

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Reaktionstechnische Untersuchungen zur  
chemolithoautotrophen Nitratatmung von  
*Cupriavidus necator***

**Armin K. Tiemeyer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Hartmut Spliethoff  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. Johann Stichlmair,  
em.

Die Dissertation wurde am 20.09.2007 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 29.11.2007  
angenommen.



„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens  
hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten  
vor unseren Augen erstreckt“

(Sir Isaac Newton)



## **Danksagung**

An oberster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die Möglichkeit danken, am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, im Rahmen einer spannenden und anspruchsvollen Fragestellung meine Promotion durchzuführen.

Beim Coreferenten Herrn Prof. Dr.-Ing. Johann Stichlmair sowie beim Prüfungsvorsitzenden Herrn Prof. Dr.-Ing. Hartmut Spliethoff möchte ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe bedanken.

Irma Einsle und Markus Amman gilt mein Dank für die unterstützenden Tätigkeiten bei organisatorischen Dingen sowie im Laboralltag.

Herrn Norbert Werth danke ich für den Kaffee, die netten Gespräche zwischendurch und für die schnellen und unproblematischen Problemlösungen.

Dank an Georg Kojro für die Unterstützung bei allen elektronischen Fragestellungen sowie Computertechnischen Problemen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Dankeschön an meine Studenten Martin Höhne, Eva Herrero und Michael Weiner die im Rahmen von Semester- sowie von Diplomarbeiten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik mit denen ich die letzten Jahre zusammenarbeiten durfte danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre sowie die hilfreichen Diskussionen. Besonders danke ich hierbei Hannes Link für die Unterstützung bei der Modellierung sowie Gabi Gebhardt für die Korrektur des Manuskript.

Danke an Jay für die Couch die mir in den zahllosen Nachtschichten immer eine angenehme Ruhestätte war.

Ein besonderer Dank geht an Meine Eltern und meinen Bruder für die Unterstützung und den Rückhalt in all den Jahren.

Vor allem danke ich meiner Frau Maya für die Unterstützung, den Rückhalt, die Motivation und das Verständnis in allen Lebenslagen. Ohne sie wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Theoretischer Hintergrund .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Das Wachstum von Mikroorganismen.....</b>	<b>5</b>
3.1.1	Atmung.....	5
3.1.2	Chemoorganoheterotrophes Wachstum.....	7
3.1.3	Chemolithoautotrophes Wachstum .....	9
<b>3.2</b>	<b>Der Mikroorganismus <i>Cupriavidus necator</i> .....</b>	<b>11</b>
3.2.1	Heterotrophes Wachstum .....	12
3.2.2	Wasserstoff-Oxidation .....	14
3.2.3	CO <sub>2</sub> -Fixierung.....	16
3.2.4	Nitratatmung .....	18
3.2.5	Produktion von PHB.....	24
<b>3.3</b>	<b>Reaktionstechnische Beschreibung des mikrobiellen Wachstums ....</b>	<b>26</b>
3.3.1	Massenbilanzen .....	26
3.3.2	Kinetik des mikrobiellen Wachstums .....	32
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Herstellung der Kultivierungsmedien .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2</b>	<b>Kultivierungen.....</b>	<b>47</b>
4.2.1	Verwendete Stämme und Stammhaltung .....	47
4.2.2	Heterotrophe Kultivierung im 200 mL-Maßstab .....	49
4.2.3	Heterotrophe Kultivierung im Laborbioreaktor .....	53
4.2.4	Chemolithoautotrophe Kultivierung im Laborbioreaktor .....	54
<b>4.3</b>	<b>Analytik.....</b>	<b>56</b>
4.3.1	Bestimmung der optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration.....	56

4.3.2	Bestimmung des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidgehalts im Abgas der chemolithoautotrophen Kultivierung im Laborbioreaktor.....	57
4.3.3	Bestimmung von Nitrat- und Nitritkonzentrationen.....	59
4.3.4	Bestimmung des PHB-Gehalts von <i>Cupriavidus necator</i> .....	59
4.3.5	Bestimmung von Fruktose und Ammoniumkonzentration .....	60
<b>4.4</b>	<b>Bestimmung der Gaslöslichkeit von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> .....</b>	<b>62</b>
<b>4.5</b>	<b>Ermittlung der kinetischen Parameter der chemolithoautotrophen Nitratatmung .....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>67</b>
<b>5.1</b>	<b>Heterotrophe Voruntersuchungen .....</b>	<b>67</b>
5.1.1	Aerobe Referenzkultivierung .....	67
5.1.2	Heterotrophe Nitratatmung - Referenzkultivierung .....	71
5.1.3	Einfluss der Nitratanfängskonzentration auf die heterotrophe Nitratatmung .....	73
5.1.4	Einfluss der Medienkonzentration auf die heterotrophe Nitratatmung .....	75
5.1.5	Einfluss von EDTA als Löslichkeitsvermittler auf die heterotrophe Nitratatmung .....	81
5.1.6	Heterotrophe Nitratatmung im Rührkesselreaktor .....	84
<b>5.2</b>	<b>Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung .....</b>	<b>86</b>
5.2.1	Stammauswahl.....	86
5.2.2	Bestimmung des pH-Optimum der chemolithoautotrophen Nitratatmung .....	90
5.2.3	Einfluss der eingesetzten Spurenelemente sowie der Eisenquelle auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung .....	95
5.2.4	Einfluss einer Nitrat- und Nitritadaptationsphase auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung .....	97
5.2.5	Festlegung eines Referenzprozesses zur Bestimmung der Kinetik der chemolithoautotrophen Nitratatmung. ....	106
5.2.6	Untersuchungen zum Einfluss von Cobinamid auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung .....	110



<b>5.3 Kinetik der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Satzverfahren</b>	<b>113</b>
5.3.1 Beschreibung des formalkinetischen Modells.....	114
5.3.2 Untersuchungen zur Parameteridentifikation.....	118
5.3.3 Untersuchung zur Parametervalidierung.....	120
5.3.4 Diskussion der identifizierten formalkinetischen Parameter.....	123
5.3.5 Modellbasierte Bestimmung der Raum-Zeit-Ausbeuten im Satzverfahren .....	127
<b>5.4 Kinetik der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Zulaufverfahren.....</b>	<b>129</b>
5.4.1 Beschreibungen des formalkinetischen Modells sowie der zugrunde liegenden Annahmen.....	131
5.4.2 Untersuchungen zur Parameteridentifikation.....	135
5.4.3 Untersuchungen zur Parametervalidierung .....	137
5.4.4 Diskussion der identifizierten formalkinetischen Parameter.....	139
5.4.5 Modellbasierte Bestimmung des optimalen Volumenstromes sowie der Nitratkonzentration des Zuflusses im Satzverfahren ....	141
<b>5.5 Untersuchungen zur PHB-Akkumulation von <i>Cupriavidus necator</i> unter chemolithoautotrophen Bedingungen bei simultaner Nitratatmung .....</b>	<b>143</b>
<b>6 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>149</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>155</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>165</b>
<b>9 Anhang .....</b>	<b>170</b>



## 1 Einleitung

Im Jahr 2006 wurden in Deutschland 18,5 Millionen Tonnen Kunststoff produziert. Von der im selben Jahr angefallenen Menge an Kunststoffabfällen von 3,45 Millionen Tonnen, wurden 2,65 Millionen Tonnen (77%) wiederverwertet, 0,35 Millionen Tonnen (10%) zwischengelagert und 0,44 Millionen Tonnen (13%) zur Endlagerung auf Deponien verbracht. Der Anteil des wiederverwerteten Kunststoffabfalls teilt sich dabei in die Bereiche werkstoffliches Recycling (24%), rohstoffliches Recycling (9%), sowie energetische Verwertung (44%) auf [PlasticsEurope Geschäftsbericht 2006]. Der größte Teil (57%) des anfallenden Kunststoffabfalls und die darin gebundenen Rohstoffe, meist Rohöl, werden somit aus dem Rohstoffkreislauf entzogen. Ein besonderes Problem stellt dabei die thermische Verwertung dar, da aufgrund dieser Verwertungsart der ursprünglich in Öl gebundene Kohlenstoff in Form von CO<sub>2</sub> in die Erdatmosphäre abgegeben wird. Kohlendioxid gilt neben Methan als Hauptursache für den Treibhauseffekt und die damit verbundene Erderwärmung.

Eine in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnende Möglichkeit zur Verbesserung des Rohstoffkreislaufs ist der Einsatz biologisch abbaubarer Kunststoffe. Ein Kunststoff wird dabei als biologisch abbaubar bezeichnet, wenn der Abbau durch biologische Aktivität, insbesondere durch enzymatischen Abbau hervorgerufen wird (Definition nach ISO/CD 16929). Eine Aussage über den Ursprung des Kunststoffs, insbesondere die für die Herstellung eingesetzten Rohstoffe, wird durch das Produktmerkmal „biologisch abbaubar“ nicht getroffen. Derzeit verfügbare, biologisch abbaubare Biopolymere werden nach Art der Rohstoffe in natürliche Polymere auf Basis nachwachsender Rohstoffe, sowie synthetische Polymere aus petrochemischen Bausteinen untergliedert [Müller 2000]. Hierbei sind lediglich Kunststoffe auf der Basis nachwachsender Rohstoffe in der Lage nachhaltig zu einer Verminderung der CO<sub>2</sub>-Emission beizutragen.

Biopolymere aus nachwachsenden Rohstoffen werden meist mit Hilfe von Mikroorganismen oder gentechnisch veränderter Pflanzen hergestellt. Dabei wird die Eigenschaft einiger Mikroorganismen zu nutze gemacht, Biopolymere wie beispielsweise Polyhydroxyalkanoate als Speicherstoff zu synthetisieren. Als Substrat für die mikrobielle Produktion des Polyesters können Kohlendioxid, pflanzliche Stärke, Zucker aber auch Abfälle aus der landwirtschaftlichen Produktion eingesetzt werden. Die Kunststoffe aus erneuerbaren Rohstoffen besitzen vergleichbare physikalische Eigenschaften wie konventionelle, aus Erdöl synthetisierte, Polymere. Biokunststoffe haben daher das Potential konventionelle

Kunststoffe in vielen Anwendungsgebieten, wie beispielsweise in der Verpackungsindustrie oder in der Medizintechnik zu ersetzen [Luengo et al. 2003]. Für den Zeitraum von 2005 bis 2010 wird im Bereich Verpackungs- und Lebensmittelindustrie ein Wachstumspotential von über 30% für biologisch abbaubare Kunststoffe prognostiziert [Fachagentur nachwachsende Rohstoffe e.V. 2007]. Der bisherige Einsatz von biologisch abbaubaren Kunststoffen im Vergleich zu herkömmlichen Polymeren ist jedoch gering. Im Jahr 2005 wurden in Europa 48,5 Millionen Tonnen Kunststoff hergestellt, wovon lediglich 0,05 Millionen Tonnen auf biologisch abbaubare Kunststoffe aus nachwachsenden Rohstoffen zurückzuführen waren [Sartorius 2007]. Dieser geringe Anteil ist auf die deutlich höheren Kosten biologisch abbaubarer Kunststoffe zurückzuführen. Der Preis pro Kilogramm konventionell hergestellten Kunststoffs liegt zwischen 0,7 € und 1€. Die Herstellungskosten für ein Kilogramm biologisch abbaubaren Kunststoff auf der Basis nachwachsender Rohstoffe liegt derzeit dagegen zwischen 6 € und 10 €. Ursache für diesen deutlich höheren Preis liegt vor allem in der aufwendigeren Produktion, sowie in dem höheren Aufwand bei der Gewinnung des Produktes aus Mikroorganismen oder Pflanzen. Darüber hinaus sind bis heute kaum großtechnische Produktionsanlagen zur Herstellung biologisch abbaubarer Kunststoffe auf Basis nachwachsender Rohstoffe in Betrieb. Die Produktion erfolgt meist in kleineren Produktionseinheiten [Karus 2003; Luengo 2003].

Die weitere Verknappung der weltweiten Rohölreserven und der damit verbundene Preisanstieg herkömmlicher Kunststoffe tragen dazu bei, dass biologisch abbaubare Kunststoffe auf Basis nachwachsender Rohstoffe in Zukunft zunehmend an Bedeutung gewinnen werden. Darüber hinaus kann durch gentechnische Modifikation der Produktionsstämme, die Entwicklung neuer effizienter und kostengünstiger Produktionsverfahren, sowie deren großtechnische Realisierung, zur Steigerung der Konkurrenzfähigkeit biologisch abbaubarer Kunststoffe beigetragen.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Das Gram-negative Bakterium *Cupriavidus necator* (früher: *Ralstonia eutropha* oder *Alcaligenes eutrophus*) ist das am besten untersuchte Bakterium zur biotechnologischen Herstellung von Polyhydroxyalkanoaten, wie beispielsweise Polyhydroxybutyrat (PHB), oder anderen biosynthetischen Co-Polyestern. Neben Anwendungen in der Verpackungsindustrie, Landwirtschaft und Medizintechnik werden diese optisch aktiven Biopolymere als Quelle für chirale Bausteine in der chemischen Industrie diskutiert. Die Fähigkeit des aeroben Bakteriums *Cupriavidus necator* auch chemolithoautotroph mit Wasserstoff als Elektronendonator, Sauerstoff als Elektronenakzeptor und Kohlendioxid als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, eröffnet weiterhin die Möglichkeit, Kohlendioxid in Form von PHB zu fixieren.

Da *Cupriavidus necator* auch zur Nitratatmung befähigt ist, wird dieses Bakterium (neben *Paracoccus denitrificans* und *Pseudomonas spec.*) bei der autotrophen Nitratentfernung aus Trinkwasser mit Wasserstoff als Elektronendonator eingesetzt. Wasserstoff wird als ideale Energiequelle bei der biologischen Denitrifikation von Trinkwasser betrachtet, da es aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit nicht im Trinkwasser stört und überschüssiges Substrat oder Folgeprodukte, wie sie bei der heterotrophen Denitrifikation auftreten, nicht nachfolgend entfernt werden müssen. Zur autotrophen Denitrifikation von Rohwasser werden Reaktoren eingesetzt, die eine Verweilzeitentkopplung von Zellen und Medium ermöglichen: Festbettreaktoren, Fließbettreaktoren oder Membranverfahren. Die Versorgung mit H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> erfolgt entweder durch direkte Dispergierung der Gasphase, über blasenfreie Begasung mit Membranen oder durch elektrolytische H<sub>2</sub>-Erzeugung im Bypass.

Zur chemolithoautotrophen Herstellung von *Cupriavidus necator* mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor liegen bisher jedoch keine Daten vor. Generell würde die Nitratatmung bei der chemolithoautotrophen Kultivierung von *Cupriavidus necator* im Gegensatz zur Sauerstoffatmung große sicherheitstechnische Vorteile bieten, da bei diesem „anoxischen“ Betrieb keine zündfähigen Gasmischungen von Wasserstoff und Sauerstoff im Reaktor auftreten können. Bei der chemolithoautotrophen Kultivierung mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor muss dagegen aus Sicherheitsgründen eine Gaszusammensetzung unterhalb der unteren Explosionsgrenze (Sauerstoffgehalt < 6 % oder Wasserstoffgehalt < 4 %) jederzeit garantiert werden. Das hierdurch sehr geringe treibende Konzentrationsgefälle beim Gaseintrag in die Flüssigphase

erfordert deswegen die Realisierung sehr hoher Stoffübergangskoeffizienten  $k_L a$  von mehr als  $2000 \text{ h}^{-1}$  im Bioreaktor um Stofftransportlimitierungen zu vermeiden. Die chemolithoautotrophe Herstellung von *Cupriavidus necator* sowie die Produktion von PHB mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor sind daher bis heute (bei Umgebungsdruck) nur im Labormaßstab möglich.

Obwohl die autotrophe Denitrifikation (mit immobilisierten Mikroorganismen) bei der Trinkwasseraufbereitung vereinzelt großtechnisch eingesetzt wird, sind nahezu keine reaktionskinetischen Daten verfügbar. Reaktionskinetische Daten (Modelle und identifizierte Modellparameter zur Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von den Konzentrationen an Nitrat und Nitrit in der Flüssigphase, Zellertragskoeffizienten, usw.) wie sie für die heterotrophe Kultivierung von *Cupriavidus necator* für verschiedene Substrate vorliegen, sind nicht verfügbar. Darüber hinaus ist über das Wachstumsverhalten des Organismus während der Nitratreduktion unter heterotrophen, sowie chemolithoautotrophen Bedingungen bislang nur wenig bekannt. Die letzten bekannten wachstumsphysiologischen Untersuchungen mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor gehen auf das Jahr 1973 zurück [Pfitzner und Schlegel 1973].

Zielsetzung der Arbeit ist daher die Identifizierung der Reaktionskinetik des chemolithoautotrophen Wachstums von *Cupriavidus necator* mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor. Hierzu sollen geeignete formalkinetische Modellansätze mit Hilfe von Experimenten im Rührkesselreaktor identifiziert werden. Zur Erreichung der Zielsetzung werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Charakterisierung des Wachstums von *Cupriavidus necator* während der Nitratatmung unter heterotrophen sowie chemolithoautotrophen Bedingungen sowie Bestimmung der optimalen Kultivierungsbedingungen.
- Etablierung eines Referenzprozesses als Grundlage für eine reproduzierbare Kultivierung von *Cupriavidus necator* unter chemolithoautotrophen Bedingungen.
- Entwicklung eines formalkinetischen Modells auf Grundlage der Beobachtungen der Voruntersuchungen.
- Identifikation und Validation der formalkinetischen Parameter durch Untersuchungen im Rührkesselreaktor.

## 3 Theoretischer Hintergrund

### 3.1 Das Wachstum von Mikroorganismen

#### 3.1.1 Atmung

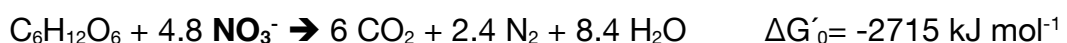
Atmung ist die Übertragung von Elektronen von einem Elektronendonator über eine Atmungskette auf einen terminalen Elektronenakzeptor. Es wird zwischen aerober Atmung, der Reduktion von Sauerstoff und anaerober Atmung, der Reduktion alternativer hochoxidierter Verbindungen, unterschieden [Präve et al. 1994]. Alternative Elektronenakzeptoren sind hierbei beispielsweise Nitrat (Nitratatmung bzw. dissimilatorische Nitratreduktion), Sulfat (Sulfatatmung) oder Schwefel (Schwefelatmung). Bei beiden Arten der Atmung erfolgt der Energiegewinn durch Elektronentransport über die Atmungskette.

Die Atmungskette besteht aus einer streng organisierten Sequenz von Cytochromen, elektronenübertragenden Hämproteinen, sowie Ubichinon. Die schrittweise Verminderung der elektrochemischen Potentialdifferenz zwischen NADH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid, ein Cosubstrat der Atmungskette) und dem terminalen Elektronenakzeptor wird zum Aufbau chemischer Energie (Adenosintriphosphat, ATP) genutzt. Dieser Ablauf der Energiegewinnung wird auch Elektronentransportphosphorylierung genannt [Schlee und Kleber 1991].

Die aerobe Atmung stellt die effizienteste Möglichkeit der Elektronenübertragung dar. Dies beruht auf der geringeren Änderung der freien Energie bei der Reduktion alternativer Elektronenakzeptoren. Wird beispielsweise die Änderung der freien Energie unter Standardbedingungen (25°C; 1013 mbar; 1 mol L<sup>-1</sup>; pH =7,0) der Sauerstoffreduktion mit der Reduktion von Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) verglichen, so ergibt sich mit Glukose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) als Elektronendonator für die aerobe Atmung:

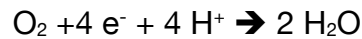


sowie für die Nitratreduktion:

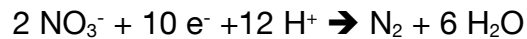


Die Oxidation von Glukose bei der Nitratatmung erreicht 95% der freien Energieänderung der Oxidation mit Sauerstoff unter Standardbedingungen [Cypionka 1999].

Abweichend von diesen theoretischen Betrachtungen wird für die heterotrophe Nitratatmung unter Prozessbedingungen ein maximaler Wirkungsgrad von lediglich 80% beobachtet [Hulsbeek et al. 2002]. Diese Abweichung kann durch die genauere Betrachtung des realen Systems erklärt werden. So erfolgt die Reduktion von Sauerstoff als einstufige Reaktion:

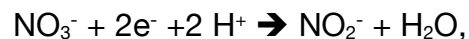


Die Reduktion alternativer Elektronenakzeptoren ist meist aufwändiger und verläuft über mehrere Zwischenschritte. So erfolgt die Reduktion von Nitrat zu molekularem Stickstoff bei der Nitratatmung:

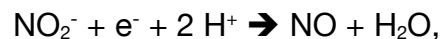


nicht als einstufige sondern als vierstufige Reaktion. Die einzelnen Zwischenstufen sind dabei:

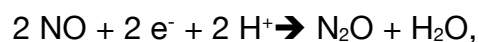
Nitratreduktion



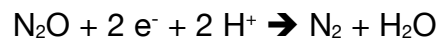
Nitritreduktion



NO-Reduktion



N<sub>2</sub>O-Reduktion



Darüber hinaus befinden sich einige der an der Reduktion von Nitrat beteiligten Enzymsysteme im Periplasma der Mikroorganismen. Sie sind somit im Gegensatz zu den membrangebundenen Reduktasen nicht direkt in die Atmungskette eingebunden [Zumft 1990; Zumft 1997].

Eine weitere Ursache für die verminderte Effizienz des Energiegewinns der anaeroben Atmung liegt in der Tatsache, dass einige Elektronenakzeptoren aktiv unter Verbrauch von Energie in das Zellinnere transportiert werden müssen. Der Elektronenakzeptor der aeroben Atmung O<sub>2</sub>, sowie das Reduktionsprodukt können dagegen die Cytoplasmamembran durch freie Diffusion überwinden.



Zu einer weiteren Verminderung der Energieausbeute kommt es, wenn beispielsweise bei der Nitratatmung die Reduktion aufgrund fehlender Enzymsysteme bei den Zwischenprodukten Nitrit oder Lachgas endet.

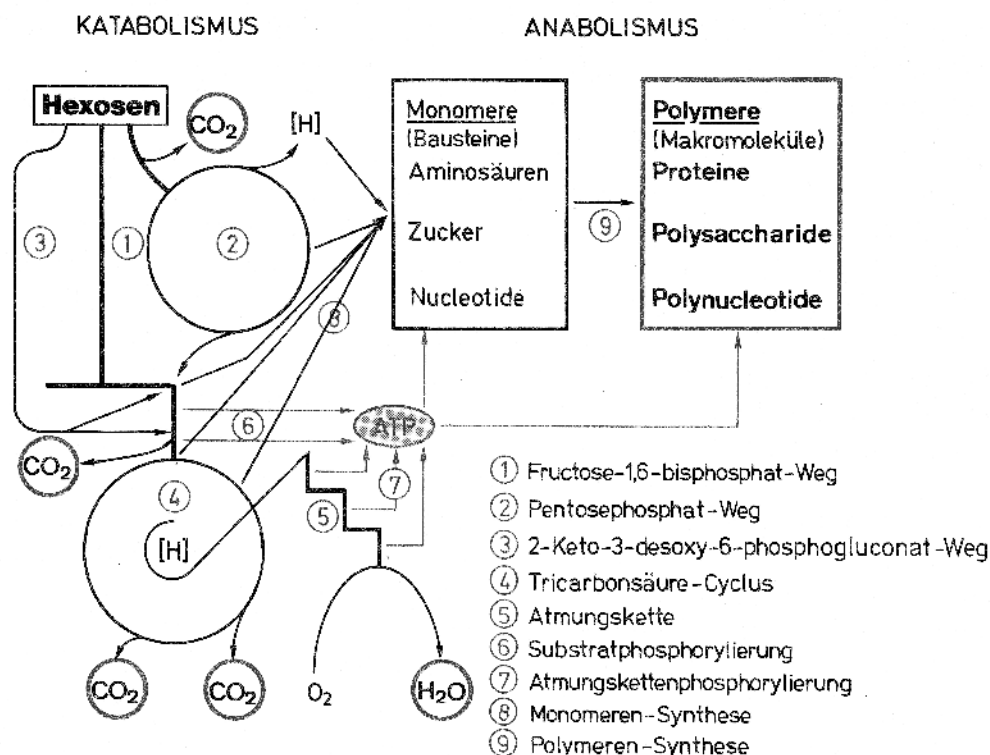
Die meisten Mikroorganismen bevorzugen daher Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor und sind somit fakultativ anaerob atmend. Dies bedeutet, dass auf alternative Elektronenakzeptoren erst zurückgegriffen wird, wenn der Sauerstoffgehalt in der Umgebung nur noch in geringer Menge vorliegt oder vollständig verbraucht ist. In fast allen Fällen kommt es sogar zu einer Repression der anaeroben Atmungssysteme durch Sauerstoff [Zumft 1997].

### **3.1.2 Chemoorganoheterotrophes Wachstum**

Als Heterotrophie werden diejenigen Ernährungstypen von Mikroorganismen bezeichnet, welche organische Verbindungen als Kohlenstoffquelle zum Zellaufbau nutzen. Häufig wird der Begriff heterotroph mit chemoorganoheterotroph gleichgesetzt. Chemoorganoheterotroph bezeichnet die am häufigsten auftretende Ernährungsform, bei der organische Kohlenstoffquellen sowohl dem Energiegewinn (als Elektronendonatoren), als auch der Biosynthese von Zellmasse dienen [Schlee und Kleber 1991].

Die Verwertung der organischen Substrate in der Zelle lässt sich vereinfacht in drei Abschnitte unterteilen. In einem ersten Abschnitt erfolgt der Abbau der Nährstoffe in kleinere Bruchstücke (Katabolismus). Bei diesem Abbau kann durch die so genannte Substratphosphorylierung, unabhängig von der Atmungskette, Energie in Form von ATP gewonnen werden.

Durch den Intermediärstoffwechsel (Amphibolismus) werden die Bruchstücke des Katabolismus zu niedermolekularen Substraten für den Zellaufbau umgesetzt. Im letzten Schritt werden aus den Makromolekülen Proteine, Nukleinsäuren, Zellwandbestandteile sowie Reservestoffe aufgebaut. Der Aufbau der niedermolekularen Substrate sowie deren weitere Umsetzung wird unter dem Begriff Anabolismus oder Synthesestoffwechsel zusammengefasst [Schlegel 1992]. Die Stoffwechselwege des Katabolismus sowie des Anabolismus sind eng miteinander verknüpft. In Abbildung 3.1 ist der Zusammenhang zwischen Katabolismus und Anabolismus dargestellt.



**Abb. 3.1** Hauptschritte des Katabolismus sowie des Anabolismus des chemoorganoheterotrophen Stoffwechsels [aus Schlegel 1992]

Eine zentrale Bedeutung bei der Bereitstellung von Intermediaten für den Zellaufbau sowie bei der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (NADH) für die Atmungskette hat der Tricarbonsäure-Zyklus (oder auch Zitronensäure-Zyklus genannt). Als organische Kohlenstoffquellen können neben Hexosen, wie Glukose, Fruktose oder Galactose, auch organische Säuren (z.B. Essigsäure), Alkohole (z.B. Ethanol oder Methanol) oder aromatische Verbindungen z.B. Benzol) umgesetzt werden [Präve et al. 1994].

Einige Mikroorganismen sind nicht in der Lage, alle für das Zellwachstum benötigten Makromoleküle, wie zum Beispiel Aminosäuren oder Vitamine, aus der bereitgestellten Kohlenstoffquelle zu synthetisieren. Dieses Phänomen wird als Auxotrophie bezeichnet [Schlee und Kleber 1991]. Die zum Wachstum benötigten Verbindungen müssen daher von den Organismen aus der Umgebung aufgenommen werden.

Auch nicht auxotrophe Mikroorganismen sind jedoch in der Lage Aminosäuren oder Vitamine aufzunehmen und in den Anabolismus einzuschleusen.

### 3.1.3 Chemolithoautotrophes Wachstum

Chemolithoautotrophie bezeichnet eine weitere Ernährungsart von Mikroorganismen. Dabei wird als Lithotrophie die Fähigkeit der Mikroorganismen bezeichnet, anorganische Verbindungen oder Ionen als Elektronendonatoren für den Energiegewinn zu nutzen. Elektronendonatoren für den lithotropen Energiegewinn sind dabei unter anderem Wasserstoff, molekularer Schwefel, Ammonium oder Thiosulfat [Präve et al. 1994].

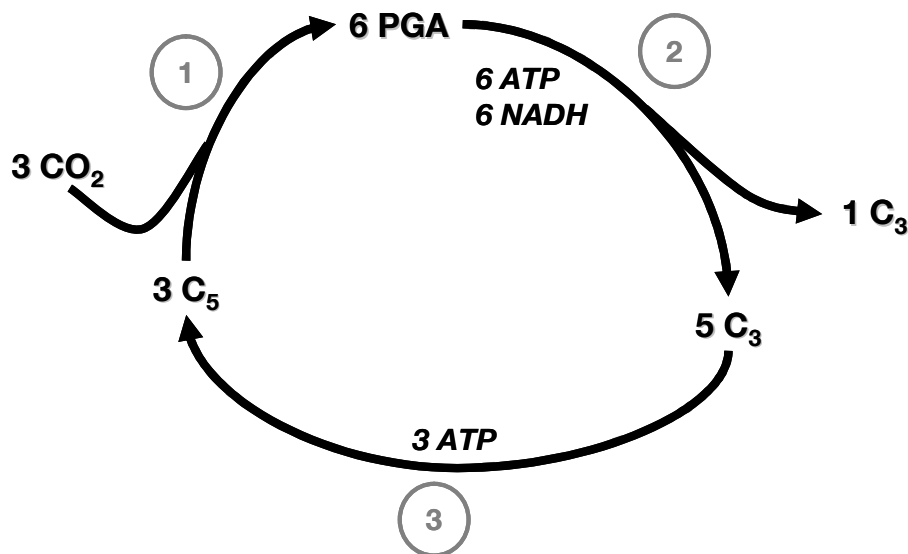
Mikroorganismen, welche den Energiegewinn durch Oxidation von Wasserstoff sowie durch Reduktion von Sauerstoff vollziehen, werden auch als Knallgasbakterien bezeichnet. Die Oxidation von Wasserstoff kann hierbei von zwei Hydrogenasen durchgeführt werden. Die am weitesten verbreitete Hydrogenase ist ein membrangebundenes Enzym, welches direkt innerhalb der Atmungskette an der Energiegewinnung in Form von ATP beteiligt ist. Einige Mikroorganismen verfügen darüber hinaus über eine weitere, im Cytoplasma gelöste, Hydrogenase, welche über die Bildung des Cosubstrats NADH zum Energiegewinn beiträgt. Mikroorganismen, welche über beide Hydrogenasen verfügen, weisen eine höhere Biomasseausbeute pro Mol verwertetem Wasserstoff auf, als Mikroorganismen, welche nur über das membrangebundene Enzym verfügen [Lengler et al. 1999].

Darüber hinaus sind die meisten Knallgasbakterien fakultativ autotroph [Lengler et al. 1999]. Autotrophie bezeichnet die Fähigkeit von Mikroorganismen mit  $\text{CO}_2$  als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dies bedeutet  $\text{CO}_2$  zu fixieren, um daraus alle für das Zellwachstum benötigten organischen Bausteine zu synthetisieren [Schlee und Kleber 1991].

Es sind vier verschiedene Mechanismen zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung bei Mikroorganismen bekannt. Der so genannte Calvin-Zyklus, der reduktive Citratzyklus, der reduktive Acetyl-CoA-Weg sowie der 3-Hydroxypropionat Zyklus.

Der am weitesten verbreitete, jedoch auch energetisch aufwendigste Mechanismus zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung, ist der Calvin-Zyklus (oder auch als Calvin-Benson-Bassham Zyklus, sowie reduktiver Pentosephosphat-Zyklus genannt). Dieser Assimilationsweg wird beispielsweise auch von den meisten Knallgasbakterien genutzt.

In Abbildung 3.2 ist der Ablauf der einzelnen Reaktionsschritte des Calvin-Zyklus schematisch dargestellt. Dabei lassen sich die Reaktionen der Kohlendioxidfixierung in drei Abschnitte unterteilen.

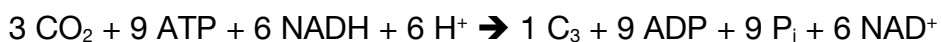


**Abb. 3.2 Schematischer Ablauf der  $\text{CO}_2$ -Fixierung im Calvin-Zyklus [nach Lengler et al. 1999]**  
 (PGA = Phosphoglycerat;  $\text{C}_3$  = Glycerinaldehyd-3-Phosphat;  $\text{C}_5$  = Ribulose-1,5-bisphosphat;  
 1 = Carboxylierungsreaktion ; 2 = GAP-Synthese; 3 = Regeneration des Akzeptormoleküls)

In einem ersten Schritt wird  $\text{CO}_2$  durch das Enzym Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (RuBisCo) irreversibel, unter Bildung von zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat (PGA), an Ribulose-1,5-bisphosphat ( $\text{C}_5$ ) gebunden. Diese Reaktion wird auch Carboxylierungsreaktion genannt.

In der Folgereaktion werden die zwei PGA-Moleküle durch Verbrauch von Energie (ATP) sowie Reduktionsäquivalenten (NADH) durch die Enzyme 3-Phosphoglyceratkinase sowie Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase zu zwei Molekülen Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP;  $\text{C}_3$ ) reduziert. Eines der beiden Reaktionsprodukte kann im Anschluss zur Synthese von Zellbestandteilen weiterverarbeitet werden, wohingegen das zweite Molekül für den dritten Schritt des Calvin-Zyklus, der energieaufwendigen Regeneration des  $\text{CO}_2$ -Akzeptormoleküls Ribulose-1,5-bisphosphat benötigt wird. Zur Bildung eines  $\text{C}_3$ -Moleküls als Grundbaustein für den Anabolismus der Zelle muss somit der Calvin-Zyklus dreimal durchlaufen werden.

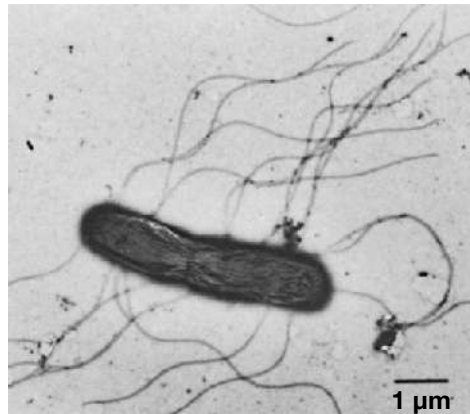
Die Fixierung von  $\text{CO}_2$  über den Calvin-Zyklus lässt sich mit der Gleichung:



zusammenfassen [Lengler et al. 1999]

### 3.2 Der Mikroorganismus *Cupriavidus necator*

*Cupriavidus necator* (frühere Namen: *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha*; *Alcaligenes eutrophus* oder *Hydrogenomonas eutropha* [Vandamme und Coeny 2004; Vaneechouette et al. 2004; Yabuuchi et al. 1995; Davis et al. 1969]) ist ein gram-negatives Bakterium, welches phylogenetisch der  $\beta$ -Subklasse der Proteobakterien angehört. *Cupriavidus necator* ist ein fakultativ chemolithoautotropher, fakultativ nitratatmender Mikroorganismus, welcher unter bestimmten limitierenden Wachstumsbedingungen das Biopolymer Polyhydroxybuttersäure (PHB) als Speicherstoff synthetisiert. Die Kolonien des Bakteriums sind weiß oder cremefarben. Das stäbchenförmige Bakterium hat eine Größe von  $0,5 \times 1,8-2,6 \mu\text{m}$  und besitzt 1-14 gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilte Flagellen (siehe Abbildung 3.3) [Aragno und Schlegel 1991]



**Abb. 3.3** *Cupriavidus necator* H16 [Aragno et al. 1977]

Von der Art *Cupriavidus necator* sind mehrere Wildtyp-Stämme bekannt. Dabei wurde der Stamm H16 (DSM428; ATCC 17699; NCIB 10442) am häufigsten untersucht. Der Stamm enthält ein selbst übertragendes Megaplasmid (pHG1), welches zusätzlich zur chromosomalen DNA Enzyme, sowohl für den chemolithoautotrophen Stoffwechsel, als auch für die Nitratatmung enthält [Schwartz et al. 2003].

*Cupriavidus necator* H16 wurde 1961 von Wilde unter chemolithoautotrophen Bedingungen isoliert [Wilde 1962]. Dieser Stamm dient als Modellorganismus zur Untersuchung der Hydrogenaseaktivität, der  $\text{CO}_2$ -Fixierung, der Enzymsysteme der Nitratatmung, sowie der Speicherstoffsynthese von PHB. Aufgrund der vielfältigen verfügbaren Daten dieses Modellorganismus auf reaktionstechnischer, molekularbiologischer als auch genetischer Ebenen beziehen sich die Erläuterungen zu den verschiedenen Stoffwechselarten, sofern nicht explizit

anders beschrieben, in den folgenden Kapiteln auf Ergebnisse aus Untersuchungen mit *Cupriavidus necator* H16.

*Cupriavidus necator* kann alle für das Wachstum benötigten Cofaktoren, Aminosäuren, Vitamine und Proteine *de novo*, also aus einfachen Kohlenstoffverbindungen, synthetisieren. Lediglich das Coenzym B12 (Vitamin B12) kann nicht *de novo* synthetisiert werden. *Cupriavidus necator* ist jedoch in der Lage dieses Coenzym sowie dessen Vorstufen aus dem Medium aufzunehmen. Liegt kein Vitamin B12 im Medium vor, so ist der Organismus in der Lage Coenzym B12 abhängige Reaktionen zu umgehen [Pohlmann et al. 2006].

### 3.2.1 Heterotrophes Wachstum

*Cupriavidus necator* ist in der Lage auf Basis einer Vielzahl an Zuckern, sowie organischen Säuren, chemoorganoheterotroph zu wachsen. Dazu gehören unter anderem Fruktose, Gluconsäure, Essigsäure, Zitronensäure, Formiat, sowie Succinat, nicht aber Glukose [Aragno und Schlegel 1991].

Es ist lediglich ein Stamm von *Cupriavidus necator* bekannt, welcher Glukose als Kohlenstoffquelle nutzt. Dieser Stamm H16 G<sup>+</sup> (DSM 538) wurde als Mutante von H16 nach Langzeitexperimenten im Chemostaten isoliert [König und Schlegel 1968].

Die Verwertung von Fruktose bei *Cupriavidus necator* H16 verläuft über den Entner-Doudoroff-Weg, auch 2-Keto-3-desoxy-phosphogluconat-Weg oder KDPG-Weg genannt (vgl. Abbildung 3.1) [Gottschalk et al. 1964]. Der Transport von Fruktose wird hierbei von einem energieabhängigen ABC-Transporter gewährleistet [Pohlmann et al. 2006].

Der Abbau von Fruktose bei *Cupriavidus necator* über den Entner-Doudoroff-Weg wird durch die Anwesenheit von molekularem Wasserstoff im Reaktionsmedium reprimiert. Wasserstoff inhibiert dabei sowohl die Synthese der Enzyme des Abbaufweges, als auch, bei bereits aktivem Abbaufweg, die Enzyme des Fruktosestoffwechsels an sich. Darüber hinaus wirkt Wasserstoff inhibierend auf die heterotrophe Verwertung von Zitronensäure, Gluconsäure oder Formiat [Blackkolb und Schlegel 1968].

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Inhibition des heterotrophen Abbaufweges in Anwesenheit von Wasserstoff, sind die Enzyme des

chemolithoautotrophen Stoffwechsels während des heterotrophen Wachstums aktiv. So können hohe Enzymaktivitäten (diese sind vergleichbar mit den Aktivitäten chemolithoautotroph gewachsener Zellen) der Wasserstoffoxidation, sowie der CO<sub>2</sub>-Fixierung nach dem heterotrophen Wachstum mit Formiat, Fruktose, Glycerin oder Zitronensäure nachgewiesen werden. Dienen Succinat oder Pyruvat als heterotrophe Kohlenstoffquellen kann keine Aktivität der chemolithoautotrophen Enzymsysteme nachgewiesen werden [Friedrich et al. 1981].

Darüber hinaus sind nahezu alle bekannten Stämme von *Cupriavidus necator* fähig, aromatische Verbindungen wie beispielsweise Benzol, Phenol oder Hydroxybenzoesäure als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen [Johnson und Stanier 1971]. *Cupriavidus necator* ist daher Gegenstand von Untersuchungen zum Einsatz als Biokatalysator für die Reinigung Aromatenverunreinigter industrieller Abwässer [Ampe et al. 1996].

Wachstumsstudien in mineralischen Salzmedium (ohne Zugabe wachstumsfördernder Aminosäuren oder Vitamine) haben gezeigt, dass *Cupriavidus necator* in der Lage ist, mit Fruktose als Kohlenstoff- und Energiequelle, sowie mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor mit einer maximalen Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) von 0,31 h<sup>-1</sup> zu wachsen. Die Sättigungskonzentration (K<sub>s</sub>) für Fruktose betrug dabei 0,06 g L<sup>-1</sup>. Der Ertragskoeffizient wurde zu 0,43 bestimmt [König und Schlegel 1968]. Die maximalen heterotrophen Wachstumsraten anderer Kohlenstoffquellen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

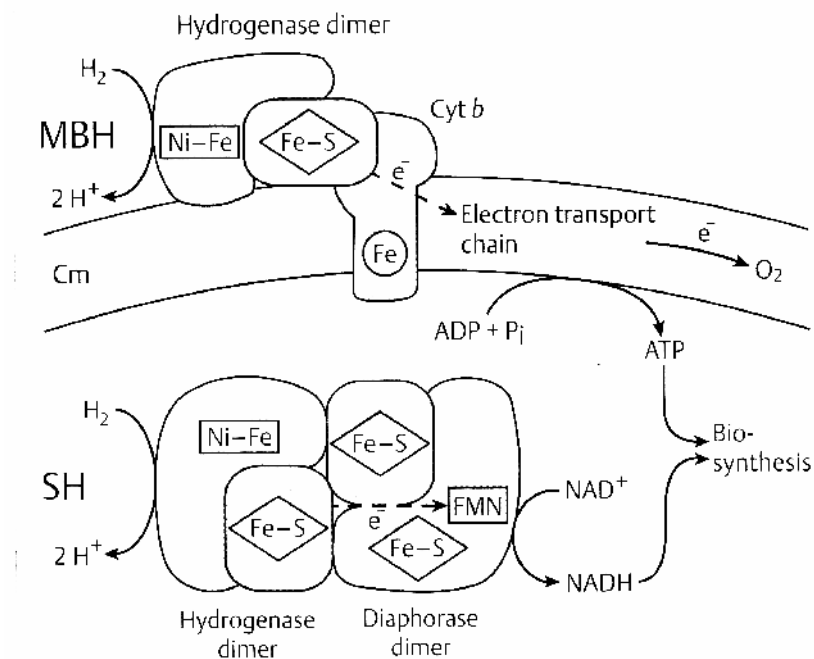
**Tab. 3.1 Maximale Wachstumsraten des heterotrophen Wachstums von *Cupriavidus necator* in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle [Friedrich et al. 1981]**

<b>Kohlenstoffquelle</b>	<b>maximale Wachstumsrate <math>\mu_{\max}</math> [h<sup>-1</sup>]</b>
Formiat	0,17
Glycerin	0,14
Gluconsäure	0,33
Zitronensäure	0,38
Pyruvat	0,46
Succinat	0,46
Essigsäure	0,46

### 3.2.2 Wasserstoff-Oxidation

Die Oxidation von Wasserstoff bei *Cupriavidus necator* verläuft über ein System von drei verschiedenen Hydrogenasen. Zwei Hydrogenasen sind direkt an der Energiegewinnung beteiligt, wohingegen einer dritten Hydrogenase eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird. Die regulatorische Hydrogenase ist für die Induktion der an der Energiegewinnung beteiligten Hydrogenasen verantwortlich, nachdem Wasserstoff detektiert wird [Burgdorf et al. 2005]. Die Gene für alle drei Hydrogenasen sind dabei auf dem Megaplasmid pHG1 von *Cupriavidus necator* kodiert [Hogrefe et al. 1984; Schwartz et al. 2003].

Die am Energiegewinn beteiligten Hydrogenasen lassen sich sowohl durch ihre Lokalisierung im Mikroorganismus, als auch durch ihre Funktion unterscheiden. Abbildung 3.4 zeigt die räumliche Anordnung sowie die Funktion der am Energiegewinn beteiligten Hydrogenasen von *Cupriavidus necator*.



**Abb. 3.4 Anordnung und Funktion der am Energiegewinn beteiligten Hydrogenasen von *Cupriavidus necator* [Lengler et al. 1999] (MBH = membrangebundene Hydrogenase; SH = im Cytoplasma gelöste Hydrogenase)**

Die erste der beiden am Energiegewinn beteiligten Hydrogenasen ist membrangebunden (MBH). Sie ist über ein Cytochrom (cyt *b*) in der Membran verankert. Die Cytochrom-Untereinheit des Enzyms ist darüber hinaus für die direkte Einbindung der Hydrogenase, über Ubichinon als Elektronenüberträger, in



die Atmungskette verantwortlich. Die membrangebundene Hydrogenase von *Cupriavidus necator* ist somit direkt am Energiegewinn in Form von ATP beteiligt [Bernhard et al. 1997; Lenger et al. 1999]. Das aktive Zentrum des Enzyms, an welchem die Wasserstoffoxidation erfolgt, befindet sich im Periplasma.

Die zweite Hydrogenase (SH) von *Cupriavidus necator* befindet sich in der löslichen Fraktion des Cytoplasmas. Diese Hydrogenase ist nicht direkt am Energiegewinn, in Form von ATP, durch Einbindung in die Atmungskette beteiligt. Das Enzym reduziert den Cofaktor  $\text{NAD}^+$  zu NADH. Dieser Cofaktor kann indirekt bei der Energiegewinnung durch Oxidation in der Atmungskette oder direkt bei der  $\text{CO}_2$ -Fixierung (vgl. Abschnitt 3.1.3 und 3.2.3) verwertet werden [Ahrens und Schlegel 1966; Lengler et al. 1999]. Die Sättigungskonzentration des isolierten Enzyms für Wasserstoff beträgt  $0,19 \text{ mmol L}^{-1}$  [Pfitzner et al. 1970]. Bei zellinterner Anhäufung des Reduktionsproduktes NADH kommt es zur Inhibition des Enzyms [Ahrens und Schlegel 1966].

Beide Hydrogenasen unterscheiden sich darüber hinaus durch ihre Bedeutung für das chemolithoautotrophe Wachstum von *Cupriavidus necator*. Mutanten, bei welchen die membrangebundene Hydrogenase durch Genmanipulation entfernt wurde, waren in der Lage mit vergleichbarer Geschwindigkeit zu wachsen wie der Wildtyp. Mutanten, welche nicht in der Lage waren die lösliche Hydrogenase zu exprimieren konnten nur noch mit stark verminderter Geschwindigkeit (etwa 30% des Wildtyps) wachsen [Hogrefe et al. 1984].

Im Gegensatz zu der membrangebundenen Hydrogenase ist das isolierte Enzym der löslichen Hydrogenase unter geeigneten Bedingungen in der Lage, die Rückreaktion der Wasserstoffoxidation, nämlich die Bildung von molekularem Wasserstoff aus Protonen, zu katalysieren. Aufgrund dieser Möglichkeit, sowie der Toleranz gegenüber Sauerstoff, wird diese Hydrogenase hinsichtlich ihres Potentials zur Verwendung bei der biotechnologischen Herstellung von Wasserstoff untersucht [Haverkamp et al. 1995; Burgdorf 2005].

