 % ab und fiel in den folgenden 3 h bis auf 40 % ab. Anschließend stieg die Sauerstoffkonzentration innerhalb von 1 h sehr steil auf 89 % an. Die Analyse des Kulturüberstandes ergab, daß jeweils bei einem Anstieg der Sauerstoffkonzentration im Medium die Octansäure fast vollständig verbraucht war, woraufhin jedesmal Octansäure nachdosiert wurde und daraufhin die Sauerstoffkonzentration im Medium rasch abnahm. Diese Korrelation von Sauerstoffkonzentration und Octansäurekonzentration im Medium wurde bis zum Ende der Wachstumsphase nach 50 h beobachtet.

### **3.1.5.2 Automatisierung der Fed-Batch-Fermentation mit Octansäure als Substrat in der Wachstumsphase**

Im folgenden wurde ein teilweise automatisierter Fed-Batch-Prozeß entwickelt. Idee der Entwicklung war eine automatische, sauerstoffkonzentrationsabhängige Zugabe von Octansäure in kleinen Portionen, wodurch der Arbeitsaufwand während der Wachstumsphase verringert werden sollte. Grundlage für diese Entwicklung war die beobachtete Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung im Medium von der Konzentration der Octansäure im Medium (3.1.5.1, Abb. 7).

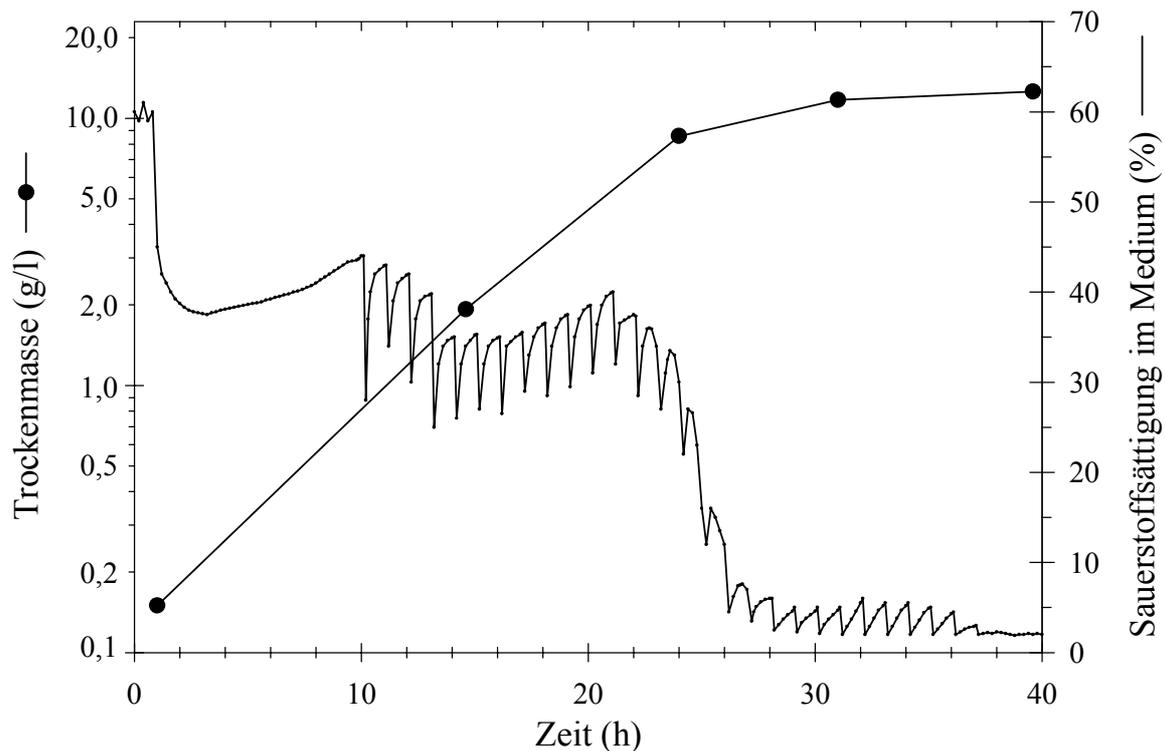
Die mit Hilfe einer Elektrode gemessene Konzentration an Gelöstsauerstoff im Medium wurde verwendet, um jeweils bei einem Anstieg der Sauerstoffkonzentration mittels einer Schlauchpumpe Octansäure aus einer 30 %igen (w/v) Substratvorlage nachzuliefern. Dabei wurde die Octansäure in Portionen von jeweils 15 g zugegeben, so daß die Octansäurekonzentration im Medium maximal 0,1 % (w/v) betrug. Durch diese Feindosierung

sollte ein Überschuß an Kohlenstoffquelle und damit der unerwünschte Einbau von Octansäureabbauprodukten in den Polyester minimiert werden. Um auch den verbrauchten Stickstoff zu ersetzen, wurde der Octansäurevorlage 67 g/l Ammoniumchlorid zugegeben. Wie aus vorangegangenen Kultivierungen bekannt war, wurde dadurch jedoch nicht der gesamte Stickstoffverbrauch ausgeglichen, so daß in Abständen von ca. 4 bis 5 h die Ammoniumkonzentration im Medium bestimmt und Ammoniumchlorid gegebenenfalls in geringen Mengen manuell nachdosiert werden mußte. Durch die geringe Stickstoffmenge in der Octansäurevorlage sollte ein zu starkes Ansteigen der Ammoniumkonzentration im Medium und eine damit verbundene Wachstumshemmung der Bakterien vermieden werden. Um auch einen Ausgleich der Mineralstoffe und Spurenelemente zu gewährleisten, wurden diese ebenfalls der Octansäurevorlage zugefügt. Der pH-Wert der Vorlage wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

Zur Steuerung der Schlauchpumpe in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration im Medium wurde das Fermentationssteuerprogramm im PASCAL-Modus modifiziert (Anhang, Kapitel 7). Das Programm ermöglicht dem Benutzer jederzeit die Ansteuerungszeit der Pumpe und damit die pro Ereignis zugegebene Substratmenge und den Wert für die minimale Änderung der Sauerstoffkonzentration im Medium, die einen Pumpvorgang auslösen soll, zu verändern.

Der mit 14 l Mineralmedium (2.2.1), Octansäure (0,15 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,15 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Octansäure gewachsenen Vorkultur, angeimpft. Der pH-Wert wurde während der Wachstumsphase wiederum auf pH 7,8 eingestellt, um den unerwünschten Einbau von Octansäureabbauprodukten möglichst gering zu halten. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Bestimmung des PHF-Gehaltes und der Zusammensetzung (2.8), zur Analyse des Überstandes (2.5) sowie zur Bestimmung der Trockenmassekonzentration entnommen.

Abb. 8 zeigt den Verlauf der relativen Sauerstoffsättigung im Medium bezogen auf % Luftsättigung, sowie die Konzentration an Trockenmasse während einer automatisierten Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* Gpp104 (pHP1014::E156) mit Octansäure als Kohlenstoffquelle in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase.



**Abb. 8:** Entwicklung der Zelltrockenmasse und der Sauerstoffkonzentration im Medium während der Wachstumsphase einer automatisierten Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) mit Octansäure als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von Polyhydroxyfettsäure.

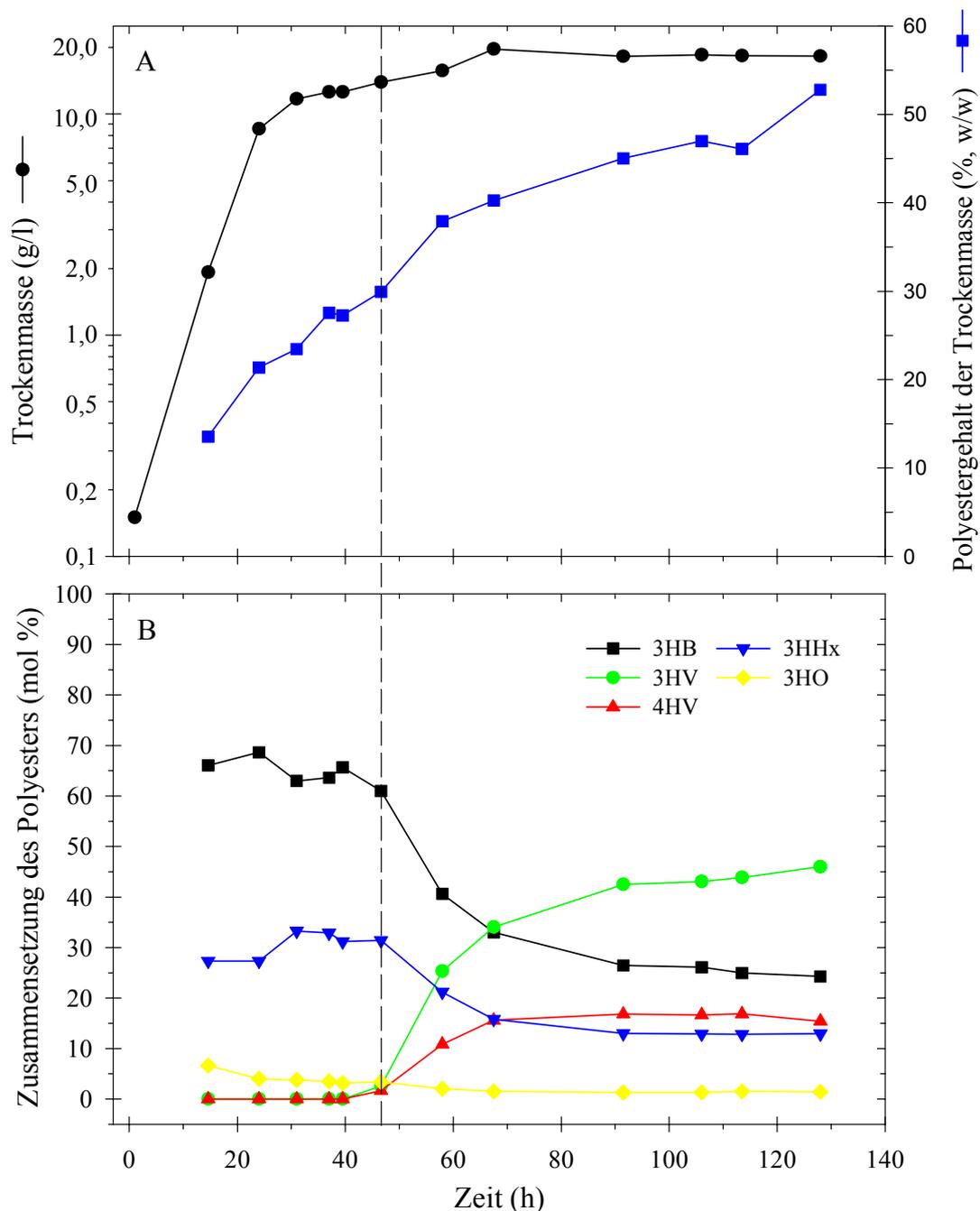
Der mit 14 l Mineralmedium (2.2.1), Octansäure (0,15 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,15 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Octansäure gewachsenen Vorkultur angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,8; Rührerdrehzahl, 500 bis 700 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 1-1,5 vvm. Speicherparameter: Temperatur, 35°C; pH-Wert, 7,1; Rührerdrehzahl, 500 Umdrehungen pro Minute, Begasungsrate, 0,75 vvm. Die Angabe der relativen Sauerstoffsättigung bezieht sich auf % Luftsättigung.

Man erkennt nach einer kurzen lag-Phase von etwa 1 h ein starkes Abfallen der Sauerstoffsättigung im Medium, das mit dem beginnenden exponentiellen Wachstum zusammenfällt. Nach etwa 3 h beginnt die Sauerstoffsättigung wieder leicht anzusteigen. Dies deutet darauf hin, daß bestimmte Nährstoffe durch die Bakterien verbraucht wurden, wodurch die Stoffwechselaktivität der Zellen langsam abnahm. Nach etwa 10 h wurde aufgrund des stärker werdenden Anstiegs der Sauerstoffsättigung zum ersten Mal automatisch Octansäure, Ammoniumchlorid, Mineralstoffe und Spurenelemente zudosiert. Nahezu augenblicklich sank die Sauerstoffsättigung von 45 % auf 28 % steil ab. Nach kurzer Zeit stieg die Sauerstoffsättigung wieder auf etwa 43 % an, bis nach etwa einer Stunde erneut automatisch Nährstoffe zudosiert wurden und die Sauerstoffsättigung abnahm. Dieser Vorgang wiederholte sich etwa einmal pro Stunde, bis nach einer Kultivierungszeit von 38 h die Nährstoffpumpe abgeschaltet wurde und die Speicherphase begann. Dabei pendelte die

relative Sauerstoffsättigung in der Zeit von 10 bis 24 h zwischen 25 und 43 % Luftsättigung und fiel trotz einer Erhöhung der Rührerdrehzahl (auf 700 Upm) und der Begasungsrate (auf 1,5 vvm) anschließend auf Werte zwischen 3 und 5 % Sättigung ab.

Die Konzentration der Trockenmasse nahm in den ersten 24 h exponentiell mit gleichbleibender Wachstumsrate von 0,15 g/l auf 8,6 g/l zu. Nach 24 h verringerte sich die Wachstumsrate, wobei die Trockenmassekonzentration bis zum Ende der Wachstumsphase auf 12,6 g/l anstieg. Diese Abnahme der Wachstumsrate der Bakterien fiel mit der Abnahme der mittleren Sauerstoffsättigung im Medium zusammen.

Die Trockenmassekonzentration nahm während der Wachstumsphase exponentiell von 0,15 g/l auf 12,6 g/l zu und stieg während der Speicherphase auf etwa 20 g/l an (Abb. 9 A). Ein Ende des Zellwachstums wurde dadurch herbeigeführt, daß keine Octansäure und kein Ammoniumchlorid mehr zugegeben wurde. Da sich ein pH-Wert von 7,0 und eine Temperaturerhöhung in Vorversuchen positiv auf das Speicherverhalten ausgewirkt hat (3.1.4), wurde zu Beginn der Speicherphase (nach 46 h) die Temperatur auf 35°C erhöht und der pH-Wert von pH 7,8 auf pH 7,0 abgesenkt. Der Polymeranteil an der Zelltrockenmasse stieg bis zum Ende der Kultivierung nach 128 h bis auf 52 % (w/w) an. Bereits während der Wachstumsphase speicherten die Zellen einen Polyester, der sich aus den durch die  $\beta$ -Oxidation der Octansäure entstandenen Metaboliten 3-Hydroxyoctansäure (3HO), 3-Hydroxyhexansäure (3HHx) und 3-Hydroxybuttersäure (3HB) zusammensetzte (Abb. 9 B). Der Anteil des Polyesters an der Zelltrockenmasse betrug am Ende der Wachstumsphase (nach 46 h) bereits 30,0 % (w/w). Daraus resultierten starke Veränderungen in der molaren Zusammensetzung des gespeicherten Polyesters, nachdem zu Beginn der Speicherphase (nach 46 h) Lävulinsäure zugegeben und die Komponenten 3HV und 4HV mit in den Polyester integriert wurden (Abb. 9 B). Ab einer Kultivierungszeit von 90 h änderte sich die Zusammensetzung des akkumulierten Polyesters nur noch geringfügig. Am Ende der Kultivierung (nach 128 h Kultivierungszeit) betrug der Polymeranteil an der Zelltrockenmasse über 50 % (w/w), wobei der molare Anteil von 4HV bei 15,4 % lag. Nach der Extraktion und Reinigung des Polyesters durch mehrmaliges Fällern (2.7) konnten 111 g reinen Polyesters mit einer molaren Zusammensetzung von 24,3 % 3HB; 46,0 % 3HV; 15,4 % 4HV; 12,9 % 3HHx und 1,4 % 3HO gewonnen werden.



**Abb. 9:** Verlauf einer automatisierten Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* GpP104 (pHP1014::E156) mit Octansäure als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von Polyhydroxyfettsäuren.

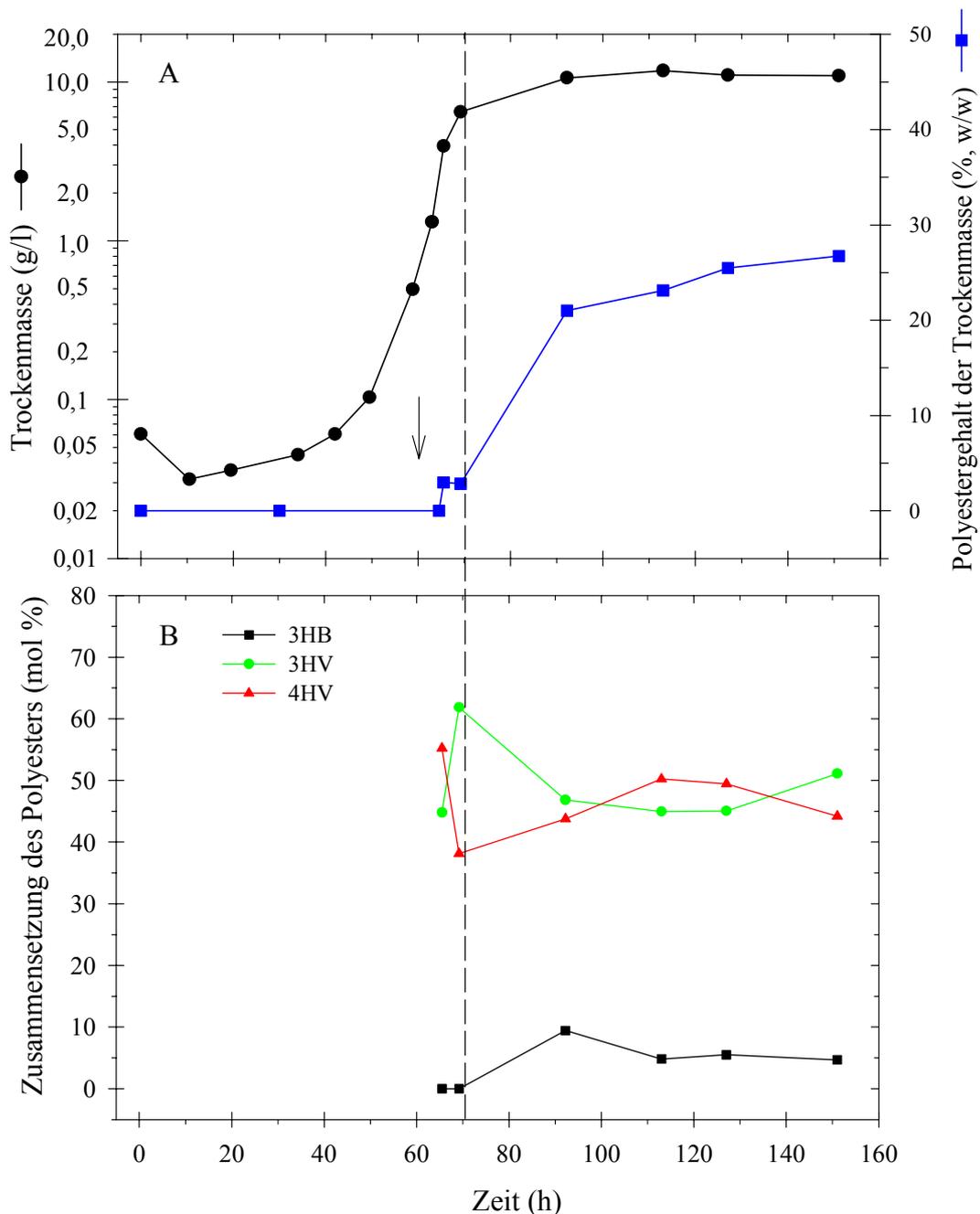
Der mit 141 Mineralmedium (2.2.1), Octansäure (0,15 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,15 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Octansäure gewachsenen Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befand, angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,8; Rührerdrehzahl, 500-700 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 1-1,5 vvm. Speicherparameter: Temperatur, 35°C; pH-Wert, 7,1; Rührerdrehzahl, 500 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 0,75 vvm. Der Beginn der Speicherbedingungen ab 46 h wird durch eine gestrichelte Linie angezeigt. Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure; 3HHx, 3-Hydroxyhexansäure; 3HO, 3-Hydroxyoctansäure. **A)** Entwicklung der Trockenmassekonzentration und des Polyestergehaltes. **B)** Molare Zusammensetzung des akkumulierten Polyesters.

### 3.1.5.3 Kultivierungen mit Gluconsäure als Substrat in der Wachstumsphase

Die Gaschromatographische Analyse der Zellen von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156), die in einstufigen Speicherversuchen (2.4.2) mit Gluconsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle angezogen wurden, ergab keinen nachweisbaren Einbau von PHF in die Zellen. Somit schien Gluconsäure ein ideales Substrat für die Wachstumsphase der Zellen zu sein, um PHF-freie Zellen herzustellen, die dann in der Lage sein sollten, während der Speicherphase auf Lävulinsäure einen Polyester zu akkumulieren, der einen höheren Anteil an 4HV aufweisen müßte.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde eine zweistufige Fed-Batch-Fermentation im 20 l-Maßstab von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) mit Gluconsäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase durchgeführt. Der mit 17 l Mineralmedium (2.2.1), Gluconsäure (1,0 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Gluconsäure gewachsenen Vorkultur, angeimpft. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Bestimmung des PHF-Gehaltes und der Zusammensetzung (2.8), zur Analyse des Überstandes (2.5) sowie zur Bestimmung der Trockenmassekonzentration entnommen. Als Substratvorlage während der Wachstumsphase diente Gluconsäure, deren pH-Wert durch Zugabe von Ammoniaklösung (32 %, w/v) auf pH 7,0 eingestellt war. Anschließend wurde durch Zugabe von Na-Gluconat und Wasser eine Gluconsäure-Endkonzentration von 50 % (w/v) und eine Ammonium-Endkonzentration von 1,35 % (w/v) eingestellt (2.3.3). Durch die Verwendung von Ammoniaklösung anstelle von NaOH zur Neutralisation der Gluconsäure wurde der Anstieg des Salzgehaltes im Fermenter während der Wachstumsphase vermindert und somit einer Hemmung des Zellwachstums durch eine zu hohe Salzkonzentration im Medium vorgebeugt.

Die Trockenmassekonzentration nahm nach einer lag-Phase von etwa 35 h während der Wachstumsphase exponentiell von 0,06 g/l auf 8 g/l zu und stieg während der Speicherphase auf 11 g/l an (Abb. 10 A). Ein Ende des Zellwachstums nach etwa 70 h wurde dadurch herbeigeführt, daß kein Ammoniumchlorid mehr zugegeben wurde. Zu Beginn der Speicherphase wurde die Temperatur auf 35°C erhöht und der pH-Wert auf pH 7,0 abgesenkt, da sich ein pH-Wert von 7,0 und eine Temperaturerhöhung in Vorversuchen positiv auf das Speicherverhalten ausgewirkt hatte (3.1.4). In den ersten 65 h wurde kein Polyester durch die Zellen akkumuliert. Um die Enzyme für den Lävulinsäure Abbau zu induzieren, wurde bereits nach 60 h Kultivierungszeit Lävulinsäure in einer geringen Konzentration (0,1 %, w/v) zugegeben (siehe Pfeil, Abb. 10A). Fünf Stunden nach der Zugabe von Lävulinsäure konnte Polyester, der sich aus etwa 45 mol % 4HV und 55 mol % 3HV zusammensetzte, in den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10 B).



**Abb. 10:** Verlauf einer automatisierten Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) mit Gluconsäure als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von Polyhydroxyfettsäure.

Der mit 171 Mineralmedium (2.2.1); Gluconsäure (1,0 %, w/v); Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Gluconsäure gewachsenen Vorkultur, angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,8; Rührerdrehzahl, 500-700 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 1 bis 1,5 vvm. Nach 70 h wurde eine Temperatur von 35°C, ein pH-Wert von 7,0, eine Rührerdrehzahl von 500 Umdrehungen pro Minute und eine Begasungsrate von 0,75 vvm eingestellt (gestrichelte Linie). Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der ersten Lävulinsäurezugabe nach 60 h. Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure. **A)** Entwicklung der Trockenmassekonzentration und des Polyestergehaltes. **B)** Molare Zusammensetzung des akkumulierten Polyesters während der Speicherphase.

Zu Beginn der Speicherphase (in den ersten 20 h) stieg der Polymergehalt der Zelltrockenmasse steil bis auf 21 % (w/w) an und nahm bis zum Ende der Kultivierung (nach 151 h) auf 26 % (w/w) zu. Am Ende der Fermentation konnten 151 g Zelltrockenmasse mit einem Polyestergehalt von 26 % (w/w) gewonnen werden. Das Polymer bestand zum Zeitpunkt der Zellernte aus 4,7 mol % 3HB; 51,1 mol % 3HV und 44,2 mol % 4HV.

Durch die Verwendung von Gluconsäure als Kohlenstoffquelle während der Wachstumsphase war es somit gelungen, die Anzahl der in den Polyester integrierten Bausteine auf drei Komponenten zu reduzieren. Der Polyesterbaustein 3HB trug nur zu einem geringen Anteil von etwa 5 mol % zum Polyester bei.

Während der gesamten Fermentation wurden 400 g Lävulinsäure von den Zellen umgesetzt, wobei die Menge an Polymer am Ende der Fermentation 39,3 g betrug. Dieses Mißverhältnis von eingesetzter Lävulinsäure zu akkumuliertem Polyester deutet darauf hin, daß die Bakterien die Lävulinsäure, die während der Speicherphase als einzige Kohlenstoffquelle zugegeben wurde, nicht nur in den Polyester integrierten, sondern auch als Energiequelle benutzten, um ihren Zellstoffwechsel aufrechtzuerhalten oder zu anderen Metaboliten verstoffwechselten.

Der Stamm *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) akkumulierte in Speicherversuchen mit Glucose oder Gluconsäure als Kohlenstoffquelle während der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase einen Polyester, der ebenfalls die drei Bausteine 3HB, 3HV und 4HV enthielt. Bei diesen Versuchen wurde wie bei *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) keine nennenswerte Akkumulation von Polyester während des Wachstums auf Gluconsäure oder Glucose beobachtet, jedoch zeigte der Stamm *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) ein wesentlich verbessertes Wachstumsverhalten, das sich insbesondere in einer deutlichen Verkürzung der lag-Phase bemerkbar machte, so daß einige Versuche auch mit diesem Stamm durchgeführt wurden. Ein Vergleich des Speicherverhaltens der beiden Stämme ist in Kapitel 3.1.5.4, Tabelle 8 dargestellt.

In zweistufigen Umsetzversuchen mit *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) im Erlenmeyerkolben (2.4.2) mit Gluconsäure als Kohlenstoffquelle während der Wachstumsphase und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Akkumulation von PHF wurde untersucht, ob sich eine Zugabe von Glucose als Co-Substrat neben Lävulinsäure während der Speicherphase eignete, um die Effektivität der Umsetzung von Lävulinsäure in 4HV-haltige Polyester zu erhöhen. Die Zellen wurden zunächst in 50 ml MM mit Gluconsäure (0,5 %, w/v) angezogen, steril geerntet, und jeweils zur Hälfte in 50 ml MM resuspendiert. Während der folgenden 72-stündigen Speicherphase wurden 3 x 0,3 % (w/v) Lävulinsäure

zugegeben, wobei eine der beiden Kulturen insgesamt 1,6 % (w/v) Glucose zugesetzt wurde. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Analyse des Überstandes entnommen (2.5).

**Tabelle 6: Polyesterakkumulation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) im zweistufigen Speicherversuch mit Gluconsäure als Wachstumssubstrat und Lävulinsäure als Speichersubstrat.**

Kohlenstoffquelle	PHF-Gehalt (% TM)	Zusammensetzung des Polyesters (mol %)		
		3HB	3HV	4HV
Lävulinsäure	31,6	3,3	64,7	32,0
Lävulinsäure + Glucose	50,8	1,6	70,6	27,8

Die Kultivierungen wurden im 50 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben bei 30°C und 150 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Nach Wachstum auf Gluconsäure (0,5 %, w/v) wurden die Zellen steril geerntet, und in MM (2.2.1) resuspendiert. Während der 72-stündigen Speicherphase wurden insgesamt 0,9 % (w/v) Lävulinsäure zugegeben (3 x 0,3 %, w/v), bei dem Versuch mit Co-Substrat zusätzlich 1,6 % (w/v) Glucose (0,3 + 0,3 + 1,0 %, w/v). Abkürzungen: PHF, Polyhydroxyfettsäure; TM, Trockenmasse; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure.

Wie man in Tabelle 6 erkennt, war der Polymeranteil an der Zelltrockenmasse bei der Kultivierung mit Glucose als Co-Substrat in der Speicherphase mit 50,8 % (w/w) deutlich erhöht gegenüber der Kultivierung ohne Co-Substrat, bei der die Zellen einen Polymeranteil von 31,6 % (w/w) aufwiesen. Die Zusammensetzung des Polyesters variierte geringfügig, wobei der 4HV-Anteil bei der Kultivierung ohne Glucose mit 32 mol % leicht erhöht war, gegenüber einem 4HV-Anteil von 27,8 mol % der Zellen, die in Gegenwart von Glucose kultiviert wurden. Dafür lag der 3HV-Anteil dieser Zellen um 5,9 mol % höher und der 3HB-Anteil um 1,7 mol % niedriger, als bei den Zellen, die ohne Co-Substrat kultiviert wurden. Der deutlich erhöhte PHF-Gehalt der Zellen, die zusätzlich mit Glucose in der Speicherphase kultiviert wurden, deutet auch darauf hin, daß die Zugabe eines Co-Substrates während der Speicherphase den Polymergehalt der Zellen erhöht und damit auch die Effektivität der Umsetzung von Lävulinsäure in Polymer. Eine Bilanzierung der PHF-Akkumulation der Bakterien bezogen auf den Verbrauch von Lävulinsäure zeigte eine deutliche Steigerung der Transformation von Lävulinsäure in PHF (Tabelle 7). Die Kultivierung wurde so durchgeführt, daß Lävulinsäure immer im Überschuß im Medium vorhanden war.

**Tabelle 7: Bilanzierung der Polyesterakkumulation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) im zweistufigen Speicherversuch mit Gluconsäure als Wachstumssubstrat und Lävulinsäure als Speichersubstrat.**

Kohlenstoffquelle Speicherphase	Akkumulierte PHF (mg)	Lävulinsäure - Verbrauch (mg)	Akkumulierte PHF pro Lävulinsäure (%)
Lävulinsäure	12,7	75,0	16,9
Lävulinsäure + Glucose	25,9	95,0	27,3

Die Kultivierungen wurden im 50 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben bei 30°C und 150 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Nach Wachstum auf Gluconsäure (0,5 %, w/v) wurden die Zellen steril geerntet, und in MM (2.2.1) resuspendiert. Während der 72-stündigen Speicherphase wurden insgesamt 0,9 % (w/v) Lävulinsäure zugegeben (3 x 0,3 %, w/v), bei dem Versuch mit Co-Substrat zusätzlich 1,6 % (w/v) Glucose (0,3 + 0,3 + 1,0 %, w/v). Abkürzungen: PHF, Polyhydroxyfettsäure.

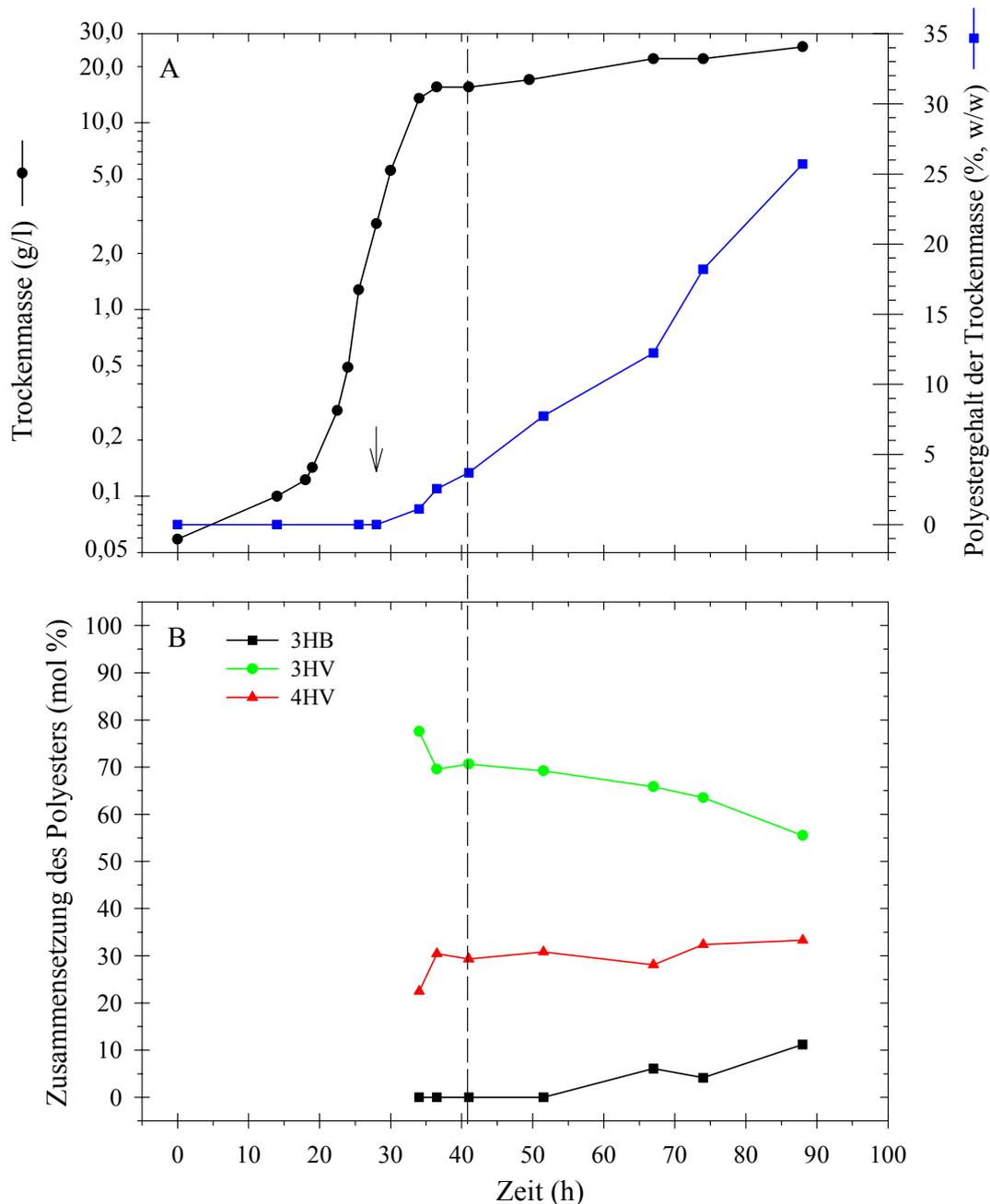
Die Gesamtmenge der durch die Bakterien gebildeten Polyhydroxyfettsäuren war bei Kultivierung mit Co-Substrat in der Speicherphase etwa doppelt so groß, wie bei Kultivierung ohne Co-Substrat. Die Umsetzung von Lävulinsäure in Polymer war trotz einer Steigerung des Lävulinsäureverbrauchs bei Kultivierung mit Co-Substrat mit 27,3 % deutlich höher als bei Kultivierung ohne Co-Substrat (16,9 %). Bei der Bilanzierung konnte man davon ausgehen, daß das gesamte akkumulierte Polymer aus Lävulinsäure gebildet wurde, da einstufige Speicherversuche und Fermentationen im 20 l-Maßstab mit *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) keine Akkumulation von PHF ausgehend von Glucose oder Gluconsäure ergeben hatten.

In einer Fermentation im 20 l-Maßstab wurde die im Vergleich zu Lävulinsäure kostengünstige Gluconsäure als Substrat in der Wachstumsphase und als Co-Substrat während der Speicherphase eingesetzt. Gluconsäure eignet sich sehr gut als Co-Substrat, da sie für den hier verwendeten Organismus keine Vorstufen für den Einbau in Polyhydroxyfettsäuren liefert (Abb. 10 A). Nachteilig an der oben beschriebenen Fermentation mit Gluconsäure war eine ungewöhnlich lange lag-Phase von etwa 35 h (Abb. 10 A). Dies führte zu einer wesentlichen Verlängerung der Fermentationsdauer gegenüber Fermentationen mit Octansäure, bei denen nur eine kurze lag-Phase zu beobachten war (Abb. 9). Vergleichende Wachstumsversuche mit *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) auf Gluconsäure und Octansäure (3.1.2) zeigten ebenfalls ungewöhnlich lange lag-Phasen von etwa 30 h bei Wachstum auf Gluconsäure und etwa 10 Stunden bei Wachstum auf Octansäure (Abb. 2 B). Die hierbei verwendeten Zellen stammten aus einer NB-Vorkultur, wohingegen die Zellen der Octansäurefermentation im 20 l-Maßstab, bei der keine ausgeprägte lag-Phase zu beobachten war, aus einer Octansäure-Vorkultur stammten.

Um die bei Fermentationen mit Gluconsäure beobachtete ungewöhnlich lange lag-Phase zu verkürzen, wurden die Zellen in allen Stufen der Vorkulturen mit Gluconsäure

als alleiniger Kohlenstoffquelle kultiviert. Dabei benötigten die Bakterien zum Wachstum auf der Agarplatte (erste Stufe) 72 h, in der nächsten Stufe der Vorkultur (10 ml MM-Medium mit 0,5 %, w/v Gluconsäure) 36 bis 48 h und in den beiden weiteren Stufen (100 ml und 2 x 500 ml) 24 h, um in die späte exponentielle Phase zu gelangen. Für die Kultivierung von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) mit Gluconsäure als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum wurde ein mit 17 l Mineralmedium (2.2.1), Gluconsäure (1,0 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllter Fermenter mit 1 l der letzten Gluconsäure-Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befand, angeimpft. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Bestimmung des PHF-Gehaltes und der PHF-Zusammensetzung (2.8), zur Analyse des Überstandes (2.5) sowie zur Bestimmung der Trockenmassekonzentration entnommen. Als Substratvorlage während der Wachstumsphase diente Gluconsäure, deren pH-Wert durch Zugabe von Ammoniaklösung (32 %, w/v) auf pH 7,0 eingestellt war, so daß die Ammonium Endkonzentration 1,35 % (w/v) betrug. Anschließend wurde durch Zugabe von Na-Gluconat und Wasser eine Gluconsäure Endkonzentration von 40 % (w/v) eingestellt (2.3.3). Während der Speicherphase wurde eine Substratvorlage mit Lävulinsäure (250 g/l) und Gluconsäure (250 g/l) verwendet, um gleichzeitig den pH-Wert auf 7,0 einzustellen und die von den Zellen verstoffwechselten Substrate automatisch zu ersetzen.

Die Trockenmassekonzentration nahm nach einer lag-Phase von 18 h während der anschließenden Wachstumsphase exponentiell von 0,12 g/l auf 16 g/l zu und stieg während der Speicherphase auf 26 g/l an (Abb. 11A). Ein Ende des Zellwachstums wurde durch den Verzicht einer weiteren Zugabe von Ammoniumchlorid nach 37 h herbeigeführt. Durch den Einsatz von Gluconsäure als Kohlenstoffquelle in allen Vorkulturen halbierte sich die lag-Phase gegenüber der vorherigen Kultivierung, bei der nur die letzte Vorkultur mit Gluconsäure als Kohlenstoffquelle kultiviert wurde (lag-Phase ca. 35 h, Abb. 10A). Zu Beginn der Speicherphase (nach 41 h) wurde die Temperatur auf 35°C erhöht, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, daß sich eine solche Temperaturerhöhung positiv auf das Speicherverhalten auswirkt (3.1.4). Wie auch in der vorherigen Kultivierung wurde während der Wachstumsphase kein Polyester durch die Zellen akkumuliert. Erst nach Zugabe von Lävulinsäure (0,1 %, w/v), von 27 h an, begann die Akkumulation von Polyester. In den letzten 14 h der Fermentation stieg der Polymeranteil an der Zelltrockenmasse von 18,2 auf 25,7 % (w/w) an. Zu Beginn der Speicherphase (nach 41 h Kultivierungszeit) setzte sich der akkumulierte Polyester aus ca. 70 mol % 3HV und 30 mol % 4HV zusammen (Abb. 11B). Nach 51 h wurde zusätzlich 3HB in den Polyester integriert, wobei der Anteil an 3HV abnahm und der Anteil an 4HV in etwa konstant blieb. Am Ende der Fermentation (nach 88 h) bestand der Polyester aus 11,2 mol % 3HB; 55,5 mol % 3HV und 33,3 mol % 4HV.



**Abb. 11: Verlauf einer automatisierten Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* Gp104 (pHP1014::E156) mit Gluconsäure als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von Polyhydroxyfettsäure mit Gluconsäure als Co-Substrat.**

Der mit 17 l Mineralmedium (2.2.1); Gluconsäure (1,0 %, w/v); Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer Gluconsäure-Vorkultur angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,0; Rührerdrehzahl, 500-700 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 1-1,5 vvm. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der ersten Lävulinsäurezugabe nach 27 h. Nach 41 h wurde eine Temperatur von 35°C, ein pH-Wert von 7,0, eine Rührerdrehzahl von 500 Umdrehungen pro Minute und eine Begasungsrate von 0,75 vvm eingestellt (gestrichelte Linie). Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure. **A)** Entwicklung der Trockenmassekonzentration und des Polyestergehaltes. **B)** Molare Zusammensetzung des akkumulierten Polyesters.

Die Effektivität der Umsetzung von Lävulinsäure in Polyester bei dieser Fermentation, bei der während der Speicherphase Gluconsäure zugegeben wurde, lag mit 30 % wesentlich höher als bei der Fermentation ohne Zugabe von Gluconsäure als Co-Substrat, bei der die Effektivität der Umsetzung lediglich 17 % betrug. (Zu dieser Bilanzierung wurden jeweils die ersten 60 h der Fermentation nach der ersten Zugabe von Lävulinsäure berücksichtigt). Die aus diesen beiden Fermentationen gewonnenen Werte der Lävulinsäure-Umsätze stimmten in etwa mit den Werten, die aus Versuchen im Schüttelkolben gewonnen werden konnten, überein (Tabelle 7).

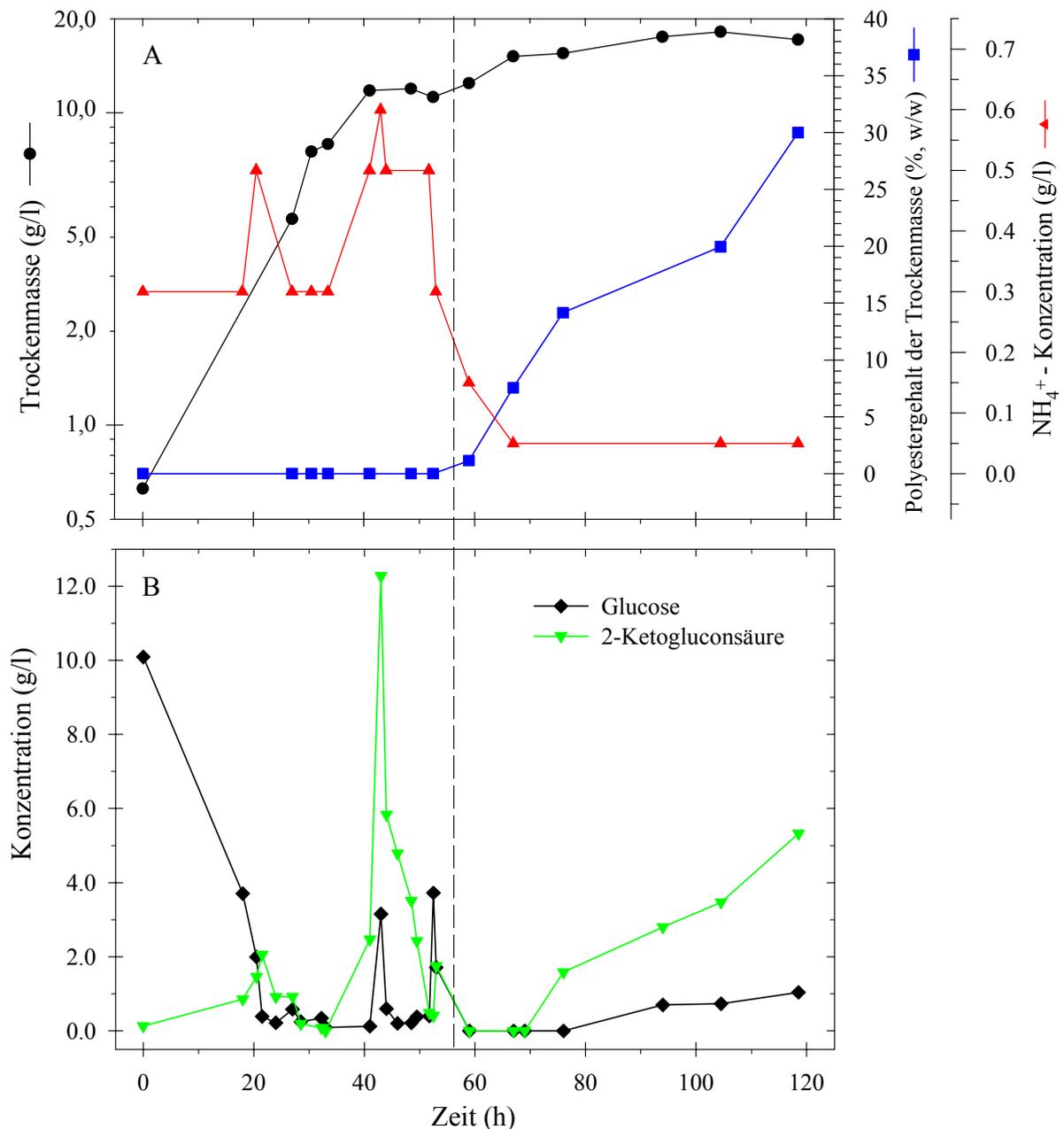
Die bei den bisherigen Fermentationen angewandte Automatisierung der gleichzeitigen sauerstoffkonzentrationsabhängigen Zugabe von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle senkte den Arbeitsaufwand beträchtlich und ermöglichte die Dosierung von kleineren Portionen, was sich hauptsächlich bei den Fermentationen mit Octansäure als vorteilhaft erwies (3.1.5.2). Die gleichzeitige Zugabe von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle hatte allerdings den Nachteil, daß man das jeweils benötigte Verhältnis von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle vor der Fermentation kennen mußte, um die Vorlage entsprechend ansetzen zu können. Es war daher wünschenswert, die Dosierung der Stickstoffquelle von der Dosierung der Kohlenstoffquelle unter Beibehaltung der Automatisierung zu entkoppeln. Eine solche Entkoppelung sollte durch die Verwendung von Ammoniumhydroxydlösung zur Korrektur des pH-Wertes erreicht werden, wodurch das von den Zellen aufgenommene Ammonium ersetzt würde. Voraussetzung für diese Automatisierung war aber, daß keine anderen sauren oder basischen Stoffe aus dem Medium aufgenommen oder ins Medium abgegeben wurden. Daher bot sich Glucose als „pH-neutrale“ C-Quelle an, um eine Automatisierung der Zugabe der Stickstoffquelle zu ermöglichen. Die gaschromatographische Analyse der Zellen von *P. putida* Gpp104 (pHP1014::E156), die in einstufigen Speicherversuchen (2.4.2) mit Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle angezogen worden waren, ergab bei ähnlichem Wachstumsverhalten keinen nachweisbaren Einbau von PHF in die Zellen. Somit war davon auszugehen, daß Gluconsäure problemlos durch Glucose als C-Quelle während der Wachstumsphase zu ersetzen war, um PHF-freie Zellen herzustellen. Gleichzeitig wäre eine unabhängige Automatisierung der Zugabe von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu realisieren.

### 3.1.5.4 Fed-Batch-Fermentationen mit Glucose oder Gluconsäure als Substrat in der Wachstumsphase

Um zu überprüfen, ob auch Glucose als Wachstumssubstrat in einer Fermentation im 20 l-Maßstab geeignet ist und die Dosierung von Ammonium getrennt automatisiert werden kann, wurde eine zweistufige Fed-Batch-Fermentation im 20 l-Maßstab von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) mit Glucose in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase durchgeführt. Der mit 14 l Mineralmedium (2.2.1), Glucose (1,0 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Glucose angezogenen Vorkultur angeimpft. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Bestimmung des PHF-Gehaltes und der PHF-Zusammensetzung (2.8), zur Analyse des Überstandes (2.5) sowie zur Bestimmung der Trockenmassekonzentration, des Polyestergehaltes und der Polyesterzusammensetzung entnommen. Als Substratvorlage während der Wachstumsphase diente Glucose (40 %, w/v), wobei der pH-Wert im Fermenter durch Ammoniaklösung (28 %, w/v) auf pH 7,0 geregelt wurde. Während der Speicherphase wurde eine Substratvorlage mit Lävulinsäure (250 g/l) und Gluconsäure (250 g/l) verwendet, um gleichzeitig den pH-Wert auf 7,0 einzustellen und die von den Zellen verstoffwechselten Substrate automatisch zu ersetzen.

Da in der vorangegangenen Fermentation auch nach einer Gesamtkultivierungszeit von 88 h mit einer Speicherphase von 47 h noch eine deutliche Zunahme des Polymergehaltes der Zelltrockenmasse am Ende der Kultivierung festzustellen war (Abb. 11 A), wurde die Fermentationsdauer auf 120 h erhöht.

Die Trockenmassekonzentration nahm während der Wachstumsphase in den ersten 40 h der Kultivierung von 0,6 g/l auf 12 g/l zu und stieg während der Speicherphase auf 18 g/l an (Abb. 12 A). Ab einer Kultivierungsdauer von 30 h blieb die Trockenmassekonzentration konstant, bis sie zu Beginn der Speicherphase wieder zunahm. Die Ammoniumkonzentration im Medium wurde über die Laugenpumpe der pH-Wert-Regulierung automatisch aufrecht erhalten und schwankte während der ersten 40 h der Kultivierung zwischen 0,3 und 0,5 g/l. Nach 42 h stieg die Ammoniumkonzentration kurzzeitig auf 0,6 g/l an. Um ein weiteres Ansteigen und eine mögliche Überdosierung von Ammonium zu verhindern und um die Zellen in die Speicherphase zu versetzen, wurde die Laugenvorlage durch NaOH (5N) ersetzt. Daraufhin nahm die Ammoniumkonzentration im Medium ab und erreichte zu Beginn der Speicherphase, nach 56 h, einen Wert von 0,15 g/l. Während der ersten 10 h der Speicherphase nahm die Ammoniumkonzentration noch bis auf 0,05 g/l ab und blieb bis zum Ende der Kultivierung konstant.