Das aktive Zentrum der Wasserstoffoxidation beider Hydrogenasen besteht aus einem Nickel-Eisen-Zentrum. Diese Art von Hydrogenasen wird auch als [NiFe]-Hydrogenase bezeichnet. Die Enzymaktivität der isolierten, löslichen Hydrogenase kann durch  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen stimuliert werden [Ahrens und Schlegel 1966]. Das während des Wachstums von *Cupriavidus necator* aufgenommene Nickel wird fast ausschließlich für den Einbau in die Hydrogenasen verwendet. Eine Konzentration von kleiner  $0,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  Nickel im

Medium wirkt wachstumsstimulierend auf *Cupriavidus necator*. Höhere Konzentrationen hingegen wirken inhibierend. Die Aufnahme von Nickel in die Zelle erfolgt dabei über energieabhängige Transportproteine [Friedrich et al. 1987; Tabillion und Kaltwasser 1977; Lohmeyer und Friedrich 1987].

Die Regulation, sowie die Expression der beiden Hydrogenasen ist temperaturabhängig. Das Optimum, sowohl für die Bildung der Enzyme, als auch für deren Aktivität bei der Wasserstoffreduktion liegt bei 30°C [Friedrich und Friedrich 1983].

Unter chemolithoautotrophen Wachstumsbedingungen wurde die Sättigungskonzentration für Wasserstoff für den Stamm DSM 531 (ATCC 17697) zu 20,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , für den Streptomycin resistenten Stamm ATCC 17707 (keine DSM-Nummer bekannt) zu 4,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  bestimmt [Takeshita und Ishizaki 1996; Siegel und Ollis 1984].

Es ist dabei zu beachten, dass sich diese Werte auf den Organismus als lebende Zelle beziehen, also den Verbrauch an Wasserstoff aller drei Enzymsysteme berücksichtigen. Der Anteil der einzelnen beteiligten Enzyme kann durch solche formalkinetische Betrachtungen nicht identifiziert werden (vgl. Abschnitt 3.3).

### 3.2.3 CO<sub>2</sub>-Fixierung

Die Fixierung von CO<sub>2</sub> als einzige Kohlenstoffquelle bei *Cupriavidus necator* erfolgt über den Calvin-Zyklus. Die essentiellen Enzyme des Zyklus sind dabei sowohl auf dem Chromosom, als auch auf dem Megaplasmid pHG1 kodiert. Die Schlüsselenzyme der CO<sub>2</sub>-Fixierung von *Cupriavidus necator* über den Calvin-Zyklus sind dabei die Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (RuBisCo) für die Fixierung von CO<sub>2</sub>, sowie die Phosphoribulokinase (PRK) für die Regeneration des CO<sub>2</sub>-Akzeptormoleküls (vgl. Abschnitt 3.1.3). Als Elektronendonator für die autotrophe CO<sub>2</sub>-Fixierung von *Cupriavidus necator* kann Wasserstoff oder Formiat verwendet werden [Hirsch et al. 1963; Dijkhuizen und Harder 1984; Schäferjohann et al. 1996].

Das isolierte RuBisCo-Enzym besitzt eine Sättigungskonzentration für Kohlendioxid von 0.066  $\text{mmol L}^{-1}$  und wird von Sauerstoff inhibiert. Die kompetitive Inhibierung des Enzyms durch Sauerstoff ist auf seine Fähigkeit zurückzuführen neben CO<sub>2</sub> auch Sauerstoff zu oxidieren [Bowien et al. 1976].

Unter Wachstumsbedingungen wurde Bikarbonat, welches in wässriger Lösung mit Kohlendioxid im Gleichgewicht steht, als limitierend bestimmt. Die optimale Konzentration zur Vermeidung einer Limitierung des autotrophen Wachstums von *Cupriavidus necator* beträgt dabei  $0.66 \text{ mmol L}^{-1}$  [Repaske et al. 1971]. Unter Vernachlässigung des Kohlensäuregleichgewichts wurde die Sättigungskonzentration für  $\text{CO}_2$  von Takeshita und Ishizaki zu  $9,38 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  bestimmt [Takeshita und Ishizaki 1995].

Das Enzym PRK wird von Phosphoenolpyruvat, einem indirekten Reaktionszwischenprodukt des Calvin-Zyklus, inhibiert. Darüber hinaus wirkt Phosphoenolpyruvat ebenfalls inhibierend auf die Regulation der Gentranskription der Enzyme des Calvin-Zyklus. Der genaue Inhibitionsmechanismus von Phosphoenolpyruvat auf PRK, sowie auf die Gentranskription, ist bislang nicht geklärt. Es wird ein Mechanismus vermutet, welcher eng mit den jeweils vorherrschenden Energie- sowie Kohlenstoffzuständen des Organismus verbunden ist. Diese Theorie wird durch die Tatsache unterstützt, dass NADH sowohl auf die Enzymaktivität der Phosphoribulokinase, als auch auf die Gentranskription stimulierend wirkt [Leadbeater und Bowien 1983; Bowien und Kusian 2002].

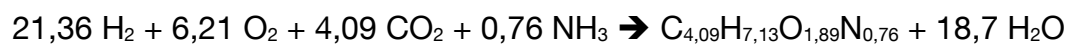
*Cupriavidus necator* ist darüber hinaus in der Lage einige organische Kohlenstoffquellen (z.B. Essigsäure) sowie  $\text{CO}_2$  simultan zu verwerten (mixotrophes Wachstum). Dabei wird jedoch die Aktivität der energieaufwendigen  $\text{CO}_2$ -Fixierung stark reduziert, so dass die Aufnahme und Verarbeitung der organischen Kohlenstoffquelle dominiert [DeCicco und Stukus 1968; Rittenberg und Goodman 1969; Leadbeater und Bowien 1983].

**Tab. 3.2 Maximale Wachstumsraten einiger Stämme von *Cupriavidus necator* unter chemolithoautotrophen Wachstumsbedingungen**

<b>Stamm</b>	<b>Maximale Wachstumsrate <math>\mu_{\text{Max}}</math> [<math>\text{h}^{-1}</math>]</b>	<b>Quelle</b>
DSM 428 (H16; ATCC 17699)	0,23	Sonnleitner et al. 1979
ATCC 17707	0,29-0,31	Siegel und Ollis 1984
Keine Angabe	0,35	Repaske und Mayer 1976
DSM 531 (ATCC 17697)	0,42	Ishizaki und Tanaka 1990

In Tabelle 3.2 sind die maximalen Wachstumsraten einiger Stämme von *Cupriavidus necator* unter chemolithoautotrophen, aeroben Bedingungen zusammengefasst. Unter chemolithoautotrophen Wachstumsbedingungen können somit vergleichbare Wachstumsraten wie unter chemoorganoheterotrophen Bedingungen erreicht werden (vgl. Tabelle 3.1).

Die Stöchiometrie des chemolithoautotrophen Wachstums von *Cupriavidus necator* DSM 531 wurde dabei von Ishizaki und Tanaka wie folgt bestimmt [Ishizaki und Tanaka 1990]:



### 3.2.4 Nitratatmung

*Cupriavidus necator* ist in der Lage, unter Sauerstoffausschluss (Sauerstoffpartialdruck geringer als 1%), Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor für die anaerobe Atmung zu nutzen. Der Organismus besitzt alle nötigen Enzyme, um Nitrat bis zur Endstufe Stickstoff vollständig zu reduzieren. Endprodukt der Nitratatmung von *Cupriavidus necator* ist neben molekularem Stickstoff auch zu einem geringen Teil Lachgas ( $\text{N}_2\text{O}$ ) [Pfztnner und Schlegel 1973; Sann et al 1994; Kester et al. 1997]. Abbildung 3.5 zeigt eine vereinfachte, schematische Darstellung der Anordnung, sowie der Funktion des Nitratatmungsenzymsystems von *Cupriavidus necator*.

Die Nitrat-Aufnahme in das Cytoplasma für den ersten Schritt der Nitratreduktion, sowie die Abgabe des Reduktionsproduktes Nitrit in das Periplasma, erfolgt über einen Nitrat/Nitrit-Antiporter. Der Mechanismus der Nitrataufnahme bei der Umstellung von Sauerstoffatmung auf Nitratatmung ist bislang nicht geklärt. Zu Beginn der Nitratatmung liegt noch kein Nitrit im Cytoplasma vor, so dass eigentlich kein Austausch durch den Antiporter vorgenommen werden kann [Pohlmann et al. 2006].

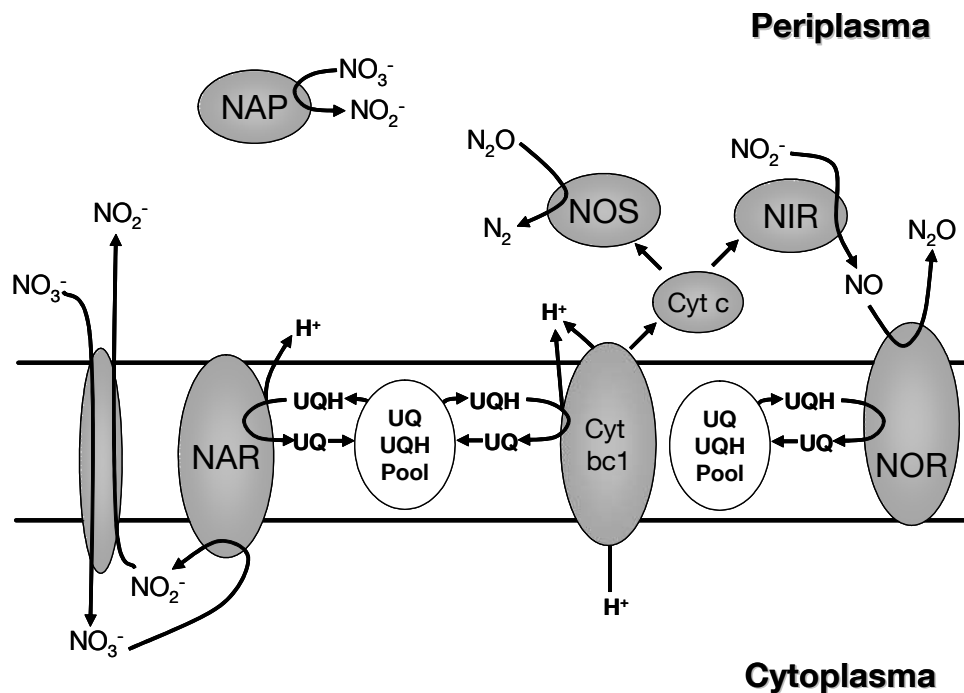


Abb. 3.5 Schematische Darstellung der Anordnung sowie der Funktion der Enzyme der Nitratatmung von *Cupriavidus necator* (NAP: periplasmatische Nitratreduktase; NAR: membrangebundene Nitratreduktase; NIR: Nitritreduktase; NOR: NO-Reduktase; NOS: N<sub>2</sub>O-Reduktase, UQ/H = Ubichinon oxidierte/reduzierte Form)

### Nitratreduktion

Nitrat kann von *Cupriavidus necator* durch drei verschiedene Nitratreduktasen zu Nitrit reduziert werden. Dabei sind lediglich zwei der vorliegenden Enzyme in den dissimilatorischen Prozess involviert. Eine dritte, im Periplasma vorliegende Nitratreduktase (NAS), dient der Nitratreduktion für die Stickstofffixierung (nicht in Abbildung 3.5 dargestellt). Dieses Enzym wird durch Ammonium, eine zusätzliche Stickstoffquelle, nicht aber durch Sauerstoff inhibiert [Warnecke-Eberz und Friedrich 1993].

Die beiden an der Nitratatmung beteiligten Enzyme unterscheiden sich sowohl durch ihre Lokalisation in der Zelle, als auch durch ihre Funktion. Das in der Cytoplasmamembran verankerte Nitratreduktase-Enzym (NAR) reduziert Nitrat zu Nitrit auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Diese Reduktase bezieht die für die Reduktion benötigten Elektronen direkt aus dem zellinternen Ubichinonpool der Atmungskette und wird durch Sauerstoff inhibiert. Die Expression des Enzyms erfolgt dabei nur unter der Anwesenheit von Nitrat. Das Enzym wird durch Gene, sowohl auf dem Chromosom, als auch auf dem

Megaplasmid pHG1 kodiert [Warnecke-Eberz und Friedrich 1993; Pohlmann et al. 2006].

Ubichinon als Elektronendonator für die membrangebundene NAR wird dabei beispielsweise von einer NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase in seine reduzierte Form (UQH) überführt. Diese Oxidoreduktase wiederum bezieht den Cofaktor NADH aus der Oxidation von Wasserstoff oder eines organischen Elektronendonators [Friedrich und Weiss 1997]. Bei der Reduktion von Nitrat gibt die membrangebundene NAR Protonen in das Periplasma ab und ist direkt an der Generierung eines Protonengradienten beteiligt. Dieser Protonengradient (auch Proton Motive Force, PMF, genannt) ist für die Speicherung der Energie der Zelle in Form von ATP verantwortlich [Zumft 1997; Moreno-Viván 1999].

Die zweite Nitratreduktase (NAP) von *Cupriavidus necator* befindet sich gelöst im Periplasma. Diese Nitratreduktase unterliegt keiner Inhibition durch Ammonium oder Sauerstoff. Die Expression des Enzyms erfolgt konstitutiv, unabhängig von der Art des terminalen Elektronenakzeptors. Die Aktivität des Enzyms steigt dabei unter aeroben Bedingungen während der stationären Phase, welche der Wachstumsphase folgt, stark an [Warnecke-Eberz und Friedrich 1993]. Die periplasmatische NAP wird im Gegensatz zur NAR ausschließlich durch Gene auf dem Megaplasmid pHG1 kodiert.

Der Elektronenüberträger, welcher Elektronen von der Atmungskette auf die NAP-Reduktase überträgt, sowie die genaue Funktion der Nitratreduktase während der Nitratatmung von *Cupriavidus necator*, sind bislang ungeklärt. Mutanten des Stammes H16, welche die periplasmatische Nitratreduktase, nicht aber die membrangebundene Nitratreduktase exprimieren konnten, waren nicht in der Lage mit Nitrat als Elektronenakzeptor zu wachsen. Mutanten hingegen, bei welchen die periplasmatische Nitratreduktase entfernt wurde, erreichten mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor vergleichbares Wachstum wie der Wildtyp. Es kam lediglich zu einer Verlängerung der stationären Phase bei der Umstellung von Sauerstoffatmung auf Nitratatmung. Die periplasmatische Nitratreduktase scheint daher eine Funktion bei der Umstellung von aeroben auf anaerobe Verhältnisse zu übernehmen. Darüber hinaus wird eine Funktion des Enzyms bei einem Ausgleich ungünstiger Redoxzustände der Zelle diskutiert [Siddiqui et al. 1993; Warnecke-Eberz und Friedrich 1993; Zumft 1997].

### **Nitritreduktion**

Der zweite Schritt der Nitratatmung, die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid (NO), wird bei *Cupriavidus necator* durch die so genannte Cytochrom cd1-Nitritreduktase (NIR) katalysiert. Diese Reduktase befindet sich gelöst im Periplasma der Zelle und erhält seine Elektronen indirekt aus der Atmungskette [Siddiqui et al. 1993]. Dabei werden die Elektronen zunächst aus dem Ubichinonpool über den Cytochrom bc1-Komplex, auf ein c-Cytochrom übertragen. Dieses c-Cytochrom, im Falle der NIR das Cytochrom c-552, überträgt anschließend die Elektronen auf die NIR. Die Übertragung der Elektronen über den bc1-Komplex führt dabei zum Aufbau eines Protonengradienten [Stuthamer et al. 1982; Ferguson 1987].

Das Enzym NIR wird bei *Cupriavidus necator* durch Gene auf dem Megaplasmid pHG1 kodiert. Die Induktion der Enzymexpression erfolgt nur unter Anwesenheit von Nitrit, sowie unter Sauerstoffausschluss. Die Cytochrom cd1-Nitritreduktase besitzt in isolierter Form eine Sättigungskonzentration für Nitrit von 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$  [Rees et al. 1997; Sann et al. 1994].

### **NO-Reduktion**

Das toxische Zwischenprodukt Stickstoffmonooxid (NO), welches ein Radikal darstellt, kann bei *Cupriavidus necator* durch zwei membrangebundene NO-Reduktasen (NOR) zu Lachgas ( $\text{N}_2\text{O}$ ) reduziert werden. Eines der beiden Enzyme, NORB, wird dabei durch Gene auf dem Megaplasmid pHG1 kodiert, wohingegen das zweite Enzym, NORZ durch Gene auf dem Chromosom kodiert wird. Die beiden Enzyme sind sich dabei zu 87% identisch und können sich gegenseitig ersetzen. Mutationsstudien haben gezeigt, dass eines der beiden Enzyme ausreichend ist, um wildtypspezifische Wachstumsraten zu erreichen [Cramm et al. 1997]. Die Induktion der Enzymexpression wird dabei durch die Anwesenheit von NO reguliert [Pohlmann et al. 2000; Cramm et al. 2006]. Untersuchungen mit der NO-Reduktase NORB deuten darauf hin, dass Ubichinon als Elektronendonator für die Stickstoffmonoxidreduktion fungiert [Cramm et al. 1999].

### ***N<sub>2</sub>O-Reduktion***

Der letzte Schritt der Nitratatmung, die Reduktion von Lachgas (N<sub>2</sub>O) zu molekularem Stickstoff erfolgt bei *Cupriavidus necator* durch ein im Periplasma gelöstes Enzym (NOS). Die Gene für dieses Enzym sind ebenfalls auf dem Megaplasmid des Organismus pHG1 kodiert [Zumft et al. 1992, Bernhard et al. 2000]. Die genaue Funktion, sowie die Art des Elektronendonators dieses Enzyms, wurden bei *Cupriavidus necator* noch nicht untersucht. N<sub>2</sub>O-Reduktasen anderer, nitratatmender Bakterien, z.B. *Paracoccus denitrificans*, erhalten ihre Elektronen durch c-Cytochrome [Zumft 1997].

### ***Wachstum mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor***

Neben den Enzymen zur Nitratatmung besitzt *Cupriavidus necator* eine spezielle Ribonukleotidreduktase. Ribonukleotidreduktasen sind essentiell an der DNA-Synthese beteiligt und somit unverzichtbar für das Wachstum von Mikroorganismen. Mutanten von *Cupriavidus necator*, welche nicht in der Lage waren, die anaerobe Ribonukleotidreduktase zu exprimieren, konnten sich während der Nitratatmung nicht mehr teilen und bildeten lange Filamente. Die Gene für die anaerobe Ribonukleotidreduktase befinden sich ebenfalls auf dem Megaplasmid pHG1 [Siedow et al. 1999; Pohlmann et al 2006].

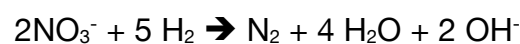
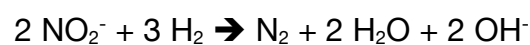
Das Wachstum von *Cupriavidus necator* H16 unter Nitratatmungsbedingungen wurde erstmals von Pfitzner und Schlegel untersucht [Pfitzner und Schlegel 1973]. Für die heterotrophe Nitratatmung wurde ein pH-Optimum zwischen 7,5 und 7,9 beobachtet. Darüber hinaus beginnt das anaerobe Wachstum erst nach einer ausgeprägten stationären Phase, sofern als Inokkulum aerob gewachsene Zellen verwendet wurden. In der ersten Wachstumsphase kommt es zu einer Akkumulation des Zwischenproduktes Nitrit im Medium. Mit Erreichen der maximalen Nitritkonzentration wurde eine weitere stationäre Phase durchlaufen. Es wird angenommen, dass zu Beginn des Wachstums vorwiegend Nitrat veratmet wird, da Nitrat eine inhibierende Wirkung auf die Nitritreduktion besitzt, und die Expression der Nitratreduktase erst langsam nach der Induktion durch das gebildete Nitrit verläuft. Wurde anstelle von Fruktose Wasserstoff als Elektronendonator, sowie Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle eingesetzt, kam es zu einer starken Verringerung der Wachstumsrate sowie des Zellertrags. Diese Untersuchungen erfolgten ohne pH-Regelung sowie ohne kontinuierliche Begasung mit Wasserstoff und Kohlendioxid [Pfitzner und Schlegel 1973].



Von industriellem Interesse ist die Nitratatmung unter chemolithoautotrophen Bedingungen für die Nitratentfernung aus Trinkwasser. Vor diesem Hintergrund wurden Studien mit auf gasdurchlässigen Membranen immobilisierten Zellen durchgeführt. Die Versorgung der Mikroorganismen mit Wasserstoff sowie Kohlendioxid erfolgt hierbei über Gasdiffusion durch die Membran. Unter chemolithoautotrophen Bedingungen konnten mit immobilisierten *Cupriavidus necator* H16–Zellen (DSM428) Nitratverbrauchsdaten von bis zu  $11,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht werden [Chang und Tseng 1998; Chang et al. 1999; Ho et al. 2001].

Studien zur chemolithoautotrophen Nitratentfernung wurden darüber hinaus mit immobilisiertem *Cupriavidus necator* DSM 531 durchgeführt. Bei den Untersuchungen mit diesem Stamm wurde der Bioreaktor jedoch nur anfänglich mit einer Reinkultur besiedelt. Im Verlauf der Experimente wurde aufgrund inesteriler Bedingungen die Ausbildung einer Mischkultur zugelassen. *Cupriavidus necator* diente hier lediglich als Startkultur [Lee und Rittmann 2000; Nerenberg 2005].

Die Nitratatmung von *Cupriavidus necator* unter den oben beschriebenen Bedingungen kann zu einem zweistufigen Prozess vereinfacht werden. Die erste Stufe ist die Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Die zweite Stufe ist die anschließende Reduktion von Nitrit zu molekularem Stickstoff. Die Akkumulation von weiteren Zwischenprodukten wird hierbei nicht berücksichtigt, so dass die Stöchiometrie für diesen zweistufigen Prozess wie folgt dargestellt werden kann [Kurt et al. 1987]:



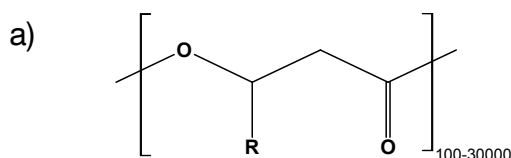
Aufgrund der immobilisierten Biomasse der beschriebenen Untersuchungen sind jedoch keine Daten bezüglich zellspezifischer Aufnahmeraten, Sättigungskonzentrationen, sowie Wachstumsraten verfügbar. Reaktionstechnische Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung unter definierten Bedingungen mit suspendierter Biomasse sind nicht bekannt.

### 3.2.5 Produktion von PHB

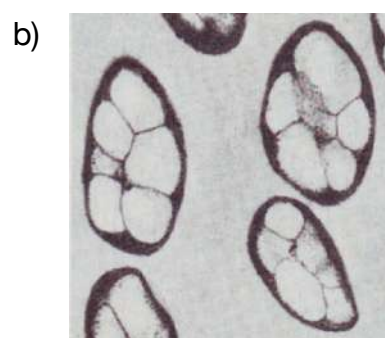
Unter wachstumslimitierten Bedingungen ist *Cupriavidus necator* in der Lage bei gleichzeitigem Überschuss einer Kohlenstoffquelle, diesen Kohlenstoff in Form von Polyhydroxybutyrat (PHB) bis zu einem Gewichtsanteil von über 80% zu fixieren [Sonnleitner et al. 1979; Du et al. 2001; Tanaka et al. 1994].

Polyhydroxybutyrat gehört zur Gruppe der Polyhydroxyalkanoate (siehe Abbildung 3.6a), welche von einer Vielzahl von Bakterien als Speicherstoff akkumuliert werden kann. Polyhydroxyalkanoate werden auch als Biopolymere oder Bioplastik bezeichnet. Solche Biopolymere besitzen im Gegensatz zu herkömmlichen, synthetischen Polymeren den Vorteil, dass sie vollständig biologisch abbaubar sind und darüber hinaus nicht aus Erdöl, sondern aus nachwachsenden Substraten (z.B. Zucker) synthetisiert werden. Biopolymere besitzen des Weiteren vergleichbare thermoplastische Eigenschaften wie herkömmliche Kunststoffe und können unter anderem zur Produktion von Kunststoffbehältern, Rasierern oder in der Medizintechnik eingesetzt werden. Biologisch mit Hilfe von *Cupriavidus necator* hergestelltes PHB wird von der Firma Zeneca unter dem Namen Biopol® vertrieben. Ein Nachteil der biologisch hergestellten Biopolymere sind die immer noch hohen Produktionskosten im Vergleich zu herkömmlichen Kunststoffen [Lee 1996; Steinbüchel und Fuchtenbusch 1998; Choi und Lee 1999; Ishizaki et al. 2001; Reddy et al. 2003].

Wachstumslimitierende Bedingungen, unter welchen *Cupriavidus necator* vermehrt PHB bildet sind unter anderem Limitierung durch eine externe Stickstoff- oder Phosphatquelle, sowie die Limitierung durch Sauerstoff. Durch die Anhäufung von PHB bilden sich zellinterne Granula (Abbildung 3.6b) [Schlegel et al. 1961; Walther-Maruchat et al. 1977; Ishizaki und Tanaka 1991].



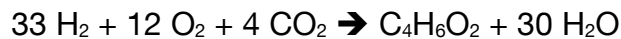
R-Gruppe	Name
CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxybutyrat)
CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Poly(3-Hydroxyvalerat)
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Poly(3-hydroxyhexanoat)



**Abb. 3.6 a) Strukturformeln einiger Polyhydroxyalkanoate (PHA) [nach Lee 1996]; b) *Cupriavidus necator* mit zellinternem PHB [aus Schlegel 1992]**

*Cupriavidus necator* bildet dabei PHB nicht nur unter limitierenden Bedingungen, sondern auch in geringerem Anteil während des nicht limitierten Wachstums. Der zellinterne PHB-Gehalt kann hierbei bis zu 10% des Gesamtgewichtes der Biotrockenmasse betragen [Du et al. 2001].

Die Stöchiometrie der PHB-Produktion von *Cupriavidus necator* DSM 531 unter chemolithoautotrophen, sauerstofflimitierten Bedingungen folgt der Gleichung:



Die Summenformel  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$  steht für das gebildete PHB. Der Wasserstoffbedarf während der PHB-Produktion ist höher im Vergleich zum unlimitierten Wachstum unter gleichen Bedingungen (vgl. Abschnitt 3.2.3) [Ishizaki und Tanaka 1991].

Bei der biotechnologischen Produktion von PHB durch *Cupriavidus necator* wird zwischen zwei Phasen unterschieden. In einer ersten nährstoffreichen Phase erfolgt unlimitiertes Wachstum zur Bereitstellung ausreichend hoher Zelldichten. Eine zweite, limitierte Phase dient der Produktion des Biopolymers. Erfolgt Wachstum sowie Produktion in einem einfachen Satzverfahren, beginnt die Produktionsphase, sobald eines der Medienbestandteile (zumeist Ammonium) limitierend wird. Die Biomassezunahme ist dann nur auf die Zunahme an PHB zurückzuführen, nicht aber auf die Zunahme der Zellzahl [Heinzle und Lafferty 1980].

In einem zweistufigen Prozess, welcher eine aerobe Wachstumsphase mit Fruktose als Kohlenstoffquelle und eine anschließende Produktionsphase unter chemolithoautotrophen, sauerstofflimitierten Bedingungen umfasst, konnte eine PHB-Produktivität von bis zu  $0,56 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht werden. Der PHB-Gehalt der Zellen betrug hierbei 82%. Eine weitere Erhöhung der PHB-Produktivität auf  $0,91 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  führte zu einer Abnahme des PHB-Gehaltes auf 56% [Tanak und Ishizaki 1994].

Durch geeignete Auswahl der Kohlenstoffquelle, beziehungsweise der Kohlenstoffquellen-Zusammensetzung, kann die Zusammensetzung des von *Cupriavidus necator* synthetisierten Biopolymers beeinflusst werden. So kann durch den zusätzlichen Einsatz von Propionsäure oder Pentansäure ein Polymer gewonnen werden, welches nicht ausschließlich aus 3-Hydroxybutyrat-Monomeren aufgebaut ist, sondern zusätzlich 3-Hydroxyvalerat-Bausteine enthält [Squio et al 2003; Pederson et al. 2006].

Darüber hinaus kann die Biopolymerzusammensetzung durch gezielten Eingriff auf die Biosynthesewege des Organismus beeinflusst werden. Als Basis für dieses gezielte Polymerdesign soll das erst kürzlich vollständig entschlüsselte Genom von *Cupriavidus necator* H16 dienen [Pohlmann et al. 2006, Nomura und Taguchi 2007].

### **3.3 Reaktionstechnische Beschreibung des mikrobiellen Wachstums**

#### **3.3.1 Massenbilanzen**

Reaktorsysteme in der Chemie- oder Bioverfahrenstechnik können mathematisch durch Stoff- und Energiebilanzen beschrieben werden. Die Bilanzierung der zeitlichen Änderung der Zustandsgrößen erfolgt mittels Festlegung eines Bilanzraumes. Wird das Reaktionssystem als idealer, isothermer Reaktor angesehen, ist die Stoffbilanz zur Beschreibung des Reaktionssystems ausreichend. Ein Reaktor wird als ideal angesehen, wenn folgende Eigenschaften erfüllt werden:

- Isotherm

Die für die Reaktion benötigte, beziehungsweise die durch die Reaktion erzeugte Wärme, kann ausreichend schnell zu- und abgeführt werden, so dass zeitliche sowie räumliche Temperaturkonstanz herrscht.

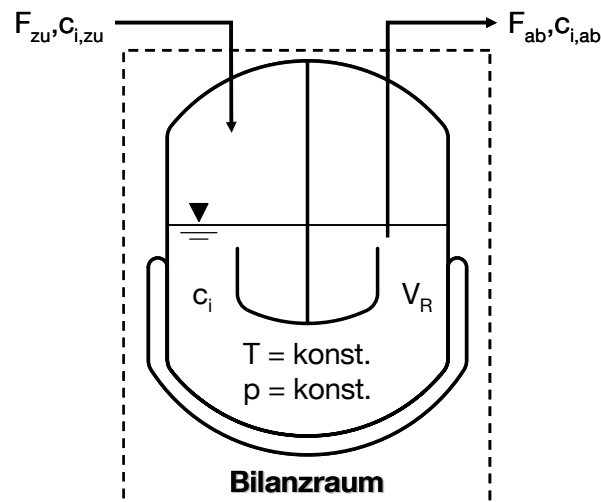
- Isobar

Der Druck ist während der Reaktionszeit im gesamten Bilanzraum konstant.

- Ideale Durchmischung

Sofortige, vollständige Durchmischung des Reaktionsgemisches, so dass keine Konzentrationsgradienten im Reaktor auftreten. Zeitliche Änderungen der Konzentration sind von der Betriebsweise des Reaktors abhängig.

Viele reale Reaktoren kommen in ihrem Verhalten dem idealen Grundtyp sehr nahe [Baerns et al. 1992]. Der am häufigsten in der Bioverfahrenstechnik eingesetzte Reaktortyp ist der ideale Rührkesselreaktor. Abbildung 3.7 zeigt das Grundschemata eines solchen Reaktors.



**Abb. 3.7** Grundschemata des idealdurchmischten, isothermen Rührkesselreaktor ( $F$  = Volumenstrom [ $L h^{-1}$ ];  $c_i$  = Konzentration der Komponente  $i$  [ $mol L^{-1}$ ];  $V_R$  = Reaktionsvolumen [ $L$ ];  $T$  = Temperatur [ $K$ ];  $p$  = Druck [ $Pa$ ])

Die Stoffbilanz einer Komponente  $i$  im idealen, isothermen Rührkesselreaktor lässt sich wie folgt beschreiben:

$$\left[ \begin{array}{l} \text{Zeitliche Änderung der} \\ \text{Komponente } i \text{ im Bioreaktor} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{l} \text{Zufluss der} \\ \text{Komponente } i \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{l} \text{Abfluss der} \\ \text{Komponente } i \end{array} \right] \pm \left[ \begin{array}{l} \text{Bildung / Verbrauch} \\ \text{der Komponente } i \end{array} \right]$$

Die mathematische Beschreibung dieser formalen Zusammenhänge ist in Gleichung 3.1 dargestellt.

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{zu} \cdot c_{i,zu} - F_{ab} \cdot c_{i,ab} \pm r_i \cdot V_R \quad \text{Gl. 3.1}$$

mit:

- $V_R$  = Reaktionsvolumen [ $L$ ]
- $c_i$  = Konzentration der Komponente  $i$  im Medium [ $mol L^{-1}$ ]
- $F_{zu}$  = Volumenstrom des Zufluss [ $L h^{-1}$ ]
- $c_{i,zu}$  = Konzentration der Komponente  $i$  im Zufluss [ $mol L^{-1}$ ]
- $F_{ab}$  = Volumenstrom des Abfluss [ $L h^{-1}$ ]
- $c_{i,ab}$  = Konzentration der Komponente  $i$  im Abfluss [ $mol L^{-1}$ ]
- $r_i$  = Bildungs- bzw. Verbrauchsgeschwindigkeit der Komponente  $i$  im Bioreaktor [ $mol L^{-1} h^{-1}$ ]

Mit Hilfe der Produktregel lässt sich Gleichung 3.1 umformen zu:

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} + c_i \cdot \frac{dV_R}{dt} = F_{zu} \cdot c_{i,zu} - F_{ab} \cdot c_{i,ab} \pm r_i \cdot V_R \quad \text{Gl. 3.2}$$

Aufgrund der idealen Durchmischung des Reaktors ist:

$$c_{i,ab} = c_i \quad \text{Gl. 3.3}$$

und somit:

$$V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} + c_i \cdot \frac{dV_R}{dt} = F_{zu} \cdot c_{i,zu} - F_{ab} \cdot c_i \pm r_i \cdot V_R \quad \text{Gl. 3.4}$$

Bei der Betriebsweise von Reaktoren kann zwischen Satz-, Zulauf- und kontinuierlichen Verfahren unterschieden werden.

### **Satzverfahren (Batch)**

Das Satzverfahren ist durch einmaliges Befüllen des Reaktors und die anschließende Durchführung der Reaktion gekennzeichnet. Eine Zu- oder Abgabe einer Reaktionskomponente oder eines Reaktionsproduktes wird nicht vorgenommen. Das Reaktionsvolumen bleibt während der gesamten Reaktion konstant. Aufgrund der zeitlichen Änderung der Edukte sowie der Produkte während der Reaktion im Satzverfahren wird dieses Verfahren auch als diskontinuierlich oder instationär bezeichnet. Aufgrund der Volumenkonstanz während der Reaktion lässt sich die Stoffbilanz einer Komponente  $i$  aus Gleichung 3.4 vereinfachen:

$$\frac{dc_i}{dt} = \pm r_i \quad \text{Gl. 3.5}$$

Die Reaktion eines im Satzverfahren betriebenen Reaktors endet wenn eine oder mehrere Komponenten  $i$  verbraucht sind oder ein Gleichgewichtszustand erreicht wird.

In der Bioverfahrenstechnik wird für die Kultivierung von Mikroorganismen zumeist wenigstens eine für das Wachstum benötigte Komponente gasförmig dem Reaktionsmedium zugeführt. Die Reaktionsführung erfolgt dann definitionsgemäß halbkontinuierlich. Der Begriff Satzbetrieb bezieht sich in der Bioverfahrenstechnik daher zumeist auf die Flüssigphase, nicht aber auf

gasförmige Komponenten. Darüber hinaus wird die Änderung des Reaktionsvolumens durch Zugabe von Säure oder Base für die Regelung des pH, sowie durch Zugabe von Antischaummitteln in der Regel vernachlässigt [Schügerl 1985].

### **Zulaufverfahren (Fed-Batch; extended Batch)**

Bei dem so genannten Zulaufverfahren werden dem Reaktor kontinuierlich eine oder mehrere Komponenten zugeführt. Die Zugabe der Komponenten kann dabei unmittelbar zu Beginn der Reaktion (Kultivierung) oder im Anschluss an eine Reaktion im Satzverfahren erfolgen. Ein Abfluss aus dem Reaktor erfolgt bei einem Zulaufverfahren nicht. Diese Verfahrensweise wird daher auch als halbkontinuierlich bezeichnet. Die Änderung des Reaktionsvolumens bei konstantem Volumenstrom ( $F_{zu} = \text{konst.}$ ) im Zufluss ist definiert als:

$$\frac{dV_R}{dt} = F_{zu} \quad \text{Gl. 3.6}$$

Mit Gleichung 3.4 und Gleichung 3.6 ergibt sich für die Stoffbilanz des Reaktors im Zulaufverfahren:

$$V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} + c_i \cdot F_{zu} = F_{zu} \cdot c_{i,zu} \pm r_i \cdot V_R \quad \text{Gl. 3.7}$$

Für die zeitabhängige Konzentrationsänderung der Komponente  $i$  gilt durch Umformung von Gleichung 3.7:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F}{V_R} \cdot (c_{i,zu} - c_i) \pm r_i \quad \text{Gl. 3.8}$$

Dabei ist

$$\frac{F}{V_R} = D \quad \text{Gl. 3.9}$$

als Verdünnungsrate  $D$  [ $\text{h}^{-1}$ ] definiert.

### **Kontinuierliches Verfahren**

Der kontinuierliche Betrieb eines Reaktors ist durch einen ständigen Zufluss an Reaktionskomponenten, sowie durch einen ständigen Abfluss von Reaktionsprodukten und Komponenten gekennzeichnet. Wird der Volumenstrom des Zu- und Abflusses gleich groß eingestellt ( $F_{zu} = F_{ab} = F$ ), so stellt sich für eine Komponente  $i$  im Reaktor ein räumliches, sowie zeitliches Gleichgewicht ein. Aufgrund dieser Raum- sowie Zeitkonstanz des kontinuierlichen Verfahrens wird diese Betriebsweise auch als stationär bezeichnet. Für die Stoffbilanz des kontinuierlich betriebenen Reaktors gilt somit:

$$V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} + c_i \cdot \frac{dV_R}{dt} = 0 = F \cdot (c_{i,zu} - c_i) \pm r_i \cdot V_R \quad \text{Gl. 3.10}$$

Unter Berücksichtigung der Verdünnungsrate  $D$  (Gleichung 3.9) ergibt sich für die Bildungs- beziehungsweise Verbrauchsgeschwindigkeit der Komponente  $i$ :

$$r_i = \pm D \cdot (c_{i,zu} - c_i) \quad \text{Gl. 3.11}$$

Der Kehrwert der Verdünnungsrate im kontinuierlichen Betrieb ist als die mittlere hydrodynamische Verweilzeit  $\tau$  [h] definiert:

$$\tau = \frac{1}{D} = \frac{V_R}{F} \quad \text{Gl. 3.12}$$

Die hydrodynamische Verweilzeit gibt die Zeit an, die es dauert, bis eine dem Reaktionsvolumen adäquate Menge zugeführt wurde und ist eine für die Prozessführung charakteristische Größe.

Ein kontinuierlich betriebener Reaktor kann erst nach einer Anlaufphase von etwa 5 hydrodynamischen Verweilzeiten, nach der sich alle Gleichgewichtszustände eingestellt haben, als stationär betrachtet werden [Baerns et al. 1992].

### **Vergleich der Betriebsweisen des idealen, isothermen Reaktors**

Bei der Auswahl der Betriebsweise eines Reaktors zur Durchführung von Experimenten oder der Auslegung von Produktionsprozessen sind die Vor- und Nachteile der einzelnen Betriebsweisen gegeneinander abzuwägen. Die Betriebsweise des Reaktors hängt darüber hinaus von der Art der Reaktion ab. So ist bei biotechnologischen Prozessen beispielsweise zu berücksichtigen,



inwiefern eine Produktbildung wachstumsassoziiert, oder erst nach Induktion abläuft.

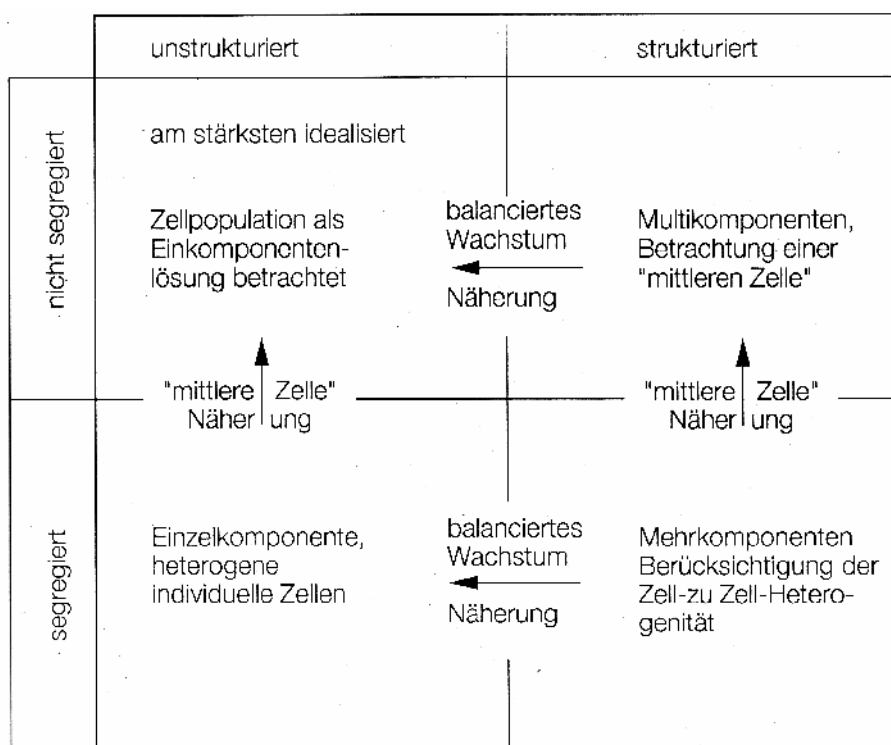
Der im Satzverfahren betriebene Rührkessel birgt den Vorteil einer vergleichsweise einfachen Prozessführung und Regelung. Aufgrund der abgeschlossenen Betriebsweise, sowie vergleichsweise kurzen Betriebszeiten kann bei biotechnologischen Produktionen das Kontaminationsrisiko durch Fremdkeime gering gehalten werden. Im Laborbetrieb sind Untersuchungen im Satzverfahren schnell und mit verhältnismäßig geringen Vorbereitungen durchzuführen. Nachteile bei einem industriellen Einsatz des Satzverfahrens sind die langen Totzeiten, welche durch Befüllen, Entleeren sowie Reinigung des Reaktors auftreten. Des Weiteren kommt es durch häufige Sterilisation der Reaktors zu einer stärkeren Beanspruchung der Messinstrumente.

Die Vorteile des Zulaufverfahrens gegenüber dem Satzverfahren liegen in einer höheren Flexibilität, sowie einer höheren Raum-Zeit-Ausbeute bei vergleichbarem Aufwand der Prozessführung. Ein gesteigerter Aufwand entsteht lediglich durch die zusätzliche Kontrolle, beziehungsweise Regelung des Zuflusses. Der Nachteile der langen Totzeiten kann durch eine halbkontinuierliche Prozessführung nicht vermindert werden.

Das Problem der Totzeiten kann durch die kontinuierliche Betriebsweise des Rührkessels gelöst werden. Darüber hinaus lassen sich aufgrund der Stationarität des kontinuierlich betriebenen Reaktors definierte Betriebspunkte gezielt ansteuern, und somit definierte Produkteigenschaften erreichen. Die Nachteile des kontinuierlichen Betriebes liegen in der hohen Anfälligkeit gegenüber Störungen des Reaktionssystems. So können bereits kleine Störungen, beispielsweise durch Schwankungen im Volumenstrom des Zu- oder Abflusses, zu einer Störung des Reaktionsgleichgewichtes und somit zu Veränderungen der Produktqualität führen. Bei einem Einsatz des kontinuierlichen Verfahrens bei der biotechnologischen Produktion können solche Schwankungen zu einem Ausspülen der Mikroorganismen führen. Darüber hinaus können durch den kontinuierlichen Betrieb Mutationen bei Mikroorganismen auftreten [Schügerl 1985; Kovárová und Egli 1998].

### 3.3.2 Kinetik des mikrobiellen Wachstums

Bei der Entwicklung kinetischer Modelle zur Beschreibung des mikrobiellen Wachstums wird zwischen unstrukturierten und strukturierten, sowie zwischen segregierten und unsegregierten Modellen unterschieden (siehe Abbildung 3.8).



**Abb. 3.8 Differenzierung der Betrachtungsweisen eines Systems zur Erstellung eines kinetischen Modells des mikrobiellen Wachstums [aus Chmiel 1991]**

Unstrukturierte Modelle (auch Black-Box-Modelle genannt) berücksichtigen lediglich die Beziehungen zwischen Ein- und Ausgangsgrößen des Bilanzraumes. Die innere Struktur sowie Wirkungsmechanismen werden nicht berücksichtigt. Unstrukturierte Modelle stellen die Zellpopulation als Einkomponentenlösung dar.

Bei einer strukturierten Betrachtungsweise (auch Grey-Box-Modell) werden innere Zusammenhänge, wie beispielsweise die Wechselwirkung verschiedener enzymatischer Reaktionen, bei der Formulierung des kinetischen Modells berücksichtigt. In Abhängigkeit der Detailkenntnis der inneren Zusammenhänge können untergeordnete Prozesse erneut als unstrukturierte Abläufe in Erscheinung treten.

Wird ein System als unsegregiert betrachtet, werden die Zelleigenschaften als Mittelwert einer homogenen Zellpopulation berücksichtigt. Unterscheidungen

bezüglich des Wachstumsstadiums oder des Zellzyklus für einzelne Individuen oder Zellklassen werden nicht vorgenommen. Das Wachstum wird als balanciert angesehen.

Bei einer segregierten Betrachtungsweise wird zwischen Individuen oder Zellklassen der Zellpopulation, welche sich in unterschiedlichen physiologischen Stadien befinden, unterschieden.

Der am stärksten vereinfachte, sowie idealisierte Modelltyp ist somit das unstrukturierte, unsegregierte Modell [Chmiel 1991]

In der Biotechnologie sind die Bildungs- beziehungsweise Verbrauchsgeschwindigkeiten  $r_i$  der Massenbilanz in Abhängigkeit der Funktion der Komponente während des mikrobiellen Wachstums definiert worden. So ergibt sich für die Zunahme der Biomassekonzentration:

$$r_i = \mu \cdot c_x \quad \text{Gl. 3.13}$$

Hierbei sind:

$\mu$  = spezifische Wachstumsrate [ $\text{h}^{-1}$ ]

$c_x$  = Biomassekonzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ]

Analog gilt für ein für das Wachstum oder die Produktbildung benötigtes Substrat:

$$r_i = q_i \cdot c_x \quad \text{Gl. 3.14}$$

mit:

$q_i$  = spezifische Aufnahmegeschwindigkeit [ $\text{h}^{-1}$ ]

Für die Produktbildung einer mikrobiellen Reaktion gilt:

$$r_i = q_P \cdot c_x \quad \text{Gl. 3.15}$$

mit:

$q_P$  = spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit [ $\text{h}^{-1}$ ]

Die Zunahme an Zellmasse, welche durch Verbrauch einer bestimmten Menge an Substrat erreicht werden kann, wird als Zellertragskoeffizient oder Ausbeutekoeffizient bezeichnet. Dieser Koeffizient ist definiert als:

$$Y_{x,s} = \frac{dc_x}{dc_s} \quad \text{Gl. 3.16}$$

Hierbei bedeutet:

$Y_{x,s}$  = Zellertragskoeffizient [ $\text{g g}^{-1}$ ]; [ $\text{g mol}^{-1}$ ]

$c_s$  = Konzentration des Substrats [ $\text{g L}^{-1}$ ]

Über den Zellertragskoeffizienten lassen sich Wachstumsrate und Substrataufnahmegeschwindigkeit korrelieren:

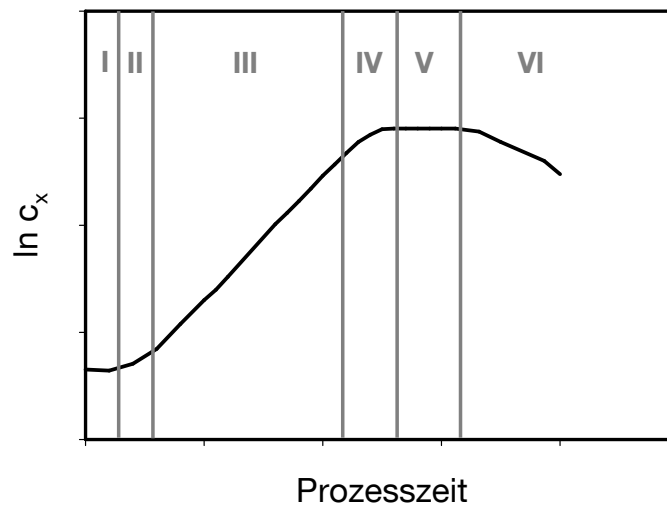
$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x,s}} \quad \text{Gl. 3.17}$$

Eine detailliertere, mathematische Beschreibung dieser Geschwindigkeitskonstanten erfolgt in Abhängigkeit der oben beschriebenen Betrachtungsweise des mikrobiologischen Systems bei der Entwicklung eines formalkinetischen Modells. Grundlage zur Entwicklung eines kinetischen Modells ist zunächst die qualitative Beschreibung des Wachstums. Abbildung 3.9 zeigt einen typischen Wachstumsverlauf einer Kultivierung im Satzverfahren.