**Abb. 12: Verlauf einer automatisierten Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) mit Glucose als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von Polyhydroxyfettsäure mit Glucose als Co-Substrat.**

Der mit 141 Mineralmedium (2.2.1); Glucose (1,0 %, w/v); Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Glucose gewachsenen Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befand, angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,0; Rührerdrehzahl, 500-700 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 1-1,5 vvm. Speicherparameter: Temperatur, 35°C; pH-Wert, 7,0; Rührerdrehzahl, 500 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 0,75 vvm. Der Beginn der Speicherbedingungen ab 56 h wird durch eine gestrichelte Linie dargestellt. **A)** Entwicklung der Trockenmassekonzentration, des Polyestergehaltes und der Ammoniumkonzentration im Überstand. **B)** Entwicklung der Glucose- und 2-Ketogluconsäurekonzentration im Überstand.

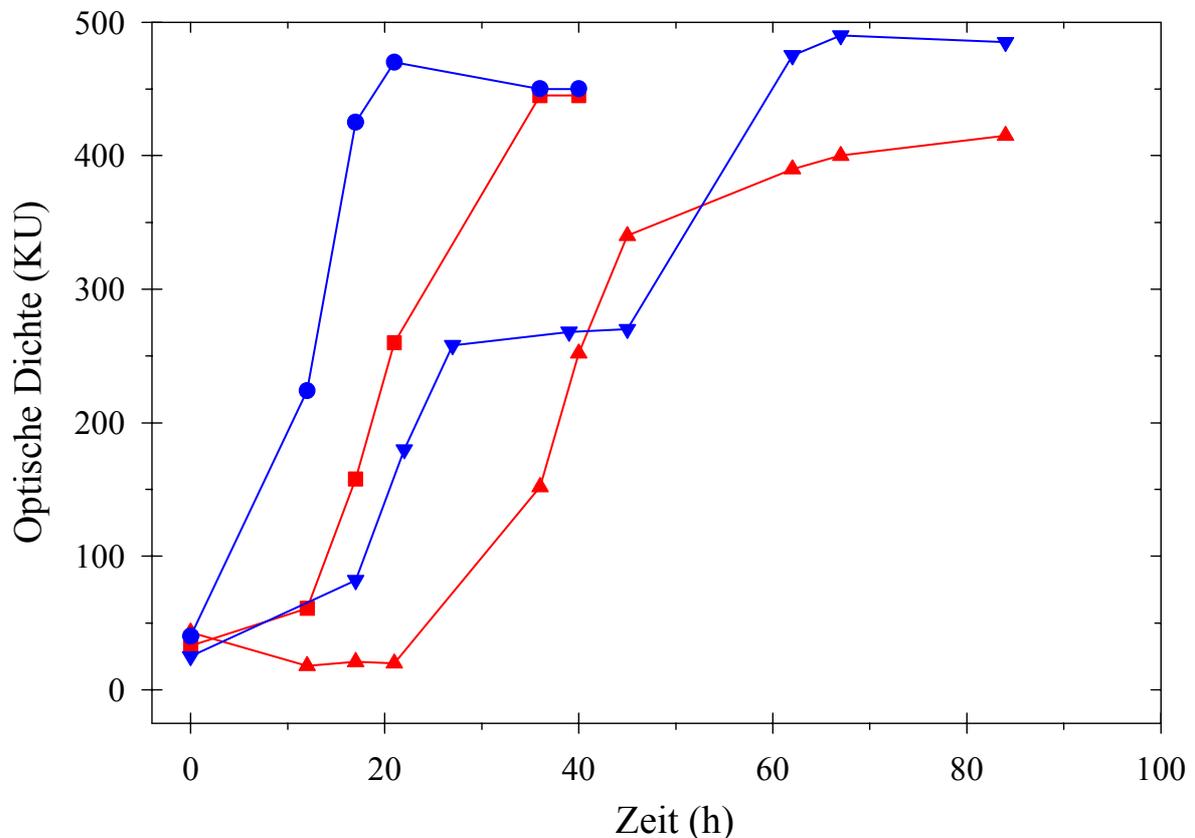
In den ersten 56 h der Kultivierung akkumulierten die Bakterien keinen Polyester. Während der Speicherphase stieg der Polymeranteil an der Zelltrockenmasse bis auf 30 % (w/w) an. Nach einer Fermentationsdauer von 119 h konnten 90 g gereinigter Polyester mit einer Zusammensetzung von 7,0 mol % 3HB; 58,5 mol % 3HV und 34,5 mol % 4HV gewonnen werden. Auch am Ende der gegenüber der vorigen Fermentation verlängerten Gesamtkultivierungszeit von 119 h mit einer Speicherphase von 63 h konnte ein Anstieg des Polymergehaltes in den letzten 14 h der Fermentation beobachtet werden. Dies ließ erwarten, daß eine weitere Verlängerung der Speicherphase den Polymeranteil der Zellen noch steigern würde.

Abb. 12 B zeigt den Verlauf der Glucose- und 2-Ketogluconsäure-Konzentration im Kulturüberstand während der Fermentation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) auf Glucose. Die zu Beginn der Kultivierung zugegebene Menge Glucose (10,0 g/l) wurde während der ersten 20 h der Kultivierung abgebaut und anschließend während der Wachstumsphase bis zu einer Kultivierungszeit von 56 h automatisch ersetzt, wenn sie von den Bakterien verbraucht war. Während des Abbaus der Glucose entstand 2-Ketogluconsäure, deren Konzentration nach 20 h etwa 2,0 g/l erreichte und während der nächsten 13 h wieder verstoffwechselt wurde. Nach 33 h begann die Konzentration von 2-Ketogluconsäure im Medium rasch anzusteigen, bis sie nach 43 h 12,0 g/l betrug und während der nächsten 10 h wieder abgebaut wurde. Während der Speicherphase wurde neben Lävulinsäure kontinuierlich Glucose als Co-Substrat zugegeben, so daß die Glucose-Konzentration im Medium maximal 1,0 g/l betrug. Während dieser Zeit bildete sich 2-Ketogluconsäure, die sich innerhalb von 50 h kontinuierlich bis zu einer Endkonzentration von ca. 5,0 g/l anhäufte.

Bei den Fermentationen mit Gluconsäure und Glucose wurde ein ungewöhnlich schlechtes Wachstumsverhalten des Stammes *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) beobachtet. Dies äußerte sich in sehr langen lag-Phasen von 30 h (3.1.5.3), die sich insbesondere in den ersten Stufen der Vorkulturen stark bemerkbar machten und hier sogar bis zu 70 h betragen konnten. Der in diesen Versuchen verwendete rekombinante Stamm SK 6138 von *P. putida* GPp104 enthielt den Vektor pHP 1014, in den das 15,6 kbp große Fragment E156 kloniert wurde, das die PHF-Synthasegene *phaE* und *phaC* aus *Thiocapsa pfennigii* und einen offenen Leserahmen unbekannter Funktion enthielt. Das so zusammengesetzte Hybridplasmid hatte eine Größe von 38,5 kbp (Tabelle 3).

Um einen Einfluß der eingebrachten Fremdgene auf das Wachstumsverhalten des rekombinanten Stammes auszuschließen, wurden *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und der Ausgangsstamm *P. putida* GPp104 in MM mit Gluconsäure (0,7 %, w/v) unter Verwendung von 300 ml-Klettkolben (2.4.6) wie unter 2.4.1 beschrieben untersucht. Als

Inoculum dienten jeweils gewaschene Zellen einer auf NB- oder Gluconsäure gewachsenen Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befanden.



**Abb. 13: Wachstumsvergleiche von *P. putida* Gp104 und *P. putida* Gp104 (pHP1014::E156) in Mineralmedium mit Gluconsäure.**

Die mit 50 ml Mineralmedium (2.2.1) Gluconsäure (1,0 %, w/v) und Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) gefüllten 300 ml Klett-Kolben wurden mit 3 ml einer in Saline (0,9 %, w/v) gewaschenen Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befand, angeimpft. ▼ *P. putida* Gp104 (pHP1014::E156) nach Wachstum auf einer Gluconsäure-Vorkultur, ● *P. putida* Gp104 nach Wachstum auf einer Gluconsäure-Vorkultur, ■ *P. putida* Gp104 nach Wachstum auf einer NB-Vorkultur, ▲ *P. putida* Gp104 (pHP1014::E156) nach Wachstum auf einer NB-Vorkultur. Das Wachstum wurde über die Bestimmung der optischen Dichte unter Verwendung eines Klett-Photometers während der Kultivierung auf einem Rotationsschüttler bei 150 Umdrehungen pro Minute und 30°C verfolgt (2.4.6). Abkürzungen: KU, Klett-Einheiten.

Der rekombinante Stamm *P. putida* Gp104 (pHP1014::E156) zeigt gegenüber dem Plasmid freien Ausgangsstamm *P. putida* Gp104 eine deutlich verlängerte lag-Phase, wobei die lag-Phase durch die Verwendung von Gluconsäure an Stelle von NB-Vorkulturen bei dem rekombinanten Stamm von etwa 30 h auf 15 h halbiert werden konnte (Abb. 13). Bei dem Plasmid freien Stamm betrug die lag-Phase bei Verwendung einer NB-Vorkultur 10 h und verkürzte sich durch Verwendung einer auf Gluconsäure gewachsenen Vorkultur deutlich auf unter 10 h. Auffällig war ein stark ausgeprägtes diauxisches Wachstum des rekombinanten Stammes mit einer ersten Wachstumsphase von 15 bis 25 h und einer zweiten

Wachstumsphase von 45 bis 60 h, wenn die Zellen aus einer auf Gluconsäure gewachsenen Vorkultur stammten. Diese Untersuchung zeigte deutlich einen wachstumshemmenden Effekt des Plasmids pHP1014::E156 auf den Stamm *P. putida* GPp104.

Das klonierte Fragment E156 enthielt stromabwärts der PHF-Synthasegene *phaE* und *phaC* aus *Thiocapsa pfennigii* einen offenen Leserahmen (ORF X) mit einer Größe von etwa 13 kbp mit bisher unbekannter Funktion (Liebergesell, persönliche Mitteilung). Um eine Wachstumshemmung durch diesen ORF X zu überprüfen, wurde ein Großteil des ORF (ca. 10 kbp) durch Verdauung mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI abgetrennt. Das dadurch entstandene Fragment B28RV wurde in den Vektor pHP1014 kloniert und in *P. putida* GPp104 konjugativ übertragen (Liebergesell, persönliche Mitteilung).

Um zu untersuchen, welchen Einfluß dieses verkürzte Konstrukt auf das Speicherverhalten der Bakterien in zweistufigen Speicherexperimenten hat, wurden die Stämme *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) im zweistufigen Speicherversuch (2.4.2) mit Gluconsäure (1,0 %, w/v) als Kohlenstoffquelle in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase angezogen. Die Zellen wurden nach 4 Tagen geerntet und die Trockenmassekonzentration, der PHF-Gehalt sowie die PHF-Zusammensetzung wurden bestimmt (2.8).

**Tabelle 8: Polyesterakkumulation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) im zweistufigen Speicherversuch mit Gluconsäure als Wachstumssubstrat und Lävulinsäure als Speichersubstrat.**

Stamm	TM (g/l)	PHF-Gehalt (% TM)	Zusammensetzung des Polyesters (mol %)		
			3HB	3HV	4HV
<i>P. putida</i> GPp104					
(pHP1014::E156)	2,0	53,0	3,5	61,1	35,4
<i>P. putida</i> GPp104					
(pHP1014::B28RV)	2,0	54,0	4,8	73,7	21,5

Die Kultivierungen wurden im 100 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben bei 30°C und 150 Umdrehungen pro Minute mit Gluconsäure (1,0 %, w/v) als Kohlenstoffquelle in der Wachstumsphase durchgeführt, während der Speicherphase wurden insgesamt 0,7 % (w/v) Lävulinsäure in Portionen zugegeben (1 x 0,1 %, w/v; 3 x 0,2 %, w/v). Dauer der Wachstumsphase: 24 h, Dauer der Speicherphase: 72 h. Abkürzungen: PHF, Polyhydroxyfettsäure; TM, Trockenmasse; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure.

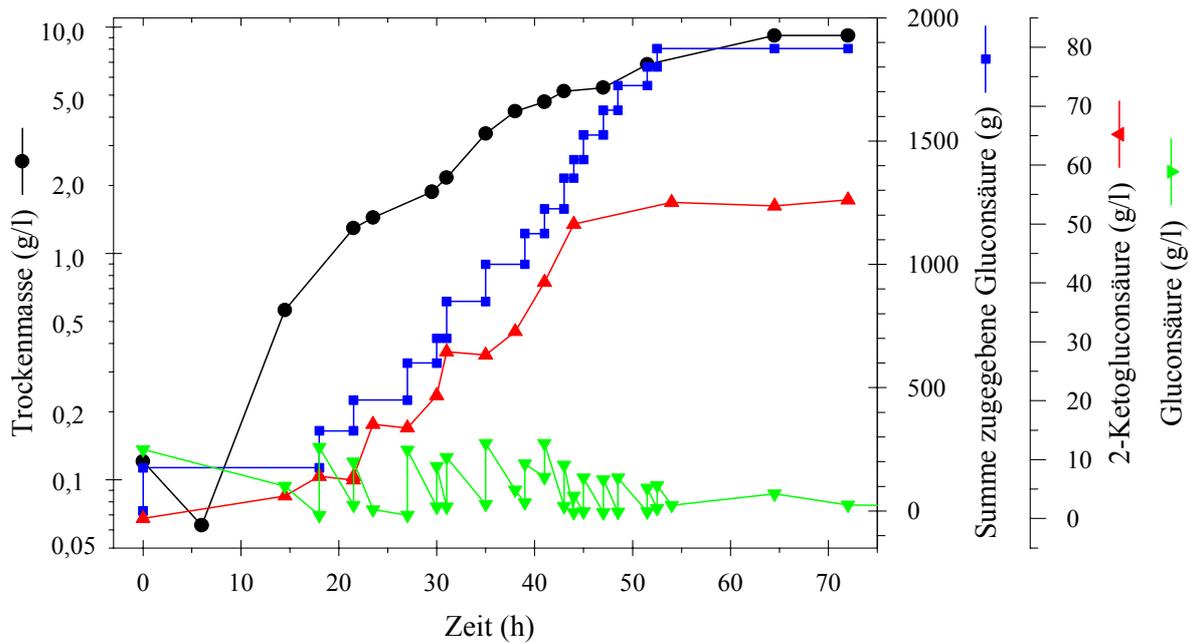
Beide Stämme zeigten etwa den gleichen PHF-Gehalt von 53,0 bzw. 54,0 % (w/w) und wuchsen zu einer Zelldichte von 2,0 g/l heran (Tabelle 8). Der Stamm *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) akkumulierte einen Polyester mit einem deutlich höheren 4HV-Anteil von 35,4 mol % im Gegensatz zu *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) mit einem 4HV-Anteil

von 21,5 mol %. Bei diesem Stamm lag der 3HV-Anteil mit 73,7 mol % und der 3HB-Anteil mit 4,8 mol % höher, als bei dem Stamm mit vollständigem ORF X (61,1 mol % 3HV, 3,5 mol % 3HB). Der deutlich erhöhte 4HV-Gehalt des Polyesters von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) zeigte sich auch bei einstufigen Speicherversuchen mit Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle (Tabelle 5).

Es war also zu erwarten, daß *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) bei Fermentationen im 20 l-Maßstab ein besseres Wachstumsverhalten bei etwa gleichem PHF-Gehalt der Zellen aufweisen würde, wobei der molare Anteil von 4HV am Polyester niedriger liegen würde, als bei Fermentationen mit *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156).

Um die Konzentration an Zelltrockenmasse und damit die Polymerausbeute weiter zu steigern, wurde eine Fermentation im 20 l-Maßstab mit *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) und „intensiviertem Fütterungsregime“ durchgeführt. Der mit 14 l Mineralmedium (2.2.1), Gluconsäure (1,2 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Gluconsäure gewachsenen Vorkultur angeimpft. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur HPLC-Analyse der Lävulinsäure-, Gluconsäure- und 2-Ketogluconsäurekonzentration im Überstand (2.5) sowie zur Bestimmung der Trockenmassekonzentration entnommen. Als Substratvorlage während der Wachstumsphase diente Gluconsäure, deren pH-Wert durch Zugabe von Ammoniaklösung (32 %, w/v) auf pH 7,0 eingestellt war, so daß die Ammonium Endkonzentration 1,35 % (w/v) betrug. Anschließend wurde durch Zugabe von Na-Gluconat und Wasser eine Gluconsäure Endkonzentration von 50 % (w/v) eingestellt (2.3.3). Die Zugabe von Substrat erfolgte immer dann, wenn die Sauerstoffkonzentration im Fermenter anstieg, was auf einen fast vollständigen Verbrauch der Kohlenstoffquelle zurückzuführen war. Die Ammoniumkonzentration wurde während der Wachstumsphase auf Werten zwischen 0,2 g/l und 0,5 g/l gehalten.

Abb. 14 zeigt den Verlauf der Wachstumsphase dieser Fed-Batch-Fermentation. Die Trockenmassekonzentration im Fermenter nahm während der ersten 5 h von 0,12 g/l auf 0,06 g/l ab und stieg dann steil auf etwa 1,0 g/l an. Bis zum Ende der Wachstumsphase nahm die Trockenmassekonzentration bis auf knapp 10 g/l zu, wobei die Wachstumsgeschwindigkeit kontinuierlich abnahm. Zu Beginn der Kultivierung sank die Gluconsäurekonzentration während 18 h von 12,0 g/l auf 2,0 g/l ab, so daß zunächst 150 g Gluconsäure manuell nachdosiert wurden. Während des weiteren Verlaufs der Wachstumsphase wurde Gluconsäure automatisch zugegeben, wobei die Gluconsäurekonzentration im Fermenter nicht über 15,0 g/l anstieg. Die Konzentration von 2-Ketogluconsäure nahm während der ersten 50 h kontinuierlich bis auf 55,0 g/l zu und blieb ab ca. 45 h konstant, nach 52 h wurde keine Gluconsäure mehr zugegeben.



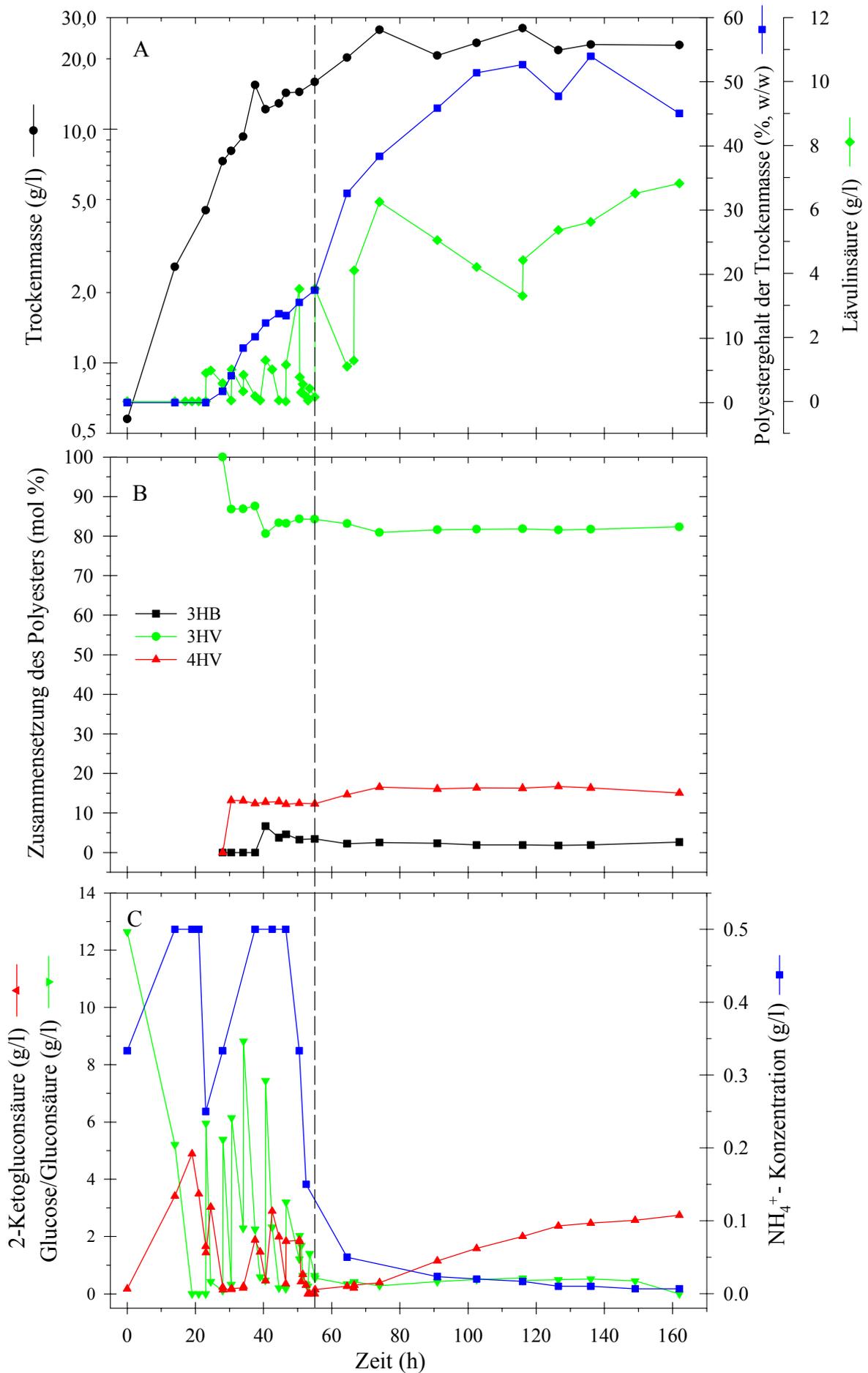
**Abb. 14: Verlauf der Wachstumsphase einer Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* GPP104 (pHP1014::B28RV) mit Gluconsäure als Kohlenstoffquelle.**

Der mit 14 l Mineralmedium (2.2.1); Gluconsäure (1,2 %, w/v); Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Gluconsäure gewachsenen Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befand, angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,0; Rührerdrehzahl, 500-700 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 1-1,5 vvm.

Gegen Ende der Wachstumsphase verlangsamte sich das Zellwachstum trotz weiterer Zugabe von Gluconsäure deutlich, wobei die Trockenmassekonzentration einen Höchstwert von 9,4 g/l erreichte. Dieser Wert lag trotz erhöhter Zugabe von Gluconsäure sogar noch unter der Trockenmassekonzentration von 12 g/l, die mit dem Stamm *P. putida* GPP104 (pHP1014::E156) auf Glucose während der Wachstumsphase unter ähnlichen Kultivierungsbedingungen erreicht wurde (Abb. 12). Insgesamt wurden während der Wachstumsphase 1700 g Gluconsäure eingesetzt, wobei nur 140 g Zelltrockenmasse mit einem Polymergehalt von 20 % (w/w) erhalten wurden. Dies entsprach einer polymerfreien Zelltrockenmasse von 112 g, so daß nur 6,6 % der Gluconsäure in Zellmasse umgesetzt wurden. Diese sehr geringe Ausbeute ist unter anderem auch darauf zurückzuführen, daß aus der Gluconsäure insgesamt etwa 800 g 2-Ketogluconsäure gebildet wurden, die nicht zum Zellwachstum verwendet wurden, sondern sich im Medium anhäuferten. Um die Trockenmassekonzentration und die Substratausbeute zu erhöhen, sollte daher eine Anhäufung von 2-Ketogluconsäure im Medium verhindert werden. Dieses Ziel sollte mit einer veränderten Fütterungsstrategie erreicht werden.

Daher wurde *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) in einer weiteren Fermentation im 20 l-Maßstab mit Glucose als Substrat in der Wachstumsphase und Lävulinsäure als Substrat in der Speicherphase kultiviert, wobei die Glucose in kleineren Portionen (50 bis 150 g) und größeren zeitlichen Abständen dosiert wurde, um eine Anhäufung von 2-Ketogluconsäure im Medium zu verhindern. Der mit 14 l Mineralmedium (2.2.1), Glucose (1,2 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Gluconsäure gewachsenen Vorkultur angeimpft. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur HPLC-Analyse der Lävulinsäure-, Glucose- und 2-Ketogluconsäurekonzentration im Überstand (2.5) sowie zur Bestimmung der Trockenmassekonzentration, des Polyestergehaltes sowie dessen Zusammensetzung entnommen. Als Substratvorlage während der Wachstumsphase diente Glucose (50 %, w/v), der pH-Wert im Fermenter wurde durch Ammoniaklösung (28 %, w/v) über die Laugenpumpe der pH-Wert-Steuerung auf pH 7,0 geregelt. Gleichzeitig wurde dadurch der bakterielle Bedarf an Ammonium ausgeglichen. Während der Speicherphase wurde eine Substratvorlage mit Lävulinsäure (400 g/l) und Gluconsäure (150 g/l) verwendet, um gleichzeitig den pH-Wert auf 7,0 einzustellen und die von den Zellen verstoffwechselten Kohlenstoffquellen automatisch zu ersetzen.

Während der Wachstumsphase wurde ab einer Fermentationszeit von 23 h regelmäßig Lävulinsäure zugegeben, um die für deren Abbau notwendigen Gene frühzeitig zu induzieren. Kurz vor Beginn der Speicherphase wurde die Lävulinsäurekonzentration im Medium durch manuelle Zugabe auf 3,5 g/l erhöht und bis zum Ende der Fermentation automatisch zwischen 1,0 g/l und 7,0 g/l gehalten, so daß kein Mangel an Lävulinsäure im Medium entstand. Bei starkem Abfall der Lävulinsäurekonzentration nach 65 h und 116 h wurde sie manuell zugegeben. Die Trockenmassekonzentration stieg während der Wachstumsphase innerhalb von 55 h von 0,6 g/l auf 16 g/l an und betrug am Ende der Fermentation 25 g/l (Abb. 15 A). Der Polymergehalt der Trockenmasse stieg während der Wachstumsphase ab dem Zeitpunkt der Lävulinsäurezugabe von 0 % (w/w) auf 17 % (w/w) an und nahm während den ersten 19 h der Speicherphase auf 38 % (w/w) zu. Während der folgenden 88 h der Speicherphase nahm der Polymergehalt noch bis auf 45 % (w/w) zu. Die molare Zusammensetzung des akkumulierten Polyesters schwankte in der Zeit von 30 bis 44,5 h leicht und blieb während der restlichen Fermentation in etwa konstant. Am Ende der Kultivierung setzte sich der Polyester aus 2,6 mol % 3HB; 82,3 mol % 3HV und 15,1 mol % 4HV zusammen (Abb. 15 B).



**Abb. 15: Verlauf einer automatisierten Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) auf Glucose als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von Polyhydroxyfettsäure mit Gluconsäure als Co-Substrat (vorherige Seite).**

Der mit 141 Mineralmedium (2.2.1); Glucose (1,2 %, w/v); Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer Gluconsäure-Vorkultur angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,0; Rührerdrehzahl, 500-700 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 1-1,5 vvm. Nach 55 h wurde eine Temperatur von 35°C, ein pH-Wert von 7,0, eine Rührerdrehzahl von 500 Umdrehungen pro Minute und eine Begasungsrate von 0,75 vvm eingestellt (gestrichelte Linie). Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure. Glucose und Gluconsäure konnten analytisch nicht getrennt werden und wurden gemeinsam erfaßt. **A)** Entwicklung der Trockenmassekonzentration, des Polyestergehaltes und der Lävulinsäurekonzentration im Überstand. **B)** Molare Zusammensetzung des akkumulierten Polyesters. **C)** Verlauf der Konzentration von Ammonium, Glucose/Gluconsäure und 2-Ketogluconsäure.

Insgesamt wurden während der Fermentation 700 g Lävulinsäure von den Zellen verstoffwechselt und dabei 180 g Polyester erzeugt, was einer Einbaurrate von 25,7 % entsprach. Am Ende der Fermentation wurde der Überstand der Kultur mittels Gaschromatographie (2.5.4) und HPLC (2.5.1) auf mögliche Abbauprodukte der Lävulinsäure untersucht. Dabei wurde 4 HV mit einer Konzentration von 3,10 g/l, 3HV mit 0,21 g/l und 3HB mit 0,10 g/l nachgewiesen.

In den ersten 14 h der Kultivierung stieg die Ammoniumkonzentration von ca. 0,3 g/l auf 0,5 g/l an. Um eine Überdosierung von Ammonium zu vermeiden, wurde die Ammoniumlösung nach 22 h kurzfristig durch Natronlauge (5 N) ersetzt, woraufhin die Ammoniumkonzentration steil auf 0,25 g/l abnahm (Abb. 15 C). Innerhalb der folgenden 14 h nahm die Ammoniumkonzentration wieder auf 0,5 g/l zu. Um die Bakterien in die Speicherphase zu versetzen, wurde die Ammoniumlösung nach 46 h wieder durch Natronlauge (5 N) ersetzt, wodurch die Ammoniumkonzentration im Medium zu Beginn der Speicherphase auf 0,14 g/l und bis zum Ende der Kultivierung auf 0,002 g/l abnahm.

Die Glucose wurde während der Wachstumsphase so dosiert, daß die Summe der Konzentration von Glucose und Gluconsäure in den ersten 35 h nicht über 6,0 g/l und später nicht über 9,0 g/l anstieg (Abb. 15 C). Die 2-Ketogluconsäurekonzentration stieg während der gesamten Fermentation nicht über 5,0 g/l an. In den ersten 19 h der Kultivierung nahm die Glucosekonzentration von 12,6 g/l auf 0 g/l ab. Dabei stieg die Konzentration von 2-Ketogluconsäure von 0,2 g/l auf 4,9 g/l an. Während der folgenden 4 h wurde keine Glucose zugegeben und die Konzentration von 2-Ketogluconsäure nahm auf 1,4 g/l ab. Zu diesem Zeitpunkt wurden 100 g Glucose zugegeben, so daß die Konzentration im Medium 6,0 g/l betrug. Innerhalb der folgenden 1,5 h nahm die Glucosekonzentration rasch auf 0,4 g/l ab, wobei 2-Ketogluconsäure bis zu einer Konzentration von 3,0 g/l gebildet wurde. In den

folgenden 3,5 h wurde wiederum keine Glucose zugegeben und die Konzentration an 2-Ketogluconsäure nahm bis auf 0,1 g/l ab.

Die Bildung von 2-Ketogluconsäure schien somit auf die Glucosezugabe zurückgeführt werden zu können. In der Glucose limitierten Phase wurde die 2-Ketogluconsäure wieder verstoffwechselt, allerdings mit einer geringeren Geschwindigkeit als zuvor die Glucose. Während der ersten 28 h der Fermentation wurden jeweils etwa 50 % der zugegebenen Glucose in 2-Ketogluconsäure umgewandelt. Diese Rate nahm dann im weiteren Verlauf der Fermentation ab. Während der restlichen Wachstumsphase wurde die Dosierung der Glucose so gesteuert, daß das von den Bakterien gebildete 2-Ketogluconsäure wieder abgebaut wurde und die Konzentration nicht über 3,0 g/l anstieg. Diese gegenüber der vorhergehenden Fermentation (Abb. 14) verlangsamte Dosierung der Glucose verhinderte eine starke Anhäufung von 2-Ketogluconsäure im Medium.

Insgesamt wurden während der Wachstumsphase 1055 g Glucose eingesetzt, wobei 256 g Zelltrockenmasse mit einem Polymeranteil von 17 % (w/w) entstanden. Dies entsprach einer polymerfreien Zelltrockenmasse von 212 g, so daß die Glucose mit einer Rate von 20,1 % in Zelltrockenmasse umgesetzt wurde. Während der Speicherphase wurde über die pH-Wert-Steuerung kontinuierlich Lävulinsäure als Speichersubstrat und Gluconsäure als Co-Substrat zugegeben. Das Verhältnis von Lävulinsäure und Gluconsäure in der Säurevorlage wurde so gewählt, daß die Konzentration von Gluconsäure im Medium während der Speicherphase etwa 0,5 g/l betrug. In dieser Zeit nahm die Konzentration von 2-Ketogluconsäure von 0 auf 2,7 g/l zu, wobei insgesamt 290 g Gluconsäure zugegeben wurden.

### 3.1.6 Hochzellichtefermentation von *Ralstonia eutropha* im 20 l-Maßstab

In Vorversuchen zeigte sich, daß die rekombinanten Stämme *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::E156) und *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::B28), die die Synthasegene *phaE* und *phaC* aus *Thiocapsa pfennigii* enthielten, in der Lage waren, ausgehend von Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle 4HV-haltige Polyester mit einem 4HV-Gehalt zwischen 1,5 und 3,8 mol % zu synthetisieren (Tabelle 5). Um die Produktion solcher Polyester durch *R. eutropha* im größeren Maßstab und eine mögliche Steigerung des Anteils von 4HV im gespeicherten Polyester durch kontrollierte Fermentationsbedingungen zu untersuchen, sollte eine zweistufige Fed-Batch-Fermentation mit *R. eutropha* entwickelt werden. Zunächst wurden zweistufige Speicherversuche im Erlenmeyerkolben im 100 ml-Maßstab zur Akkumulation 4HV-haltiger Polyester durch *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::E156) und *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::B28) durchgeführt (2.4.2). Hierbei diente Gluconsäure

(1,0 %, w/v) als Kohlenstoffquelle in der Wachstumsphase und Lävulinsäure als Substrat in der Speicherphase. Ein Teil der Zellen wurde nach einer 24-stündigen Wachstumsphase, ein weiterer nach 3 Tagen Speicherphase geerntet. Anschließend wurde jeweils die Trockenmassekonzentration, deren PHF-Gehalt sowie die PHF-Zusammensetzung bestimmt (siehe Kapitel 2.8 und Tabelle 9).

**Tabelle 9: Polyesterakkumulation von *R. eutropha* H16-PHB<sup>-</sup>4 (pHP1014::*E156*) und *R. eutropha* H16-PHB<sup>-</sup>4 (pHP1014::*B28*) im zweistufigen Speicherversuch mit Gluconsäure als Substrat in der Wachstumsphase und Lävulinsäure als Substrat in der Speicherphase.**

Stamm (Plasmid)	TM (g/l)	PHF-Gehalt (% TM)	Zusammensetzung des Polyesters (mol %)		
			3HB	3HV	4HV
Nach der Wachstumsphase auf Gluconsäure (1,0 %, w/v)					
(pHP1014:: <i>E156</i> )	k.D.v.	42,0	100,0	0,0	0,0
(pHP1014:: <i>B28</i> )	k.D.v.	35,0	100,0	0,0	0,0
Nach der Speicherphase mit Lävulinsäure (0,7 %, w/v)					
(pHP1014:: <i>E156</i> )	3,2	74,4	89,4	9,2	1,4
(pHP1014:: <i>B28</i> )	4,6	77,6	80,6	16,3	3,1

Die Kultivierungen wurden im 100 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben bei 30°C und 150 Umdrehungen pro Minute mit Gluconsäure (1,0 %, w/v) als Kohlenstoffquelle in der Wachstumsphase durchgeführt. Während der Speicherphase wurden insgesamt 0,7 % (w/v) Lävulinsäure in Portionen (1 x 0,1 %, w/v, 3 x 0,2 %, w/v) zugegeben. Dauer der Wachstumsphase: 24 h, Dauer der Speicherphase: 72 h. Abkürzungen: k.D.v., keine Daten vorliegend; PHF, Polyhydroxyfettsäure; TM, Trockenmasse; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure.

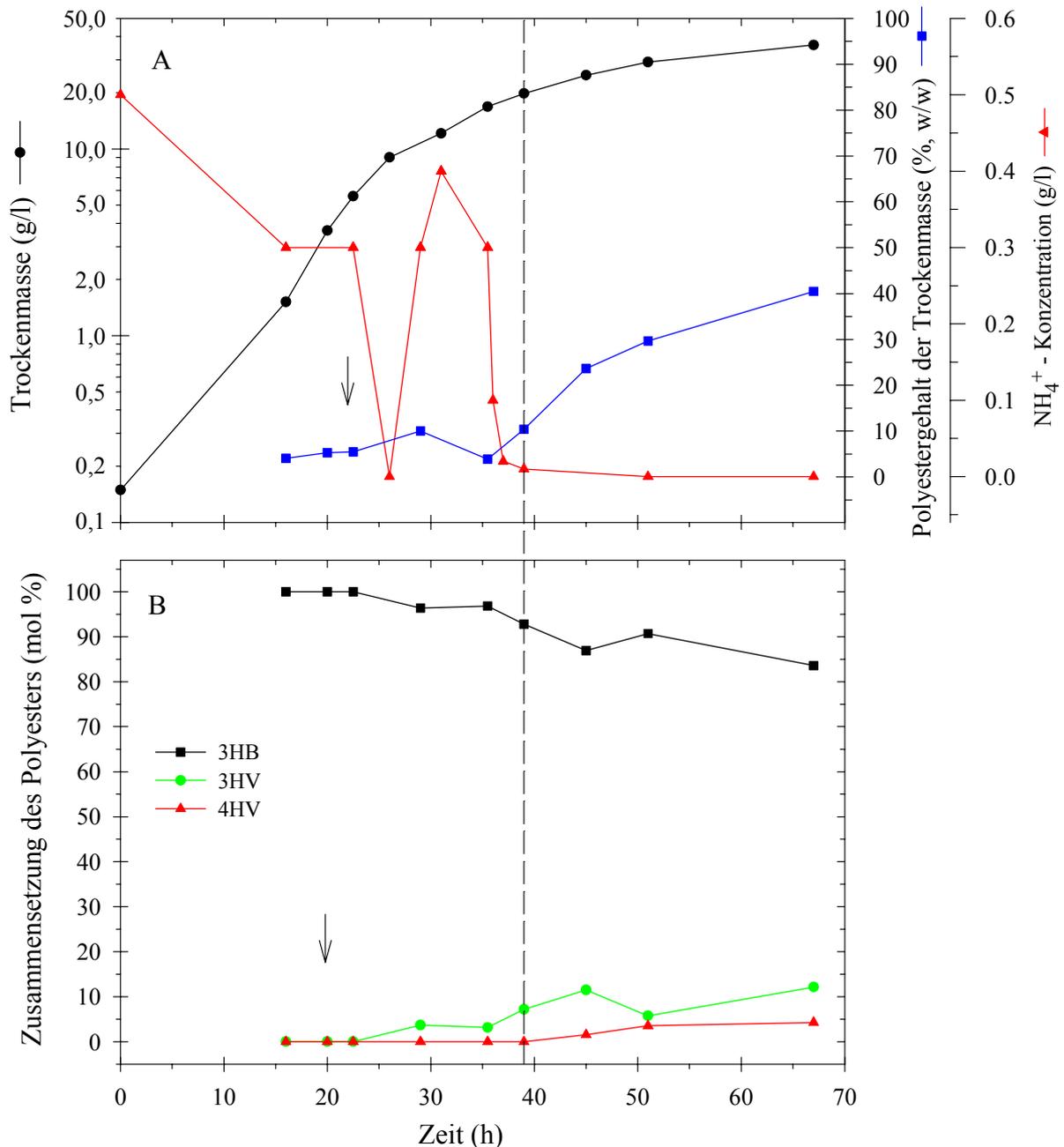
Während des Wachstums auf Gluconsäure speicherten die Bakterien einen Polyester, der zu 100 % aus 3HB bestand. Der Polyesteranteil an der Zelltrockenmasse betrug 42,0 % (w/w) für den Stamm mit dem Plasmid (pHP1014::*E156*) bzw. 35,0 % (w/w) für den Stamm mit dem Plasmid (pHP1014::*B28*). In der Speicherphase mit Lävulinsäure stieg der Polyesteranteil an der Zelltrockenmasse auf 74,4 bzw. 77,6 % (w/w) an. Dabei wurde auch 3HV und 4HV in den Polyester integriert, wobei die molaren Anteile von 3HV und 4HV bei dem Stamm, der das Plasmid (pHP1014::*B28*) trug mit 16,3 bzw. 3,1 mol % etwa doppelt so hoch lagen wie bei dem Stamm mit dem größeren Plasmid. Zu diesem erhöhten Einbau von 3HV und 4HV könnte unter anderem der geringere Polymergehalt der Zellen zu Beginn der Speicherphase beigetragen haben. Der Stamm mit dem kürzeren Plasmid wuchs zu einer um ein Drittel höheren Zelldichte heran.

Somit sollte eine Fermentation im 20 l-Maßstab in einer Weise geführt werden, bei der die Bakterien während der Wachstumsphase möglichst wenig Polymer akkumulieren. Dabei erschien die Vermeidung einer Stickstoffmangelsituation und die Dosierung der

Kohlenstoffquelle während des Wachstums in kleinen Portionen, um einen Überschuß der Kohlenstoffquelle zu vermeiden, essentiell. In einstufigen Speicherversuchen mit *R. eutropha* im Erlenmeyerkolben (2.4.2) und Fructose, Gluconsäure und Succinat als Kohlenstoffquellen zeigten die Bakterien auf Fructose die geringste Speicherrate und gute Wachstumseigenschaften (Abb. 2 A), so daß sich diese Kohlenstoffquelle für die Fermentationen im 20 l-Maßstab während der Wachstumsphase als sinnvoll erwies. Die Verwendung von Fructose bot gegenüber Gluconsäure und Bernsteinsäure (Succinat) auch den Vorteil der Automatisierung der Fermentation wie für die Fermentation von *P. putida* mit Glucose unter 3.1.5.4 beschrieben.

Für die Fermentation von *R. eutropha* H16-PHB<sup>-</sup>4 (pHP1014::B28) im 20 l-Maßstab wurde der Fermenter mit 13 l Mineralmedium (2.2.1), Fructose (1,5 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (12,5 mg/l) gefüllt und mit 1 l einer auf Fructose gewachsenen Vorkultur angeimpft. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur HPLC-Analyse des Überstandes (2.5.1) sowie zur Bestimmung der Trockenmassekonzentration und des Polyestergehaltes entnommen. Als Substratvorlage während der Wachstumsphase diente Fructose (50 %, w/v), der pH-Wert im Fermenter wurde durch Ammoniaklösung (16 %, w/v) auf pH 7,0 geregelt.

Die Trockenmassekonzentration nahm während der Wachstumsphase in den ersten 39 h von 0,15 g/l auf 20 g/l zu und stieg während der anschließenden 28-stündigen Speicherphase auf 36 g/l an (Abb. 16 A). Die Ammoniumkonzentration im Medium nahm während der ersten 16 h der Wachstumsphase von 0,5 g/l auf 0,3 g/l ab, blieb bis 23 h auf diesem Wert und nahm in den nächsten 3 h kurzzeitig auf 0,0 g/l ab. Durch manuelle Zugabe von Ammoniumchlorid wurde die Ammoniumkonzentration wieder auf 0,3 g/l erhöht und nahm anschließend noch leicht auf 0,4 g/l zu. Nach 36 h Kultivierungszeit wurde die Laugenvorlage durch NaOH (5N) ersetzt. Daraufhin nahm die Ammoniumkonzentration im Medium innerhalb von 3 h bis zum Beginn der Speicherbedingungen (nach 38 h Fermentationsdauer) auf unter 0,02 g/l ab. Der Polyestergehalt der Zelltrockenmasse betrug in der Zeit von 16 bis 23 h 4 bis 5 % (w/w) und stieg während der folgenden 6 h kurzzeitig auf etwa 10 % (w/w) an, nahm jedoch bis kurz vor Ende der Wachstumsphase wieder auf 4 % (w/w) ab. Dieser kurzzeitige Anstieg des Polyestergehaltes stimmte zeitlich mit der Erschöpfung der Stickstoffquelle im Medium und der ersten Zugabe von Lävulinsäure (0,1 %, w/v) überein.



**Abb. 16:** Verlauf einer automatisierten Fed-Batch-Fermentation von *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::B28) mit Fructose als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von PHF mit Fructose als Co-Substrat.

Der mit 13 l Mineralmedium (2.2.1); Fructose (1,5 %, w/v); Ammoniumchlorid (0,1 %, w/v) und Tetracyclin (12,5 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer auf Fructose gewachsenen Vorkultur angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,0; Rührerdrehzahl, 500-700 Umdrehungen pro Minute, Begasungsrate, 1-1,5 vvm. Der Pfeil deutet den Zeitpunkt der ersten Lävulinsäurezugabe an (22 h). Nach 39 h wurde eine Temperatur von 35°C, ein pH-Wert von 7,0, eine Rührerdrehzahl von 500 Umdrehungen pro Minute und eine Begasungsrate von 0,75 vvm eingestellt (gestrichelte Linie). Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure. **A)** Entwicklung der Trockenmassekonzentration, des Polyesthergehaltes und der Ammoniumkonzentration im Überstand. **B)** Molare Zusammensetzung des akkumulierten Polyesters.

Während der Speicherphase wurde die Temperatur auf 35°C erhöht, die Rührerdrehzahl auf 500 Upm und die Begasungsrate auf 0,5 vvm reduziert. In dieser Phase stieg der Polyestergehalt der Zelltrockenmasse bis auf 40 % (w/w) an. Insgesamt wurden während der Fermentation 1300 g Lävulinsäure von den Zellen verstoffwechselt und 270 g Polyester erzeugt. Eine Berechnung der Umsatzrate von Lävulinsäure in Polyester war bei dieser Fermentation nicht möglich, da der verwendete Stamm von *R. eutropha* auch in der Lage war, ausgehend von Fructose, die hier als Substrat in der Wachstumsphase und als Co-Substrat in der Speicherphase eingesetzt wurde, Polyester zu akkumulieren. Am Ende der Fermentation wurde der Überstand der Kultur mittels Gaschromatographie (2.5.4) und HPLC (2.5.1) auf mögliche Abbauprodukte der Lävulinsäure untersucht. Dabei wurde 4 HV mit einer Konzentration von 10,00 g/l, 3HV mit 0,05 g/l und 3HB mit 0,39 g/l nachgewiesen.

In den ersten 22 h der Wachstumsphase akkumulierten die Zellen einen Polyester, der zu 100 mol % aus 3HB bestand (Abb. 16 B). Nach 22 h wurde der Kultur erstmals Lävulinsäure (0,1 %, w/v) zugegeben, um den Stoffwechsel der Bakterien auf den Abbau von Lävulinsäure einzustellen. Ab diesem Zeitpunkt begannen die Zellen, das Lävulinsäureabbauprodukt 3HV in den Polyester zu integrieren (Abb. 16 B). Dabei nahm der Anteil von 3HB am gebildeten Polyester ab. Zu Beginn der Speicherphase, nach 39 h Kultivierungszeit, begannen die Zellen auch 4HV in den Polyester einzubauen, dessen Anteil während der ersten 12 h der Speicherphase bis auf 3,6 mol % anstieg und sich dann während der folgenden 16 h nur noch auf 4,3 mol % steigerte. Aus dieser Entwicklung und einem Vergleich mit Vorversuchen im Schüttelkolben, bei denen der 4HV-Anteil lediglich bis auf 3,1 mol % anstieg (Tabelle 9), ist keine wesentliche Steigerung des 4HV-Anteils mehr zu erwarten, so daß die Fermentation nach einer Kultivierungsdauer von 67 h abgebrochen wurde. Aus dieser Fermentation konnten 590 g Zelltrockenmasse mit einem Polyestergehalt von 40,0 % (w/w) gewonnen werden, wobei der akkumulierte Polyester am Ende der Fermentation eine Zusammensetzung von 83,6 mol % 3HB; 12,1 mol % 3HV und 4,3 mol % 4HV aufwies. Da der Polymergehalt auch am Ende der Fermentation noch zunahm und bei Versuchen in Erlenmeyerkolben auf über 70 % (w/w) anstieg (Tabelle 9), kann mit einem weiteren Anstieg des Polymergehaltes der Zellen bei einer Verlängerung der Fermentationszeit gerechnet werden.

Vergleicht man diese Fermentation von *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::B28) auf Fructose mit der Fermentation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) auf Glucose (Abb. 15), so stellt man fest, daß *R. eutropha* mit einer Trockenmassekonzentration von 36 g/l unter den gegebenen Bedingungen zu höheren Zelldichten als *P. putida* (25 g/l) kultivierbar ist. Der Polymeranteil an der Trockenmasse lag bei beiden Stämmen in der gleichen Größenordnung von 40 bis 45 % (w/w), wobei *P. putida* einen Polyester akkumulierte, der

mit 15,1 mol % einen wesentlich höheren 4HV-Anteil aufwies als der Polyester von *R. eutropha* (4HV-Anteil: 4,3 mol %).

### 3.1.7 Herstellung 4HV-haltiger Polyesterproben für die Bestimmung ihrer Werkstoffeigenschaften

Zur Produktion 4HV-haltiger Polyester wurden rekombinante Stämme von *P. putida* Gpp104, die die Synthasegene von *Thiocapsa pfennigii* enthielten (*P. putida* Gpp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* Gpp104 (pHP1014::B28RV) verwendet (siehe Tabelle 1 und Tabelle 3). Die Zellen wurden im Fermenter auf Octansäure, Gluconsäure oder Glucose in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase angezogen (2.4, 3.1 und 3.2). Der dabei in den Zellen akkumulierte Polyester wurde durch Lösungsmittlextraktion von der Zelltrockenmasse getrennt, filtriert, durch Fällung in Ethanol aufgereinigt (siehe 2.7 und 3.4) und bezüglich seiner Zusammensetzung mittels Gaschromatographie analysiert (2.8). Die Menge und Zusammensetzung der für die Bestimmung der Werkstoffeigenschaften herangezogenen Polyester sind in Tabelle 10 dargestellt.

Durch die Fermentationen von *P. putida* im 20 l-Maßstab standen Polyester mit einem 4HV-Gehalt zwischen 14,5 und 47,3 mol % für Materialuntersuchungen zur Verfügung, wobei in einigen Polyestern zusätzlich Monomere mittlerer Kettenlänge (3HHx und 3HO) mit in den Polyester integriert waren (F5 bis F11). Bei den anderen Proben fehlten diese Bausteine völlig (F13 bis F16), wobei auch der Anteil von 3HB auf 1,5 bis 7,0 mol % verringert war, so daß diese Polyester im wesentlichen aus 3HV und 4HV bestanden. Die so gewonnenen Polyesterproben wurden am Institut für Polymerforschung Dresden (IPF) auf ihre Werkstoffeigenschaften und ihr Verarbeitungsverhalten untersucht.