Bei der Kultivierung von Mikroorganismen im Satzverfahren sind fünf verschiedene Wachstumsphasen zu beobachten.

In einer ersten Phase (I), der so genannten Adaptations- oder Lag-Phase ist kein Wachstum zu beobachten. In dieser Phase adaptieren sich die Zellen an die neuen Bedingungen im Bioreaktor. In Abhängigkeit der Güte des Impfgutes (Inokkulum) kann diese Adaptationsphase mehr oder weniger stark ausgeprägt sein.

In der Übergangsphase (II), auch Beschleunigungsphase genannt, setzt das Wachstum der Mikroorganismen ein. In dieser Phase der Kultivierung ist ein Teil der Zellen bereits an die neuen Bedingungen adaptiert.



**Abb. 3.9** Verschiedene Phasen des Wachstums von Mikroorganismen im Satzverfahren ( $c_x$  = Biotrockenmassekonzentration [g L<sup>-1</sup>]; I = Lag-Phase; II = exponentielle Wachstumsphase; III = Übergangsphase; IV = stationäre Phase; V = Absterbephase)

In der darauf folgenden Phase (III), der exponentiellen Wachstumsphase oder log-Phase, ist eine schnelle, kontinuierliche Zunahme der Biomasse zu beobachten. In dieser Phase wird die maximale Wachstumsrate des Mikroorganismus erreicht. Für diese Phase gilt unter Berücksichtigung des kinetischen Theores (Gleichung 3.13) sowie der Massenbilanz für Reaktoren im Satzbetrieb (Gleichung 3.5) der mathematische Zusammenhang:

$$\frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_x \quad \text{Gl. 3.18}$$

Durch Integration von Gleichung 3.17 gilt:

$$c_{x,t} = c_{x,0} \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Gl. 3.19}$$

mit:

$c_{x,0}$  = Biomassekonzentration am Ende der stationären Phase [g/L]

$c_{x,t}$  = Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t [g/L]

t = Prozesszeit [h]

Aufgrund des exponentiellen Wachstums lässt sich aus Gleichung 3.18 die Zeit ( $t_d$ ) ableiten, welche zur Verdopplung der Biomassekonzentration benötigt wird.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Gl. 3.20

Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase kommt es zu einer Abflachung der Wachstumskurve (Phase IV). In dieser Übergangsphase setzt die Limitation eines oder mehrerer Substrate ein. Eine weitere Ursache für das Auftreten der Übergangsphase kann in der Akkumulation für die Zelle toxischer Produkte im Medium liegen.

In der anschließenden stationären Phase (V) kann aufgrund der Limitation oder Inhibierung keine weitere Zellzunahme mehr beobachtet werden. Diese Phase kann je nach Art des Mikroorganismus unterschiedlich lang sein.

Auf die stationäre Phase folgend, kann in der letzten Wachstumsphase (VI), ein Absterben der Zellen beobachtet werden.

Basierend auf den so durchgeführten Beobachtungen können Modelle entwickelt werden, welche in der Lage sind, das mikrobielle Wachstum nicht nur in der exponentiellen Wachstumsphase zu beschreiben. Hierfür wurden bereits vielfältige formalkinetische Modelle untersucht, welche sich zumeist auf das Monod-Modell zurückführen lassen.

### ***Monod-Modell***

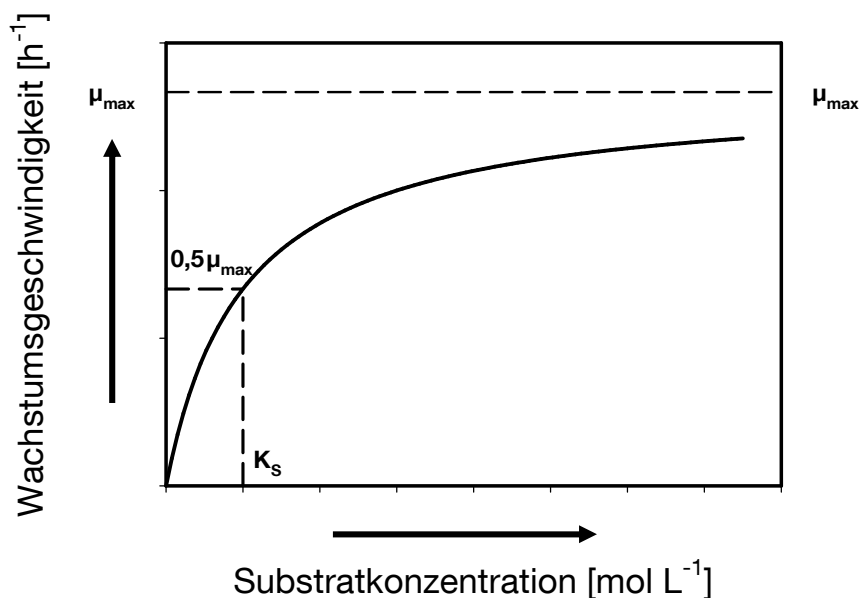
Das einfachste, unstrukturierte, unsegregierte Modell zur Beschreibung der Kinetik des mikrobiellen Wachstums ist das so genannte Monod-Modell [Monod 1942]. Das Modell besitzt für die Wachstumsphasen III und IV (exponentiell und Übergang) des in Abbildung 3.9 dargestellten Wachstums im Satzverfahren Gültigkeit. Dieses Modell beruht auf der Annahme, dass mit Ausnahme eines Substrates, alle anderen für das Wachstum benötigten Komponenten, den Mikroorganismen im Bilanzraum im Überschuss zur Verfügung stehen. Zwischen dem limitierenden Substrat, sowie dem Wachstum der Mikroorganismen besteht ein nichtlinearer Zusammenhang. Der Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate sowie der Konzentration des limitierenden Substrates  $S$  wurde von Monod in Anlehnung an die Michaelis-Menten-Enzymkinetik formuliert:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad \text{Gl. 3.21}$$

Dabei sind:

- $\mu_{\max}$  = maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [ $\text{h}^{-1}$ ]
- $c_S$  = Konzentration des limitierenden Substrates [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
- $K_S$  = Sättigungskonzentration oder Affinitätskonstante des limitierenden Substrates [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

Abbildung 3.10 zeigt schematisch den Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate sowie der limitierenden Substratkonzentration.



**Abb. 3.10 Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen limitierender Substratkonzentration und spezifischer Wachstumsrate des Monod-Modells**

Die Sättigungskonzentration  $K_S$  des Monod-Modells hat dabei den Wert der Substratkonzentration, bei welcher die Hälfte der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  erreicht wird. Je geringer der Wert für  $K_S$ , umso höher ist die Affinität des Mikroorganismus bezüglich des limitierenden Substrates.

Aufgrund von Abweichungen im Wachstum einiger Mikroorganismen wurden Anpassungen des Monod-Modells vorgenommen. In Tabelle 3.3 sind einige dieser angepassten Modelle des Wachstums in Abhängigkeit eines limitierenden Substrates dargestellt.

**Tab. 3.3 Alternative Modelle zur Beschreibung des Wachstums in Abhängigkeit eines limitierenden Substrates**

Modell	Quelle
$\mu = \mu_{\max} \cdot \left( 1 - e^{-\left(\frac{c_s}{K_s}\right)} \right)$	Teissier 1936
$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s^n}{c_s^n + K_s}$	Moser 1958
$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{c_s + K_s \cdot c_x}$	Contois 1959

Häufig sind das einfache, unstrukturierte, unsegregierte Modell, oder dessen Anpassungen nicht ausreichend um das mikrobielle Wachstum zu beschreiben. Gründe hierfür können unter anderem das Auftreten von Inhibitionen einzelner Substrate, sowie das Absterben empfindlicher Mikroorganismen während des Wachstums sein. Um solche Wachstumsphänomene mit einem kinetischen Modell zu beschreiben, muss eine weitere Strukturierung des Modells vorgenommen werden. Als Ausgangspunkt einer tieferen Strukturierung dient zumeist das Monod-Modell.

### ***Erhaltungsstoffwechsel und Absterberate***

Die Theorie des Erhaltungsstoffwechsels bei der Modellbildung folgt der Annahme, dass ein Teil des energieliefernden, limitierenden Substrates zur Erhaltung der Mikroorganismen oder zur Reaktivierung inaktiver Biomasse genutzt wird [Prit 1965]. Die spezifische Substrataufnahmegeschwindigkeit lässt sich daher als Summe der Substrataufnahme für das Wachstum und für den Erhaltungsstoffwechsel formulieren:

$$q_s = q_{s,\mu} + q_{s,m}$$

**Gl. 3.22**

mit:

$q_{s,\mu}$  = Spezifische Aufnahmegeschwindigkeit für das Wachstum [ $\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]

$q_{s,m}$  = Spezifische Aufnahmegeschwindigkeit für den Erhaltungsstoffwechsel [ $\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]



Durch Erweiterung von Gleichung 3.17 erhält man unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x,s}} + m_s \quad \text{Gl. 3.23}$$

Dabei ist:

$m_s$  = Spezifische konstante  
Substrataufnahmegeschwindigkeit für den  
Erhaltungsstoffwechsel [ $\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]

Für die Beobachtung des Absterbens der Zellen wird die Annahme eines endogenen Stoffwechsels für die Modellbildung herangezogen. Unter endogenem Metabolismus werden zellinterne Vorgänge definiert, welche zu einem Abbau von Zellsubstanz führen [Chmiel 1991]. Analog zur Gleichung 3.23 für den Erhaltungsstoffwechsel kann durch Erweiterung der Gleichung 3.21 der endogene Stoffwechsel wie folgt beschrieben werden:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{c_s + K_s} - k_d \quad \text{Gl. 3.24}$$

mit

$k_d$  = Absterberate [ $\text{h}^{-1}$ ]

### ***Inhibierung***

Bei der Inhibierung des mikrobiellen Wachstums wird zwischen Substrat- sowie Produktinhibierung unterschieden.

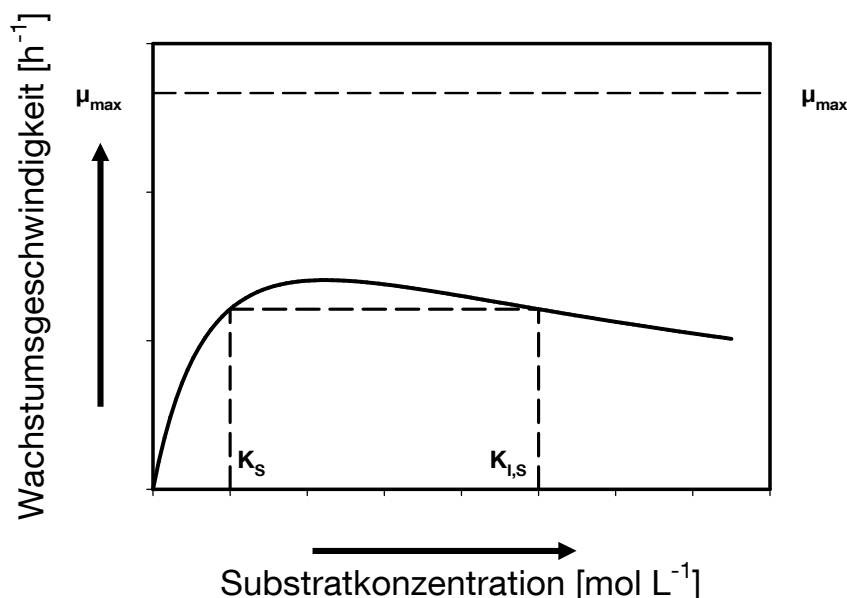
Bei der Substratinhibierung führt ein Überschuss des limitierenden Substrates zu einer Verlangsamung des Wachstums. Nach Andrews 1968 kann das Monod-Modell bei Inhibition des Substrates wie folgt erweitert werden:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{c_s + K_s + \frac{c_s^2}{K_{i,s}}} \quad \text{Gl. 3.25}$$

dabei ist

$K_{i,s}$  = Inhibitionskonstante des Substrat [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

In Abbildung 3.11 ist schematisch der Zusammenhang zwischen limitierender, inhibierender Substratkonzentration und der Wachstumsrate dargestellt.



**Abb. 3.11 Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen limitierender, inhibierender Substratkonzentration und spezifischer Wachstumsrate ( $K_s$  = Sättigungskonzentration;  $K_{i,s}$  = Inhibitionskonstante)**

Es ist zu sehen, dass bei zwei Substratkonzentrationen,  $c_s = K_s$  sowie  $c_s = K_{i,s}$  die gleiche Wachstumsrate erreicht wird. Die real zu beobachtende, maximale Wachstumsrate ist bei substratinhibiertem Wachstum geringer als bei nicht inhibiertem Wachstum (vgl. Abbildung 3.10). In Tabelle 3.4 sind einige alternative Modelle für das Wachstum mit einem inhibierenden Substrat zusammengefasst (Tabelle adaptiert aus Wolf 1991).

**Tab. 3.4 Modelle zur Beschreibung des substratinhibierten Wachstums**

Modell	Autor
$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{(c_s + K_s) \cdot \left(1 + \frac{c_s}{K_i}\right)}$	Haldane
$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s \cdot e^{\left(-\frac{c_s}{K_i}\right)}}{c_s + K_s}$	Aiba u.a.
$\mu = \mu_{\max} \cdot \left( e^{\left(-\frac{c_s}{K_i}\right)} - e^{\left(-\frac{c_s}{K_s}\right)} \right)$	Teissier

Neben einer Inhibition durch Wachstumssubstrate, kann es zu einer Inhibition durch Produkte kommen, welche während des Wachstums der Mikroorganismen gebildet werden. Ein häufig verwendetes Modell zur Beschreibung des Wachstums bei Produktinhibition ist der einfache Potenzansatz nach Levenspiel [Levenspiel 1980]:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \cdot \left(1 - \frac{c_P}{c_{P,\max}}\right)^n \quad \text{Gl. 3.26}$$

Hierbei sind:

$c_P$  = Produktkonzentration [mol L<sup>-1</sup>]

$c_{P,\max}$  = Maximale, kritische Produktkonzentration, bei welcher kein Wachstum mehr zu beobachten ist [mol L<sup>-1</sup>]

$n$  = Exponent [-]

In Abbildung 3.12 ist die Wachstumsrate in Abhängigkeit der Produktkonzentration für verschiedene Werte des Exponenten  $n$  dargestellt. Für einen Exponent  $n=1$  nimmt die Wachstumsrate linear mit steigender Produktkonzentration ab. Wird der Exponent als  $n < 1$  identifiziert, so ist mit steigender Produktkonzentration zunächst nur eine geringe Inhibition des Wachstums zu beobachten. Nähert sich die Produktkonzentration im Medium ihrer kritischen Konzentration erfolgt ein starker Abfall der Wachstumsrate. Bei Werten  $n > 1$  hat das gebildete Produkt einen größeren Einfluss auf das Wachstum. Bereits geringe Produktkonzentrationen führen zu einer starken Abschwächung des Wachstums.

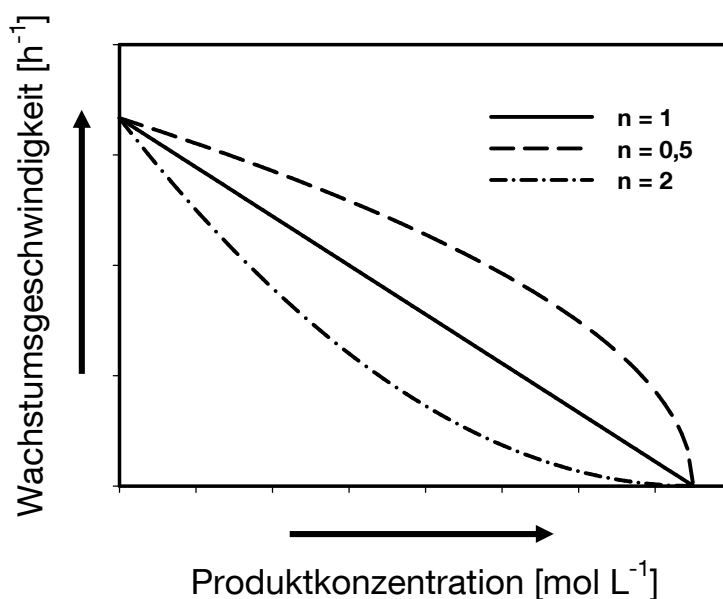


Abb. 3.12 Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Produktkonzentration sowie dem Exponent  $n$  für produktinhibiertes Wachstum

In Tabelle 3.5 sind weitere Modelle zur Beschreibung des Wachstums bei Auftreten einer Produktinhibition zusammengefasst (Tabelle adaptiert aus Wolf 1991).

Tab. 3.5 Modelle zur Beschreibung des produktinhibierten Wachstums

Modell	Autor
$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{(c_s + K_s)} \cdot \frac{K_p}{K_p + c_p}$	Jerusalimski
$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{c_s + K_s} \cdot e^{(-K_p \cdot c_p)}$	Aiba u.a.
$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{c_s + K_s} \cdot (1 - K_p \cdot c_p)$	Dagley und Hinschelwood

### Berücksichtigung mehrerer Substrate

Um das Wachstum von Mikroorganismen in Abhängigkeit von mehreren Substraten darzustellen, müssen weitere Strukturierungen und somit weitere Erweiterungen des Monod-Modells vorgenommen werden. Das Wachstum unter

Berücksichtigung zweier oder mehrerer essentieller Bestandteile (z.B. Zucker und Sauerstoff) kann durch einen multiplikativen Ansatz beschrieben werden:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_{s,1}}{c_{s,1} + K_{s,1}} \cdot \frac{c_{s,2}}{c_{s,2} + K_{s,2}} \quad \text{Gl. 3.27}$$

Bei der Berücksichtigung von mehreren gleichwertigen Substraten, zum Beispiel zwei verschiedene Zuckerarten, trifft die Annahme, dass beide Bestandteile für das Wachstum essentiell sind, nicht zu. Der Mikroorganismus ist in der Lage auch unter Anwesenheit von nur einem der beiden Substrate zu wachsen. In diesem Fall kann ein additiver Ansatz zur Beschreibung des Wachstums herangezogen werden.

Es wird generell zwischen der simultanen, sowie der sequentiellen Verwertung von Substraten unterschieden. Bei der sequentiellen Verwertung von Substraten ist zunächst nur das Wachstum aufgrund eines der beiden Substrate zu betrachten. Erst nach vollständigem Verbrauch des ersten Substrates beginnt die Aufnahme des zweiten Substrates. Häufig ist bei dem Übergang zwischen den zwei Substraten eine stationäre Phase erkennbar. Dieses Wachstumsverhalten wird auch Diauxie genannt und ist darauf zurückzuführen, dass der Stoffwechsel der Mikroorganismen erst auf ein anderes Substrat umgestellt werden muss.

Die einfachste Form der simultanen Substratverwertung ist in Gleichung 3.28 dargestellt.

$$\mu = \mu_1 + \mu_2 = \mu_{\max,1} \frac{c_{s,1}}{c_{s,1} + K_{s,1}} + \mu_{\max,2} \frac{c_{s,2}}{c_{s,2} + K_{s,2}} \quad \text{Gl. 3.28}$$

Häufig kann eine gegenseitige Beeinflussung der Substrate beobachtet werden. Diese Beeinflussung kann ebenfalls zu einem sequentiellen Verbrauch der Substrate ohne Diauxie führen. Hierfür können Wechselwirkungsmodelle formuliert werden, welche die gegenseitige Beeinflussung berücksichtigen. Einige dieser Modelle sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.6 Interaktionsmodelle des Multisubstratwachstums [nach Reardon et al. 2000]

Interaktion	Modell
kompetitiv	$\mu = \mu_{\max,1} \frac{C_{s,1}}{C_{s,1} + K_{s,1} + \left(\frac{K_{s,1}}{K_{s,2}}\right) \cdot C_{s,2}} + \mu_{\max,2} \frac{C_{s,2}}{C_{s,2} + K_{s,2} + \left(\frac{K_{s,2}}{K_{s,1}}\right) \cdot C_{s,1}}$
nonkompetitiv	$\mu = \mu_{\max,1} \frac{C_{s,1}}{(C_{s,1} + K_{s,1}) \cdot \left(1 + \frac{C_{s,2}}{K_{s,2}}\right)} + \mu_{\max,2} \frac{C_{s,2}}{(C_{s,2} + K_{s,2}) \cdot \left(1 + \frac{C_{s,1}}{K_{s,1}}\right)}$
unkompetitiv	$\mu = \mu_{\max,1} \frac{C_{s,1}}{K_{s,1} + C_{s,1} \cdot \left(1 + \frac{C_{s,2}}{K_{s,2}}\right)} + \mu_{\max,2} \frac{C_{s,2}}{K_{s,2} + C_{s,2} \cdot \left(1 + \frac{C_{s,1}}{K_{s,1}}\right)}$
undefiniert	$\mu = \mu_{\max,1} \frac{C_{s,1}}{C_{s,1} + K_{s,1} + I_{2,1} \cdot C_{s,2}} + \mu_{\max,2} \frac{C_{s,2}}{C_{s,2} + K_{s,2} + I_{1,2} \cdot C_{s,1}}$

### Bestimmung der kinetischen Parameter

Grundlage der Parameteridentifikation der kinetischen Modelle ist die Durchführung verlässlicher, reproduzierbarer Experimente. Dabei hat die Art der Prozessführung einen starken Einfluss auf die Identifizierbarkeit der kinetischen Parameter. So sind Untersuchungen im Satzverfahren schnell und reproduzierbar durchzuführen, sind jedoch nur im begrenzten Rahmen zur Parameteridentifikation geeignet. Aufgrund der Instationarität der Prozessführung durchlaufen die Zellen verschiedene Wachstumsstadien, in denen sich der Metabolismus ändert. Die Annahme des balancierten Wachstums ist daher nicht zutreffend. Darüber hinaus ist die Sättigungskonzentration  $K_s$  häufig sehr gering, so dass während der gesamten Kultivierung annähernd keine Limitation auftritt. Das Modell ist somit bezüglich dieses Parameters nicht sensitiv. Untersuchungen im Satzverfahren werden jedoch häufig herangezogen, um eine erste Abschätzung der formalkinetischen Parameter zu erhalten [Sonnleitner et al. 1986; Chmiel 1991; Baltes et al. 1994].

Eine bessere Bestimmung der Parameter kann durch Untersuchungen im Zulaufverfahren erreicht werden. Durch gezieltes Einstellen der Zulauftrate können annähernd balancierte Wachstumsbedingungen erreicht werden. Dies ermöglicht eine bessere Bestimmung der kinetischen Parameter [Munack 1989; Baltes et al. 1994].

Balanciertes Wachstum kann aufgrund der Stationarität im kontinuierlichen Verfahren erreicht werden. Durch Einsetzen der Gleichung 3.13 in die Massenbilanzgleichung 3.11 des kontinuierlichen Reaktors sowie der Voraussetzung  $c_{x,zu} = 0$ , ergibt sich für die Biomassebilanz:

$$\mu = D \quad \text{Gl. 3.29}$$

Somit lassen sich im kontinuierlichen Verfahren gezielt Betriebspunkte zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Substrat, Substratverbrauch sowie Wachstumsrate einstellen. Bei Untersuchungen im kontinuierlichen Verfahren muss darauf geachtet werden, dass nur stabile Betriebspunkte eingestellt werden. Voraussetzung zum Erhalt eines stabilen Betriebspunktes ist:

$$\frac{d\mu}{dc_s} > 0 \quad \text{Gl. 3.30}$$

Bei Auftreten einer Substratinhibierung ist diese Voraussetzung lediglich bis zum Erreichen der maximal möglichen Wachstumsrate bei der Konzentration

$$c_{s,krit} = \sqrt{K_s \cdot K_i} \quad \text{Gl. 3.31}$$

(nach Gleichung 3.25) gegeben (vgl. Abbildung 3.11). Bei Substratkonzentrationen größer  $c_{s,krit}$  ist kein stabiler stationärer Betrieb des Bioreaktors mehr möglich [Schügerl 1985].

In allen Fällen müssen zur Bestätigung der identifizierten kinetischen Parameter unabhängige Versuche zur Parametervalidierung durchgeführt werden.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Herstellung der Kultivierungsmedien

Die Kultivierung von *Cupriavidus necator* sowohl unter heterotrophen als auch chemolithoautotrophen Bedingungen erfolgte in einem mineralischen Salzmedium. Das eingesetzte Medium ist dabei auf Studien zur optimalen Medienzusammensetzung zur chemolithoautotrophen, aeroben Kultivierung zurückzuführen [Repaske und Mayer 1976; Repaske und Repaske 1976]. Das Medium wird lediglich um das Molybdänsalz erweitert, da Molybdän ein wichtiger Bestandteil der Enzymsysteme der Nitratreduktion darstellt. In Tabelle 4.1 sind die einzelnen Medienkomponenten sowie deren endgültige Konzentration im Kulturmedium dargestellt.

Tab. 4.1 Medium zur Kultivierung von *Cupriavidus necator*

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,9
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	8,41
NH <sub>4</sub> Cl	1
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,17
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,41
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,016
CaCl <sub>2</sub>	7·10 <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,8·10 <sup>-3</sup>
NaNO <sub>3</sub>	variierend
Fruktose	0 bis 10
Spurenelemente	
Ni <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,31·10 <sup>-4</sup>
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,82·10 <sup>-5</sup>
CrCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5,33·10 <sup>-5</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4,75·10 <sup>-5</sup>

Die Konzentration an Fruktose sowie Nitrat im Medium variiert in Abhängigkeit der Zielstellung der durchgeführten Untersuchung. Die jeweiligen Endkonzentrationen sind im Text der entsprechenden Versuche in Abschnitt 5 dargestellt.



Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung werden in fruktosefreiem Medium durchgeführt.

Bei der Herstellung des Kulturmediums werden zunächst die Phosphatsalze sowie  $K_2SO_4$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  und  $NaNO_3$  in der gewünschten Konzentration in vollentsalztem Wasser gelöst und anschließend im Kulturgefäß autoklaviert ( $121^\circ C$ , 20 Minuten). Stammlösungen der Salze  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  und  $NH_4Cl$ , sowie die Fruktosestammlösung werden separat autoklaviert und im Anschluss dem Kulturmedium steril zugegeben, so dass die gewünschte Endkonzentration erreicht wird. Die Spurenelemente werden als gemeinsame Stammlösung hergestellt. Die Spurenelementlösung sowie die Eisenchloridlösung werden nicht autoklaviert. Die Zugabe zu dem Kulturmedium erfolgt über sterile Filtration (Einmalspritzenfilter; Porengröße  $0,22 \mu m$ )

## 4.2 Kultivierungen

### 4.2.1 Verwendete Stämme und Stammhaltung

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme für die heterotrophen Voruntersuchungen, als auch für Studien zur chemolithoautotrophen Nitratatmung sind die Stämme *Cupriavidus necator* DSM 428 sowie DSM 531. Die Stämme wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die Herstellung von Gefrierkulturen für beide Stämme erfolgt nach derselben Verfahrensweise.

#### ***Aerobe Stammhaltung***

Die gefriergetrockneten Zellen werden in einem ersten Schritt in 1 mL Medium (siehe Abschnitt 4.1) welches  $5 g L^{-1}$  Fruktose jedoch kein Nitrat enthält gelöst. Die gelöste Zellsuspension wird anschließend in einen Schüttelkolben (500 mL) ohne Schikanen überführt, welcher 199 mL Medium enthält. Die Kultur wird für 2 Tage bei  $30^\circ C$  und  $150 min^{-1}$  (5 cm Exzentrizität) im Schüttelinkubator unter aeroben Bedingungen inkubiert. Nach 48 Stunden werden je 5 mL der ersten Kultivierung in 4 Schüttelkolben mit 195 mL Medium, welches  $10 g L^{-1}$  Fruktose enthält, überführt. Anschließend erfolgt eine erneute Inkubation für 20 Stunden bei  $30^\circ C$  sowie  $150 min^{-1}$ . Im Folgenden werden die Zellsuspensionen in Zentrifugenröhrchen (50 mL) überführt und bei  $4800 \times g$  für 30 Minuten bei  $4^\circ C$  zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird der am Boden der

Zentrifugenröhrchen verbliebene Zellrückstand in einem Gemisch aus 70 % Natriumphosphatpuffer (pH 7,5; 0,03 mmol L<sup>-1</sup>) und 30 % v/v Glycerin resuspendiert, so dass die erhaltene Suspension eine optische Dichte (OD<sub>660</sub>) von 50 besitzt. Je 1 mL der Suspension werden in 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgt bei -80°C.

### ***Stammhaltung nitratatmender Zellen im 200 mL-Maßstab***

Zur Stammhaltung nitratatmender Zellen werden 4 anoxische, pH-geregelte Rührkolben (siehe Abschnitt 4.2.2) mit je 100 µL der Zellsuspension der aeroben Stammhaltung beimpft. Das Medium (200 mL) enthält dabei 23,5 mol L<sup>-1</sup> (1,46 g L<sup>-1</sup>) Nitrat sowie 5 g L<sup>-1</sup> Fruktose. Die Inkubation erfolgt für 3 Tage bei 30°C sowie einem pH von 7,5. Nach Abtrennen der Zellen in 50 mL Zentrifugenröhrchen mittels Zentrifugation (30 min, 4800xg, 4°C) wird der Zellrückstand in der Natriumphosphatpuffer-Glycerin-Lösung (70% : 30% v/v) resuspendiert. Die optische Dichte (OD<sub>660</sub>) der Suspension wird auf 20 eingestellt. Je 1 mL der Suspension wird in 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

### ***Stammhaltung nitratatmender Zellen im 4 L-Maßstab***

Die Herstellung größerer Mengen Zellsuspension für die Stammhaltung erfolgt durch Kultivierung im Laborbioreaktor (siehe Abschnitt 4.2.4). Als Inokulum für den Start der Kultivierung dienen 20 mL der Zellsuspension der oben beschriebenen Stammhaltung nitratatmender Zellen im 200 mL-Maßstab. Das Medium enthält 35,3 mmol L<sup>-1</sup> (2,19 g L<sup>-1</sup>) Nitrat sowie 5 g L<sup>-1</sup> Fruktose. Die Zellernte erfolgt nach 26 bis 28 Stunden. Nach Zentrifugation (50 min, 4800xg, 4°C) in 1L Zentrifugenbechern wird der Zellrückstand in der Natriumphosphatpuffer-Glycerin-Lösung resuspendiert, so dass die erhaltene Suspension eine optische Dichte (OD<sub>660</sub>) von 12 erreicht. Je 12 mL der Zellsuspension werden in Reaktionsgefäßen (15 mL) bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.2 Heterotrophe Kultivierung im 200 mL-Maßstab

Untersuchungen zur heterotrophen Atmung mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor sowie zur heterotrophen Nitratatmung werden im 200 mL-Maßstab in gerührten Kolben sowie in Blasensäulen durchgeführt.

##### ***Vorkulturherstellung zu Untersuchung der heterotrophen Nitratatmung im 200 mL-Maßstab***

Als Inokkulum für die Kultivierungen zur Untersuchung der heterotrophen Nitratatmung dienen Zellen aus Kultivierungen in pH-ungelegelten Rollrandflaschen (100 mL). In Abbildung 4.1 sind die Vorkulturen in den Rollrandflaschen auf einem Mehrfachrührplatz in einem PROFORS-Inkubationsschrank (Infors, Bottmingen, Schweiz) dargestellt.



**Abb. 4.1** Vorkulturen für die Untersuchung der heterotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* in Rollrandflaschen

Zur heterotrophen Kultivierung von *Cupriavidus necator* werden die Flaschen mit 40 mL Medium befüllt. Das Medium enthält  $5 \text{ g L}^{-1}$  Fruktose sowie  $35,3 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $2,19 \text{ g L}^{-1}$ ) Nitrat. Der pH des Mediums zu Beginn der Kultivierung beträgt 7,5. Als Inokkulum werden frisch aufgetaute Zellen der Stammhaltung nitratatmender Zellen im 200 mL-Maßstab verwendet. Das Animpfvolumen beträgt 1,5 mL der Zellsuspension der Stammhaltung. Die Durchmischung der Ansätze wird über Magnetrührer (Mehrfachrührplatte Variomag Poly15 mit 15 Rührplätzen; H+P, Oberschleißheim, Deutschland) bei  $200 \text{ min}^{-1}$  gewährleistet. Nach dem Befüllen der Rollrandflaschen erfolgte der luftdichte Abschluss durch ein Silikonseptum, welches mit Hilfe einer Aluminium-Bördelkappe fixiert wurde. Zur Gewährleistung anoxischer Verhältnisse zu Beginn der Kultivierung wird die verschlossene Rollrandflasche über eine Kanüle, welche mit einem Sterilfilter

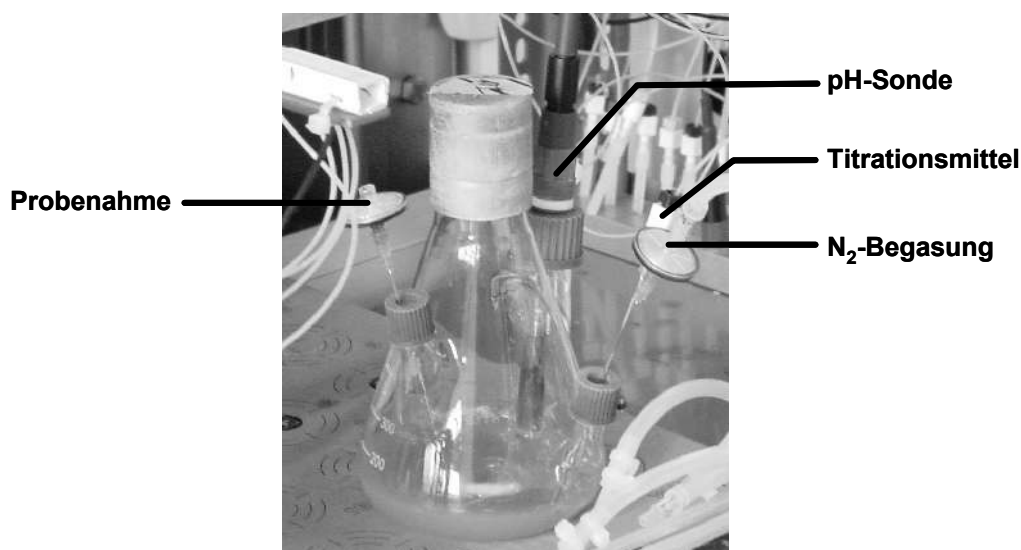
(Einmalspritzenfilter; Porengröße 0,22  $\mu\text{m}$ ) versehen ist, für 5 Minuten mit Stickstoff begast. Der Druckausgleich erfolgt über eine zweite Kanüle.

Die Kultivierung erfolgt für 24 Stunden bei 30°C. Der Wachstumsverlauf einer Vorkultur ist exemplarisch in Anhang 9.3 dargestellt.

Nach der Zellernte werden die Zellen durch Zentrifugation (30 min, 4800xg, 4°C) vom Medium abgetrennt. Der Überstand wird verworfen und die verbliebene Zellmasse in 4 mL Natriumphosphatpuffer (0,03 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,5) resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension dient als Inokulum für die heterotrophe Nitratatmung im 200 mL-Maßstab.

### ***Kultivierung in gerührten Kolben***

In Abbildung 4.2 ist ein Rührkolben in dem zur Temperierung verwendeten PROFORS-Inkubationsschrank (Infors, Bottmingen, Schweiz) zur pH-geregelten Kultivierung von *Cupriavidus necator* dargestellt.



**Abb. 4.2** pH-geregelter, gerührter Kolben zur heterotrophen Kultivierung von *Cupriavidus necator*

Der Kolben mit einem Gesamtvolumen von 500 mL ist mit einem Stutzen zur Anbringung einer pH-Sonde, sowie mit zwei weiteren Stutzen für die Zudosierung von Titrationsmittel, die Begasung mit Stickstoff oder die Probenentnahme versehen. Der sterile, sowie sauerstoffdichte Verschluss der Stutzen wird durch Silikonsepten gewährleistet. Die Kolben wurden mit einem Arbeitsvolumen von

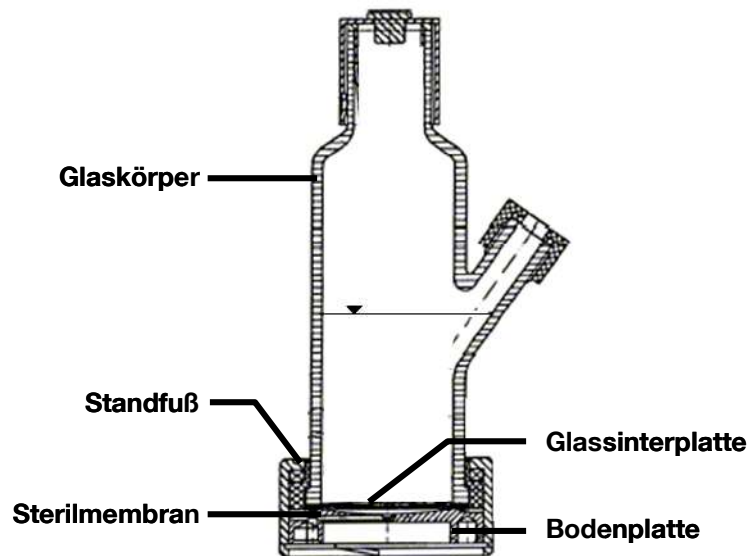
200 mL betrieben wobei die Durchmischung durch einen Magnetrührer bei  $500 \text{ min}^{-1}$  (Mehrfachrührplatte Variomag Poly15) gewährleistet wird. Die pH-Regelung erfolgte über das fedbatch-pro Fermentationssystem (DASGIP AG, Jülich, Deutschland). Dieses System bietet die Möglichkeit einer bis zu 16-fach parallelen *on-line* pH-Kontrolle, beziehungsweise -Regelung. Die Zudosierung der Titrationsmittel kann dabei über zwei Dosierstrecken realisiert werden. Bei der heterotrophen Kultivierung von *Cupriavidus necator* wird eine einseitige pH-Regelung eingesetzt. Das Titrationsmittel bei aeroben Kultivierungen ist eine  $5 \text{ mol L}^{-1}$  Natriumhydroxidlösung. Bei der Kultivierung unter nitratatmenden Bedingungen wird zum pH-Ausgleich eine 5 %-ige (w/w) Salzsäurelösung eingesetzt. Das Kalibrieren der pH-Sonden erfolgt vor jeder Kultivierung durch Zweipunktkalibration mit Standardlösungen des pH 7,0 und 9,0.

Bei Untersuchungen zur heterotrophen Nitratatmung wird der Kolben zur Vermeidung eines Sauerstoffeintritts über einen Seitenarm mit  $2 \text{ L h}^{-1}$  (0,42 vvm) Stickstoff, welcher zuvor durch einen Sterilfilter (Einmalspritzenfilter; Porengröße  $0,22 \mu\text{m}$ ) geführt wird, begast. Die Untersuchungen erfolgen bei  $30^\circ\text{C}$  und einem pH von 7,5.

Proben zu Bestimmung der optischen Dichte, der Nitrat und Nitritkonzentration sowie des Fruktose- und Ammoniumgehalt des Medium werden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Kultivierung entnommen. Die Probenahme erfolgt mit Hilfe von 1 mL Spritzen über eine Kanüle in einem weiteren Seitenarm. Zwischen den Probenahmen wird die Kanüle mit einem Sterilfilter abgedeckt.  $500 \mu\text{L}$  des Probenvolumens werden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und anschließend die Zellen durch Zentrifugation (10 min  $50000\times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) abgetrennt. Der Überstand wird zur Analyse von Nitrat, Nitrit, Fructose sowie Ammonium verwendet.

### ***Kultivierung in Blasensäulen***

Als Alternative zur parallelen Kultivierung von *Cupriavidus necator* stehen Blasensäulen zur Verfügung. In einem PROFORS-Inkubationsschrank (Infors, Bottmingen, Schweiz) können bis zu 16 Blasensäulen parallel betrieben werden. Der Vorteil dieses Systems liegt in der direkten Begasung der Kultur über eine Bodenplatte. In Abbildung 4.3 ist der schematische Aufbau einer Blasensäule dargestellt.



**Abb. 4.3 Schematischer Aufbau einer Blasensäule [nach Weuster-Botz et al. 2002]**

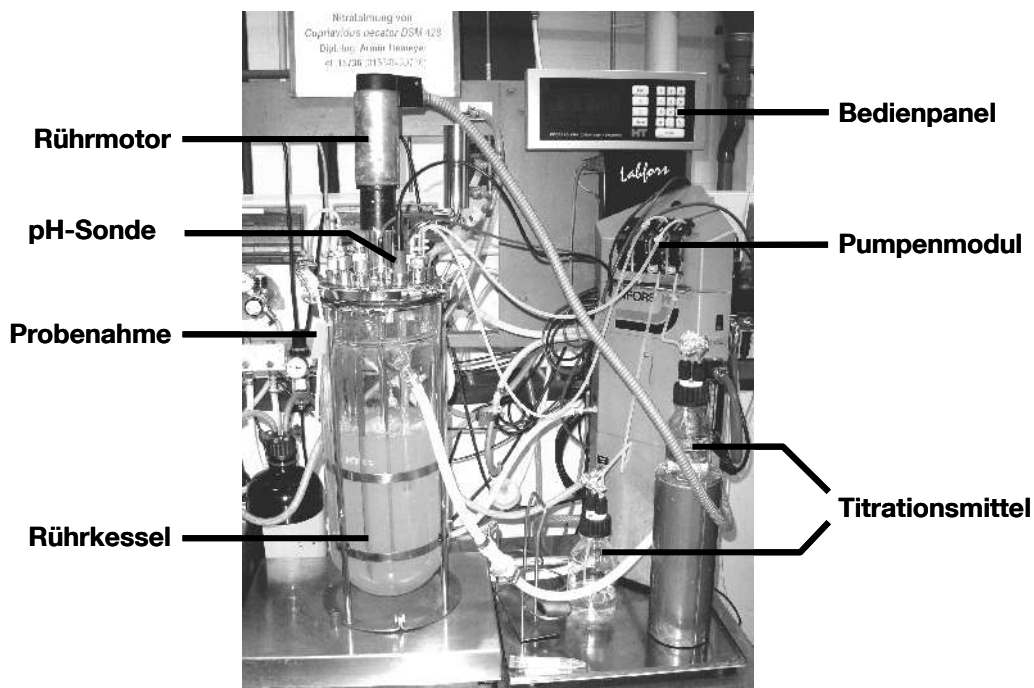
Über eine in der Bodenplatte angebrachte Bohrung erfolgt die Verbindung zwischen den Ventilen auf der Schublade der Profors-Anlage und der Blasensäule. Über die Ventile wird die Begasung der Blasensäule gewährleistet. Als Sterilbarriere befindet sich zwischen Bodenplatte und Glassinterplatte eine Sterilmembran (PTFE-Membran, Porengröße 2  $\mu\text{m}$ ). Durch die Glassinterplatte (Porendurchmesser 10  $\mu\text{m}$  bis 16  $\mu\text{m}$ ) wird die Dispergierung des zugeführten Gases in feine Blasen gewährleistet. Die Durchmischung der Blasensäule erfolgt durch die aufsteigenden Gasblasen.

Der Volumenstrom des zugeführten Stickstoffs zur Gewährleistung einer sauerstofffreien Atmosphäre wird zu  $5 \text{ L h}^{-1}$  (1,04 vvm) eingestellt. Das Arbeitsvolumen beträgt 200 mL. Die Blasensäule verfügt über einen Seitenarm zur Anbringung einer pH-Sonde, sowie über einen weiteren Stutzen zur Zudosierung des Titrationsmittels, beziehungsweise zur Entnahme von Probelösungen. Die Regelung des pH wird über das fedbatch-pro Fermentationssystem vorgenommen. Die einseitige pH-Regelung wird dabei durch die Zugabe des von  $5 \text{ mol L}^{-1}$  Natriumhydroxidlösung gewährleistet.

Vor jeder Kultivierung erfolgt die Kalibrierung der pH-Sonde durch Zweipunktkalibration mittels Standardlösungen mit einem pH von 7,0 und 9,0. Die Kultivierungen werden bei  $30^\circ\text{C}$  und pH 7,5 durchgeführt. Die Probenahme während der Kultivierung erfolgt analog zu der Vorgehensweise bei der Kultivierung in gerührten Kolben.

### 4.2.3 Heterotrophe Kultivierung im Laborbioreaktor

Zur Bereitstellung größerer Zellmassen als Vorkultur für Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* wird der Organismus unter heterotrophen Bedingungen mit simultaner Nitratatmung im 7,5 L Laborbioreaktor vom Typ Labfors (Infors, Bottmingen, Schweiz) kultiviert. Das eingesetzte Arbeitsvolumen beträgt 4 L. In Abbildung 4.4 ist der Versuchsaufbau des Laborbioreaktors für diese Anwendung dargestellt.



**Abb. 4.4 Versuchsaufbau zur heterotrophen Kultivierung von *Cupriavidus necator* mit simultaner Nitratatmung im 4 L-Maßstab im Laborbioreaktor**

Die heterotrophe Kultivierung im Rührkesselreaktor erfolgt bei 30°C und einem pH von 7,5. Zur Regelung des pH werden die Titrationsmittel  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $0,543 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sowie  $\text{NaOH}$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) eingesetzt. Die Prozesskontrolle, sowie die Regelung erfolgt mittels der Software IRIS (Infors, Bottmingen, Schweiz). Zur Gewährleistung anoxischer Verhältnisse wird der Bioreaktor während der gesamten Kultivierzeit mit einem Volumenstrom von  $0,3 \text{ L min}^{-1}$  ( $0,075 \text{ vvm}$ ) Stickstoff begast. Die Durchmischung der Zellsuspension erfolgt bei  $600 \text{ min}^{-1}$  mittels drei Sechsblassenscheibenrührer.

Vor der Zugabe des Inokkulum wird der Reaktor für 30 Minuten mit Stickstoff begast, um den im Medium gelösten Sauerstoff auszutreiben. Als Inokkulum für die heterotrophe Nitratatmung im Rührkesselreaktor dienen 24 mL frisch

aufgetaute Zellsuspension der Stammhaltung nitratatmender Zellen im 4 L-Maßstab. Das Medium zur heterotrophen Kultivierung von *Cupriavidus necator* bei simultaner Nitratatmung im Laborbioreaktor enthält  $5 \text{ g L}^{-1}$  Fruktose sowie  $35,3 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $2,19 \text{ g L}^{-1}$ ) Nitrat.

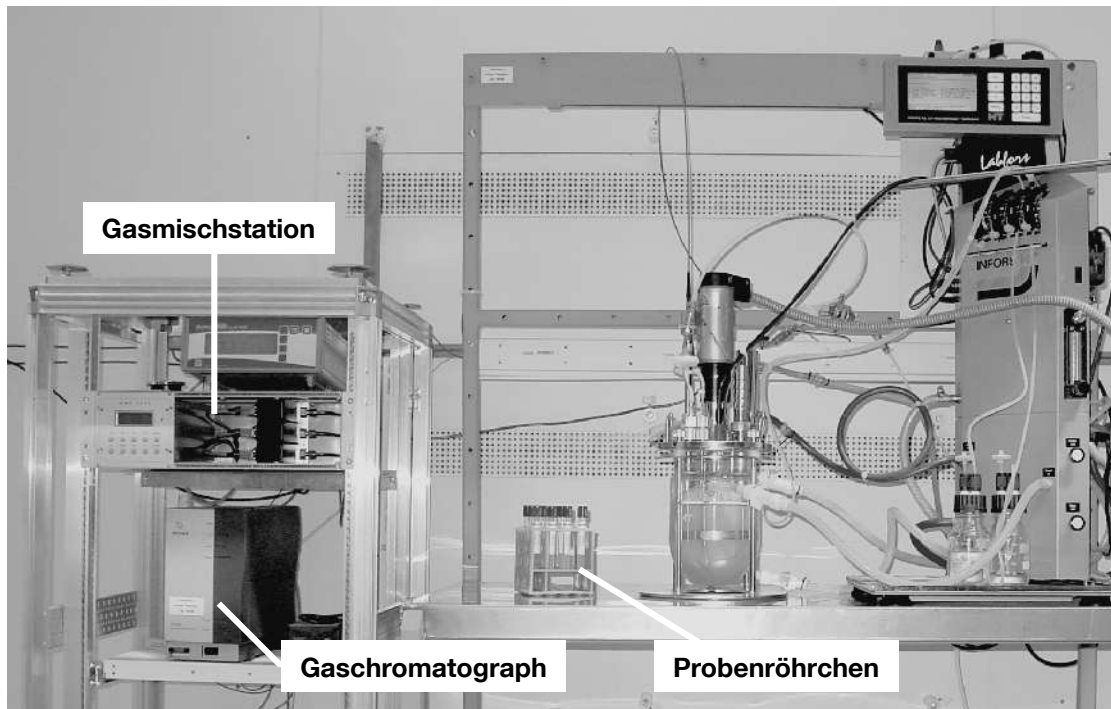
Die Zellernte erfolgt nach einer Kultivierungszeit von 26 bis 28 Stunden. Die Zellsuspension aus dem Bioreaktor wird dabei vollständig in zwei bereitgestellte, sterile, Schottflaschen (2 L) abgepumpt. Während der Zellernte wird der Bioreaktor auf  $15^\circ\text{C}$  abgekühlt.  $3,6 \text{ L}$  der Suspension werden in 4 Zentrifugenbecher (je  $800 \text{ mL}$ ) überführt. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Zellrückstände in einem Gesamtvolumen von  $20 \text{ mL}$  Natriumphosphatpuffer ( $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH } 7,0$ ) resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension dient als Inokkulum für Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung.

#### 4.2.4 Chemolithoautotrophe Kultivierung im Laborbioreaktor

Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* werden in einem  $2 \text{ L}$  Infors Laborbioreaktor (Infors, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen der Ansätze beträgt dabei  $1,2 \text{ L}$ . In Abbildung 4.5 ist der Versuchsaufbau dargestellt. Aufgrund des Einsatzes von Wasserstoff befindet sich der Versuchsaufbau in einem begehbaren Abzug mit Gaswarnsystem, sowie einer Notabschaltung.

Die kontinuierliche Versorgung des Bioreaktors mit den Gasen Wasserstoff, Kohlendioxid sowie Stickstoff erfolgt über eine Gasmischstation (Westphal Mess- und Regeltechnik, Ottobrunn, Deutschland). Stickstoff dient hierbei als Trägergas. Die Gasmischstation ist mit drei separaten Massendurchflussreglern für die einzelnen Gase ausgestattet. Die Volumenströme der drei zugeführten Gase können somit getrennt voneinander eingestellt werden. Das Gasgemisch aus Wasserstoff, Kohlendioxid sowie Stickstoff wird über einen Sterilfilter (PTFE,  $0,2 \mu\text{m}$ ) durch ein Begasungsrohr in das Medium eingeblasen. Die Volumenströme der einzelnen Gase, sowie der Gesamtvolumenstrom der einzelnen Untersuchungen sind in der Beschreibung des jeweiligen Experimentes angegeben. Um vor Beginn der Untersuchung Reste von im Medium gelöstem Sauerstoff auszutreiben, sowie zur Gewährleistung eines vollständig ausgebildeten Kohlensäuregleichgewichtes, wird der Bioreaktor für  $12 \text{ Stunden}$  vor der Zellzugabe mit dem Gasgemisch begast.





**Abb. 4.5 Versuchaufbau zur Untersuchung der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im 2 L Laborbioreaktor**

Die Analyse des Gehalts an Wasserstoff und Sauerstoff im Abgas des Laborbioreaktors wird *on-line* mittels Gaschromatographie (CP 4900 Micro-GC, Varian, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt (vergleiche Abschnitt 4.3.2). Der Probenzugang des Gaschromatographen ist direkt über ein T-Stück mit der Abgasleitung des Bioreaktors verbunden. Das T-Stück sitzt dabei unmittelbar hinter einem Sterilfilter (PTFE, 0,2  $\mu\text{m}$ ) zur Vermeidung des Partikeleintrags aus dem Reaktor in den Gaschromatographen. Die Probenahme durch den Gaschromatographen erfolgt dabei automatisch durch Ansaugen des Gases aus der Abgasleitung.

Der Rührkessel ist mit zwei Sechsblasscheibenrührern ausgestattet. Die Rührerdrehzahl während der Kultivierung beträgt konstant 800  $\text{min}^{-1}$ .

Zur Probenahme während der Kultivierung wird ein am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickeltes, schnelles Probenahmesystem eingesetzt (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität München, Garching, Patent DE 102005049226.6). Dieses Probenahmesystem ermöglicht die sterile und reproduzierbare Probenahme von 3 mL Zellsuspension mit Hilfe von Probenröhrchen (BD Vacutainer, Heidelberg, Deutschland). Die Prozesskontrolle sowie Regelung wurde durch die Software IRIS Infors, Bottmingen, Schweiz)

gewährleistet. Dabei wurden zur Regelung des pH die Titrationsmittel  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $0,543 \text{ mmol L}^{-1}$ ) sowie  $\text{NaOH}$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) eingesetzt.

Die chemolithoautotrophe Kultivierung von *Cupriavidus necator* mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor erfolgt bei  $30^\circ\text{C}$ . Der pH der einzelnen Experimente sowie die Nitratanfängskonzentration bei Untersuchungen im Satzverfahren sind im Text des jeweiligen Abschnitts angegeben.

Bei Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung im Zulaufverfahren wird dem Reaktor kontinuierlich Nitratlösung zudosiert. Die Zudosierung erfolgt durch eine peristaltische Pumpe (Mehrkanalpumpe 205U, Watson Marlow, Rommerskirchen, Deutschland). Die Pumpenkennlinie der verwendeten Pumpe ist in Anhang 9.4 dargestellt. Der Volumenstrom der zugeführten Nitratlösung beträgt  $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ . Die Konzentrationen der eingesetzten Nitratlösungen werden bei der jeweiligen Untersuchung angegeben.

Der Abgasstrom wird bei Untersuchungen im Zulaufverfahren über einen Sterilfilter (Einmalspritzenfilter; Porengröße  $0,22 \mu\text{m}$ ) in die Vorlageflasche geleitet. Dies dient zum einen zur Austreibung des Sauerstoffs und zum anderen zur Herstellung vergleichbarer gelöster Konzentrationen der Substratgase  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  in der Substratvorlage. Somit kann eine Störung des Gas-Flüssigkeitsgleichgewichtes im Bioreaktor durch die Substratzudosierung verhindert werden. Während der gesamten Kultivierung wurde die Vorlage mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt.

## 4.3 Analytik

### 4.3.1 Bestimmung der optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration

Die Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspensionen erfolgt bei einer Wellenlänge von  $660\text{nm}$  ( $\text{OD}_{660}$ ) mittels eines Einstrahlspektrophotometers (Spectrophotometer Genesys 20, Thermo Spectronic, Rochester, NY). Die Zellsuspensionen wurden nach Bedarf mit Natriumphosphatpuffer ( $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 bzw. 7,5) verdünnt, so dass der Messwert im linearen Bereich des Photometers liegt ( $\text{OD}_{660}$  0,1-0,4).

Die Biotrockenmassekonzentration ( $c_x$  [ $\text{g L}^{-1}$ ]) wird über eine Korrelation mit der optischen Dichte berechnet. Zur Bestimmung der Korrelation der  $\text{OD}_{660}$  mit der Biotrockenmassekonzentration wurde die Biotrockenmasse (BTM) von Proben

bekannter optischer Dichte gravimetrisch ermittelt. Die Bestimmung wurde mit aerob heterotroph im Schüttelkolben bei 30°C und 150 min<sup>-1</sup> (5 cm Exzentrizität) kultivierten Zellen durchgeführt. 5 mL der Zellsuspensionen verschiedener Wachstumsstadien wurden in 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (30 min, 4800xg, 4°C). Anschließend wurden die Zellen zum Auswaschen von Salz- und Medienrückständen zweimal mit 5 mL 0,03 mol L<sup>-1</sup> Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) gewaschen. Nach dem Waschen erfolgt ein Trocknen der Zellen bei 80°C im Trockenschrank für 24 Stunden.

Für *Cupriavidus necator* wurde folgende Korrelation ermittelt:

$$c_x = OD_{660} \cdot 0,688 \quad \text{Gl. 4.1}$$

#### 4.3.2 Bestimmung des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidgehalts im Abgas der chemolithoautotrophen Kultivierung im Laborbioreaktor

Die Bestimmung des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidgehalts im Abgas des Laborbioreaktors bei der chemolithoautotrophen Kultivierung erfolgt mittels Gaschromatographie (Vergleiche Abschnitt 4.2.4). Die Micro-GC (CP 4900 Micro-GC, Varian, Darmstadt, Deutschland) ist mit zwei Chromatographiesäulen ausgerüstet. Dabei dient eine Säule (MSA 10 m) der Analyse von Wasserstoff wobei die zweite Säule (PPQ 10 m) der Bestimmung von Kohlendioxid dient. Die Detektion der Gase erfolgt durch einen Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD). Vor jeder Injektion erfolgte ein Spülen der Probeschleife mit Probengas für 45 Sekunden. Die *on-line* Messung des Wasserstoff-, sowie des Kohlendioxidgehalts erfolgt im Abstand von 10 Minuten. Die Einstellungen der Micro-GC sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst

**Tab. 4.2 Einstellungen der Micro-GC zur Bestimmung des Wasserstoff- und Kohlendioxidgehalts**

	Kanal A (H <sub>2</sub> )	Kanal B (CO <sub>2</sub> )
Säulentemperatur [°C]	45	60
Injektionszeit [ms]	50	100
Backflush [s]	6	-
Druck (psi)	25	25

Die Retentionszeit von Wasserstoff betrug 15,5 Sekunden, die des Kohlendioxids 18 Sekunden. Die Gesamtanalysenzeit beträgt 45 Sekunden. Eine Kalibrierung erfolgte für einen Wasserstoffgehalt zwischen 71% und 30% sowie für einen Kohlendioxidgehalt zwischen 2,3 % und 12 %.

Mit Hilfe des bestimmten Wasserstoff- sowie Kohlendioxidgehalts lässt sich der Molenstrom der beiden Gase im Abgas bestimmen. Unter der Annahme von idealen Gasen, sowie der Annahme eines konstanten Volumenstromes der Gasmischung am Reaktor Ein- und Ausgang ( $F_{zu} = F_{ab} = F$ ) ergibt sich unter Berücksichtigung der idealen Gasgleichung:

$$\dot{n}_{ges} = \frac{p \cdot F}{R \cdot T} \quad \text{Gl. 4.2}$$

mit:

- $\dot{n}_{ges}$  = Gesamtmolenstrom der Abluft [ $\text{mol h}^{-1}$ ]
- $p$  = Gesamtdruck [ $\text{kPa}$ ] (hier 101,3 kPa)
- $F$  = Gesamtvolumenstrom [ $\text{L h}^{-1}$ ]
- $R$  = Ideale Gaskonstante ( $8,3144 \text{ kPa L mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )
- $T$  = Temperatur [ $\text{K}$ ] (hier 303,15)

Der Molenbruch ist definiert als:

$$y_i = \frac{n_i}{n_{ges}} \quad \text{Gl. 4.3}$$

mit:

- $y_i$  = Molenbruch (Anteil) der Komponente  $i$
- $n_i$  = Stoffmenge der Komponente  $i$  [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
- $n_{ges}$  = Gesamtstoffmenge [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

Somit ergibt sich für den Molenstrom einer Komponente  $i$  (hier Wasserstoff oder Kohlendioxid) im Abgas:

$$\dot{n}_i = \frac{y_i \cdot p \cdot F}{R \cdot T} \quad \text{Gl. 4.4}$$

### 4.3.3 Bestimmung von Nitrat- und Nitritkonzentrationen

Die Detektion von Nitrat und Nitrit im Medium während der Kultivierung von *Cupriavidus necator* erfolgt mittels HPLC-Analyse (High Performance Liquid Chromatographie). Die Temperatur des Säulenofens des eingesetzten HPLC-System (Smart Line HPLC, Knauer, Berlin, Deutschland) wurde zur Detektion von Nitrat und Nitrit auf 30°C eingestellt. Die Trennung der beiden Anionen erfolgt mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule (Grom-SIL SAX, Porendurchmesser 5 µm, 126x4,6 mm, Alltech Grom GmbH, Rottenburg-Hailfingen, Deutschland). Die Flussrate der mobilen Phase (70% (v/v) Acetonitril, 26% (v/v) Methanol, 4% (v/v) 100 mmol L<sup>-1</sup> Natriumchloridlösung) beträgt 1,2 mL min<sup>-1</sup>. Die aus diesen Einstellungen resultierenden Retentionszeiten sind 5 Minuten für Nitrat sowie 6,5 Minuten für Nitrit. Die Detektion der Anionen erfolgt mittels UV-Detektor bei 220 nm. Eine Kalibrierung des Analysesystems für beide Komponenten erfolgt in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,1 mg L<sup>-1</sup> und 100 mg L<sup>-1</sup> mit Hilfe von Standardlösungen (CertiPUR Standardlösungen, Merck, Darmstadt, Deutschland). Das Injektionsvolumen der Probelösung beträgt 20 µL.

### 4.3.4 Bestimmung des PHB-Gehalts von *Cupriavidus necator*

Die Bestimmung des PHB-Gehalts der Zellen basiert auf der von Karr et al. entwickelten Methode der Detektion von Crotonsäure mittels HPLC-Analyse nach saurer Hydrolyse des zellinternen PHB [Karr et al. 1983]. Die Strukturformel von Crotonsäure ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

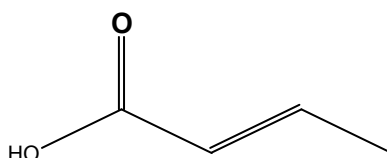


Abb. 4.6 Strukturformel von Crotonsäure

Zur Bestimmung des PHB-Gehalt von *Cupriavidus necator* werden folgende Schritte durchgeführt:

1. Zentrifugation von 1 mL Zellsuspension (10 min, 50000xg, 4°C).
2. Verwerfen des Überstandes.

3. Gefriertrocknen des Zellrückstands (24h, Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD, Martin Christ GmbH, Osterrode, Deutschland).
4. Zugabe von 0,5 mL 10 mmol L<sup>-1</sup> EDTA in 97%-98% (w/w) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
5. Hydrolyse bei 90°C für 50 min im Thermomixer (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).
6. Abkühlen der Proben auf Eis (30 min).
7. Zugabe von 0,5 mL 11,2 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
8. Bestimmung des Crotonsäuregehalts der Probe mittels HPLC-Analyse.

Die zur Analyse der Crotonsäure eingesetzte Trennsäule ist eine Aminex HPX-87H Chromatographiesäule (BioRad, München, Deutschland) zur Analyse organischer Säuren. Die Mobile Phase bei der Analyse ist Schwefelsäurelösung (5 mmol L<sup>-1</sup>) mit einer Flussrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup>. Bei einer Säulenofentemperatur von 50°C beträgt die Retentionszeit von Crotonsäure, welches bei einer Wellenlänge von 210 nm mittels UV-Detektor bestimmt wird, 22 min. Der Kalibrierbereich liegt zwischen 250 mg L<sup>-1</sup> und 12,5 mg L<sup>-1</sup>. Das Injektionsvolumen der Probelösung beträgt 20 µL

Das Verhältnis von detektierter Crotonsäure zu eingesetzter PHB-Konzentration wurde durch Umsetzungsversuche mit bekannter, vorgelegter PHB-Konzentration experimentell bestimmt. Der Zusammenhang lautet:

$$c_{\text{PHB}} = 0,9695 * c_{\text{Crotonsäure}} \quad \text{Gl. 4.5}$$

Dabei sind:

$c_{\text{PHB}}$  = Konzentration an PHB in der Ausgangsprobe [mg L<sup>-1</sup>]

$c_{\text{Crotonsäure}}$  = Konzentration der detektierten Crotonsäure [mg L<sup>-1</sup>]

### 4.3.5 Bestimmung von Fruktose und Ammoniumkonzentration

#### *Fruktoseanalyse*

Die Bestimmung der Fruktosekonzentration im Medium der heterotrophen Untersuchungen erfolgt mit Hilfe eines enzymatischen BioAnalysis Test (Test Nr. 10139106035, R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland). Der Test wurde für den Einsatz in Mikrotiterplatten modifiziert. Die Extinktionsmessungen zur

Bestimmung der Fruktosekonzentration werden im Mikrotiterplattenphotometer durchgeführt (Mikrotiterplattenphotometer EL808, Biotek-Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland). Die Kalibration erfolgt zwischen  $4,39 \text{ mg L}^{-1}$  sowie  $0,55 \text{ mg L}^{-1}$  Fruktose. Der Test wird wie in Tabelle 4.3 dargestellt durchgeführt. Aufgrund der Anpassung des Tests werden die Suspensionen 2 und 3 des Testkits vor der Verwendung 1:10 verdünnt.

**Tab. 4.3 Pipettierschema zur Analyse von Fruktose mittels Enzymtest**

<b>Lösung</b>	<b>Volumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>
Lösung 1 (NADP; ATP; $\text{MgSO}_4$ )	50
Probelösung/VE- $\text{H}_2\text{O}$	90
Suspension 2 (Hexokinase; Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase)	10
Bestimmung der extinktion (E1) nach 10 min	
Suspension 3 (Phosphocluucose-Isomerase)	10
Bestimmung der Extinktion (E2) nach 15 min	

Die Bestimmung des Leerwertes erfolgt durch zugabe von VE-Wasser zu dem Testansatz anstelle von Probelösung. Die Extinktionsdifferenz zur Bestimmung der Fruktosekonzentration ergibt sich aus:

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}} \quad \text{Gl. 4.6}$$

Aus der Extinktionsdifferenz, multipliziert mit einem Korrelationsfaktor, welcher durch Kalibration ermittelt wird lässt sich die Fruktosekonzentration der Probe berechnen.

### **Ammoniumanalyse**

Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration im Medium erfolgt ebenfalls mit Hilfe eines enzymatischen BioAnalysis Tests (Test Nr. 11 112 732 035, R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland). In Tabelle 4.4 ist die Durchführung des für den Einsatz in Mikrotiterplatten modifizierten Tests zusammengefasst. Aufgrund der Anpassung wurde die Lösung 3 des Testkits vor Verwendung 1:10 verdünnt. Die Extinktionsmessungen bei 340 nm erfolgen im Mikrotiterplattenphotometer

(Mikrotiterplattenphotometer EL808, Biotek-Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland).

**Tab. 4.4 Pipettierschema zur Analyse von Ammonium mittels Enzymtest**

<b>Lösung</b>	<b>Volumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>
Reaktionsgemisch 2* (Triethanolaminpuffer; 2-Oxoglutarat; NADH)	50
Probelösung/VE-H <sub>2</sub> O	90
Bestimmung der Extinktion (E1) nach 5 min	
Lösung 3 (Glutamat-Dehydrogenase)	10
Bestimmung der Extinktion (E2) nach 20 min	

Die Extinktionsdifferenz zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration berechnet sich aus:

$$\Delta E = (E_1 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_1 - E_2)_{\text{Leerwert}} \quad \text{Gl. 4.7}$$

die Kalibrierung des Tests erfolgt in einem Konzentrationsbereich von 0,096 mg L<sup>-1</sup> bis 4,38 mg L<sup>-1</sup> Ammonium. Durch Multiplikation des durch die Kalibration ermittelten Korrelationsfaktors mit der aus Gleichung 4.7 berechneten Extinktionsdifferenz lässt sich die Ammoniumkonzentration der Probe bestimmen.

#### 4.4 Bestimmung der Gaslöslichkeit von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>

Die Bestimmung der Gelöstgaskonzentration der Substratgase Wasserstoff und Kohlendioxid erfolgt mit Hilfe des Henryschen Gesetzes:

$$c_{i,\text{fl}} = K_{\text{H},i} \cdot p_i \quad \text{Gl. 4.8}$$

mit:

$c_{i,\text{fl}}$  = Konzentration der Komponente  $i$  in der Flüssigphase [mol L<sup>-1</sup>]

$K_{\text{H},i}$  = Henrykonstante der Komponente  $i$  [mol L<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>]

$p_i$  = Partialdruck der Komponente  $i$  in der Gasphase [Pa]



Der Partialdruck einer Komponente  $i$  in der Gasphase berechnet sich dabei aus dem Gesamtdruck:

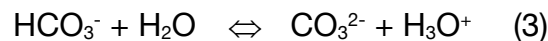
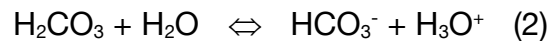
$$p_i = y_i \cdot p_{\text{ges}} \quad \text{Gl. 4.9}$$

mit:

$$\begin{aligned} p_i &= \text{Partialdruck der Komponente } i \text{ [Pa]} \\ y_i &= \text{Molenbruch (Anteil) der Komponente } i \\ p_{\text{ges}} &= \text{Gesamtdruck [Pa]} \end{aligned}$$

Die Henrykonstante bei 30°C in wässriger Lösung beträgt für Wasserstoff  $0,749 \cdot 10^{-5} \text{ mmol L}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ , für Kohlendioxid  $0,2939 \cdot 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  [Sander 1999].

Das in der Flüssigphase gelöste Kohlendioxid steht im Gleichgewicht mit Kohlensäure. Diese dissoziiert in wässrigen Lösungen zu Hydrogenkarbonat, welches wiederum in einer zweiten Dissoziationsstufe mit dem Karbonat-Ion im Gleichgewicht steht. Formal gelten folgende Zusammenhänge:



Die Dissoziationskonstanten der Gleichgewichte 2 und 3 sind definiert als:

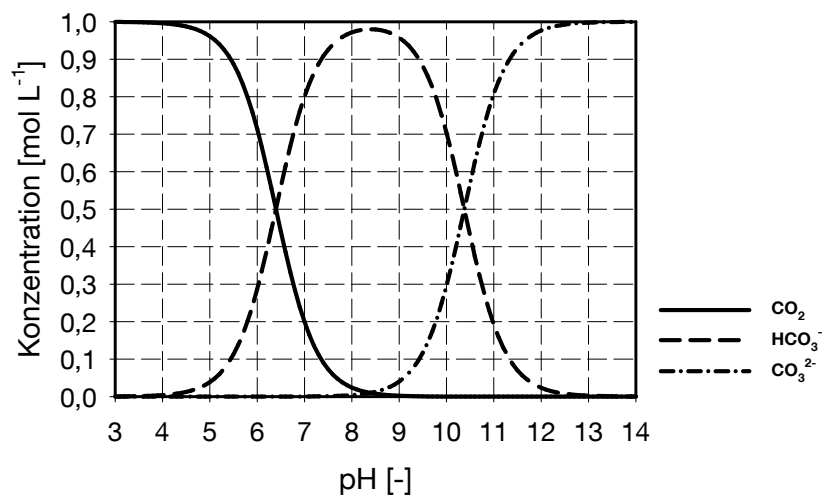
$$K_{S,2} = \frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot c_{\text{HCO}_3^-}}{c_{\text{H}_2\text{CO}_3}} \approx \frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot c_{\text{HCO}_3^-}}{c_{\text{CO}_{2,\text{fl}}}} \quad \text{Gl. 4.10}$$

$$K_{S,3} = \frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot c_{\text{CO}_3^{2-}}}{c_{\text{HCO}_3^-}} \quad \text{Gl. 4.11}$$

Dabei sind:

$K_{S,2}$	=	Dissoziationskonstante von Kohlensäure [mol L <sup>-1</sup> ]
$K_{S,3}$	=	Dissoziationskonstante von Hydrogenkarbonat [mol L <sup>-1</sup> ]
$c_{H_3O^+}$	=	Konzentration an H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> [mol L <sup>-1</sup> ]
$c_{H_2CO_3}$	=	Kohlensäurekonzentration [mol L <sup>-1</sup> ]
$c_{CO_2,fl}$	=	Konzentration an gelöstem Kohlendioxid [mol L <sup>-1</sup> ]
$c_{HCO_3^-}$	=	Bikarbonatkonzentration [mol L <sup>-1</sup> ]
$c_{CO_3^{2-}}$	=	Karbonatkonzentration [mol L <sup>-1</sup> ]

Der Anteil der vorliegenden Kohlensäureformen ist dabei von dem pH abhängig. Abbildung 4.7 zeigt die Verteilung der Konzentration an gelöstem Kohlendioxid, Bikarbonat sowie Karbonat in Abhängigkeit des pH.



**Abb. 4.7** Verteilung der Konzentration an gelöstem Kohlendioxid, Bikarbonat sowie Karbonat in Abhängigkeit des pH. (T =20°C;  $K_{S,2}=4,01 \cdot 10^{-7}$ ;  $K_{S,3}=4,19 \cdot 10^{-11}$ ; [Riedel 1994])

Nach Repaske et al. 1971 ist Hydrogenkarbonat das limitierende Substrat bei dem chemolithoautotrophen Wachstum von *Cupriavidus necator* (vergleiche Abschnitt 3.2.3) [Repaske et al. 1971]. Unter Berücksichtigung der Definition des pH:

$$pH = -\log(c_{H_3O^+})$$

Gl. 4.12

kann durch Umformen der Gleichung 4.10 bei thermodynamisch ausgebildeten Gleichgewichten die Konzentration an Hydrogenkarbonat in der Lösung berechnet werden. Für einen pH von 7 ergibt sich für die Bikarbonatkonzentration:

$$c_{\text{HCO}_3^-} = \frac{K_{\text{S},2} \cdot c_{\text{CO}_2,\text{fl}}}{10^{-\text{pH}}} \quad \text{Gl. 4.13}$$

Die Dissoziationskonstante  $K_{\text{S},2}$  von Kohlensäure in wässriger Lösung bei 30°C beträgt  $4,71 \cdot 10^{-7}$  [Weast et al. 1989-1990].

#### 4.5 Ermittlung der kinetischen Parameter der chemolithoautotrophen Nitratatmung

Die Identifikation der formalkinetischen Modellparameter sowie modellbasierte Simulationen werden mit dem am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München entwickelten Programm SiSy durchgeführt. Dieses auf Basis von MATLAB-Simulink (R2006b, Mathworks, Massachusetts) erstellte Programm erlaubt die einfache Parameteridentifikation sowie die Simulation von experimentellen Verläufen über eine graphische Benutzeroberfläche.

Zur Parameteridentifikation werden in einem ersten Schritt die experimentell bestimmten Konzentrationsverläufe interpoliert, um analytische Funktionen  $c_i(t)$ , welche den zeitabhängigen Verlauf der Komponenten  $i$  beschreiben, zu erhalten. Die berücksichtigten Verläufe sind hierbei der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration, sowie der Verlauf eines oder mehrerer limitierender Substrate. Die Interpolation erfolgt durch ein in dem Programm SiSy implementiertes Artifizielles Neuronales Netzwerk (ANN). Mit Hilfe der interpolierten Verläufe kann die Steigung  $S$  der Konzentrationsverläufe der Komponente  $i$  zu jedem Zeitpunkt  $t$  abgeschätzt werden. Es gilt:

$$S_i(t) = \frac{dc_i}{dt} \quad \text{Gl. 4.14}$$

mit:

- $S_i(t)$  = Steigung zum Zeitpunkt  $t$
- $c_i$  = Konzentration der Komponente  $i$
- $t$  = Prozesszeit

Mit den geschätzten Steigungen und den experimentell ermittelten Daten zu  $n$  Zeitpunkten wird ein System nichtlinearer Gleichungen für jede Komponente  $i$  (1 bis  $m$ ) erhalten:

$$S_i(t_1) = f_i[c_1(t_1), \dots, c_m(t_1), p]$$

...

$$S_i(t_n) = f_i[c_1(t_n), \dots, c_m(t_n), p]$$

**Gl. 4.15**

mit:

$f_i$  = Rechte Seite der Massenbilanzgleichung (vergleiche Abschnitt 3.3.1)

$p$  = Modellparameter

Hierbei stellen die Modellparameter  $p$  die einzigen Unbekannten dar.

Zur Lösung der multivariaten Regression wird ein einfacher genetischer Algorithmus (GA) mit 300 Individuen, Zweipunkt-Crossover, sowie einer Mutationswahrscheinlichkeit von 2% eingesetzt. Die Generationszahl des implementierten GA beträgt 50. Das System der nichtlinearen Gleichungen wird dabei für jede Komponente  $i$  separat gelöst (Entkopplung der abhängigen Differentialgleichungen).

Die durch die Entkopplung abgeschätzten Parameter dienen anschließend als Startwerte für einen Nelder Mead Simplex Algorithmus zur Minimierung der Fehlerquadratsumme (FQS) zwischen Modellvorhersage und experimentell ermittelten Daten. Aufgrund der guten Parameterschätzung der globalen Suchverfahren (ANN und GA) werden mit dem Nelder Mead Simplex Algorithmus, welches ein lokales Suchverfahren darstellt, nach 100 bis 200 Iterationsschritten minimale Fehlerquadratsummen, und somit eine verlässliche Bestimmung der kinetischen Parameter erreicht.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Heterotrophe Voruntersuchungen

Das Ziel der heterotrophen Voruntersuchungen war die Charakterisierung der Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Da über das Wachstum des Organismus während der anaeroben Nitratatmung bislang kaum Daten zur Verfügung stehen, sollte durch die Vorversuche zunächst ein besseres Verständnis dieser Atmungsweise erlangt werden.

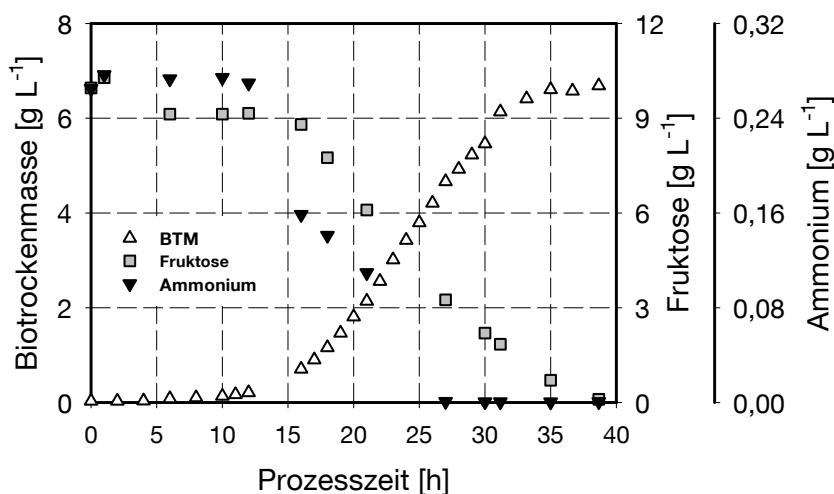
Heterotrophe Untersuchungen im 200 mL-Maßstab sind mit vergleichsweise geringem Aufwand reproduzierbar zu realisieren und können im Parallelansatz durchgeführt werden. Aufgrund der Sicherheitsbestimmungen bei der Arbeit mit Wasserstoff war ein Einsatz eines Parallelsystems für Untersuchungen unter chemolithoautotrophen Bedingungen nicht möglich. Daher wurden Einflüsse, wie beispielsweise die Medienzusammensetzung unter heterotrophen Bedingungen untersucht und anschließend, soweit möglich, auf autotrophe Verhältnisse übertragen.

#### 5.1.1 Aerobe Referenzkultivierung

Um eine erste Charakterisierung des Wachstums von *Cupriavidus necator* durchzuführen, wurde der Organismus unter aerob, heterotrophen Bedingungen mit Fruktose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Als Inokulum für die Untersuchungen dienten frisch aufgetaute Gefrierkulturen aus der aeroben Stammhaltung (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Kultivierung erfolgte im pH-geregelten Rührkolben (pH 7,5) mit einer Fruktosekonzentration von  $10 \text{ g L}^{-1}$  zu Beginn der Untersuchung. In Abbildung 5.1 sind der Wachstumsverlauf, sowie der Verlauf der Fruktose- und Ammoniumkonzentration im Medium während der Kultivierung dargestellt. Für diese Untersuchungen wurde der Stamm *Cupriavidus necator* DSM 531 eingesetzt.

Zu Beginn der Kultivierung ist eine 12-stündige stationäre lag-Phase zu beobachten. Nach dieser Phase geht der Organismus in das exponentielle Wachstum über. Nach einer Prozesszeit von 27 Stunden ist das im Medium vorgelegte Ammonium ( $0,26 \text{ g L}^{-1}$ ) vollständig verbraucht. Trotz der Ammoniumlimitation ist im weiteren Verlauf eine Zunahme der

Biotrockenmassekonzentration zu beobachten. Wie unter Abschnitt 3.5.2 beschrieben ist der Mikroorganismus in der Lage, unter Ammoniumlimitation, sowie bei einer im Überschuss vorliegenden Kohlenstoffquelle, den Speicherstoff PHB zu akkumulieren. Zum Zeitpunkt des Ammoniumverbrauch lagen im Medium noch  $3,25 \text{ g L}^{-1}$  Fruktose vor. Es ist daher anzunehmen, dass die Zunahme der Biotrockenmasse in der Phase ohne externe Stickstoffquelle auf die Bildung des Speicherstoffes PHB zurückzuführen ist, nicht aber auf eine weitere Zunahme der Zellzahl.



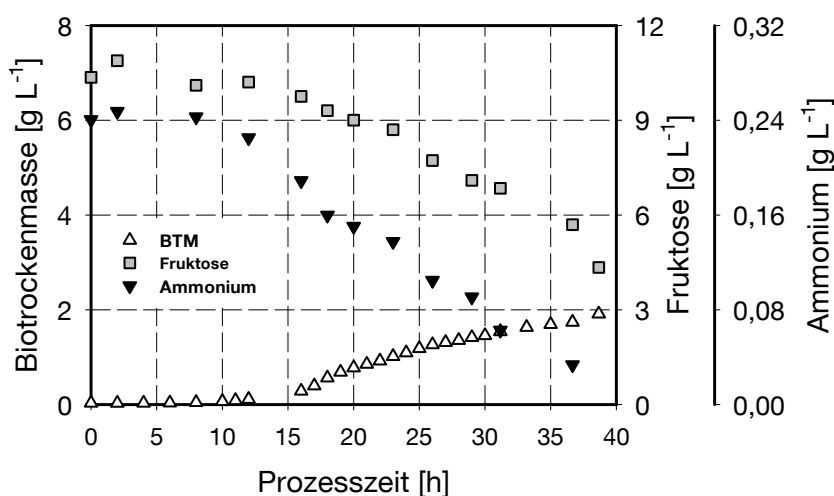
**Abb. 5.1** Wachstumsverlauf sowie Ammonium- und Fruktoseverbrauch von *Cupriavidus necator* bei aerober Atmung

Die maximale Wachstumsrate in der exponentiellen Phase wurde mit Hilfe von Gleichung 3.19 zu  $0,2 \text{ h}^{-1}$  abgeschätzt. Dieser Wert ist geringer als die in der Literatur beschriebene maximale Wachstumsrate von  $0,31 \text{ h}^{-1}$  bei der Verwertung von Fruktose unter aeroben Bedingungen [König und Schlegel 1968]. Es ist zu beachten, dass die vorliegenden Untersuchungen in einem gerührten Kolben ohne Sauerstoffkontrolle durchgeführt wurden. Inwiefern eine Sauerstofflimitierung vorlag wurde nicht bestimmt.

Bis zum Zeitpunkt des vollständigen Ammoniumverbrauches konnte eine Biomassezunahme von  $4,6 \text{ g L}^{-1}$  erreicht werden. Während dieser Zeit wurden  $6,7 \text{ g L}^{-1}$  Fruktose sowie  $0,26 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium verbraucht. Dies entspricht einem Ertrag  $Y_{X,\text{Fruktose}}$  von  $0,69 \text{ g}_{\text{BTM}} (\text{g}_{\text{Fruktose}})^{-1}$  sowie einem Ertrag  $Y_{X,\text{NH}_4^+}$  von  $17,42 \text{ g}_{\text{BTM}} (\text{g}_{\text{Ammonium}})^{-1}$ .

### **Aerobes Wachstum unter der Anwesenheit von Nitrat im Medium**

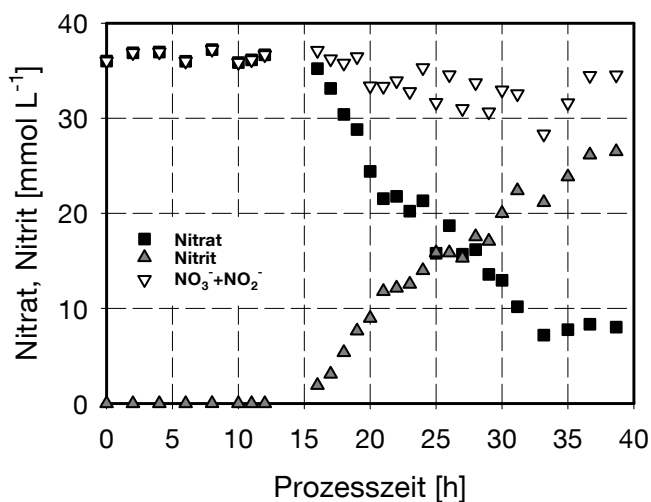
Zur Untersuchung des Einflusses von Nitrat auf das aerobe, heterotrophe Wachstum wurde einem weiteren Ansatz  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat zugegeben. Die Kultivierung dieses Ansatzes erfolgte erneut unter aeroben Bedingungen in pH-geregelten Rührkolben (pH 7,5). In Abbildung 5.2 sind der Wachstumsverlauf, sowie der Verlauf der Fruktose- und Ammoniumkonzentration während der Kultivierung unter Anwesenheit von Nitrat im Medium dargestellt.



**Abb. 5.2 Wachstumsverlauf sowie Ammonium- und Fruktoseverbrauch von *Cupriavidus necator* bei aerober Atmung unter Anwesenheit von Nitrat im Medium**

Es zeigt sich, dass die Anwesenheit von Nitrat im Medium zu einer starken Verlangsamung des Wachstums führt. Nach einer 12-stündigen lag-Phase, welche somit dem Ansatz ohne Nitrat im Medium vergleichbar ist, wird eine maximale Wachstumsrate von  $0,11 \text{ h}^{-1}$  erreicht. Dies entspricht einer Reduktion von annähernd 50% im Vergleich zu dem Ansatz ohne Nitrat im Medium. Nitrat zeigt somit eine negative Auswirkung auf das aerobe Wachstum von *Cupriavidus necator*.

In Abbildung 5.3 ist der Verlauf der Nitrat- sowie Nitritkonzentration im Medium dargestellt. Der Organismus ist auch unter aeroben Bedingungen in der Lage Nitrat bis zur Zwischenstufe Nitrit zu reduzieren. Die Summenkurve von Nitrat und Nitrit zeigt, dass im Rahmen der Messgenauigkeit kein weiterer Verbrauch des gebildeten Nitrits zu beobachten ist. Es ist anzunehmen, dass die beobachtete Nitratreduktion auf eine Reduktion durch die periplasmatische Nitratreduktase (NAP) zurückzuführen ist, deren Aktivität auch unter aeroben Bedingungen nachgewiesen wurde [Warnecke-Ebert und Friedrich 1992].



**Abb. 5.3** Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der aeroben, heterotrophen Kultivierung unter der Anwesenheit von Nitrat

Inwiefern das verlangsamte Wachstum in der hier beschriebenen Untersuchung auf eine Inhibition durch Nitrat, oder auf eine Änderung der Stoffwechselwege von *Cupriavidus necator* durch die einsetzende Nitratreduktion zurückzuführen ist, kann nicht bestimmt werden. Darüber hinaus ist es möglich, dass eine Inhibition des Wachstums aufgrund der Akkumulation von Nitrit im Medium vorliegt.

Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 38,7 Stunden konnte im Gegensatz zu der Untersuchung ohne Nitrat im Medium kein vollständiger Verbrauch der vorgelegten Fruktose sowie des Ammoniums beobachtet werden. Der Biomassezuwachs bei diesem Ansatz betrug 1,88 g L<sup>-1</sup>. Dabei wurden 6,02 g L<sup>-1</sup> Fruktose sowie 0,207 g L<sup>-1</sup> Ammonium verbraucht. Die abgeschätzten Ertragskoeffizienten sind dabei mit  $Y_{X,\text{Fruktose}} = 0,31 \text{ g}_{\text{BTM}} (\text{g}_{\text{Fruktose}})^{-1}$ , sowie  $Y_{X,\text{NH}_4^+} = 9,08 \text{ g}_{\text{BTM}} (\text{g}_{\text{Ammonium}})^{-1}$  ebenfalls geringer als bei dem Ansatz ohne Nitrat im Medium.

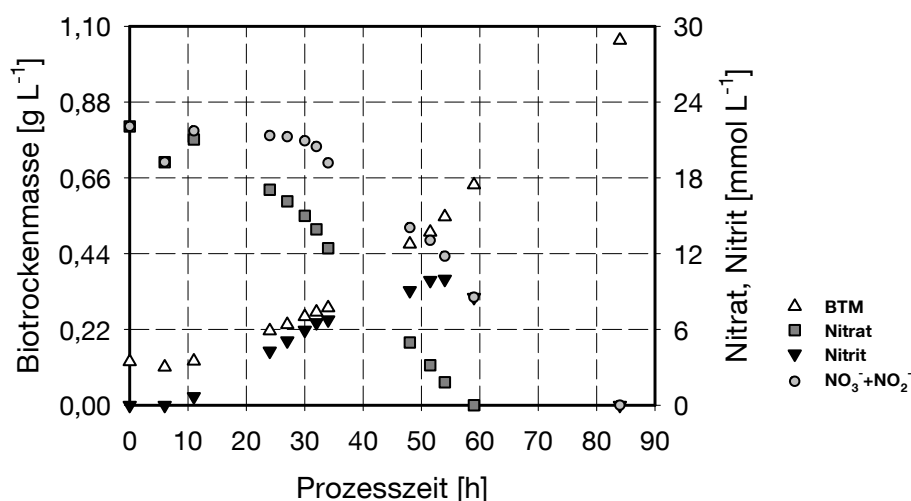
Es ist bekannt, dass *Cupriavidus necator* während des heterotrophen Wachstums mit Fruktose in der Lage ist, Enzyme des chemolithoautotrophen Stoffwechsels zu exprimieren [Friedrich et al. 1981]. Da unter Anwesenheit von Nitrat auch Nitratreduktion nachgewiesen werden konnte, wurde zunächst angenommen, dass eine unter heterotrophen, aeroben Bedingungen mit Nitrat im Medium gewachsene Kultur geeignet ist, um für Kultivierungen unter chemolithoautotrophen Bedingungen mit anaerober Nitratatmung als Inokulum zu dienen.



Unter chemolithoautotrophen Bedingungen konnte jedoch auch nach mehrtägiger Inkubation nach der Inokkulation mit der oben beschriebenen Vorkultur kein Wachstum beobachtet werden. Kulturen, welche unter diesen Bedingungen kultiviert wurden, eignen sich demnach nicht als Inokkulum für Untersuchungen unter chemolithoautotrophen Bedingungen bei simultaner Nitratatmung.

### 5.1.2 Heterotrophe Nitratatmung - Referenzkultivierung

Die heterotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator* wurde in pH-geregelten, gerührten Kolben (pH 7,5) untersucht. Zur Gewährleistung einer sauerstofffreien Atmosphäre wurde der Kolben mit Stickstoff begast. Der Kolben wurde mit einer unter heterotropher Nitratatmung gewachsenen Vorkultur beimpft. Zu Beginn der Kultivierung lagen im Medium  $22,1 \text{ mmol L}^{-1}$  (entspricht  $1,37 \text{ g L}^{-1}$ ) Nitrat vor. Für die Untersuchungen wurde erneut der Stamm DSM 531 eingesetzt.



**Abb. 5.4 Wachstumsverlauf sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration der heterotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator***

Wie in Abbildung 5.4 zu sehen, setzt das Wachstum nach einer 12-stündigen lag-Phase ein. In der darauf folgenden Wachstumsphase kann eine Akkumulation von Nitrit im Medium beobachtet werden. Die maximale Nitritkonzentration wird mit  $9,98 \text{ mmol L}^{-1}$  nach einer Prozesszeit von 54 Stunden erreicht. Die maximal in das Medium abgegebene Menge Nitrit entspricht dabei 45 % mol/mol der ursprünglich dem Medium zugegebenen Menge an Nitrat. Bereits nach 34 Stunden ist eine deutliche Abnahme der Nitrat- und Nitritgesamtmenge zu beobachten. *Cupriavidus necator* ist also in der Lage Nitrat und Nitrit simultan zu

veratmen. Dabei verläuft die Nitratreduktion schneller als die Nitritreduktion, woraufhin es zu einer Akkumulation von Nitrit im Medium kommt. Die Akkumulation an Nitrit kann darüber hinaus auf eine größere Affinität des Organismus bezüglich Nitrat oder eine Inhibition der Nitritreduktase durch das vorgelegte Nitrat zurückgeführt werden.

Die oben beschriebene Abnahme der Nitrat- Nitritgesamtbilanz tritt erst nach einer Kultivierungszeit von 34 Stunden ein. Bis zu diesem Zeitpunkt wird ausschließlich Nitrat als Elektronenakzeptor für den Energiegewinn genutzt. Da als Impfgut für die hier beschriebene Untersuchung heterotrophe, unter Nitratatmung gewachsene Zellen eingesetzt wurden, ist davon auszugehen, dass zu Beginn der Kultivierung alle Enzymsysteme für eine vollständige Nitratreduktion bis zu molekularem Stickstoff funktionsfähig vorlagen.

Nach einer Zeit von 59 Stunden kann kein Nitrat im Medium mehr nachgewiesen werden. Bei dem Übergang auf reine Nitritatmung ab diesem Zeitpunkt kann keine weitere stationäre Phase, wie sie für eine Diauxie charakteristisch wäre, beobachtet werden. Nach einer Zeit von 84 Stunden kann kein Nitrit im Medium nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass der vollständige Nitritverbrauch nach einer Prozesszeit zwischen 70 und 80 Stunden stattgefunden hat. Der genaue Endpunkt der Kultivierung wurde nicht bestimmt. Die Biomassezunahme während des Wachstums betrug  $0,933 \text{ g L}^{-1}$ .