**Tabelle 10: Menge und Zusammensetzung der für die Materialuntersuchungen eingesetzten 4HV-haltigen Polyester.**

Probe	C-Quelle (WT)		gewonnener Polyester (g)	Zusammensetzung der PHF (mol %)				
	Art	Menge (g)		3HB	3HV	4HV	3HHx	3HO
F-5	Octansäure	75 <sup>a</sup>	25,0	18,0	52,9	23,9	4,7	0,5
F-6	Octansäure	60	7,1	22,9	52,3	17,8	5,9	1,1
F-8/1	Octansäure	300	52,2	10,7	64,5	21,2	3,6	n.n.
F-8/2	Octansäure	300	17,0	13,2	62,1	22,0	2,7	n.n.
F-11	Octansäure	555	101,0	20,0	47,0	16,0	15,0	2,0
F-13	Gluconsäure	2000	71,0	2,4	50,3	47,3	n.n.	n.n.
F-14	Glucose	1080	50,0	7,0	58,4	34,6	n.n.	n.n.
F-15	Glucose	1055	100,0	1,5	84,0	14,5	n.n.	n.n.
F-16	Glucose	2000	58,0	3,7	71,3	25,0	n.n.	n.n.

Stamm: *P. putida* GPP104 (pHP1014::E156), außer F-15, F-16: *P. putida* GPP104 (pHP1014::B28RV). Abkürzungen: PHF, Polyhydroxyfettsäure; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure; 3HHx, 3-Hydroxyhexansäure; 3HO, 3-Hydroxyoctansäure; n.n., nicht nachweisbar, WT, Wachstumsphase. Kultivierungsbedingungen: Wachstumsphase: T 30°C; Belüftung 1 vvm; Tetracyclin 50 µg/ml; F-5 bis F-11: pH 8,0; F-13 bis F-16: pH 7,0; Speicherphase: F-5 und F-6: pH 7,0, T 37°C, Belüftung 1 vvm; F-8/1, F-8/2, F13-F16: pH 6,5-7,0, T 35°C, Belüftung 1,5 vvm, F-8/1 und F-8/2: Produkt F-8 nach 24 h bzw. 96 h Extraktionszeit. F-11: wie F-8, außer Belüftung 0,75 vvm.

### 3.2 Übertragung der Fermentation in den 500 l-Pilotmaßstab

Um zu zeigen, daß die Produktion 4HV-haltiger Polyester auch im industriellen Maßstab möglich ist, wurden die Fermentationen 4HV-haltiger Polyester vom 20 l-Maßstab in den 500 l-Pilotmaßstab übertragen. Hauptziele der Fermentation im großen Maßstab war eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute und eine möglichst hohe Produktqualität (in diesem Fall bedeutet dies einen hohen 4HV-Anteil) bei Einsatz von kostengünstigen Substraten. Die untersuchten Stämme von *R. eutropha* zeigten zwar ein deutlich besseres Wachstumsverhalten als die Stämme von *P. putida* auf den für Fermentationen im größeren Maßstab geeigneten Substraten wie Fructose bzw. Glucose oder Gluconsäure für *P. putida* (Abb. 2, und 3.1.6), jedoch akkumulierten sie einen Polyester mit einem deutlich geringeren Anteil von 4HV (Tabelle 8 und Tabelle 9). Von den untersuchten Stämmen der Gattung *Pseudomonas* akkumulierte der Stamm *P. putida* GPP104 (pHP1014::E156) einen Polyester mit einem höheren 4HV-Anteil als der Stamm *P. putida* GPP104 (pHP1014::B28RV) (Tabelle 8), wies jedoch ein deutlich schlechteres Wachstumsverhalten auf. Aus diesem Grund wurde *P. putida* GPP104 (pHP1014::B28RV) für die Übertragung der Fermentation in den 500 l-Maßstab gewählt.

Der mit 350 l Mineralmedium (2.2.1), Gluconsäure (0,3 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,12 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 30 l einer auf Gluconsäure gewachsenen Vorkultur angeimpft (2.4.3). In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur HPLC-Analyse der Lävulinsäure-, Gluconsäure-, 2-Ketogluconsäure- und 4HV-Konzentration im Überstand (2.5) sowie zur Bestimmung der Trockenmassekonzentration, des Polyestergehaltes und dessen Zusammensetzung (2.8.1) entnommen. Als Substratvorlage während der Wachstumsphase diente Gluconsäure, deren pH-Wert durch Zugabe von Ammoniaklösung (32 %, w/v) auf pH 7,0 eingestellt war, so daß die Ammonium-Endkonzentration 1,35 % (w/v) betrug. Anschließend wurde durch Zugabe von Na-Gluconat und Wasser eine Gluconsäure-Endkonzentration von 50 % (w/v) eingestellt (2.3.3). Die Zugabe von Substrat erfolgte immer dann, wenn die Sauerstoffkonzentration im Fermenter deutlich anstieg, was auf einen fast vollständigen Verbrauch der Kohlenstoffquelle hinwies. Um eine Anhäufung von 2-Ketogluconsäure im Medium zu verhindern, wurde die Gluconsäure in Portionen von 3,0 g/l (maximal 6,0 g/l) zugegeben. Die Ammoniumkonzentration wurde bei einem Absinken auf unter 0,2 g/l während der Wachstumsphase durch manuelle Zugabe von Ammoniumchloridlösung auf maximal 0,5 g/l ergänzt. Die Rührerdrehzahl und der Begasungsvolumenstrom wurden so eingestellt, daß die relative Sauerstoffsättigung im Medium (bezogen auf Luftsättigung) während der Wachstumsphase nicht unter 20 % und während der Speicherphase nicht unter 40 % abnahm. In der Speicherphase wurde eine Lösung aus Lävulinsäure (1,0 kg/l), Gluconsäure (150 g/l) und NaOH (20,0 g/l) eingesetzt, um den pH-Wert konstant auf 7,0 zu halten und gleichzeitig automatisch Lävulinsäure als Substrat zur Speicherung von PHF und Gluconsäure als Co-Substrat zuzugeben.

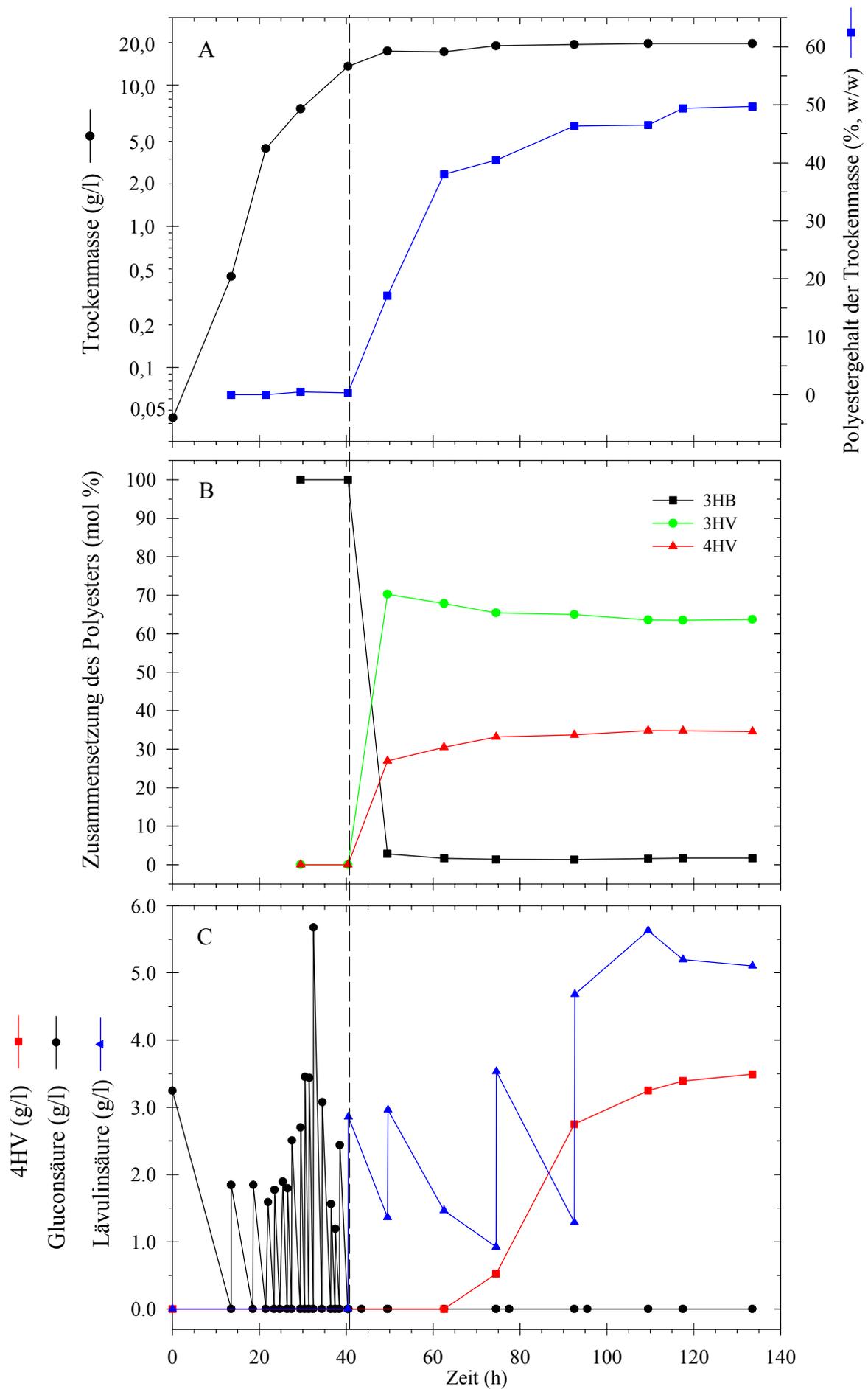
Die Trockenmassekonzentration nahm während der Wachstumsphase in den ersten 40,5 h von 0,04 g/l auf 13,6 g/l zu und stieg während der anschließenden 92-stündigen Speicherphase auf 19,7 g/l an (Abb. 17 A). Bis zum Beginn der Speicherphase akkumulierten die Zellen sehr geringe Mengen Polyester (maximaler Gehalt der Trockenmasse: 0,5 %, w/w). Ab einer Kultivierungszeit von 34,5 h wurde kein Ammonium mehr zugegeben, so daß die Ammoniumkonzentration nach einer Kultivierungszeit von 40,5 h auf 0 abgesunken war und die Bakterien in die Speicherphase übergangen. Die Temperatur wurde von 30 auf 35°C erhöht, wobei gleichzeitig Lävulinsäure in einer Konzentration von 2,9 g/l zugegeben wurde. In den ersten 20 h der Speicherphase stieg der Polymergehalt der Zellen steil auf 38 % (w/w) an und nahm dann bis zum Ende der Kultivierung kontinuierlich bis auf 50 % (w/w) zu. Nach einer Kultivierungszeit von insgesamt 133,5 h konnten 6,0 kg Zellen mit einem Polymergehalt von 3,0 kg geerntet werden. Während der Wachstumsphase wurde 2-Ketogluconsäure im Kulturüberstand kurzzeitig mit einer maximalen Konzentration von

2,5 g/l nachgewiesen, was jedoch bis zum Ende der Wachstumsphase wieder vollständig verstoffwechselt war.

Der während der Wachstumsphase in vernachlässigbarer Menge akkumulierte Polyester bestand aus Poly(3HB). Nach Zugabe der Lävulinsäure zu Beginn der Speicherphase begannen die Bakterien einen Polyester zu akkumulieren, der sich aus 2,8 mol % 3HB; 70,2 mol % 3HV und 27,0 mol % 4HV zusammensetzte (Abb. 17 B). Während der weiteren Speicherphase nahm der 3HV-Anteil am Polyester leicht ab, wohingegen der 4HV-Anteil anstieg. Am Ende der Speicherphase setzte sich der Polyester aus 1,7 mol % 3HB; 63,7 mol % 3HV und 34,6 mol % 4HV zusammen. Insgesamt wurden während der Fermentation 9,6 kg Lävulinsäure von den Zellen verstoffwechselt und 3,0 kg Polyester erzeugt, so daß die Lävulinsäure zu 31 % in Polyester umgesetzt wurde. Da in vorangegangenen Fermentationen mit *P. putida* 4HV im Medium in einer Konzentration von bis zu 3,0 g/l nachweisbar war (3.1.5.4), wurde der Überstand der 500 l-Kultur mittels Gaschromatographie (2.5.4) und HPLC (2.5.1) in regelmäßigen Abständen auf Abbauprodukte der Lävulinsäure untersucht.

Abb. 17C zeigt den Verlauf der Konzentration von Gluconsäure und Lävulinsäure im Medium, die während der Fermentation als Substrate eingesetzt wurden und die Konzentration von 4HV, das während der Speicherphase gebildet und in das Medium ausgeschieden wurde.

Nach 13,5 h war die zu Beginn der Fermentation in einer Konzentration von 3,3 g/l zugegebene Gluconsäure vollständig verstoffwechselt, woraufhin während der restlichen Wachstumsphase immer dann Gluconsäure in Portionen von 3,0 g/l bis maximal 6,0 g/l zugegeben wurde, wenn die Kohlenstoffquelle und das in geringen Konzentrationen gebildete 2-Ketogluconsäure verbraucht war. Während der Speicherphase konnten trotz der automatischen Zugabe von Gluconsäure als Co-Substrat weder Gluconsäure noch 2-Ketogluconsäure im Medium nachgewiesen werden. Zu Beginn der Speicherphase (nach 40,5 h) wurde 1,0 kg Lävulinsäure zugegeben, so daß die Konzentration im Medium 2,9 g/l betrug. Sank die Lävulinsäurekonzentration auf etwa 1,0 g/l ab, wurde sie durch manuelle Zugabe zunächst auf 3,0 g/l, später auf 5,0 g/l erhöht.



**Abb. 17: Verlauf einer 500 l-Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) mit Gluconsäure als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von Polyester (vorherige Seite).**

Der mit 350 l Mineralmedium (2.2.1), Gluconsäure (0,3 %, w/v), Ammoniumchlorid (0,12 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 30 l einer auf Gluconsäure gewachsenen Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befand, angeimpft (2.4.3). Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,0; Rührerdrehzahl, 100-300 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 0,25-0,75 vvm. Speicherparameter: Temperatur, 35°C; pH-Wert, 7,0; Rührerdrehzahl, 180-250 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 0,35-0,75 vvm. Der Beginn der Speicherbedingungen ab 40,5 h ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure. **A)** Entwicklung der Trockenmassekonzentration und des Polyestergehaltes. **B)** Molare Zusammensetzung des akkumulierten Polyesters. **C)** Verlauf der Konzentration von Gluconsäure und Lävulinsäure und Bildung von 4HV im Medium.

---

Ab einer Fermentationsdauer von ca. 74 h wurde 4HV im Medium nachgewiesen, dessen Konzentration bis zum Ende der Fermentation kontinuierlich anstieg. Am Ende der Fermentation, nach 133,5 h, wurde 4 HV mit einer Konzentration von 3,50 g/l, 3HV mit 0,18 g/l und 3HB mit 0,02 g/l im Überstand nachgewiesen. Die Gesamtmenge dieser drei im Überstand gebildeten Substanzen betrug am Ende der Fermentation 1,3 kg. Somit waren 13,5 % der verstoffwechselten Lävulinsäure in diese Metabolite umgewandelt und ins Medium ausgeschieden worden. Die Umsetzung von Lävulinsäure in Polyester betrug 31 %, so daß insgesamt 44,5 % der Lävulinsäure in die Substanzen 4HV, 3HV und 3HB umgewandelt wurden und 55,5 % von den Bakterien anderweitig verstoffwechselt wurden.

Die bisherigen Untersuchungen mit rekombinanten Stämmen von *P. putida* und *R. eutropha* stellten eine ausreichende Menge an 4HV-haltigen Polyestern für Materialuntersuchungen zur Verfügung. Dabei zeigte sich, daß die Variation der Kultivierungsbedingungen im Fermenter, wie Temperatur, pH-Wert und Belüftung oder eine Variation der Fütterungsstrategie, wie die Wahl des Wachstumssubstrates und die Verwendung eines Co-Substrates in der Speicherphase, eine Steigerung des Anteils von 4HV am Polyester über 4,3 mol % für *R. eutropha* und 44,2 mol % für *P. putida* hinaus nicht ermöglichte. Um dennoch zu einer Steigerung des 4HV-Anteils zu gelangen, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, den bakteriellen Stoffwechsel zur Bildung von 4HV positiv zu beeinflussen.

### 3.3 Optimierung der Akkumulation 4HV-haltiger Polyester durch Eingriffe in den Lävulinsäurekatabolismus von *R. eutropha* HF39

Ziel der Untersuchungen war die Erhöhung des 4HV-Anteils in dem von *R. eutropha* HF39 ausgehend von Lävulinsäure gebildeten Polyester und die Optimierung der Umsetzung von Lävulinsäure in 4HV.

Bei Anzucht von *R. eutropha* auf 4HV als alleiniger Kohlenstoffquelle wird die Akkumulation eines Terpolyesters aus 3HB, 3HV und 4HV beobachtet, wobei 3HV mit einem molaren Anteil von über 50 % den Hauptbestandteil des Polyesters darstellt (Valentin et al., 1992). Daraus wurde abgeleitet, daß 4HV nach der Aktivierung zu 4-Hydroxyvaleryl-CoA unter Beteiligung der  $\beta$ -Oxidation über 3-Hydroxyvaleryl-CoA und 3-Ketovaleryl-CoA zu Acetyl-CoA und Propionyl-CoA abgebaut wird (Valentin & Steinbüchel, 1995). Dieser Abbauweg stellt somit sämtliche für die Synthese des auftretenden Terpolyesters benötigten Substrate zur Verfügung. Da *R. eutropha* HF39 auch ausgehend von Lävulinsäure einen Terpolyester aus 3HB, 3HV und 4HV akkumulierte (Tabelle 5), scheinen die beiden Substrate 4HV und Lävulinsäure im bakteriellen Stoffwechsel in Verbindung zu stehen. Zur Aufklärung des Abbauweges von Lävulinsäure wurden Tn5-Mutanten von *R. eutropha* HF39 im Rahmen eines studentischen Praktikums erzeugt, in denen für den Lävulinsäurekatabolismus essentielle Gene inaktiviert waren. In weiterführenden Versuchen wurden die Auswirkungen einer Hemmung der  $\beta$ -Oxidation von *R. eutropha* HF39 durch Acrylsäure untersucht.

#### 3.3.1 Phänotypische Charakterisierung der Tn5-Mutanten von *R. eutropha* HF39

Tn5-Mutanten von *R. eutropha* HF39 wurden auf die Fähigkeit untersucht, Lävulinsäure als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Diejenigen Transkonjuganten, die Störungen im Abbau von Lävulinsäure aufwiesen, wurden von Stammplatten abgenommen, in steriler Saline (NaCl, 0,9 %, w/v) resuspendiert, gewaschen und mit einer Impföse auf Mineralmedienplatten überführt, die entweder Na-Lävulinat oder die Na-Salze der postulierten Intermediate des Lävulinsäurekatabolismus 4HV, 3-Pentensäure und 3HV als alleinige C-Quelle enthielten (jeweils 1,0 g/l). Durch diese phänotypische Charakterisierung sollte der jeweilige Defekt in jeder Mutante einem bestimmten Schritt im Lävulinsäurekatabolismus zugeordnet werden. Zur Kontrolle wurden die Stämme jeweils auch auf Platten mit Gluconsäure bzw. Octansäure ausgestrichen, um sicherzustellen, daß die Mutanten keine Defekte im Entner-Doudoroff-Weg bzw. in der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren aufwiesen. Anschließend wurden die Stämme für 4 Tage bei 30°C inkubiert.

Die phänotypischen Merkmale ausgewählter Mutanten von *R. eutropha* HF39 wurden in Tabelle 11 zusammengestellt. Die Stämme, die einen für die weiteren Untersuchungen nicht relevanten Phänotyp zeigten, wurden nicht mit aufgeführt. Die Mutanten ließen sich hinsichtlich ihres phänotypischen Verhaltens in zwei Klassen einteilen. Die Stämme der Klasse I zeigten kein oder nur schwaches Wachstum auf Lävulinsäure und 4HV und kein Wachstum auf 3HV, wuchsen jedoch auf Gluconsäure und Octansäure normal. Die zweite Klasse wurde von Mutanten gebildet, die kein oder nur schwaches Wachstum auf Lävulinsäure und 4HV zeigten, auf 3HV, Gluconsäure und Octansäure jedoch normales Wachstum aufwiesen. Die Mutanten SK4491, SK4525 und SK4416 wurden nicht auf 3HV getestet, eine spätere genotypische Charakterisierung zeigte jedoch ihre Zugehörigkeit zur Klasse II. Die Mutante 4508 zeigte ein normales Wachstum auf Lävulinsäure und 4HV, wurde jedoch aufgrund ihrer Fähigkeit, ausgehend von 4HV als Kohlenstoffquelle einen Polyester mit ungewöhnlich hohem 4HV-Anteil zu akkumulieren (Valentin & Steinbüchel, 1995) in die Untersuchungen mit einbezogen.

Keiner der Stämme war in der Lage, 3-Pentensäure als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Wachstumsversuche von *R. eutropha* HF39 auf Gluconsäure und Lävulinsäure (jeweils 1,0 g/l) im 50 ml-Maßstab zeigten auf beiden Substraten keine Wachstumshemmung durch 3-Pentensäure (0,5 g/l). Dies ließ darauf schließen, daß 3-Pentensäure von den untersuchten Bakterien nicht als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden kann.

**Tabelle 11: Phänotypische Charakterisierung ausgewählter Tn5-induzierter Mutanten von *R. eutropha* HF39.**

Stamm	Klasse	Läv	4HV	3-PS	3HV	Oct	Gluconsäure	NBKmSm
HF39	-	+++	+++	---	+++	+++	+++	---
VG3 (SK7532)	I	+	+	---	---	+++	+++	+++
VG17 (SK7545)	I	+	+	---	---	++	+++	+++
P2 (SK7167)	I	+	+	---	---	+++	+++	+++
SK7286	I	+	+	---	---	+++	+++	+++
SK7290	I	+	+	---	---	+++	+++	+++
SK7287	I	---	---	---	---	+++	+++	+++
VG13 (SK7538)	II	+	+	---	++	+++	+++	+++
VG16 (SK7541)	II	---	---	---	+++	+++	+++	+++
G1 (SK7205)	II	---	---	---	+++	+++	+++	+++
SK7291	II	---	---	---	+++	+++	+++	+++
SK4491	II	---	---	---	k.D.v.	+++	+++	+++
SK4525	II	---	---	---	k.D.v.	+++	+++	+++
SK4416	II	---	---	---	k.D.v.	+++	+++	+++
SK4508	-	+++	+++	k.D.v.	k.D.v.	k.D.v.	+++	+++

Die Substrate wurden dem Medium als Na-Salze zugegeben (1,0 g/l). Die Stämme wurden für 4 Tage bei 30°C inkubiert. Die Zeichen +/- symbolisieren das Wachstum der Stämme: +++ > ++ > + > ---. Bei “+++” entsprach das Wachstum nach 48 h dem Wachstum auf NB-Medium, mit Kanamycin (Km: 160 µg/ml) und Streptomycin (Sm: 500 µg/ml) (NBKmSm). Bei “---“ war kein Wachstum festzustellen. Abkürzungen: SK/VG, Stammkulturnummer in der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Steinbüchel; k.D.v., keine Daten vorliegend; 4HV, 4-Hydroxyvalerat; 3HV, 3-Hydroxyvalerat; Läv, Lävulinsäure; 3-PS, 3-Pentensäure; Oct, Octansäure.

### 3.3.2 Speicherversuche mit im Lävulinsäurekatabolismus defekten Tn5-Mutanten von *R. eutropha* HF39

Um zu untersuchen, ob Mutationen im Lävulinsäurekatabolismus ein verändertes PHF-Speicherverhalten der Mutanten zur Folge hatten, wurden Speicherversuche auf Lävulinsäure als Substrat in der Speicherphase durchgeführt. Da die Stämme auf Grund ihrer phänotypischen Eigenschaften nicht oder nur sehr schlecht in der Lage waren, auf Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen, wurden zweistufige

Speicherversuche im 50 ml-Maßstab (2.4.2) mit Gluconsäure (6,0 g/l) als Wachstumssubstrat und Lävulinsäure als Speichersubstrat durchgeführt (Dosierung in Portionen: nach 24 h: 2,0 g/l; nach 48 h und nach 60 h je 4,0 g/l). Vor jeder Lävulinsäurezugabe wurde der pH-Wert unter sterilen Bedingungen gemessen und durch entsprechende Zugabe von Lävulinsäure bzw. Na-Lävulinat auf etwa pH 7,0 korrigiert. Nach der Wachstumsphase und nach der Speicherphase wurde jeweils ein Teil der Zellen geerntet, gewaschen und einer gaschromatographischen Analyse unterworfen (2.8.1).

**Tabelle 12: Polyesterakkumulation ausgewählter Tn5-Mutanten von *R. eutropha* HF 39 mit Defekten im Lävulinsäurekatabolismus im zweistufigen Speicherversuch mit Gluconsäure als Wachstumssubstrat und Lävulinsäure als Speichersubstrat.**

Stamm	PHF-Gehalt (% TM)	Zusammensetzung des Polyesters (mol %)			4HV Überstand (g/l)
		3HB	3HV	4HV	
Nach der Wachstumsphase auf Gluconsäure					
HF39	17,3	100,0	0,0	0,0	0,0
SK7167	24,2	100,0	0,0	0,0	0,0
SK7286	26,1	100,0	0,0	0,0	0,0
SK7287	28,2	100,0	0,0	0,0	0,0
SK7290	26,2	100,0	0,0	0,0	0,0
SK7291	29,7	100,0	0,0	0,0	0,0
SK7205	31,5	100,0	0,0	0,0	0,0
SK4508	14,5	100,0	0,0	0,0	0,0
Nach der Speicherphase auf Lävulinsäure					
HF39	43,2	45,4	52,8	1,8	0,06
SK7167	38,2	72,2	23,4	4,4	0,16
SK7286	20,9	86,2	8,9	4,9	0,15
SK7287	36,0	97,9	2,1	0,0	0,00
SK7290	65,9	30,1	68,2	1,7	0,15
SK7291	40,7	91,4	7,3	1,3	0,60
SK7205	42,2	94,6	2,6	2,8	0,56
SK4508	13,0	78,7	12,0	9,3	0,10

Die Kultivierungen wurden im 50 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben bei 30°C und 150 Umdrehungen pro Minute durchgeführt (MM nach 2.2.1 mit Gluconsäure: 6,0 g/l). Dauer der Wachstumsphase: 24 h, Dauer der Speicherphase: 72 h. Die Lävulinsäure wurde in Portionen zudosiert (1 x 2,0 g/l, 2 x 4,0 g/l). Abkürzungen: PHF, Polyhydroxyfettsäure; TM, Trockenmasse; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure.

Bereits während des Wachstums auf Gluconsäure akkumulierten die untersuchten Stämme einen Polyester, der zu 100 % aus Poly(3HB) bestand und mit einem Anteil von 15 bis 32 % (w/w) zur Gesamttrockenmasse beitrug (Tabelle 12). In der Speicherphase auf Lävulinsäure nahm der PHF-Anteil an der Trockenmasse bei fast allen Stämmen auf Werte zwischen 36 und 66 % (w/w) deutlich zu, wobei zusätzlich 4HV, 3HV und 3HB in unterschiedlichen Verhältnissen in den Polyester integriert wurden. Nur bei den Mutanten SK7286 und SK4508 nahm der Anteil der PHF an der Zelltrockenmasse leicht ab. Der Ausgangsstamm *R. eutropha* HF39 akkumulierte einen Polyester, der zu etwa gleichen Teilen aus 3HB und 3HV bestand, wobei der molare Anteil von 4HV 1,8 % betrug. Mit Ausnahme des Stammes SK7290 zeigten die Polymere aller untersuchten Mutanten einen gegenüber dem Ausgangsstamm zum Teil stark verringerten 3HV-Anteil. Bei den Stämmen SK7167, SK7286, SK7205 und SK4508 war der 4HV-Anteil am Polymer mit 4,4 bis 9,3 mol % auf das 2- bis 5-fache gegenüber dem Ausgangsstamm erhöht. Der Stamm SK4508 zeigte den höchsten molaren 4HV-Anteil, wies mit einem PHF-Gehalt von 13,0 % (w/w) jedoch die deutlich geringste Gesamtspeicherrate auf. Der Stamm SK7287 wies als einziger kein 4HV im Polyester auf. Die gaschromatographische Untersuchung der Kulturüberstände (2.5.4) zeigte bei allen Stämmen außer bei SK7287 eine Anhäufung von 4HV zwischen 0,06 und 0,6 g/l im Medium, wobei die Konzentration von 4HV im Überstand der Mutanten gegenüber der des Ausgangsstammes bei den vier Mutanten SK7167, SK7286, SK7290 und SK4508 leicht und bei den beiden Mutanten SK7291 und SK7205 mit ca. 0,6 g/l auf das zehnfache erhöht war.

Um den Einfluß des Wachstumssubstrates auf die Akkumulation von PHF während der Speicherphase auf Lävulinsäure zu untersuchen, wurden zweistufige Speicherversuche im Schüttelkolben durchgeführt (2.4.2), wobei jeweils 6,0 g/l Gluconsäure, Succinat oder Fructose als Substrat in der 24-stündigen Wachstumsphase eingesetzt wurde. Während der 72-stündigen Speicherphase wurden insgesamt 10,0 g/l Lävulinsäure zudosiert (nach 24 h: 2,0 g/l; nach 48 h und nach 60 h je 4,0 g/l). Vor jeder Lävulinsäurezugabe wurde der pH-Wert unter sterilen Bedingungen gemessen und durch entsprechende Zugabe von Lävulinsäure bzw. Na-Lävulinat auf etwa pH 7,0 korrigiert. Nach der Wachstumsphase und nach der Speicherphase wurde jeweils ein Teil der Zellen geerntet, gewaschen und einer gaschromatographischen Analyse unterworfen (2.8.1). Für diese Untersuchungen wurden zwei Mutanten ausgewählt, die sich in dem vorangegangenen Speicherversuch durch einen hohen 4HV-Anteil am Polymer (SK4508) oder eine hohe Konzentration von 4HV im Überstand (SK7291) ausgezeichnet hatten (Tabelle 12). Der Ausgangsstamm *R. eutropha* HF 39 wurde als Referenz in die Untersuchungen mit einbezogen.

**Tabelle 13: Polyesterakkumulation von *R. eutropha* HF 39 und der Tn5-Mutanten SK7291 und SK4508 im zweistufigen Speicherversuch mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen als Wachstumssubstrat und Lävulinsäure als Speichersubstrat.**

Stamm	C-Quelle Wachstum	PHF-Gehalt (% TM)	Zusammensetzung des Polyesters (mol %)		
			3HB	3HV	4HV
Nach der Wachstumsphase auf je 6,0 g/l C-Quelle					
HF39	Gluconsäure	17,3	100,0	0,0	0,0
	Succinat	29,4	100,0	0,0	0,0
	Fructose	14,8	100,0	0,0	0,0
SK7291	Gluconsäure	29,7	100,0	0,0	0,0
	Succinat	28,2	100,0	0,0	0,0
	Fructose	23,5	100,0	0,0	0,0
SK4508	Gluconsäure	14,5	100,0	0,0	0,0
	Succinat	25,7	100,0	0,0	0,0
	Fructose	18,3	100,0	0,0	0,0
Nach der Speicherphase auf Lävulinsäure					
HF39	Gluconsäure	43,2	45,4	52,8	1,8
	Succinat	77,6	38,0	60,7	1,3
	Fructose	69,8	51,0	46,4	2,6
SK7291	Gluconsäure	40,7	91,4	7,3	1,3
	Succinat	46,6	87,7	9,2	3,1
	Fructose	30,7	71,3	20,3	8,4
SK4508	Gluconsäure	13,0	78,7	12,0	9,3
	Succinat	75,9	44,2	54,0	1,8
	Fructose	69,0	66,3	30,6	3,1

Die Kultivierungen wurden im 50 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben bei 30°C und 150 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Als Medium diente MM (2.2.1). Dauer der Wachstumsphase: 24 h, Dauer der Speicherphase: 72 h. Die Lävulinsäure wurde in Portionen zudosiert (1 x 2,0 g/l, 2 x 4,0 g/l). Abkürzungen: PHF, Polyhydroxyfettsäure; TM, Trockenmasse; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure.

Während der Wachstumsphase akkumulierten die Stämme einen Polyester, der zu 100 % aus Poly(3HB) bestand, wobei der Polymergehalt an der Zelltrockenmasse zwischen 15 und 30 % (w/w) betrug. Die Zellen der Mutante SK4508 zeigten während der Wachstumsphase ein ähnliches Speicherverhalten, wie die des Wildtyps, wobei die Speicherrate auf Succinat jeweils höher lag, als auf Gluconsäure oder Fructose. Die Mutante SK7291 wies im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen mit Gluconsäure und Fructose eine höhere Speicherrate auf; mit Succinat hingegen lag der Polymergehalt in dieser Mutante

leicht unter dem Wert des Ausgangsstammes. Nach der Speicherphase auf Lävulinsäure zeigte der Stamm SK4508 für Succinat und Fructose als Wachstumssubstrat die höchsten Speicherraten, wobei die Werte in einem ähnlichen Bereich lagen, wie die des Ausgangsstammes HF39. Gegenüber der Wachstumsphase war jeweils eine Steigerung des PHF-Gehaltes um 50 %-Punkte zu verzeichnen. Nach Wachstum auf Gluconsäure war der Zuwachs an PHF während der Speicherphase bei dem Stamm HF39 etwas geringer als auf Fructose und Succinat, wobei der PHF-Gehalt bei der Mutante SK4508 sogar leicht abnahm. Die Mutante SK7291 zeigte nach dem Wachstum auf allen drei Substraten in der Speicherphase mit Lävulinsäure geringere PHF-Konzentrationen, als der Ausgangsstamm HF39. Der molare Anteil von 4HV am Polymer lag bei der Mutante SK4508 mit 9,3 mol % im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen und Substraten am höchsten, wenn Gluconsäure als Kohlenstoffquelle in der Wachstumsphase diente. Der PHF-Gehalt an der Zelltrockenmasse war jedoch mit 13,0 % (w/w) vergleichsweise gering. Die Mutante SK7291 zeigte mit 8,4 mol % nach dem Wachstum auf Fructose und der Speicherphase auf Lävulinsäure den zweit höchsten 4HV-Anteil, wobei die Gesamtspeicherrate bei 30,7 % (w/w) lag. Vergleicht man die molare Verteilung der einzelnen Polyesterbausteine, so fällt auf, daß bei dem Stamm SK7291 der Anteil von 3HV am Polyester gegenüber den beiden anderen Stämmen erheblich niedriger war. Auch die Mutante SK4508 bildete nach Wachstum auf Gluconsäure einen Polyester, in dem der molare Anteil von 3HV mit 12,0 % ebenfalls deutlich niedriger war, als im Polymer von *R. eutropha* HF 39.

Um zu untersuchen, ob die bei der „*fadE2*-Mutante“ SK7291 beobachtete Verschiebung der molaren Zusammensetzung im Polyester auch bei anderen „*fadE2*-Mutanten“ zu beobachten war, wurde die PHF-Speicherung von drei anderen zur Verfügung stehenden „*fadE2*-Mutanten“ (Tabelle 2) im zweistufigen Speicherversuch, wie bereits oben beschrieben, mit Fructose als Kohlenstoffquelle während des Wachstums und Lävulinsäure während der Speicherphase untersucht.

Der molare 4HV-Anteil am Polyester der Mutanten war auf das 3- bis 4-fache gegenüber dem des Ausgangsstammes *R. eutropha* HF 39 erhöht, wobei der 3HV-Anteil auf etwa die Hälfte reduziert war. Der molare Anteil von 3HB war im Polyester der Mutanten um 12 bis 20 Prozentpunkte erhöht. Der Polyestergehalt an der Zelltrockenmasse war in allen untersuchten „*fadE2*-Mutanten“ deutlich verringert, wobei die Mutante SK7291 mit 30,7 % (w/w) den höchsten Polyestergehalt, jedoch mit 8,4 mol % den geringsten 4HV-Anteil aufwies (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Polyesterakkumulation der Tn5-Mutanten von *R. eutropha* HF 39 mit Defekten im *fadE2*-homologen Gen im zweistufigen Speicherversuch mit Fructose als Wachstumssubstrat und Lävulinsäure als Speichersubstrat.**

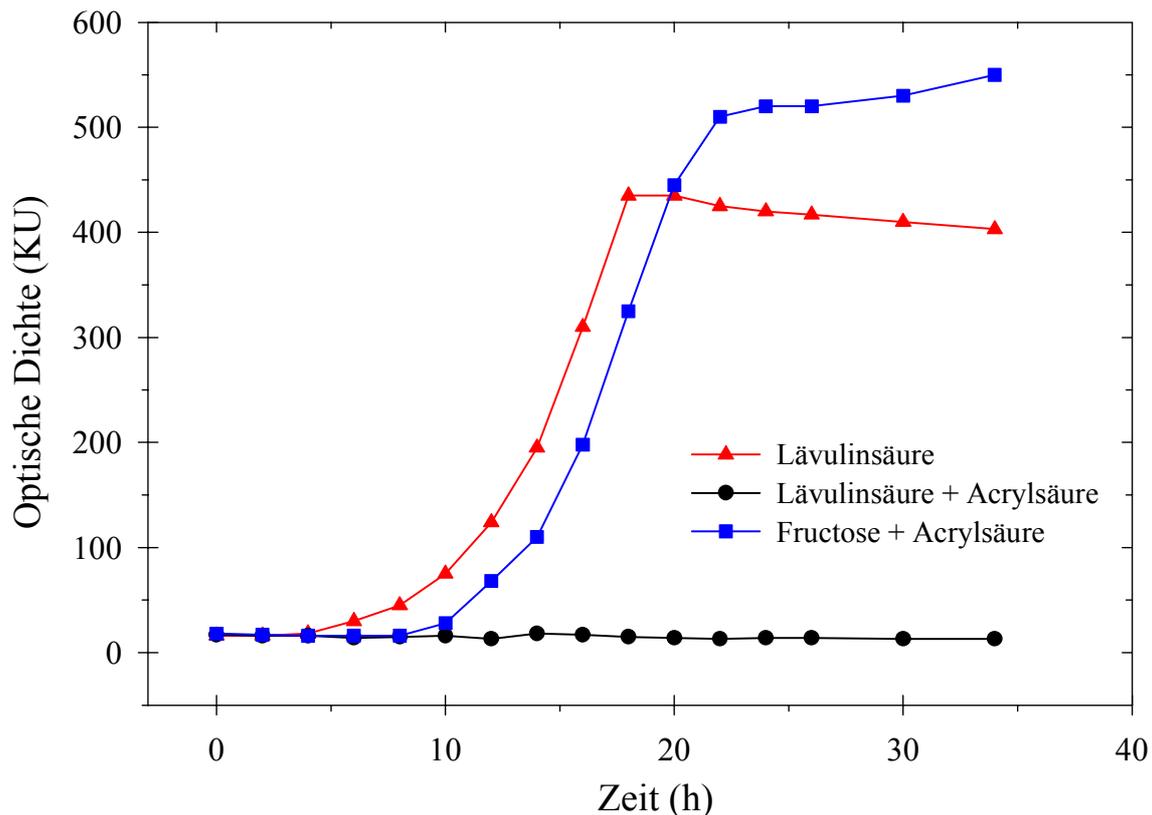
Stamm	PHF-Gehalt (% TM)	Zusammensetzung des Polyesters (mol %)		
		3HB	3HV	4HV
HF39	69,8	51,0	46,4	2,6
SK7291	30,7	71,3	20,3	8,4
SK4491	25,0	68,0	22,2	9,8
SK4525	13,3	63,0	26,3	10,7
SK4416	13,7	66,8	22,6	10,6

Die Kultivierungen wurden im 50 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben bei 30°C und 150 Umdrehungen pro Minute durchgeführt (MM nach 2.2.1 mit Fructose: 6,0 g/l). Dauer der Wachstumsphase: 24 h, Dauer der Speicherphase: 72 h. Die Lävulinsäure wurde in Portionen zudosiert (1 x 2,0 g/l, 2 x 4,0 g/l). Abkürzungen: PHF, Polyhydroxyfettsäure; TM, Trockenmasse; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure.

### 3.3.3 Hemmung der $\beta$ -Oxidation in *R. eutropha* HF 39 durch Acrylsäure

Aus Speicherversuchen mit *R. eutropha* HF 39 und *P. putida* KT 2440 war bekannt, daß während des Katabolismus von Lävulinsäure die Abbauprodukte 4HV, 3HV und 3HB als Bausteine in den Polyester integriert werden (Tabelle 5). Diese Beobachtung ließ vermuten, daß die  $\beta$ -Oxidation am Abbau der Lävulinsäure beteiligt ist. Um den Abbau der Lävulinsäure und die Akkumulation von Polyester ausgehend von Lävulinsäure genauer zu untersuchen, wurde Acrylsäure eingesetzt, die einen potenten Inhibitor der  $\beta$ -Oxidation darstellt (Thijsse, 1964).

Um zu untersuchen, ob die  $\beta$ -Oxidation am Abbau der Lävulinsäure beteiligt ist, wurde *R. eutropha* HF39 in Gegenwart von Acrylsäure (0,2 g/l) kultiviert. Als Hauptkultur dienten 50 ml MM (2.2.1) in 300 ml-Klettkolben (2.4.1) mit 2,0 g/l Lävulinsäure bzw. 10,0 g/l Fructose als einziger Kohlenstoffquelle. Als Inoculum dienten Zellen einer 20 ml NBSm-Vorkultur (2.2.2, Streptomycin 500  $\mu$ g/ml), die sich in der späten exponentiellen Phase befanden. Die Zellen wurden geerntet (4 000 Upm, 10 min, 4°C), zweimal mit steriler Saline (NaCl, 9,0 g/l) gewaschen und dann in 10 ml steriler Saline aufgenommen. Die Hauptkulturen wurden mit jeweils 5,0 % (v/v) dieser Vorkultur inokuliert und anschließend kultiviert (30°C, 150 Upm). Das Wachstum wurde über die Bestimmung der optischen Dichte unter Verwendung eines Klett-Photometers während der Kultivierung verfolgt (2.4.6).



**Abb. 18: Hemmung des Wachstums von *R. eutropha* HF 39 auf Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle durch Acrylsäure**

Die mit 50 ml Mineralmedium (2.2.1); Lävulinsäure (2,0 g/l) bzw. Fructose (10,0 g/l) gefüllten 300 ml Klett-Kolben wurden mit 2,5 ml einer gewaschenen NBSm-Vorkultur (2.2.2, Streptomycin 500 µg/ml), angeimpft. Das Wachstum wurde über die Bestimmung der optischen Dichte unter Verwendung eines Klett-Photometers während der Kultivierung auf einem Rotationsschüttler bei 150 Umdrehungen pro Minute und 30°C verfolgt (2.4.6). Abkürzungen: KU, Klett-Einheiten.

Nach einer lag-Phase von 8 h zeigte *R. eutropha* auf Lävulinsäure (2,0 g/l) gutes Wachstum bis zu einer OD von 420 KU, wohingegen in Gegenwart von Acrylsäure (0,2 g/l) kein Wachstum erkennbar war (Abb. 18). Mit Fructose (10,0 g/l) als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zeigte sich auch in Gegenwart von Acrylsäure Wachstum bis zu einer OD von 550 KU. Die Anzucht mit Fructose diente als Kontrolle, um eine generelle Wachstumshemmung durch Acrylsäure auszuschließen. Dieses Ergebnis unterstreicht die Annahme, daß die  $\beta$ -Oxidation am Abbau der Lävulinsäure beteiligt ist.

Acrylsäure kann durch seine hemmende Wirkung auch eingesetzt werden, um Intermediate der  $\beta$ -Oxidation im Stoffwechsel anzustauen, die dann verstärkt in das Polymer eingebaut werden (Qi et al., 1998). Um zu untersuchen, ob Acrylsäure auch einen positiven Einfluß auf die Speicherung 4HV-haltiger Polyester in *R. eutropha* ausgehend von Lävulinsäure hat, wurden *R. eutropha* HF39 und die beiden Mutanten SK4508 sowie SK7291 im zweistufigen Umsetzversuch im Schüttelkolben untersucht (2.4.2), wobei 4,0 g/l Fructose

als Substrat in der 24-stündigen Wachstumsphase eingesetzt wurde. Nach der Wachstumsphase wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen geerntet (4 000 Upm, 10 min, 4°C), zweimal mit steriler Saline (NaCl, 9,0 g/l) gewaschen und in 50 ml stickstofffreiem Mineralmedium (2.2.1) resuspendiert und anschließend kultiviert (30°C, 150 Upm). Während der folgenden 48-stündigen Speicherphase wurden insgesamt 12,0 g/l Lävulinsäure in Portionen zugegeben (zu Beginn, nach 24 h und 36 h je 4,0 g/l). Vor jeder Lävulinsäurezugabe wurde der pH-Wert unter sterilen Bedingungen gemessen und durch entsprechende Zugabe von Lävulinsäure bzw. Na-Lävulinat auf etwa pH 7,0 korrigiert. Acrylsäure wurde, wie in Tabelle 15 angegeben, in einer Konzentration von 1,0 g/l zugegeben. Nach der Wachstumsphase und nach der Speicherphase wurde jeweils ein Teil der Zellen geerntet, gewaschen und einer gaschromatographischen Analyse unterworfen (2.8.1). Die Konzentration an Lävulinsäure, 4HV und Acrylsäure in den Überständen wurde mittels HPLC bestimmt (2.5.1).

**Tabelle 15: Einfluß von Acrylsäure auf die Polyesterakkumulation von *R. eutropha* HF 39 und der Tn5-Mutanten SK7291 und SK4508.**

Stamm	Acryl- säure	Verbrauch Läv (mg)	PHF-Gehalt (% TM)	Zusammensetzung des Polyesters (mol %)		
				3HB	3HV	4HV
Nach der Wachstumsphase auf 4,0 g/l Fructose						
HF39	-	-	14,8	100,0	0,0	0,0
SK4508	-	-	18,3	100,0	0,0	0,0
SK7291	-	-	23,5	100,0	0,0	0,0
Nach der Speicherphase auf Lävulinsäure						
HF39	-	280	68,6	40,7	58,2	1,1
	+	100	7,5	91,9	8,1	0,0
SK4508	-	320	75,5	44,8	54,0	1,2
	+	80	14,2	93,7	6,3	0,0
SK7291	-	160	26,1	78,2	18,0	3,8
	+	120	17,8	95,9	4,1	0,0

Die Kultivierungen wurden im 50 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben bei 30°C und 150 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Als Medium diente MM (2.2.1). Dauer der Wachstumsphase auf Fructose (4,0 g/l): 24 h, Dauer der Speicherphase auf Lävulinsäure (12 g/l): 48 h. Lävulinsäure wurde in Portionen zugegeben (3 x 4,0 g/l). Acrylsäure wurde, wenn durch + angegeben, in einer Konzentration von 1,0 g/l zugegeben. Abkürzungen: Läv, Lävulinsäure; PHF, Polyhydroxyfettsäure; TM, Trockenmasse; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure.

Während der Wachstumsphase akkumulierten die Zellen bereits Poly(3HB), mit einem Gehalt von bis zu 23,5 % (w/w) an der Zelltrockenmasse (Tabelle 15). In der folgenden Speicherphase auf Lävulinsäure wurde ein Polyester akkumuliert, der das

Lävulinsäureabbauprodukt 3HV enthielt. Bei den Versuchen, bei denen keine Acrylsäure zugegeben wurde, konnte auch 4HV als Bestandteil des Polyesters identifiziert werden. Der Polyestergehalt stieg in der Speicherphase bei den Stämmen HF39 und SK4508 deutlich auf etwa 70 % (w/w), jedoch bei dem Stamm SK7291 nur auf 26,1 % (w/w) an. Bei diesem Stamm war der molare Anteil an 3HV gegenüber den beiden anderen Stämmen wesentlich reduziert und der 4HV-Anteil erhöht. Wenn in der Speicherphase Acrylsäure vorhanden war, nahm der Polyestergehalt an der Zelltrockenmasse während der Speicherphase bei allen Stämmen leicht ab, wobei der molare Anteil an 3HV am Polyester drastisch reduziert war gegenüber den Versuchen ohne Zugabe von Acrylsäure und kein 4HV nachzuweisen war. Die Analyse der Überstände ergab, daß die beiden Stämme HF39 und SK4508 etwa 300 mg Lävulinsäure umgesetzt hatten, wenn keine Acrylsäure zugegeben wurde. Der Stamm SK7291 verstoffwechselte in dieser Zeit nur etwa die Hälfte dieser Menge, wobei sich 30 mg 4HV im Überstand anhäuferten. Bei den beiden anderen Stämmen konnte kein 4HV im Überstand nachgewiesen werden. Die Zugabe von Acrylsäure reduzierte bei allen Stämmen den Verbrauch an Lävulinsäure deutlich, wobei kein 4HV im Überstand nachgewiesen werden konnte.

In einem weiteren Speicherversuch wurde untersucht, ob die Zugabe eines Co-Substrates während der Speicherphase einen Einfluß auf das Speicherverhalten der Stämme hat. Die Mutante SK7291 wurde auf Lävulinsäure und auf Acetat plus Propionat in der Speicherphase kultiviert, um festzustellen, ob das Speicherverhalten ausgehend von diesen beiden Substraten ebenfalls durch die Anwesenheit von Acrylsäure beeinflusst wird. Die Stämme wurden im zweistufigen Umsetzversuch im Schüttelkolben kultiviert (2.4.2), wobei 4,0 g/l Fructose als Substrat in der 24-stündigen Wachstumsphase eingesetzt wurde. Nach der Wachstumsphase wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen geerntet (4 000 Upm, 10 min, 4°C), zweimal mit steriler Saline (NaCl, 9,0 g/l) gewaschen und in 50 ml stickstofffreiem Mineralmedium (2.2.1) resuspendiert und anschließend kultiviert (30°C, 150 Upm). Während der folgenden 48-stündigen Speicherphase wurden insgesamt 12,0 g/l Lävulinsäure bzw. Na-Acetat und Na-Propionat zudosiert (zu Beginn, nach 12 h, 24 h und 36 h je 1,0 g/l). Vor jeder Säurezugabe wurde der pH-Wert unter sterilen Bedingungen gemessen und durch entsprechende Zugabe von Säure bzw. Na-Salz der entsprechenden Säure auf pH 7,0 korrigiert. Acrylsäure wurde, wie in Tabelle 16 angegeben, in einer Konzentration von 1,0 g/l zugegeben. Teilweise wurden wie in Tabelle 16 angegeben während der Speicherphase jeweils 4,0 g/l Fructose als Co-Substrat (4 x 1,0 g/l) zugegeben. Nach der Wachstumsphase und nach der Speicherphase wurde jeweils ein Teil der Zellen geerntet, gewaschen und einer gaschromatographischen Analyse unterworfen (2.8.1).