Es zeigt sich, dass das Wachstum von *Cupriavidus necator* unter anaerober Nitratatmung im Vergleich zu der Atmung mit Sauerstoff stark eingeschränkt ist. Die mit Gleichung 3.19 bestimmte maximale Wachstumsrate in der Phase reiner Nitratatmung beträgt  $0,037 \text{ h}^{-1}$ . Dies sind nur etwa 18,5% der unter aeroben Bedingungen beobachteten maximalen Wachstumsrate. Es ist zu beachten, dass die hier vorgenommenen Abschätzungen der Wachstumsrate lediglich als Anhaltspunkt für einen Vergleich der unterschiedlichen Atmungsarten dienen sollen. Diese Wachstumsraten können von den realen Wachstumsraten, welche beispielsweise mit Untersuchungen unter stationären Bedingungen bestimmt werden, stark abweichen.

Betrachtungen bezüglich Ammonium- sowie Fruktoseverbrauch wurden zu diesem Zeitpunkt nicht durchgeführt. Die unter 5.1.1 beschriebenen Untersuchungen zur aeroben Kultivierung deuten jedoch darauf hin, dass keine der beiden Komponenten aufgrund der geringen Biomassezunahme limitierend auf das Wachstum gewirkt haben.

### 5.1.3 Einfluss der Nitratanfängskonzentration auf die heterotrophe Nitratatmung

Untersuchungen zur Nitratatmung anderer Mikroorganismen (z.B. *Pseudomonas denitrificans*) haben gezeigt, dass ein Überschuss an Nitrat zu einer Inhibition des Wachstums führt [Wang et al. 1995; Vasiliadou et al. 2006]. Zur Untersuchung des Einflusses der Nitratkonzentration auf die heterotrophe Nitratatmung wurde *Cupriavidus necator* unter dem Einfluss verschiedener Nitratanfängskonzentrationen im Satzverfahren in pH-geregelten Rührkolben (pH 7,5) kultiviert. Zusätzlich zu dem unter 5.1.2 beschriebenen Referenzansatz mit 22,1 mmol L<sup>-1</sup> Nitrat im Medium wurden Untersuchungen mit einer Nitratanfängskonzentration von 12,4 mmol L<sup>-1</sup> (0,77 g L<sup>-1</sup>); 34,7 mmol L<sup>-1</sup> (2,15 g L<sup>-1</sup>) sowie 61,5 mmol L<sup>-1</sup> (3,81 g L<sup>-1</sup>) durchgeführt. Die Biotrockenmasse zu Beginn der Kultivierungen lag zwischen 0,104 g L<sup>-1</sup> und 0,129 g L<sup>-1</sup>. Ein Einfluss der Start-Biotrockenmasse auf die Ergebnisse der Untersuchung kann somit ausgeschlossen werden.

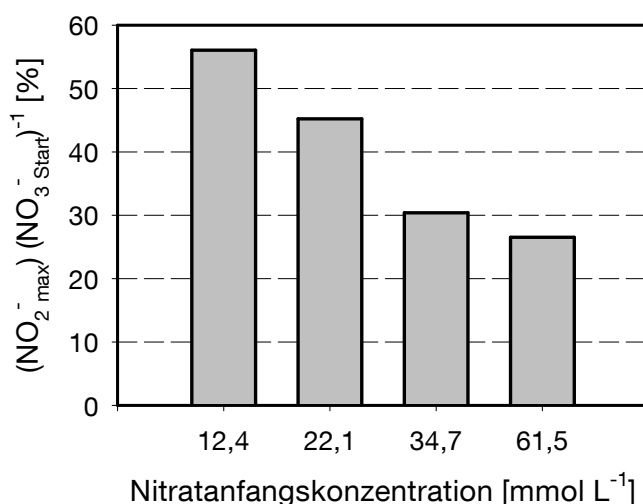
In Tabelle 5.1 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst. Die Wachstumsverläufe, sowie die Verläufe der Nitrat- und Nitritkonzentration sind Anhang 9.5 zu entnehmen. Die dargestellten maximalen Wachstumsraten wurden erneut mit Hilfe von Gleichung 3.19 während der reinen Nitratatmungsphase abgeschätzt. Für den Ansatz mit einer Nitratanfängskonzentration von 12,4 mmol L<sup>-1</sup> Nitrat im Medium konnte aufgrund einer nur kurzen Wachstumsphase unter reiner Nitratatmung nach der stationären Phase keine Abschätzung der maximalen Wachstumsrate vorgenommen werden. Als Endpunkt der Untersuchungen ( $t_{\text{Ende}}$ ) wurde der Zeitpunkt definiert, an dem kein Nitrat oder Nitrit mehr im Medium nachgewiesen werden kann.

**Tab. 5.1 Vergleich der Endpunkte der heterotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* mit variierender Nitratanfängskonzentration**

$C_{0,\text{NO}_3^-}$ [mmol L <sup>-1</sup> ]	$C_{\text{max},\text{NO}_2^-}$ [mmol L <sup>-1</sup> ]	$t_{\text{Ende}}$ [h]	$\mu_{\text{max}}$ [h <sup>-1</sup> ]	$\Delta C_X$ [g L <sup>-1</sup> ]
12,4	7,2	48	-	0,414
22,1	9,98	-	0,037	0,933
34,7	10,54	54	0,046	0,933
61,5	16,3	102	0,026	0,237

Es zeigt sich, dass die maximal in das Medium abgegebene Nitritkonzentration mit steigender Nitratanfängskonzentration ansteigt. Der Anstieg verläuft dabei nicht proportional zum Anstieg der Nitratkonzentration. Wie in Abbildung 5.5 zu sehen beträgt der Anteil an Nitrit, bezogen auf die zu Beginn der Kultivierung eingesetzte Menge an Nitrat, bei dem Ansatz mit der geringsten Nitratkonzentration ( $12,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 56 %. Dieser Anteil nimmt mit steigender Nitratanfängskonzentration ab (siehe Abbildung 5.5).

Bei dem Ansatz mit einer Nitratanfängskonzentration von  $61,5 \text{ mmol L}^{-1}$  beträgt der Anteil des in das Medium abgegebenen Nitrit lediglich 26,5 %. Dies bestätigt die unter 5.1.2 beschriebenen Beobachtungen, dass *Cupriavidus necator* in der Lage ist, Nitrat und Nitrit simultan als Elektronenakzeptor zu nutzen. Die Zunahme der im Medium akkumulierten Nitritkonzentration mit steigender Nitratanfängskonzentration zeigt wiederum, dass die Nitratveratmung schneller verläuft als die darauf folgende Nitritreduktion.



**Abb. 5.5 Vergleich des Anteils der maximal in das Medium abgegebenen Nitritmenge im Verhältnis zur Nitratanfängskonzentration**

Bezüglich der maximal bestimmbarer Wachstumsrate stellt der Ansatz mit  $34,7 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration ( $\mu_{\text{max}} = 0,046 \text{ h}^{-1}$ ) ein Maximum dar. Die maximale Wachstumsrate des Ansatzes mit  $61,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat im Medium ist mit  $0,026 \text{ h}^{-1}$  um mehr als 50 % reduziert. Es ist zu beachten, dass bei diesem Ansatz zum Endzeitpunkt der Untersuchungen (102 h) noch  $46,7 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat sowie  $16,3 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrit im Medium vorlagen. Eine vollständige Veratmung des vorgelegten Nitrats konnte im beschriebenen Untersuchungszeitraum nicht beobachtet werden. Der verminderte Nitratabbau ( $14,8 \text{ mmol L}^{-1}$  in 102 Stunden),

sowie die deutlich geringere Zunahme an Biotrockenmasse deuten auf eine Inhibition durch das vorgelegte Nitrat hin.

Die maximale Wachstumsrate des Ansatzes mit einer Nitratanfängskonzentration von  $22,1 \text{ mmol L}^{-1}$  ist mit  $0,037 \text{ h}^{-1}$  nur geringfügig kleiner als bei dem Ansatz mit  $34,7 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration. Darüber hinaus kann bei diesen beiden Ansätzen eine identische Biomassezunahme beobachtet werden. Diese Beobachtung könnte auf einen negativen Einfluss der Nitratanfängskonzentration auf den Zellertrag, nicht aber auf die maximale Wachstumsrate im untersuchten Konzentrationsbereich zurückzuführen sein. Die starken Abweichungen in der beobachteten Prozesszeit bis zu einem vollständigen Verbrauch von Nitrat und Nitrit dieser beiden Ansätze können nicht eindeutig erklärt werden. Nach einer Prozesszeit von 59 Stunden konnte bei dem Ansatz mit  $22,4 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration noch  $8,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrit nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache für das verlangsamte Wachstum dieses Ansatzes könnte in einem früheren Einsetzen einer Nitratlimitation durch die geringere Vorlage des Elektronenakzeptors im Medium zurückzuführen sein.

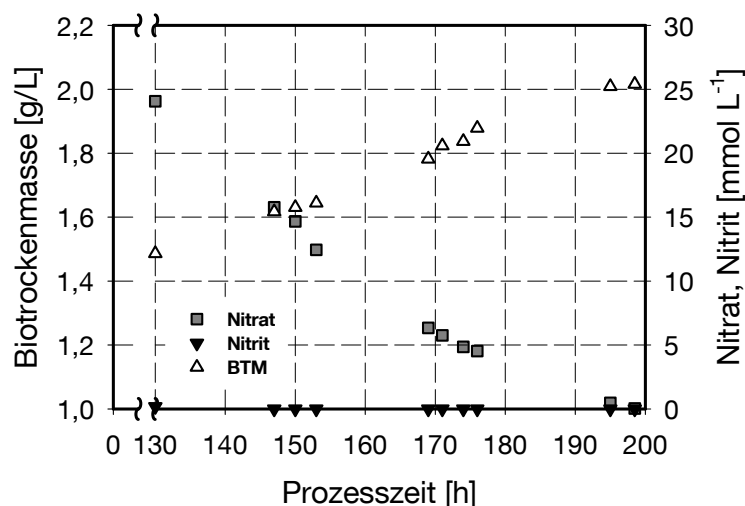
#### **5.1.4 Einfluss der Medienkonzentration auf die heterotrophe Nitratatmung**

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität lebender Kulturen von *Cupriavidus necator* wurde dem unter 5.1.3 beschriebenen Ansatz mit  $34,7 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration nach 130 Stunden Gesamtinkubationszeit erneut steril Nitrat zugegeben. Die Nitratkonzentration im Medium betrug nach der Zugabe  $24,1 \text{ mmol L}^{-1}$ . Die Inkubationszeit der Kultur ohne Elektronenakzeptor betrug 71 Stunden. Während dieser Zeit wurde der Ansatz weiterhin mit Stickstoff begast um ein Eintreten von Sauerstoff in das Kulturgefäß zu verhindern.

Es ist bekannt, dass *Cupriavidus necator* ohne Aktivitätsverlust über längere Zeit (bis zu 30 Tage) bei Raumtemperatur ohne Kohlenstoffquelle unter Anwesenheit von Sauerstoff, kultiviert werden kann. Die Lagerung unter Sauerstoffausschluss führte über den selben Zeitraum zu einem Aktivitätsverlust von lediglich 50% [Repaske et al.1971].

Da Zellen, welche unter heterotropher Nitratatmung herangezogen werden, als Inokulum für Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung eingesetzt werden sollen, könnte eine stabile Langzeitkultur zu einer ständigen Verfügbarkeit von *Cupriavidus necator* für Folgeuntersuchungen führen. Eine

zeitaufwendige Aufzucht des Inokkulum für jede chemolithoautotrophe Kultivierung wäre somit nicht erforderlich. In Abbildung 5.6 ist der Wachstumsverlauf, sowie der Verlauf von Nitrat- und Nitritkonzentration der Langzeitkultur, nach der erneuten Nitratzugabe dargestellt.



**Abb. 5.6** Wachstumsverlauf sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration der heterotrophen Nitratatmung einer Langzeitkultur von *Cupriavidus necator* nach erneuter Nitratzugabe (bei  $t = 130$  h)

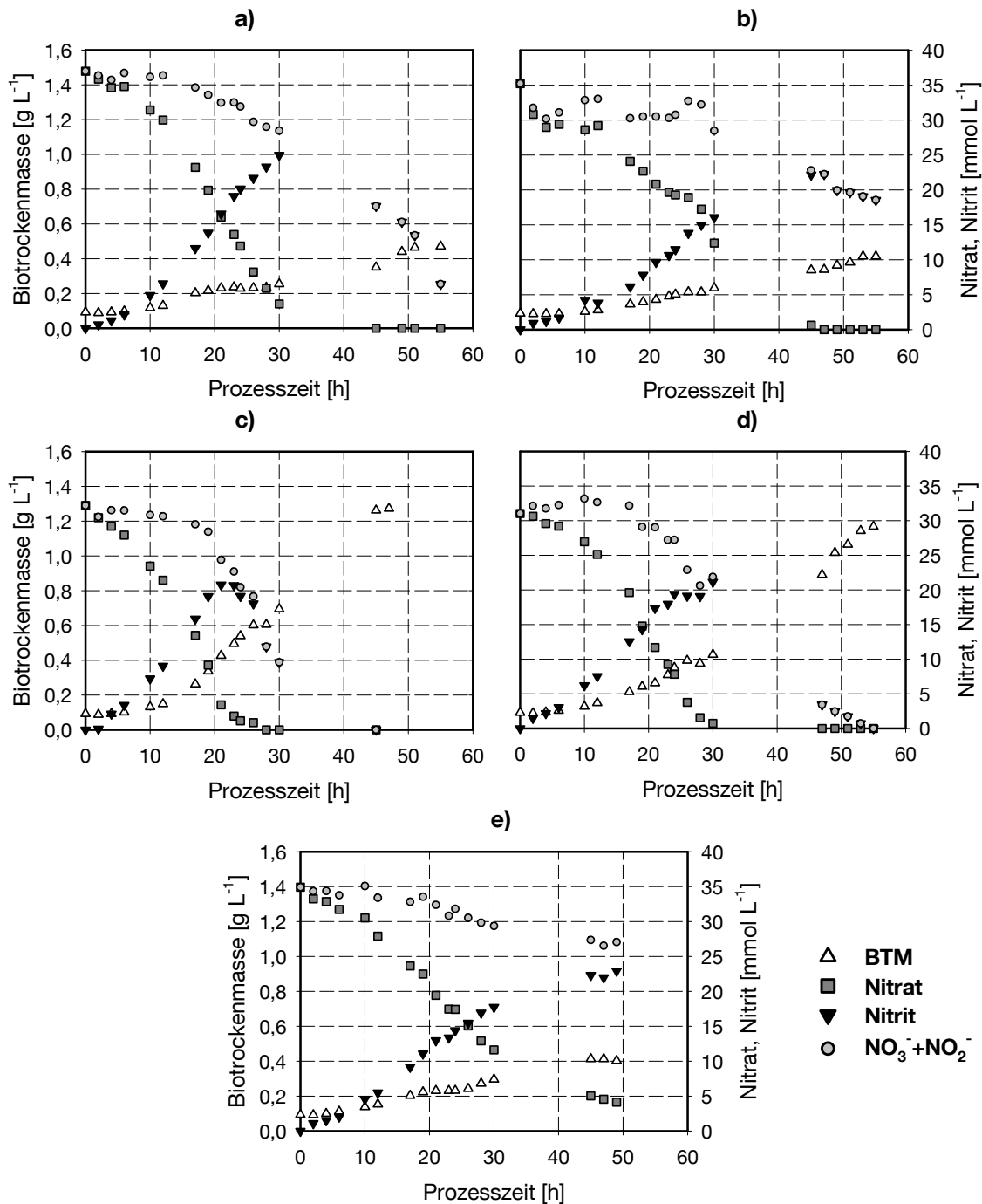
Wie zu sehen ist, setzt das Wachstum unmittelbar nach der erneuten Nitratzugabe ein. Dabei kommt es im Gegensatz zu den bisherigen Beobachtungen zu keiner Nitritakkumulation im Medium. Dies deutet darauf hin, dass nach der Inkubationszeit ohne terminalen Elektronenakzeptor die Nitritreduktion mit gleicher Geschwindigkeit wie die Nitratreduktion verläuft. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass eine, oder mehrere Medienkomponenten zu Beginn der Satzkultivierung inhibierend auf die Nitritreduktase wirken. Aufgrund des Wachstums, welches den hier beschriebenen Untersuchungen vorangegangen war, könnte diese inhibierende Komponente bereits soweit verbraucht sein, dass die Nitritreduktase mit voller Aktivität arbeiten kann. Es ist zu beachten, dass das eingesetzte Medium auf Wachstumsuntersuchungen unter chemolithoautotrophen, aeroben Bedingungen zurückzuführen ist. Ein möglicher negativer Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Nitratatmung kann somit nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Ursache für das Ausbleiben der Nitritakkumulation könnte in einer durch die Inkubationszeit ohne Elektronenakzeptor hervorgerufene Änderung des Stoffwechsels von *Cupriavidus necator* liegen.

Nach einer Kultivierungszeit von 198,5 Stunden (68,5 Stunden nach der erneuten Nitratzugabe) kann kein Nitrat mehr im Medium nachgewiesen werden. Bis zu diesem Zeitpunkt war eine erneute Biomassezunahme von  $0,53 \text{ g L}^{-1}$  zu beobachten. Dies entspricht lediglich 56 % der unter 5.1.2 beschriebenen Biomassezunahme des Referenzansatzes, welchem zu Beginn der Kultivierung mit  $22,1 \text{ mmol L}^{-1}$  eine vergleichbare Menge an Nitrat für den Energiegewinn zur Verfügung stand. Darüber hinaus betrug die maximal beobachtete Wachstumsrate  $0,005 \text{ h}^{-1}$  und ist somit um 86,5 % geringer als bei dem Referenzansatz.

### **Untersuchungen in verdünntem Medium**

Die hier beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass es unter heterotrophen Bedingungen bei simultaner Nitratatmung nicht möglich ist, *Cupriavidus necator* über längere Zeit unter Ausschluss eines Elektronenakzeptors ohne Änderung des Wachstumsverhaltens zu lagern. Die beobachteten Zellausbeuten, sowie die maximale Wachstumsrate waren im Vergleich zu dem Referenzansatz stark vermindert. Die Untersuchungen führten jedoch zu der Beobachtung, dass *Cupriavidus necator* in der Lage ist, Nitrat ohne eine Akkumulation des Zwischenproduktes Nitrit zu veratmen.

Zur Untersuchung eines möglichen negativen Einflusses der Medienkomponenten auf die Nitritreduktase wurden Satzuntersuchungen in verdünntem Medium durchgeführt. Dabei wurde die Konzentration aller Medienkomponenten, mit Ausnahme der Phosphatsalze (Puffer) in gleichem Maße reduziert. Die untersuchten Konzentrationen in einem Fünffachansatz betragen bezogen auf das unter 4.1 beschriebene Medium 100%, 80%, 60%, 40% sowie 20%. Die Kultivierung der Ansätze erfolgte in pH-geregelten Blasensäulen (pH 7,5). Als Inokkulum wurden Zellen eingesetzt, welche unter heterotropher Nitratatmung kultiviert wurden. Bei allen Ansätzen lagen zu Beginn der Kultivierung  $5 \text{ g L}^{-1}$  vor Fruktose sowie  $35,3 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $2,19 \text{ g L}^{-1}$ ) Nitrat vor. Die Biotrockenmassekonzentration der Ansätze lag zu Beginn der Untersuchung zwischen  $0,092 \text{ g L}^{-1}$  und  $0,094 \text{ g L}^{-1}$ . Bei der Untersuchung wurde der Stamm DSM 531 eingesetzt. In Abbildung 5.7 a bis e sind die Wachstumsverläufe, sowie die Verläufe der Nitrat- und Nitritkonzentrationen der verschiedenen Ansätze dargestellt.



**Abb. 5.7 Einfluss der Medienkonzentration auf die heterotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Medienzusammensetzung im Verhältnis zum Ausgangsmedium: a) 100%; b) 80%; c) 60%; d) 40%; e) 20%**

Es zeigt sich, dass mit einem Medium, welches nur 60% der ursprünglichen Anfangskonzentrationen enthält nach 45 Stunden Kultivierungszeit die höchste Biomassezunahme erreicht wird (1,18 g L<sup>-1</sup>). Nach dieser Kultivierungszeit ist bei diesem Ansatz Nitrat und Nitrit vollständig verbraucht. Zu einem Zeitpunkt von 21 Stunden wird die maximale in das Medium abgegebene Nitritkonzentration von



20,85 mmol L<sup>-1</sup> erreicht. Bei den Ansätzen mit 100% bzw. 80% der Mediumskonzentration wird die maximale Nitritkonzentration nach 30 und 45 Stunden erreicht. Die maximalen Nitritkonzentrationen liegen mit 24,9 mmol L<sup>-1</sup> und 22,2 mmol L<sup>-1</sup> über dem des 60% Ansatzes. Die geringste Menge an Nitrit wird bei dem Ansatz mit 40% in das Medium abgegeben (19,4 mmol L<sup>-1</sup>). Die bei diesem Ansatz erreichte Biomassezunahme nach 55 Stunden (1,07 g L<sup>-1</sup>) ist geringer als bei dem Ansatz mit 60%. Auch bei diesem Ansatz wurden im Gegensatz zu den Ansätzen mit 100% und 80% Nitrat und Nitrit vollständig verbraucht.

Die im 20%-Medium vorgelegten Salzkonzentrationen reichen nicht aus, um ausreichendes Wachstum zu gewährleisten. Bei diesem Ansatz kann keine vollständige Veratmung von Nitrat und Nitrit beobachtet werden. Die Biomassezunahme des Ansatzes bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes beträgt 0,31 g L<sup>-1</sup>.

Die hier beschriebenen Untersuchungen zum Einfluss der Medienkonzentration auf die heterotrophe Nitratatmung haben gezeigt, dass mit einem verdünnten Medium (60%) ein besseres Wachstum im Vergleich zu dem bisher verwendeten Medium, erzielt werden kann. Eine Vermeidung der Akkumulation von Nitrit im Medium konnte mit keinem der untersuchten Medien erreicht werden. Inwiefern die direkte Veratmung des Nitrats nach der Inkubationszeit ohne Elektronenakzeptor auf Einflüsse der Konzentrationen der Medienkomponenten, als auch auf eine Änderung der Stoffwechselwege von *Cupriavidus necator* zurückzuführen ist kann nicht eindeutig bestimmt werden. Eine weitere mögliche Ursache für das verbesserte Wachstum in verdünntem Medium könnte ein negativer Einfluss der Ionenstärke des Mediums zu Beginn der Kultivierung auf das Wachstum sein.

Aufgrund des verbesserten Wachstums in dem verdünnten Medium mit 60 % der Ausgangskonzentration wurde die Medienzusammensetzung neu festgelegt. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten im Medium sind in Tabelle 5.2 dargestellt. Dabei wurden die Konzentrationen der Salze K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sowie CaCl<sub>2</sub> um 40% im Vergleich zu der Ausgangskonzentration reduziert. Die Konzentration von MgCl<sub>2</sub> wurde darüber hinaus auf 0,102 g L<sup>-1</sup> reduziert (Ausgangsgröße 0,41 g L<sup>-1</sup>), da Magnesium inhibierend auf die Aufnahme von Nickel wirkt [Lohmeyer und Friedrich 1987]. Die Konzentrationen der Phosphatsalze sowie von NH<sub>4</sub>Cl, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O und der Spurenelementlösung wurden bei den Ausgangskonzentrationen beibehalten. Die Konzentration für Ammoniumchlorid

wird dabei bereits in der Literatur als nicht wachstumsinhibierend beschrieben [Repaske und Mayer 1976]. Darüber hinaus wird durch eine hohe Ammoniumkonzentration die Inhibierung der nicht am Energiegewinn beteiligten assimilatorischen Nitratreduktase gewährleistet. Eine ausreichende Versorgung mit Ammonium gewährleistet darüber hinaus, dass die durch Nitratatmung gewonnene Energie für das Wachstum und nicht für die Speicherstoffsynthese genutzt wird (vgl. Abschnitt 3.2.4 und 3.2.5). Die Metallionen Nickel und Eisen sind wichtige Bestandteile der Hydrogenasen. Die hier eingesetzten Konzentrationen wurden dabei ebenfalls als nicht inhibierend beschrieben [Repaske und Mayer 1976]. Eine Reduktion der  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - sowie der Spurenelementkonzentration wurde daher nicht vorgenommen.

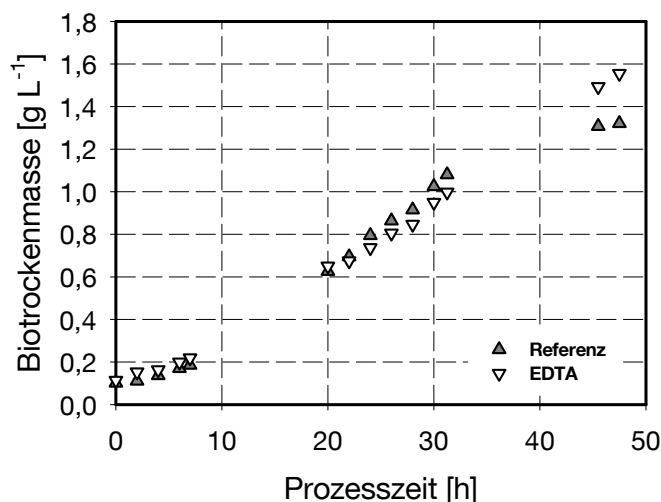
**Tab. 5.2 Konzentrationen der Medienkomponenten des überarbeiteten Medium**

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration [g/L]</b>
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,9
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	8,41
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0,105
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,102
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,016
$\text{CaCl}_2$	$4 \cdot 10^{-3}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{NaNO}_3$	variierend
Fruktose	0/5
<b>Spurenelemente</b>	
$\text{Ni}_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,31 \cdot 10^{-4}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$6,82 \cdot 10^{-5}$
$\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$5,33 \cdot 10^{-5}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$4,75 \cdot 10^{-5}$

### 5.1.5 Einfluss von EDTA als Löslichkeitsvermittler auf die heterotrophe Nitratatmung

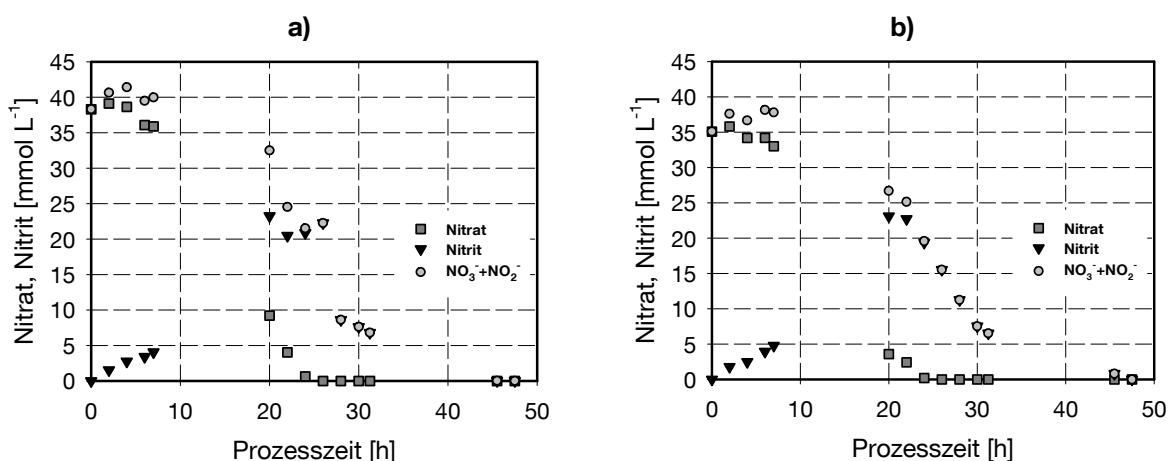
Untersuchungen zur chemolithoautotrophen aeroben Kultivierung haben gezeigt, dass EDTA aufgrund der Komplexbildung von Eisen- sowie Nickelionen einen stark inhibierenden Einfluss auf das Wachstum von Knallgasbakterien (u.a. *Cupriavidus necator*) hat [Tabillion et al. 1980]. Studien zur Hydrogenaseaktivität von *Cupriavidus necator* wiederum haben gezeigt, dass die Anwesenheit von EDTA nur einen geringen Einfluss auf die Bildung dieses Enzyms hat [Friedrich et al. 1981]. EDTA wird häufig zur Verminderung von Ausfällungen von beispielsweise Eisensalzen im Medium eingesetzt. Bei einer zu hohen Konzentration von EDTA kann es zu einer Limitierung durch Metall-Ionen im Medium kommen, da dann fast alle der vorgelegten Ionen an EDTA gebunden sind. Da in den oben beschriebenen Untersuchungen unterschiedliche Konzentrationen, sowohl an EDTA, als auch an Nickel eingesetzt wurden, sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Zugabe des Komplexbildners zu dem unter 5.1.4 bestimmten Medium auf die heterotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator* hat. Darüber hinaus hat sich bei den vorangegangenen Untersuchungen im unverdünnten Medium gezeigt, dass zu Beginn der Kultivierung ein Teil der im Medium vorgelegten Eisenionen ausfällt (rotes Pellet nach Zentrifugation der Zellsuspension). Der Einsatz des Komplexbildners EDTA könnte dies verhindern. Zur Untersuchung des EDTA-Einflusses auf die heterotrophe Nitratatmung wurde dem Medium  $4 \text{ mg L}^{-1}$  ( $10,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) EDTA-Dinatriumdihydrat zugegeben. Dies entspricht der Menge an EDTA, welche bei den Untersuchungen von Friedrich et al. 1981 eingesetzt wurde. Zur Kontrolle wurde parallel zu dem Ansatz mit EDTA ein weiterer Ansatz im überarbeiteten Referenzmedium (siehe Abschnitt 5.1.4) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in pH-geregelten Blasensäulen (pH 7,5). Bei beiden Ansätzen lagen zu Beginn der Kultivierung  $35,3 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat sowie  $5 \text{ g L}^{-1}$  Fruktose vor. Zur Untersuchung wurde der Stamm DSM 428 eingesetzt. Abbildung 5.8 zeigt den Wachstumsverlauf der beiden Ansätze.

Es zeigt sich, dass bei beiden Ansätzen bis zu einer Zeit von 31,25 Stunden vergleichbares Wachstum zu beobachten ist. Lediglich am Ende der Kultivierung kommt es zu einer geringen Abweichung des Wachstums. Dabei wird bei dem Ansatz mit EDTA im Medium eine Biotrockenmassezunahme von  $1,44 \text{ g L}^{-1}$  erreicht, wobei bei dem Referenzansatz eine Zunahme von  $1,22 \text{ g L}^{-1}$  erreicht wird.



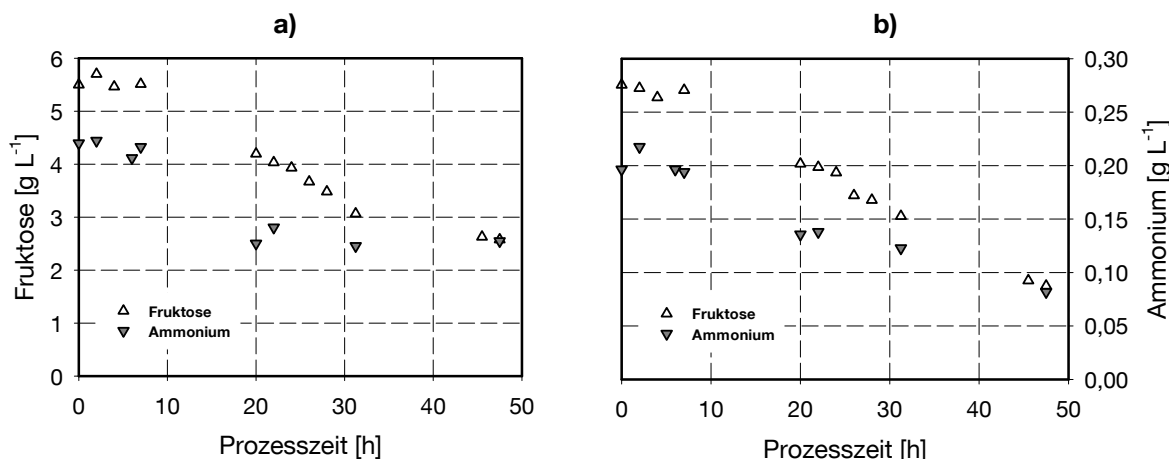
**Abb. 5.8** Vergleich des Wachstums der heterotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* mit EDTA im Medium sowie im Referenzansatz

Die gesteigerte Biotrockenmassezunahme des Ansatzes mit EDTA könnte auf einer verbesserten Verfügbarkeit von Eisen durch den Löslichkeitsvermittler beruhen. Wie in Abbildung 5.9 a und b zu sehen, ist der Verlauf der Nitrat- sowie Nitritkonzentration während der Kultivierung ebenfalls vergleichbar. Die maximale, in das Medium abgegebene Menge an Nitrit beträgt bei dem Absatz mit EDTA 23,1 mmol L<sup>-1</sup> nach 20 Stunden Kultivierungszeit. Die maximale Nitritkonzentration bei dem Referenzansatz wird mit 23,27 mmol L<sup>-1</sup> ebenfalls nach 20 Stunden erreicht. Nach einer Prozesszeit von 26 Stunden ist bei beiden Ansätzen das vorgelegte Nitrat vollständig reduziert.



**Abb. 5.9** Verlauf der Nitrat- sowie Nitritkonzentration während der heterotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* in: a) Referenzmedium, b) Medium mit EDTA

In Abbildung 5.10 sind vergleichend die Verläufe der Ammonium- sowie Fruktosekonzentration dargestellt.



**Abb. 5.10** Verlauf der Ammonium- sowie der Fruktosekonzentration während der heterotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* in: a) Referenzmedium, b) Medium mit EDTA

Der geringe Anfangswert der Ammoniumkonzentration ist dabei auf einen Verdünnungsfehler bei der Medienherstellung zurückzuführen, so dass bei diesen Ansätzen erneut lediglich 60% der Standardkonzentration vorlagen.

Bei keinem der beiden Ansätze konnte am Ende der Kultivierung ein vollständiger Verbrauch des vorgelegten Ammoniums oder der Fruktose beobachtet werden. Eine Limitation eines der beiden Bestandteile bis zur vollständigen Nitrat-, Nitritreduktion kann somit ausgeschlossen werden. Bis zum Ende der Kultivierung werden bei dem Referenzansatz 2,92 g L<sup>-1</sup> Fruktose sowie 0,092 g L<sup>-1</sup> Ammonium verbraucht. Der Verbrauch der Komponenten in dem Ansatz mit EDTA im Medium lag mit 3,76 g L<sup>-1</sup> Fruktose sowie 0,116 g L<sup>-1</sup> Ammonium höher als bei dem Referenzansatz. Der höhere Verbrauch ist hierbei auf die höhere Biotrockenmassezunahme des Ansatzes mit EDTA zurückzuführen.

Die hier beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass durch den Einsatz von EDTA das heterotrophe Wachstum bei simultaner Nitratatmung nicht deutlich gesteigert werden konnte (Steigerung um 15% bezogen auf die Biomassezunahme). Aufgrund dieser Beobachtung, sowie aufgrund des nicht eindeutig beschriebenen Einflusses von EDTA auf die Wasserstoffoxidation, wurde der Löslichkeitsvermittler in den folgenden Versuchen dem Medium nicht mehr zugegeben.

### 5.1.6 Heterotrophe Nitratatmung im Rührkesselreaktor

Zur Bereitstellung größerer Zellmassen als Inokulum für Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung wurde *Cupriavidus necator* unter heterotrophen Bedingungen bei simultaner Nitratatmung im Rührkesselreaktor im Satzverfahren kultiviert. Der Reaktor wurde mit frisch aufgetauten Zellen des Stamms DSM 428 aus der Stammhaltung beimpft. Die Biotrockenmasse- und Nitratkonzentration zu Beginn der Kultivierung betragen  $0,088 \text{ g L}^{-1}$  sowie  $34,88 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $2,16 \text{ g L}^{-1}$ ). In Abbildung 5.11 sind der Wachstumsverlauf, sowie der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration von *Cupriavidus necator* im Laborbioreaktor dargestellt.

Nach einer 6-stündigen lag-Phase ist ein Einsetzen des Wachstums zu beobachten. Bis zu einer Prozesszeit von 20,5 Stunden erfolgt der Energiegewinn ausschließlich durch die Reduktion von Nitrat. Die maximale Wachstumsrate während der reinen Nitratatmung wurde mit Hilfe von Gleichung 3.19 zu  $0,098 \text{ h}^{-1}$  bestimmt. Die entspricht 49 % der Wachstumsrate des unter 5.1 beschriebenen Referenzansatzes zur heterotroph aeroben Kultivierung.

In einem Zeitraum zwischen 20,5 Stunden sowie 26 Stunden erfolgt eine simultane Veratmung von Nitrat und Nitrit. Die maximale Wachstumsrate in dieser Nitritatmungsphase wurde zu  $0,065 \text{ h}^{-1}$  abgeschätzt. Die maximale Nitritkonzentration im Medium wird mit  $28,14 \text{ mmol L}^{-1}$  nach 22,5 Stunden erreicht.

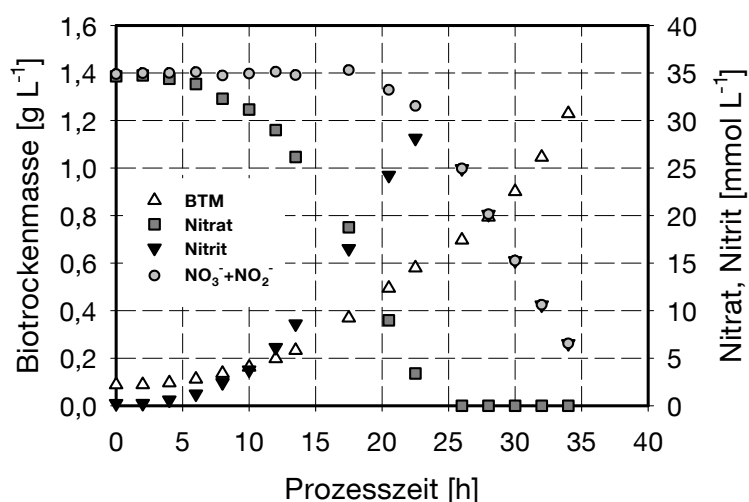
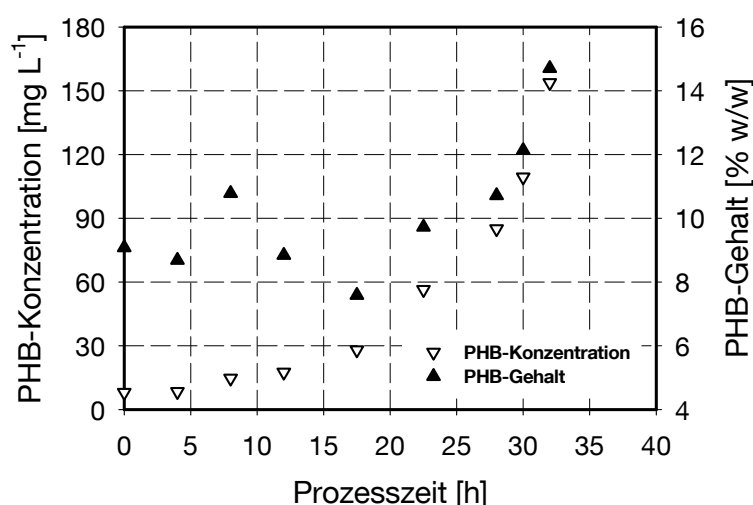


Abb. 5.11 Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration bei der heterotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Laborbioreaktor.

Wie in Abbildung 5.12 zu sehen, bleibt der PHB-Gehalt der Zellen bis zu einer Zeit von 28 Stunden im Rahmen der Messgenauigkeit konstant ( $9,3 \pm 1$  % w/w). Nach dieser Zeit ist eine Zunahme des PHB-Gehaltes der Zellen zu beobachten. Da zu diesem Zeitpunkt noch  $0,227 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium im Medium vorlagen kann eine Limitierung durch diese Medienkomponente ausgeschlossen werden. Der Verlauf der Ammoniumkonzentration während der Kultivierung ist in Anhang 9.6 dargestellt.



**Abb. 5.12 Verlauf der PHB-Konzentration sowie des PHB-Gehalt während der heterotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Rührkesselreaktor**

Eine mögliche Ursache für die einsetzende Akkumulation von PHB könnte in einer einsetzenden Limitation durch den Elektronenakzeptor liegen. Zum Zeitpunkt der einsetzenden PHB-Akkumulation lagen noch  $20,14 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrit im Medium vor. Der PHB-Gehalt der Zellen beträgt am Ende des Beobachtungszeitraumes  $14,7$  % w/w.

Aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen wurde der geeignete Erntezeitpunkt für eine unter heterotropher Nitratatmung gewachsenen Vorkultur zwischen 26 Stunden und 28 Stunden Kultivierungszeit ( $0,697 \text{ g L}^{-1}$  bis  $0,793 \text{ g L}^{-1}$  Biotrockenmasse) festgelegt. In diesem Zeitraum sind die Enzymsysteme für die Nitritreduktion vollständig ausgebildet. Darüber hinaus hat in diesem Zeitraum noch keine gesteigerte PHB-Akkumulation eingesetzt.

## 5.2 Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung

### 5.2.1 Stammauswahl

In der Literatur sind bislang zwei Stämme von *Cupriavidus necator* beschrieben, welche bei Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung eingesetzt wurden. So wurde das Wachstum des Stammes DSM 428 unter chemolithoautotrophen Bedingungen im Zuge von Untersuchungen zur Nitratatmung beschrieben [Pfitzner und Schlegel 1973]. Bei Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung zur Entfernung von Nitrat aus Trinkwasser mit Hilfe von immobilisierter Biomasse wurde der Stamm 531 als Startkultur eingesetzt [Lee und Rittmann 2000]. In einem ersten Schritt sollten Untersuchungen zu Unterschieden der beiden Stämme, sowie die Auswahl eines geeigneten Referenzstammes zur reaktionstechnischen Untersuchung der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Rührkesselreaktor, vorgenommen werden.

#### ***Cupriavidus necator* DSM 531**

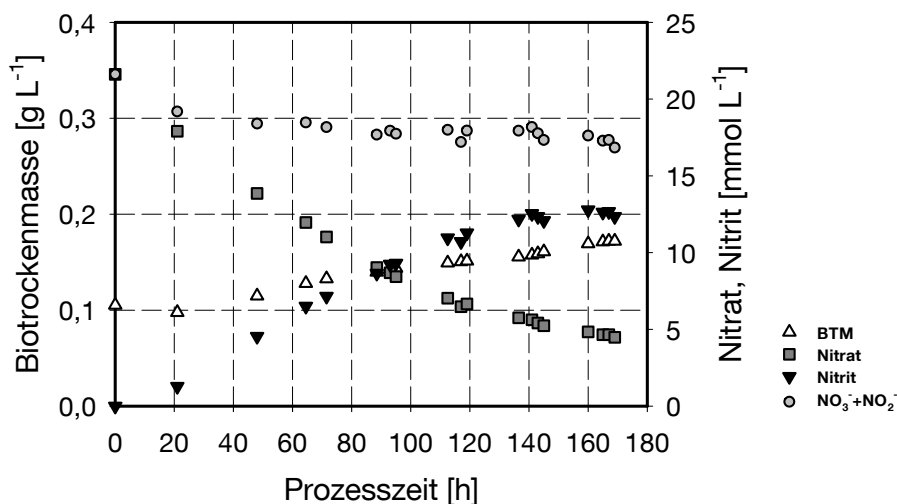
Zur Untersuchung der chemolithoautotrophen Nitratatmung des Stammes 531 wurde der Bioreaktor mit Zellen einer in gerührten, pH-geregelten Kolben unter heterotropher Nitratatmung kultivierten Vorkultur beimpft. Die Biotrockenmasse zu Beginn der Kultivierung betrug  $0,105 \text{ g L}^{-1}$ . Die Nitratankonzentration lag bei  $21,6 \text{ mmol L}^{-1}$ . Der Reaktor wurde kontinuierlich mit einem Gemisch aus  $0,28 \text{ mol h}^{-1} \text{ H}_2$  (70%),  $0,04 \text{ mol h}^{-1} \text{ CO}_2$  (10%) sowie  $0,08 \text{ mol h}^{-1}$  (20%)  $\text{N}_2$  begast. Der Gesamtvolumenstrom des zugeführten Gases betrug  $10 \text{ L h}^{-1}$  (0,14 vvm). Die Kultivierung wurde bei einem pH von 7,5 durchgeführt.

In Abbildung 5.13 sind der Wachstumsverlauf, sowie der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* DSM 531 dargestellt. Während der ersten 20 Stunden Kultivierungszeit nimmt die Biotrockenmasse im Bioreaktor ab. Nach dieser Adaptationszeit beginnt der Stamm DSM 531 unter chemolithoautotrophen Bedingungen zu wachsen.

Bereits zu Beginn der Untersuchung, während der stationären Phase, wird Nitrat zu Nitrit reduziert. Darüber hinaus ist in dieser ersten Phase bereits eine Abnahme der Nitrat- und Nitritgesamtmenge zu beobachten. Die Abnahme der Gesamtbilanz beträgt in den ersten 20 Stunden Kultivierungszeit  $2,43 \text{ mmol L}^{-1}$ ,



wohingegen die Abnahme im verbleibenden Untersuchungszeitraum lediglich  $2,35 \text{ mmol L}^{-1}$  beträgt.



**Abb. 5.13** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* DSM 531

Im Verlauf der Kultivierung verlangsamt sich die Nitratreduktion mit zunehmender Nitritkonzentration im Medium. Dies deutet auf eine Inhibierung durch das gebildete Nitrit hin. Nach einer Prozesszeit von 165 Stunden kann nur noch geringes Wachstum sowie Nitratreduktion beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt lagen im Medium  $12,63 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat vor. Nach einer Prozesszeit von 169 Stunden wurde die Untersuchung beendet. Zum Ende der Untersuchung lag im Medium noch  $4,48 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat sowie  $12,35 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrit vor. Die Zunahme der Biotrockenmasse bis zu diesem Zeitpunkt betrug  $0,067 \text{ g L}^{-1}$ .

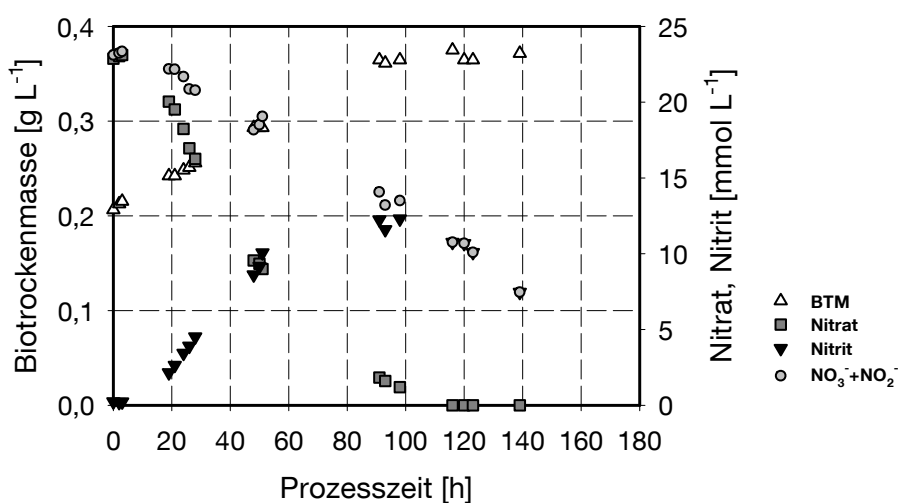
Aufgrund des geringen Wachstums, sowie des hohen Volumenstromes der zugeführten Substratgase kann im Abgas keine signifikante Änderung der Wasserstoff- oder Kohlendioxidmenge ermittelt werden.