**Tabelle 16: Einfluß eines Co-Substrates auf die Polyesterakkumulation von *R. eutropha* HF 39 und der Tn5-Mutanten SK7291 und SK4508 unter Anwesenheit von Acrylsäure.**

Stamm	Additiv Speicherphase		PHF-Gehalt (% TM)	Zusammensetzung des Polyesters (mol %)		
	Acrylsäure	Fructose		3HB	3HV	4HV
Nach der Wachstumsphase auf 4,0 g/l Fructose						
HF39	-		7,5	100,0	0,0	0,0
SK4508	-		8,8	100,0	0,0	0,0
SK7291	-		12,7	100,0	0,0	0,0
Nach der Speicherphase auf Lävulinsäure						
HF39	-	+	80,1	60,7	38,2	1,1
	+	+	2,0	84,9	15,1	0,0
SK4508	-	+	85,4	64,8	34,2	1,0
	+	+	2,4	79,6	20,4	0,0
SK7291	-	+	46,7	84,7	13,0	2,3
	+	+	4,0	74,0	26,0	0,0
Nach der Speicherphase auf Acetat plus Propionat						
SK7291	-	-	45,0	74,7	25,3	0,0
SK7291	+	-	4,6	95,9	4,1	0,0
SK7291	+	+	3,8	95,6	4,4	0,0

Die Kultivierungen wurden im 50 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben bei 30°C und 150 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Als Medium diente MM (2.2.1). Dauer der Wachstumsphase auf Fructose (4,0 g/l): 24 h, Dauer der Speicherphase auf Lävulinsäure bzw. Propionat plus Acetat (je 12 g/l): 48 h. Lävulinsäure bzw. Propionat plus Acetat wurden in Portionen zudosiert (3 x 4,0 g/l). Acrylsäure wurde, wenn durch + angegeben, in einer Konzentration von 1,0 g/l zugegeben. Fructose wurde, wenn durch + angegeben, in einer Konzentration von 4,0 g/l zugegeben (4 x 1,0 g/l). Abkürzungen: PHF, Polyhydroxyfettsäure; TM, Trockenmasse; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure.

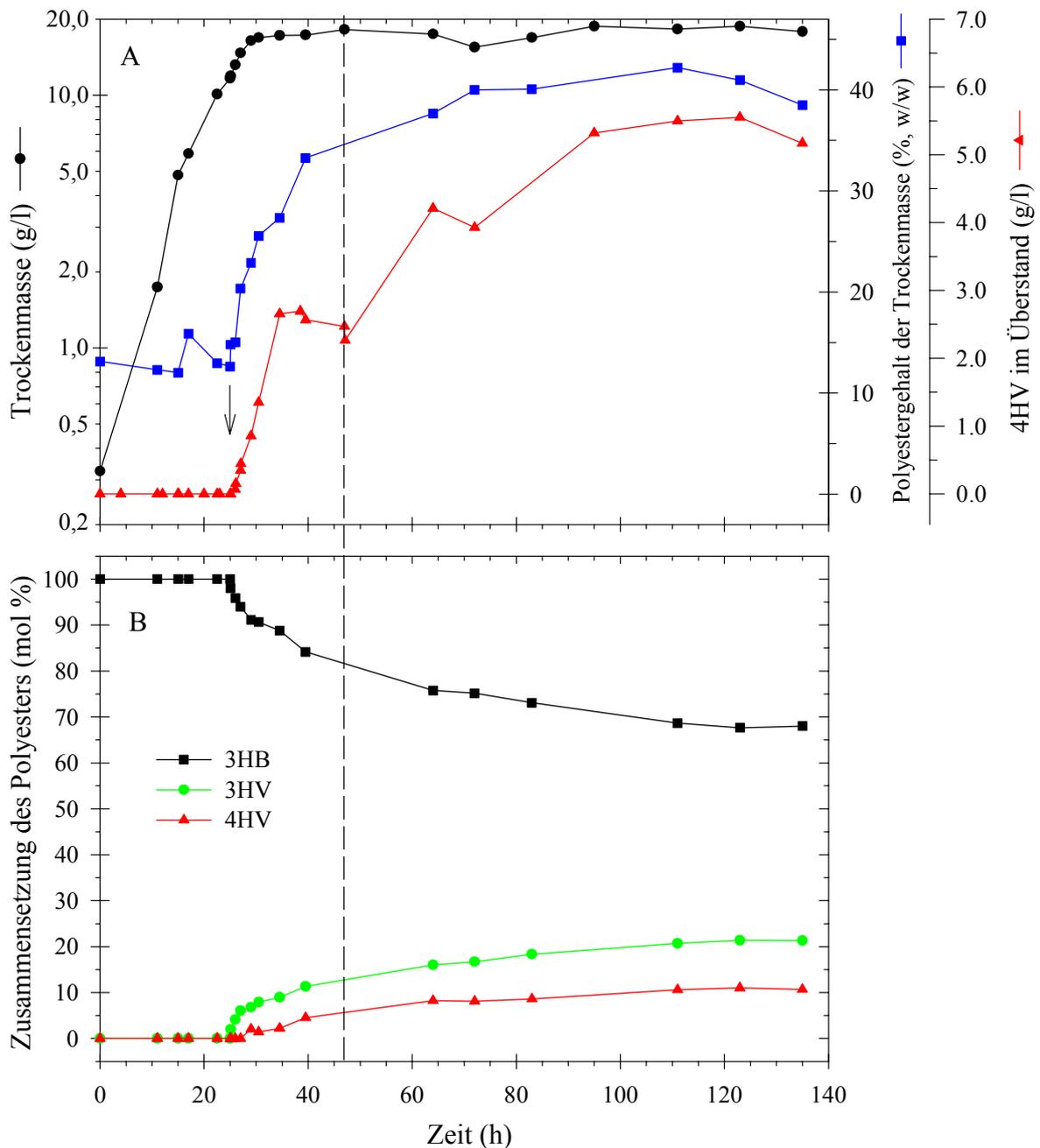
Während der Wachstumsphase akkumulierten die Zellen einen Polyester, der zu 100 % aus Poly(3HB) bestand und 7,5 bis 12,7 % (w/w) der Zelltrockenmasse ausmachte (Tabelle 16). In der Speicherphase auf Lävulinsäure verhielten sich die beiden Stämme HF39 und SK4508 annähernd gleich und akkumulierten einen Polyester, der zu 60 mol % aus 3HB und zu 40 mol % aus 3HV bestand, wobei 4HV nur mit etwa 1,0 mol % auftrat, wenn keine Acrylsäure zugegeben wurde. Der Stamm SK7291 wies eine geringere Speicherrate und einen verringerten 3HV-Anteil auf, zeigte jedoch mit 2,3 mol % einen erhöhten Anteil an 4HV. Unter Anwesenheit von Acrylsäure zeigten alle Stämme einen wesentlich verringerten Polymergehalt, der mit 2,0 bis 4,0 % (w/w) während der Speicherphase gegenüber dem PHF-Gehalt nach der Wachstumsphase sogar abnahm, wobei keine 4HV in den Polyester

integriert wurde. Diese Beobachtungen deckten sich im wesentlichen mit den Versuchen ohne Co-Substrat (Tabelle 15). Allerdings war bei den Versuchen mit Co-Substrat der Anteil an 3HV mit 15,0 bis 26,0 mol % deutlich höher, als bei den Versuchen ohne Co-Substrat. Auffällig war auch der bei dem Stamm SK7291 unter Zugabe von Acrylsäure erhöhte 3HV-Gehalt des Polyesters, während der 3HV-Anteil bei den anderen beiden Stämmen in diesem Fall verringert war (Tabelle 16). Kultivierte man den Stamm SK7291 auf Acetat plus Propionat während der Speicherphase, wurde ein Polyester aus 74,7 mol % 3HB und 25,3 mol % 3HV akkumuliert, der zu 45 % (w/w) zur Zelltrockenmasse beitrug. Unter der Anwesenheit von Acrylsäure während der Speicherphase wurde die Speicherrate auf ein Zehntel reduziert, wobei der Anteil an 3HV drastisch auf etwa 4,0 mol % zurückging. Dabei spielte es keine Rolle, ob ein Co-Substrat vorhanden war oder nicht.

### 3.3.4 Fed-Batch-Fermentation von *R. eutropha* SK7291 im 25 l-Maßstab

Wie aus den Vorversuchen hervorging, schienen Mutanten von *R. eutropha* mit einem Defekt in einem Gen, das für eine Acyl-CoA-Dehydrogenase codierte, (Tabelle 2) für die Gewinnung von 4HV-haltigen Polyestern am besten geeignet zu sein. Diese Mutanten zeichneten sich durch einen gegenüber dem Ausgangsstamm deutlich erhöhten Anteil von 4HV am Polyester aus (Tabelle 14), wobei der PHF-Gehalt der Zelltrockenmasse bei der Mutante SK7291 mit 30,7 % (w/w) am höchsten lag. Die drei anderen „*fadE2*-Mutanten“ (Tabelle 2) waren zum Zeitpunkt der Fermentation noch nicht eindeutig genotypisch charakterisiert, was zur Auswahl des Stammes SK7291 für eine 25 l-Fermentation führte. Die Mutante SK4508, die einen Defekt in einem Gen aufwies, das Homologien zu einem Phosphoenolpyruvat-Carboxylasegen aufwies (Tabelle 2), zeigte nach Wachstum auf Gluconsäure den höchsten Anteil an 4HV im gespeicherten Polyester (Tabelle 13), wies dann jedoch einen extrem geringen Polyestergehalt auf und eignete sich somit nur schlecht zur Gewinnung 4HV-haltigen Polyesters im großen Maßstab. Zudem war die Verwendung von Fructose als Wachstumssubstrat für eine Fermentation im großen Maßstab wünschenswert, da so eine automatisierte Zugabe von Ammonium realisiert werden kann. Dabei wies der Stamm SK7291 nach Wachstum auf Fructose und anschließender Speicherung auf Lävulinsäure den höchsten 4HV-Gehalt im Polyester auf (Tabelle 13).

Die automatisierte Fed-Batch-Fermentation mit dem Stamm SK7291 wurde im 25 l-Maßstab mit Fructose als Substrat in der Wachstumsphase durchgeführt (2.4.3). Der Fermenter wurde mit 24 l Mineralmedium (2.2.1), Fructose (5,0 g/l), Ammoniumchlorid (1,0 g/l) und Kanamycin (160 mg/l) gefüllt und mit 1,5 l einer auf Fructose herangezogenen Vorkultur angeimpft.



**Abb. 19: Verlauf einer automatisierten Fed-Batch-Fermentation von *R. eutropha* SK7291 auf Fructose als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von Polyhydroxyfett-säure.**

Der mit 24 l Mineralmedium (2.2.1); Fructose (5,0 g/l); Ammoniumchlorid (1,0 g/l) und Kanamycin (160 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1,5 l einer auf Fructose gewachsenen Vorkultur angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,0; Rührerdrehzahl, 300-700 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 1-1,5 vvm. Der Beginn der Zugabe von Lävulinsäure nach 25 h ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Nach 47 h wurde eine Temperatur von 35°C, ein pH-Wert von 7,0, eine Rührerdrehzahl von 350 Umdrehungen pro Minute und eine Begasungsrate von 0,3 bis 0,5 vvm eingestellt (gestrichelte Linie). Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure. **A)** Entwicklung der Trockenmassekonzentration, des Polyestergehaltes und der 4HV-Konzentration im Überstand. **B)** Molare Zusammensetzung des akkumulierten Polyesters.

In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur HPLC-Analyse des Überstandes (2.5.1) sowie zur Bestimmung der Trockenmassekonzentration und des Polyestergehaltes entnommen. Als Substratvorlage während der Wachstumsphase diente Fructose (50 %, w/v), der pH-Wert im Fermenter wurde durch Ammoniaklösung (16 %, w/v) auf pH 7,0 geregelt. Während der Speicherphase wurde Lävulinsäure (Vorlage: 950 g/l) verwendet, um den pH-Wert auf 7,0 zu regeln und gleichzeitig die von den Zellen verbrauchte Lävulinsäure automatisch zu ersetzen.

Die Trockenmassekonzentration nahm während der Wachstumsphase in den ersten 30 h von 0,33 g/l auf 17,0 g/l zu und stieg während der anschließenden 105-stündigen Speicherphase nur noch geringfügig bis auf 18 g/l an (Abb. 19 A). Das durch die Bakterien verbrauchte Ammonium wurde automatisch ersetzt, in dem der pH-Wert mittels Ammoniaklösung (16 %, w/v) auf pH 7,0 geregelt wurde. Nach 27 h Kultivierungszeit wurde die Laugenvorlage durch NaOH (5N) ersetzt. Daraufhin nahm die Ammoniumkonzentration im Medium bis zu Beginn der Speicherbedingungen (nach 47 h) auf unter 0,1 g/l ab. Der Polyestergehalt der Zelltrockenmasse betrug bis zum Beginn der ersten Lävulinsäurezugabe (nach 25 h) etwa 10 % (w/w) und stieg während der folgenden 15 h zunächst rasch auf 33 % (w/w) an. Nach einer Kultivierungszeit von 47 h wurde die Temperatur auf 35°C erhöht, die Rührerdrehzahl auf 350 Upm und die Begasungsrate auf 0,5 vvm reduziert. In der anschließenden Speicherphase stieg der Polyestergehalt der Zelltrockenmasse noch auf 42 % (w/w) an und fiel ab einer Kultivierungszeit von 111 h bis zum Ende der Fermentation nach 135 h auf einen Wert von 38,5 % (w/w) wieder leicht ab. Insgesamt wurden während der Fermentation 750 g Lävulinsäure von den Zellen verstoffwechselt und 166 g Polyester erzeugt. Eine Berechnung der Umsatzrate von Lävulinsäure in Polyester ist bei dieser Fermentation nicht möglich, da der verwendete Stamm von *R. eutropha* auch in der Lage ist, ausgehend von Fructose, die hier als Substrat in der Wachstumsphase und als Co-Substrat in der Speicherphase eingesetzt wurde, Polyester zu akkumulieren. Am Ende der Fermentation wurde der Überstand der Kultur mittels Gaschromatographie (2.5.4) und HPLC (2.5.1) auf mögliche Abbauprodukte der Lävulinsäure untersucht. Dabei wurde 4HV mit einer Konzentration von 5,10 g/l, 3HV mit 0,02 g/l und 3HB mit 0,03 g/l nachgewiesen.

In den ersten 25 h der Wachstumsphase akkumulierten die Zellen einen Polyester, der zu 100 mol % aus 3HB bestand (Abb. 19 B). Nach 25 h wurde der Kultur erstmals Lävulinsäure (1,0 g/l) zugegeben, um den Stoffwechsel der Bakterien auf den Abbau von Lävulinsäure einzustellen. Ab diesem Zeitpunkt begannen die Zellen, das Lävulinsäureabbauprodukt 3HV in den Polyester zu integrieren (Abb. 19 B), dessen molarer Anteil am Polyester in den ersten 5 h nach der Zugabe von Lävulinsäure rasch auf 8,0 mol % anstieg. Dabei nahm der Anteil von 3HB am gebildeten Polyester ab. Nach 29 h Kultivierungszeit, begannen die Zellen, auch 4HV in den Polyester einzubauen, dessen Anteil

während der ersten 17 h der Speicherphase bis auf 8,2 mol % anstieg und sich dann während der restlichen Kultivierungszeit noch auf 10,7 mol % steigerte. Am Ende der Fermentation wies der von den Zellen akkumulierte Polyester eine Zusammensetzung von 68,0 mol % 3HB; 21,3 mol % 3HV und 10,7 mol % 4HV auf.

### 3.4 Optimierung der Produktaufbereitung 4HV-enthaltender Polyester

Die Produktion größerer Mengen eines hochreinen 4HV-haltigen Polyesters, die nötig sind, um dessen Material- und Verarbeitungseigenschaften zu untersuchen, erfordert einen effektiven Prozeß zu dessen Gewinnung. Nach der biotechnologischen Produktion (3.1) liegen diese Polyester in Form von intrazellulären Granula in einer Bakteriensuspension vor. Der Trockenmassegehalt dieser Suspension lag typischerweise zwischen 10 und 40 g/l, wobei der Anteil des Polyesters an der Zelltrockenmasse 30 bis 50 % (w/w) betrug. Zur Gewinnung der Polyester aus solchen Suspensionen sind zwei Trennschritte notwendig: Zum einen muß das Wasser mit allen löslichen Medienbestandteilen von der Zellmasse, zum anderen muß die Zellmasse von dem Polyester abgetrennt werden, so daß dieser in dem für die spätere Anwendung gewünschten Reinheitsgrad vorliegt.

Zur Fest-Flüssig-Trennung wurden bisher überwiegend drei Verfahren angewandt: Die Zentrifugation, die Gefriertrocknung und die Sprühtrocknung, wobei die Sprühtrocknung einen hohen apparatetechnischen Aufwand erfordert, so daß sich dieses Verfahren hauptsächlich zur großtechnischen Produktion von Biopolyestern eignet (Holmes & Lim, 1990). Zur Abtrennung der PHF von der Zelltrockenmasse wurden überwiegend zwei Methoden angewandt: Eine Methode basiert auf der Extraktion mit chlorierten Lösungsmitteln wie Chloroform, Methylenchlorid oder 1,2-Dichloroethan (Ramsay et al., 1989). Diese Verfahren sind allerdings teuer und stellen außerdem eine hohe Umweltbelastung dar. Eine andere Methode, bei der alle Zellbestandteile außer die PHF durch Natriumhypochlorit aufgelöst wurden und die freigesetzten Granula anschließend von der Flüssigkeit abgetrennt wurden, war zwar effektiv, führte jedoch zu einer drastischen Reduktion des Molekulargewichtes des Polyesters auf etwa die Hälfte (Berger et al., 1989; Ramsay et al., 1990). Die Kombination dieser Methode mit einem Lösungsmittelextraktionsschritt wurde als Abhilfe vorgeschlagen, jedoch nie kommerziell umgesetzt (Hahn et al., 1994; Hahn et al., 1995). Statt dessen wurden im kommerziell eingesetzten Biopol-Produktionsprozeß Zellen von *R. eutropha* durch Wärmebehandlung zerstört und die entstandenen Zellreste mittels eines Enzymcocktails und einer oberflächenaktiven Substanz aufgelöst (Holmes & Lim, 1990). Zellen von *P. putida* konnten nach einem Hitzeschock durch Behandlung mit Alcalase, SDS und EDTA aufgeschlossen werden, ohne die PHF-Granula anzugreifen, jedoch stellte SDS in diesem optimierten Prozeß

eine ernsthafte Kontaminationsquelle der gewonnenen PHF dar (deKoning & Witholt, 1997). Die freigesetzten PHF-Granula konnten nur sehr schlecht durch Zentrifugation von der Flüssigkeit getrennt werden, so daß hierfür ein vergleichsweise aufwendiger Filtrationsprozeß nötig war (deKoning et al., 1997).

Im folgenden sollte die Gewinnung von hoch reinem 4HV-haltigem Polyester durch Lösungsmittelextraktion und anschließender Fällung optimiert werden.

### 3.4.1 Optimierung der Fest-Flüssig-Trennung durch Flockung

Die Durchlaufzentrifugation stellt als kontinuierliches oder semikontinuierliches mechanisches Verfahren in Verbindung mit einer nachgeschalteten Gefriertrocknung eine günstige Methode dar, polyesterhaltige Zelltrockenmasse im Pilotmaßstab zu gewinnen. Bei der Durchlaufzentrifugation von Zellsuspensionen mit *P. putida* Gp104 (pHP1014::B28RV) (2.6), die im 500 l-Maßstab auf Gluconsäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase angezogen worden waren (3.2), war trotz einer hohen Verweilzeit der Suspension in der Zentrifuge (ca. 5 min) ein Verlust an Zellmasse von über 30 % (w/w) nicht zu vermeiden. Um die Abscheidung der Zellmasse während der Zentrifugation zu verbessern, wurde ein Flockungsverfahren basierend auf der Verschiebung des pH-Wertes und der Temperatur der Zellsuspension eingesetzt, welches schon in einer Patentschrift zur Gewinnung von Poly(3HB) aus Zellen von *R. eutropha* beschrieben wurde (Walker et al., 1982). Hierzu wurde zunächst der pH-Wert im Fermenter durch Zugabe von NaOH (50 %, w/v) auf pH 8,5 eingestellt und die Temperatur auf 70°C erhöht, für 15 min gehalten und anschließend auf 25°C reduziert, wobei der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure (37 %, w/v) auf pH 4,0 eingestellt wurde. Die Rührerdrehzahl wurde während des Flockungsprozesses auf 50 Upm eingestellt. Eine Begasung fand nicht statt. Die mikroskopische Untersuchung der gebildeten Flocken ergab eine Größe von ca. 50 bis 100 µm. Die Zellen wurden mittels Durchlaufzentrifugation (CEPA, Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr, Typ Z61) bei 16 960 g abgetrennt. Der Volumenstrom wurde auf ca. 3,0 l/min eingestellt, so daß die mittlere Verweilzeit der Zellen im Rotor (Rotorvolumen 6 l) etwa 2,0 min betrug. Die Analysen des Zentrifugats ergaben, daß der Verlust an Zellmasse durch die Flockung auf unter 5 % (w/w) reduziert werden konnte.

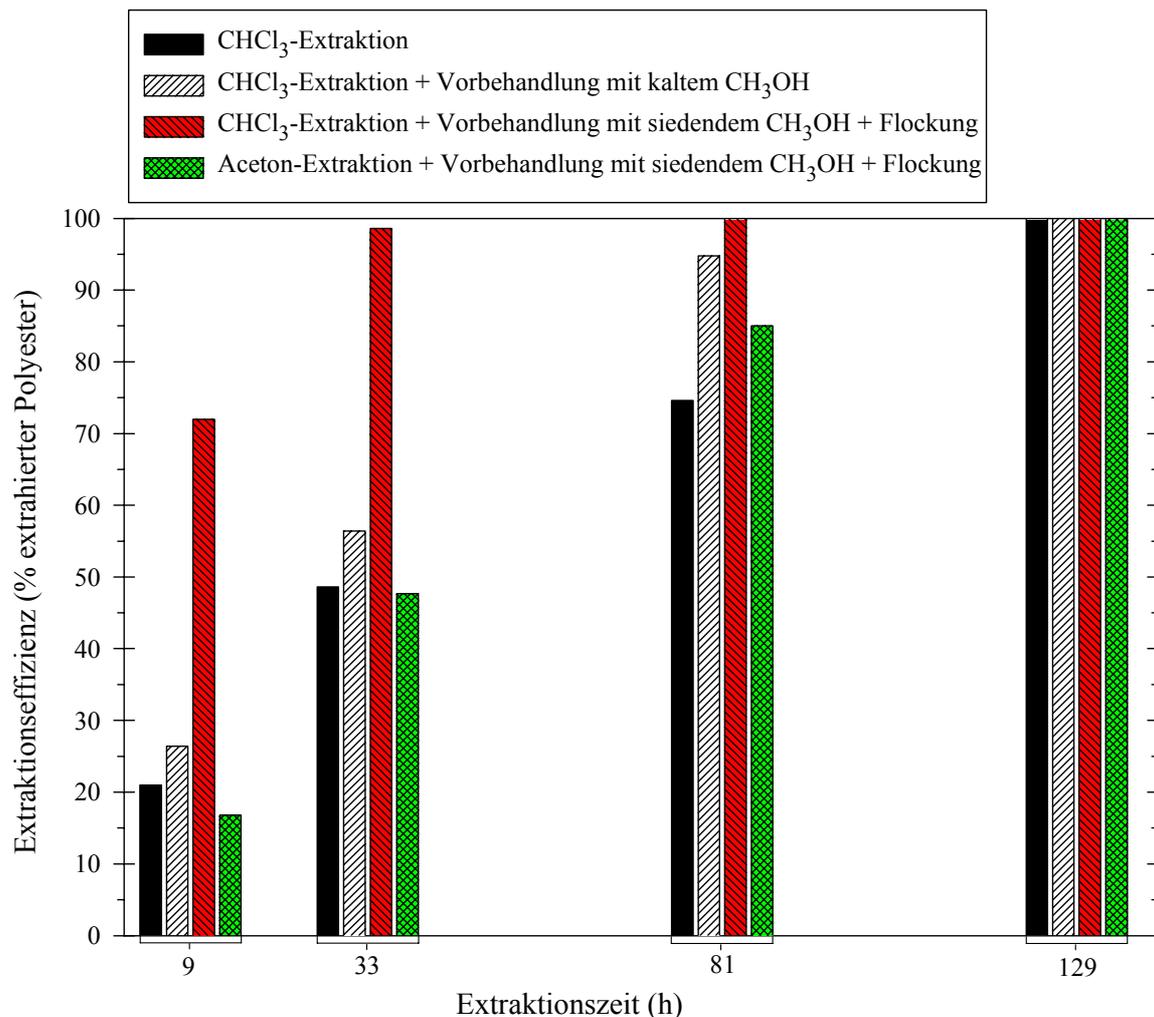
### 3.4.2 Optimierung der Isolierung von Polyhydroxyfettsäuren

Zur Gewinnung von hoch reinen Polyesterproben stellte die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln eine sehr gute Methode dar (Lageveen et al., 1988). Die auf Gluconsäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase angezogenen Zellen von *P. putida* GPP104 (pHP1014::B28RV) (2.4.4) wurden zunächst geflockt (3.4.1) und in einer Gefriertrocknungsanlage (Beta 1-16, Christ, Osterode) lyophilisiert, wobei ein Aliquot der Zellen bereits vor der Flockung entnommen wurde. Der Extraktionsverlauf der PHF aus den so gewonnenen Zellen wurde im folgenden untersucht. Hierzu wurden die lyophilisierten Zellen in einer Soxhlet-Apparatur mittels Chloroform oder Aceton extrahiert, wobei die Zusammensetzung und das Molekulargewicht des extrahierten Polyesters verfolgt wurden.

#### 3.4.2.1 Lösungsmittlextraktion in einer Soxhlet Apparatur

Nach der Gefriertrocknung wurde ein Aliquot der Zellen in Methanol resuspendiert (Konzentration 150 g/l) und für 30 min unter Rühren inkubiert. Hierbei wurde das Methanol in einigen Versuchen kurzzeitig bis zum Siedepunkt erhitzt. Nach dem Abfiltrieren der Zellen wurden diese in einem Luftstrom getrocknet. Vorversuche ergaben, daß die von *P. putida* GPP104 (pHP1014::B28RV) auf Lävulinsäure gebildeten 4HV-haltigen Polyester nicht in siedendem Methanol löslich waren, so daß diese Methode hier zur Extraktion von Lipiden eingesetzt werden konnte, ohne gleichzeitig auch den Polyester in Lösung zu bringen. Anschließend wurden jeweils ca. 250 g unbehandelte bzw. mit Methanol vorbehandelte Zellen in einer Soxhlet-Apparatur (Eigenbau, 1,5 Liter) unter Verwendung von Cellulose-Extraktionshülsen (Schleicher & Schüll, Dassel) mittels Chloroform oder Aceton unter Rückfluß für insgesamt 129 h extrahiert. Nach jeweils 9, 33, 81 und 129 Stunden wurde das Lösungsmittel erneuert und der bis zu diesem Zeitpunkt extrahierte Polyester in Ethanol gefällt und mittels Gaschromatographie und Gelpermeationschromatographie im Hinblick auf die Zusammensetzung und das Molekulargewicht analysiert (2.8).

Anhand der Auftragung des extrahierten Polyesteranteils über der Extraktionszeit (Abb. 20) kann man erkennen, daß bereits nach 9 h Extraktionsdauer über 70 % und nach 33 h etwa 99 % des in den Zellen akkumulierten Polyesters extrahiert waren, wenn die Zellen zunächst im Fermenter geflockt (3.4.1) und anschließend in siedendem Methanol vorbehandelt wurden (2.7). Ohne Vorbehandlung der Zellen waren nach 9 h erst ca. 20 % des insgesamt in den Zellen vorhandenen Polyesters extrahiert. Die Extraktion des gesamten Polyesters benötigte 129 h, wobei in den letzten 48 h noch 25 % des Polyesters extrahiert wurden.

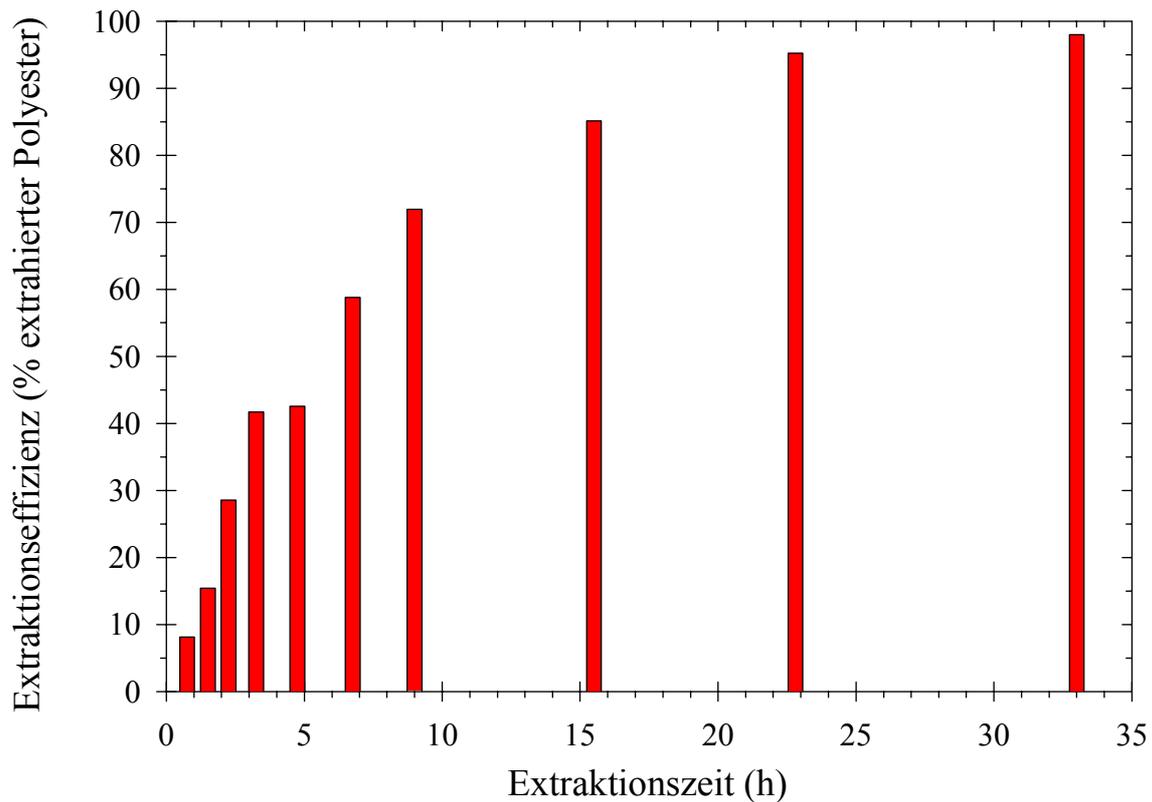


**Abb. 20: Extraktion von 4HV-haltigen Polyestern aus *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) mittels Chloroform oder Aceton nach verschiedenen Vorbehandlungen.**

Die auf Gluconsäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase angezogenen Zellen von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) (2.4.4) wurden wie angegeben vorbehandelt und getrocknet. Die Polyhydroxyfettsäuren wurden unter Rückfluß in einer Soxhlet-Apparatur (Eigenbau, 1,5 Liter) unter Verwendung von Cellulose-Extraktionshülsen (Schleicher & Schüll, Dassel) extrahiert (2.7), in Ethanol gefällt und analysiert (2.8).

Die Vorbehandlung mit kaltem Methanol führte, im Gegensatz zur Vorbehandlung mit siedendem Methanol, nur zu einer geringfügigen Verbesserung der Extraktion. Die Extraktion mit dem nicht chlorierten (und damit vom Umweltgesichtspunkt her weniger bedenklichen) Lösungsmittel Aceton verlief trotz der Vorbehandlung der Zellen durch Flockung und siedendem Methanol ähnlich wie die Extraktion mit Chloroform, wenn die Zellen keiner Vorbehandlung unterzogen wurden.

Der Verlauf der ersten 33 h einer Soxhlet-Extraktion von geflockten und mit siedendem Methanol gewaschenen Zellen mittels Chloroform wurde detailliert untersucht. Hierzu wurden in kürzeren Abständen Proben entnommen und analysiert.



**Abb. 21: Extraktion von 4HV-haltigen Polyestern aus *P. putida* GPP104 (pHP1014::B28RV) mittels Chloroform nach Flockung und Behandlung mit siedendem Methanol.**

Die auf Gluconsäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase angezogenen Zellen von *P. putida* GPP104 (pHP1014::B28RV) (2.4.4) wurden wie angegeben vorbehandelt und getrocknet. Die PHF wurden unter Rückfluß in einer Soxhlet-Apparatur (Eigenbau, 1,5 Liter) unter Verwendung von Cellulose-Extraktionshülsen (Schleicher & Schüll, Dassel) extrahiert (2.7) und anschließend in Ethanol gefällt.

In Abb. 21 ist die Ausbeute des Polyesters während der Extraktion aufgetragen. Der Verlauf der Extraktion zeigt eine kontinuierlich abnehmende Extraktionsgeschwindigkeit. Nach 9 h waren bereits 75 % des in den Zellen ursprünglich vorhandenen Polyesters extrahiert; nach weiteren 24 h wurde ein Wert von 98 % erreicht.

Um den Einfluß der Vorbehandlung der Zellen und der Extraktion der Polyester auf dessen Eigenschaften zu untersuchen, wurde die Zusammensetzung des Polyesters und dessen Molekulargewicht vor der Behandlung der Zellen und während des Extraktionsprozesses mittels Gaschromatographie und Gelpermeationschromatographie (2.8) bestimmt und in Tabelle 17 zusammengefaßt.

**Tabelle 17: Einfluß der Vorbehandlung der Zellen von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) und der Extraktion des 4HV-haltigen Polyesters auf dessen Zusammensetzung und Molekulargewicht.**

Extraktionsdauer (h)	Zusammensetzung (mol %)			$M_W$ ( $10^3$ Daltons)	Polydispersität $M_W/M_N$
	3HB	3HV	4HV		
0,0*	3,7	71,3	25,0	536,1	3,0
9,0	2,1	72,9	25,0	554,8	3,2
33,0	2,7	71,8	25,5	513,8	2,9
91,0	3,0	72,0	25,0	551,4	3,1
129,0	2,8	71,9	25,3	502,4	3,0

Die auf Gluconsäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase angezogenen Zellen von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) (2.4.4) wurden geflockt, in kaltem Methanol gewaschen und getrocknet. Die Polyester wurden unter Rückfluß in einer Soxhlet-Apparatur (Eigenbau, 1,5 L) mittels Aceton unter Verwendung von Cellulose-Extraktionshülsen (Schleicher & Schüll, Dassel) extrahiert (2.7), in Ethanol gefällt und analysiert (2.8). Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure;  $M_W$ , Molekulargewicht (Gewichtsmittel);  $M_N$ , Molekulargewicht (Zahlenmittel); \* Probe ohne Flockung nach Methanolwaschgang durch kalte Extraktion mittels Chloroform (72 h) gewonnen (2.7).

Während der gesamten Extraktionsdauer von 129 h konnte im Rahmen der Meßgenauigkeit keine Veränderung in der molaren Zusammensetzung des Polyesters festgestellt werden. Das Molekulargewicht ( $M_W$ ) und der Polydispersitätsindex ( $M_W/M_N$ ) wiesen Schwankungen von maximal 10 % auf und zeigten damit im Rahmen der Meßgenauigkeit ebenfalls keine signifikanten Veränderungen. Auch gegenüber der ungeflockten und kalt extrahierten Probe (Tabelle 17, Probe 0,0\*) konnten keine bedeutenden Veränderungen in der Zusammensetzung oder dem Molekulargewicht festgestellt werden.

Ein Vergleich der gaschromatographischen Analysen des aus mit siedendem Methanol vorbehandelten Zellen gewonnenen Polyesters mit dem aus unbehandelten Zellen zeigte eine wesentlich geringere Kontamination des vorbehandelten Polyesters mit freien Fettsäuren, so daß mindestens einer der drei zur Reinigung notwendigen Ethanolfällungsschritte eingespart werden konnte, um einen entsprechenden Reinheitsgrad des Polyesters zu erlangen.

### 3.4.2.2 Behandlung der Zellen mit Natronlauge

Die Auflösung von nicht PHF-Zellmaterial durch Natronlauge wurde als weitere Alternative zur Methanol-Vorbehandlung der Zellen untersucht, die schließlich zu einer effektiveren Gewinnung der Polyester führen sollte. Hierzu wurden Zellen von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) im 20 l-Maßstab auf Gluconsäure in der Wachstumsphase und

Lävulinsäure in der Speicherphase angezogen (2.4.4), durch Zentrifugation in einer Durchlaufzentrifuge geerntet und anschließend lyophilisiert (2.6). Daraufhin wurden 50 g der Zellen in 1 Liter Natronlauge (0,5 N) resuspendiert und unter Rühren auf 30°C erhitzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde die Natronlauge durch Salzsäure (37 %, w/w) neutralisiert. Nach dem Abkühlen der Suspension auf Raumtemperatur wurde ein Aliquot der Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 13 000 Upm (Biofuge A, Heraeus Christ, Osterode) geerntet, zweimal mit Saline (NaCl 0,9 %, w/v) gewaschen, lyophilisiert (2.6) und mittels Gaschromatographie analysiert (2.8). Die Ausgangszellen enthielten 50,0 % (w/w) eines Polyesters, der sich aus 1,7 mol % 3HB; 63,7 mol % 3HV und 34,6 mol % 4HV zusammensetzte. Durch die Behandlung mit Natronlauge wurde der Polyestergehalt an der Zelltrockenmasse von 50 % (w/w) auf 75,3 % (w/w) der Rest-Zelltrockenmasse erhöht, wobei sich die Zusammensetzung des Polyesters im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht änderte. Dies bedeutet, daß 67,2 % des zu Beginn vorhandenen Nicht-PHF-Zellmaterials während der Behandlung mit Natronlauge aufgelöst wurde. Im Vergleich hierzu konnte Poly(3HB) aus rekombinanten Zellen von *Escherichia coli*, die einen Polyestergehalt von 77 % (w/w) aufwiesen, durch die Behandlung mit NaOH (0,2 N) unter den ansonsten gleichen Bedingungen mit einer Reinheit von 98,5 % gewonnen werden (Choi & Lee, 1999).

### 3.4.2.3 Sequentielle Extraktion mit siedendem Chloroform

Zellen von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) wurden im 20 l-Maßstab auf Gluconsäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase angezogen (2.4.4), durch Zentrifugation in einer Durchlaufzentrifuge geerntet und anschließend lyophilisiert (2.6). Daraufhin wurden 360 g der Zellen mit einem Polyestergehalt von 44,0 % (w/w) (Zusammensetzung: 1,7 mol % 3HB; 63,7 mol % 3HV und 34,6 mol % 4HV) in 2 Litern Chloroform resuspendiert und unter Rückfluß für 30 Minuten mit siedendem Chloroform extrahiert. Nach dem Abkühlen der Suspension wurden die Zellen zunächst grob mittels eines handelsüblichen Stahlküchensiebes (Maschenweite 1,0 mm) abgetrennt, in frischem Chloroform (2 l) resuspendiert, erneut unter Rückfluß für 6 h extrahiert und filtriert. Durch den ersten Grobfiltrationsschritt konnten über 95 % der Zellmasse abgetrennt werden. Die so gewonnenen Polyesterlösungen wurden anschließend mittels eines Edelstahl-Feinfilters (Trenngrenze 3 bis 7 µm) filtriert und der Polyester in Ethanol gefällt (2.7). Die Restzellen und die Polyesterproben wurden in einem Luftstrom getrocknet und mittels Gaschromatographie analysiert.

**Tabelle 18: Sequentielle Extraktion von 4HV-haltigem Polyester mit siedendem Chloroform unter Rückfluß**

Gesamtextraktionszeit (h)	Menge der extrahierten PHF (g)	PHF Restgehalt der Zellen (%, w/w)
0,0*	-	44,0
0,5	91,2	25,0
6,5	61,0	3,0

Die auf Gluconsäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase angezogen Zellen von *P. putida* GPP104 (pHP1014::B28RV) (2.4.4) wurden geflockt, in siedendem Methanol gewaschen und getrocknet. Die extrahierten Polyester wurden in Ethanol gefällt und ebenso wie die Restzellen analysiert (2.8). Abkürzungen: PHF, Polyhydroxyfettsäure; \* Probe vor der Extraktion.

Nach einer Extraktionszeit von 30 Minuten wurden bereits 91,2 g Polyester extrahiert. Dies entsprach 57,6 % des insgesamt in den Zellen vorhandenen Polyesters. Nach weiteren 6 Stunden Extraktion konnten 61,0 g Polyester gewonnen werden, wobei der Polymergehalt der Zellen nach der Extraktion 3,0 % (w/w) betrug (Tabelle 18).

### 3.5 Nachweis von Polyhydroxyfettsäuren durch Nilrot

Analytische Methoden zur Bestimmung des PHF-Gehaltes von Zellen basierten bisher im wesentlichen auf der Gaschromatographie (Braunegg et al., 1978), NMR (Bloembergen et al., 1986; Doi et al., 1986) oder der Massenspektrometrie (Ballistreri et al., 1989). Diese Methoden erfordern eine aufwendige, zeitintensive Probenvorbereitung und einen hohen apparativen Aufwand. Eine effektive Prozeßkontrolle und Optimierung der biotechnologischen Produktion von PHF bedarf einer verlässlichen, schnellen und kostengünstigen Überwachungsmethode der Produktkonzentration. Optische Methoden bieten sich hierfür an. Erste Ergebnisse für den Nachweis von Polyhydroxybuttersäure mittels Anfärbung durch Nilrot sind bereits mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Methoden bzw. Durchflußzytometrie erhalten worden (Müller et al., 1995; Deglau et al., 1995), wobei letzteres Verfahren auch die Analyse von Partikelgrößenverteilungen in der Biotechnologie ermöglicht (Akerlund et al., 1995). Diese neuen optischen Methoden bieten den Vorteil einer raschen, zerstörungsfreien Produktüberwachung „at-line“.

Ziel der im folgenden dargestellten Untersuchungen war, diese Methode von Poly(3HB) auf eine Vielzahl verschiedener bakterieller PHF zu übertragen und die Voraussetzungen für eine Quantifizierung des PHF-Gehaltes von Bakteriensuspensionen zu erarbeiten. Hierzu wurden sowohl isolierte Filme und Granula als auch Polyester in lebenden Zellen durch Nilrot angefärbt und mittels 2-D-Fluoreszenzspektroskopie und Flow

Cytometrie untersucht. Abschließend wurde die erarbeitete Methode auf eine Kultivierung von *P. putida* im 15 l-Maßstab angewandt.

### 3.5.1 2-D-Fluoreszenzspektren verschiedener Polyhydroxyfettsäuren

Verschiedene bakterielle Polyhydroxyfettsäuren wurden durch die Kultivierung von Bakterien mit den in Tabelle 19 angegebenen Kohlenstoffquellen in den Zellen (Tabelle 1, Tabelle 3) akkumuliert (2.4.2) und isoliert (2.7).

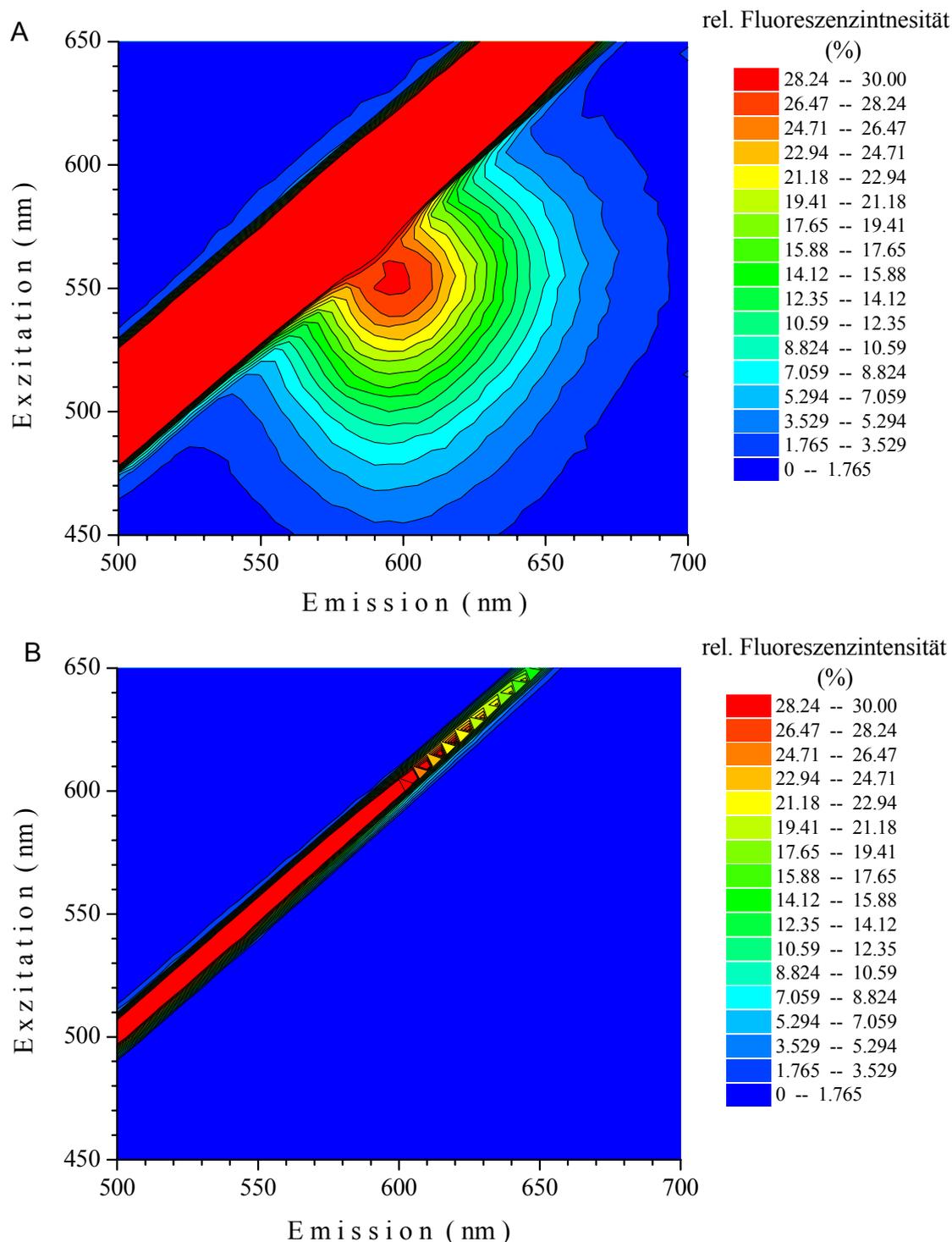
Die Fluoreszenzspektren dieser Polyhydroxyfettsäuren wurden nach Anfärbung mit Nilrot *in vivo* (2.9.3) und *in vitro* (2.9.2) mittels 2-D-Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Das so gewonnene 2-D-Fluoreszenzspektrum eines isolierten Poly(3HB)-Films nach der Anfärbung mit Nilrot ist in Abb. 22 A dargestellt. Man erkennt ein deutliches Fluoreszenzmaximum bei einer Exzitationswellenlänge von 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 600 nm. Derselbe Polyesterfilm zeigte keine Fluoreszenz, wenn er nicht mit Nilrot angefärbt wurde (Abb. 22 B). Auch die wäßrige Lösung von Nilrot ohne die Gegenwart eines Polymers zeigte keinerlei Fluoreszenzsignal.

Diese Methode wurde auf Zellen *in vivo* übertragen, um die Möglichkeit der schnellen Quantifizierung von PHF während einer Fermentation zu gewährleisten. Abb. 23 A zeigt das 2-D-Fluoreszenzspektrum einer Suspension von *R. eutropha* H16 Zellen, die im einstufigen Speicherversuch im 50 ml-Maßstab mit 1,5 % (w/v) Gluconsäure kultiviert wurden (2.4.2). Unter diesen Bedingungen speicherte *R. eutropha* H16 einen Homopolyester aus Poly(3HB) (Tabelle 19). Das Fluoreszenzmaximum lag bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm. Im Vergleich zu dem isolierten Poly(3HB)-Film konnte eine leichte Verschiebung des Maximums zu höheren Wellenlängen festgestellt werden. Eine Suspension Poly(3HB)-freier Zellen der Poly(3HB)-negativen Mutante *R. eutropha* H16-PHB<sup>-</sup>4, die unter denselben Bedingungen angezogen wurden, zeigte bei etwa der gleichen optischen Dichte in diesem Wellenlängenbereich nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal, verglichen mit den Zellen des Wildtyps (Abb. 23 B).

**Tabelle 19: Verwendete Bakterienstämme und Kohlenstoffquellen zur Erzeugung verschiedener bakterieller Poly(hydroxyfettsäuren)**

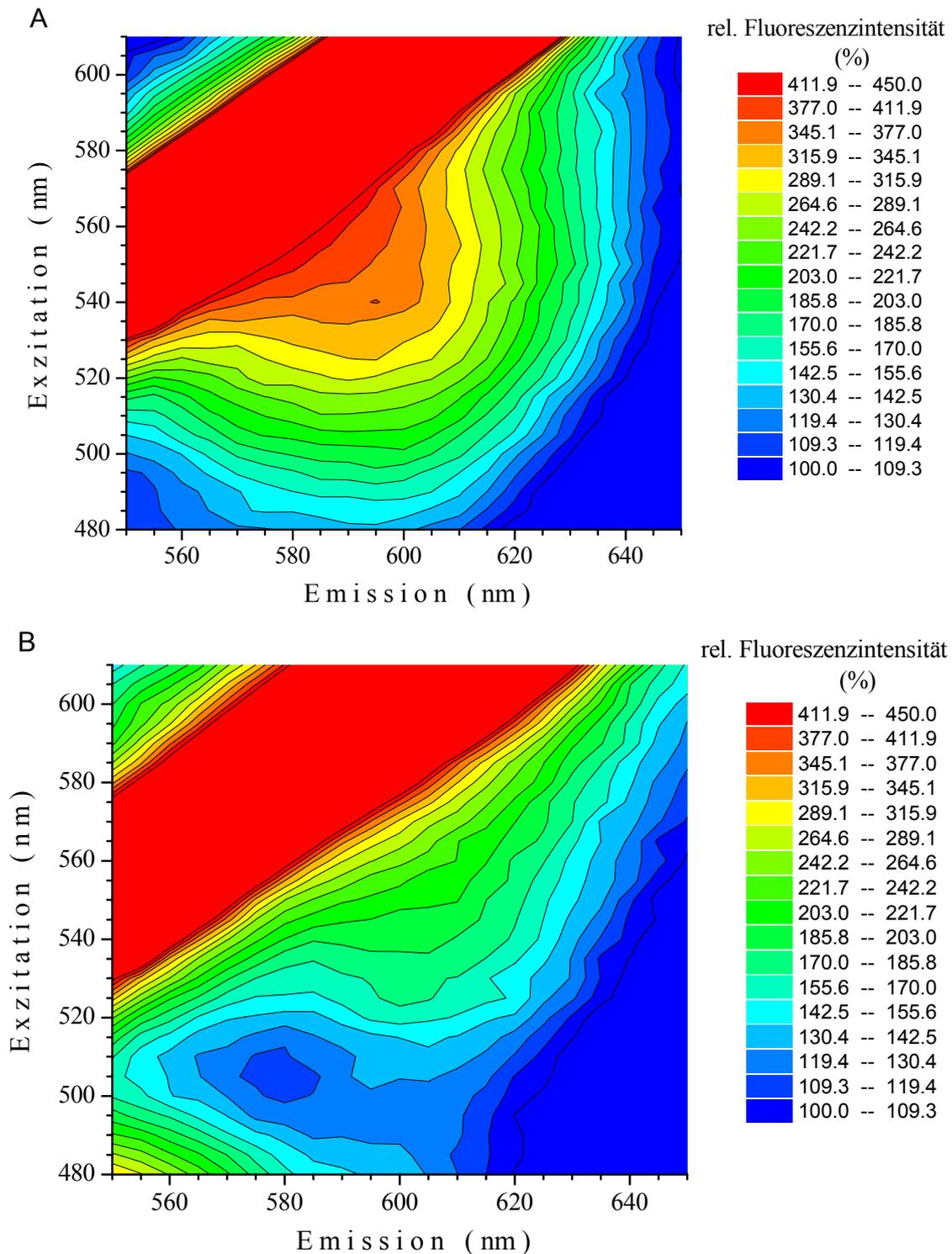
Stamm (Plasmid)	C-Quelle	Polyester
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	Gluconsäure, 1,5 %	Poly(3HB)
<i>R. eutropha</i> PHB <sup>-</sup> 4 (PHF-negative Mutante von H16)	Gluconsäure, 1,5 %	-
<i>R. eutropha</i> H2275 (PHF-leaky-Mutante von H16)	Fructose, 1,0 %	Poly(3HB)
<i>Pseudomonas putida</i> GPp104 (pHP1014::B28RV)	Lävulinsäure, 3 x 0,2 %	Poly(3HB-co-3HV-co-4HV)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Valeriansäure, 3 x 0,3 %	Poly(3HV)
<i>P. oleovorans</i> ATCC 29347	Octansäure, 0,3 % + 0,5 %	Poly(3HO)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Decansäure, 0,3 % + 0,5 %	Poly(3HD)
<i>P. putida</i> GPp104 (pHP1014::E156)	Octansäure, 0,2 %, Lävulinsäure 3 x 0,2 %	Poly(3HB-co-3HV-co-4HV-co-3HHx-co-3HO)
<i>Escherichia coli</i> (pKSSE5,3)	Glucose, 1,0 %, 4HB 3 x 0,3 %	Poly(4HB)

Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure; 3HHx, 3-Hydroxyhexansäure; 3HO, 3-Hydroxyoctansäure; 3HD, 3-Hydroxydekansäure; 4HB, 4-Hydroxybuttersäure; %-Angaben in % (w/v). Zur genauen Charakterisierung und Herkunft der aufgeführten Stämme und verwendeten Plasmide siehe Tabelle 1 und Tabelle 3.



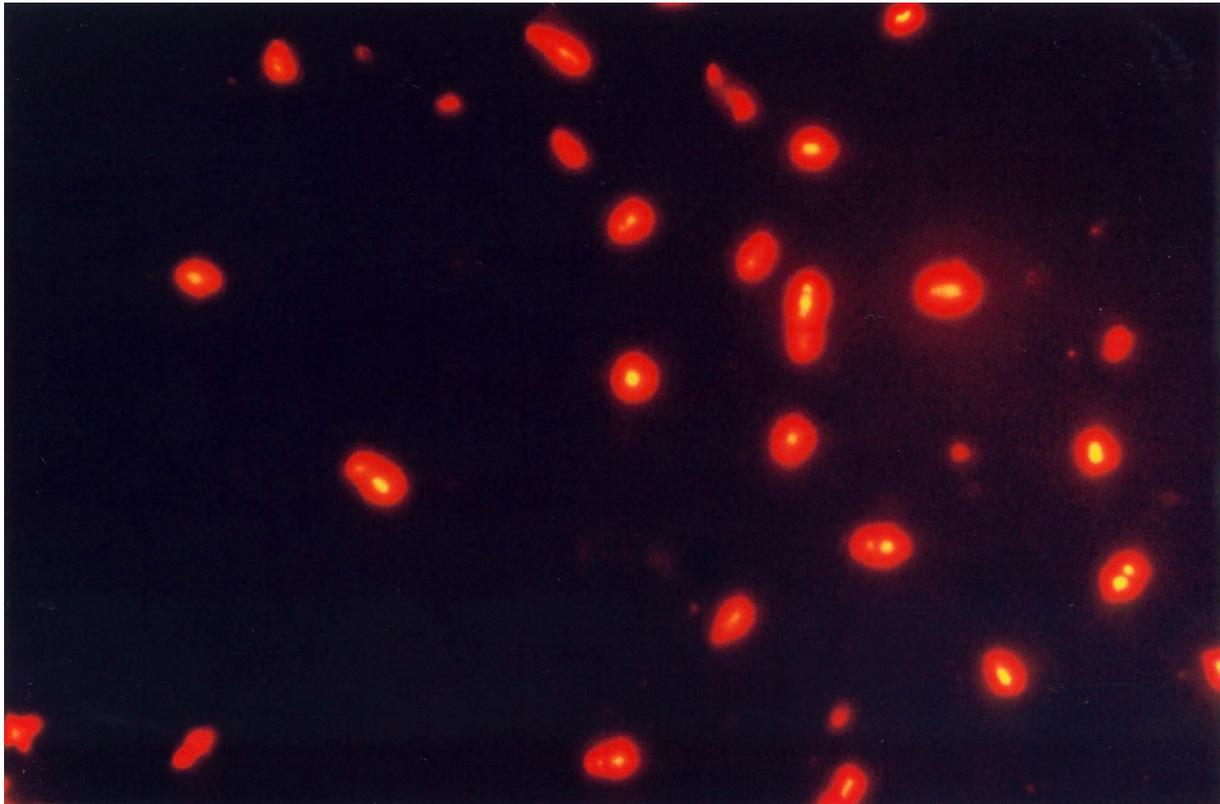
**Abb. 22: 2-D-Fluoreszenzspektren von isoliertem Poly(3HB).**

Meßbedingungen: Scangeschwindigkeit  $2\,400\text{ nm min}^{-1}$ , Exzitationswellenlängenbereich 450-650 nm, Emissionswellenlängenbereich 500-700 nm, Schrittweite der Exzitationswellenlänge bzw. Emissionswellenlänge 10 nm, Exzitationsschlitz 20 nm, Emissionsschlitz 10 nm, Verstärkerspannung 700 V. Für B): Exzitationsschlitz 5 nm, Emissionsschlitz 5 nm. **A)** Nach Anfärbung mit Nilrot. **B)** Ohne Anfärbung mit Nilrot.



**Abb. 23: 2-D-Fluoreszenzspektren von *R. eutropha* H16-Zellen nach Anfärbung mit Nilrot**

Meßbedingungen: Scangeschwindigkeit 3 000 nm min<sup>-1</sup>, Exzitationswellenlängenbereich 480-610 nm, Emissionswellenlängenbereich 550-650 nm, Schrittweite der Exzitationswellenlänge bzw. Emissionswellenlänge 5 nm, Exzitationsschlitz 10 nm, Emissionsschlitz 10 nm, Verstärkerspannung 700 V. **A)** *R. eutropha* H16 (OD 600 nm: 0,7). **B)** Poly(3HB)-negativer Stamm *R. eutropha* H16-PHB4 (OD 600 nm: 0,6).



**Abb. 24:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *Pseudomonas putida* (pHP1014::B28RV)-Zellen nach Anzucht auf Lävulinsäure.

Die Zellen wurden nach 2.4 angezogen und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt (2.9.4).

Auf der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von *P. putida* (pHP1014::B28RV)-Zellen nach Anzucht auf Lävulinsäure kann man deutlich fluoreszierende granuläre Strukturen innerhalb der Zellen erkennen, die von schwach fluoreszierenden Zellmembranen umgeben sind (Abb. 24). Dieses Ergebnis zeigt, daß Nilrot neben einer intensiven Anfärbung von PHF-Granula auch in der Lage ist, andere Bereiche der Zellen, wie zum Beispiel die Zellmembran, anzufärben.

Das Fluoreszenzverhalten eines chemisch synthetisierten und von sieben verschiedenen, biologisch hergestellten Polyestern wurde sowohl in lebenden Zellen als auch von isolierten Filmen nach Anfärbung mit Nilrot untersucht, um die Analysenmethode von Poly(3HB) auch auf andere Polyhydroxyfettsäuren zu übertragen. Alle untersuchten Polyester zeigten nach Anfärbung mit Nilrot ein ähnliches Fluoreszenzverhalten, wobei das Fluoreszenzmaximum bei einer Exzitationswellenlänge zwischen 540 und 560 nm und einer Emissionswellenlänge zwischen 570 und 605 nm lag. Die Daten der Fluoreszenzmaxima der einzelnen Polyester, die gemäß Tabelle 19 hergestellt wurden, sind in Tabelle 20 aufgelistet.

**Tabelle 20: Fluoreszenzmaxima der untersuchten Polyester als isolierte Filme und in lebenden Zellen nach Anfärbung mit Nilrot.**

Polyester	Filme,		Zellen,	
	Wellenlängen-Maxima (nm)		Wellenlängen-Maxima (nm)	
	Exzitation	Emission	Exzitation	Emission
Poly(3HB)	550	590	560	595
Poly(3HV)	545	580	555	600
Poly(3HO)	540	575	545	605
Poly(3HD)	540	570	545	600
Poly(3HB-co-3HV-co-4HV)	550	590	-	-
Poly(3HB-co-3HV-co-4HV-co-3HHx-co-3HO)	-	-	550	600
Poly(4HB)	550	590	540	585
Poly (R,S-3HB)	550	600	-	-

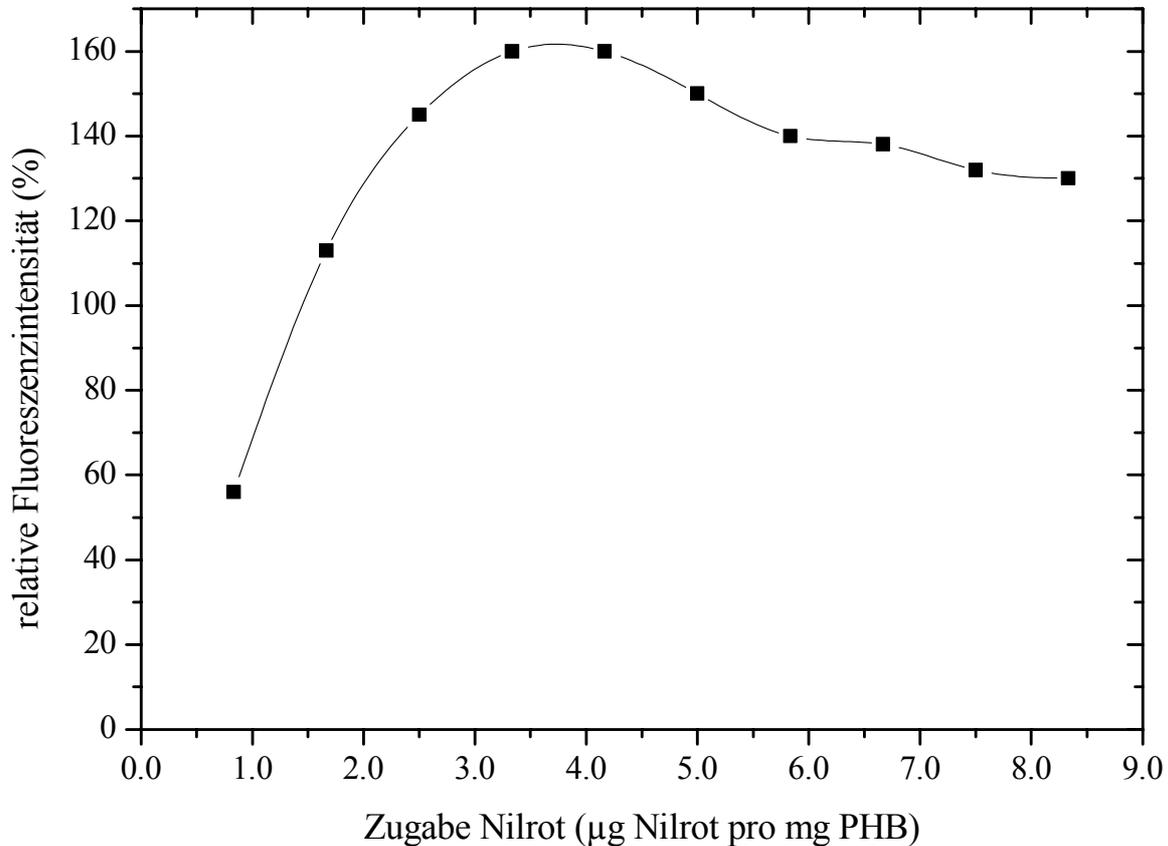
Meßbedingungen: Exzitationswellenlängenbereich 480-610 nm, Emissionswellenlängenbereich 550-650 nm, Schrittweite der Exzitationswellenlänge bzw. Emissionswellenlänge 5 nm, Exzitations-schlitz 10 nm, Emissionsschlitz 10 nm, Verstärkerspannung 700 V. Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure; 3HHx, 3-Hydroxyhexansäure; 3HO, 3-Hydroxyoctansäure; 4HB, 4-Hydroxybuttersäure; -, keine Daten vorliegend.

Der Wert für das jeweilige Fluoreszenzmaximum war bei lebenden Zellen gegenüber den isolierten Polyesterfilmen leicht zu höheren Wellenlängen verschoben (außer bei Poly(4HB)). In allen weiteren Experimenten wurde deshalb eine Exzitationswellenlänge von 550 nm und eine Emissionswellenlänge von 600 nm gewählt.

### 3.5.2 Quantifizierung von bakteriellen Polyhydroxyfettsäuren durch Anfärbung mit Nilrot

Um die optimalen Bedingungen für eine Quantifizierung des PHF-Gehaltes von Zellsuspensionen zu bestimmen, wurde der Effekt der Nilrotkonzentration auf die Fluoreszenzintensitäten angefarbter Polyester untersucht. Für diesen Zweck wurden native Granula von *R. eutropha* H16 isoliert (2.9.1) und in H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> resuspendiert, wodurch eine Poly(3HB)-Konzentration von 0,3 mg ml<sup>-1</sup> eingestellt wurde. Diese Granula-Suspension wurde in Portionen von 0,25 bis 1,25 µl einer Nilrot-Stammlösung (1,0 mg ml<sup>-1</sup> Nilrot in Aceton) angefärbt, bis bei einer Konzentration von 3,5 µg Nilrot pro mg Poly(3HB) Sättigung erreicht war (Abb. 25). Bei allen weiteren Experimenten mit Granula wurden jeweils 2,5 µl Nilrot-Stammlösung zu 1,0 ml Granula-Suspension zugegeben (Endkonzentration

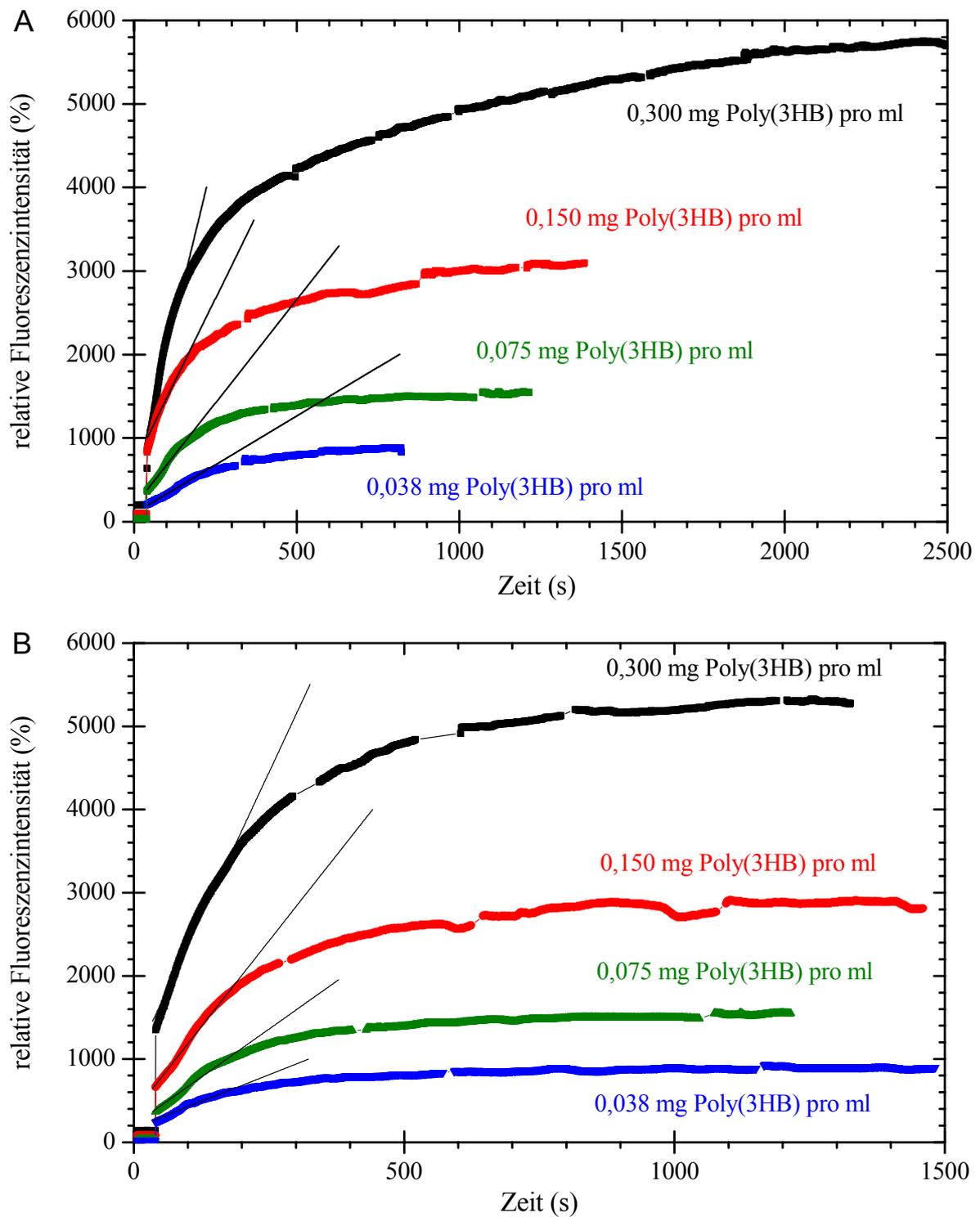
Nilrot:  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), wobei die maximale Konzentration an Poly(3HB) von  $0,6 \text{ mg ml}^{-1}$  nicht überschritten wurde, um Sättigung zu gewährleisten. Bei Experimenten mit Zellen mußte eine größere Menge an Farbstoff zugegeben werden ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), um Sättigung zu gewährleisten.



**Abb. 25: Sättigungskurve für die Anfärbung von Poly(3HB)-Granula mit Nilrot**

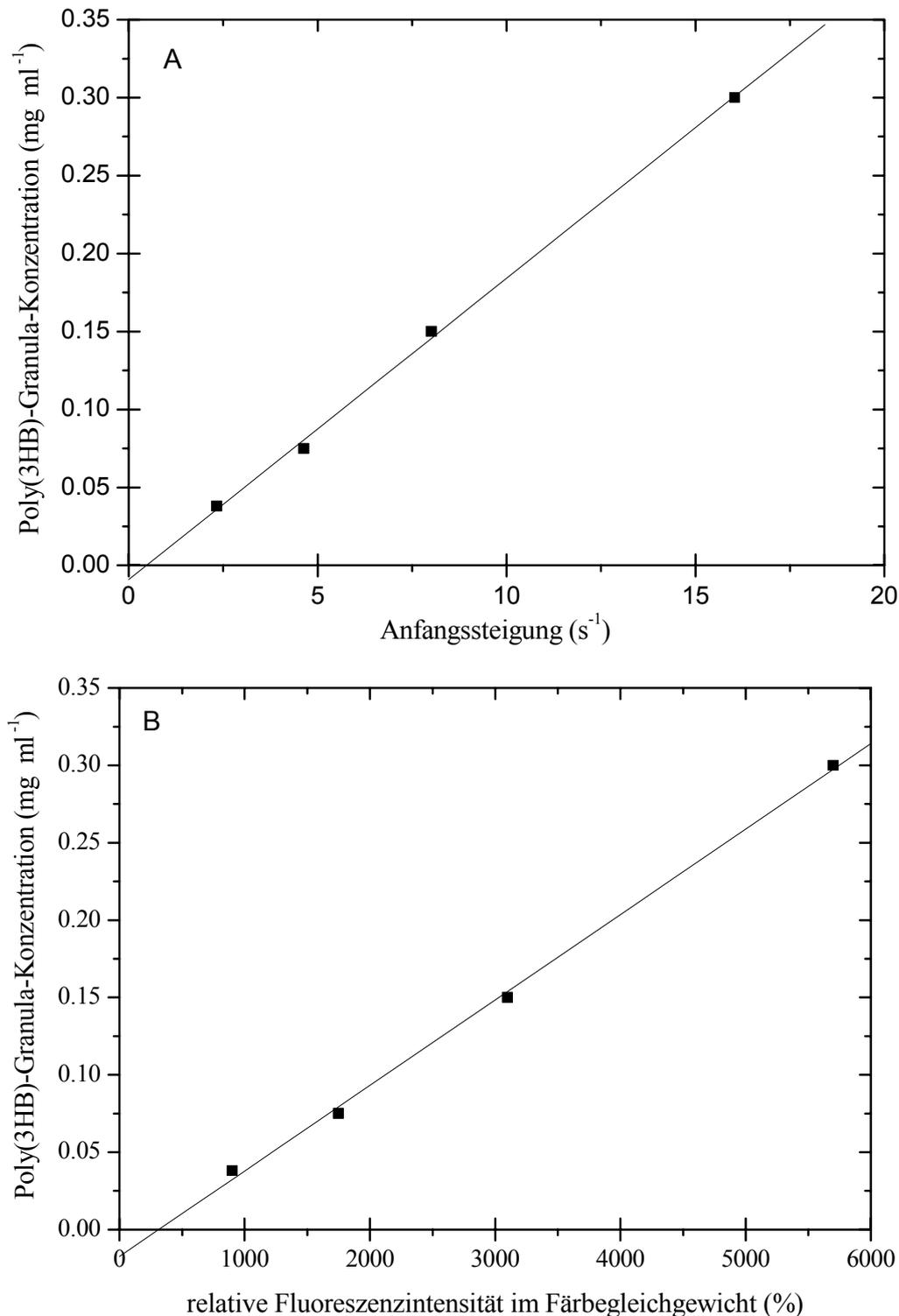
Meßbedingungen: Exzitationswellenlänge 550 nm, Emissionswellenlänge 600 nm, Exzitations- und Emissionsschlitz 10 nm, Verstärkerspannung 618 V.

Die Färbekinetik von Suspensionen mit zwei unterschiedlichen Granula-Größenverteilungen aus *R. eutropha* H16 (kleine Granula) und der PHF-leaky-Mutante von *R. eutropha* H16 (*R. eutropha* H2275, SK 2275, große Granula) wurde untersucht. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von jeweils 4 Granula-Suspensionen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Poly(3HB) wurde während des Färbvorgangs verfolgt. Dabei konnten drei wesentliche Beobachtungen gemacht werden: Je höher die Konzentration an Poly(3HB) war, desto höher war die relative Fluoreszenzintensität im Gleichgewicht und die Anfangssteigung der Fluoreszenzintensität wobei mehr Zeit zum Erreichen des Färbgleichgewichtes benötigt wurde, je höher die Poly(3HB)-Konzentration war (Abb. 26).



**Abb. 26: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von Granula-Suspensionen aus *R. eutropha* unterschiedlicher Konzentration an Poly(3HB) während der Anfärbung mit Nilrot.**

Nilrotkonzentration  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Meßbedingungen: Exzitationswellenlänge 550 nm, Emissionswellenlänge 600 nm, Exzitationsschlitz 10 nm, Emissionsschlitz 10 nm, Verstärkerspannung 700 V.  
**A)** *R. eutropha* H16 Wildtyp. **B)** *R. eutropha* H2275.



**Abb. 27: Kalibrierung der Poly(3HB)-Konzentration einer aus *Ralstonia eutropha* H16 isolierten Granula-Suspension gegen die Fluoreszenzintensität.**

Meßbedingungen: Exzitationswellenlänge: 550 nm; Emissionswellenlänge 600 nm; Exzitations-schlitz 10 nm, Emissionsschlitz 10 nm; Verstärkerspannung 700 V. Die Polyesterkonzentration wurde gaschromatographisch bestimmt (2.8.1). **A)** Auftragung der Poly(3HB)-Konzentration gegen die Anfangssteigung der Fluoreszenzintensität (Nilrotkonzentration:  $2,5\ \mu g\ ml^{-1}$ ; die ersten 180 s der Anfärbung wurden berücksichtigt).  $K_m$ :  $1,9\ 10^{-2}\ mg\ s\ ml^{-1}$ , Korrelation  $R_{K_m}$ : 0,999. **B)** Auftragung der Poly(3HB)-Konzentration gegen die Fluoreszenzintensität im Färbegleichgewicht (Nilrotkonzentration:  $2,5\ \mu g\ ml^{-1}$ ).  $K_{FG}$ :  $6\ 10^{-5}\ mg\ ml^{-1}$ ;  $R_{K_{FG}}$ : 0,999.

**Tabelle 21: Linearität der Auftragung von verschiedenen Poly(3HB)-Granula-Konzentrationen in unterschiedlichen Granula-Größen gegen die aus Abb. 27 ermittelten Fluoreszenzintensitäten im Gleichgewicht und Anfangssteigungen.**

Herkunft der Granula	Durchschnittsgröße ( $\mu\text{m}$ )	Gleichgewicht		Anfangssteigungen	
		$K_{\text{FG}}$ ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$R_{\text{KFG}}$	$K_{\text{m}}$ ( $\text{mg}\cdot\text{s}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$R_{\text{Km}}$
<i>R. eutropha</i> H16 (Wildtyp)	0,60	$6\cdot 10^{-5}$	0,999	$1,9\cdot 10^{-2}$	0,999
<i>R. eutropha</i> H16 („PHB-leaky“-Mutante)	0,76	$12\cdot 10^{-5}$	1,000	$3,6\cdot 10^{-2}$	1,000

Abkürzungen: K, Korrelationskoeffizient; R, Regressionskoeffizient; FG, Fluoreszenzintensität im Gleichgewicht; m, Anfangssteigung.

Zur Berechnung der Anfangssteigungen wurde jeweils der lineare Bereich der ersten 180 s ausgewertet. Zur quantitativen Ermittlung der Poly(3HB)-Konzentrationen wurde diese sowohl für den Wildtyp, als auch für die Mutante gegen die aus dem linearen Bereich der ersten 180 Sekunden ermittelten Anfangssteigung und gegen die Fluoreszenzintensität im Gleichgewicht aufgetragen, wobei jeweils ein linearer Zusammenhang gefunden wurde. Sowohl die Anfangssteigung der Fluoreszenzintensität (Abb. 27 A), als auch die Intensität im Gleichgewicht (Abb. 27 B) konnten sehr gut für die Berechnung der Konzentration von Poly(3HB) in der Suspension verwendet werden, wobei der Regressionskoeffizient (R) jeweils über 0,999 lag (Tabelle 21).

Die Konzentration an Poly(3HB)-Granula konnte über folgende zwei Gleichungen bestimmt werden:

$$C_{3\text{HB}} = K_{\text{m}} \cdot m \quad (\text{IV})$$

$$C_{3\text{HB}} = K_{\text{FG}} \cdot I_{\text{FG}} \quad (\text{V})$$

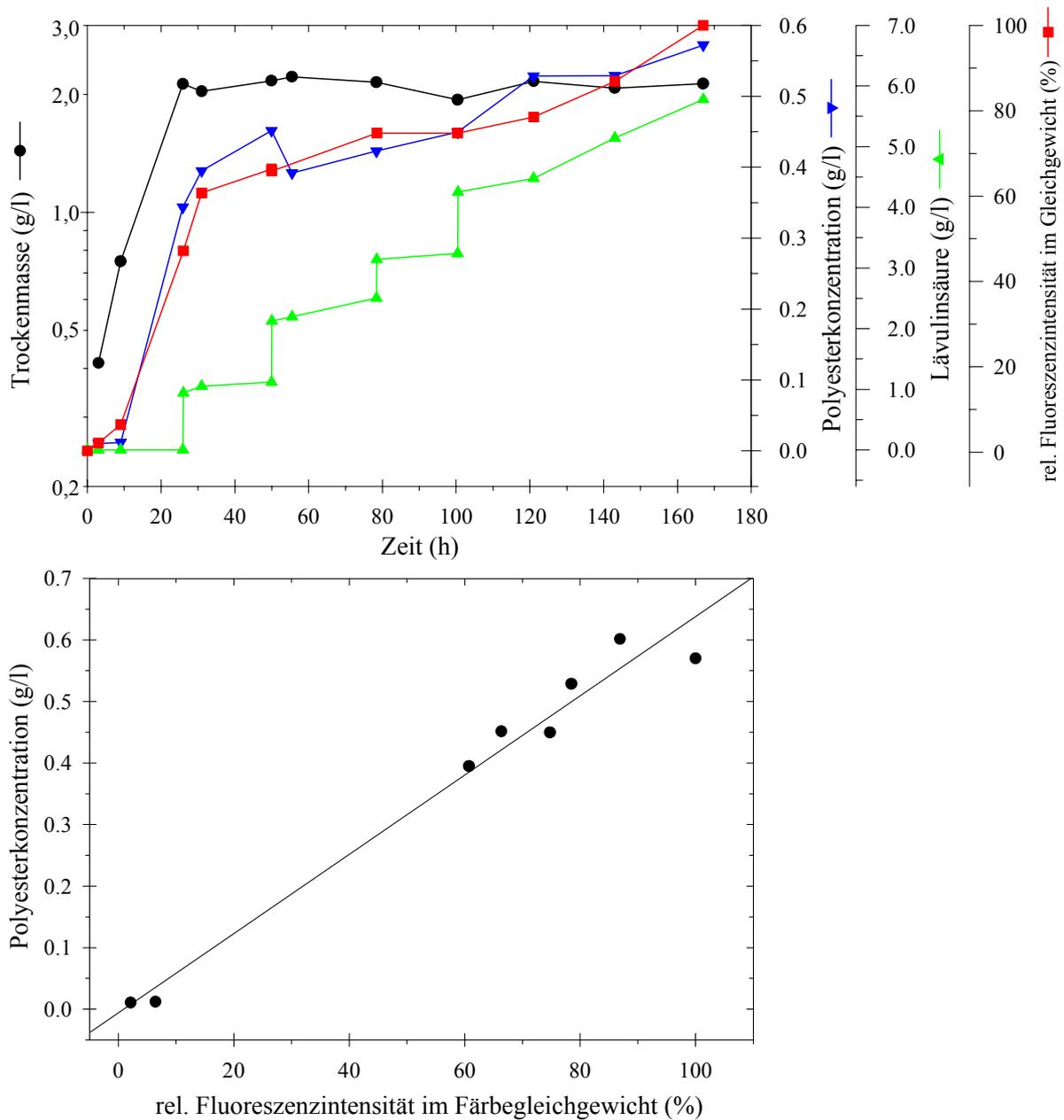
mit  $C_{3\text{HB}}$ : Konzentration von Poly(3HB) in der Küvette in  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,

$K_{\text{m}}$ : Korrelationskoeffizient für die Methode der Anfangssteigung (m),

$K_{\text{FG}}$ : Korrelationskoeffizient für die Methode der Intensität im Gleichgewicht ( $I_{\text{FG}}$ ).

Die Korrelationskoeffizienten (K) variierten deutlich mit der Größe der Partikel, die mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt wurde, wobei auch festgestellt werden konnte, daß die Partikelgrößenverteilung relativ eng war.

Die Anwendung der Nilrotfärbetechnik auf eine Kultivierung von *P. putida* (pHP1014::E156) im 15 l-Maßstab (2.4.4) mit Octansäure als Kohlenstoffquelle während der Wachstumsphase und Lävulinsäure als Substrat in der Speicherphase (Abb. 28 A) zeigte, daß diese Methode geeignet ist, die Konzentration an PHF in Zellen während einer Fed-Batch-Fermentation abzuschätzen. Abb. 28 B zeigt die gute Korrelation zwischen dem PHF-Gehalt der Zelltrockenmasse und dem Fluoreszenzsignal der mit Nilrot angefärbten Zellsuspension im Färbegleichgewicht.



**Abb. 28: Verlauf einer Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) mit Octansäure als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Speicherung von Polyhydroxyfettsäure.**

Der mit 14 l Mineralmedium (2.2.1); Octansäure (0,15 %, w/v); Ammoniumchlorid (0,15 %, w/v) und Tetracyclin (50 mg/l) gefüllte Fermenter wurde mit 1 l einer Octansäure-Vorkultur, die sich in der späten exponentiellen Phase befand, angeimpft. Wachstumsparameter: Temperatur, 30°C; pH-Wert, 7,8; Rührerdrehzahl, 500-700 Umdrehungen pro Minute; Begasungsrate, 1-1,5 vvm. Der Polyestergehalt wurde mittels Gaschromatographie (2.8.1) bestimmt. Für Fluoreszenzmessungen wurde die optische Dichte (bei 600 nm) auf maximal 0,3 eingestellt, die Nilrotkonzentration betrug 20,0 µg/ml. Meßbedingungen: Exzitationswellenlänge 550 nm, Emissionswellenlänge 600 nm, Exzitations- und Emissionsschlitz 10 nm, Verstärkerspannung 618 V. **A)** Entwicklung der Trockenmassekonzentration, des Polyestergehaltes und der Fluoreszenzintensität im Färbgleichgewicht. **B)** Auftragung der Polyesterkonzentration in der Kulturbrühe gegen das Fluoreszenzsignal im Gleichgewicht. Korrelationskoeffizient K:  $3.44 \cdot 10^{-2}$  mg/ml; Regressionskoeffizient R: 0,990.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte ein System erarbeitet und optimiert werden, das die biotechnologische Produktion 4HV-haltiger Polyester im Pilotmaßstab ermöglicht. Die mikrobiell produzierten Polyester sollten in größeren Mengen gewonnen, aufgereinigt und auf ihre physikalischen und mechanischen Eigenschaften untersucht werden.

Die Gewinnung solcher Polyester kann in zwei Stufen unterteilt werden:

1. die Produktion der Polyester durch die Mikroorganismen und
2. die Isolierung der Polyester aus der Bakteriensuspension, das sogenannte „Downstream Processing“.

Bei der Optimierung des Gesamtprozesses steht die *Produktqualität* (in diesem Fall in erster Linie die Erhöhung des Anteils von 4HV) und die Senkung der *Produktionskosten* im Vordergrund.

Zur Verbesserung der *Produktqualität* sollten verfahrenstechnische und molekularbiologische Methoden („metabolic routing“) eingesetzt werden. Hierzu zählte die Optimierung der Kultivierungsparameter und der Fütterungsstrategie sowie der Einsatz von Mutanten und rekombinanten Bakterienstämmen.

Zur Reduktion der *Produktionskosten* boten sich zwei Wege an:

1. die Reduktion der Rohstoffkosten und
2. die Verbesserung der Effektivität des Produktionsprozesses.

Diese beiden Punkte spielen sowohl bei der mikrobiellen Produktion der Polyester im Fermentationsprozeß, wie auch bei der anschließenden Aufbereitung des Polyesters bei der Produktgewinnung eine entscheidende Rolle.

Um den Beitrag der Rohstoffkosten zu den Fermentationskosten zu reduzieren, sollten möglichst günstige Substrate ausgewählt werden. Außerdem sollte das Wachstum der Mikroorganismen und die Produktbildung, also die Speicherung der Polyester auf zwei Phasen verteilt und somit „entkoppelt“ werden, so daß das vergleichsweise teure Speichersubstrat nur zur Akkumulation der Polyester und nicht gleichzeitig auch zum Aufbau von Zellmasse dient. So kann zum Wachstum der Mikroorganismen ein wesentlich preisgünstigeres Substrat eingesetzt werden. Durch Verbesserungen in der „Fütterungsstrategie“ sollte schließlich die Umsetzung des Substrates in Zellmasse bzw. Produkt erhöht werden.

Die Effektivität des Produktionsprozesses sollte zunächst durch die Erhöhung der sogenannten „Raumausbeute“, also durch eine Steigerung der Produktkonzentration im Fermenter erreicht werden. In einem zweiten Schritt sollte die sogenannte „Zeitausbeute“ durch eine Maßstabsvergrößerung der Kultivierung zu größeren Fermentationsvolumina und durch die Optimierung der Produktbildungsrate erhöht werden.

Bei der Produktaufbereitung sollte die Optimierung der „Raumausbeute“ durch eine Verbesserung der Fest-Flüssig-Trennung, in diesem Fall der Zentrifugation im Vordergrund stehen. Die „Zeitausbeute“ sollte durch eine Maßstabsvergrößerung des Extraktionsprozesses oder durch eine Beschleunigung des Extraktionsvorganges, wie zum Beispiel durch die Vorbehandlung der Zellen zum Aufbrechen der Zellwand, erreicht werden.

Die Rohstoffkosten für die Produktaufbereitung sollten durch die Wahl des Extraktionsmittels und die Reduktion von Aufreinigungsschritten durch die Vorbehandlung der Zellen zur Entfernung störender oder unerwünschter Zellprodukte (wie z.B. freier Fettsäuren) verringert werden. Dabei war die Aufrechterhaltung der Produkteigenschaften von entscheidender Bedeutung.

#### **4.1 Optimierung der biotechnologischen Produktion 4HV-haltiger Polyester**

Die Synthese von Polyestern, die 4-Hydroxyvaleriansäure (4HV) enthalten, in Stämmen von *P. putida* und *R. eutropha* gehen von 4HV als Vorstufe aus (Valentin et al., 1992; Valentin et al., 1995). 4HV ist käuflich nicht erhältlich und mußte zunächst durch alkalische Hydrolyse aus  $\gamma$ -Valerolacton synthetisiert werden.  $\gamma$ -Valerolacton ist jedoch mit einem Preis von ca. 500 DM/kg (Fa. Sigma) nicht für die biotechnologische Produktion 4HV-haltiger Polyester im industriellen Maßstab geeignet. Allerdings handelt es sich auch im folgenden bei den angegebenen Preisen um Preise für den Abnehmer kleinerer Rohstoffmengen. Rohstoffe, die im technischen Maßstab eingesetzt werden, sind üblicherweise bedeutend günstiger, jedoch stehen nicht alle verglichenen Substanzen im technischen Maßstab zur Verfügung. Wie einstufige Speicherversuche mit Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle ergaben, waren Wildtypen und rekombinante Stämme von *P. putida* und *R. eutropha* in der Lage, ausgehend von dieser Kohlenstoffquelle 4HV-haltige Polyester zu akkumulieren (3.1.1), wobei dessen Zusammensetzung beim Wildtyp *R. eutropha* HF39 in etwa der Zusammensetzung des Polyesters entsprach, wenn der Wildtyp *R. eutropha* H16 auf 4HV als alleiniger Kohlenstoffquelle angezogen wurde (siehe Tabelle 5 und Valentin et al., 1992). Lävulinsäure ist mit ca. 65 DM/kg (Fa. Sigma) wesentlich günstiger als  $\gamma$ -Valerolacton und zudem aus nachwachsenden Rohstoffen, wie z.B. Fructose, herstellbar (Neumüller, 1983), womit es sich für eine großtechnische Produktion dieser Polyester als Substrat anbietet. Der Stamm *P. putida* KT2440 akkumulierte auf diesem Substrat einen Polyester mit einem ungewöhnlich breiten Spektrum an Bausteinen, das Kettenlängen von C<sub>4</sub> bis C<sub>12</sub> umfaßte. Im Unterschied hierzu akkumulierte der Wildtyp *P. putida* (DSMZ 291) ausgehend von Gluconsäure oder

Octansäure einen Polyester, der Bausteine mit den Kettenlängen C<sub>6</sub> bis C<sub>12</sub> enthielt, war jedoch nicht in der Lage, 3HB in den Polyester zu integrieren (Timm & Steinbüchel, 1990).

Durch Auswahl des Stammes *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156), einer PHF-negativen Mutante von *P. putida* KT2440 (Huisman et al., 1991), die mit den Genen der PHF-Synthase aus *Thiocapsa pfennigii* komplementiert worden war (Liebergesell et al., 1993), konnte ausgehend von Lävulinsäure ein Polyester gewonnen werden, dessen 4HV-Gehalt bei 30,0 mol % lag und somit den höchsten 4HV-Gehalt aller untersuchten Stämme aufwies (Tabelle 5). Dabei waren die Bausteine 3HHx, 3HO, 3HD und 3HDD, die vom Wildtyp zusätzlich in den Polyester integriert wurden, im rekombinanten Stamm nicht mehr nachzuweisen. Bereits in vorangegangenen Untersuchungen beobachteten Liebergesell et al. (1993), daß dieser Stamm in der Lage war, ausgehend von Octansäure einen Polyester mit 48,5 mol % 3HB; 47,3 mol % 3HHx und 4,2 mol % 3HO zu akkumulieren. Dieser Polyester wies somit eine bis dahin ungewöhnliche Zusammensetzung auf, da er gleichzeitig kurzkettige (3HB) und mittelkettige Bausteine (3HHX und 3HO) zu etwa gleichen Teilen enthielt.

#### 4.1.1 Entwicklung eines Fermentationsprozesses im 20 l-Maßstab

Zwar akkumulierte *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) auf Lävulinsäure einen Polyester mit einem relativ hohen Anteil an 4HV, jedoch eignete sich Lävulinsäure für diesen Stamm nicht besonders gut als Kohlenstoffquelle zum Wachstum (Abb. 2). So beobachteten Jang & Rogers (1996) ebenfalls eine wachstumshemmende Wirkung der Lävulinsäure, wenn sie bei der Kultivierung von *Alcaligenes* sp. mit Glucose Lävulinsäure als Co-Substrat in einer Konzentration von 1,0 g/l und mehr zugaben. Diesen wachstumshemmenden Effekt der Lävulinsäure führten Sasaki et al. (1987) auf die Hemmung der Tetrapyrrol-Biosynthese in den Bakterien zurück. Eine Hemmung der 5-Aminolävulinsäure-Dehydratase, die sich störend auf die Porphyrin-Biosynthese auswirkt, wird ebenfalls angenommen (Shemin, 1972). Um für das Zellwachstum ein Substrat mit besseren Eigenschaften bezüglich des Zellwachstums verwenden zu können, wurde eine Zweistufen-Fermentation entwickelt, bei der zum Zellwachstum ein anderes Substrat als zur Akkumulation von PHF in der Speicherphase verwendet wurde und somit die Wachstumsphase von der Speicherphase getrennt wurde.

Octansäure bot sich als Wachstumssubstrat für *P. putida* an, da die Zellen auf diesem Substrat sehr gut wuchsen (Abb. 2) und Octansäure mit einem Preis von ca. 37 DM/kg (Fa. Merck) wesentlich günstiger war als Lävulinsäure. Zwar zeigte sich, daß *P. putida* auf Succinat deutlich schneller wuchs als auf Octansäure, jedoch hatte die Verwendung von Octansäure entscheidende Vorteile gegenüber Succinat: Zum einen stellte sie die

physiologisch höherwertige Energiequelle dar, zum anderen erfolgte der Abbau sowohl von Lävulinsäure, wie auch von Octansäure über eine Beteiligung von  $\beta$ -Oxidationsschritten (3.3), so daß sich eine Expression der Gene der  $\beta$ -Oxidation durch den Octansäureabbau positiv auf die Bildung von Polyestern ausgehend von Lävulinsäure auswirken könnte. Kim et al. (1997) beobachteten bei der Kultivierung von *P. putida*, daß durch die Gegenwart von Octansäure bereits in der Wachstumsphase die Bildung von Polyestern mit mittlerer Kettenlänge in der nachfolgenden Speicherphase stimuliert wurde. Sie führten diesen Effekt darauf zurück, daß Octansäure bereits während der Wachstumsphase die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation aktivierte, über die auch die Vorstufen zur Polyestersynthese zur Verfügung gestellt werden. Da 4HV dem Übergangsbereich zwischen Bausteinen kurzer und mittlerer Kettenlänge zuzuordnen ist, war somit zu erwarten, daß auch die Speicherung 4HV-haltiger Polyester durch Octansäure stimulierbar ist.

Aus diesen Gründen wurde eine zweistufige Batch-Fermentation im 15 l-Maßstab mit Octansäure als Kohlenstoffquelle für das Zellwachstum und Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle zur Akkumulation 4HV-haltiger Polyester entwickelt. Allgemein werden Polyhydroxyfettsäuren von den Zellen bevorzugt dann gebildet, wenn eine Kohlenstoffquelle im Überschuß vorhanden ist und ein anderer essentieller Nährstoff fehlt und somit das Zellwachstum limitiert ist (Anderson & Dawes, 1990; Steinbüchel, 1991b; Hocking & Marchessault, 1994). *P. putida* akkumulierte die größte Menge an Polyester, wenn die Stickstoffquelle die wachstumslimitierende Komponente darstellte, wobei auch Sauerstoffmangel die Bildung von Polyhydroxyfettsäuren im Schüttelkolbenversuch stimulierte (Kim et al., 1997). Durch die Limitierung der Stickstoffquelle (z.B. Ammonium) während des Fermentationsprozesses sinkt die Konzentration an Stickstoff im Medium ab, da die wachsenden Zellen Ammonium zur Synthese von Zellbestandteilen aufnehmen. Dadurch kommt es für die Zellen zu einer Stickstoffmangelsituation, so daß sie das Wachstum einstellen und in die Speicherphase gelangen. Die Dosierung von Stickstoff kann also dazu verwendet werden, die Wachstumsphase von der Speicherphase zu trennen. Das Verhältnis von Octansäure zu Ammonium wurde zu Beginn der Batch-Fermentationen so gewählt, daß beide Substanzen in etwa gleichzeitig von den Zellen verbraucht waren. Zu diesem Zeitpunkt wurde Lävulinsäure zugegeben, um den Bakterien die Vorstufe zur Akkumulation eines 4HV-haltigen Polyesters zu bieten. Die Konzentration an Lävulinsäure im Medium wurde schrittweise gesteigert, um den Überschuß an Kohlenstoffquelle und damit den Druck der Kohlenstoffquelle auf die Organismen zu erhöhen. Bereits während des Wachstums auf Octansäure hatten die Zellen bis zum Beginn der Speicherphase ca. 15 % (w/w) der Zelltrockenmasse an Polyester akkumuliert, der sich aus den  $\beta$ -Oxidationsabbauprodukten der Octansäure (3HB, 3HHx und 3HO) ableitete (Abb. 3). Dies zeigte deutlich, daß eine strikte Trennung von Wachstumsphase und Speicherphase nicht möglich war. Wie aus

vorangegangenen Untersuchungen hervorging, akkumulierte der rekombinante Stamm *P. putida* GPP104 (pHP1014::E156) unter Speicherbedingungen mit Octansäure als Substrat ebenfalls einen Terpolyester aus 3HB, 3HHx und 3HO (Liebergesell et al., 1993). Nach der Zugabe von Lävulinsäure integrierten die Zellen zusätzlich 3HV und 4HV in den Polyester, wobei jedoch über die Anordnung der Monomere im Polymergerüst mit den zur Verfügung stehenden Analysemethoden keine Aussage gemacht werden konnte.

#### 4.1.2 Optimierung der Fermentationsparameter im Batch-Prozeß

Um die optimalen Parameter für die Akkumulation von 4HV-haltigen Polyestern zu finden, wurden in einzelnen Fermentationen nach der Wachstumsphase auf Octansäure (unter jeweils gleichen Bedingungen) verschiedene Temperaturen und pH-Werte während der Speicherphase eingestellt und zusätzlich die Belüftung variiert.

Mit steigender **Temperatur** konnte ein deutlich steigender Polymergehalt der Zelltrockenmasse festgestellt werden. Weiterhin nahm der molare Anteil von 3HV und 4HV im Polyester zu, wohingegen die Anteile der Octansäureabbauprodukte 3HHx und 3HO abnahmen.