Die hier beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass das Wachstum von *Cupriavidus necator* DSM 531 bei der Nitratreduktion unter chemolithoautotrophen Bedingungen im Vergleich zu heterotrophen Bedingungen (siehe Abschnitt 5.1.6 Abbildung 5.11) stark vermindert wird.

### ***Cupriavidus necator* DSM 428**

Die Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* DSM 428 erfolgten ebenfalls im Satzverfahren im Rührkesselreaktor bei

einem pH von 7,5. Aufgrund des langen Beobachtungszeitraumes der Untersuchungen mit dem Stamm 531 wurde die Biotrockenmasse zu Beginn der Kultivierung auf  $0,206 \text{ g L}^{-1}$  erhöht. Darüber hinaus wurde der Gesamtvolumenstrom der zugeführten Gase auf  $5 \text{ L h}^{-1}$  ( $0,069 \text{ vvm}$ ) reduziert. Die Molenströme der zugeführten Gase betragen  $0,141 \text{ mol h}^{-1} \text{ H}_2$  (70%),  $0,02 \text{ mol h}^{-1} \text{ CO}_2$  (10%) sowie  $0,04 \text{ mol h}^{-1} \text{ N}_2$  (20%). Als Inokulum wurden heterotroph, unter Nitratatmung kultivierte Zellen aus gerührten, pH-geregelten Blasensäulen eingesetzt. Die Nitratkonzentration zu Beginn der Kultivierung betrug  $22,87 \text{ mmol L}^{-1}$ .



**Abb. 5.14** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* DSM 428

Wie in Abbildung 5.14 zu sehen, setzt bei dem Stamm 428 bereits in den ersten 19 Stunden Kultivierungszeit das chemolithoautotrophe Wachstum ein. In diesem Zeitraum ist lediglich eine geringe Abnahme der Nitrat- und Nitritgesamtmenge zu beobachten ( $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Das Wachstum in diesem Zeitraum beruht daher hauptsächlich auf dem Energiegewinn durch Nitratreduktion. Nach einer Zeit von 19 Stunden ist eine stärkere Abnahme der Nitrat- und Nitritgesamtmenge zu beobachten. Ab diesem Zeitpunkt erfolgt das Wachstum aufgrund von simultaner Nitrat- und Nitritreduktion. Die maximale Nitritkonzentration im Medium wird mit  $12,3 \text{ mmol L}^{-1}$  nach 98 Stunden Kultivierungszeit erreicht.

Mit Erreichen der maximalen Nitritkonzentration kann keine weitere Zunahme der Biotrockenmasse beobachtet werden. Die Nitratkonzentration zu diesem Zeitpunkt beträgt  $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ . Nach einer Zeit von 116 Stunden kann kein Nitrat im Medium nachgewiesen werden. Die vorliegende Abnahme von Nitrat sowie

Nitrit in der stationären Wachstumsphase nach Erreichen des Nitritmaximums deuten darauf hin, dass Nitrit das Wachstum von *Cupriavidus necator* inhibiert, nicht aber die Reduktion der Elektronenakzeptoren. Aufgrund der anhaltenden stationären Biotrockenmasse im Laborbioreaktor wurde der Versuch nach einer Prozesszeit von 139 Stunden beendet. Zu diesem Zeitpunkt lagen noch  $7,46 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrit im Medium vor. Die Zunahme der Biotrockenmasse bis zu diesem Zeitpunkt betrug  $0,16 \text{ g L}^{-1}$ .

Aufgrund des langsamen Wachstums und dem damit verbundenen langen Untersuchungszeitraum, muss die Zelldichte zu Beginn einer Untersuchung weiter erhöht werden. Diese weitere Erhöhung, verbunden mit einer weiteren Erniedrigung des Volumenstromes der Substratgase sollte eine Messung der Änderung des Molenstromes von Wasserstoff und Kohlendioxid ermöglichen.

### **Vergleich und Stammauswahl**

Die hier beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl der Stamm DSM 531, als auch der Stamm DSM 428 in der Lage sind, unter chemolithoautotrophen Bedingungen zu wachsen. Die maximal in das Medium abgegebenen Mengen an Nitrit während der Kultivierung waren mit  $12,63 \text{ mmol L}^{-1}$  (DSM 531) sowie  $12,3 \text{ mmol L}^{-1}$  (DSM 428) bei beiden Stämmen vergleichbar. Nach Erreichen der maximalen Nitritkonzentration war bei keinem der beiden Stämme eine weitere Zunahme der Biotrockenmasse zu beobachten. Bei dem Stamm 531 führten die hohen Nitritkonzentrationen zu einer starken Abschwächung der Nitrat- sowie Nitritreduktion. Eine vollständige Reduktion des vorgelegten Nitrats konnte bei diesem Stamm nicht beobachtet werden. Bei dem Stamm 428 hingegen konnte auch nach Erreichen der maximalen Nitrat- und Nitritkonzentrationen eine Reduktion der beiden Elektronenakzeptoren beobachtet werden. Das vorgelegte Nitrat wurde von diesem Stamm vollständig zu Nitrit reduziert. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass bei dem Stamm 428 die simultane Verwertung von Nitrat und Nitrit besser verläuft als bei dem Stamm 531.

Aufgrund dieser Beobachtungen, wurde der Stamm DSM 428 für die reaktionstechnischen Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung ausgewählt. Darüber hinaus ist dieser Stamm hinsichtlich seiner chemolithoautotrophen Enzymsysteme sowohl auf enzymatischer, als auch genetischer Ebene bereits besser erforscht als der Stamm 531 (vgl. Abschnitt 3.2).

## 5.2.2 Bestimmung des pH-Optimum der chemolithoautotrophen Nitratatmung

Der optimale pH-Bereich für den Start einer pH-ungeordneten Kultivierung zur Untersuchung der heterotrophen Nitratatmung wurde von Pfitzner und Schlegel zu 7,5 bis 7,9 bestimmt. Bei einem pH von 7,0 zu Beginn der Kultivierung konnte kein Wachstum durch Nitritreduktion mehr beobachtet werden [Pfitzner und Schlegel 1973]. Im Gegensatz hierzu erfolgt die Kultivierung von *Cupriavidus necator* unter chemolithoautotrophen Bedingungen meist bei einem sauren pH. Die Wachstumsstudien von Repaske und Mayer beispielsweise wurden bei einem pH von 6,5 durchgeführt. Die kinetischen Untersuchungen zum Wachstum sowie zur Speicherstoffsynthese von *Cupriavidus necator* von Heinzle und Lafferty wurden bei einem pH von 6,9 durchgeführt [Repaske und Mayer 1976; Heinzle und Lafferty 1980].

Zur Bestimmung des pH-Optimum der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* wurde der Organismus bei einem pH von 7,5; 7,4; 7,2; 7,0; sowie 6,8 im Satzverfahren im Laborbioreaktor kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in dem unter Abschnitt 4.2 beschriebenen, unveränderten, Ausgangsmedium. Die Anfangskonzentration an Nitrat zu Beginn der Kultivierung betrug bei allen Ansätzen  $23,53 \text{ mmol L}^{-1}$ . Die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses des pH auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Die Wachstumsverläufe, sowie die Verläufe der Nitrat- und Nitritkonzentration sind in Anhang 9.7 dargestellt. Die Biotrockenmassekonzentrationen zu Beginn der Kultivierung betragen  $1,114 \text{ g L}^{-1}$  (pH 7,5);  $1,369 \text{ g L}^{-1}$  (pH 7,4);  $1,069 \text{ g L}^{-1}$  (pH 7,2);  $1,076 \text{ g L}^{-1}$  (pH 7,0) sowie  $1,124 \text{ g L}^{-1}$  (pH 6,8).

Aufgrund von Unregelmäßigkeiten bei der HPLC-Analyse konnte der Nitrat-Nitritverlauf nicht für alle Ansätze bestimmt werden. Die maximale Wachstumsrate wurde mit Hilfe von Gleichung 3.19 abgeschätzt. Für Ansätze, bei welchem kein Nitrat oder Nitrit gemessen werden konnte, wurde für eine Kultivierungszeit kleiner 10 Stunden Wachstum aufgrund von reiner Nitratreduktion angenommen. Die Nitritreduktion bei den Ansätzen bei einem pH von 7,2 sowie 6,8 startete jeweils nach 10 Stunden.

Die Biotrockenmasse am Ende der Kultivierung konnte aufgrund der langen Kultivierungszeit für einige Ansätze nicht genau bestimmt werden (Ende der Nitrat- und Nitritreduktion erfolgte während der Nacht). Die Endpunkte der Kultivierung konnten durch einen starken Anstieg des kontinuierlich, mittels

Gaschromatographie, bestimmten Wasserstoffgehalts im Abgas bestimmt werden (vergleiche Anhang 9.8). Zur Abschätzung der Biomassezunahme wurde der letzte bestimmte Messwert vor der Zunahme herangezogen.

**Tab. 5.3 Einfluss des pH auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator***

pH [-]	$c_{\max, \text{NO}_2^-}$ [mmol L <sup>-1</sup> ]	$t_{\text{Ende}}$ [h]	$\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ]	$\Delta c_x$ [g L <sup>-1</sup> ]
7,5	-	> 23	-	> 0,021
7,4	-	29	0,0049	0,12
7,2	22,02	29	0,0061	> 0,06
7,0	-	27	0,0130	> 0,103
6,8	22,18	>20	-	> 0,023

Die größte maximale Wachstumsrate während der Nitratatmungsphase wurde mit 0,013 h<sup>-1</sup> bei dem Ansatz mit einem pH von 7,0 erreicht. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Pfitzner und Schlegel konnte bei diesem pH auch während der Nitritreduktion eine Zunahme der Biomasse beobachtet werden. Es ist zu beachten, dass die Untersuchungen von Pfitzner und Schlegel ohne pH-Regelung durchgeführt wurden. Zu Beginn der beschriebenen heterotrophen Kultivierungen war stets ein Abfall des pH zu beobachten. Der pH während der Nitritreduktionsphase war somit geringer als 7,0 [Pfitzner und Schlegel 1973].

Die Wachstumsraten der verbleibenden Ansätze sind mit 0,0061 h<sup>-1</sup> (pH 7,2), sowie 0,0049 h<sup>-1</sup> (pH 7,4) um mehr als 50% geringer als bei dem Ansatz mit einem pH von 7,0. Bei den Ansätzen mit einem pH von 7,5 sowie 6,8 konnte aufgrund des geringen, unregelmäßigen Wachstums die Wachstumsrate nicht bestimmt werden. Die beiden Ansätze zeigen mit 0,021 g L<sup>-1</sup> beziehungsweise 0,023 g L<sup>-1</sup> die geringste Biomassezunahme. Diese Versuche wurden aufgrund des geringen Wachstums bei den vorliegenden pH nach einer Prozesszeit von 23 Stunden, beziehungsweise 20 Stunden abgebrochen. Bei dem Ansatz mit einem pH von 6,8 war darüber hinaus während der Nitritreduktion kein Wachstum zu beobachten. Dies bestätigt die Beobachtungen von Pfitzner und Schlegel.

Die größte Biotrockenmassezunahme ist bei der Untersuchung mit einem pH von 7,4 mit 0,12 g L<sup>-1</sup> zu beobachten. Da bei dem Ansatz mit einem pH von 7,0 die Biomasse am Ende des Nitrat-, Nitritverbrauches nicht exakt bestimmt werden

konnten ist nicht auszuschließen, dass mit diesem Ansatz vergleichbare Biomassezunahmen erreicht werden können. Die Biomassezunahme bei diesem Ansatz nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden betrug  $0,103 \text{ g L}^{-1}$ . Das Ende der Kultivierung erfolgte nach 27 Stunden. Die vergleichsweise geringe Biomassezunahme des Ansatzes mit einem pH von 7,2 ( $0,06 \text{ g L}^{-1}$  nach 24 Stunden Kultivierungszeit) kann nicht erklärt werden.

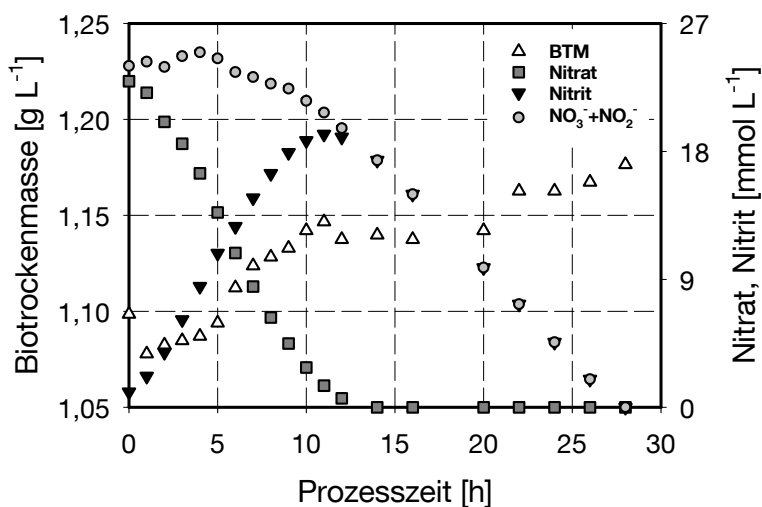
Die maximal in das Medium abgegebenen Mengen an Nitrit sind mit  $22,02 \text{ mmol L}^{-1}$  bei einem pH von 7,4 sowie  $22,18 \text{ mmol L}^{-1}$  bei einem pH von 6,8 vergleichbar. Die abgegebene Menge Nitrit entspricht dabei nahezu 100% der ursprünglich vorgelegten Menge an Nitrat.

Aufgrund der oben beschriebenen Untersuchungen wurde der pH für die reaktionstechnischen Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* auf 7,0 festgelegt.

### **Chemolithoautotrophe Nitratatmung bei pH 7,0**

Zur genaueren Charakterisierung des chemolithoautotrophen Wachstums bei simultaner Nitratatmung wurde *Cupriavidus necator* erneut bei einem pH von 7,0 mit dem unter 5.1.4 bestimmten Medium kultiviert. Die Kultur wurde kontinuierlich mit  $0,0446 \text{ mol h}^{-1}$  (50,11 %)  $\text{H}_2$ ,  $0,0088 \text{ mol h}^{-1}$  (9,93%)  $\text{CO}_2$  sowie  $0,0356 \text{ mol h}^{-1}$  (39,96%)  $\text{N}_2$  begast. Der Gesamtvolumenstrom des zugeführten Gasgemisches betrug  $2,215 \text{ L h}^{-1}$  (0,031 vvm). Die Nitratkonzentration zu Beginn der Untersuchung betrug  $22,93 \text{ mmol L}^{-1}$ . In Abbildung 5.15 sind der Wachstumsverlauf, sowie der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration im Satzverfahren dargestellt.

Es zeigt sich, dass nach der Inokkulation des Bioreaktors mit den heterotroph gewachsenen Zellen zunächst eine Abnahme der Biomassekonzentration zu beobachten ist. Dies deutet darauf hin, dass der Organismus zunächst an den neuen pH adaptiert, da die Vorkultur bei einem pH von 7,5 kultiviert wurde. Aufgrund der heterotrophen Anzucht der Vorkultur bei simultaner Nitratatmung sind die Nitrat- sowie Nitritreduktionsenzyme bereits expremiert. Dies wird durch die Abnahme des Nitratgehaltes unmittelbar nach Beginn der Kultivierung bestätigt. Eine Abnahme der Summenkurve von Nitrat und Nitrit kann in dieser Phase nicht beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass zu Beginn der Kultivierung bei einem Überschuss an Nitrat, im Vergleich zu Nitrit, dieses als bevorzugter Elektronenakzeptor verwertet wird.



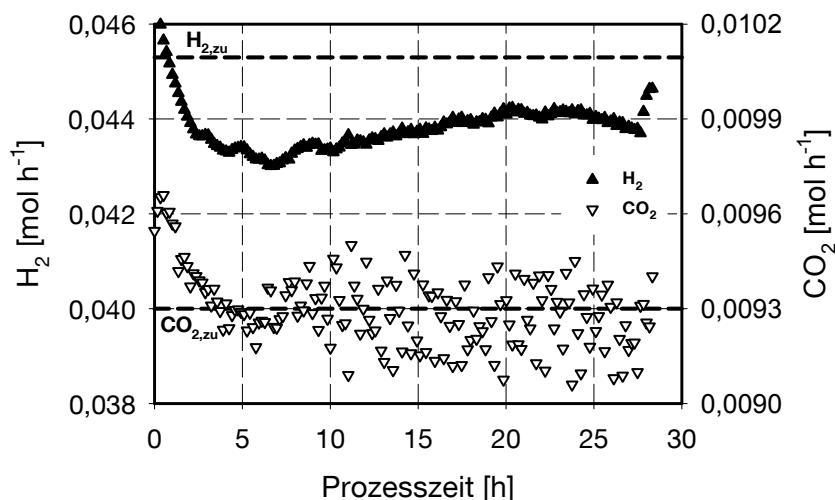
**Abb. 5.15** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bei pH 7,0 in dem überarbeiteten Medium (siehe Tabelle 5.2)

Die sofortige Abnahme des Wasserstoffgehalts im Abgas zeigt, dass die Enzymsysteme zur Wasserstoffoxidation ebenfalls nach der heterotrophen Kultivierung der Vorkultur funktionsfähig vorliegen (Abbildung 5.16). Die horizontalen Linien geben den Referenzwert der zugeführten Molenströme der Substratgase an. Die Referenzwerte wurden nach Beendigung der Untersuchungen durch direktes Verbinden der Zuluft- mit der Abluftstrecke bestimmt. Aufgrund von Schwankungen der Massendurchflussregler, sowie aufgrund der Messgenauigkeit der Gaschromatographie weichen die experimentell ermittelten Werte geringfügig (1,5% für  $H_2$  sowie 5% für  $CO_2$ ) von den vorgegebenen Einstellungen ab.

Der hohe gemessene  $CO_2$ -Gehalt des Abgases ist auf einen Stelleingriff zur pH-Kontrolle nach Zugabe des Inokulums zu Beginn der Kultivierung zurückzuführen. Bereits geringe Schwankungen des pH ( $\pm 0,01$  pH-Einheiten) beeinflussen das Kohlensäuregleichgewicht und somit die Messung des  $CO_2$  im Abgas.

Aufgrund dieser geringfügigen pH-Schwankungen, sowie des geringen Wachstums und dem damit verbundenen geringen  $CO_2$ -Verbrauch kann kein eindeutiger Verlauf des  $CO_2$ -Molenstromes im Abgas bestimmt werden. Die zunehmenden Schwankungen des gemessenen Molenstromes im Verlauf der Kultivierung lassen sich auf das Einsetzen der Nitritreduktion nach einer Zeit von 6 Stunden zurückführen. Mit Einsetzen der Nitritreduktion wird dem Medium zur

pH-Kontrolle Säure zudosiert, was zu der oben beschriebenen geringfügigen Schwankung des pH führt.



**Abb. 5.16** Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bei pH 7,0 in dem überarbeiteten Medium (siehe Tabelle 5.2)

Die maximale, in das Medium abgegebene Nitritkonzentration wird mit 19,22 mmol L<sup>-1</sup> nach 11 Stunden Kultivierungszeit erreicht. Dies entspricht 84,6% des zu Beginn der Kultivierung vorgelegten Nitrats. Es zeigt sich, dass unter chemolithoautotrophen Bedingungen mehr Nitrit in das Medium abgegeben wird als unter heterotrophen Bedingungen. Bei den unter Abschnitt 5.1.3 beschriebenen Untersuchungen konnten maximal 56 % des vorgelegten Nitrats in Form von Nitrit nachgewiesen werden. Bei dem Ansatz mit vergleichbarer Nitratanfängskonzentration (22,1 mmol L<sup>-1</sup>) betrug der Anteil des in das Medium abgegebenen Nitrits 45,2 %.

Mit Erreichen des Nitritmaximums, bei welchem darüber hinaus kein Nitrat im Medium mehr vorliegt, ist ein kurzes Absterben (1 Stunde), gefolgt von einer 8-stündigen stationären Phase zu beobachten. Die Zunahme der Biotrockenmasse bei Erreichen des Nitritmaximums betrug 0,048 g L<sup>-1</sup>. Da bereits nach 6 Stunden eine Abnahme der Nitrat- Nitrit- Gesamtbilanz zu beobachten war, ist die zweite stationäre Phase nicht auf eine Adaptation an den verbleibenden Elektronenakzeptor zurückzuführen. Die hohen Nitritkonzentrationen im Medium zu diesem Zeitpunkt deuten auf eine Inhibition des Wachstums durch das gebildete Nitrit hin. Nach einer Zeit von 20 Stunden setzt das chemolithoautotrophe Wachstum erneut ein. Zu diesem Zeitpunkt lagen 9,82 mmol L<sup>-1</sup> Nitrit im Medium vor. In der Nitritatmungsphase steigt aufgrund des



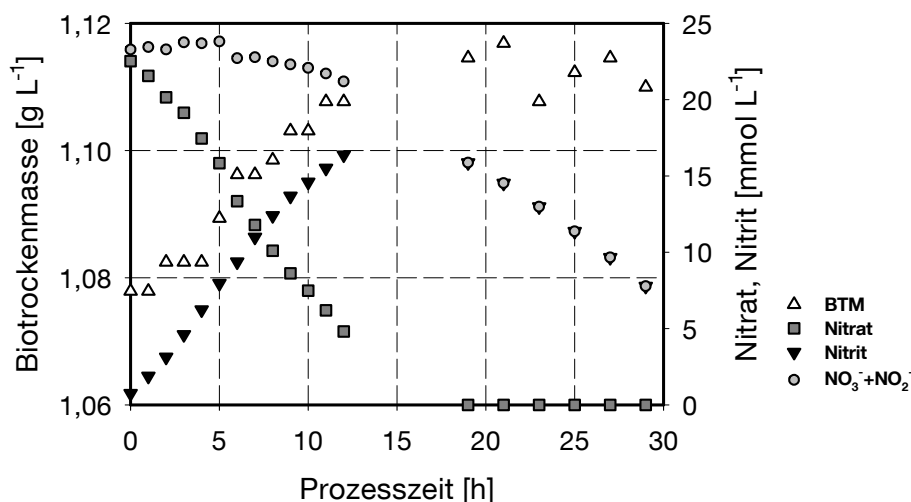
geringeren Wachstums der Wasserstoffgehalt im Abgas an. Nach einer Kultivierungszeit von 28 Stunden ist kein Nitrit mehr im Medium nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt ist ein starker Anstieg des Wasserstoffmolenstromes im Abgas des Reaktors zu beobachten. Die Biomassezunahme bis zum Ende der Kultivierung betrug bei diesem Ansatz  $0,078 \text{ g L}^{-1}$ .

### 5.2.3 Einfluss der eingesetzten Spurenelemente sowie der Eisenquelle auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung

Zur Untersuchung des Einflusses der Spurenelementlösung auf die autotrophe Nitratatmung wurde die bislang eingesetzte Spurenelementlösung durch die von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ) für autotrophes Wachstum von *Cupriavidus necator* vorgeschlagene Spurenelementlösung SL 6 ersetzt. Diese Spurenelementlösung enthält zusätzlich zu der bislang eingesetzten Lösung  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$  und  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , enthält jedoch kein  $\text{CrCl}_3$ . Die genaue Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL6 ist in Anhang 9.9 dargestellt.

Darüber hinaus wurde in diesem Ansatz zusätzlich zu dem bislang eingesetzten  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen,  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen dem Medium zugegeben. Die Zugabe erfolgte in äquivalenten Mengen (je  $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ ; entspricht zusammen der ursprünglichen Menge an  $\text{Fe}^{3+}$ ). Untersuchungen zum Nährstoffbedürfnis von *Cupriavidus necator* haben gezeigt, dass sowohl  $\text{Fe}^{3+}$  als auch  $\text{Fe}^{2+}$  den Eisenbedarf des Organismus abdecken kann [Repaske und Repaske 1976]. Darüber hinaus liegt Eisen in Form von  $\text{Fe}^{2+}$  im aktiven Zentrum der löslichen NiFe-Hydrogenase vor, wird jedoch Routine mäßig unter chemolithoautotrophen Bedingungen in Form von  $\text{FeCl}_3$  im Medium vorgelegt [van der Linden et al. 2006].

Die Kultivierung zur Untersuchung des Einflusses der Spurenelementlösung erfolgte bei einer Gesamtbeegasungsrate von  $2,215 \text{ L h}^{-1}$  (0,031 vvm). Die Zusammensetzung des Gases betrug dabei  $0,0446 \text{ mol h}^{-1}$  (50,11 %)  $\text{H}_2$ ,  $0,0088 \text{ mol h}^{-1}$  (9,93%)  $\text{CO}_2$  sowie  $0,0356 \text{ mol h}^{-1}$  (39,96%)  $\text{N}_2$  begast. Zu Beginn der Kultivierung lagen im Medium  $22,52 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat, sowie eine Biotrockenmassekonzentration von  $1,099 \text{ g L}^{-1}$  vor. In Abbildung 5.17 sind der Wachstumsverlauf, sowie der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration von *Cupriavidus necator* unter den geänderten Medienbedingungen dargestellt. Der Verlauf des Molenstromes von Wasserstoff und Kohlendioxid sind in Anhang 9.10 dargestellt.



**Abb. 5.17** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* in einem Medium mit der Spurenelementlösung SL6 sowie mit Fe<sup>2+</sup>.

Bei diesem Ansatz beginnt erneut die Nitratreduktion unmittelbar nach der Zugabe des Inokkulum. Eine kontinuierliche Zunahme der Biotrockenmasse ist nach einer Prozesszeit von 4 Stunden zu beobachten. Im Gegensatz zu dem unter 5.2.2 beschriebenen Ansatz bei pH 7,0 in dem unveränderten Medium ist bei diesem Ansatz keine Absterbephase zu Beginn der Kultivierung zu beobachten. Die maximale Nitritkonzentration wurde mit 16,37 mmol L<sup>-1</sup> nach 12 Stunden Kultivierung bestimmt. Da zu diesem Zeitpunkt noch 4,8 mmol L<sup>-1</sup> Nitrat im Medium vorlagen, ist davon auszugehen, dass die maximal in das Medium abgegebene Nitritkonzentration in dem Bereich zwischen 12 und 19 Stunden größer ist. Nach einer Kultivierungszeit von 19 Stunden liegen im Medium noch 15,87 mmol L<sup>-1</sup> Nitrit vor. Nitrat kann zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden. Während der Phase der Nitritreduktion kann keine weitere Zunahme der Biotrockenmasse beobachtet werden. Die Biotrockenmassezunahme bis zu einer Zeit von 19 Stunden beträgt 0,037 g L<sup>-1</sup> und ist somit deutlich geringer als die beobachtete Zunahme des unter 5.2.2 beschriebenen Referenzansatzes. Nach einer Kultivierungszeit von 29 Stunden wurde der Versuch beendet. Zu diesem Zeitpunkt konnten noch 7,77 mmol L<sup>-1</sup> Nitrit im Medium nachgewiesen werden. Bei dem unter 5.2.2 beschriebenen Referenzansatz war bei vergleichbaren Zelldichten eine vollständige Reduktion des vorgelegten Nitrat, sowie des gebildeten Nitrits bereits nach 28 Stunden zu beobachten.

Die Veränderung der Spurenelementzusammensetzung im Medium brachte keine Verbesserung hinsichtlich der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Vielmehr führten der Einsatz der alternativen Spurenelementlösung, sowie die Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu dem Medium zu einer Abschwächung des Wachstums. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer Inhibition des Wachstums durch eine der zusätzlichen Komponenten der Spurenelementlösung SL6 liegen. Darüber hinaus ist es möglich, dass es durch das Vorliegen von Eisen in zwei Oxidationsstufen zu einer Verminderung der Eisenaufnahmegeschwindigkeit in den Mikroorganismus kommt. Der genaue Einfluss der neuen Medienzusammensetzung auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung konnte nicht geklärt werden. Für die folgenden reaktionstechnischen Untersuchungen wurde daher die unter 5.1.4 beschriebene Medienzusammensetzung beibehalten.

#### **5.2.4 Einfluss einer Nitrat- und Nitritadaptationsphase auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung**

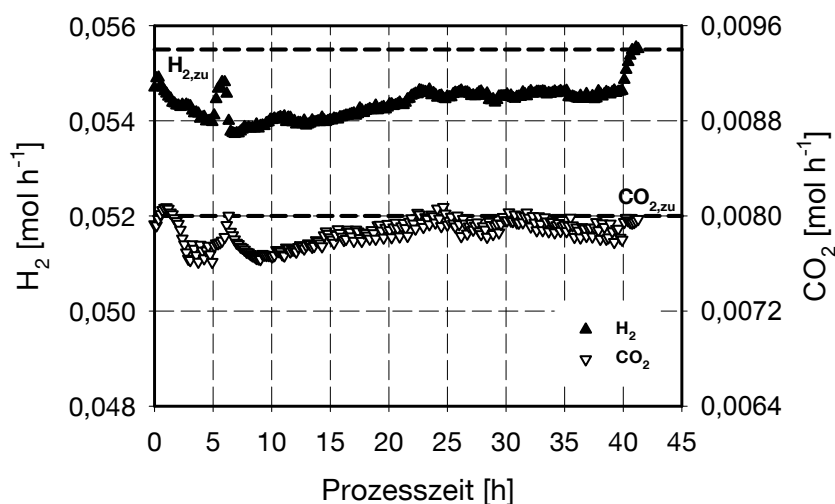
Wie unter 5.2.2 beschrieben, kommt es bei der Überführung der heterotrophen Vorkultur in den chemolithoautotroph betriebenen Reaktor zu einem Absterben der Zellen, gefolgt von einer stationären Phase. Um diese Absterbe- und stationäre Phase für die reaktionstechnischen Untersuchungen der chemolithoautotrophen Nitratatmung zu umgehen, wurde der Einfluss einer Nitrat- und Nitritadaptationsphase auf das Wachstum des Mikroorganismus untersucht. In einer solchen Adaptationsphase liegt zu Beginn der Untersuchungen nur eine geringe Menge an Nitrat beziehungsweise Nitrit im Medium vor. Während der Reduktion der vorgelegten Elektronenakzeptoren erfolgt eine Adaptation an den, im Vergleich zur Vorkultur veränderten pH des Mediums, sowie an chemolithoautotrophe Umgebungsbedingungen. Nach vollständiger Reduktion des zu Beginn vorgelegten Elektronenakzeptors erfolgt zum Anfang der Wachstumsuntersuchungen die sterile Zugabe eines Nitratpulses.

Der Volumenstrom der zugeführten Gase bei allen Untersuchungen zum Einfluss einer Nitrat- und Nitritadaptationsphase betrug  $2,22 \text{ L h}^{-1}$  (0,031 vvm). Der zugeführte Volumenstrom setzte sich dabei aus  $0,053 \text{ mol h}^{-1}$  (59,54%)  $\text{H}_2$ ,  $0,0071 \text{ mol h}^{-1}$  (7,98%)  $\text{CO}_2$  sowie  $0,0289 \text{ mol h}^{-1}$  (32,48%)  $\text{N}_2$  zusammen. Alle Ansätze wurden mit einer im Laborbioreaktor unter heterotropher Nitratatmung

kultivierten, Vorkultur beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei einem pH von 7,0 sowie in dem für die Nitratatmung angepassten Medium.

### **Nitratadaptation**

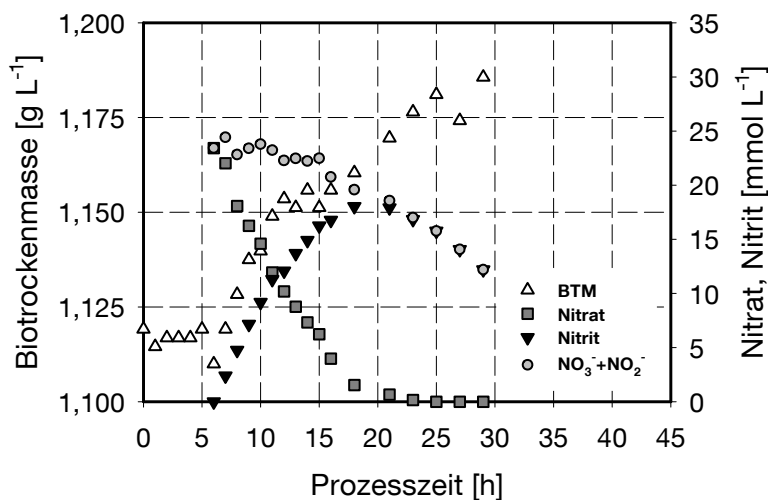
Zur Untersuchung der Nitratadaptationsphase auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung wurde dem Medium zu Beginn der Kultivierung  $2,35 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat zugegeben. Während der Adaptationsphase wurde keine Nitrat- bzw. Nitritanalyse vorgenommen. Als Endpunkt der Adaptationsphase, also die vollständige Veratmung des vorgelegten Nitrats, sowie des gebildeten Nitrits wurde der Anstieg des Wasserstoffmolenstromes im Abgas des Bioreaktors definiert. In Abbildung 5.18 sind die Molenströme von Wasserstoff und Kohlendioxid im Abgas der Kultivierung mit einer Nitratadaptationsphase dargestellt.



**Abb. 5.18** Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* mit einer anfänglichen Nitratadaptationsphase ( $2,35 \text{ mmol L}^{-1}$ )

Es zeigt sich, dass der Molenstrom von Wasserstoff im Abgas unmittelbar nach der Zugabe zu sinken beginnt. Nach einer Untersuchungszeit von 5 Stunden kommt es zu einem rapiden Anstieg des gemessenen Molenstromes. Dies deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt das zur Adaptation vorgelegte Nitrat, sowie das als Zwischenprodukt gebildete Nitrit vollständig reduziert wurden.

Nach 6 Stunden Kultivierungszeit wurde dem Medium steril Nitrat (12 mL; 2,35 mol L<sup>-1</sup> Nitrat) zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 2,35 mmol L<sup>-1</sup> erreicht wurde.



**Abb. 5.19** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* mit einer anfänglichen Nitratadaptationsphase (2,35 mmol L<sup>-1</sup>)

Wie in Abbildung 5.19 zu sehen, kann während der Adaptationsphase keine Zunahme der Biotrockenmasse beobachtet werden. Zu Beginn der Kultivierung kommt es darüber hinaus zu dem erwarteten Absterben der Zellen. Die Abnahme der Biotrockenmasse nach 6 Stunden Kultivierungszeit ist auf eine Verdünnung durch die Nitratzugabe zurückzuführen. Bei der ersten Messung nach der Zugabe von Nitrat kann kein Nitrit im Medium nachgewiesen werden. In der vorangegangenen Adaptationsphase wurde somit eine vollständige Nitrat und Nitritreduktion erreicht. Nach der Nitratzugabe setzt das chemolithoautotrophe Wachstum unmittelbar ohne weitere lag-Phase ein. Darüber hinaus beginnt die Wasserstoffaufnahme von *Cupriavidus necator* ohne Verzögerung nach der erneuten Zugabe des Elektronenakzeptors.

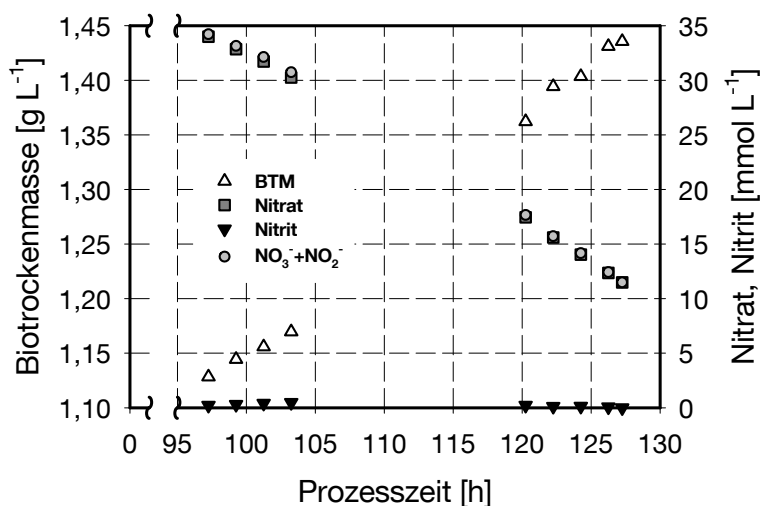
Bis zu einer Zeit von 12 Stunden (6 Stunden nach erneuter Nitratzugabe) ist eine kontinuierliche Zunahme der Biotrockenmasse zu beobachten. In der darauf folgenden Zeit (12 bis 16 Stunden) kommt es zu keinem weiteren Wachstum. Mit Erreichen der maximalen Nitritkonzentration (18,03 mmol L<sup>-1</sup>) nach 18 Stunden setzt erneut das chemolithoautotrophe Wachstum ein. Zu diesem Zeitpunkt liegen noch 1,54 mmol L<sup>-1</sup> Nitrat im Medium vor. Eine simultane Reduktion von Nitrat und Nitrit ist bereits ab einer Prozesszeit von 10 Stunden (4 Stunden nach der Nitratzugabe) zu beobachten. Nach einer Prozesszeit von 29 Stunden sind im

Medium noch  $12,2 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrit vorhanden. Der Anstieg des Wasserstoffmolenstromes im Abgas des Bioreaktors nach 40 Stunden Kultivierungszeit deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt das gebildete Nitrit verbraucht ist. Die vollständige Veratmung des zugegebenen Nitrats erfolgte somit in einem Zeitraum von 34 Stunden. Bei dem unter 5.2.2 beschriebenen Ansatz erfolgte die Reduktion einer vergleichbaren Menge an Nitrat nach 28 Stunden.

Die Biomassezunahme bis zu einer Prozesszeit von 29 Stunden (23 Stunden nach der Zugabe von Nitrat) beträgt  $0,077 \text{ g L}^{-1}$ . Diese Biomassezunahme wurde im Referenzansatz erst nach 34 Stunde Kultivierzeit erreicht ( $0,078 \text{ g L}^{-1}$  nach vollständiger Reduktion von Nitrat sowie Nitrit). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nach einer Adaptationsphase die chemolithoautotrophe Nitratatmung ohne Auftreten einer stationären Phase untersucht werden kann.

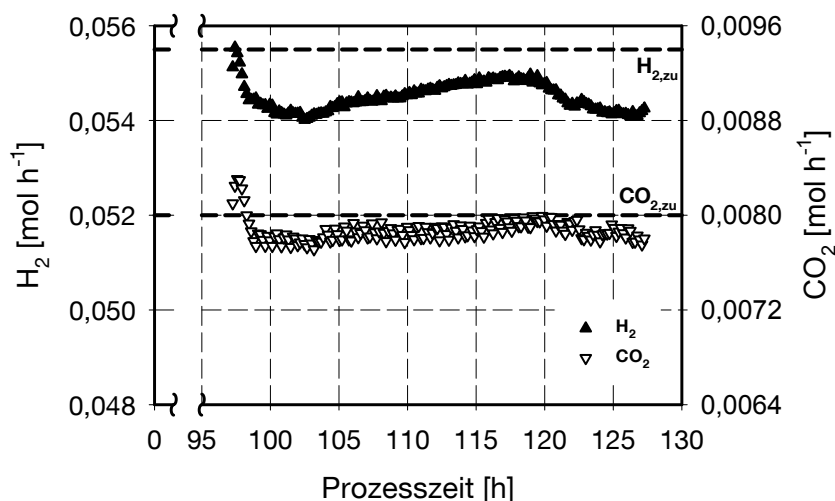
#### ***Chemolithoautotrophe Nitratatmung von Cupriavidus necator nach Nitratadaptation, Wachstum sowie Inkubation ohne Elektronenakzeptor***

Die Untersuchungen zum Einfluss der Medienkonzentration auf die heterotrophe Nitratatmung haben gezeigt, dass bei Wachstum von *Cupriavidus necator*, nach einer Inkubationszeit ohne Elektronenakzeptor kein Nitrit mehr in das Medium abgegeben wird (vgl. Abschnitt 5.1.4). Zur Überprüfung inwiefern sich dieses Verhalten auf chemolithoautotrophe Bedingungen übertragen lässt, wurde dem oben beschriebenen Ansatz zur Untersuchung der Nitratadaptationsphase nach 97,25 Stunden Prozesszeit erneut steril Nitrat zugegeben. Die Mikroorganismen im Bioreaktor waren somit über einen Zeitraum von 57,25 Stunden ohne terminalen Elektronenakzeptor. Die Begasung des Bioreaktors mit Wasserstoff sowie Kohlendioxid wurde während dieser Phase beibehalten. Die Nitratkonzentration nach der erneuten Zugabe betrug  $34 \text{ mmol L}^{-1}$ . Die Biotrockenmassekonzentration zu Beginn der Untersuchung betrug  $1,13 \text{ g L}^{-1}$ .



**Abb. 5.20** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* nach 57,25 Stunden Inkubation ohne terminalen Elektronenakzeptor.

Wie in Abbildung 5.20 zu sehen, setzt das chemolithoautotrophe Wachstum ohne stationäre Phase nach der erneuten Nitratzugabe ein. Vergleichbar zu den Untersuchungen zur heterotrophen Nitratatmung wird nach der Inkubation ohne Elektronenakzeptor kein Nitrit in das Medium abgegeben. Die Biotrockenmassezunahme des linearen Wachstums beträgt  $0,0107 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Abb. 5.21** Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* nach 57,25 Stunden Inkubationszeit ohne Elektronenakzeptor

Abbildung 5.21 zeigt, dass der Wasserstoffmolenstrom im Abgas ebenfalls unmittelbar nach der erneuten Nitratzugabe zu sinken beginnt. Trotz der

konstanten, steigenden Biomassezunahme ist eine Zunahme, sowie eine Abnahme des Wasserstoffmolenstromes während des Beobachtungszeitraumes zu beobachten. Diese Unregelmäßigkeiten sind auf geringe Schwankungen des zur Regelung eingesetzten Massendurchflussreglers zurückzuführen. Aufgrund des geringen Wasserstoffverbrauchs während der chemolithoautotrophen Nitratatmung sind diese Schwankungen deutlich im Abgas bemerkbar. Der bestimmte Wasserstoffgehalt des Abgases ist daher nur für qualitative Betrachtungen geeignet. Quantitative Bestimmungen bezüglich Wasserstoffverbrauchsrate sowie Zellertragskoeffizient bezüglich Wasserstoffs lassen sich somit nicht treffen.

Die Biotrockenmasse bis zu einer Zeit von 127,25 Stunden (Endpunkt der Untersuchung) beträgt  $0,307 \text{ g L}^{-1}$ . Bis zu diesem Zeitpunkt wurden  $22,51 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat und Nitrit reduziert. Der Zellertragskoeffizient für die chemolithoautotrophe Nitratatmung nach einer Inkubation ohne Elektronenakzeptor kann somit zu  $13,64 \text{ g-BTM (mol-Nitrat)}^{-1}$  abgeschätzt werden. Der abgeschätzte Ertragskoeffizient (inklusive Absterbephase) bei dem unter 5.2.2 beschriebenen Referenzansatz ohne Adaptationsphase und Inkubationszeit betrug bei vollständiger Veratmung vergleichbarer Mengen an Nitrat und Nitrit ( $22,93 \text{ mmol L}^{-1}$ )  $3,4 \text{ g-BTM (mol-Nitrat)}^{-1}$ . Im Gegensatz hierzu kommt es nach der Inkubationszeit zu einer Verlangsamung der Nitratreduktion. Bei geringeren Zelldichten ( $1,11 \text{ g L}^{-1}$  bis  $1,187 \text{ g L}^{-1}$ , beziehungsweise  $1,13 \text{ g L}^{-1}$  bis  $1,44 \text{ g L}^{-1}$ ) kann bei dem oben beschriebenen Ansatz mit der Nitratzugabe unmittelbar nach der Nitratadaptation, 19 Stunden nach der erneuten Nitratzugabe kein Nitrat, aber Nitrit, im Medium nachgewiesen werden. Die Reduktion der vergleichbaren Menge an Nitrat, ohne Akkumulation von Nitrit, benötigt bei dem Ansatz mit einer Inkubation ohne Elektronenakzeptor 30 Stunden. Das Ausbleiben der Nitritakkumulation ist somit auf eine Verlangsamung der Nitratreduktion zurückzuführen.

Eine mögliche Ursache der verminderten Nitratreduktionsgeschwindigkeit könnte in einer Veränderung der Elektronentransportwege liegen, bei welcher die Nitritreduktase im Vergleich zu der Nitratreduktase bevorzugt mit Elektronen für die Reduktion versorgt wird. Die Ursache für eine solche Veränderung der Elektronentransportwege könnte in einer Veränderung des Cytochromgehalts während der Inkubation liegen. Studien zur chemolithoautotrophen aeroben Atmung von *Cupriavidus necator* haben gezeigt, dass sich die Zusammensetzung der an der Atmung beteiligten Cytochrome während der Kultivierung im



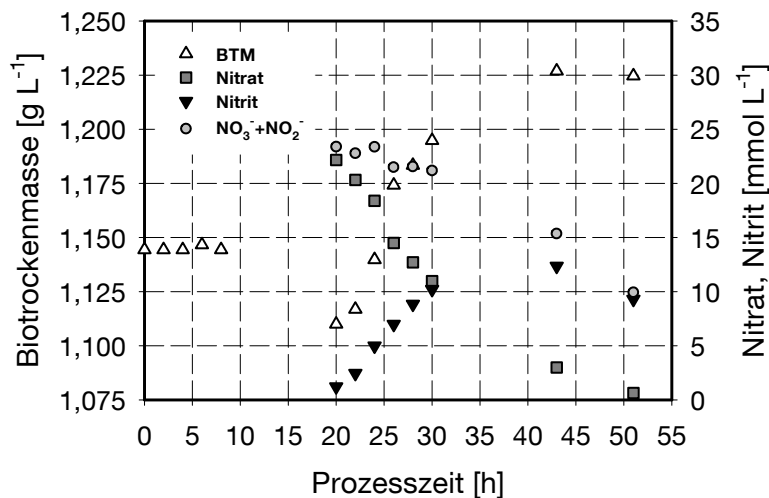
Satzverfahren ändert. So konnten Unterschiede des Gehalts an Cytochrom c und b zwischen früher (OD 5) und später (OD 12) exponentieller Phase beobachtet werden [Kömen et al. 1991]. Es ist also möglich, dass das veränderte Wachstumsverhalten von *Cupriavidus necator* bei der chemolithoautotrophen Nitratatmung nach der Inkubation ohne Elektronenakzeptor auf eine Änderung der Cytochromzusammensetzung und somit auf eine Änderung der Elektronentransportwege zurückzuführen ist.

Darüber hinaus könnte die geringere Nitratreduktion auf ein Fehlen der Enzymaktivität der periplasmatischen Nitratreduktase zurückzuführen sein. Die physiologische Funktion dieser Nitratreduktase sowie deren Elektronendonatoren in lebenden Zellen ist bislang ungeklärt (vgl. Abschnitt 3.2.4). Eine Veränderung der Elektronentransportwege könnte durch das ausschließliche Wachstum von *Cupriavidus necator* durch Nitritreduktion am Ende der Satzkultivierung, als auch auf die lange Inkubationszeit ohne Elektronenakzeptor zurückzuführen sein.

### **Nitritadaptation**

Zur Untersuchung, inwiefern sich das Wachstum mit Nitrit, sowie eine darauf folgende Inkubationszeit ohne Elektronenakzeptor, auf das chemolithoautotrophe Wachstumsverhalten von *Cupriavidus necator* auswirkt, wurde dem Medium zu Beginn einer Untersuchung ausschließlich  $4,35 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrit und kein Nitrat zugegeben. Im Anschluss an die Nitritatmungsphase wurde *Cupriavidus necator* ohne Elektronenakzeptor inkubiert. Während der Nitritadaptation ist keine Zunahme der Biotrockenmasse zu beobachten (Abbildung 5.22). Nach einer Prozesszeit von insgesamt 20 Stunden wurde dem Reaktor erneut steril Nitrat zugegeben, so dass eine Konzentration von  $22,16 \text{ mol L}^{-1}$  erreicht wurde.