Der positive Einfluß einer erhöhten Temperatur in der Speicherphase könnte mit einer verstärkten Aufnahme von Lävulinsäure oder deren Abbauprodukten in die Zelle erklärt werden. Langkettige Fettsäuren werden durch einen aktiven Transportmechanismus unter Beteiligung der Fettsäure Permease (fadL-Genprodukt) in die Zelle aufgenommen (Ginsburgh et al., 1984), während Fettsäuren kürzerer Kettenlänge passiv durch die Membran diffundieren können (Maloy et al., 1981). Durch die Erhöhung der Temperatur nimmt die Membranfluidität und damit die Permeabilität der Zellmembranen zunächst zu, worauf die Bakterien mit einer Erhöhung des Sättigungsgrades der Membranfettsäuren reagieren, um die ursprüngliche Fluidität und Permeabilität wieder herzustellen (Streuer, 1994). Die Erhöhung der Membranpermeabilität und eine damit möglicherweise erhöhte Diffusion von Lävulinsäure oder deren Abbauprodukten in die Zelle kurz nach dem Temperaturanstieg könnte somit eine Erklärung für den positiven Effekt einer Temperaturerhöhung auf die Polyesterspeicherung sein. Eigene Messungen der Zusammensetzung der typischen Membranfettsäuren C16 und C18 ergaben einen Sättigungsgrad von 51 % bei einer Kultivierungstemperatur von 28°C und einen Sättigungsgrad von 62 % 10 Stunden nach der Temperaturerhöhung von 28°C auf 37°C. Diese Reaktion der Bakterien läßt auf eine gesteigerte Membranfluidität kurz nach dem Anheben der Temperatur schließen.

Wenn während der Speicherphase ein **pH-Wert** von 7,0 eingestellt wurde, war die Speicherrate mit 31,6 % (w/w) am größten, wohingegen ein pH-Wert von 8,0 und 6,0 zu einer

deutlich reduzierten Speicherrate (3,0 %, w/w; bzw. 21 %, w/w) führte. In der Literatur konnten keine eindeutigen Erklärungen für diese starke Abhängigkeit der Speicherrate vom pH-Wert gefunden werden. Möglicherweise hat die eingesetzte Synthase aus *Thiocapsa pfennigii* ein sehr enges pH-Wert-Optimum. *In vitro* wurden für die Aktivitäten verschiedener PHF-Synthasen pH-Optima zwischen pH 7,2 und pH 7,7 bestimmt. Außerdem wird beschrieben, daß eine Verschiebung des pH-Wertes um 1,0 in den sauren oder basischen Bereich eine um 30 bis 50 % geringere PHF-Synthaseaktivität zur Folge hat (Liebergesell et al., 1994; Griebel et al., 1968; Fukui et al., 1976). Allerdings führt die Veränderung des extrazellulären pH-Wertes meist nur zu einer kurzzeitigen (ca. 30 min) Verschiebung des intrazellulären pH-Wertes, da die Zellen in der Lage sind, den physiologischen pH-Wert rasch wieder einzustellen (Schlegel, 1992), so daß die Abhängigkeit der Aktivität der PHF-Synthase vom pH-Wert die starke Abhängigkeit der Polyesterspeicherung vom pH-Wert nicht vollständig erklärt.

Die **Belüftung** wurde im Fermenter bei der Kultivierung von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) während der Speicherphase auf Lävulinsäure in zwei getrennten Fermentationen von 1,0 vvm auf unter 0,1 vvm reduziert, um die Sauerstoffsättigung im Kulturmedium auf unter 10 % abzusenken. Dabei reduzierte sich der Polymergehalt der Zelltrockenmasse gegenüber der Fermentation mit starker Belüftung von ca. 30 % (w/w) auf 20 % (w/w), bei gleichzeitigem Rückgang der Anteile von 3HV und 4HV im Polyester auf ein Drittel. Der Abbau von Fettsäuren über die  $\beta$ -Oxidation erfordert in einem ersten Schritt die Aktivierung der Fettsäure zum CoA-Thioester, die von einer ATP-abhängigen Thiokinase unter ATP-Verbrauch katalysiert wird (Steinbüchel & Fuchtenbusch, 1998). Auch Lävulinsäure muß vor einem Abbau über die  $\beta$ -Oxidation sehr wahrscheinlich zunächst aktiviert werden. In einem weiteren Schritt wird die Lävulinsäure vermutlich zu 4HV reduziert, wobei die Zelle Reduktionsäquivalente zur Verfügung stellen muß. Möglicherweise ist die Atmungskette der Bakterien und damit auch die Erzeugung von ATP und Reduktionsäquivalenten durch den drastisch reduzierten Sauerstoffpartialdruck gehemmt, so daß die Zelle nicht genügend Vorstufen zur Synthese von Polyester erzeugen kann. Kim et al. (1997) fanden im Schüttelkolbenversuch mit *P. putida* und Octansäure als Substrat einen steigenden Polyestergehalt mit steigendem Füllvolumen des Kolbens und schlossen daraus auf einen positiven Effekt einer Sauerstofflimitation. Dieses Ergebnis ist jedoch nicht ohne weiteres auf die bezüglich pH-Wert und Belüftung besser kontrollierten Bedingungen im Fermenter zu übertragen.

Aus diesen Untersuchungen ergaben sich als optimale Parameter für die Wachstumsphase, in der das Wachstum gut sein sollte, aber gleichzeitig möglichst keine Akkumulation von unerwünschten Polyesterbausteinen stattfinden sollte, eine Temperatur

von 30°C, ein pH-Wert von ca. 8,0 und für die Speicherphase eine Temperaturerhöhung auf ca. 35 bis 37°C und ein pH-Wert von 7,0 bei ausreichender Belüftung (ca. 1 vvm).

#### 4.1.3 Erhöhung der Zelldichte durch die Entwicklung eines Fed-Batch-Prozesses

Zur Steigerung der Zelldichte im Fermenter wurde ein Fed-Batch-Prozeß im 20 l-Maßstab entwickelt, in dem die für das Zellwachstum notwendigen Nährstoffe während der Wachstumsphase je nach Bedarf so zugeführt wurden, daß kein Mangel entstand und eine optimale Wachstumsgeschwindigkeit zu erwarten war. Hierzu wurde wie in dem zuvor beschriebenen Prozeß Octansäure als Substrat in der Wachstumsphase und Lävulinsäure als Substrat in der Speicherphase verwendet. Dabei kam es darauf an, daß die Bakterien während der Wachstumsphase möglichst wenig Polyester akkumulierten, der die unerwünschten Octansäureabbauprodukte 3HHx und 3HO enthielt, um in der anschließenden Speicherphase auf Lävulinsäure einen Polyester mit einem möglichst hohen 4HV-Anteil zu erhalten. Deshalb wurde während der Wachstumsphase ein pH-Wert von 7,8, eine Temperatur von 30°C und eine Belüftungsrate von 1 bis 1,5 vvm gewählt, da bei diesen Einstellungen eine relativ geringe Speicherung bei einer dennoch guten Wachstumsrate zu erwarten war. Während der gesamten Wachstumsphase wurde die Konzentration von Ammonium, Octansäure und gegebenenfalls Lävulinsäure im Überstand in regelmäßigen Abständen analysiert und jeweils bei Bedarf nachgefüttert. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß die Substanzen den Bakterien stets in ausreichender Menge zur Verfügung standen, wobei die Konzentrationen wiederum nicht zu hoch sein durften, um eine limitierende Wirkung auf das Zellwachstum auszuschließen. Ammonium war in einer Konzentration ab 0,8 g/l, Octansäure ab 3,0 g/l und Lävulinsäure ab 2,0 g/l wachstumshemmend, wobei die Zellen während der Wachstumsphase bei einer Ammoniumkonzentration von unter 0,1 g/l oder einer Octansäurekonzentration von über 1,5 g/l bevorzugt unerwünschte Octansäureabbauprodukte in den Polyester integrierten. Somit waren die Grenzen für die Dosierung dieser Nährstoffe sehr eng gesetzt, so daß eine häufige Kontrolle der Nährstoffkonzentrationen erforderlich war. Mit steigender Trockenmassekonzentration mußten die Nähstoffe in immer kürzer werdenden zeitlichen Abständen zugegeben werden (siehe die Pfeile in Abb. 7), so daß der Arbeitsaufwand ohne Automatisierung sehr hoch war. Durch diese Art der Fed-Batch-Fermentation wurde während der Wachstumsphase eine Trockenmassekonzentration von 20 g/l erreicht, die gegenüber der Batch-Fermentation um den Faktor 10 erhöht war.

#### 4.1.4 Automatisierung des Fed-Batch-Prozesses

Wie man durch einen Vergleich der Fütterungszeitpunkte mit der Entwicklung der Sauerstoffkonzentration im Medium erkennen kann, stieg die Sauerstoffsättigung im Medium kurz vor der Zugabe von Octansäure steil an und fiel kurz nach der Zugabe wieder steil ab (Abb. 7). Analysen des Kulturüberstandes ergaben, daß jeweils zu dem Zeitpunkt, in dem die Sauerstoffkonzentration anstieg, fast die gesamte Octansäure verbraucht war. *P. putida* gewinnt hauptsächlich über die Atmungskette Energie, um die für den Aufbau von Zellmasse benötigten Bausteine synthetisieren zu können. Die dabei im Stoffwechsel anfallenden Elektronen werden auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei Wasser entsteht. Dabei nehmen die Zellen den im Medium gelösten Sauerstoff auf, der durch die Begasung der Kulturbrühe wieder ersetzt wird. Je nach Verhältnis von aufgenommenem zu nachgeliefertem Sauerstoff stellt sich eine bestimmte Sauerstoffsättigung im Medium ein. Bleibt die Begasungsrate im Fermenter konstant, ist die Sauerstoffkonzentration im Medium ein indirektes Maß für die Stoffwechselaktivität der Bakterien: Steigt die Sauerstoffkonzentration im Medium an, ist dies ein Zeichen dafür, daß die Zellen weniger Sauerstoff verbrauchen und somit die Stoffwechselaktivität der Zellen sinkt und umgekehrt. Wenn man voraussetzt, daß alle von den Zellen benötigten Nährstoffe bis auf *einen* stets in ausreichender Konzentration im Medium vorhanden sind, kann man die Änderung der Sauerstoffsättigung als Maß für das Vorhandensein oder das Fehlen dieses Nährstoffes nutzen, da der Stoffwechsel der Zellen dann am höchsten ist, wenn alle benötigten Nahrungsstoffe zur Verfügung stehen. Fehlt ein Nährstoff, können sich die Zellen nicht mehr optimal vermehren, womit sich ihre Stoffwechselaktivität und damit ihr Sauerstoffverbrauch drastisch reduziert und infolgedessen die Sauerstoffkonzentration im Medium ansteigt. (Eine weitere Voraussetzung für diese Betrachtung ist, daß die Zellen nicht durch andere Stoffe, wie zum Beispiel toxische Metabolite, gehemmt werden).

In der in Abb. 7 dargestellten Fermentation wurden alle Nährstoffe außer Octansäure so zugegeben, daß sie stets im Überschuß vorlagen, so daß die Änderung der Sauerstoffsättigung ein indirektes Maß für das Vorhandensein bzw. das Fehlen von Octansäure darstellte. Je höher die Zelldichte im Medium war, desto geringer war der Wert der Sauerstoffsättigung vor einem Anstieg und desto schärfer waren die Signale. Dies kann als Zeichen für die mit zunehmender Zelldichte steigende Gesamtstoffwechselaktivität der im Fermenter vorhandenen Zellen gewertet werden. Nach einer Wachstumsphase von 35 h lag der jeweils tiefste Wert der Sauerstoffsättigung bei ca. 5 %, so daß man davon ausgehen kann, daß das Wachstum der Zellen in dieser Phase sauerstofflimitiert war.

In einer weiteren in Abb. 8 dargestellten Fermentation wurde die Änderung der Sauerstoffsättigung im Medium genutzt, um die von den Zellen verbrauchte Octansäure

automatisch zu ersetzen. Hierzu wurde das Signal der Clark-Elektrode, die die Sauerstoffkonzentration im Medium mißt, von einem Computer aufgenommen und über ein Programm im PASCAL-Modus ausgewertet. Vor der Fermentation wurde die Elektrode mit den am Ende der Fermentation zu erwartenden Einstellungen für die Begasungsrate und die Rührerdrehzahl auf 100 % Sättigung kalibriert. Da die relative Sauerstoffsättigung im Medium von der Begasungsrate (Druckanstieg im Fermenter) und der Rührerdrehzahl stark abhängig ist, beginnt die Kultivierung nicht bei einer relativen Sauerstoffsättigung von 100 %, sondern darunter. Jeweils bei einem Anstieg der Sauerstoffsättigung wurde Octansäure automatisch zudosiert. Man erkennt einen prinzipiell ähnlichen Verlauf der Sauerstoffsättigung wie bereits bei der nicht automatisierten Fed-Batch-Fermentation in Abb. 7. Während der Fermentation wurde die Begasungsrate und die Rührerdrehzahl schrittweise erhöht, um den mit steigender Zelldichte erhöhten Sauerstoffverbrauch auszugleichen. Der Einbau der unerwünschten Octansäureabbauprodukte 3HHx und 3HO in den Polyester sollte minimiert werden, wozu die Octansäure in kleineren Portionen von maximal 1,0 g/l zugegeben wurde, so daß die Fütterungsintervalle kürzer waren als bei der nicht automatisierten Fermentation. Die so realisierte teilweise Automatisierung des Fermentationsprozesses ermöglichte eine gleichmäßigere Dosierung von Octansäure in kleineren Portionen und verringerte außerdem den Arbeitsaufwand beträchtlich. Die während der automatisierten Fermentation erreichte Trockenmassekonzentration lag mit 20 g/l in der gleichen Größenordnung wie die der nicht automatisierten, und damit um den Faktor zehn höher als bei der einfachen Batch-Fermentation. Der PHF-Gehalt von 52 % (w/w) entsprach dem der optimierten Batch-Fermentation, jedoch war der molare Anteil von 4HV mit ca. 15 mol % geringer als der des optimierten Batches (ca. 20 mol %). Allerdings konnte auch durch die veränderte Fütterungsweise während der automatisierten Fermentation nicht völlig verhindert werden, daß die Zellen während der Wachstumsphase einen Polyester akkumulierten, der die Abbauprodukte der Octansäure enthielt (Abb. 9).

Der Polyester, der aus einzelnen Fermentationen mit Octansäure in der Wachstumsphase gewonnen werden konnte, war zwar mit etwa 100 g mengenmäßig für die geplanten Werkstoffuntersuchungen ausreichend, der molare Anteil von 4HV am Polyester war jedoch mit etwa 15 % nicht hoch. Außerdem enthielt der Polyester vier weitere Monomere in jeweils nicht zu vernachlässigenden Mengen, wovon 3HHx und 3HO vollständig und 3HB zumindest teilweise aus dem Abbau der Octansäure stammten (Abb. 9). Eine Möglichkeit, den Einbau von unerwünschten Komponenten in den Polyester zu verhindern, könnte die Verwendung einer Kohlenstoffquelle sein, auf der die Bakterien wachsen können, jedoch nicht in der Lage sind, einen Polyester zu akkumulieren. Somit wäre der Prozeß zur Erzeugung von Zellmasse und die Speicherung von Polyester vollständig getrennt.

#### 4.1.5 Fed-Batch-Fermentation mit Gluconsäure oder Glucose als Substrat

Wie aus einstufigen Speicherversuchen mit *P. putida* Gp104 (pHP1014::E156) und Gluconsäure oder Glucose als Substrat hervorging, akkumulierten die Zellen ausgehend von diesen Kohlenstoffquellen keine nachweisbaren Mengen an Polyester. Somit scheint Gluconsäure ein ideales Substrat für die Wachstumsphase der Zellen zu sein, um PHF-freie Zellen herzustellen, die dann in der Lage sind, während der Speicherphase auf Lävulinsäure einen Polyester mit einem höheren Anteil an 4HV zu akkumulieren. In einer wie oben beschriebenen automatisierten Fermentation von *P. putida* Gp104 (pHP1014::E156) im 20 l-Maßstab lieferte der Einsatz von Gluconsäure an Stelle von Octansäure während der Wachstumsphase tatsächlich keine nachweisbare Speicherung von Polyester in den Zellen (siehe die ersten 70 h in Abb. 10 A). Während der Speicherphase mit Lävulinsäure akkumulierten die Zellen einen Polyester, der sich ausschließlich aus Derivaten von Lävulinsäureabbauprodukten zusammensetzte, und zwar hauptsächlich aus den zwei Bausteinen 3HV (51,1 mol %) und 4HV (44,2 mol %) und der nur noch in geringen Mengen 3HB (4,7 mol %) enthielt; die beiden Bausteine 3HHx und 3HO, die während des Wachstums auf Octansäure in den Polyester integriert wurden, fehlten gänzlich. Dadurch steht ein völlig neuartiger Polyester zur Verfügung, der es erstmals ermöglichen sollte, in einem Vergleich mit 3HV-Homopolyester den Einfluß von 4HV auf die Materialeigenschaften zu bestimmen.

Am Ende der Fermentation lag der Polymergehalt der Zellen mit 26 % (w/w) allerdings deutlich unter dem Gehalt von etwa 52 % (w/w) nach der Fermentation mit Octansäure. Die Differenz entspricht ziemlich genau dem Polyestergehalt von 30 % (w/w), den die Zellen während des Wachstums auf Octansäure am Ende der Wachstumsphase bereits gespeichert hatten. Damit liegt die von Lävulinsäure ausgehende Speicherrate bei beiden Fermentationen in der gleichen Größenordnung.

#### 4.1.6 Polyesterakkumulationsverhalten der rekombinanten Stämme von *P. putida* Gp104 auf Gluconsäure oder Glucose

Der Wildtyp *P. putida* KT2440 akkumuliert ausgehend von Octansäure einen Polyester aus 3-Hydroxyfettsäuren mit 3HO und ausgehend von Gluconsäure mit 3HD als Hauptbestandteil. Andere Bausteine mit einer Kettenlänge von C<sub>6</sub> bis C<sub>12</sub> werden nur zu relativ kleinen Anteilen integriert (Timm & Steinbüchel, 1990). Der rekombinante, PHF-negative Stamm *P. putida* Gp104 (pHP1014::E156), der die PHF-Synthasegene *phaE* und *phaC* aus *Thiocapsa pfennigii* enthält, akkumuliert ausgehend von Octansäure einen Polyester mit den  $\beta$ -Oxidationsabbauprodukten 3HHx und 3HB in etwa gleichen Anteilen und mit Spuren von 3HO (Liebergesell et al., 1993); ausgehend von Gluconsäure oder Glucose

speichert dieser Stamm jedoch so gut wie keinen Polyester (3.1.5.3 und 3.1.5.4). Zur besseren Übersicht sind die Daten in Tabelle 22 noch einmal zusammengefaßt dargestellt.

*P. putida* nutzt für die Synthese von Polyestern ausgehend von Glucose oder Gluconsäure in erster Linie die Fettsäure de novo-Synthese (Eggink et al., 1992; Huijberts et al., 1992; Huijberts et al., 1994); die dabei entstehenden (*R*)-3-Hydroxyacyl-ACP-Intermediate werden durch eine Transacylase in die entsprechenden CoA-Thioester umgewandelt (Rehm et al., 1998), die dann der PHF-Synthase als Substrate zur Verfügung stehen. Durch diese Schritte wird in erster Linie 3-Hydroxydecanoyl-CoA gebildet (Haywood et al., 1990; Timm & Steinbüchel, 1990), wobei auch kürzerkettige und längerkettige CoA-Thioester, jedoch in wesentlich geringeren Mengen entstehen. Die so gebildeten 3-Hydroxyacyl-CoA-Metaboliten werden im Wildtyp bevorzugt von der Synthase akzeptiert und in das Polymer eingebaut, so daß sie nicht mehr über die  $\beta$ -Oxidation abgebaut werden. Die beobachtete ungewöhnlich geringe Speicherrate von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) ausgehend von Gluconsäure bzw. Glucose läßt sich vermutlich auf die Kombination von durch den Organismus *P. putida* GPp104 zur Verfügung gestellten Vorstufen, die hauptsächlich im längerkettigen Bereich ( $C_8$  und länger) liegen, und rekombinanter PHF-Synthase, die bevorzugt Bausteine im kürzerkettigen Bereich ( $C_6$  und kürzer) akzeptiert, zurückführen. Diese Vermutung könnte auch erklären, warum die rekombinanten Stämme ausgehend von Lävulinsäure keine nachweisbaren Mengen an Monomeren mit Kettenlängen größer als  $C_5$  in den Polyester integrieren. Die Katabolitrepression von Enzymen der  $\beta$ -Oxidation durch Gluconsäure oder Glucose könnte außerdem den Abbau der längerkettigen Vorstufen über die  $\beta$ -Oxidation hemmen, so daß kürzerkettige 3-Hydroxyacyl-CoA-Metabolite nur in sehr geringem Maß entstehen. Eine Hemmung der Enzyme der  $\beta$ -Oxidation durch Glucose wurde bereits in *E. coli* (Weeks et al., 1969) und in *Caulobacter crescentus* (O'Connell et al., 1986) nachgewiesen.

**Tabelle 22: Polyesterspeicherung von *P. putida* Wildtyp und rekombinanten Stämmen auf Octansäure und Gluconsäure.**

C-Quelle Stamm	PHF-Gehalt (% TM)	Zusammensetzung des Polyesters (mol %)				
		3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD
<u>Octansäure</u>						
<i>P. putida</i> WT (DSM 291) <sup>*1</sup>	40,3	0,0	2,6	89,6	5,4	2,4
<i>P. putida</i> GPp104 (pHP1014::E156) <sup>*2</sup>	22,3	48,5	47,3	4,2	n.n.	n.n.
<u>Gluconsäure</u>						
<i>P. putida</i> WT (DSM 291) <sup>*1</sup>	33,5	n.n.	3,6	23,7	60,6	12,1
<i>P. putida</i> GPp104 (pHP1014::E156) <sup>*3</sup>	< 3,0	100,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>P. putida</i> GPp104 (pHP1014::B28RV) <sup>*3</sup>	< 3,0	100,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Die Zellen wurden im 50 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben mit MM (2.2.1 mit NH<sub>4</sub>Cl, 0,05 %, w/v) bei 30°C und 150-250 Umdrehungen pro Minute für 72 h kultiviert, anschließend geerntet gewaschen und analysiert (2.8). Abkürzungen: \*1, \*2, Daten aus Timm & Steinbüchel, (1990), bzw. Liebergesell et al. (1993); \*3 Daten aus den Lävulinsäure-freien Wachstumsphasen der Fermentationen im 20 bis 500 l-Maßstab (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12, Abb. 15, Abb. 17). PHF, Polyhydroxyfettsäure; TM, Trockenmasse; 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HHx, 3-Hydroxy-hexansäure; 3HO, 3-Hydroxyoctansäure; 3HD, 3-Hydroxydecansäure; 3HDD, 3-Hydroxy-dodecansäure; n.n., nicht nachweisbar.

#### 4.1.7 Kultivierung mit Co-Substrat

Speicherversuche mit *P. putida* auf Lävulinsäure ergaben unter Anwesenheit von Glucose oder Gluconsäure als Co-Substrat während der Speicherphase eine um bis zu Faktor drei verbesserte Umsetzung von Lävulinsäure in Polymer. Wie im vorangehenden Abschnitt dargelegt, erfordert die Bereitstellung von Vorstufen zur PHF-Synthese ausgehend von Lävulinsäure vermutlich zunächst eine Aktivierung zum CoA-Thioester, die von einer Thiokinase unter ATP-Verbrauch katalysiert wird. Folglich benötigen die Zellen zur Akkumulation von Polyester neben den entsprechenden Vorstufen auch Energie in Form von ATP.

Wenn während der Speicherphase ausschließlich Lävulinsäure vorliegt, sind die Zellen gezwungen, einen Teil der Lävulinsäure über die  $\beta$ -Oxidation abzubauen, um aus der vollständigen Oxidation ATP gewinnen zu können. Durch den Abbau von Glucose oder Gluconsäure als Co-Substrat kann von den Zellen ebenfalls ATP gewonnen werden, das dann zur Aktivierung von Lävulinsäure zur Verfügung steht, wobei die Zellen nicht mehr

gezwungen sind, Lävulinsäure zur Energiegewinnung zu nutzen. Ein weiterer positiver Effekt von Glucose bzw. Gluconsäure könnte die Hemmung von Enzymen der  $\beta$ -Oxidation sein, so daß es während des Abbaus von Lävulinsäure zur Anhäufung von Metaboliten in den Zellen kommt, die der PHF-Synthase als Substrate dienen. Eine Hemmung von Enzymen der  $\beta$ -Oxidation durch Glucose wurde, wie oben beschrieben, bereits in *E. coli* (Weeks et al., 1969) und in *Caulobacter crescentus* (O'Connell et al., 1986) nachgewiesen. Der positive Effekt einer Hemmung der  $\beta$ -Oxidation auf die Akkumulation von PHF ausgehend von Fettsäuren konnte kürzlich für *E. coli* durch die Zugabe von Acrylsäure gezeigt werden (Qi et al., 1998). Die in Kultivierungen im Erlenmeyerkolben mit Glucose oder Gluconsäure als Co-Substrat beobachtete deutliche Steigerung des PHF-Gehaltes der Zellen konnte im Gegensatz zur Umsatzrate der Lävulinsäure in Polyester im großen Maßstab nicht beobachtet werden (Tabelle 7, Abb. 11). Die Umsatzrate von Lävulinsäure in Polyester hat sich jedoch auch im großen Fermentationsmaßstab auf etwa 30 % verdoppelt.

#### 4.1.8 Automatisierung der Zufuhr von Ammonium

Bei der Automatisierung der Fermentationen mit Octansäure oder Gluconsäure wurde die Stickstoffquelle, die die Zellen zu ihrer Vermehrung benötigen, der Substratvorlage zu einem großen Teil als Ammonium beigefügt, so daß die Stickstoff- und Kohlenstoffquelle gleichzeitig dosiert wurden. Die Stickstoffquelle dient den Zellen hauptsächlich zur Synthese von stickstoffreichen Zellbestandteilen, wie zum Beispiel den Proteinen und Nukleinsäuren. Diese Komponenten werden notwendigerweise während des Wachstums von den Zellen synthetisiert. Die Kohlenstoffquelle wird von den Bakterien zum Aufbau von Zellmasse und zur Deckung des Stoffwechselenergiebedarfs unter anderem in Form von Reduktionsäquivalenten benötigt. Der Aufbau von Zellmasse geschieht während der Wachstumsphase. Jedoch auch während der stationären Phase, in der kein Wachstum stattfindet, benötigen die Zellen Energie, um ihren Stoffwechsel aufrechterhalten zu können. Da das Verhältnis von sich teilenden Zellen zu stationären Zellen besonders in der zweiten Hälfte der Wachstumsphase stark abnimmt, verändert sich das benötigte Verhältnis von Kohlenstoff- zu Stickstoffquelle im Verlauf einer Fermentation ständig. Die gleichzeitige Zugabe von Kohlenstoff und Stickstoffquelle ist daher von Nachteil, da man das jeweils benötigte Verhältnis von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle vor der Fermentation zu jedem Zeitpunkt kennen muß, um die Substratvorlage entsprechend ansetzen zu können. Es ist also wünschenswert, die Dosierung der Stickstoffquelle von der Dosierung der Kohlenstoffquelle zu entkoppeln.

Der Stickstoff wurde den Bakterien in Form von Ammonium zugeführt, das in gelöster, ionisierter Form im Medium vorlag. Die Zellen nahmen das Ammonium in seiner elektrisch neutralen Form als Ammoniumhydroxyd auf, wodurch der pH-Wert des Mediums während der Aufnahme abnahm und als Regelgröße benutzt werden konnte, um aufgenommenes Ammonium zu ersetzen, wenn Ammoniumhydroxydlösung zur Korrektur des pH-Wertes eingesetzt wurde. Diese Steuerung war aber nur möglich, wenn nicht andere saure oder basische Stoffe aus dem Medium aufgenommen oder ins Medium abgegeben wurden. Fermentationen mit organischen Säuren wie Octansäure oder Gluconsäure als Kohlenstoffquelle eigneten sich folglich nicht für eine solche Automatisierung der Stickstoffzugabe. Glucose bot sich daher als „pH-neutrale C-Quelle“ für diese Form der Automatisierung an.

Bei einer Fermentation erwies sich jedoch die automatisierte Stickstoffzugabe über die Laugenpumpe der pH-Wert-Kontrolle als problematisch, da die Ammoniumkonzentration während der ersten 42 h der Wachstumsphase von 0,3 auf 0,6 g/l anstieg (Abb. 12 A). Um ein weiteres Ansteigen der Ammoniumkonzentration im Fermenter und eine dadurch verursachte Hemmung des Zellwachstums zu verhindern, mußte die Ammoniaklösung durch Natronlauge ersetzt werden, wodurch die Ammoniumkonzentration im Fermenter wieder abnahm. Der beobachtete Anstieg der Ammoniumkonzentration konnte auf eine starke Bildung von 2-Ketogluconsäure im Medium zurückgeführt werden. Durch die Kopplung der Ammoniumzugabe mit der Kontrolle des pH-Wertes wurde somit nicht nur die Aufnahme von Ammonium durch die Zellen ausgeglichen, sondern zusätzlich auch die gebildete 2-Ketogluconsäure neutralisiert, was zu der beobachteten Überdosierung von Ammonium führte.

#### **4.1.9 Bildung von 2-Ketogluconsäure während der Fermentation von *Pseudomonas putida* auf Gluconsäure oder Glucose**

*P. putida* kann, wie viele andere Bakterien der Gattung *Pseudomonas* Glucose direkt in die Zelle aufnehmen und phosphoryllieren oder extrazellulär mittels einer Glucose-Dehydrogenase zu Gluconsäure oxidieren, das daraufhin entweder in die Zelle aufgenommen oder über eine Gluconat-Dehydrogenase zu 2-Ketogluconsäure oxidiert wird (Gottschalk, 1988). Die Glucose-Abbauprodukte Gluconsäure und 2-Ketogluconsäure können in die Zelle aufgenommen und nach Phosphoryllierung über den Entner-Doudoroff-Weg verstoffwechselt werden. Timm & Steinbüchel (1990) beobachteten ebenfalls die Bildung von 2-Ketogluconsäure bei einer Batch-Fermentation von *P. aeruginosa* wenn Gluconsäure als alleinige Kohlenstoffquelle eingesetzt wurde. Um die Teilungsrate der Bakterien zu erhöhen

und zu höheren Zelldichten zu gelangen, wurde in einer Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* die von den Zellen verstoffwechselte Gluconsäure sofort durch die erneute Zugabe von Gluconsäure ausgeglichen. Dabei bildete sich im Überstand 2-Ketogluconsäure bis zu einer Konzentration von 50 g/l, wobei die Zelltrockenmassekonzentration nicht über 10 g/l anstieg (Abb. 14) und die Umsetzung von Gluconsäure in Zelltrockenmasse nur bei etwa 7,0 % lag. Vermutlich ist dieses strikte Fütterungsregime hauptverantwortlich für die beobachtete exzessive Bildung von 2-Ketogluconsäure und das verminderte Zellwachstum. So wurde durch hohe Konzentrationen von Gluconsäure im Medium bei einer Kultivierung von *Klebsiella pneumoniae* NCTC418 die Gluconsäure-Dehydrogenase stimuliert, wodurch es ebenfalls zu einer Anhäufung von 2-Ketogluconsäure im Medium kam (Simons et al., 1993).

In einer weiteren Fermentation von *P. putida* wurde die Glucose während der Wachstumsphase so zugegeben, daß die Konzentration von Glucose und Gluconsäure im Medium nicht über 9,0 g/l anstieg. Diese geringe Dosierung der Glucose sollte die Produktion von 2-Ketogluconsäure durch die Zellen vermindern. Vor jeder erneuten Zugabe von Substrat wurde sichergestellt, daß das eventuell gebildete 2-Ketogluconsäure von den Zellen nahezu vollständig verstoffwechselt war (Abb. 15). Weiterhin wurde gewährleistet, daß keine Ammoniumlimitation während der Wachstumsphase entstand, da Whiting et al. (1976) beobachteten, daß bei *P. aeruginosa* durch die Limitation von Ammonium das Aufnahmesystem für Gluconsäure und 2-Ketogluconsäure gehemmt wurde, wobei die dann angehäuften Gluconsäure wiederum die direkte Aufnahme von Glucose hemmte. Ein solcher Mechanismus würde vermutlich zu einer deutlich reduzierten Wachstumsrate und zu einer verstärkten Bildung von 2-Ketogluconsäure im Überstand beitragen.

Das Glucose-limitierte Fütterungsregime verhinderte bei der Fed-Batch-Fermentation von *P. putida* effektiv die Anhäufung von 2-Ketogluconsäure im Medium, wobei die Umsetzung von Glucose in Zelltrockenmasse von 7,0 % auf 20 % gesteigert werden konnte und eine maximale Konzentration an Zelltrockenmasse von 25 g/l erreicht wurde. Diese deutlich verbesserte Umsetzung der Glucose ist vermutlich auf eine erhöhte direkte Aufnahme von Glucose in die Zelle und die Nutzung von gebildeter Gluconsäure und 2-Ketogluconsäure zum Zellwachstum zurückzuführen. Eine Limitation der Konzentration von Glucose im Medium führte auch bei der Kultivierung von *P. aeruginosa* zu einer verbesserten Aufnahme von Glucose in die Zelle, wobei der Stoffwechsel der Zellen vom extrazellulären, oxidativen Weg zum intrazellulären Weg umgestellt wurde und die aufgenommene Glucose nach Phosphoryllierung über den „Entner-Doudoroff-Weg“ abgebaut wurde (Mitchell & Dawes, 1982; Whiting et al., 1976).

#### 4.1.10 Einfluß von rekombinanter DNA auf das Zellwachstum des Wirtsstammes

In Wachstumsversuchen zeigte der rekombinante Stamm *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) eine deutlich verlängerte lag-Phase und ein verzögertes Wachstum gegenüber dem PHF-negativen Ausgangsstamm *P. putida* GPp104, der keine rekombinante DNA enthielt (Abb. 13). Zur Akkumulation 4HV-haltiger Polyester wurden in die PHF-negativen Stämme *P. putida* GPp104 und *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> jeweils pHP1014 Hybridplasmide übertragen, die die PHF-Synthasegene *phaE* und *phaC* aus *Thiocapsa pfennigii* enthielten. Hierfür standen zwei genomische Fragmente von unterschiedlicher Länge zur Verfügung: Ein Eco RI-Restriktionsfragment (E156) mit einer Länge von 15,6 kbp, das stromabwärts der PHF-Synthase Gene *phaE* und *phaC* aus *Thiocapsa pfennigii* zusätzlich einen offenen Leserahmen mit einer Größe von etwa 13 kbp von unbekannter Funktion enthielt (Liebergesell et al., 1993), und ein daraus resultierendes BamHI-Subfragment (B28), das die PHF-Synthase Gene *phaE* und *phaC* aus *Thiocapsa pfennigii* enthielt, bei dem der offene Leserahmen jedoch auf 0,6 kbp verkürzt wurde (Liebergesell et al., unveröffentlicht). Sowohl bei *P. putida* als auch bei *R. eutropha* zeigten die rekombinanten Stämme, die jeweils das größere Fragment (E156) enthielten, schlechtere Wachstumseigenschaften, als die Stämme mit dem kleineren Fragment (B28). Bei *P. putida* äußerte sich dies in einer um etwa 12 h verlängerten lag-Phase (Abb. 13) und bei *R. eutropha* in einer geringeren Trockenmassekonzentration (Tabelle 9). Deshalb schienen die Stämme mit dem kleineren Fragment für eine Fermentation im großen Maßstab besser geeignet, auch wenn im Falle von *P. putida* mit einem etwas verringerten 4HV-Gehalt des akkumulierten Polyesters gerechnet werden mußte.

Die beobachtete Verschlechterung des Wachstums durch die eingebrachte Fremd-DNA könnte darauf zurückzuführen sein, daß der rekombinante Stamm durch das Vorhandensein von fremden Genen gezwungen ist, diese rekombinante DNA zu replizieren und außerdem ihm fremde Proteine zu synthetisieren, die die Zellen zum Wachstum ursprünglich nicht benötigten, wobei Ressourcen und Energie benötigt werden, die der Zelle dann nicht mehr zum Wachstum zur Verfügung stehen. Auch Lang et al. (1997) beobachteten bei der Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* einen negativen Effekt von rekombinanter DNA auf das Zellwachstum und die Umsetzung von Substrat in Biomasse. Dabei wurde festgestellt, daß die Replikation von rekombinanter Plasmid-DNA und die Synthese von rekombinantem Protein den Wirtszellen eine Last aufbürdet, die sich in einer verminderten Wachstumsrate und einer verschlechterten Biomasseausbeute äußerte (Gopal et al., 1989; Tottrup & Carlsen, 1990). Ein Vergleich der spezifischen *Thiocapsa pfennigii*-PHF-Synthaseaktivität in *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) ergab eine wesentlich erhöhte Enzymaktivität (ca. Faktor 30) der

PHF-Synthase in dem Stamm *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) (Liebergesell et al., unveröffentlicht). Diese höhere Expression von Fremdprotein und die damit verbundene Belastung für die Wirtszelle könnte eine Erklärung für die verminderte Wachstumsrate von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) gegenüber *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) und dem Ausgangsstamm *P. putida* GPp104 sein. Ein solcher Zusammenhang zwischen der Produktionsrate von rekombinantem Protein und der Wachstumsrate der Zellen wurde auch bei der Kultivierung von rekombinanten Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* festgestellt, wobei die Wachstumsrate mit zunehmender Menge an produziertem Fremdprotein abnahm (Wang & Da Silva, 1993). Möglicherweise hat aber auch das Genprodukt des ORF I störende Wirkung auf das Zellwachstum von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156). Bisher konnten für die von der Sequenz des ORF I abgeleiteten Aminosäuresequenz keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen gefunden werden (Liebergesell et al., unveröffentlicht).

## 4.2 Übertragung der Fermentation von *P. putida* in den 500 l-Maßstab

Um zu zeigen, daß die Produktion 4HV-haltige Polyester auch im industriellen Maßstab möglich ist, wurde die Fermentation vom 20 l-Maßstab in den 500 l-Maßstab übertragen. Das Hauptziel der Fermentation im großen Maßstab war die Entwicklung eines Prozesses, der eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute gewährleistet, kostengünstig ist und eine hohe Produktqualität (in diesem Fall bedeutet dies einen hohen 4HV-Anteil) liefert. Gleichzeitig sollte die Fermentation eine große Menge an 4HV-enthaltendem Polyester aus einer Charge erzeugen, der dann für ausführliche Materialuntersuchungen zur Verfügung stehen sollte, um den Einfluß von 4HV auf die Materialeigenschaften des Polyesters zu charakterisieren und mögliche Anwendungen für diesen Polyester zu finden.

### 4.2.1 Kultivierung von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) im 650 l-Fermenter

*P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) wurde für die Kultivierung im 650 l-Fermenter als Organismus gewählt, da er ein besseres Wachstumsverhalten aufwies als *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156). Zwar akkumulierte dieser Stamm einen Polyester mit einem 4HV-Anteil von ca. 20 mol %, der damit gegenüber *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) (ca. 35 mol %, Tabelle 8) leicht verringert war, jedoch lag der Anteil immer noch in einem Bereich, in dem deutliche Auswirkungen auf die Materialeigenschaften zu erwarten waren.

Während der Kultivierung von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) im 500 l-Maßstab zeigten die Zellen ein vergleichsweise gutes Wachstum und am Ende der Fermentation konnte eine Trockenmassekonzentration von ca. 20 g/l erreicht werden, die

einen Polymergehalt von 50 % (w/w) aufwies, wobei der Anteil an 4HV mit 34,6 mol % für diesen Stamm relativ hoch war. Dieses Ergebnis zeigt, daß die im 20 l-Maßstab entwickelte Fermentationsstrategie in den 500 l-Pilotmaßstab übertragbar ist, wobei sowohl die erreichte Trockenmassekonzentration wie auch deren Polyestergehalt in der gleichen Größenordnung lag, wie bei der Fermentation im 20 l-Maßstab.

deKoning et al. (1997) stellten bei der Bilanzierung eines Beispielprozesses mit *P. putida* KT2442 und Octansäure fest, daß die Erhöhung der Zelldichte über eine Trockenmassekonzentration von 20 g/l hinaus keinen entscheidenden Einfluß auf die Reduktion der Produktionskosten mehr hat und sich eine Steigerung des PHF-Gehaltes der Zellen im Bereich von über etwa 50 % (w/w) nicht mehr wesentlich auf die Reduktion der Kosten auswirkt. Die Übertragung dieser Bilanzierung auf den in dieser Arbeit entwickelten Prozeß zur Produktion 4HV-haltiger Polyester ergibt, daß sich die im 500 l-Maßstab erreichte Trockenmasse- und Polyesterkonzentration sehr gut für die großtechnische Produktion 4HV-haltiger Polyester eignet.

#### 4.2.2 Grenzen der Fermentation

Die bei der Fermentation entscheidenden Parameter sind die maximal erreichbare *Zelldichte*, der *PHF-Gehalt* der Zelltrockenmasse und der molare *Anteil von 4HV* am Polyester.

##### 4.2.2.1 Zelldichte

Während den Fed-Batch-Fermentationen von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) mit Glucose oder Gluconsäure zeigte sich, daß trotz einer ausreichenden Zufuhr von Nährstoffen keine höhere Trockenmassekonzentration als 25 g/l erreicht werden konnte. Bei allen durchgeführten Fermentationen wurde beobachtet, daß die relative Sauerstoffsättigung im Medium während der exponentiellen Phase stark abnahm und gleichzeitig mit dem Übergang des Zellwachstums in die stationäre Phase bis fast auf 0 % zurückging. Somit kann angenommen werden, daß die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff der wachstumslimitierende Faktor war. Zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung der Zellen wurde die Begasungsrate während der exponentiellen Phase auf maximal 1,5 vvm und die Rührerdrehzahl auf 700 Upm (bzw. 0,75 vvm und 300 Upm im 500 l-Maßstab) erhöht. Eine weitere Erhöhung der Begasungsrate führte zu einer sehr starken Schaumentwicklung im Fermenter, so daß der mechanische Entschäumer nicht mehr ausreichte, um den anfallenden Schaum im Fermenter zurückzuhalten und zusätzlich

chemischer Entschäumer in großer Menge zugegeben werden mußte. Chemische Entschäumer setzen unter anderem die Oberflächenspannung des Mediums herab und könnten sich in größerer Konzentration negativ auf das Zellwachstum auswirken. Außerdem stellen sie bei der späteren Gewinnung des Polyesters eine mögliche Quelle für Verunreinigungen dar, so daß darauf geachtet werden mußte, möglichst wenig Entschäumer einzusetzen, weshalb die Belüftung begrenzt wurde. Die Erhöhung der Rührerdrehzahl zur Verbesserung des Sauerstoffeintrags führte ebenfalls zu einer verstärkten Schaumbildung und außerdem zum Absterben der Zellen, was vermutlich auf einen zu großen Schergradienten im Medium zurückzuführen war, so daß die Drehzahl im 20 l-Maßstab auf maximal 700 Upm und im 500 l-Maßstab auf maximal 300 Upm begrenzt wurde. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung der Zellen stellt die Begasung mit reinem Sauerstoff dar, allerdings wäre diese Lösung mit vergleichsweise hohen Kosten verbunden.

Bei der Kultivierung des Wildtyps *P. putida* BM01 auf Glucose konnte während einer Fed-Batch-Fermentation eine Trockenmassekonzentration von 100 g/l erreicht werden (Kim et al., 1996). Die dabei erreichte Zelldichte ist die bisher höchste für *P. putida* beschriebene Zelldichte (Riesenberg & Guthke, 1999), wobei die Kultivierung im vergleichsweise kleinen 5 l-Maßstab mit reinem Sauerstoff als Begasungsmedium durchgeführt wurde. Die in der vorliegenden Arbeit bei der Fermentation von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) mit Glucose oder Gluconsäure erreichten Trockenmassekonzentrationen von 25 g/l liegen um den Faktor 4 niedriger als die von Kim et al. (1996) erreichten Zelldichten. Da die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff wie oben beschrieben die wachstumslimitierende Größe darstellt und der Sauerstoffgehalt der Luft nur etwa 21 % (v/v) beträgt, ist die Trockenmassekonzentration bei einer Begasung mit Luft vermutlich nicht wesentlich über 25 g/l zu steigern. Bei der Einordnung der maximal erreichten Trockenmassekonzentrationen ist auch zu beachten, daß bei Hochzelldichtefermentationen mit Stämmen der Gattung *Pseudomonas* der Sauerstoffeintrag oftmals die limitierende Größe darstellt (Huijberts & Eggink, 1994; Preusting et al., 1993b) und außerdem rekombinante Organismen meist schlechtere Wachstumseigenschaften aufweisen, als die entsprechenden Wildtypen (siehe vorangegangener Abschnitt).

In Fed-Batch-Fermentationen im 20 l-Maßstab von *R. eutropha* H16-PHB-4 (pHP1014::B28) mit Fructose als Substrat in der Wachstumsphase wurde eine Zelldichte von 40 bis 45 g/l erreicht (Abb. 16). Diese gegenüber *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) deutlich erhöhte Trockenmassekonzentration läßt darauf schließen, daß *R. eutropha* besser zu hohen Zelldichten kultivierbar ist, als *P. putida*. Diese Annahme wird in der Literatur bestätigt, wo für den nicht rekombinanten Stamm *R. eutropha* NCIMB 11599 (früher *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599) maximale

Zelldichten von 184 g/l erreicht wurden (Lee et al., 1994), die damit etwa doppelt so hoch lagen, wie für *P. putida*.

#### 4.2.2.2 Polyestergehalt der Trockenmasse und 4HV-Gehalt des Polyesters

Die rekombinanten Stämme *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) akkumulierten sowohl bei der Kultivierung im 50 ml-Maßstab, wie auch bei der Fermentation im 500 l-Pilotmaßstab ausgehend von Lävulinsäure einen 4HV-haltigen Polyester, dessen Anteil an der Zelltrockenmasse etwa 50 % (w/w) betrug. Da der Polyestergehalt der Zelltrockenmasse am Ende der 500 l-Fermentation kaum noch zunahm, ist anzunehmen, daß eine Verlängerung der Speicherphase über 100 h hinaus nicht zu einer wesentlichen Steigerung des Polyestergehaltes führen würde (Abb. 17). *R. eutropha* H16-PHB-4 (pHP1014::B28) akkumulierte in einer zweistufigen Kultivierung im 50 ml-Maßstab mit Lävulinsäure als Substrat in der 72-stündigen Speicherphase einen 4HV-haltigen Polyester, dessen Anteil an der Zelltrockenmasse mit etwa 75 % deutlich höher lag, als bei den rekombinanten Stämmen von *P. putida* (Tabelle 9 bzw. Tabelle 8). Bei der Fermentation von *R. eutropha* H16-PHB-4 (pHP1014::B28) im 20 l-Maßstab akkumulierten die Zellen während der 30-stündigen Speicherphase auf Lävulinsäure einen Polyester, dessen Anteil an der Zelltrockenmasse mit etwa 40 % (w/w) deutlich unter dem Polyestergehalt der Zelltrockenmasse aus der Kultivierung im 50 ml-Maßstab lag (Abb. 16). Dies läßt darauf schließen, daß hier eine Verlängerung der Speicherphase über 30 Stunden hinaus noch zu einem deutlichen Anstieg des Polyestergehaltes führen würde. Allerdings nahm bei der Fermentation im 20 l-Maßstab der 4HV-Anteil des Polyesters während der letzten 16 h der Speicherphase nur noch geringfügig von 3,7 mol % auf 4,3 mol % zu. Aus dieser Entwicklung und einem Vergleich mit den Ergebnissen aus der Kultivierung im 50 ml-Maßstab, bei denen der 4HV-Anteil lediglich 3,1 mol % betrug (Tabelle 9), ist selbst bei einer Verlängerung der Speicherphase mit keiner wesentlichen Steigerung des 4HV-Anteils mehr zu rechnen. Die Kultivierung von *R. eutropha* H16-PHB-4 (pHP1014::B28) im Fermenter unter kontrollierten Bedingungen führte im Vergleich zu der Kultivierung im Schüttelkolben zu einer deutlich verringerten Speicherrate der Zellen während der Wachstumsphase auf Fructose. Dies ist vermutlich auf die Vermeidung einer Stickstoffmangelsituation im Fermenter zurückzuführen.

Bei der Kultivierung von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) mit Lävulinsäure als Substrat in der Speicherphase fiel auf, daß die Zellen von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) einen Polyester mit einem deutlich höheren 4HV-Anteil akkumulierten, als die Zellen von *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV), der

PHF-Gehalt der Zelltrockenmasse jedoch etwa gleich war (Tabelle 8). Dieser erhöhte 4HV-Anteil ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß Zell-Rohextrakte von *P. putida* GpP104 (pHP1014::E156) eine um den Faktor 30 höhere spezifische PHF-Synthaseaktivität aufwiesen als Rohextrakte von *P. putida* GpP104 (pHP1014::B28RV) (Liebergesell et al., unveröffentlicht). Dadurch wurden vermutlich die zuvor als CoA-Thioester aktivierten Vorstufen bevorzugt der PHF-Synthese zugeleitet und nicht über die um die gleichen Substrate konkurrierende  $\beta$ -Oxidation abgebaut. Eine Verschiebung der Polyesterzusammensetzung in Abhängigkeit von der spezifischen PHF-Synthaseaktivität der Zellen wurde auch bei Speicherversuchen von *P. oleovorans* Gp01 ausgehend von Decanoat als Kohlenstoffquelle beobachtet (Huisman et al., 1991). Auf Grund des gleichen PHF-Gehaltes der Zellen, die eine um den Faktor 30 höhere spezifische PHF-Synthaseaktivität aufwiesen, scheint die PHF-Synthaseaktivität nicht der limitierende Faktor für die Gesamtspeicherrate gewesen zu sein. Eine mögliche Erklärung stellt die Limitation der für die PHF-Synthese zur Verfügung gestellten Acyl-CoA-Intermediate dar. Allerdings wurde bei den Fermentationen von *P. putida* GpP104 (pHP1014::B28RV) eine sehr starke Bildung von 4HV im Medium festgestellt, deren Konzentration am Ende der Fermentation bis zu 3,5 g/l betrug. Vermutlich wird Lävulinsäure zunächst in die Zelle aufgenommen, zum CoA-Thioester aktiviert und zu 4HV-CoA reduziert, bevor es zu 3-Pentenoyl-CoA und weiter unter Beteiligung der  $\beta$ -Oxidation umgesetzt wird (Abb. 29). Dadurch, daß 4HV in großem Maße von den Zellen in das Medium ausgeschleust wird, kann man also eher von einem Überangebot an 4HV-CoA in den Zellen ausgehen, das weder von der PHF-Synthase, noch von der  $\beta$ -Oxidation in dem Maße umgesetzt wird, wie es durch die Organismen gebildet wird. Bei der Fermentation von *R. eutropha* H16-PHB-4 (pHP1014::B28) wurde 4HV sogar mit Konzentrationen von bis zu 10,0 g/l im Medium nachgewiesen, wobei der Anteil von 4HV am Polyester unter 5 mol % lag. Dieser im Vergleich zu *P. putida* GpP104 (pHP1014::B28RV) deutlich geringere Anteil von 4HV am gebildeten Polyester könnte dadurch erklärbar sein, daß *R. eutropha* H16-PHB-4 im Gegensatz zu *P. putida* GpP104 eine relativ hohe Aktivität der  $\beta$ -Ketothiolase zeigte (Liebergesell et al., 1993) und damit vermehrt in der Lage war, das zentrale Intermediat Acetyl-CoA zu 3HB-CoA zu kondensieren, das dann durch die rekombinante Synthase in den Polyester mit integriert wurde. Da *R. eutropha* H16-PHB-4 (pHP1014::B28) ausgehend von Lävulinsäure 3HB mit einem Anteil von über 80 mol % in den Polyester integrierte, aber im Vergleich zu 4HV nur sehr geringe Mengen an 3HB und 3HV in das Medium abgab (unter 0,4 g/l), ist es sehr wahrscheinlich, daß die rekombinante Synthase gegenüber 3HB und 3HV eine deutlich größere Aktivität aufweist, als gegenüber 4HV. Das überschüssig gebildete 4HV müßte dann von den Zellen ins Medium ausgeschleust werden.

Eine weitere Erklärung für die hohe Konzentration an 4HV im Überstand würde die Annahme liefern, daß die Lävulinsäure extrazellulär, z.B. durch eine membranständige Reduktase zu 4HV reduziert würde, welche dann von der Zelle aufgenommen und der PHF-Synthese zur Verfügung stünde oder weiter verstoffwechselt würde, wobei unter anderem 3HV entstünde, das über die Synthase in den Polyester integriert werden könnte. Möglicherweise ist dabei die Aufnahme von 4HV in die Zelle der limitierende Schritt, so daß sich 4HV im Medium anhäuft.

### **4.3 Optimierung der Akkumulation 4HV-haltiger Polyester durch Eingriffe in den Lävulinsäurekatabolismus von *R. eutropha* HF39**

Ziel der Untersuchungen war die Erhöhung des 4HV-Anteils in dem von *R. eutropha* ausgehend von Lävulinsäure gebildeten Polyester und die Optimierung der Umsetzung von Lävulinsäure in 4HV. *R. eutropha* bildet einen Terpolyester aus 3HB, 3HV und 4HV, wenn der Organismus auf 4HV als alleiniger Kohlenstoffquelle angezogen wird, wobei 3HV mit einem molaren Anteil von über 50 % den Hauptbestandteil des Polyesters darstellt (Valentin et al., 1992). Daraus wurde abgeleitet, daß 4HV nach der Aktivierung zu 4-Hydroxyvaleryl-CoA unter Beteiligung der  $\beta$ -Oxidation über 3-Hydroxyvaleryl-CoA und 3-Ketovaleryl-CoA zu Acetyl-CoA und Propionyl-CoA abgebaut wird (Valentin & Steinbüchel, 1995). Dieser Abbauweg stellt somit sämtliche für die Synthese des auftretenden Terpolyesters benötigten Substrate zur Verfügung. Da *R. eutropha* HF39 auch ausgehend von Lävulinsäure einen Terpolyester aus 3HB, 3HV und 4HV akkumuliert (Tabelle 5), kann angenommen werden, daß die beiden Substrate 4HV und Lävulinsäure im bakteriellen Stoffwechsel in Verbindung stehen.

#### **4.3.1 „Metabolic Engineering“ durch Tn5-induzierte Mutagenese von *R. eutropha* HF39**

In den Untersuchungen zur Erhöhung des 4HV-Gehaltes in *R. eutropha* HF39 wurden Tn5-induzierte Mutanten verwendet, die kein oder nur sehr schwaches Wachstum auf Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle zeigten. Diese Mutanten wurden phänotypisch und im Rahmen einer Diplomarbeit (Brämer 1999a) auch genotypisch charakterisiert. Auf Grund ihrer phänotypischen Charakterisierung wurden die Stämme in zwei Klassen mit jeweils identischem Wachstumsverhalten eingeteilt (Tabelle 11). Die Stämme der Klasse I zeigten kein oder nur schwaches Wachstum auf Lävulinsäure und 4HV und kein Wachstum

auf 3HV, wuchsen jedoch auf Gluconsäure und Octansäure normal. Die zweite Gruppe unterscheidet sich von der ersten dadurch, daß sie auf 3HV normales Wachstum zeigt. Auf Grundlage des oben erwähnten hypothetischen Abbauweges von 4HV war anzunehmen, daß die Tn5::*mob*-Insertion bei diesen Stämmen in ein Strukturgen erfolgt war, dessen Produkt die Isomerisierung von 4HV zu 3HV katalysiert. Diese Stämme müßten also in der Lage sein, Lävulinsäure zu aktivieren und zum 4HV-CoA zu reduzieren, ohne dieses Intermediat weiter verstoffwechseln zu können. Dadurch müßte es zu einer Anhäufung von 4HV-CoA in den Zellen kommen und damit zu einem Einbau von 4HV in den Polyester. Außerdem dürften die Zellen nicht mehr in der Lage sein, 3HV und 3HB in den Polyester zu integrieren, da sie im postulierten Abbauweg als Intermediate nach einer Isomerisierung von 4HV zu 3HV entstehen. Zweistufige Speicherversuche ausgewählter Mutanten mit Lävulinsäure als Substrat in der Speicherphase zeigten für alle Stämme außer für SK7290 einen drastisch reduzierten Anteil von 3HV am Polyester. Die beiden Mutanten der Klasse II (SK7291 und SK7205) wiesen keinen erhöhten 4HV-Anteil am Polyester auf, bildeten jedoch 4HV im Überstand mit einer gegenüber dem Ausgangsstamm um den Faktor 10 erhöhten Konzentration (Tabelle 12). Damit stellen sie einen für weitere Untersuchungen sehr interessanten Phänotypen dar und bestätigen den postulierten Abbau von Lävulinsäure über 4HV zu 3HV.

Die genotypische Charakterisierung dieser Mutanten zeigte, daß die Tn5::*mob*-Insertionen in ein Strukturgen erfolgt waren, dessen Produkte hohe Identitäten zum *fadE2*-Genprodukt aus *Mycobacterium tuberculosis* aufwiesen (Tabelle 2, Brämer et al., 1998). Das *fadE2*-Gen codiert für eine Acyl-CoA-Dehydrogenase (EC 1.3.99.3), die mittelkettige Acyl-CoA-Thioester als Substrate akzeptiert (Cole et al., 1998). Daher wird die aus der Lävulinsäure gebildete 4-Hydroxyvaleriansäure in *R. eutropha* HF39 vermutlich zunächst zu Pentenoyl-CoA dehydratisiert und anschließend zu Valeryl-CoA reduziert. Da die Tn5-Insertion bei den 4HV-negativen Mutanten nicht in ein Gen erfolgt war, das für eine Hydratase/Dehydratase codiert, kann angenommen werden, daß 4HV nicht, wie ursprünglich vermutet, zu 3HV isomerisiert wird. Das entstandene Valeryl-CoA wird durch die  $\beta$ -Oxidation zu Propionyl-CoA und Acetyl-CoA gespalten. Diese Produkte werden dann entweder über die zentralen Stoffwechselwege weiter verwertet oder zu 3HB-CoA bzw. 3HV-CoA kondensiert und stehen somit der PHF-Synthase zur Integration in den Polyester zur Verfügung (Tabelle 15, Tabelle 16).

Auf Grund ihres Geno- und Phänotyps stellen insbesondere die „*fadE2*-Mutanten“ äußerst interessante Kandidaten für eine Erhöhung des 4HV-Anteils im Polyester dar und wurden daher für weiterführende Speicherversuche herangezogen. Da die „*fadE2*-Mutanten“ auf Grund ihres Phänotyps nicht in der Lage waren, auf Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen, mußten die Zellen zunächst auf anderen Substraten angezogen

werden. Fructose war für diese Mutanten eine gut geeignete Kohlenstoffquelle während der Wachstumsphase, da die Zellen nach dem Wachstum den geringsten Polyestergehalt und nach der anschließenden Speicherphase auf Lävulinsäure den höchsten 4HV-Anteil am Polyester aufwiesen (exemplarisch SK7291, Tabelle 13).

Erstaunlicherweise zeigte die Mutante SK4508 nach Wachstum auf Gluconsäure einen ungewöhnlich hohen 4HV-Anteil von 9,3 mol % und einen gegenüber dem Ausgangsstamm *R. eutropha* HF39 deutlich reduzierten 3HV-Gehalt, so daß er bezüglich der Polyesterzusammensetzung den „*fadE2*-Mutanten“ ähnelte. Die genotypische Charakterisierung dieser Mutante zeigte, daß die Tn5::*mob*-Insertion in ein Strukturgen erfolgt war, dessen Produkt hohe Identitäten zum *capP*-Gen aus *M. leprae* zeigte, das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase codiert und die Kondensation von CO<sub>2</sub> und Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat katalysiert. Diese Reaktion steht nach bisherigen Erkenntnissen nicht in direktem Zusammenhang mit dem Lävulinsäurekatabolismus und erklärt somit den erhöhten 4HV-Gehalt dieser Mutante nicht. Das gegenüber *R. eutropha* HF39 unveränderte Speicherverhalten auf Lävulinsäure nach Wachstum auf Fructose und Succinat war hingegen zu erwarten. Vermutlich ist der erhöhte 4HV-Gehalt auch nicht auf eine Anhäufung von 4HV in der Zelle zurückzuführen, da keine verstärkte Bildung von 4HV im Medium gemessen werden konnte. Auffällig ist der bei diesem Stamm nach Wachstum auf Gluconsäure sehr geringe Polymeranteil der Zelltrockenmasse. Dieses Ergebnis wird von zweistufigen Speicherversuchen mit Gluconsäure als Substrat während der Wachstumsphase und 4HV als Substrat in der Speicherphase bestätigt, wobei der Polymeranteil an der Zelltrockenmasse mit 6,1 % (w/w) im Vergleich zu 4HV-negativen Mutanten am geringsten, der molare Anteil von 4HV am Polyester mit 22,7 mol % jedoch am höchsten war (Valentin & Steinbüchel, 1995).

Interessanterweise akkumulierten alle untersuchten „*fadE2*-Mutanten“ nach Wachstum auf Fructose ausgehend von Lävulinsäure als Kohlenstoffquelle in der Speicherphase einen Polyester, der noch zu etwa 20 mol % aus 3HV bestand (Tabelle 14). Dennoch waren sie nicht mehr in der Lage, auf Lävulinsäure oder 4HV zu wachsen, sie wuchsen jedoch auf 3HV. Dies ließ auf einen alternativen Abbauweg von Lävulinsäure schließen, für den das Genprodukt des *fadE2*-homologen Gens nicht notwendig ist und darauf, daß unter Speicherbedingungen oder bei längerer Inkubation der Zellen auf diesen Substraten neben der Reduktion von 3-Pentenoyl-CoA auch dessen Hydratisierung zu 3HV-CoA möglich ist. Eine solche Reaktion wird vermutlich durch eine Enoyl-CoA-Hydratase katalysiert. Wachstumsversuche mit Mutanten, bei denen die Tn5-Insertion in ein Gen erfolgt war, das große Homologien zum *fadE2*-Gen aufwies (SK4491, SK4416, SK7291, SK4525), zeigten, daß die Stämme nach 216 h Inkubation auf Lävulinsäure bzw. 4HV in der Lage waren, auf den Substraten Lävulinsäure und 4HV zu wachsen, auf denen nach kürzerer

Inkubation kein Wachstum zu beobachten war (Brämer, 1999a). Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme eines alternativen Abbauweges in *R. eutropha* HF39.

Die bisherigen Ergebnisse führten zu der Entwicklung eines hypothetischen Abbauweges der Lävulinsäure in *R. eutropha* HF39 (Abb. 29). Der Katabolismus der Lävulinsäure beginnt mit einer Aktivierung zum 4-Ketovaleryl-CoA, das anschließend zu 4-Hydroxyvaleryl-CoA reduziert wird. Diese beiden initialen Schritte sind hypothetisch, stellen aber nach dem bisherigen Kenntnisstand die einzige Möglichkeit dar, wie 4HV-CoA als Substrat für die PHF-Synthase zur Verfügung gestellt werden kann. Anschließend wird 4HV-CoA zu 3-Pentenoyl-CoA dehydratisiert und im Hauptabbauweg zu Valeryl-CoA reduziert. Alternativ kann 4HV-CoA in einer Nebenreaktion auch zu 3HV-CoA hydratisiert werden. Valeryl-CoA bzw. 3-Hydroxyvaleryl-CoA fließen dann in die  $\beta$ -Oxidation ein. Beim Abbau von Valeryl-CoA durch die  $\beta$ -Oxidation entstehen als Produkte Propionyl-CoA und Acetyl-CoA, wobei letzteres in den Tricarbonsäure-Zyklus eingeht und Propionyl-CoA über den Methylcitrat-Zyklus verstoffwechselt wird.



**Abb. 29: Hypothetischer Abbauweg der Lävulinsäure in *R. eutropha* HF39** (Brämer et al., 1998) (vorherige Seite).

Abkürzungen: 3HB, 3-Hydroxybuttersäure; 3HV, 3-Hydroxyvaleriansäure; 4HV, 4-Hydroxyvaleriansäure; 3HV-CoA, 3-Hydroxyvaleryl-CoA; 4HV-CoA, 4-Hydroxyvaleryl-CoA; TCC, Tricarbonsäure-Zyklus; MCC, 2-Methylcitrat-Zyklus. Die roten Pfeile zeigen den Einbau von Intermediaten des postulierten Lävulinsäureabbauweges in den Terpolyester an. Der gestrichelt dargestellte Pfeil stellt die alternative Reaktion der Hydratisierung von 3-Pentenoyl-CoA zu 3HV-CoA dar. *FadE2*, *prpC*, *prpB*, *acn* und *mdh* stellen die potentiellen Strukturgene der vorgeschlagenen Enzyme dieses Abbauweges dar.

#### 4.3.2 „Metabolic Engineering“ durch Hemmung der $\beta$ -Oxidation mittels Acrylsäure

Acrylsäure stellt durch ihre Fähigkeit, die  $\beta$ -Oxidation zu hemmen, ein wirkungsvolles Werkzeug zur Kanalisierung von Intermediaten („metabolic routing“) in die Synthese von PHF dar (Thijsse, 1964; Qi et al., 1998). Da *R. eutropha* HF39 in Gegenwart von Acrylsäure nicht mehr in der Lage ist, auf Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen, kann man davon ausgehen, daß die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren am Katabolismus von Lävulinsäure beteiligt ist (Abb. 18). Bei Speicherversuchen mit Lävulinsäure in der Speicherphase führte die Anwesenheit von Acrylsäure zu einem leichten Abbau des in der Wachstumsphase gebildeten Polyesters, so daß die Zellen nach der Speicherphase sogar einen geringeren Polymergehalt aufwiesen, als nach der Wachstumsphase. In dem nach der Speicherphase akkumulierten Polyester war kein 4HV nachweisbar und der Gehalt an 3HV war auf unter 10 mol % drastisch reduziert gegenüber den Kontrollanzuchten ohne Acrylsäure (Tabelle 15). Wie bereits oben beschrieben, erfordert die Bereitstellung von Vorstufen zur PHF-Synthese ausgehend von Lävulinsäure zunächst vermutlich eine Aktivierung zum CoA-Thioester, die von einer Thiokinase unter ATP-Verbrauch katalysiert wird. Folglich benötigen die Zellen zur Akkumulation von Polyester neben den entsprechenden Vorstufen auch Energie in Form von ATP. Wenn die Zellen aber während der Speicherphase durch die Anwesenheit von Acrylsäure die Lävulinsäure nicht mehr verstoffwechseln können, sind sie auch nicht mehr in der Lage, Energie in Form von ATP zu gewinnen. Dies könnte eine Erklärung für die drastisch reduzierte Speicherrate der Zellen in Gegenwart von Acrylsäure sein. Unter Anwesenheit von Fructose als Co-Substrat, das nicht über die  $\beta$ -Oxidation abgebaut wird, müßten die Zellen in der Lage sein, unabhängig von einer Blockade der  $\beta$ -Oxidation, Energie zu gewinnen, um Vorstufen für die PHF-Synthese zu synthetisieren und in den Polyester zu integrieren. Unter diesen Umständen ist jedoch keine Steigerung des Polymeranteils festzustellen (Tabelle 16).

Acrylsäure ist ein Inhibitor für zwei Schlüsselenzyme der  $\beta$ -Oxidation, die Acyl-CoA-Synthetase, welche die Fettsäure durch Anlagerung von Coenzym A zum

Acyl-CoA aktiviert und die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase, welche die Abspaltung von Acetyl-CoA aus 3-Ketoacyl-CoA katalysiert und sie ist möglicherweise zusätzlich in der Lage, freies CoA aus der Aktivierungsreaktion der Fettsäure abzufangen (Thijsse, 1964). Diese durch Acrylsäure inhibierten Reaktionen würden die drastisch verminderte Akkumulation von Polyester und den verminderten Abbau von Lävulinsäure durch *R. eutropha* HF39 unter Anwesenheit von Acrylsäure erklären.

Die Kultivierung der „*fadE2*-Mutante“ SK7291 von *R. eutropha* HF39 wurde in den 20 l-Maßstab übertragen, um den von diesem Stamm akkumulierten Polyester im größeren Maßstab zu produzieren und den molaren Anteil an 4HV gegenüber der Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab durch die bezüglich pH-Wert, Belüftung und Temperatur kontrollierten Bedingungen im Fermenter möglicherweise weiter zu erhöhen. Die Akkumulation von Polyester während der Wachstumsphase auf Fructose konnte gegenüber den Versuchen im Schüttelkolben auf etwa 10 % (w/w) halbiert werden (Tabelle 13, Abb. 19). Diese deutlich verminderte Speicherrate während der Wachstumsphase ist vermutlich hauptsächlich auf die erfolgreiche Vermeidung einer Stickstoffmangelsituation und eine ausreichende Belüftung im Fermenter zurückzuführen. Der bis zum Ende der Fermentation gespeicherte Polyester wies einen 4HV-Anteil von ca. 10 mol % auf und lag damit nur geringfügig über dem 4HV-Anteil, der im Schüttelkolbenversuch erreicht werden konnte (8,4 mol %, Tabelle 14), war jedoch mehr als doppelt so hoch wie der 4HV-Gehalt des im Fermenter kultivierten rekombinanten Stammes *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::B28) (4,3 mol %, Abb. 16).

#### 4.4 Produktgewinnung und -aufbereitung

Die Aufbereitungskosten zur Gewinnung von Polyhydroxyfettsäuren aus einer Zellsuspension machen etwa ein Drittel der gesamten Produktionskosten aus und stellen damit ein großes Potential dar, die Gesamtkosten zu reduzieren (deKoning et al., 1997).

Die bei der Durchflußzentrifugation beobachteten zum Teil erheblichen Verluste an Zellmasse (bis zu 30 %) sind darauf zurückzuführen, daß die Dichte von PHF mittlerer Kettenlänge im Unterschied zu PHB nahe an der Dichte von Wasser liegt und somit schlechter sedimentiert (Marchessault et al., 1990). Die durch den Flockungsprozeß gebildeten Zellagglomerate (Größe ca. 50 bis 100 µm) verbesserten die Sedimentation, so daß der Verlust an Zellmasse während der Zentrifugation auf unter 10 % gesenkt werden konnte. Gleichzeitig wurden die Zellwände durch die Behandlung der Zellen mit Säure, Lauge und Hitze vermutlich geschwächt, was zu einer Beschleunigung der späteren Extraktion des Polyesters beigetragen haben kann.

Die Vorbehandlung der geflockten und gefriergetrockneten Zellen mit siedendem Methanol führte zu einer drastischen Verkürzung der anschließenden Soxhlet-Extraktion und zu einem wesentlich reineren Polyester. Dadurch konnte auf eine mehrmalige Fällung des Polyesters in Ethanol verzichtet und erhebliche Kosten eingespart werden. Während der Behandlung mit siedendem Methanol wurden die Zellen zum größten Teil aufgebrochen wobei PHF-Agglomerate von bis zu 5 mm Größe entstanden. Diese Agglomeration könnte darauf zurückzuführen sein, daß die untere Temperatur des Schmelzbereiches der Polyester (25°C, Schmack et al., 1998; Gorenflo et al., 2001) unterhalb der Siedetemperatur von Methanol (65°C) liegt und die freigesetzten Granula anschmelzen und zusammenkleben. Die Extraktion des Polyesters mit dem nicht halogenierten Lösungsmittel Aceton stellt eine wesentlich günstigere und umweltfreundlichere Alternative zur Extraktion mit dem teilweise halogenierten Lösungsmittel Chloroform dar, jedoch verlängert sich die Extraktionsdauer deutlich (Abb. 20).

Im folgenden soll der zeitliche Verlauf des Extraktionsvorganges in einer Soxhlet Apparatur an ein Stofftransport-Modell angepaßt werden, um dessen Berechnung zu ermöglichen.

Der Stofftransport des Polyesters aus der Zelle wird mittels des allgemeinen kinetischen Ansatzes für die Stoffübertragung (Schlünder, 1984) formuliert:

$$\dot{m}_{Pol,Zellen}(t) = \beta \cdot A_{Zellen} \cdot (c_{Pol,Zellen}(t) - c_{Pol,Lösung}(t)) \quad (1)$$

Mit  $\dot{m}_{Pol,Zellen}(t)$  : Massenänderung des Polyesters in den Zellen,

$\beta$  : Stoffübergangskoeffizient,

$A_{Zellen}$  : Außenfläche der Zellen,

$c_{Pol,Zellen}(t)$  : Polyesterkonzentration in den Zellen,  $c_{Pol,Zellen}(t) = \frac{m_{Pol,Zellen}(t)}{V_{Zellen}}$

$V_{Zellen}$  : Volumen der Zellen,

$c_{Pol,Lösung}(t)$  : Polyesterkonzentration im Lösungsmittel.

Dabei wurde vereinfachend angenommen, daß die Polyesterkonzentrationen im Lösungsmittel und im Filterkuchen nicht ortsabhängig sind.

Massenbilanz für den Polyester in der Zelle  $m_{Pol,Zellen}$ :

$$\frac{dm_{Pol,Zellen}}{dt} = -\dot{m}_{Pol,Zellen}(t) \quad (2)$$

Massenbilanz für den aus den Zellen extrahierten Polyester  $m_{Pol,ext}$

$$m_{Pol,ges} = m_{Pol,Zellen} + m_{Pol,ext} \quad (3)$$

Mit  $m_{Pol,ges}$ : Gesamtmenge des Polyesters.

Da in der Soxhlet-Apparatur ständig frisches Chloroform mit einem vergleichsweise hohen Volumenstrom durch den Filterkuchen strömt, kann man die Konzentration des Polyesters im Lösungsmittel gegenüber der Konzentration des Polyesters in den Zellen vernachlässigen:

$$C_{Lösung}(t) \approx 0 \quad (4)$$

(1) mit (4) in (2) ergibt:

$$\frac{dm_{Pol,Zellen}}{dt} = -\beta \cdot A_{Zellen} \cdot (c_{Pol,Zellen}(t) - 0) = -\beta \cdot A_{Zellen} \cdot \frac{m_{Pol,Zellen}(t)}{V_{Zellen}} \quad (5)$$

Nimmt man vereinfachend an, daß sich das Gesamtvolumen der Zellen und damit auch deren Oberfläche während der Extraktion nicht wesentlich ändert, ergibt sich nach Integration aus (5) mit

$$k^* = \frac{\beta \cdot A_{Zellen}}{V_{Zellen}}$$

$$\int_{m_{Pol,ges}}^{m_{Pol,Zellen}(t)} \frac{1}{m_{Pol,Zellen}} dm_{Pol,Zellen} = -\int_0^t k^* dt \quad (6)$$

$$m_{Pol,Zellen}(t) = m_{Pol,ges} \cdot \exp(-k^* \cdot t) \quad (7)$$

mit (3) folgt: 
$$m_{Pol,ext}(t) = m_{Pol,ges} \cdot (1 - \exp(-k^* \cdot t)) \quad (8)$$

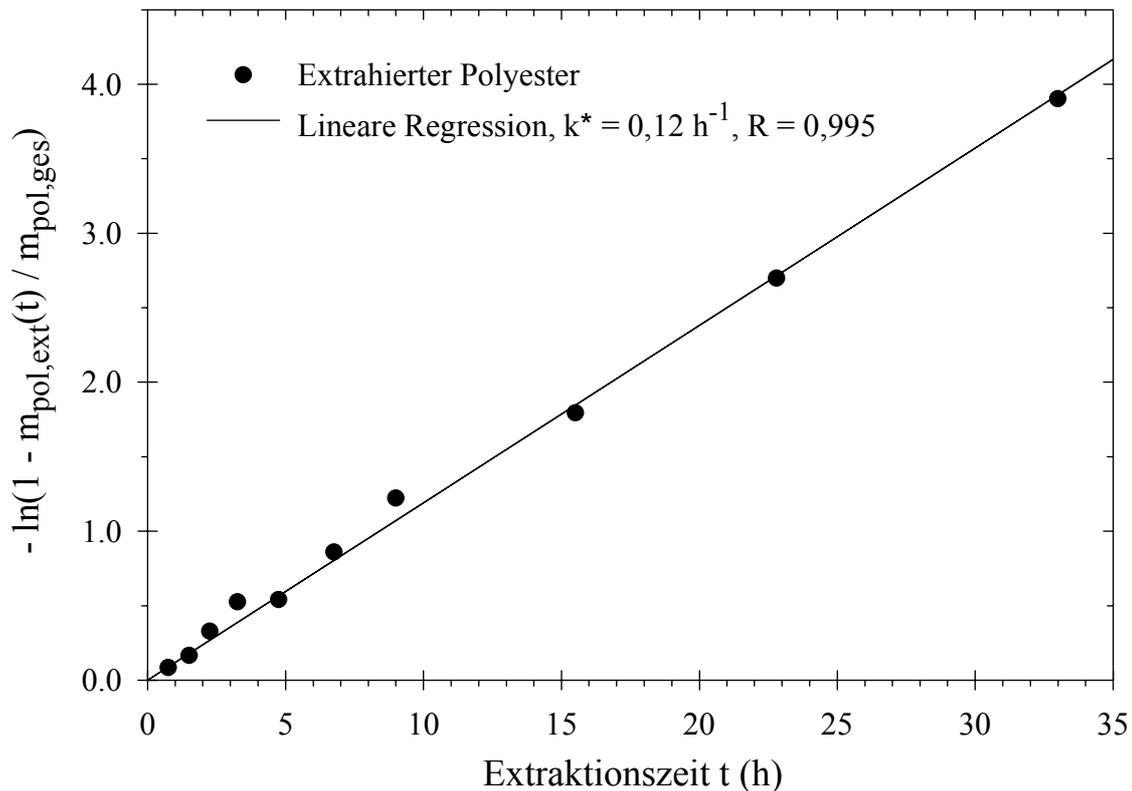
und schließlich:

$$\boxed{\frac{m_{Pol,ext}(t)}{m_{Pol,ges}} = 1 - \exp(-k^* \cdot t)} \quad (9)$$

Löst man diese Gleichung nach  $k^* \cdot t$  auf und stellt das Ergebnis über der Extraktionszeit dar, so müßte sich eine Gerade mit der Steigung  $k^*$  ergeben. Wie die Anwendung dieser Modellrechnung auf eine Polyesterextraktion mittels einer Soxhlet-Apparatur (3.4.2.1) zeigt, stimmen Modell und Realität sehr gut überein, so daß Gleichung 9 zur Berechnung des Extraktionsvorganges herangezogen werden kann, wenn man zuvor den Koeffizienten  $k^*$  experimentell bestimmt hat.

Die molare Zusammensetzung und das Molekulargewicht des extrahierten Polyesters änderte sich während des Extraktionsprozesses im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht (Tabelle 17). Dies läßt darauf schließen, daß es sich bei dem ausgehend von Lävulinsäure gebildeten Polyester, Poly(3HB-co-3HV-co-4HV), um einen Copolyester handelt. Andernfalls würden vermutlich Fraktionen mit unterschiedlicher Zusammensetzung oder Molekulargewicht entstehen, die sich gemäß ihrer Löslichkeit leichter bzw. schwerer extrahieren ließen. Der Polyester baute während des 129-stündigen Extraktionsprozesses nicht ab, da die Polydispersität ( $M_w/M_n$ ) des Polyesters während der gesamten Extraktion konstant blieb.

Bei der Extraktion größerer Mengen an Zellen (> 300 g) mit hohem Polymergehalt (ca. 50 % ,w/w) in einer Soxhlet-Apparatur verlängerte sich die Extraktionszeit drastisch. Vermutlich ist dieser Effekt auf ein teilweises Verkleben der Poren der Extraktionshülse durch Polymer zurückzuführen. Dadurch kommt es in einigen Bereichen des Filterkuchens zu einem stark verminderten Austausch des mit Polymer gesättigten Lösungsmittels durch frisches Lösungsmittel. Wurden gefriergetrocknete Zellen mit siedendem Chloroform in einem Rundkolben extrahiert, konnte die Extraktionszeit für 95 % des in den Zellen vorhandenen Polyesters gegenüber der Extraktion mittels einer Soxhlet-Apparatur auf unter ein Drittel verkürzt werden (Tabelle 18, Abb. 20). Dies ist vermutlich hauptsächlich auf den wesentlich verbesserten Kontakt des Lösungsmittels mit den Zellen und eine deutlich bessere Vermischung während der Extraktion zurückzuführen.



**Abb. 30:** Linearisierter zeitlicher Verlauf der in Abb. 21 dargestellten Polyesterextraktion von 4HV-haltigen Polyestern aus *P. putida* GpP104 (pHP1014::B28RV) mittels Chloroform nach Flockung und Behandlung mit siedendem Methanol.

Die auf Gluconsäure in der Wachstumsphase und Lävulinsäure in der Speicherphase angezogenen Zellen von *P. putida* GpP104 (pHP1014::B28RV) (2.4.4) wurden wie angegeben vorbehandelt und getrocknet. Die PHF wurden unter Rückfluß in einer Soxhlet-Apparatur (Eigenbau, 1,5 Liter) unter Verwendung von Cellulose-Extraktionshülsen (Schleicher & Schüll, Dassel) extrahiert (2.7) und anschließend in Ethanol gefällt. Abkürzungen:  $m_{\text{Pol,ges}}$ : Gesamtmasse des Polyesters,  $m_{\text{Pol,ext}}$ : Masse des aus den Zellen extrahierten Polyesters.

#### 4.5 Material- und Werkstoffeigenschaften 4HV-haltiger Polyester

Die Verarbeitungs- und Materialeigenschaften biologisch produzierter Polyhydroxyfettsäuren können durch die Wahl der in den Polyester integrierten Monomere sehr stark variiert werden (Jendrossek et al., 1997; Schmack et al., 1998). Die Eigenschaften der resultierenden Polyester unterscheiden sich im Hinblick auf deren Hydrophobizität, Resistenz gegenüber hydrolytischem Abbau, Kristallinität, Elastizität sowie anderer Eigenschaften, ohne die biologische Abbaubarkeit zu verlieren, die eine der charakteristischen Eigenschaften dieser Werkstoffgruppe darstellt (Jendrossek et al., 1997). Ziel der im folgenden diskutierten und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Polymerforschung Dresden (IPF) durchgeführten Werkstoffuntersuchungen war es, das Verarbeitungsverhalten von 4HV-enthaltenden

Polyestern zu charakterisieren, die ausgehend von Lävulinsäure im großen Maßstab produziert und aufgereinigt wurden (3.1, 3.2 und 3.4) (Gorenflo et al., 2001). Dabei wurden Methoden angewandt, die üblicherweise zur industriellen Verarbeitung von thermoplastischen Werkstoffen eingesetzt werden. Unter anderem wurde das Molekulargewicht dieser Polyester, ihre thermischen, rheologischen und mechanischen Eigenschaften sowie deren Spinnfähigkeit und resultierenden Fadeneigenschaften untersucht (Schmack et al., 1998; Gorenflo et al., 2001). Zum Vergleich wurden Homopolyester aus 3HV hergestellt (Steinbüchel & Schmack, 1995), um insbesondere den Einfluß von 4HV und Hydroxyalkanoaten mittlerer Kettenlänge auf die Eigenschaften dieser neuartigen Polyester bestimmen und einordnen zu können.

Der Schmelzbereich der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten 4HV haltigen Polyester lag im Bereich zwischen 25°C und 150°C. Dieser relativ große Schmelzbereich der Proben läßt auf eine statistische Anordnung der Monomere innerhalb des Copolyesters schließen. Diese Vermutung wird gestützt durch deren sehr schwache Kristallisationsneigung und dem daraus resultierenden geringen kristallinen Anteil. So zeigten die Proben vergleichsweise geringe Glasübergangstemperaturen zwischen -11°C und -15°C und eine geringe Kristallisationsgeschwindigkeit. Der Baustein 4HV scheint die ohnehin nur schwache Kristallisationsneigung von Poly(3HV) (Steinbüchel & Schmack, 1995) weiter herabzusetzen (Gorenflo et al., 2001). Daraus resultieren die beobachteten Entformungsprobleme der Spritzgußkörper und die extrem klebrigen Fäden nach dem Spinnprozeß. Das geringe Festigkeitsniveau der Fäden und deren lange Relaxationszeiten führten zu Fadenabrissen während des Spinnprozesses.

Die Schmelzeviskosität der Copolyester (3,5 bis 440 Pa · s) lag wesentlich höher als die des Homopolyesters Poly(3HV) (1,0 Pa · s) (Gorenflo et al., 2001). Diese hohe Schmelzeviskosität und Elastizität des 4HV-haltigen Materials führte zu Fließstörungen der Schmelze bei Eintritt in den Düsenkanal und zu einem verstärkten Schmelzebruch, der auch durch eine Variation der Düsenabmessungen nicht verhindert werden konnte.

Aus den unbearbeiteten Polyesterfilmen wurden Prüfkörper ausgestanzt und anschließend mittels einer Zugprüfmaschine Kraft-Dehnungs Diagramme aufgenommen. Die Höchstkraft ( $R_H$ ) lag für F-15 mit 1,3 MPa am niedrigsten und für F-16 mit 5,5 MPa am höchsten, wobei die Bruchdehnung ( $\epsilon$ ) der Proben sehr stark variierte ( $\epsilon_{F-16}$ : 28 %,  $\epsilon_{F-15}$ : 208 %,  $\epsilon_{F-11}$ : 1000 %) und deutlich höher war als für Poly(3HV) ( $\epsilon_{\text{Poly}(3HV)}$ : 1,4 %) (Steinbüchel & Schmack, 1995; Schmack et al., 1998; Gorenflo et al., 2001). Die Bruchspannungen ( $\sigma$ ) lagen für die Proben F-15 und F-16 zwischen 4,1 und 7,0 MPa und damit im gleichen Bereich wie für Poly(3HV). Die Probe F-11 zeigte mit 50,6 MPa die höchste Bruchspannung der untersuchten Proben. Die gegenüber linearen Polymeren wesentlich verlängerten Relaxationszeiten sind auf Verhakungen der Polyesterketten untereinander zurückzuführen, die infolge des hohen Molekulargewichtes und der

langkettigen Verzweigungen der Copolyester deutlich verstärkt sind. Daraus erklärt sich auch die ungewöhnlich hohe Elastizität des Materials.

Beim Spinnen der Fäden aus Polyesterproben, die mittelkettige Monomere enthalten (F5 bis F11), mußte die Spinnengeschwindigkeit nachjustiert werden, um einen Fadenabriß zu verhindern. Dieser Effekt ist auf einen deutlichen Abbau der Polymere während des Spinnprozesses zurückzuführen. Der stärkste Abbau ist bei den Proben mit einem hohen Molekulargewicht zu beobachten und betrifft hauptsächlich die längerkettigen Anteile des Polyesters, sichtbar durch den hohen Abbauindex (DI) und die gegenüber dem Ausgangspolyester drastisch reduzierten Molekulargewichte ( $M_z$ ) der verarbeiteten Proben (F6 bis F11) (Schmack et al., 1998).

Die Polyesterproben, die keine Monomere mittlerer Kettenlänge enthalten (F13 bis F16), zeigten geringere Festigkeitswerte und niedrigere Elastizität, als die Polyester mit geringem Anteil an Monomeren mittlerer Kettenlänge (F5 bis F11). Sie schrumpften nach dem Spritzgußprozeß in Abhängigkeit von der Verweilzeit in der Spritzgußmaschine deutlich. Diese fehlende Formstabilität ist auf die äußerst geringe Kristallisationsneigung des Materials zurückzuführen. Dahingegen wiesen diese Proben eine relativ enge Molekulargewichtsverteilung auf und bauten während des Verarbeitungsprozesses nur sehr wenig ab. Dies zeigt die sehr hohe thermische Stabilität 4HV-haltiger Polyester, die keine Monomeren mittlerer Kettenlänge enthalten (Gorenflo et al., 2001).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die neuen, 4HV-haltigen Polyester im Gegensatz zu Poly(3HV) ein um Faktor 2 bis 5 höheres Molekulargewicht (ca.  $500 \cdot 10^3$  g/mol), eine stark erhöhte Schmelzeviskosität, extrem niedrige untere Schmelztemperaturen (ab  $25^\circ\text{C}$ ), und eine ungewöhnlich hohe Elastizität mit einer Bruchdehnung  $\epsilon$  von 28 bis 1000 % zeigen (zum Vergleich  $\epsilon_{\text{Poly(3HV)}}$ : 1,4 %).

#### 4.6 Nachweis von Polyhydroxyfettsäuren durch Nilrot

Alle sieben untersuchten PHF-Proben zeigten nach dem Anfärben mit Nilrot ein ähnliches Fluoreszenzverhalten und wiesen ein deutliches Fluoreszenzmaximum auf, das bei einer Exzitationswellenlänge zwischen 540 und 560 nm und einer Emissionswellenlänge zwischen 570 und 605 nm lag (Abb. 22, Tabelle 20). Das Maximum des Fluoreszenzsignals lag in der Nähe des Streulichts und trat oftmals nur als Schulter auf, so daß es schwierig war, den exakten Wert zu bestimmen. Die eingestellte Schrittweite von 5 nm ließ nur eine grobe Abschätzung des Maximums zu, so daß die unterschiedlichen Polyester durch diese Methode nur mit Einschränkungen zu unterscheiden waren. Die schwache Hintergrundfluoreszenz der Poly(3HB)-negativen Mutante *R. eutropha* PHB<sup>-</sup>4 (Abb. 23) ist sehr wahrscheinlich auf das

Anfärben von hydrophoben Membranbestandteilen zurückzuführen (Abb. 24). Auch Deglau et al. (1995) beobachteten eine Anfärbung von Membran-Phospholipiden und im Zytoplasma gelösten Lipiden. Dieses Anfärben von lipophilen Nicht-PHF-Komponenten der Zelle könnte unter anderem den gegenüber Granula-Suspensionen erhöhten Verbrauch von Nilrot bei der Anfärbung von intrazellulären Polyestern erklären.

Eine Bewertung der beiden unterschiedlichen Methoden zur Quantifizierung des PHF-Gehaltes von Suspensionen zeigt den klaren Vorteil der Methode der Anfangssteigungen, da hier nur sehr kurze Analysezeiten von etwa 3 min benötigt werden. Demgegenüber benötigt die Methode des Färbegleichgewichtes Analysezeiten von 45 min und mehr (Abb. 26). Die Annahme, daß die Nilrotmoleküle überwiegend an die Oberfläche der Granula binden, liefert hierfür eine Erklärung. Selbst wenn die Nilrotmoleküle in die Granula eindringen würden, könnten sie kaum angeregt werden, da das Anregungslicht an der Oberfläche der Granula absorbiert oder gestreut würde. Diese Betrachtung führt zu der Folgerung, daß das Fluoreszenzsignal von angefärbten Granula-Suspensionen von der Oberfläche und der Form der Granula abhängt und nicht nur von deren Masse. Da das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bei Granula unterschiedlicher Größe nicht linear zu deren Durchmesser ist, ergibt sich kein linearer Zusammenhang des Fluoreszenzsignals solcher Granula-Suspensionen mit deren Konzentration.

Unter der Annahme eines zur Masse (oder Oberfläche) proportionalen Fluoreszenzsignals und unter der Annahme einer kugelförmigen Gestalt der Granula hängt die Fluoreszenzintensität von an den PHF-Partikeln gebundenem Nilrot wie folgt vom Partikeldurchmesser  $d$  ab:

Fluoreszenzintensität = konst· $d^3$ , für die Massenabhängigkeit,

(lg[Fluoreszenzintensität] = lg konst + 3·d)

und

Fluoreszenzintensität = konst· $d^2$ , für die Oberflächenabhängigkeit,

(lg[Fluoreszenzintensität] = lg konst + 2·d).

Die Auswertung der Steigung des Fluoreszenzsignals gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC) von zwei Proben unterschiedlicher Größenverteilungen mittels linearer Regression zeigt, daß das Fluoreszenzsignal weder proportional zur Masse der Granula noch zu deren Oberfläche ist. Daraus kann geschlossen werden, daß eine kugelförmige Gestalt der Granula unwahrscheinlich ist. Die Anwendung der Färbemethode auf eine Kultivierung von *P. putida* Gpp104 (pHP1014::E156) zeigt die gute Korrelation des Fluoreszenzsignals zum PHF-Gehalt der Zellen während der Speicherphase (Abb. 28).

Die Methode der Anfangssteigungen ist in der Lage, den Polyestergehalt von Zellen innerhalb von Minuten zu bestimmen und führt damit gegenüber herkömmlichen Methoden zu einer drastischen Reduktion der Analysezeiten und des apparativen Aufwandes. Das macht die Methode überlegen gegenüber herkömmlichen Methoden wie Gaschromatographie (GC), NMR oder Massenspektrometrie (GC/MS), die bei Berücksichtigung der Probenvorbereitung Analysezeiten von mindestens 10 Stunden erfordern. Die dargestellte Methode ist darüber hinaus wesentlich preisgünstiger, da sie weder teure Chemikalien zur Extraktion oder Derivatisierung der Probe, noch hochentwickelte und teure Geräte zu deren Analyse benötigt. Statt dessen benötigt man pro Analyse lediglich 30 µg des hochempfindlichen Farbstoffes Nilrot, die in einem einfachen Fluoreszenzspektrometer mit fest eingestellter Exzitations- und Emissionswellenlänge von 550 nm bzw. 600 nm durchgeführt werden kann. Der Nachteil der Methode besteht darin, daß sie nicht geeignet ist, die Zusammensetzung des Polyesters zu ermitteln. Vergleicht man die Fluoreszenzeigenschaften von angefärbten Zellen mit isolierten Polyesterfilmen, so stellt man fest, daß die Werte für das Fluoreszenzmaximum bei lebenden Zellen, außer bei Poly(4HB), leicht zu höheren Wellenlängen verschoben sind.

Aus den vorliegenden Daten kann geschlossen werden, daß die hier entwickelte Methode zur Quantifizierung von PHF mittels Anfärben mit Nilrot in Kombination mit einer Fließinjektionsanalytik in der Lage ist, PHF-Produktkonzentrationen in industriellen Prozessen „on-line“ zu verfolgen, womit die Optimierung von Produktionszeiten und Produktkonzentrationen wesentlich erleichtert wäre. Ein und die selbe Methode ist ebenfalls anwendbar für die Quantifizierung von Produktionsprozessen unterschiedlicher PHF. Es konnte gezeigt werden, daß Nilrot ein hohes Potential zur quantitativen Bestimmung hydrophober bakterieller PHF besitzt.

## 5 Zusammenfassung

1. Alle untersuchten Wildtypstämme und rekombinanten Stämme von *P. putida* und *R. eutropha* akkumulierten in einstufigen Speicherversuchen mit Lävulinsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle 4HV-haltige Polyester. Der Polyester des rekombinanten Stammes *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) wies mit 30 mol % den höchsten 4HV-Gehalt aller untersuchten Stämme auf. Somit konnte 4HV als Ausgangssubstrat (ca. 500 DM/kg) für die Akkumulation 4HV-haltiger Polyester durch die wesentlich kostengünstigere Lävulinsäure (ca. 65 DM/kg) ersetzt werden.
2. Ein zweistufiger Fed-Batch-Prozeß im 20 l-Maßstab mit *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) mit Lävulinsäure in der zweiten Stufe wurde entwickelt und optimiert. Durch die Verwendung von Octansäure (ca. 37 DM/kg) als Substrat in der Wachstumsphase konnte die Wachstumsgeschwindigkeit erhöht und die Kosten weiter gesenkt werden. Die optimalen Speicherbedingungen ergaben sich bei einem pH-Wert von 7,0, einer Temperatur von 35 bis 37°C und einer Belüftungsrate von 1,0 bis 1,5 vvm. Durch die Entwicklung eines Hochzelldichte-Fermentationsprozesses konnte eine maximale Trockenmassekonzentration von 20 g/l mit einem PHF-Gehalt von 50 % (w/w) erreicht werden, so daß etwa 150 g Polyester aus einer Fermentation gewonnen werden konnten. Der 4HV-Anteil am Polyester betrug 15 mol %, wobei zusätzlich die Monomere 3HB, 3HV, 3HHx und 3HO enthalten waren. Die entwickelte sauerstoffkonzentrationsabhängige Automatisierung der Nährstoffzugabe vereinfachte den Prozeß entscheidend.
3. Wenn Glucose bzw. Gluconsäure als Substrat in der Wachstumsphase verwendet wurde, konnten die von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) und *P. putida* GPp104 (pHP1014::B28RV) in den Polyester integrierten Bausteine von fünf auf drei reduziert werden (50,0 mol % 3HV; 45,0 mol % 4HV; 5,0 mol % 3HB). Mit diesem neuartigen Polyester konnte der Einfluß von 4HV auf die Materialeigenschaften vergleichend zu Poly(3HV) bestimmt werden. Die verfahrenstechnische Trennung von Wachstumssubstrat (Glucose bzw. Gluconsäure) und Speichersubstrat (Lävulinsäure) wurde erfolgreich etabliert. Die Verwendung von Glucose ermöglichte eine von der Kohlenstoffquelle unabhängige Automatisierung der Stickstoffzugabe. Wurde der Kultur das Wachstumssubstrat in großen Portionen (ca. 10 g/l) zugegeben, wurde eine maximale Trockenmassenkonzentration von 9 g/l erreicht. Durch die Dosierung von Glucose in kleinen Portionen (< 6 g/l) wurde die wachstumshemmende Bildung von 2-Ketogluconsäure effektiv verhindert, wobei die Umsetzung von Glucose in Zelltrockenmasse verdreifacht und gleichzeitig eine Zelltrockenmassekonzentration von

25 g/l erreicht wurde. Die Verwendung von Glucose als Co-Substrat während der Speicherphase verdoppelte die Umsatzrate der Lävulinsäure in Polyester.

4. Die Übertragung der Kultivierung von *P. putida* GPp104 (pHP1014::E156) in den 500 l-Maßstab gelang problemlos, wobei vergleichbare Trockenmassekonzentrationen (20 g/l) und Polyestergehalte (50 %, w/w) erzielt wurden. Der 4HV-Anteil war mit 35 mol % vergleichsweise hoch.
5. In Fed-Batch-Fermentationen mit dem rekombinanten Stamm *R. eutropha* H16-PHB<sup>4</sup> (pHP1014::B28) im 20 l-Maßstab unter Verwendung von Fructose als Substrat in der Wachstumsphase und Lävulinsäure als Substrat in der Speicherphase wurde eine Zelldichte von 40 bis 45 g/l erreicht. Der 4HV-Anteil am Polyester betrug dabei maximal 4,3 mol %.
6. Die Flockung der Zellen mittels Verschiebung des pH-Wertes und Einwirkung von Hitze vor der Ernte verbesserte die Effektivität der Durchlaufzentrifugation erheblich und senkte den Verlust an Zelltrockenmasse von 30 % auf unter 10 %. Die Kombination der Zellflockung mit einer Vorbehandlung der gefriergetrockneten Zellen mit siedendem Methanol führte zu einer drastischen Verkürzung der anschließenden Soxhlet-Extraktion von 129 auf 33 h, wobei ein wesentlich reinerer Polyester gewonnen und somit nachfolgende Aufreinigungsschritte eingespart werden konnten. Der Verlauf der Soxhlet-Extraktion von 4HV-haltigem Polyester aus Zellen von *P. putida* wurde durch eine Modellrechnung angepaßt, die die Berechnung des Extraktionsverlaufes mit sehr hoher Genauigkeit ( $R = 0,995$ ) ermöglichte. Die Extraktion von Zellen mittels siedendem Chloroform in einem Rundkolben verkürzte die Extraktionszeit gegenüber der Extraktion mittels Soxhlet Apparatur auf unter ein Drittel.
7. Das Molekulargewicht der neuen, 4HV-haltigen Polyester war im Gegensatz zu Poly(3HV) um den Faktor 3 bis 5 erhöht (ca.  $500 \cdot 10^3$  g/mol) und wies eine enge Molekulargewichtsverteilung auf. Der Polyester zeichnete sich außerdem durch eine stark erhöhte Schmelzeviskosität, extrem niedrige Schmelztemperaturen (ab 25°C) und eine ungewöhnlich hohe Elastizität mit einer Bruchdehnung  $\epsilon$  von bis zu 1000 % aus (zum Vergleich  $\epsilon_{\text{Poly(3HV)}}$ : 1,4 %). Die enge Molekulargewichtsverteilung der Proben ohne Anteile an Monomeren mittlerer Kettenlänge blieb auch während des Verarbeitungsprozesses erhalten, so daß auf eine sehr hohe thermische Stabilität 4HV-haltiger Polyester geschlossen werden konnte. Der große Schmelzbereich der Polyester, die sehr schwache Kristallisationsneigung und der daraus resultierende geringe kristalline Anteil der Polyester läßt auf eine statistische Anordnung der Bausteine

innerhalb des Polyesters schließen. Der Baustein 4HV setzte die ohnehin nur schwache Kristallisationsneigung von Poly(3HV) weiter herab.