Es zeigt sich, dass auch bei diesem Ansatz das chemolithoautotrophe Wachstum unmittelbar nach der erneuten Nitratzugabe einsetzt. Durch die Nitritadaptationsphase, sowie die anschließende Inkubation ohne Elektronenakzeptor, konnte nicht erreicht werden, dass Nitrat ohne eine Akkumulation von Nitrit im Medium veratmet wird. Bis zu einer Zeit von 30 Stunden (10 Stunden nach der Nitratzugabe) werden  $10,21 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrit in das Medium abgegeben.



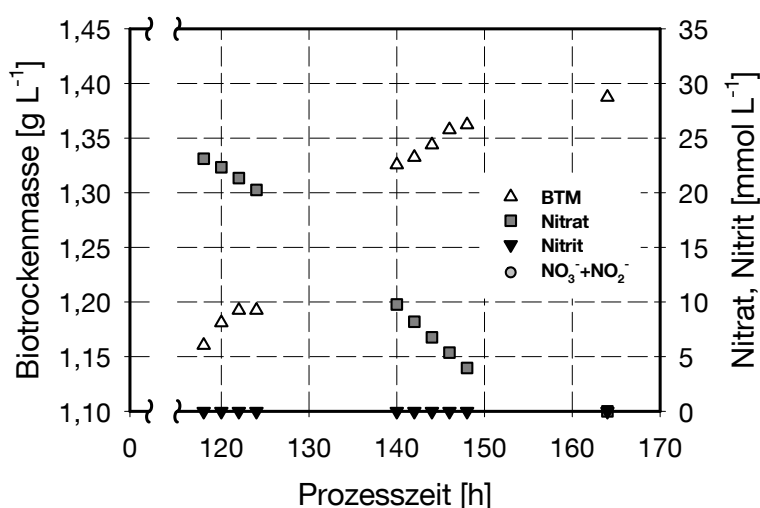
**Abb. 5.22** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* mit einer anfänglichen Nitritadaptationsphase (2,35 mmol L<sup>-1</sup>)

Das Nitritmaximum konnte bei diesem Ansatz nicht bestimmt werden. Nach 43 Stunden Kultivierungszeit liegen noch 3 mmol L<sup>-1</sup> Nitrat sowie 12,35 mmol L<sup>-1</sup> Nitrit im Medium vor. Der Verlauf der Nitritkonzentration vor beziehungsweise nach Erreichen des Maximums deuten darauf hin, dass die maximal in das Medium abgegebene Menge geringer ist als bei dem Ansatz mit einer Nitratadaptationsphase (18,3 mmol L<sup>-1</sup>). Das vorgelegte Nitrat ist nach 51 Stunden (31 Stunden seit der Nitratzugabe) fast vollständig verbraucht (Nitrat-Restkonzentration 0,63 mmol L<sup>-1</sup>). Bei dem vorherigen beschriebenen Ansatz mit einer anfänglichen Nitratadaptationsphase ohne Inkubation vor der erneuten Nitratzugabe (bei vergleichbarer Nitratmenge) war die vollständige Veratmung des vorgelegten Nitrats bereits nach 19 Stunden zu beobachten. Die Nitritadaptationsphase, sowie die anschließende Inkubation ohne Elektronenakzeptor führen daher zu einer Verlangsamung der Nitratreduktion. Während der Nitritreduktionsphase kann keine weitere Zunahme der Biotrockenmasse im Reaktor beobachtet werden. Der Endpunkt der Kultivierung mit einer Nitritadaptationsphase kann aufgrund der defekten Abgasanalytik nicht bestimmt werden. Die Biotrockenmassezunahme nach der Zugabe von Nitrat bis zu einer Zeit von 51 Stunden betrug 0,115 g L<sup>-1</sup>.

### **Chemolithoautotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator* nach Nitritadaptation, Wachstum sowie Inkubation ohne Elektronenakzeptor**

Zur Untersuchung inwiefern sich durch eine längere Inkubationszeit ohne Elektronenakzeptor die Beobachtungen des Ansatzes mit Nitratadaptationsphase und 57,25-stündiger Inkubation ohne Elektronenakzeptor reproduzieren lassen, wurde dem hier beschriebenen Ansatz nach 118 Stunden Prozesszeit erneut steril Nitrat zugegeben. Dies entspricht einer etwa 60-stündigen Inkubationszeit ohne Elektronenakzeptor. Der genaue Zeitraum kann aufgrund des fehlenden Endpunktes der vorangegangenen Untersuchung nicht bestimmt werden. Die Nitratkonzentration nach der Zugabe im Bioreaktor betrug  $23,11 \text{ mmol L}^{-1}$ . Der Wachstumsverlauf sowie der Verlauf der Nitrat und Nitritkonzentration des Ansatzes sind in Abbildung 5.23 dargestellt.

Es zeigt sich, dass bei diesem Ansatz das chemolithoautotrophe Wachstum nach der Nitratzugabe erneut ohne Verzögerung einsetzt. Eine Nitritakkumulation im Medium kann wiederum nicht beobachtet werden. Bis zu einer Zeit von 164 Stunden (46 Stunden nach der erneuten Nitratzugabe) ist das zugegebene Nitrat vollständig verbraucht. Die Biomassezunahme bis zu dieser Zeit beträgt  $0,227 \text{ g L}^{-1}$ . Der Ertragskoeffizient kann somit zu  $9,28 \text{ g-BTM (mol-Nitrat)}^{-1}$  abgeschätzt werden. Dies ist etwas geringer als bei dem Ansatz mit einer Nitratadaptationsphase und anschließender Inkubation ohne Elektronenakzeptor ( $13,64 \text{ g-BTM (mol-Nitrat)}^{-1}$ ).



**Abb. 5.23** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* nach 60 Stunden Inkubation ohne terminalen Elektronenakzeptor.

Die hier beschriebenen Untersuchungen zum Einfluss einer Nitritadaptationsphase mit anschließender Inkubation ohne Elektronenakzeptor haben gezeigt, dass die Länge der Inkubationszeit für die Änderungen des Stoffwechsels von *Cupriavidus necator* verantwortlich ist. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 11 Stunden kommt es zu einer Verlangsamung der Nitratreduktion, welche jedoch nicht ausreicht um eine Nitritakkumulation zu verhindern. Erst nach einer längeren Inkubation ohne Elektronenakzeptor kann chemolithoautotrophes Wachstum mit Nitrat als Elektronenakzeptor ohne die Akkumulation von Nitrit im Medium beobachtet werden.

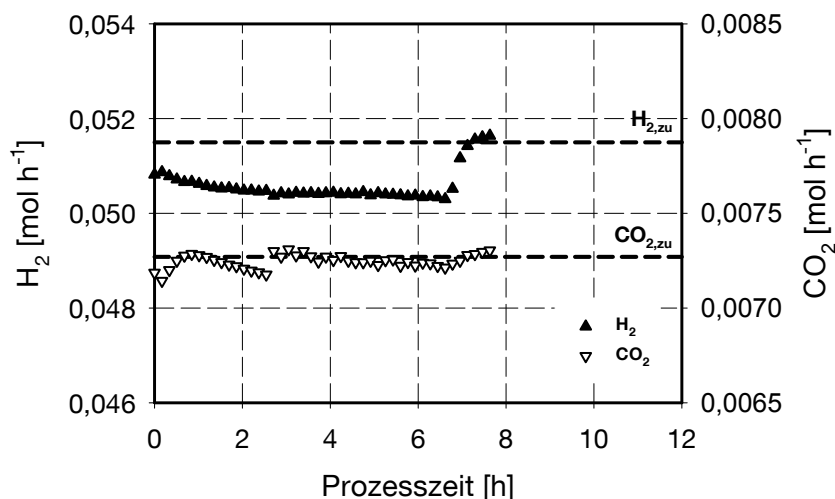
### **5.2.5 Festlegung eines Referenzprozesses zur Bestimmung der Kinetik der chemolithoautotrophen Nitratatmung.**

Die Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung haben gezeigt, dass sich das Wachstumsverhalten von *Cupriavidus necator* in Abhängigkeit der durchlaufenen Wachstumsstadien ändert. Die Grundlage zur Bestimmung der kinetischen Parameter eines Modells zur Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen ist die reproduzierbare Durchführung sequentieller Experimente. Hierzu gehört vor allem bei Untersuchungen im Satzverfahren die Bereitstellung des Mikroorganismus in vergleichbarem physiologischem Ausgangszustand. Als Grundlage für die Bestimmung der kinetischen Parameter der chemolithoautotrophen Nitratatmung wurde daher basierend auf den vorangegangenen Untersuchungen ein Referenzprozess festgelegt.

Zu Beginn der Kultivierung, nach Überführung der heterotrophen Vorkultur in den Bioreaktor, liegen  $4,7 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat im Medium vor, um eine Adaptation der Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen zu gewährleisten. Die Nitratadaptationsphase wurde gewählt, da nach einer Nitritadaptationsphase kein Wachstum während der Nitritatmung zu beobachten war (vgl. 5.4.2). In Abbildung 5.24 sind der Verlauf des Wasserstoff- sowie des Kohlendioxidmolenstromes während der Adaptationsphase dargestellt.

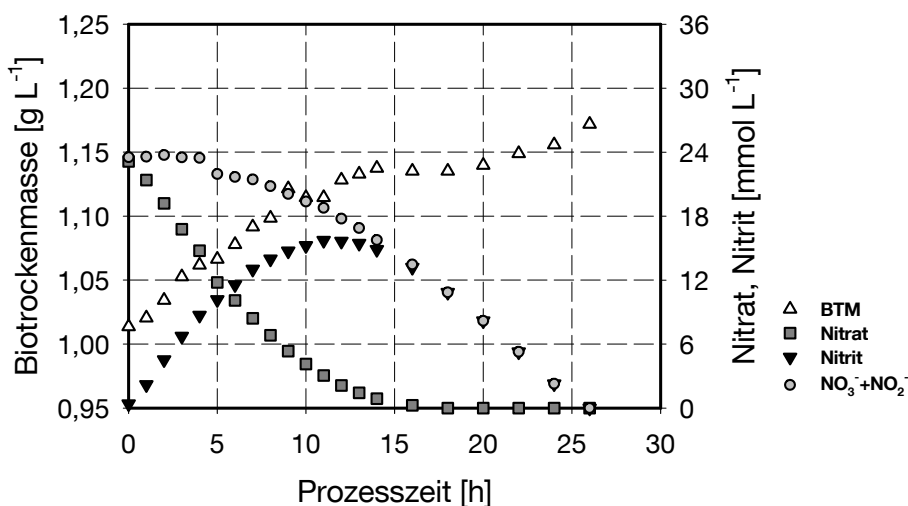
Der Wasserstoffmolenstrom steigt nach einer Prozesszeit von 6,6 Stunden an. Dies deutet daraufhin, dass nach dieser Zeit das vorgelegte Nitrat sowie das gebildete Nitrit vollständig reduziert wurden. Da die Untersuchungen zur Nitrat-Nitritadaptationsphase gezeigt haben, dass nach einer Inkubationszeit ohne Elektronenakzeptor der Biomasseertrag bezogen auf die verbrauchte Menge an Nitrat gesteigert werden konnte, wurde die Untersuchung im Satzverfahren nach

einer Prozesszeit von 12 Stunden durch die sterile Zugabe von Nitrat gestartet. Die Inkubation ohne Elektronenakzeptor betrug somit 5,4 Stunden.



**Abb. 5.24** Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der Adaptation von *Cupriavidus necator* an die chemolithoautotrophe Nitratatmung

In Abbildung 5.25 sind der Wachstumsverlauf, sowie der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration des chemolithoautotrophen Wachstums nach der Adaptations-Inkubationsphase dargestellt.

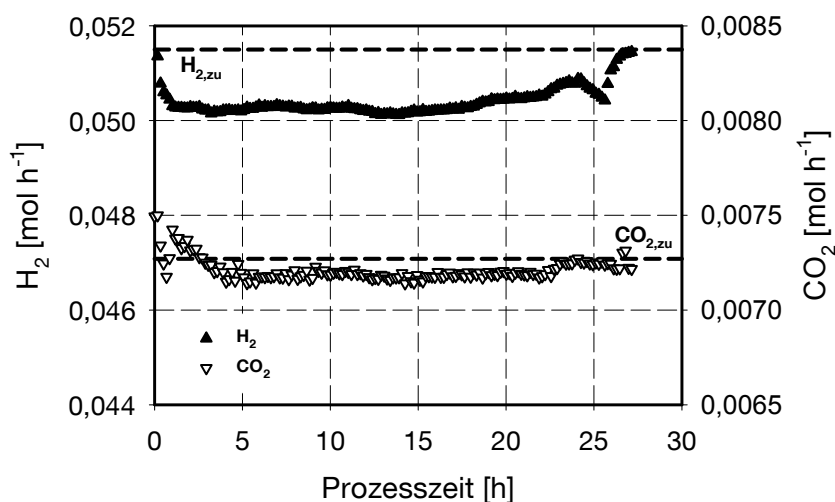


**Abb. 5.25** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Referenzprozess nach einer Nitratadaptationsphase sowie Inkubation ohne Elektronenakzeptor

Der Laborbioreaktor wurde dabei mit einem Gesamtvolumenstrom von  $2,22 \text{ L h}^{-1}$  ( $0,031 \text{ vvm}$ ) begast. Die Zuluft setzte sich dabei zusammen aus  $0,053 \text{ mol h}^{-1}$

(59,54%)  $\text{H}_2$ ,  $0,0071 \text{ mol h}^{-1}$  (7,98%)  $\text{CO}_2$  sowie  $0,0289 \text{ mol h}^{-1}$  (32,48%)  $\text{N}_2$ . Die Nitratkonzentration zu Beginn der Untersuchung betrug  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  bei einer Biotrockenmassekonzentration von  $1,014 \text{ g L}^{-1}$ .

Es zeigt sich, dass das chemolithoautotrophe Wachstum unmittelbar nach der Zugabe von Nitrat ohne Absterbe- oder lag-Phase einsetzt. Die simultane Reduktion von Nitrat und Nitrit setzt nach 5 Stunden ein. Die maximale in das Medium abgegebene Nitritmenge beträgt  $15,72 \text{ mmol L}^{-1}$  (nach 11 Stunden Kultivierungszeit). Dies ist geringer als bei dem unter 5.2.2 beschriebenen Ansatz ohne Adaptationsphase bei welchem bei vergleichbarer Ausgangsnitratkonzentration  $19,21 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrit in das Medium abgegeben wurden. Nach einer Kultivierungszeit von 15 Stunden ist das vorgelegte Nitrat fast vollständig reduziert. Ab diesem Zeitpunkt kann bis zu einer Zeit von 20 Stunden keine weitere Zunahme der Biotrockenmasse im Bioreaktor beobachtet werden. Während dieser stationären Phase kommt es zu einem weiteren Nitrit-Verbrauch. Dies deutet darauf hin, dass Nitrit das Wachstum, nicht aber die Nitritreduktion inhibiert. Die Nitritkonzentration nach 20 Stunden betrug  $8,17 \text{ mmol L}^{-1}$ . Nach einer Prozesszeit von 26 Stunden ist das gebildete Nitrit vollständig verbraucht.



**Abb. 5.26** Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Referenzprozess nach einer Nitratadaptationsphase sowie Inkubation ohne Elektronenakzeptor

Wie in Abbildung 5.26 zu sehen ist fallen im Abgas sowohl die Molenströme von Wasserstoff, als auch Kohlendioxid unmittelbar nach Beginn der Untersuchung ab. Die horizontalen Linien geben den nach der Kultivierung, durch direkte Verbindung der Zuluft- mit der Abluftstrecke, gemessenen Referenzwerte an. Diese weichen aufgrund der Ungenauigkeit der Massendurchflussregler, sowie

der Messgenauigkeit des Gaschromatographen etwas von den eingestellten Sollwerten ab (2,8% für Wasserstoff, 2,3 % für Kohlendioxid).

Nach einer Kultivierungszeit von 25 Stunden beginnt der Wasserstoffmolenstrom im Abgas zu steigen. Zu diesem Zeitpunkt ist das vorgelegte Nitrat fast vollständig verbraucht und dem Organismus steht nur noch Nitrit als Elektronenakzeptor zur Verfügung. Der geringste Wasserstoffmolenstrom beträgt  $0,0501 \text{ mol h}^{-1}$  (56,25%) nach einer Zeit von 13 Stunden. Der starke Abfall des Wasserstoffgehalts in einem Zeitraum zwischen 24 und 25,6 Stunden Kultivierungszeit kann nicht erklärt werden. Eine Biomassezunahme des chemolithoautotrophen Wachstums während der Nitritatmungsphase kann bereits nach 20 Stunden beobachtet werden. Eine mögliche Ursache des erneuten Abfalls des Molenstromes könnte in einem Einsetzen der Reduktion der nicht berücksichtigten Zwischenstufen Stickstoffmonoxid sowie Distickstoffmonoxid liegen. Nach einer Prozesszeit von 25,6 Stunden beginnt der Wasserstoffmolenstrom bis zu dem Referenzwert zu steigen. Nach 26 Stunden liegt kein Nitrit mehr im Medium vor.

In Abbildung 5.27 sind vergleichend die Wachstumsverläufe des unter 5.2.2 beschriebenen Ansatzes ohne Adaptationsphase mit dem hier diskutierten Ansatz mit einer Adaptationsphase sowie Inkubationszeit ohne Elektronenakzeptor dargestellt.

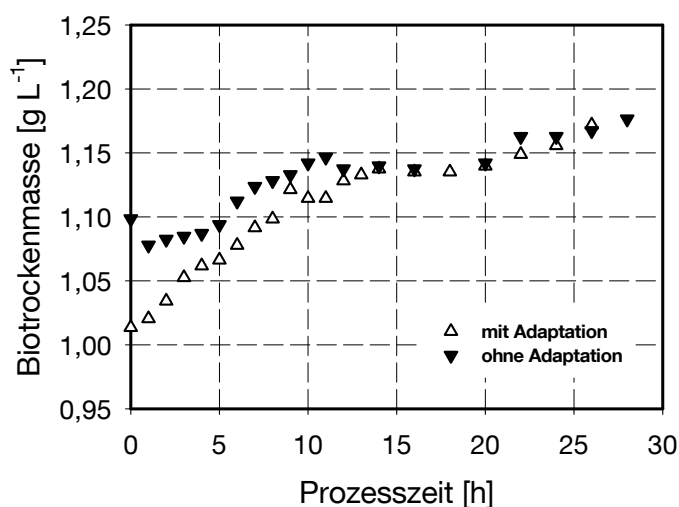


Abb. 5.27 Vergleich des Wachstums der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* mit und ohne Adaptationsphase

Es zeigt sich, dass in den ersten Wachstumsphasen, der Phase der reinen Nitratreduktion, sowie der Phase der simultanen Verwertung von Nitrat und Nitrit, durch das Etablieren einer Adaptations- sowie einer Inkubationsphase das chemolithoautotrophe Wachstum von *Cupriavidus necator* deutlich gesteigert werden konnte. Bei dem Ansatz mit vorangegangener Nitratadaptation sowie Inkubation ohne Elektronenakzeptor ist von Beginn der Untersuchungen bis zum Erreichen der intermediären stationären Phase kontinuierliches Wachstum zu beobachten. Bei dem Ansatz mit einem sofortigen Untersuchungsbeginn nach Überführung der heterotrophen Vorkultur in den Bioreaktor kann das bereits beschriebene Absterben sowie eine lag-Phase beobachtet werden. In der Phase der reinen Nitritatmung, nach der durch Nitritinhibition verursachten stationären Phase, erfolgt bei beiden Ansätzen vergleichbares Wachstum.

Durch die Einführung der Adaptationsphase gefolgt von einer Inkubation ohne Elektronenakzeptor konnte darüber hinaus die Biomasseausbeute gesteigert werden. Die Biomassezunahme während der Reduktion von  $22,93 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat in 28 Stunden betrug bei dem Ansatz ohne Adaptation  $0,078 \text{ g L}^{-1}$ . Bei dem hier beschriebenen Referenzansatz konnte in 27 Stunden bei der Veratmung von  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat in 27 Stunden Prozesszeit eine Biomassezunahme von  $0,158 \text{ g L}^{-1}$  beobachtet werden. Dies entspricht einem abgeschätzten Biomasseertragskoeffizient von  $6,72 \text{ g-BTM (mol-Nitrat)}^{-1}$ .

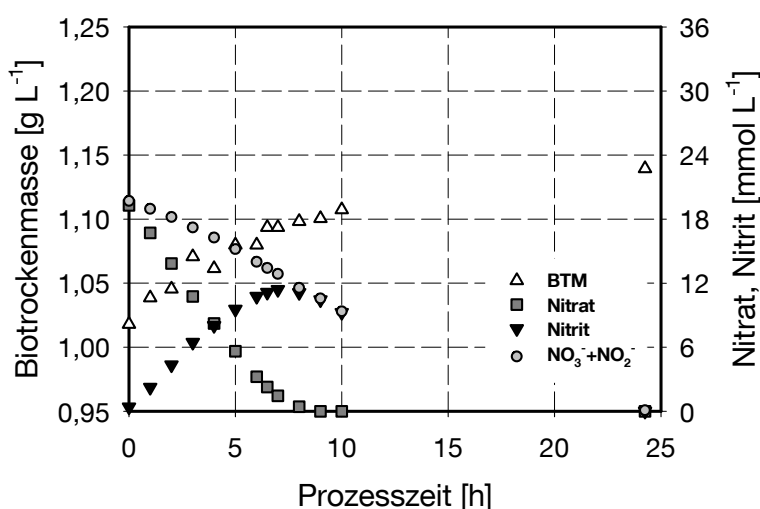
Aufgrund der Verbesserung der Biomasseausbeute, sowie der Verbesserung des Wachstums zu Beginn der Untersuchungen wurden alle folgenden Untersuchungen nach der hier beschriebenen Nitratadaptation sowie der Inkubationszeit ohne terminalen Elektronenakzeptor im Medium durch sterile Zugabe eines Nitratpulses gestartet.

### **5.2.6 Untersuchungen zum Einfluss von Cobinamid auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung**

Wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben ist *Cupriavidus necator* nicht in der Lage Cobalamin (Vitamin B12) *de novo*, also aus einfachen Kohlenstoffquellen wie beispielsweise  $\text{CO}_2$ , zu synthetisieren. Cobinamid abhängige Reaktionen können jedoch von dem Organismus umgangen werden. Darüber hinaus ist der Organismus in der Lage, Cobinamid oder dessen Vorstufen Corbyrinsäure oder Cobinamid zur Synthese des Vitamins, aus der Umgebung aufzunehmen [Pohlmann et al. 2006]



Zur Untersuchung, inwiefern sich der Einsatz der Vitamin B12-Vorstufe Cobinamid auf das chemolithoautotrophe Wachstum von *Cupriavidus necator* auswirkt, wurde dem Medium zu Beginn der Untersuchung (zeitgleich mit der Nitratzugabe nach der Adaptations- sowie Inkubationsphase) Cobinamid in der Form von Dicyanocobinamid in einer Endkonzentration von  $3,2 \cdot 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$  ( $0,031 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) zugegeben. Während der Kultivierung wurde der Bioreaktor kontinuierlich mit einem Gemisch aus  $0,053 \text{ mol h}^{-1}$  (59,54%)  $\text{H}_2$ ,  $0,0071 \text{ mol h}^{-1}$  (7,98%)  $\text{CO}_2$  sowie  $0,0289 \text{ mol h}^{-1}$  (32,48%)  $\text{N}_2$  begast. Die Nitratkonzentration zu Beginn der Untersuchung betrug  $19,3 \text{ mmol L}^{-1}$ . Der Gesamtvolumenstrom betrug  $2,22 \text{ L h}^{-1}$  (0,031 vvm). Bei Beginn der Untersuchung lag eine Biotrockenmassekonzentration von  $1,018 \text{ g L}^{-1}$  im Bioreaktor vor.

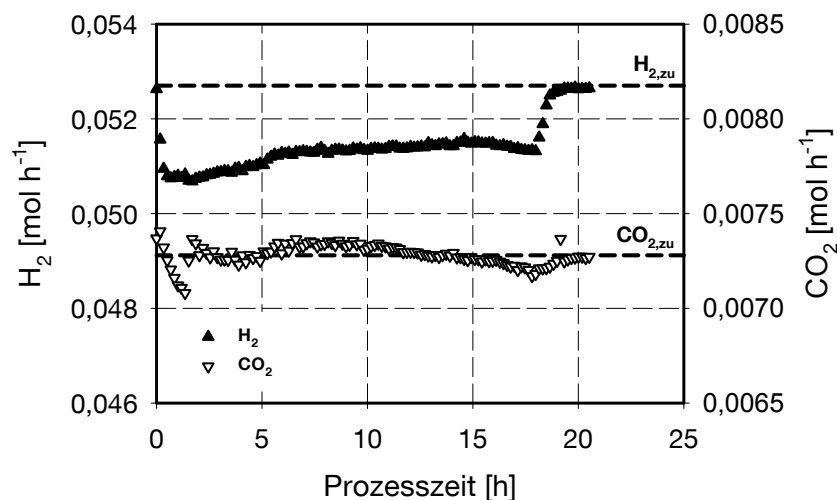


**Abb. 5.28** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* mit  $0,031 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  der Vitamin B12 Vorstufe Cobinamid im Medium.

Wie in Abbildung 5.28 zu sehen, setzt das chemolithoautotrophe Wachstum von *Cupriavidus necator* bei simultaner Nitratatmung mit Cobinamid im Medium unmittelbar nach der Nitratzugabe ein. Im Gegensatz zu dem unter 5.2.5 beschriebenen Referenzansatz ohne Cobinamid im Medium mit einer Nitratanzfangskonzentration von  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , ist hier bereits von Beginn an eine simultane Nitrat- und Nitritveratmung zu beobachten. Die maximal in das Medium abgegebene Nitritkonzentration nach 7 Stunden Kultivierungszeit beträgt  $11,04 \text{ mmol L}^{-1}$ . Dies sind 57,2 % der vorgelegten  $19,3 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat. Bei dem Referenzansatz konnten 66,9 % des vorgelegten Nitrats in Form von Nitrit im Medium nachgewiesen werden. Das vorgelegte Nitrat ist nach einer Kultivierungszeit von 9 Stunden verbraucht. Zu diesem Zeitpunkt lagen noch

10,44 mmol L<sup>-1</sup> Nitrit im Medium vor. In der Phase der reinen Nitritatmung ist eine kontinuierliche Zunahme der Biotrockenmasse zu beobachten. Eine längere stationäre Phase wie sie bei dem unter 5.2.5 beschriebenen Referenzansatz konnte nicht beobachtet werden. In einem vergleichsweise kurzen Zeitraum zwischen 6,5 und 7 Stunden kann kein Wachstum beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass aufgrund der geringeren, maximalen Menge an Nitrit bei dem Ansatz mit Cobinamid im Medium eine geringere Inhibition durch das Zwischenprodukt der Atmung vorlag

Nach einer Prozesszeit von 18 Stunden steigt der Wasserstoffgehalt im Abgas des Bioreaktors stark an (siehe Abbildung 5.29). Dies deutet darauf hin, dass nach dieser Zeit das gebildete Nitrit vollständig verbraucht ist. Nach einer Prozesszeit von 24,25 Stunden kann kein Nitrit im Medium mehr nachgewiesen werden. Die Biomassezunahme bis zu diesem Zeitpunkt beträgt 0,122 g L<sup>-1</sup>.



**Abb. 5.29** Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* mit 0,031 μmol L<sup>-1</sup> Cobinamid, einer Vitamin B12 Vorstufe im Medium.

Der Biomasseertragskoeffizient bezogen auf die vorgelegte Nitratmenge wurde zu 6,32 g-BTM (mol-Nitrat)<sup>-1</sup> abgeschätzt. Bei dem unter 5.2.5 beschriebenen Referenzansatz mit einer Startkonzentration von 23,5 mmol L<sup>-1</sup> war der abgeschätzte Biomasseertrag mit 6,72 g-BTM (mol-Nitrat)<sup>-1</sup> geringfügig höher. Eine Verbesserung des Wachstums hinsichtlich des Biomasseertrags konnte somit durch die Zugabe der Vitaminvorstufe nicht erreicht werden. Lediglich der Anteil des in das Medium abgegebenen Nitrits konnte reduziert werden. Inwiefern die kurze Kultivierungszeit von 18 Stunden nach der Zugabe von Cobinamid

ausreicht bei *Cupriavidus necator* eine Veränderung der Stoffwechselwege hervorzurufen kann nicht geklärt werden.

Da durch den Einsatz von Cobinamid als Vitamin B12-Vorstufe bei diesen Untersuchungen keine deutliche Verbesserung des Wachstums hervorgerufen werden konnte, wurde bei den Untersuchungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter der chemolithoautotrophen Nitratatmung auf die Zugabe dieser Komponente verzichtet.

### **5.3 Kinetik der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Satzverfahren**

Zur genaueren Charakterisierung der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Satzverfahren wurde basierend auf den unter 5.2 dargestellten Untersuchungen ein formalkinetisches Modell erstellt. Ziel war dabei eine ausreichend gute formalkinetische Beschreibung von Wachstums- und Substrataufnahmeraten von *Cupriavidus necator* im Satzverfahren mit einem minimalen Parametersatz zu ermöglichen.

Experimentelle Untersuchungen zur Parameteridentifikation, sowie zur Parametervalidierung wurden in einem Konzentrationsbereich von 12 mmol L<sup>-1</sup> bis 23,5 mmol L<sup>-1</sup> Nitrat zu Beginn der Untersuchung durchgeführt. Die Kultivierungen aller Ansätze erfolgte bei einem pH von 7,0 mit dem unter 5.1.4 beschriebenen, überarbeiteten Medium für die Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Alle Ansätze wurden mit einem Gesamtvolumenstrom von 2,22 L h<sup>-1</sup> (0,031 vvm) begast. Die Molenströme der Komponenten Wasserstoff, Kohlendioxid sowie Stickstoff betragen dabei 0,053 mol h<sup>-1</sup> (59,54%) H<sub>2</sub>, 0,0071 mol h<sup>-1</sup> (7,98%) CO<sub>2</sub> sowie 0,0289 mol h<sup>-1</sup> (32,48%) N<sub>2</sub>. Der Start der Untersuchungen erfolgte durch sterile Zugabe der gewünschten Nitratmenge nach der unter 5.2.5 beschriebenen Adaptations- und Inkubationsphase. Die Bestimmung der formalkinetischen Parameter erfolgte wie in Abschnitt 4.5 beschrieben.

### 5.3.1 Beschreibung des formalkinetischen Modells

Die Erstellung des formalkinetischen Modells zur Beschreibung der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* erfolgte unter Berücksichtigung der folgenden, vereinfachenden Annahmen:

- Der Bioreaktor ist ein ideal durchmischerter, isothermer Rührkesselreaktor.
- Die Nitratatmung ist ein zweistufiger Prozess. Die schrittweise Reduktion von Nitrat zu Nitrit und anschließend zu molekularem Stickstoff erfolgt ohne Akkumulation gasförmiger Zwischenprodukte [nach Kurt et al. 1987].
- Nitrat und Nitrit sind limitierende Substrate.
- Das durch die Nitratreduktion gebildete Nitrit wird vor der weiteren Reduktion aus der Zelle ausgeschleust.
- Die gasförmigen Substrate Wasserstoff sowie Kohlendioxid liegen im Überschuss vor und sind nicht wachstumslimitierend.
- Vorgänge des Erhaltungsstoffwechsels werden nicht berücksichtigt.
- Die Bildung von PHB während der Untersuchung kann vernachlässigt werden.

Wie unter Abschnitt 5.2.5 bei der Beschreibung des Referenzprozesses gezeigt, fällt der Wasserstoffmolenstrom während der gesamten Kultivierungszeit des Ansatzes mit einer Nitratankonzentration von  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  nicht unter  $0,0501 \text{ mol h}^{-1}$  (56,25%). Dies entspricht einem Wasserstoffpartialdruck von 56,98 kPa. Unter Berücksichtigung von Gleichung 4.8 ergibt sich somit eine Gelöstkonzentration von Wasserstoff im Medium von  $0,427 \text{ mmol L}^{-1}$ . Dies ist bedeutend höher (um den Faktor 1000) als die von Siegel und Ollis angegebene Sättigungskonzentration  $K_{\text{H}_2}$  von  $4,6 \cdot 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$  für das chemolithoautotrophe, aerobe Wachstum von *Cupriavidus necator* [Siegel und Ollis 1984]. Eine Limitierung durch Wasserstoff im beobachteten Untersuchungszeitraum kann somit ausgeschlossen werden.

Nach Repaske 1971 ist Kohlendioxid in Form von Hydrogenkarbonat wachstumslimitierend. Die minimale Konzentration von Hydrogenkarbonat zur Gewährleistung von exponentiellem Wachstum wird mit  $0,66 \text{ mmol L}^{-1}$  angegeben [Repaske et al. 1971]. Der zugeführte Kohlendioxidmolenstrom von  $0,0071 \text{ mol h}^{-1}$  (7,98%) führt nach Gleichung 4.8 zu einer Gelöstkonzentration von  $2,38 \text{ mol L}^{-1}$ . Im thermodynamischen Gleichgewicht liegt somit nach Gleichung 4.13  $11,07 \text{ mmol L}^{-1}$  Hydrogenkarbonat im Medium vor. Eine Wachstumslimitierung

durch das zugeführte Kohlendioxid kann demnach ebenfalls ausgeschlossen werden. Zur Beschreibung der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Satzverfahren wurden daher drei Massenbilanzen berücksichtigt.

Biotrockenmassebilanz:

$$\frac{dc_x}{dt} = c_x \cdot \mu \quad \text{Gl. 5.1}$$

mit:

$$c_x = \text{Biotrockenmassekonzentration [g L}^{-1}\text{]}$$

$$\mu = \text{spezifische Wachstumsrate [d}^{-1}\text{]}$$

Nitratbilanz:

$$\frac{dc_{\text{NO}_3^-}}{dt} = -c_x \cdot q_{\text{NO}_3^-} \quad \text{Gl. 5.2}$$

dabei sind:

$$c_{\text{NO}_3^-} = \text{Nitratkonzentration [mol L}^{-1}\text{]}$$

$$q_{\text{NO}_3^-} = \text{spezifische Nitrataufnahmerate [mol g}^{-1} \text{d}^{-1}\text{]}$$

Massenbilanz für Nitrit:

$$\frac{dc_{\text{NO}_2^-}}{dt} = c_x \cdot (q_{\text{NO}_3^-} - q_{\text{NO}_2^-}) \quad \text{Gl. 5.3}$$

mit:

$$c_{\text{NO}_2^-} = \text{Nitritkonzentration [mol L}^{-1}\text{]}$$

$$q_{\text{NO}_2^-} = \text{spezifische Nitritaufnahmerate [mol g}^{-1} \text{d}^{-1}\text{]}$$

Die unter 5.2 beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass *Cupriavidus necator* unter chemolithoautotrophen Bedingungen in der Lage ist, die beiden Elektronenakzeptoren Nitrat und Nitrit simultan zu verwerten. Zur formalkinetischen Beschreibung der spezifischen Wachstumsrate wurde daher

ein Ansatz der simultanen Substratverwertung gewählt (vergleiche Abschnitt 3.3.2). Darüber hinaus konnte eine Inhibition durch einen Überschuss an Nitrit beobachtet werden. Nitritinhibition tritt häufig während der Reduktion von Nitrat auf und wurde bereits bei anderen Mikroorganismen wie z.B. *Pseudomonas denitrificans* oder *Paracoccus denitrificans* beobachtet [Wang et al. 1995; Baumann et al. 1997]. Da Nitrit während der anaeroben Nitratatmung als Zwischenprodukt auftritt, wurde der in Gleichung 3.18 beschriebene einfache Potenzansatz nach Levenspiel zur Beschreibung der Nitritinhibition gewählt. Für die spezifische Wachstumsrate der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* ergibt sich somit:

$$\mu = (\mu_{\text{NO}_3^-} + \mu_{\text{NO}_2^-}) \cdot \left(1 - \frac{c_{\text{NO}_2^-}}{c_{\text{NO}_2^-, \text{max}}}\right)^n \quad \text{Gl. 5.4}$$

Hierbei sind:

- $\mu_{\text{NO}_3^-}$  = spezifische Wachstumsrate der Nitratreduktion [ $\text{d}^{-1}$ ]
- $\mu_{\text{NO}_2^-}$  = spezifische Wachstumsrate der Nitritreduktion [ $\text{d}^{-1}$ ]
- $c_{\text{NO}_2^-}$  = Nitritkonzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
- $c_{\text{NO}_2^-, \text{max}}$  = Maximale Nitritkonzentration, bei welcher kein Wachstum mehr eintritt [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
- $n$  = Exponent [-]

Die spezifische Wachstumsrate mit Nitrat als Elektronenakzeptor wurde nach Monod zu:

$$\mu_{\text{NO}_3^-} = \mu_{\text{NO}_3^-, \text{max}} \cdot \frac{c_{\text{NO}_3^-}}{c_{\text{NO}_3^-} + K_{\text{S}, \text{NO}_3^-}} \quad \text{Gl. 5.5}$$

definiert. Dabei bedeuten:

- $\mu_{\text{NO}_3^-, \text{max}}$  = maximale spezifische Wachstumsrate bei der Nitratreduktion [ $\text{d}^{-1}$ ]
- $c_{\text{NO}_3^-}$  = Nitratkonzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
- $K_{\text{S}, \text{NO}_3^-}$  = Sättigungskonzentration für Nitrat [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

Zur Beschreibung der spezifischen Wachstumsrate mit Nitrit als Elektronenakzeptor wurde der Monod-Term mit einer einfachen Schaltfunktion erweitert:

$$\mu_{\text{NO}_2^-} = \mu_{\text{NO}_2^-, \text{max}} \cdot \frac{c_{\text{NO}_2^-}}{c_{\text{NO}_2^-} + K_{\text{S,NO}_2^-}} \cdot \frac{F_{\text{NO}_3^-}}{F_{\text{NO}_3^-} + c_{\text{NO}_3^-}} \quad \text{Gl. 5.6}$$

mit:

$\mu_{\text{NO}_2^-, \text{max}}$  = maximale spezifische Wachstumsrate bei der Nitritreduktion [ $\text{d}^{-1}$ ]

$K_{\text{S,NO}_2^-}$  = Sättigungskonzentration für Nitrit [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

$c_{\text{NO}_2^-}$  = Nitritkonzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

$F_{\text{NO}_3^-}$  = Schaltparameter [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

Die Schaltfunktion berücksichtigt die Beobachtung, dass zu Beginn der Kultivierung bei hohen Nitratkonzentrationen zunächst ausschließlich Nitrat als Elektronenakzeptor verwendet wird ehe eine simultane Reduktion von Nitrat und Nitrit einsetzt.

Die spezifische Substrataufnahmerate für Nitrat ergibt sich zu:

$$q_{\text{NO}_3^-} = \frac{\mu_{\text{NO}_3^-}}{Y_{\text{X,NO}_3^-}} \quad \text{Gl. 5.7}$$

mit:

$Y_{\text{X,NO}_3^-}$  = Zellertragskoeffizient für Nitrat [ $\text{g mol}^{-1}$ ]

Analog lässt sich die spezifische Substrataufnahmerate für Nitrit darstellen durch:

$$q_{\text{NO}_2^-} = \frac{\mu_{\text{NO}_2^-}}{Y_{\text{X,NO}_2^-}} \quad \text{Gl. 5.8}$$

mit:

$Y_{\text{X,NO}_2^-}$  = Zellertragskoeffizient für Nitrit [ $\text{g mol}^{-1}$ ]

Für die Beschreibung der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* durch die in den Gleichungen 5.1 bis 5.8 dargestellten Zusammenhänge müssen somit Untersuchungen zur Identifikation von 9 formalkinetischen Parametern durchgeführt werden.

### 5.3.2 Untersuchungen zur Parameteridentifikation

Zur Identifikation der 9 Parameter des unter 5.3.1 dargestellten formalkinetischen Modells wurde neben dem unter 5.2.5 beschriebenen Referenzprozess mit einer Nitratanfängskonzentration von  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  eine weitere Kultivierung im Satzverfahren mit  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat im Medium zu Beginn der Kultivierung durchgeführt. Die Parameteridentifikation anhand der zwei Untersuchungen erfolgte wie unter Abschnitt 4.5 beschrieben.

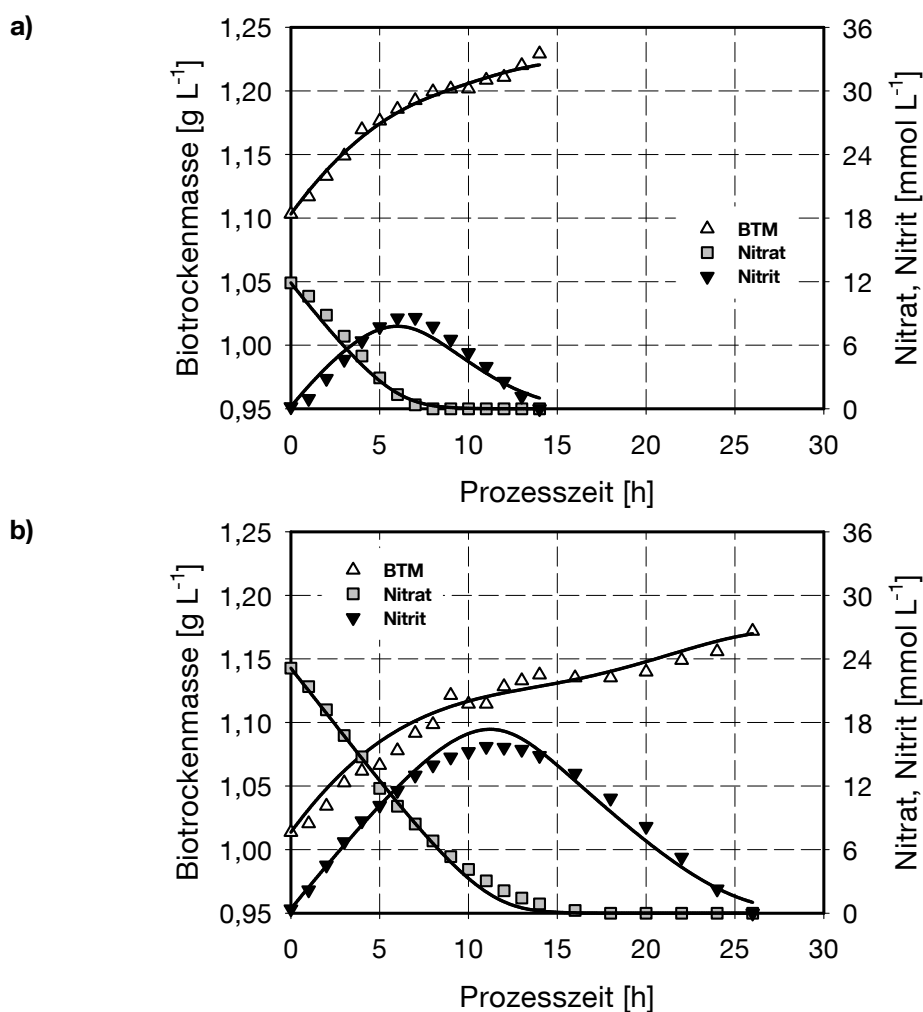


Abb. 5.30 Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Die Linien geben die simulierten Verläufe an. a)  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration; b)  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration.



In Abbildung 5.30 sind sowohl die experimentell bestimmten Wachstumsverläufe, die Verläufe der Nitrat- und Nitritkonzentrationen der beiden Ansätze, als auch die mit Hilfe der identifizierten kinetischen Parameter simulierten Verläufe dargestellt. Die experimentellen Daten werden hierbei als Symbole, die simulierten Verläufe als Linien dargestellt. Die Verläufe der Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenströme im Abgas sind Anhang 9.11 zu entnehmen.

Durch das einfache formalkinetische Modell mit 9 Parametern lassen sich die experimentellen Daten gut wiedergeben. Es wird sowohl für den Wachstumsverlauf, als auch für die Verläufe der Nitrat- und Nitritkonzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und experimentellen Daten erreicht. Lediglich bei der Vorhersage der maximalen Nitritkonzentration bei dem Ansatz mit  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat im Medium wird eine Abweichung zwischen simulierten und experimentell ermittelten Daten beobachtet. Die Abweichung für die maximale Nitritkonzentration, zwischen Modellvorhersage und experimentell ermittelten Daten beträgt hierbei 9,5 %.

In Abbildung 5.31 sind die Verläufe der mit Hilfe des Modells bestimmten Wachstumsraten, sowie die Anteile der Nitrat- und Nitritwachstumsraten dargestellt. Wie zu sehen, erfolgt das Wachstum zu Beginn der Kultivierung zum größten Teil aufgrund der Nitratreduktion. Durch die Inhibition des gebildeten Nitrits fällt die Wachstumsrate während der Kultivierung bei beiden Untersuchungen stark ab. Die maximalen Wachstumsraten mit Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor werden aufgrund der Bevorzugung von Nitrat als Elektronenakzeptor erst nach 8,4 Stunden (bei  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat-anfangskonzentration), beziehungsweise 15,2 Stunden ( $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat-anfangskonzentration) Kultivierzeit erreicht. Bei der Untersuchung mit einer Nitrat-anfangskonzentration von  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  ist ein erneuter Anstieg der Wachstumsrate nach 15 Stunden Kultivierzeit zu beobachten. Eine detaillierte Diskussion der identifizierten formalkinetischen Parameter wird in Abschnitt 5.3.3 vorgenommen.