8. Alle sieben untersuchten Polyesterproben von unterschiedlicher Art und Zusammensetzung zeigten ein ähnliches Fluoreszenzverhalten nachdem sie mit Nilrot angefärbt waren und wiesen ein deutliches Fluoreszenzmaximum auf, das bei einer Exzitationswellenlänge zwischen 540 und 560 nm und einer Emissionswellenlänge zwischen 570 und 605 nm lag. Suspensionen nativer Poly(3HB)-Granula aus *R. eutropha* H16 und dessen Mutante H2275 mit zwei unterschiedlichen Größenverteilungen wurden auf ihr Färbeverhalten untersucht. Dabei zeigte sich, daß 6,0 µg Nilrot ausreichen, um 1,0 mg Granula vollständig anzufärben. Die Fluoreszenzintensität bei einer Exzitationswellenlänge von 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 600 nm zeigte eine hohe Korrelation zur Poly(3HB)-Konzentration der Granula-Suspensionen bei verschiedenen Granula-Konzentrationen. In Verbindung mit Experimenten zum Anfärben von Zell-Suspensionen während verschiedener Kultivierungen konnte gezeigt werden, daß die entwickelte Methode sehr gut zur quantitativen Bestimmung hydrophober, bakterieller Polyhydroxyfettsäuren *in vitro* und *in vivo* geeignet ist.
9. Speicherversuche mit Tn5::*mob*-induzierten Mutanten von *R. eutropha* HF39 mit Defekt im Katabolismus von Lävulinsäure führten im Vergleich zum Wildtyp zur Akkumulation eines Polyesters mit einem bis zu dreifach erhöhten 4HV-Anteil und einem auf die Hälfte reduzierten 3HV-Anteil. In Verbindung mit einer phäno- und genotypischen Charakterisierung und der Tatsache, daß das Wachstum von *R. eutropha* auf Lävulinsäure durch die Anwesenheit von Acrylsäure gehemmt wurde, ließ sich ein hypothetischer Stoffwechselweg zum Abbau von Lävulinsäure in *R. eutropha* entwickeln: Zunächst findet eine Aktivierung der Lävulinsäure zu 4-Ketovaleryl-CoA und dessen Reduktion zu 4-Hydroxyvaleryl-CoA statt. Im Hauptabbauweg erfolgt eine Dehydratisierung des 4HV-CoA zu 3-Pentenoyl-CoA und eine nachfolgende Reduktion zu Valeryl-CoA, welches in der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren zu Propionyl-CoA und Valeryl-CoA abgebaut wird. In einem alternativen Abbauweg erfolgt eine Hydratisierung des 3-Pentenoyl-CoA zu 3-Hydroxyvaleryl-CoA, welches dann entweder in den Polyester integriert oder ebenfalls in der  $\beta$ -Oxidation zu Propionyl-CoA und Valeryl-CoA abgebaut werden kann. Die beiden Abbauprodukte wiederum werden anschließend entweder ebenfalls in den Polyester integriert oder über die zentralen Stoffwechselwege weiter abgebaut.

## 6 Literatur

- Akerlund, T; K. Nordstrom & R. Bernander** (1995) Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:6791-6797.
- Anderson, A.J. & E.A. Dawes** (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450-472.
- Anonymus** (1990) Biodegradable plastic hits the production line. *New Scientist* 126:36.
- Ballistreri, A; D. Garozzo; M. Giuffrida; G. Impallomeni & G. Montaudo** (1989) Sequencing bacterial poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by partial methanolysis, high-performance liquid chromatography fractionation, and fast atom bombardment mass spectrometry analysis. *Macromolecules* 22:2107-2111.
- Berger, E.; B.A. Ramsay; J.A. Ramsay; C. Chavarie & G. Braunegg** (1989) PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol. Tech.* 3:227-232.
- Birnboim, H.C. & J. Doly** (1979) A rapid alkali extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7:1513-1523.
- Bloembergen, S.; D.A. Holden; G.K. Hamer; T.L. Bluhm & R.H. Marchessault** (1986) Studies of composition and crystallinity of bacterial poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate). *Macromolecules* 19:2865-2871.
- Brämer, C.** (1999b) Mündliche Mitteilung
- Brämer, C.; V. Gorenflo & A. Steinbüchel** (1998) Conversion of Levulinic Acid into Bacterial PHA Containing 4HV by Tn5-Induced Mutants of *A. eutrophus*. Posterpräsentation auf dem "International Symposium on Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers", (Germany), Münster, June 3-6, 1998.
- Brämer, C.O.** (1999a) Molekulargenetische Charakterisierung von Tn5-induzierten Lävulinat-negativen und Lävulinat-leaky Mutanten von *Ralstonia eutropha* HF39 und Klonierung der am Abbau von Lävulinat beteiligten Gene. *Diplomarbeit*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Brandl H; R.A. Gross; R.W. Lenz & R.C. Fuller** (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1977-1982.
- Brandl H.; E.J. Knee; R.C. Fuller; R.A. Gross; & R.W. Lenz** (1989) Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(beta-hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. *Int. J. Biol. Macromol.* 11:49-55.

- Braunegg, G.; B. Sonnleitner & R.M. Lafferty** (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.
- Bullock, W.O.; J.M. Fernandez & J.M. Short** (1987) XL1-blue: high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Bio Techniques* 5:376-378.
- Byrom, D.** (1987) Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *TibTech.* 5:246-250.
- Byrom, D.** (1990) Industrial production of copolymer from *Alcaligenes eutrophus*. In: Dawes, E. A. (Hrsg.), Novel Biodegradable Microbial Polymers, *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*, 113-117.
- Byrom, D.** (1992) Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate:polyhydroxyvalerate copolymers. *FEMS Microbiol. Rev.* 103:247-250.
- Choi, J. & S.Y. Lee** (1999) Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* 62:546-553.
- Chopray , A.K.; J.W. Peterson & R. Prasad** (1991) Cloning and sequence analysis of hydrogenase regulatory genes (*hydHG*) from *Salmonella typhimurium*. *Biochim. Biophys. Acta* 1129:115-118.
- Cole, S.T. et al.** (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from complete genome sequence. *Nature* 393:537-544.
- Dawes, E.A.** (1976) Endogenous metabolism and the survival of starved prokaryotes. In: Gray, T.G.R. & J.R. Postgate (Hrsg.), The survival of vegetative microbes, *Cambridge University Press*, Cambridge, 19-53.
- Dawes, E.A.** (1985) Starvation, survival and energy reserves. In: Fletcher, M. & G.D. Floodgate (Hrsg.), Bacteria in their natural environments. *Academic Press London*, London, 43-79.
- Dawes, E.A.** (1989) Growth and survival of bacteria. In: Poindexter, J.S. & E.R. Leadbetter (Hrsg.), Bacteria in nature. *Plenum Publishing Corp.* New York, 3:67-187.
- Dawes, E.A. & P.J. Senior** (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 10:135-266.
- deKoning, G.J.M.; H.H.M. Van Bilsen; P.L. Lemstra; W. Hazenberg; B. Witholt; H. Preusting; J.G. Van der Galien; A. Schirmer & D. Jendrossek** (1994) A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoate) from *Pseudomonas oleovorans*. *Polymer*, 35: 2090-2097.

- deKoning, G.J.M. & B. Witholt** (1997) A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonads*. Part 1: Solubilization. *Bioproc. Eng.* 17:7-13.
- deKoning, G.J.M.; M. Kellerhals; C. van Meurs & B. Witholt** (1997) A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonads*. Part 2: Process development and economic evaluation. *Bioproc. Eng.* 17:15-21.
- De Smet, M.J.; G. Eggink; B. Witholt, J. Kingma & H. Wynberg** (1983) Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.* 154:870-878.
- Degelau, A.; T. Scheper; J.E. Bailey & C. Guske** (1995) Fluorometric measurement of poly-beta hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42:653-657.
- Doi, Y.; M. Kunioka; Y. Nakamura & K. Soga** (1986) Nuclear magnetic resonance studies on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and a copolyester of  $\beta$ -hydroxybutyrate and  $\beta$ -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Macromolecules* 19:2860-2864.
- Doi, Y.; M. Kunioka; A. Tamaki; Y. Nakamura & K. Soga** (1988) Nuclear magnetic resonance studies on bacterial copolyesters of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid. *Macromol. Chem.* 189:1077-1086.
- Eggink, G.; P. de Waard & G.N.M. Huijberts** (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.
- Föllner, C.G.; W. Babel & A. Steinbüchel** (1995) Isolation and purification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthesis from methylotrophic bacteria relying on the serine pathway. *Can. J. Microbiol.* 41:124-130.
- Friedrich, B.; C. Hogrefe & H.G. Schlegel** (1981) Naturally occurring genetic transfer of hydrogen-oxidizing ability between strains of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 147:198-205.
- Fukui, T.; A. Yoshimoto; M. Matsumoto; S. Hosokawa; T. Saito; H. Nishikawa & K. Tomita** (1976) Enzymatic synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Zoogloera ramigera*. *Arch. Microbiol.* 110:149-156.
- Fukui, T.; N. Shiomi & Y. Doi** (1998) Expression and characterization of (R)-specific enoyl Coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.* 180:667-673.
- Gagnon, K.D.; R.W. Lenz; R.J. Farris & R.C. Fuller** (1992) Crystallization behavior and its influence on the mechanical properties of a thermoplastic elastomer produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* 25:3723-3728.

- Ginsburgh, C.L.; P.N. Black & W.D. Nunn** (1984) Transport of long chain fatty acids in *Escherichia coli*: identification of membrane protein associated with the *fadL* gene. *J. Biol. Chem.* 259:8437-8443.
- Gopal, C.V.; D. Broad & D. Loyd** (1989) Bioenergetic consequences of protein overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30:160-165.
- Gorenflo, V.; S. Marose; M. Rieseberg; T. Scheper & A. Steinbüchel** (1999) Quantification of Bacterial PHA by Nile Red Staining. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:765-772.
- Gorenflo, V.; Schmack, G.; R. Vogel & A. Steinbüchel** (2001) Development of a Process for the Biotechnological Large-Scale Production of 4HV-Containing Polyesters and Characterization of their Physical and Mechanical Properties. *Biomacromolecules*, 2: 45-57.
- Gottschalk, G.** (1964a) Die Biosynthese der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure durch Knallgasbakterien. I. Ermittlung der  $^{14}\text{C}$ -Verteilung in Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure. *Arch. Mikrobiol.* 47:225-229.
- Gottschalk, G.** (1964b) Die Biosynthese der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure durch Knallgasbakterien. II. Verwertung organischer Säuren. *Arch. Mikrobiol.* 47:230-235.
- Gottschalk, G.** (1988) Bacterial Metabolism, *Springer-Verlag*, 2<sup>nd</sup> ed., New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.
- Griebel, R. J.; Z. Smith & J. M. Merrik** (1968) Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochem.* 7:3676-3681.
- Gross, R.A.; C. de Mello; R.W. Lenz; H. Brandl & R.C. Fuller** (1989) Biosynthesis and characterization of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromol.* 22:1106-1115.
- Hahn, S.K.; Y.K. Chang; B.S. Kim & H.N. Chang** (1994) Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol. Bioeng.* 44:256-261.
- Hahn, S.K.; Y.K. Chang; S.Y. Lee** (1995) Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:34-39.
- Hartley, P.** (1987) Abbaubare Polymere aus dem Fermenter. *Bio Engineering* 3:66-68.
- Haywood, G.W.; A.J. Anderson & E.A. Dawes** (1989) A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. *Biotechnol. Lett.* 11:471-476.
- Haywood, G.W.; A.J. Anderson; D.E. Ewing & E.A. Dawes** (1990) Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrates by *Pseudomonas sp.* strain NCIMB40135. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3354-3359.

- Hein S; B. Söhling; G. Gottschalk & A. Steinbüchel** (1997) Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:411-418.
- Hocking, P.J. & R.H. Marchessault** (1994) Biopolyesters. In: Chemistry And Technology Of Biodegradable Polymers.: Griffin, G.J.L., (Hrsg.) *Blackie Academic & Professional*: New York.
- Holmes, P.A.** (1985) Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.* 16:32-36.
- Holmes, P.A.; L.F. Wright & S.H. Collins** (1982) *European Patent Application* 0 052 459.
- Holmes, P.A. & G.B. Lim** (1990) Separation Process. *US Patent* 4 910 145.
- Horswill, A.R. & J.C. Escalante-Semerana** (1997). Propionate catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2: Two divergently transcribed units comprise the *prp* locus at 8.5 centisomes, *prpR* encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the *prpBCDE* genes constitute an operon. *J. Bacteriol.* 179:928-940.
- Huijberts, G.N.M.; G. Eggink; P. de Waard; G. W. Huisman & B. Witholt** (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. & G. Eggink** (1994) High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* KT2442. International Symposium on Bacterial PHA. Montreal, Canada, p. 66.
- Huijberts, G.N.M.; T. de Rijk; P. de Waard & G. Eggink** (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.
- Huisman, G.W.; O. de Leeuw; G. Eggink & B. Witholt** (1989) Synthesis of polyhydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1949-1954.
- Huisman, G.W.; E. Wonink; R. Meima; B. Katzemier; P. Terpstra & B. Witholt** (1991) Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans*: identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.* 266:2191-2198.
- Hustede, E. & A. Steinbüchel** (1993) Characterization of the polyhydroxyalkanoate synthase gene locus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol. Lett.* 15:709-714.
- Jang, J.-H.; P.L. Rogers** (1996) Effect of Levulinic Acid on Cell Growth and Poly-β-Hydroxyalkanoate Production by *Alcaligenes* sp. SH-69. *Biotechnol. Lett.* 18:219-224.
- Jendrossek, D.; A. Schirmer & H.G. Schlegel** (1997) Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46:451-463.

- Kaltwasser, H.** (1962) Die Rolle der Phosphate im Phosphatstoffwechsel eines Knallgasbakteriums (*Hydrogenomonas* Stamm H16). *Arch. Mikrobiol.* 41:282-306.
- Kim, G.J.; I.Y. Lee; D.K. Choi; S.C. Yoon & Y.H. Park** (1996) High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* BM01 using glucose. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6:221-224.
- Kim, J.G.; I.Y. Lee; S.C. Yoon; Y.C. Shin & Y.H. Park** (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 and Microbial Technology*, 20:500-505.
- Kohler, T.; L. Kocjamicic Curti; M. Michea-Hamzehpour & J.C. Pechere** (1998) *MexT* is the regulator of the *MexE-MexF-OprN* multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Unpublished.
- Lafferty, R.M.; B. Korsatko & W. Korsatko** (1988) Microbial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. In Rehm, H. J. & G. Reeds (Hrsg.), *Biotechnology* (1<sup>st</sup> edn), *VCH Weinheim*, vol. VI b, 136-176.
- Lageveen, R.G.; G.W. Huisman; H. Preusting; P. Ketelaar; G. Eggink & B. Witholt** (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(*R*)-3-hydroxyalkanoates and poly-(*R*)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2924-2932.
- Lang, C.; C. Göllnitz; M. Popovic & U. Stahl** (1997) Optimization of fungal polygalacturonase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch culture. *Chemical Engineering Journal* 65:219-226.
- Lederberg, J. & E.M. Lederberg** (1962) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* 63:399-406.
- Lee, I.Y.; E.S. Choi; G.J. Kim; S.W. Nam; Y.C. Shin; H.N. Chang & Y.H. Park** (1994) Optimization of Fed-Batch Fermentation for production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4:146-150.
- Lemoigne, M.** (1926) Produits de déshydrations et de polymérisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Bio.* 8:770-782.
- Liebergesell, M.; B. Schmidt & A. Steinbüchel** (1992) Isolation and identification of granule associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. *FEMS Microbiol. Lett.* 99:227-232.
- Liebergesell, M.; F. Mayer & A. Steinbüchel** (1993) Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:292-300.

- Liebergesell, M.; K. Sonomoto; M.H. Madkour; F. Mayer & A. Steinbüchel** (1994) Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Chromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. *Eur. J. Biochem.* 226:71-80.
- Liebergesell, M.; S. Rahalkar & A. Steinbüchel** Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase: Subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases. (unveröffentlicht).
- Lundgren, D.G.; R.M. Pfister & J.M. Merrik** (1964) Structure of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) granules. *J. Gen. Microbiol.* 34:441-446.
- Maloy, S.; C. Ginsburgh; R. Simons & W.D. Nunn** (1981) Transport of long and medium chain fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 84:1260-1267.
- Marchessault, R.H.; C.J. Monasterios; F.G. Morin & P.R. Sundararajan** (1990) Chiral Poly(beta-hydroxyalkanoates): an adaptable helix influenced by the alkane side-chain. *Int. J. Biol. Macromol.*, 12:158-165.
- Mayer, F.** (1992) Structural aspects of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules. *FEMS Microbiol. Rev.* 103:265-268.
- Merrik, J.M.** (1978) Metabolism of reserve materials. In: Clayton, R.K. & W.R. Sistrom (Hrsg.), *The photosynthetic bacteria*. Plenum Publishing Corp., New York, 199-219.
- Miller, J.H.** (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Mitchel, C.G. & E.A. Dawes** (1982) The role of oxygen in the regulation of glucose metabolism, transport and the tricarboxylic acid cycle in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 128:49-59.
- Moskowitz, G.J. & J.M. Merrik** (1969) Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Enzymatic synthesis of D(-)- $\beta$ -hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* 8:2748-2755.
- Müller, S.; A. Losche; T. Bley & T. Scheper** (1995) A flow cytometric approach for characterization and differentiation of bacteria during microbial processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:93-101.
- Neumüller, O. A.** (1983) Römpps Chemie-Lexikon.
- Nulton, C.P. & I.M. Campbell** (1978) Labeled acetone and levulinic acid are formed when [ $^{14}$ C]acetate is being converted to mycophenolic acid in *Penicillium brevicompactum*. *Can. J. Microbiol.* 24:199-201.
- Overath, P.; G. Pauli & H.U. Schairer** (1969) Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 7:559-574.

- Peoples, O.P. & A. Sinskey** (1989) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J. Biol. Chem.* 264:15298-15303.
- Pfennig, N.** (1974) *Rhodopseudomonas globiformis* sp., a new species of the *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.* 100:197-206.
- Pieper, U. & A. Steinbüchel** (1992) Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the Gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber*. *FEMS Microbiol. Lett.* 96:73-80.
- Pieper-Fürst, U.; M.H. Madkour; F. Mayer & A. Steinbüchel** (1994) Purification and characterization of a 14-kDa protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. *J. Bacteriol.* 176:4328-4337.
- Preiss, J.** (1989) Chemistry and metabolism of intracellular reserves. In: Poindexter, J.S. & E.R. Leadbetter (Hrsg.), *Bacteria in nature*. Plenum Publishing Corp. New York, 3:189-258.
- Preusting, H.; J. Kingma & B. Witholt** (1991) Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 13:770-780.
- Preusting H; J. Kingma; G. Huisman; A. Steinbüchel & B. Witholt** (1993a) Formation of polyester blends by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*: Different poly(3-hydroxyalkanoates) are stored in separate granules. *J. Environ. Polym. Degrad.* 1:11-21.
- Preusting, H.; R. Houten; A. Hoefs; E.K. Langenberghe; O. Favre-Bulle & B. Witholt** (1993b) High cell density cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: growth and production of poly(3-hydroxyalkanoates) in two-liquid phase batch and fed-batch systems. *Biotechnol. Bioeng.* 41:550-556.
- Pries, A.; H. Priefert; N. Krüger & A. Steinbüchel** (1991) Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:744-746.
- Pries, A.; S. Hein & A. Steinbüchel** (1992) Identification of a lipoamide dehydrogenase gene as second locus affected in poly(3-hydroxybutyric acid)-leaky mutants of *A. eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 97:227-234.
- Qi, Q.; A. Steinbüchel & B.H.A. Rehm** (1998) Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (*fadR*): inhibition of fatty acid  $\beta$ -Oxidation by acrylic acid. *FEMS Microbiology Letters* 167:89-94.
- Ramsay, J.A.; E. Berger; R. Voyer; C. Chavarie & B.A. Ramsay** (1989) Extraction of Poly-3-Hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol. Tech.* 8:589-594.

- Ramsay, B.A.; E. Berger; J.A. Ramsay & C. Chavarie** (1990) Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. *Biotechnol. Tech.* 4:212-226.
- Rehm, B.H.A.; N. Krüger & A. Steinbüchel** (1998) A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 273:24044-24051.
- Repaske, R. & C.R. Repaske** (1976) Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 32:585-591.
- Reusch, R.N.** (1989) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 191:377-381.
- Riesenberg, D. & R. Guthke** (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:422-430.
- Saito, Y & Y. Doi** (1993) Biosynthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas aeruginosa* AO-232 from  $^{13}\text{C}$ -labelled acetate and propionate. *Int. J. Biol. Macromol.* 15:287-292.
- Sambrook, J.; E.F. Fritsch & Maniatis** (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup>. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sasaki, K.; S. Ikeda; Y. Nishizawa & M. Hayashi** (1987) Production of 5-Aminolevulinic Acid by Photosynthetic Bacteria. *J. Ferment. Technol.* 65:511-515.
- Schembri, M.A.; R.C. Bayly & J.K. Davies** (1994) Cloning and analysis of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from *Acinetobacter* sp.: Evidence that the gene is both plasmid and chromosomally located. *FEMS Microbiol. Lett.* 118:145-152.
- Schlegel, H.G.** (1992) Allgemeine Mikrobiologie. 7. Überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Schlegel, H.G.; H. Kaltwasser & G. Gottschalk** (1961) Ein Submersverfahren zur Kultur Wasserstoff oxidierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.* 38:209-222.
- Schlegel, H.G.; R. Lafferty & I. Kraus** (1970) The isolation of mutants not accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Arch. Microbiol.* 71:283-294.
- Schlegel, H.G. & A. Steinbüchel** (1981) Die relative Respirationsrate (RRR), ein neuer Belüftungsparameter. In: Lafferty, R. M. (Hrsg.) *Fermentation*, Springer-Verlag, Wien, 11-26.
- Schlünder, E.-U.** (1984) Einführung in die Stoffübertragung. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Schmack, G.; V. Gorenflo & A. Steinbüchel** (1998) Biotechnological Production and Characterization of Polyesters Containing 4-Hydroxyvaleric Acid and Medium-Chain-length Hydroxyalkanoic Acids. *Macromolecules* 31:644-649.

- Schubert, K.; F. Ritter; T. Sorkina; K.-H. Böhme & C. Hörhold** (1975) Abbau von Steroiden-XIV. *J. Steroid Biochem.* 6:1501-1504.
- Schuster, E. & H.G. Schlegel** (1967) Chemolitotrophes Wachstum von *Hydrogenomonas* H16 im Chemostat mit elektrischer Knallgaserzeugung. *Arch. Mikrobiol.* 58:380-409.
- Senior, P.J. & E.A. Dawes** (1971) Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* 125:55-66.
- Shemin, D.** (1972) In: The enzymes. Vol. VII, 3<sup>rd</sup> Ed., Boyer, P.D.; H. Laddy & K. Myrback (Hrsg.), *Academic press*, New York, 323-337.
- Simon, R.** (1984) High frequency mobilization of Gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* Tn5-*mob* transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196:413-420.
- Simon, R.; U. Priefer & A. Pühler** (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnol.* 1:784-791.
- Simons, J.A.; M.J. Teixeira de Mattos & O.M. Neijssel** (1993) Gluconate metabolism of *Klebsiella pneumoniae* NCTC 418 grown in chemostat culture. *Arch. Microbiol.* 159:386-391.
- Slepecky, R.A. & J.H. Law** (1961) Synthesis and degradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 82:37-42.
- Srivastava, S.; M. Urban & B. Friedrich** (1982) Mutagenesis of *Alcaligenes eutrophus* by insertion of the drug resistance transposon Tn5. *Arch. Microbiol.* 131:203-207.
- Steinbüchel, A.; M. Kuhn; M. Niedrig & H.G. Schlegel** (1983) Fermentation enzymes in strictly aerobic bacteria: comparative studies on strains of the genus *Alcaligenes* and on *Nocardia opaca* and *Xanthobacter autotrophicus*. *J. Gen. Microbiol.* 129:2825-2835.
- Stam, H.; H.W. van Verseveld; W. de Vries & A.H. Stouthamer** (1986) Utilization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in free-living cultures of *Rhizobium* ORS571. *FEMS Microbiol. Lett.* 35:215-220.
- Steinbüchel, A.** (1991a) Polyhydroxyalkanoic acids. In Byrom, D. (Hrsg.), *Biomaterials*, Basingstoke: Mac Millan Publishers, 123-213.
- Steinbüchel, A.** (1991b) Polyhydroxyfettsäuren- thermoplastisch verformbare Polyester aus Bakterien. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 39:1112-1123.
- Steinbüchel, A.** (1995) Mikrobielle und chemische Synthese von biologisch abbaubaren Polyestern. *Chemie in unserer Zeit* 29:260-271.
- Steinbüchel, A.** (1996) PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In Rehm, H.-J. & G. Reed (Hrsg.), *Biotechnology* (2<sup>nd</sup> edn.), VCH Weinheim, VI:403-464.

- Steinbüchel, A. & H.G. Schlegel** (1989) Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus*, which are impaired in the accumulation of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permissive for synthesis of PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:168-175.
- Steinbüchel, A. & H.G. Schlegel** (1991) Genetics of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* 5:535-542.
- Steinbüchel, A.; E. Hustede; M. Liebergesell; A. Timm; U. Pieper & H. Valentin** (1992) Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 103:217-230.
- Steinbüchel, A. & H. Valentin** (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 128:219-228.
- Steinbüchel, A.; G. Schmack** (1995) Large-Scale Production of Poly(3-hydroxyvaleric Acid) by Fermentation of *Chromatium violaceum*, Processing, and Characterization of the Homopolyester. *J. Environ. Polymer Degr.* 3:243-258.
- Steinbüchel, A.; K. Aerts; W. Babel; C. Föllner; M. Liebergesell; M.H. Madkour; F. Mayer; U. Pieper-Fürst; A. Pries; H.E. Valentin & R. Wieczorek** (1995) Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microbiol.* 41:94-105.
- Steinbüchel, A. & V. Gorenflo** (1997) Biosynthetic and Biodegradable Polyesters from Renewable Resources: Current State and Prospects. *Macromol. Symp.* 123:61-66.
- Steinbüchel, A.; R. Wieczorek; H. Alvarez & R. Jossek** (1997) Assembly of bacterial PHA granules and other aspects of PHA biosynthesis. In: Eggink; G.; A. Steinbüchel; Y. Poirier & B. Witholt (Hrsg.) International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, 1996, NCR-CNRC, NCR Research Press, Ottawa, 36-47.
- Steinbüchel, A. & B. Fächtenbusch** (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. *TIBTECH*, 16:419-427.
- Steinbüchel, A.; B. Fächtenbusch; V. Gorenflo; S. Hein; R. Jossek; S. Langenbach & B. H. A. Rehm** (1998) Biosynthesis of polyesters in bacteria and recombinant organisms. *Polymer Degradation and Stability* 59:177-182.
- Streyer, L.** (1994) Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Textor, S.; V.F. Wendisch; A.A. De Graf; U. Müller; M.I. Linder; D. Linder & W. Buckel** (1997) Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch. Microbiol.* 168:428-436.
- Thijsse, G.J.E.** (1964) Fatty acid accumulation by acrylate inhibition of  $\beta$ -Oxidation in an alkane-oxidizing pseudomonas. *Biochim. Biophys. Acta* 84:195-197.

- Timm, A. & A. Steinbüchel** (1990) Formation of Polyesters Consisting of Medium-Chain-Length 3-Hydroxyalkanoic Acids from Gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and Other Fluorescent Pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3360-3367.
- Timm A; D. Byrom & A. Steinbüchel** (1990) Formation of blends of various poly(3-hydroxyalkanoic acids) by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:296-301.
- Tottrup, H.V. & S. Carlsen** (1990) A process for the production of human proinsulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 35:339-348.
- Valentin, H.E.; A. Schönebaum & A. Steinbüchel** (1992) Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:507-514.
- Valentin, H.E. & A. Steinbüchel** (1993) Cloning and characterization of the *Methylobacterium extorquens* polyhydroxyalkanoic acid synthase structural gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:309-317.
- Valentin, H.E. & A. Steinbüchel** (1995) Accumulation of Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by Mutants and Recombinant Strains of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 3:169-175.
- Vollbrecht, D.; H.G. Schlegel; G. Stoscheck & A. Janczikowski** (1979) Excretion of metabolites by hydrogen bacteria. VI. Respiration rate-dependent formation of primary metabolites and of poly- $\beta$ -hydroxybutanoate. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 7:267-276.
- Walker, J.; J.R. Whitton & B. Alderson** (1982) Extraction of poly(beta-hydroxy butyric acid). *European Patent Specification* 0046017.
- Wang, Z. & N.A. Da Silva** (1993) Improved protein synthesis and secretion through medium enrichment in a stable recombinant yeast strain. *Biotechnol. Bioeng.* 43:95-102.
- Ward, A.C.; B.I. Rowley & E.A. Dawes** (1977) Effect of oxygen and nitrogen limitation on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in ammonium grown *Azotobacter beijerinckii*. *J. Gen. Microbiol.* 102:61-68.
- Weeks, G.; M. Shapiro; R.O. Burns & S.J. Wakil** (1969) Control of fatty acid metabolism. I. Induction of the enzymes of fatty acid oxidation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 97:827-836.
- Whiting, P.H.; M. Midgley & E.A. Dawes** (1976) The role of glucose limitation in the regulation of the transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate, and of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 92:304-310.
- Wieczorek, R.** (1997) Regulation der Expression von *phaP* in *Alcaligenes eutrophus*. *Dissertation*, Westfälische-Wilhelms-Universität Münster.

- Wieczorek, R.; A. Steinbüchel & B. Schmidt** (1996) Occurrence of polyhydroxyalkanoic acid granule-associated proteins related to the *Alcaligenes eutrophus* H16 GA24 protein in other bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 135:23-30.
- Wilde E.** (1962) Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. *Arch. Microbiol.* 43:109-137.
- Worsey, M.J. & P.A. Williams** (1975) Metabolism of toluene and the xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 124:7-13.

## 7 Anhang

### 7.1 Fermentationssteuerprogramm BRC 1000 im PASCAL-Modus (modifiziert)

```

PROCESS VOLKERW ;
START 0;
BEGIN
  0 : BEGIN
    {=====}
    {=      Initialisierung der Regel-Konstanten      =}
    {=====}

    { Temperatur Regelung; T = 9 Sek., Tn = 400 Sek., Tv = 80 Sek. }
      s := 36000; { Pause Schaumpumpe }
      q := 40;    { Einschaltzeit Schaumpumpe 4 sec }
      p := 350;  { Abfrageintervall PO2 }
      r := 40;   { „Rauschabstand“ PO2 }
      w := 250;  { Pumpeneinschaltzeit Laugenpumpe }
      e := 20;   { Kp fuer Heizung }
      i := 20;   { Kp fuer Kuehlung }
      f := 0.0225; { Intervallzeit / Nachstellzeit }
      g := 8.89; { Vorhaltezeit / Intervallzeit }

      { pH Regelung }

      j := 20;   { Kp }
      k := 1;   { T/Tn }

      { pO2 Regelung }

      { p := 2;    Kp für pO2 Regelung }
      { q := 0.6;  Intervallzeit / Nachstellzeit }
      { s := 2;    Verstärkung für Drehzahl }

      DEACT 0;
      ACT 1;     { Warte auf Schaltschrank-Freigabe }
    END;

    1 : BEGIN
      {=====}
      {=      Warte auf Signal vom Schaltschrank:      =}
      {=      Schalte auf Fermentation oder Stand-By   =}
      {=====}

      a := in( 4, 3); { Hole digitalen Wert für Fermentation }
      y := in( 4, 2); { Hole digitalen Wert für Stand-By }

      IF a > 2000 THEN
        DEACT 1;
        ACT 2; { Fermentation }
      ENDIF;
    
```

```

    IF y > 2000 THEN
      DEACT 1;
      ACT 3; { Stand-By }
    ENDIF;

    DELAY 50; { Abfrage alle 5 Sekunden }
  END;

```

```
2 : BEGIN
```

```

=====
{=      Fermentation: Initialisierung      =}
=====

```

```

  out( 3, 16) := 360; { V320 auf }
  out( 3, 17) := 0;
  out( 3, 19) := 2;

  out( 2, 8) := 360; { V380 auf }
  out( 2, 9) := 0;
  out( 2, 11) := 2;

  out( 2, 20) := 360; { P410 an }
  out( 2, 21) := 0;
  out( 2, 23) := 2;

  out( 2, 12) := 360; { V424 auf }
  out( 2, 13) := 0;
  out( 2, 15) := 2;

  out( 2, 16) := 360; { V425 auf }
  out( 2, 17) := 0;
  out( 2, 19) := 2;

  DEACT 2;

```

```
{ Starten der Regelungen }
```

```

  ACT 10; { Temperatur Regelung }
  ACT 11; { pH Regelung }
  ACT 12; { pO2 Regelung }
  ACT 13; { Schaum Bekämpfung mechanisch }
  ACT 14; { Antischaummittel }

```

```
{ Start Schaltschrank-Überwachung }
```

```

  ACT 5; { Überprüfung Standby, Fermentation }
END;

```

```
3 : BEGIN
```

```

=====
{=      Stand-By: Initialisierung      =}
=====

```

```

  out( 1, 4) := 0; { P222 aus }
  out( 3, 19) := 0; { V320 zu }
  out( 2, 8) := 360; { V380 auf }
  out( 2, 9) := 0;

```

```
out( 2, 11) := 2;
```

```
out( 2, 20) := 360; { P410 an }
```

```
out( 2, 21) := 0;
```

```
out( 2, 23) := 2;
```

```
out( 2, 12) := 360; { V424 auf }
```

```
out( 2, 13) := 0;
```

```
out( 2, 15) := 2;
```

```
out( 2, 16) := 360; { V425 auf }
```

```
out( 2, 17) := 0;
```

```
out( 2, 19) := 2;
```

```
{ Stop der Regelungen }
```

```
DEACT 11;    { pH Regelung }
```

```
DEACT 12;    { pO2 Regelung }
```

```
DEACT 13;    { Schaum Bekaempfung mechanisch }
```

```
DEACT 14;    { Antischaummittel }
```

```
DEACT 3;
```

```
{ Start Schaltschrank-Überwachung }
```

```
ACT 6;      { Überprüfung Stand-By, Fermentation }
```

```
END;
```

```
5 : BEGIN
```

```
{=====
  {=      Überprüfung Stand-by, Fermentation      =}
=====}
```

```
a := in( 4, 3);    { Fermantation }
y := in( 4, 2);    { Stand-By }
```

```
IF a < 2000 AND
  y > 2000 THEN
  ACT 3;          { Start Stand-By }
  DEACT 5;
ENDIF;
```

```
IF a < 2000 AND
  y < 2000 THEN
  DEACT 5;
  ACT 7;          { Deaktiviere System }
ENDIF;
```

```
DELAY 45;
```

```
END;
```

```
6 : BEGIN
```

```
{=====
  {=      Überprüfung Stand-by, Fermentation      =}
=====}
```

```
a := in( 4, 3);    { Fermentation }
y := in( 4, 2);    { StandBy }
```

```

IF a > 2000 AND
  y < 2000 THEN
  ACT 2;      { Start Fermentation }
  DEACT 6;
ENDIF;

```

```

IF a < 2000 AND
  y < 2000 THEN
  DEACT 6;
  ACT 7;      { Deaktiviere System }
ENDIF;

```

```

  DELAY 90;
END;

```

```

7 : BEGIN

```

```

=====
{=          Deaktiviere Sytem          =}
=====

```

```

{ Stop Regelungen }

```

```

  DEACT 10;    { Temperatur Regelung }
  DEACT 11;    { pH Regelung }
  DEACT 12;    { pO2 Regelung }
  DEACT 13;    { Schaum Bekämpfung mechanisch }
  DEACT 14;    { Antischaummittel }

```

```

  out( 1, 4) := 0; { P222 zu }

```

```

{ Zur Visualisierung alle Stellgrößen auf 0 setzen }

```

```

  YntT_mv := 0;
  YntpH_mv := 0;
  dYntpO2_mv := 0;

```

```

{ Initialisiere Karte- und Kanal-Nummer }

```

```

  a := 2;
  y := 31;

```

```

  DEACT 7;
  ACT 8;      { Reset alle digitalen Ausgänge }
END;

```

```

8 : BEGIN

```

```

=====
{=          Reset alle digitalen Ausgänge          =}
=====

```

```

  out( a, y) := 0;

```

```

  y := y - 1;

```

```

  IF y < 0 THEN
    a := a + 1;
    y := 31;

```

```

        ENDIF;

        IF a > 3 THEN
            DEACT 8;
            ACT 0;      { Starte System }
        ENDIF;
    END;

10 : BEGIN
{=====}
{=          Temperatur Regelung          =}
{=====}
    a := in( 1, 0);    { Hole aktuellen Wert }
    a := ( a / 4095) * 150; { Skalieren }
    b := c;           { Uebergebe alte Differenz }
    c := TIC_ev - a;  { Bilde neue Differenz }

    IF SQR( c) > 1 THEN { Differenz ausserhalb Xp-Bereich }
        d := 0;        { Summe gleich 0 }
    ELSE
        d := d + c;    { Bilde neue Summe }
    ENDIF;

    y := c + f * d + g * ( c - b); { PID-Stellgroesse }

    IF y > 0 THEN
        y := 90 + e * y;
    ELSE
        y := 90 + i * y;
    ENDIF;

    IF y > 180 THEN    { 1 ó Ynt_mv ó 180 }
        YntT_mv := 180;
    ELSE IF y < 1 THEN
        YntT_mv := 1;
    ELSE
        YntT_mv := y;
    ENDIF;
    ENDIF;

    IF YntT_mv < 89 THEN    { Kuehlen }
        a := 90 - YntT_mv; { Einschaltzeit }
        out( 2, 31) := 0;   { V423 zu }

        out( 2, 24) := a;   { V422 auf }
        a := 90 - a;
        out( 2, 25) := a;
        out( 2, 27) := 1;
    ELSE IF YntT_mv > 91 THEN { Heizen }
        a := YntT_mv - 90; { Einschaltzeit }
        out( 2, 27) := 0;   { V422 zu }

        out( 2, 28) := a;   { V423 auf }
        a := 90 - a;
        out( 2, 29) := a;
        out( 2, 31) := 1;

```

```

        ENDIF;
    ENDIF;

    DELAY 90;    { Regelung wiederholen in 36 Sekunden }
END;

11 : BEGIN
{=====}
{=          pH Regelung          =}
{=====}
    a := in( 1, 3);    { Hole aktuellen Wert }
    a := 2 + ( a / 4095) * 10; { Skalieren }
    b := ph_ev - a ;    { Bilde neue Differenz }

    IF SQR( b) > 1 THEN    { Differenz ausserhalb Xp-Bereich }
        h := 0;    { Summe gleich 0 }
    ELSE
        h := h + b;    { Bilde neue Summe }
    ENDIF;

    IF h > 6 THEN
        h := 6;
    ELSE IF h < 0 THEN
        h := (-1) * h;
        IF h > 6 THEN
            h := 6;
        ENDIF;
        h := (-1) * h;
    ENDIF;
ENDIF;

    y := 90 + j * ( b + k * h); { PI-Stellgroesse }

    IF y > 180 THEN    { 1 ó Yntp_mv ó 180 }
        YntpH_mv := 180;
    ELSE IF y < 1 THEN
        YntpH_mv := 1;
    ELSE
        YntpH_mv := y;
    ENDIF;
ENDIF;

    IF SQR( b) > 0.01 THEN    { Ausserhalb Totzone }
        IF YntpH_mv < 89 THEN    { pH zu hoch }
            a := YntpH_mv;    { Ausschaltzeit }
            y := 90 - a;    { Einschaltzeit }
            out( 3, 7) := 0;    { P520 aus }
            out( 3, 0) := y;    P510 Säurepumpe an
            out( 3, 1) := a;
            out( 3, 3) := 1;
        ELSE IF YntpH_mv > 91 THEN    { pH zu niedrig }
            a := YntpH_mv - 90;    { Einschaltzeit }
            y := 90 - a;    { Ausschaltzeit }
            out( 3, 3) := 0;    P510 Säurepumpe aus
            out( 3, 4) := a;    { P520 an }
            out( 3, 5) := y;
        ENDIF;
    ENDIF;

```

```

        out( 3, 7) := 1;
        ENDIF;
    ENDIF;
ENDIF;??

    DELAY 90;    { Regelung wiederholen in 9 Sekunden }
END;

13 : BEGIN
=====
    {=          Schaum Bekämpfung mechanisch          =}
=====
    out( 3, 8) := 2400; { P550 an, Dauerbetrieb }
        out( 3, 9) := 0;
        out( 3, 11) := 1;
END;

14 : BEGIN
=====
    {=          Schaum Bekämpfung Antischaummittel          =}
=====
    IF Schaum2_mv > 0.5 THEN
        a := 360 * Schaum2_ev + 1;
        out( 3, 12) := q;    { P530 an }
        out( 3, 13) := y;
        out( 3, 15) := 1;
    ELSE
        out( 3, 15) := 0;
    ENDIF;
END;
=====
    {=          Zugabe Kohlenstoffquelle durch Laugenpumpe über O2-Sättigung          =}
=====

20 : Begin
    l := t;          { Übergabe alter PO2-Wert }
    l := l+r;        { "Rauschabstand" }
    t := po2_mv;     { Einlesen pO2 }

    If t>1 or
        t>u then
        v := v+1;
    Else
        v := 0;
    Endif;

    If v = 2 then
        out(3,4):= w;    { Einschaltzeit Laugenpumpe in 0.1 sec }
        out(3,7):= 1;    { Pumpe ein }
        v := 0;
    Endif;

    Delay h;
End;
END.

```

**Veröffentlichungen** (Aktualisierter Stand, 20. April, 2002)

Hessler, D. P.; V. Gorenflo, & F. H. Frimmel (1993)

UV-degradation of atrazine and metazachlor in the absence and presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bicarbonate and humic substances. *J. Water SRT-Aqua*, **42**, 8-12.

Hessler, D. P.; V. Gorenflo, & F. H. Frimmel (1993)

Degradation of aqueous atrazine and metazachlor solutions by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - influence of pH and herbicide concentration. *Acta hydrochim. Hydrobiol.*, **21**, 209-214.

\*Steinbüchel, A. & V. Gorenflo (1997)

Biosynthetic and biodegradable polyesters from renewable resources: Current state and prospects. *Macromolecular Symposia*, **123**, 61-66.

Gorenflo, V.; S. Schulze; A. M. Braun & W. Stahl (1998)

The tumbling reactor: a new reactor design for biotechnology. Cultivation of the phototrophic micro-alga *Scenedesmus communis*. *Biotechnology Techniques*, **12** (1), 55-61.

\*Schmack, G.; V. Gorenflo & A. Steinbüchel (1998)

Biotechnological production and characterization of polyesters containing 4-hydroxyvaleric acid and medium chain-length hydroxyalkanoic acids. *Macromolecules*, **31**, 644-649.

\*Steinbüchel, A.; B. Fuchtenbusch; V. Gorenflo; S. Hein; R. Jossek; S. Langenbach & B. H. A. Rehm (1998)

Biosynthesis of polyesters in bacteria and recombinant organisms. *Polymer Degradation and Stability*, **59**, 177-182.

\*Steinbüchel, A.; C. Brämer; B. Fuchtenbusch; V. Gorenflo; S. Hein; R. Jossek; S. Langenbach; Q. Qi; B. H. A. Rehm & S. Song (1998)

Poly(hydroxyalkanoic) Biosynthesis Pathways. In: A. Steinbüchel (Ed.) Proceedings of the international Symposium on "Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers", (Germany), Münster, June 3-6, 1998, Wiley-VCH publisher, 35-47.

\*Gorenflo, V.; Marose, S.; Riesenberg, M.; Scheper, T. & A. Steinbüchel (1999)  
Quantification of Bacterial PHA by Nile Red Staining.  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 765-772.

Steinbüchel, A.; I. Voß & V. Gorenflo (1999)  
Interesting carbon sources for biotechnological production of biodegradable polyesters: the use of rape seed oil methyl ester (biodiesel), *ACS Books, in press*.

Tran, H.; H. Ahlers; V. Gorenflo & A. Steinbüchel (2000)  
Axenic cultivation of anoxygenic phototrophic bacteria, cyanobacteria and microalgae in a new closed tubular glass photobioreactor.  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**: 383-389.

\*Gorenflo, V.; Schmack, G.; R. Vogel & A. Steinbüchel (2001) Development of a Process for the Biotechnological Large-Scale Production of 4HV-Containing Polyesters and Characterization of their Physical and Mechanical Properties. *Biomacromolecules*, **2**: 45-57.

### **Ausstellungen:**

Gorenflo, V.; S. Schulze; A. M. Braun & W. Stahl (1994)  
The tumbling reactor: a new reactor design for biotechnology. Exhibition, *Achema '94* in cooperation with Chema-Balke-Dürr GmbH, Germany.

\*Füchtenbusch, B.; V. Gorenflo; S. Hein; R. Jossek; B. Rehm; A. Renkert; R. Wiczorek & A. Steinbüchel (1997)  
Plastik aus Bakterien – Biotechnologische Produktion Neuer Polymerer Werkstoffe.  
Ausstellung, *Achema '97*, Frankfurt.

### **Posterbeiträge:**

\*Gorenflo, V. & A. Steinbüchel (1996)  
Optimization of the production of 4HV containing Polyesters. *International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates '96*, Davos.

\*Gorenflo, V. & A. Steinbüchel (1997)

Produktion von 4HV enthaltenden Polymeren . *Dechema-Jahrestagungen '97*, Münster.

\*Marose, S.; C. Lindemann; E. Stärk; R. Finke; V. Gorenflo; A. Steinbüchel & T. Scheper (1998)

Bioanalytik mit Hilfe von zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie. *Dechema Jahrestagungen '98*, Wiesbaden, Mai, 26-28.

\*Gorenflo, V.; G. Schmack & A. Steinbüchel (1998)

Physical and Technical Properties of Polyesters Containing 4-Hydroxyvaleric acid and Medium Chain-Length Hydroxyalkanoic acids. In: A. Steinbüchel (Ed.) Proceedings of the international Symposium on "Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers", (Germany), Münster, June 3-6.

\*Brämer, C.; V. Gorenflo & A. Steinbüchel (1998)

Conversion of Levulinic Acid into Bacterial PHA Containing 4HV by Tn5-Induced Mutants of *A. eutrophus*. In: A. Steinbüchel (Ed.) Proceedings of the international Symposium on "Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers", (Germany), Münster, June 3-6.

\*Gorenflo, V. & A. Steinbüchel (1998)

Large-Scale Production of 4-Hydroxyvaleric acid (4HV) Containing Polyesters. *International Symposium on Biological Polyhydroxyalkanoates (ISBP '98)*, Saitama, Japan, September 9.-11., 1998.

\*Gorenflo, V.; S. Marose; M. Riesenberger; T. Scheper & A. Steinbüchel (1998)

Quantification of Bacterial PHA by Nile Red Staining. *International Symposium on Biological Polyhydroxyalkanoates (ISBP '98)*, Saitama, Japan, September 9.-11., 1998.

Gorenflo, V. M., Smith, L, Dedinsky, B., Persson, B. and Piret, J. M.

Optimization of Large-scale Ultrasonic Filter Performance for a 100 L CHO Cell Perfusion Bioreactor. Cell Culture Engineering VIII, Snowmass, Colorado, poster presentation, April 1-6, 2002.

Gorenflo, V. M., Bowen, B. D., Angepat, S., Piret, J. M.

Optimization of an Acoustic Cell Filter with a Novel Air-backflush System. Cell Culture Engineering VIII, Snowmass, Colorado, poster presentation, April 1-6, 2002.

## **Vorträge:**

\*Steinbüchel A.; V. Gorenflo; N. Krüger; S. Langenbach; Q. Quingsheng & B. H. A. Rehm (1997)

PHA biosynthesis in pseudomonads and related bacteria: Molecular analysis of the genes and utilization for production of polyesters in recombinant bacteria. Lecture at the Pseudomonas '97 Symposium, Madrid, Spain, September 4.-8., 1997.

Gorenflo, V. M., Pfeifer, T. A., Grigliatti, T. A., Lesnicki, G., Kilburn, D. G. and Piret, J. M. CBD-Factor X fusion protein production by a stable transformed Sf9 insect cell line in a high cell density perfusion culture. 221st ACS National Meeting, San Diego, California, oral presentation, April 1-5, 2001.

Gorenflo, V. M.

Perfusion Bioreactor Cell Retention: Ultrasonic Filter Scale-up and Air Backflush. Cell Culture Engineering VIII, Snowmass, Colorado, invited oral workshop presentation, April 1-6, 2002.

In den mit Stern (\*) gekennzeichneten Publikationen wurden Teile der vorliegenden Arbeit bereits veröffentlicht bzw. deren Veröffentlichung befindet sich in Vorbereitung.

## **Danksagungen**

Herrn Prof. Dr. A. Steinbüchel danke ich für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und die vielen anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. T. Scheper und der Arbeitsgruppe aus Hannover danke ich für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung bei der Durchführung der Fluoreszenzmessungen. Mein besonderer Dank gilt Dr. Stefan Marose, mit dem mir nicht nur die Zusammenarbeit, sondern auch die Nachtreffen außerordentliche Freude bereiteten.

Frau Dr. Schmack danke ich herzlich für die Durchführung der Materialuntersuchungen.

Bei Herrn Herbert Ahlers möchte ich mich für die engagierte Unterstützung in allen technischen Belangen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den ehemaligen und jetzigen „Kellerkindern“, insbesondere Dr. Ralf Jossek, der mich gerade in schwierigen Phasen oft ermutigte und mir stets ein guter Freund war, Dr. Silke Hein, Katja Kemper, Dr. Bernd Füchtenbusch, Helmut Fleige und Herbert Ahlers, die durch das gute Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Christian Brämer danke ich für die äußerst fruchtbaren Diskussionen und die genetischen Arbeiten, aus denen viele wertvolle Anregungen hervorgingen.

Allen übrigen Mitarbeitern des Instituts, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle danken.

---