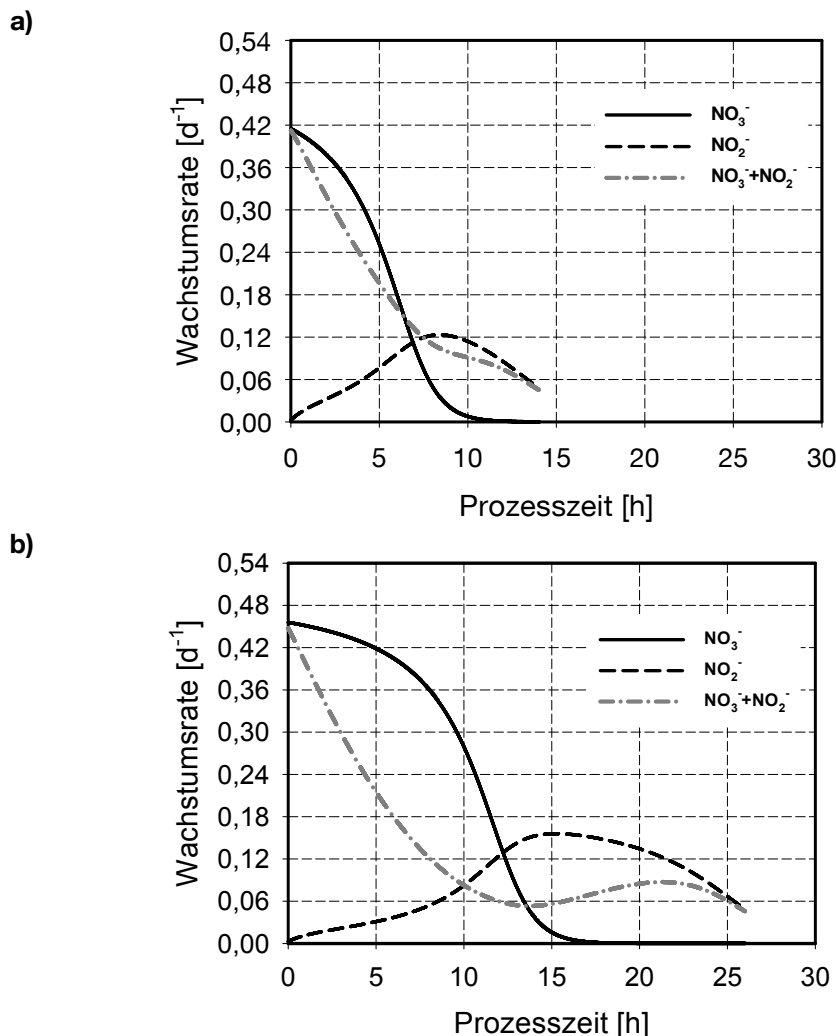
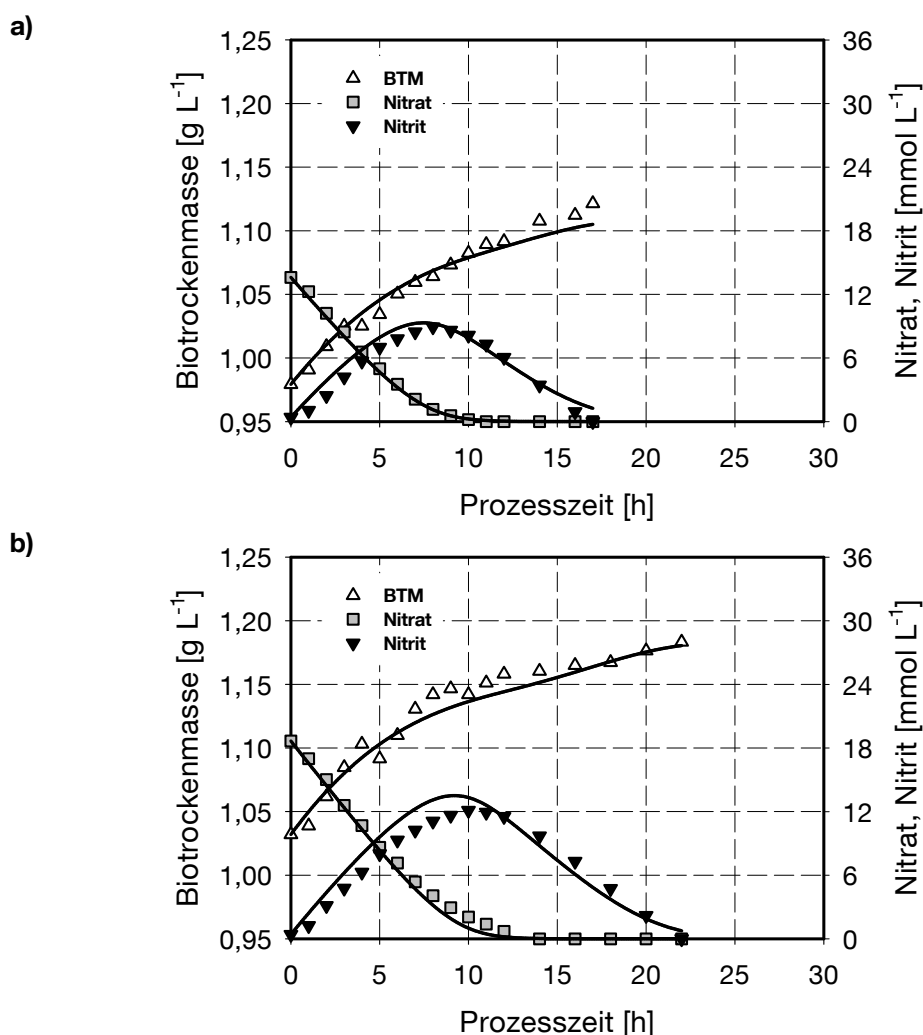


Abb. 5.31 Modellvorhersagen für den Verlauf der Wachstumsraten während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Satzverfahren. a) 12 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration; b) 23,5 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration.

### 5.3.3 Untersuchung zur Parametervalidierung

Die Validierung der für die chemolithoautotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Satzverfahren identifizierten Parameter erfolgte anhand von zwei weiteren, unabhängigen Untersuchungen. Die Nitratanfängskonzentrationen lagen dabei mit 14 mmol L<sup>-1</sup> sowie 19 mmol L<sup>-1</sup> im Bereich zwischen den Konzentrationen, welche bei den Untersuchungen zur Parameteridentifikation eingesetzt wurden. Abbildung 5.32 zeigt die Wachstumsverläufe, sowie die Verläufe von Nitrat- und Nitritkonzentration der beiden Ansätze. Die Linien geben den vom Modell vorhergesagten Verlauf wieder. Die Verläufe der Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenströme im Abgas sind Anhang 9.12 zu entnehmen.

Es zeigt sich, dass eine gute Übereinstimmung zwischen den von dem Modell vorhergesagten Verläufen und den experimentell ermittelten Daten erreicht wird. Das zur Beschreibung der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* entwickelte einfache formalkinetische Modell mit der Berücksichtigung einer Nitritinhibition sowie der Berücksichtigung der bevorzugten Nitratveratmung zu Beginn der Kultivierung eignet sich somit, um im untersuchten Konzentrationsbereich, verlässliche Vorhersagen über das Wachstum sowie die Verläufe der Nitrat und Nitritkonzentration im Satzverfahren zu treffen.

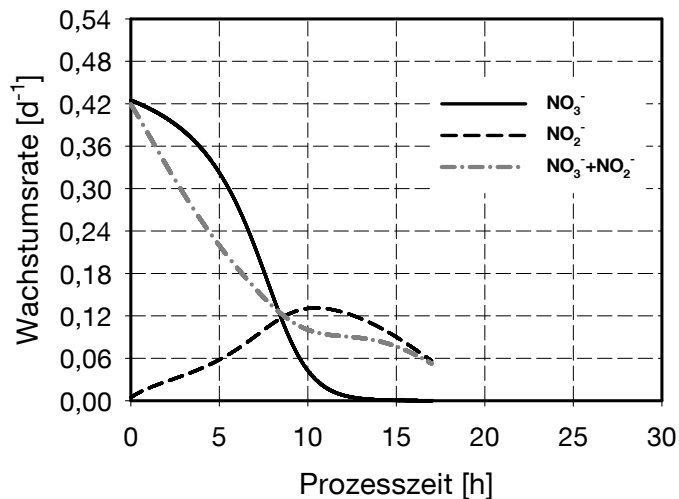


**Abb. 5.32** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Die Linien geben die simulierten Verläufe an. a)  $14 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration; b)  $19 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration

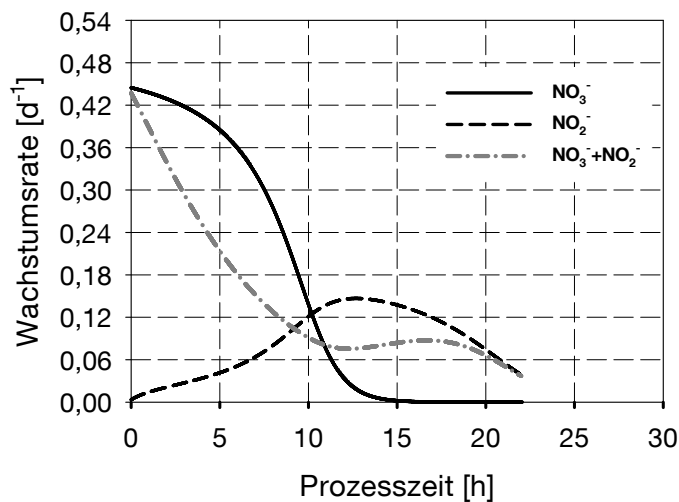
Die Abweichung der maximal in das Medium abgegebenen Nitritkonzentration zwischen Modellvorhersage sowie experimentell ermittelten Daten bei dem Ansatz mit einer Nitratanfängskonzentration von  $19 \text{ mmol L}^{-1}$  beträgt 10,4 %. Der

Endpunkt der Biotrockenmassekonzentration des Ansatzes mit  $14 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration zeigt eine Abweichung von lediglich 1,5% zwischen Modellvorhersage und experimenteller Beobachtung.

a)



b)



**Abb. 5.33 Modellvorhersagen für den Verlauf der Wachstumsraten während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Satzverfahren. a)  $14 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration; b)  $19 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration.**

Abbildung 5.33 zeigt die Verläufe der Modellvorhersagen der Gesamtwachstumsraten, sowie die Anteile der Nitrat- und Nitritwachstumsraten. Der Anteil der Nitritwachstumsrate am Gesamtwachstum steigt dabei zu Beginn der Kultivierung nur langsam an. Die maximalen Wachstumsraten mit Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor werden nach 10,5 Stunden ( $14 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration) und 12,7 Stunden ( $19 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration) erreicht. Während des Wachstums aufgrund reiner

Nitratreduktion bleibt die Nitritwachstumsrate bei beiden Ansätzen zunächst relativ konstant, ehe sie aufgrund des Verbrauches von Nitrit zu sinken beginnt.

### 5.3.4 Diskussion der identifizierten formalkinetischen Parameter

Die unter 5.3.2 sowie 5.3.3 beschriebenen Untersuchungen zur Parameteridentifikation, sowie zur Parametervalidierung haben gezeigt, dass das chemolithoautotrophe Wachstum von *Cupriavidus necator* mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor gut durch das formalkinetische Modell sowie die identifizierten Parameter im untersuchten Konzentrationsbereich dargestellt werden kann. In Tabelle 5.4 sind die 9 identifizierten Parameter des kinetischen Modells der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Satzverfahren zusammengefasst.

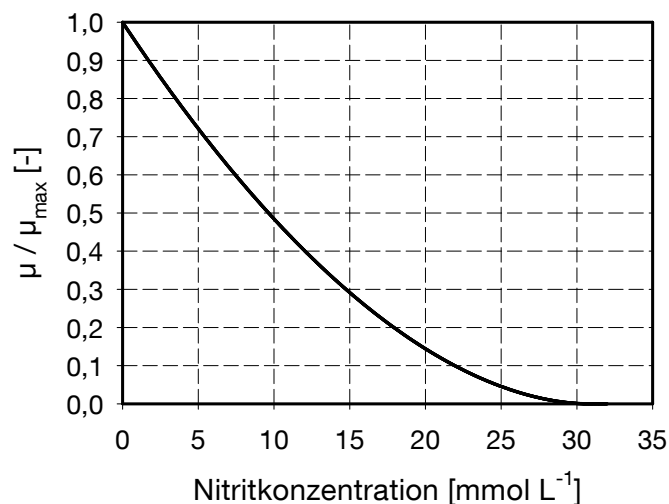
**Tab. 5.4 Identifizierte Modellparameter der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Satzverfahren**

Parameter	Wert	Einheit
$\mu_{\text{NO}_3^-,\text{max}}$	0,509	d <sup>-1</sup>
$Y_{\text{X},\text{NO}_3^-}$	9,1	g mol <sup>-1</sup>
$K_{\text{S},\text{NO}_3^-}$	2,7	mmol L <sup>-1</sup>
$F_{\text{NO}_3^-}$	3,27	mmol L <sup>-1</sup>
$\mu_{\text{NO}_2^-,\text{max}}$	0,195	d <sup>-1</sup>
$Y_{\text{X},\text{NO}_2^-}$	4,86	g mol <sup>-1</sup>
$K_{\text{S},\text{NO}_2^-}$	3,07	mmol L <sup>-1</sup>
$c_{\text{NO}_2^-,\text{max}}$	30,73	mmol L <sup>-1</sup>
$n$	1,84	-

Es zeigt sich, dass die maximale Wachstumsrate mit Nitrat als Elektronenakzeptor deutlich höher als bei der Reduktion von Nitrit (0,509 d<sup>-1</sup> beziehungsweise 0,195 d<sup>-1</sup>). Der spezifische Zellertrag bei Wachstum mit Nitrat (9,1 g mol<sup>-1</sup>) ist ebenfalls größer im Vergleich zum Wachstum mit Nitrit (4,86 g mol<sup>-1</sup>). Eine höhere Affinität des Organismus bezüglich Nitrat zeigt sich

auch bei Betrachtung der Sättigungskonzentration. So ist die Sättigungskonzentration für Nitrat mit  $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$  geringer als der für die Nitritatmung identifizierte Wert mit  $3,07 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Die maximale Nitritkonzentration, oberhalb derer kein Wachstum mehr möglich ist, wurde zu  $c_{\text{NO}_2^-, \text{max}} = 30,7 \text{ mol L}^{-1}$  bestimmt. Da die Inhibition durch das gebildete Nitrit keinem linearen Zusammenhang folgt ( $n = 1,84$ ) führen bereits geringe Nitritkonzentrationen zu einer Inhibition des chemolithoautotrophen Wachstums. Eine Nitritkonzentration von  $9,6 \text{ mmol L}^{-1}$  führt somit bereits zu einer Halbierung der Wachstumsrate. Der identifizierte Zusammenhang zwischen Nitritkonzentration und Wachstumsrate ist in Abbildung 5.34 dargestellt.



**Abb. 5.34 Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und Nitritkonzentration des im Satzverfahren identifizierten formalkinetischen Modells.**

Bei der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Satzverfahren gewinnt die Nitritreduktion erst nach einer starken Abnahme des zu Beginn der Kultivierung vorgelegten Nitrats an Bedeutung. Dies wird durch den geringen Wert von  $3,27 \text{ mmol L}^{-1}$  des Schaltparameters  $F_{\text{NO}_3^-}$  verdeutlicht. Die Wachstumsrate mit Nitrit als Elektronenakzeptor beträgt daher bei der Anwesenheit von  $3,27 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat im Medium lediglich die Hälfte der maximal erreichbaren Wachstumsrate.

Die identifizierten formalkinetischen Parameter zeigen, dass das Wachstum unter chemolithoautotrophen Bedingungen im Vergleich zur chemolithoautotrophen aeroben Kultivierung stark eingeschränkt ist. Die bislang berichteten maximalen Wachstumsraten bei der aeroben, chemolithoautotrophen Kultivierung von *Cupriavidus necator* DSM 428 betragen  $0,23 \text{ h}^{-1}$  ( $5,52 \text{ d}^{-1}$ ) [Sonnleitner et al. 1979].

Somit beträgt die hier identifizierte, maximale Wachstumsrate ( $\mu_{\text{NO}_3^-, \text{max}}$ ) von  $0,509 \text{ d}^{-1}$  ( $0,021 \text{ h}^{-1}$ ) lediglich 9,2 % der Wachstumsrate der aeroben Kultivierung. Dies ist deutlich geringer als die üblicherweise angenommene Reduktion von 20 % der Wachstumsraten der heterotrophen Nitratatmung im Vergleich zur Sauerstoffatmung [Hulsbeek et al. 2002].

Im Rahmen der Untersuchungen zur Nitratatmung von *Cupriavidus necator* DSM 428 wurde bereits von Pfitzner und Schlegel 1973 eine starke Verminderung der Zellausbeute unter chemolithoautotrophen Bedingungen beobachtet. Es wurde vermutet, dass das geringe Wachstum während der chemolithoautotrophen Nitratatmung auf einen ungünstigen ATP-Gehalt der Zellen zurückzuführen ist. Der Energiegewinn durch Elektronentransportphosphorylierung könnte insbesondere bei der Nitritreduktion im Vergleich zur Reduktion von Sauerstoff stark eingeschränkt sein [Pfitzner und Schlegel 1973]. Diese Hypothese wird durch die Tatsache bekräftigt, dass die Nitritreduktase im Periplasma vorliegt und nur indirekt über ein Cytochrom an der Atmungskette beteiligt ist (vergleiche Abschnitt 3.2.4).

Untersuchungen von Strohm und Mitarbeitern 2007 zum Zellertrag von *Paracoccus denitrificans* während der Nitratatmung unter chemolithoautotrophen Bedingungen haben gezeigt, dass auch bei diesem Organismus das Wachstum stark eingeschränkt ist. Die maximale Wachstumsrate für *Paracoccus denitrificans* mit Wasserstoff als Elektronendonator, sowie Nitrat als Elektronenakzeptor wurde zu  $0,831 \text{ d}^{-1}$  bestimmt. Der Zellertragskoeffizient bei den beschriebenen Untersuchungen betrug  $7,2 \text{ g-BTM (mol-Nitrat)}^{-1}$ . Diese Werte sind mit den hier beschriebenen Parametern für die chemolithoautotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator* vergleichbar. Das stark verminderte Wachstum von *Paracoccus denitrificans* bei der Elektronenübertragung von Wasserstoff auf Nitrat wurde ebenfalls auf einen reduzierten ATP-Gewinn zurückgeführt. Als Ursache für den geringeren ATP-Gewinn wurde hier die örtliche Anordnung der Reduktase-Enzyme in der Zelle aufgeführt. Durch die Lokalisierung der Nitritreduktase sowie der  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase im Periplasma der Zelle sind diese Enzyme nicht am Aufbau eines Protonengradienten über die Cytoplasmamembran, und somit nicht am Energiegewinn in Form von ATP beteiligt [Strohm et al. 2007].

Eine weitere mögliche Ursache für die verminderte Wachstumsrate bei der chemolithoautotrophen Nitratatmung könnte in einer mangelhaften Einbindung der im Cytoplasma gelösten Hydrogenase in den Elektronentransport liegen. Bei

Untersuchungen zum chemolithoautotrophen aeroben Wachstum von *Cupriavidus necator* konnte gezeigt werden, dass die maximale Wachstumsrate von Mutanten ohne die gelöste Hydrogenase im Vergleich zum Wildtyp um 70 % reduziert wird [Hogrefe et al. 1984]. Eine schlechte Versorgung dieser Hydrogenase mit dem Cofaktor  $\text{NAD}^+$  aus der Atmungskette könnte somit zu dem verminderten Wachstum von *Cupriavidus necator* während der chemolithoautotrophen Nitratatmung führen.

Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Untersuchungen sowie den Ergebnissen von Strohm et al. wurden von Vasiliadou und Mitarbeitern 2006 bei der chemolithoautotrophen Nitratatmung anderer Mikroorganismen deutlich höhere Wachstumsraten ermittelt. Die maximalen Wachstumsraten mit Nitrat als Elektronenakzeptor sind  $0.109 \text{ h}^{-1}$  bei *Acidovorax* sp.,  $0.155 \text{ h}^{-1}$  bei *Acinetobacter* sp. und  $0.0875 \text{ h}^{-1}$  bei *Paracoccus* sp. Darüber hinaus lagen die maximalen Wachstumsraten mit Nitrit als Elektronenakzeptor bei  $0.868 \text{ h}^{-1}$  bei *Acidovorax* sp.,  $0.608 \text{ h}^{-1}$  bei *Acinetobacter* sp. und  $0.457 \text{ h}^{-1}$  bei *Paracoccus* sp. [Vasiliadou et al. 2006].

Die tatsächliche Ursache des bei *Cupriavidus necator* stark verringerten Wachstums bei Nitratatmung unter chemolithoautotrophen Bedingungen im Vergleich zur Sauerstoffatmung lässt sich nur über detaillierte biochemische Analysen des Energiestoffwechsel und der  $\text{CO}_2$ -Fixierung sowie metabolischer Stoffflußanalysen unter diesen Bedingungen klären.

Zur Untersuchung inwiefern das entwickelte formalkinetische Modell sowie die identifizierten Modellparameter auch auf Nitratankonzentrationen größer  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  anwendbar ist, wurde ein weiterer Ansatz mit  $32,6 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat im Medium zu Beginn der Untersuchung durchgeführt. In Abbildung 5.35 sind der Wachstumsverlauf, sowie der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration der Untersuchung. Die Linien geben den auf Grundlage des Modells vorhergesagten Verlauf wieder.

Es zeigt sich, dass das Modell nicht in der Lage ist, bei dieser hohen Nitratankonzentration den Prozessverlauf wiederzugeben. Die Abweichung tritt dabei vor allem mit Erreichen hoher Nitritkonzentration bei gleichzeitiger hoher Nitratkonzentration auf. Eine gegenseitige Beeinflussung von Nitrat und Nitrit bei der Nitratatmung wurde bereits für andere Mikroorganismen beschrieben. Die gegenseitige Beeinflussung wurde hierbei darauf zurückgeführt, dass die beiden Elektronenakzeptoren um die Verwertung von Elektronen aus der Atmungskette konkurrieren [Almeida et al. 1995; Vasiliadou et al 2006].



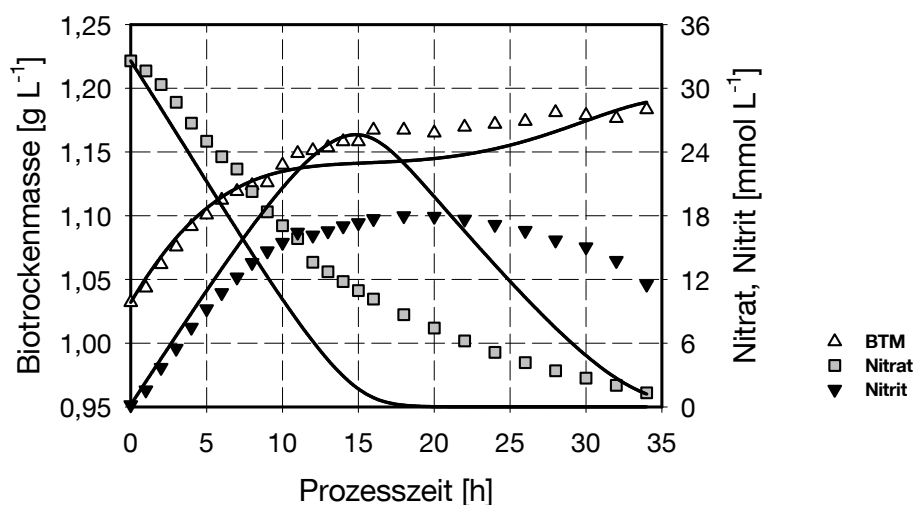


Abb. 5.35 Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Die Linien geben die simulierten Verläufe an. Nitratanfangskonzentration  $32,6 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Diese Interaktion der beiden Elektronenakzeptoren wird durch das hier entwickelte Modell nicht berücksichtigt. Bei den unter 5.3.2 sowie 5.3.3 dargestellten Untersuchungen haben zu keinem Zeitpunkt hohe Konzentrationen von Nitrat sowie Nitrit simultan vorgelegen.

### 5.3.5 Modellbasierte Bestimmung der Raum-Zeit-Ausbeuten im Satzverfahren

Zur Bestimmung der optimalen Nitratanfangskonzentration, sowie der optimalen Prozesszeit zur chemolithoautotrophen Kultivierung von *Cupriavidus necator* bei simultaner Nitratatmung im Satzverfahren wurde die Raum-Zeit-Ausbeute in Abhängigkeit dieser Parameter mit Hilfe des identifizierten formalkinetischen Modells simuliert.

Die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) für Kultivierungen im Satzverfahren ist definiert als:

$$\text{RZA} = \frac{C_{X,E} - C_{X,0}}{t_E - t_0}$$

Gl. 5.9

mit:

$c_{X,E}$  = Biotrockenmassekonzentration am Ende der Untersuchung [ $\text{g L}^{-1}$ ]

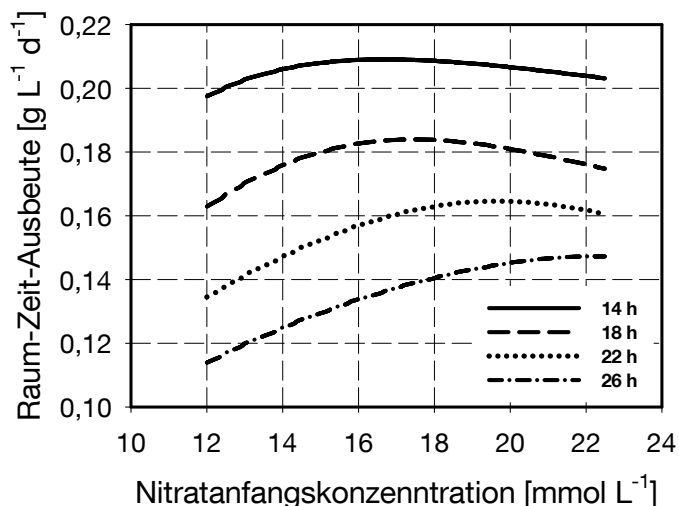
$c_{X,o}$  = Biotrockenmassekonzentration zu Beginn der Untersuchung [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$t_E$  = Endzeitpunkt [h]

$t_0$  = Startzeitpunkt [h]

Der untersuchte Bereich der Nitratanfängskonzentration zwischen  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  und  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  entspricht dabei dem Konzentrationsbereich in welchem die Parameter des formalkinetischen Modells identifiziert und validiert wurden. Der Bereich der untersuchten Prozesszeiten entspricht den Endpunkten der Untersuchungen (vollständiger Nitrat- und Nitritverbrauch) mit  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  beziehungsweise  $23,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitratanfängskonzentration.

Als Startpunkt der Simulationen wurde ein Volumen von  $1,2 \text{ L}$  sowie eine Biotrockenmassekonzentration von  $1 \text{ g L}^{-1}$  vorgegeben. Abbildung 5.36 zeigt die simulierten Raum-Zeit-Ausbeuten in Abhängigkeit der Prozesszeit sowie der Nitratanfängskonzentration.



**Abb. 5.36** Simulierte Raum-Zeit-Ausbeuten der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* in Abhängigkeit der Nitratanfängskonzentration sowie der Prozesszeit.

Mit steigender Prozesszeit nimmt die Raum-Zeit-Ausbeute der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Satzverfahren ab. Auch die Vorlage höherer Nitratanfängskonzentrationen führt nicht zum

Erreichen der maximalen Raum-Zeit-Ausbeuten bei einer Prozesszeit von 14 Stunden. Mit steigender Prozesszeit ist eine Verschiebung der optimalen Nitratanzfangskonzentration in Richtung höherer Konzentrationen zu beobachten.

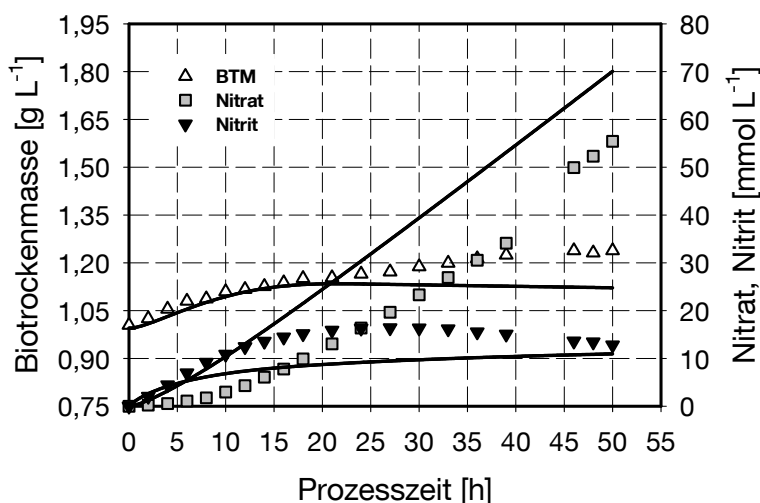
Die im untersuchten Konzentrations- sowie Zeitbereich bestimmte maximale Raum-Zeit-Ausbeute ( $0,21 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) kann bei einer Prozesszeit von 14 Stunden mit einer Nitratanzfangskonzentration von  $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$  erreicht werden. Bei einer Prozesszeit von 26 Stunden beträgt die optimale Nitratanzfangskonzentration zum Erreichen einer maximalen Raum-Zeit-Ausbeute ( $0,147 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )  $22,3 \text{ mmol L}^{-1}$ .

#### 5.4 Kinetik der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Zulaufverfahren

Wie unter Abschnitt 3.3.2 beschrieben, sind einige kinetische Parameter, wie beispielsweise die Sättigungskonzentrationen, durch Untersuchungen im Satzverfahren nur ungenau zu identifizieren. Daher wurden Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Zulaufverfahren durchgeführt. Dem Bioreaktor wurde dabei mit konstanter Flussrate Nitrat zugeführt. Aufgrund der geringen Wachstumsraten bei der chemolithoautotrophen Nitratatmung wurde ein Zufluss von  $0,5 \text{ mL h}^{-1}$  mit variierender Nitratkonzentration gewählt. Die mit Hilfe von Gleichung 3.9 bestimmte Verdünnungsrate  $D$  ist mit  $0,01 \text{ d}^{-1}$  somit deutlich geringer als die unter 5.3 bestimmte maximale Wachstumsrate ( $\mu_{\text{NO}_3, \text{max}}$ ) von  $0,509 \text{ d}^{-1}$ . Eine zu starke Verdünnung der Biomassekonzentration im Bioreaktor kann somit ausgeschlossen werden. Der Untersuchungszeitraum im Zulaufverfahren wurde auf 50 Stunden festgelegt. Die Untersuchungen wurden durch Zuschalten des Zuflusses nach der unter 5.2.4 beschriebenen Adaptations- und Inkubationsphase gestartet. Alle Ansätze wurden mit einem Gesamtvolumenstrom von  $2,22 \text{ L h}^{-1}$  ( $0,031 \text{ vvm}$ ) begast. Die Molenströme der Komponenten Wasserstoff, Kohlendioxid sowie Stickstoff betragen dabei  $0,053 \text{ mol h}^{-1}$  (59,54%)  $\text{H}_2$ ,  $0,0071 \text{ mol h}^{-1}$  (7,98%)  $\text{CO}_2$  sowie  $0,0289 \text{ mol h}^{-1}$  (32,48%)  $\text{N}_2$ . Die Verläufe des Wasserstoff- und Kohlendioxidmolenstromes aller Ansätze sind in Anhang 9.13 dargestellt.

In einer ersten Untersuchung betrug die Nitratkonzentration im Zufluss des Reaktors  $5 \text{ mol L}^{-1}$ . Dies entspricht bei dem oben beschriebenen Zufluss einem Nitratzufluss von  $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Der hohe Zufluss an Nitrat wurde gewählt, um eine möglichst hohe Akkumulation an Nitrat und Nitrit im Medium zu erreichen.

Auf diese Weise sollte das formalkinetische Modell hinsichtlich des Nitritinhibitionsterms validiert werden. Darüber hinaus hat sich bei den Untersuchungen im Satzverfahren mit einer Nitratstartkonzentration von  $32,6 \text{ mmol L}^{-1}$  gezeigt (siehe Kapitel 5.3.4), dass es zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Elektronenakzeptoren Nitrat und Nitrit kommt, sofern beide in gesteigerten Konzentrationen im Medium vorliegen. Bei einer Bestätigung dieses Phänomens muss das formalkinetische Modell gegebenenfalls angepasst werden. In Abbildung 5.37 sind der Wachstumsverlauf, sowie der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration dargestellt. Die Modellvorhersage mit den im Satzverfahren identifizierten Parametern wird durch Linien dargestellt.



**Abb. 5.37** Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Die Linien geben die simulierten Verläufe an. Die Zufussrate des Nitrats beträgt  $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Durch das einfache formalkinetische Modell mit den im Satzverfahren identifizierten Parametern kann wie erwartet keine ausreichende Übereinstimmung der Modellvorhersage mit den experimentellen Verläufen für das Wachstum, sowie für die Nitrat- und Nitritkonzentrationen erreicht werden. Auch durch eine erneute Parameteranpassung basierend auf diesen Messdaten konnte keine Verbesserung der Simulation erreicht werden. Dies deutet darauf hin, dass die im Zulaufverfahren auftretenden Effekte, wie beispielsweise das zeitgleiche Auftreten hoher Konzentrationen von Nitrat und Nitrit im Medium nicht ausreichend durch das einfache formalkinetische Modell aus dem Satzverfahren dargestellt werden können. Ein weiterer Grund für die Abweichung zwischen Modell und Experiment könnte darüber hinaus im Auftreten einer Nitratinhibition (Substratüberschussinhibition) liegen. Ein negativer Einfluss von Nitrat auf die

heterotrophe Nitratatmung wurde bereits unter 5.1.3 bei den Untersuchungen zum Einfluss der Nitratanfangskonzentration beschrieben. Eine mögliche Nitratinhibition wurde im untersuchten Konzentrationsbereich bei der Kultivierung im Satzverfahren bislang nicht berücksichtigt. Das formalkinetische Modell wird daher anhand der hier beschriebenen Beobachtungen modifiziert, um im Anschluss eine erneute Parameteridentifikation sowie Parametervalidierung durchzuführen.

#### 5.4.1 Beschreibungen des formalkinetischen Modells sowie der zugrunde liegenden Annahmen

Zur Entwicklung des formalkinetischen Modells zur Beschreibung des Wachstums, sowie des Nitrat- und Nitritverbrauchs der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Zulaufverfahren wurden bezüglich Bioreaktorsystem, Limitierungen, Erhaltungsstoffwechsel, usw. die selben Annahmen getroffen wie bei der unter 5.3.1 beschriebenen Entwicklung des formalkinetischen Modells im Satzverfahren.

Die Massenbilanzen für die Biotrockenmasse sowie Nitrat und Nitrit im Zulaufverfahren sind in den Gleichungen 5.9 bis 5.11 dargestellt.

Massenbilanz für die Biotrockenmasse:

$$\frac{dc_X}{dt} = c_X \cdot \mu - c_X \cdot \frac{F}{V_R} \quad \text{Gl. 5.10}$$

Dabei bedeuten:

$c_X$  = Biotrockenmassekonzentration [g L<sup>-1</sup>]

$\mu$  = spezifische Wachstumsrate [d<sup>-1</sup>]

$F$  = Volumenstrom des Zufluss [L h<sup>-1</sup>]

$V_R$  = Reaktionsvolumen [L]

Nitratbilanz:

$$\frac{dc_{\text{NO}_3^-}}{dt} = -c_X \cdot q_{\text{NO}_3^-} + (c_{\text{NO}_3^-, \text{zu}} - c_{\text{NO}_3^-}) \cdot \frac{F}{V_R} \quad \text{Gl. 5.11}$$

mit:

$$\begin{aligned}
 c_{\text{NO}_3^-} &= \text{Nitratkonzentration [mol L}^{-1}\text{]} \\
 q_{\text{NO}_3^-} &= \text{spezifische Nitrataufnahmerate [mol g}^{-1} \text{d}^{-1}\text{]} \\
 c_{\text{NO}_3^-, \text{zu}} &= \text{Nitratkonzentration im Zufluss [mol L}^{-1}\text{]}
 \end{aligned}$$

Nitritbilanz:

$$\frac{dc_{\text{NO}_2^-}}{dt} = c_x \cdot (q_{\text{NO}_3^-} - q_{\text{NO}_2^-}) - c_{\text{NO}_2^-} \cdot \frac{F}{V_R} \quad \text{Gl. 5.12}$$

mit:

$$\begin{aligned}
 c_{\text{NO}_2^-} &= \text{Nitritkonzentration [mol L}^{-1}\text{]} \\
 q_{\text{NO}_2^-} &= \text{spezifische Nitritaufnahmerate [mol g}^{-1} \text{d}^{-1}\text{]}
 \end{aligned}$$

Die spezifische Wachstumsrate wird (analog zu dem unter 5.3.1 beschriebenen Modell für die chemolithoautotrophe Nitrataufnahme im Satzverfahren) als Summe der spezifischen Wachstumsraten der Nitrat- und Nitritreduktion mit einer Inhibition durch Nitrit formuliert. Für die spezifische Wachstumsrate ergibt sich somit:

$$\mu = (\mu_{\text{NO}_3^-} + \mu_{\text{NO}_2^-}) \cdot \left(1 - \frac{c_{\text{NO}_2^-}}{c_{\text{NO}_2^-, \text{max}}}\right)^n \quad \text{Gl. 5.13}$$

Hierbei sind:

$$\begin{aligned}
 \mu_{\text{NO}_3^-} &= \text{spezifische Wachstumsrate der Nitratreduktion [d}^{-1}\text{]} \\
 \mu_{\text{NO}_2^-} &= \text{spezifische Wachstumsrate der Nitritreduktion [d}^{-1}\text{]} \\
 c_{\text{NO}_2^-} &= \text{Nitritkonzentration [mol L}^{-1}\text{]} \\
 c_{\text{NO}_2^-, \text{max}} &= \text{Maximale Nitritkonzentration, bei welcher kein Wachstum mehr eintritt [mol L}^{-1}\text{]} \\
 n &= \text{Exponent [-]}
 \end{aligned}$$

Die Untersuchungen im Satzverfahren mit einer Nitratanzfangskonzentration von  $32,6 \text{ mmol L}^{-1}$  sowie die Untersuchung im Zulaufverfahren mit einer Nitratzuflussrate von  $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  haben gezeigt, dass die simultane Anwesenheit hoher Nitrat- und Nitritkonzentrationen zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Reduktion der beiden Elektronenakzeptoren führt.

Formalkinetische Modelle welche die Interaktion von Nitrat und Nitrit sowie eine Nitratinhibition berücksichtigen wurden bereits erfolgreich zur Charakterisierung anderer denitrifizierender Mikroorganismen wie beispielsweise *Pseudomonas denitrificans* oder *Paracoccus sp.* herangezogen [Almeida et al. 1995; Wang et al. 1995; Vasiliadou et al. 2006]. Da die gegenseitige Beeinflussung von Nitrat und Nitrit nach Almeida et al. auf eine Konkurrenz der beiden Elektronenakzeptoren um Elektronendonatoren zurückzuführen ist, wurde ein kompetitiver Ansatz gewählt, um die Wachstumsraten von Nitrat und Nitrit zu formulieren (vergleiche Abschnitt 3.3.2). Die Nitratinhibition des Wachstums mit Nitrat als Elektronenakzeptor wurde in Form einer Substratüberschussinhibition formuliert. Die spezifische Wachstumsrate kann somit durch folgende Gleichung dargestellt werden:

$$\mu_{\text{NO}_3^-} = \mu_{\text{NO}_3^-, \text{max}} \cdot \frac{c_{\text{NO}_3^-}}{c_{\text{NO}_3^-} + K_{\text{S}, \text{NO}_3^-} + \frac{c_{\text{NO}_3^-}^2}{K_{\text{I}, \text{NO}_3^-}} + \frac{K_{\text{S}, \text{NO}_3^-}}{K_{\text{S}, \text{NO}_2^-}} \cdot c_{\text{NO}_2^-}} \quad \text{Gl. 5.14}$$

mit:

- $\mu_{\text{NO}_3^-, \text{max}}$  = maximale spezifische Wachstumsrate bei der Nitratreduktion [ $\text{d}^{-1}$ ]
- $c_{\text{NO}_3^-}$  = Nitratkonzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
- $c_{\text{NO}_2^-}$  = Nitritkonzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
- $K_{\text{S}, \text{NO}_3^-}$  = Sättigungskonzentration für Nitrat [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
- $K_{\text{S}, \text{NO}_2^-}$  = Sättigungskonzentration für Nitrit [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
- $K_{\text{I}, \text{NO}_3^-}$  = Nitratinhibitionskonstante [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

Da zu Beginn der Kultivierung im Zulaufverfahren keine hohen Nitratkonzentrationen im Bioreaktor vorliegen, wird die Schaltfunktion welche die

Bevorzugung von Nitrat als Elektronenakzeptor beschreibt, bei der Formulierung der Nitritwachstumsrate nicht mehr berücksichtigt. Aufgrund der Nitratadaptationsphase sowie der anschließenden Inkubationsphase ohne Elektronenakzeptor sind die Enzymsysteme der Nitritreduktion bereits vollständig ausgebildet, so dass eine Nitritreduktion unmittelbar nach Beginn der Untersuchung einsetzen kann. Darüber hinaus wird die Beeinflussung des Wachstums mit Nitrit als Elektronenakzeptor durch den kompetitiven Ansatz beschrieben. Analog zur Nitratreduktion wird die Wachstumsrate für Nitritreduktion beschrieben durch:

$$\mu_{\text{NO}_2^-} = \mu_{\text{NO}_2^-, \text{max}} \cdot \frac{c_{\text{NO}_2^-}}{c_{\text{NO}_2^-} + K_{\text{S}, \text{NO}_2^-} + \frac{K_{\text{S}, \text{NO}_2^-}}{K_{\text{S}, \text{NO}_3^-}} \cdot c_{\text{NO}_3^-}} \quad \text{Gl. 5.15}$$

Hierbei sind:

$\mu_{\text{NO}_2^-, \text{max}}$  = maximale spezifische Wachstumsrate bei der Nitritreduktion [ $\text{d}^{-1}$ ]

$c_{\text{NO}_2^-}$  = Nitritkonzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

$c_{\text{NO}_3^-}$  = Nitratkonzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

$K_{\text{S}, \text{NO}_2^-}$  = Sättigungskonzentration für Nitrit [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

$K_{\text{S}, \text{NO}_3^-}$  = Sättigungskonzentration für Nitrat [ $\text{mol L}^{-1}$ ]

Die spezifischen Substrataufnahmeraten sind in Gleichung 5.15 und 5.16 dargestellt.

Nitrataufnahmerate:

$$q_{\text{NO}_3^-} = \frac{\mu_{\text{NO}_3^-}}{Y_{\text{X}, \text{NO}_3^-}} \quad \text{Gl. 5.16}$$

mit:

$Y_{\text{X}, \text{NO}_3^-}$  = Zellertragskoeffizient für Nitrat [ $\text{g mol}^{-1}$ ]



Nitritaufnahmerate:

$$q_{\text{NO}_2} = \frac{\mu_{\text{NO}_2^-}}{Y_{\text{X,NO}_2^-}} \quad \text{Gl. 5.17}$$

mit:

$$Y_{\text{X,NO}_2^-} = \text{Zellertragskoeffizient für Nitrit [g mol}^{-1}\text{]}$$

Zur Beschreibung der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* durch das angepasste formalkinetische Modell müssen somit ebenfalls nur neun Parameter identifiziert werden. Die Parameterzahl konnte damit im Vergleich zu dem Modell zur Beschreibung des Wachstums im Satzverfahren konstant gehalten werden.

#### 5.4.2 Untersuchungen zur Parameteridentifikation

Die Parameteridentifikation für das formalkinetische Modell zur Beschreibung des Wachstums, sowie des Nitrat- und Nitritverbrauchs wurde mit der unter 4.5 beschriebenen Methodik anhand von zwei Untersuchungen im Zulaufverfahren durchgeführt. Dabei wurde zusätzlich zu dem Ansatz mit einer Nitratzuflussrate von 50 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> ein weiterer Ansatz mit einer Nitratzuflussrate 20 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> durchgeführt. In Abbildung 5.38 sind der Wachstumsverlauf sowie der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentrationen der experimentellen Daten im Vergleich zu den mit den identifizierten Daten simulierten Verläufen der beiden Ansätze dargestellt.

Wie zu sehen, kann durch das identifizierte kinetische Modell das chemolithoautotrophe Wachstum mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor gut dargestellt werden. Bei dem Ansatz mit einer Nitratzuflussrate von 20 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> kann zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung Nitrat oder Nitrit im Medium nachgewiesen werden. Dieses Verhalten wird durch das formalkinetische Modell gut wiedergegeben. Das Ausbleiben der Nitrat und Nitritakkumulation deutet auf eine Limitation von Nitrat und Nitrit während des gesamten Untersuchungszeitraumes hin, wodurch eine bessere Identifizierbarkeit der Sättigungskonzentration für die beiden Elektronenakzeptoren gewährleistet wird.

Eine Abweichung zwischen Simulation und experimentellen Ergebnissen ist lediglich für den Verlauf der Nitritkonzentration bei dem Ansatz mit einem Zufluss von 50 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> Nitrat zu beobachten. Der Wachstumsverlauf sowie der

Verlauf der Nitratkonzentration dagegen kann auch bei diesem Ansatz durch das formalkinetische Modell mit den identifizierten Parametern gut wiedergegeben werden.

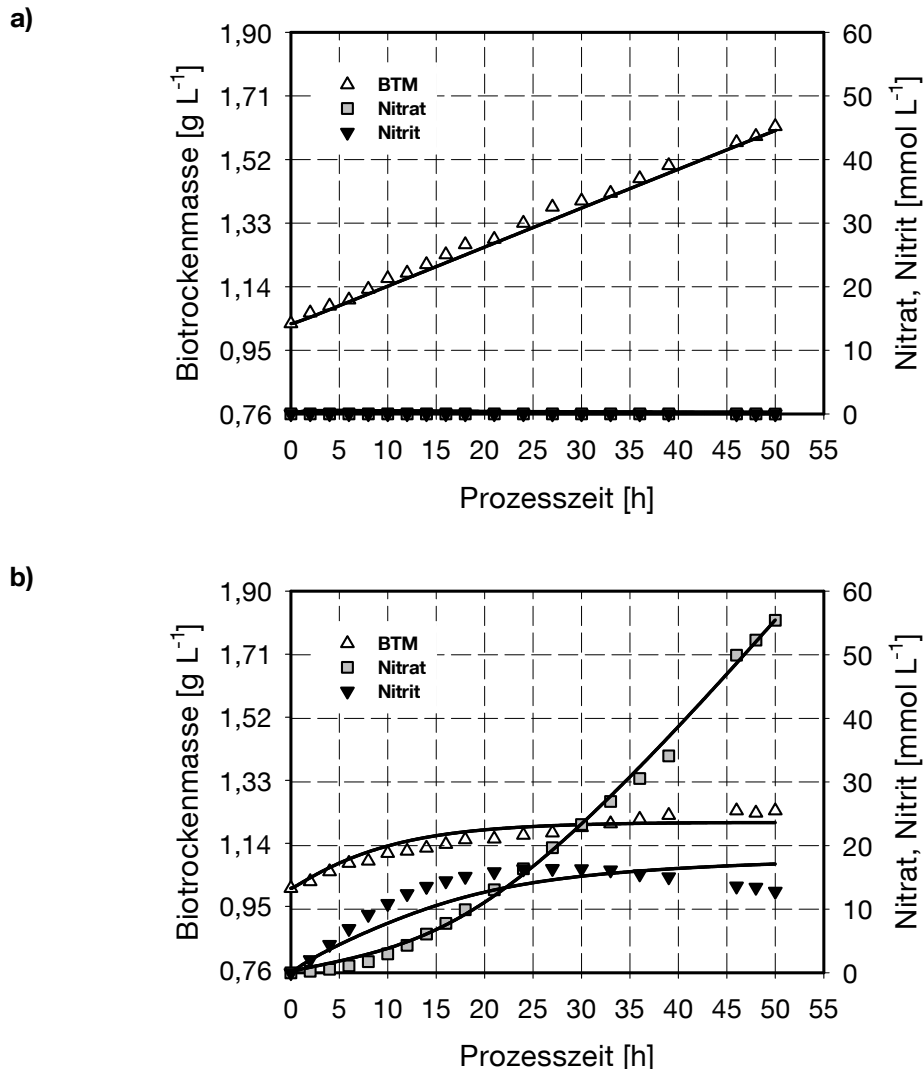


Abb. 5.38 Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Die Linien geben die simulierten Verläufe an: a) Zuflussrate 20 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; b) Zuflussrate 50 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

Eine mögliche Ursache für die Abweichung zwischen Modell und Experiment für den Nitritverlauf könnte in der dem Modell zugrunde liegenden Annahme liegen, dass das durch Nitratreduktion gebildete Nitrit vollständig aus der Zelle ausgeschleust wird. Die stärkere Abnahme des Nitrits im experimentellen Verlauf im Vergleich zu der Simulation deutet darauf hin, dass ein Teil des Nitrits, ohne zwischenzeitliche Sekretion, in der Zelle direkt weiter reduziert wird. Darüber hinaus ist es möglich, dass sich, wie bereits unter 5.2.4 beschrieben, während der

langen Kultivierungszeit die Elektronentransportwege ändern. Eine solche Änderung könnte zu der gesteigerten Nitratreduktion führen. Diese Phänomene können durch das einfache formalkinetische Modell nicht dargestellt werden.

Grundlage für eine detailliertere Beschreibung wäre die genaue Kenntnis der metabolischen Stoffflüsse sowie deren Änderung während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Da genaue Kenntnisse über die Stoff- und Elektronenflüsse bislang nicht bekannt sind, kann eine weitere Strukturierung des formalkinetischen Modells nicht vorgenommen werden. Die Strukturierung des hier beschriebenen formalkinetischen Modells reicht jedoch aus, um die chemolithoautotrophe Nitratatmung im Zulaufverfahren gut wiederzugeben.

### 5.4.3 Untersuchungen zur Parametervalidierung

Zur Validierung der unter 5.4.2 identifizierten Parameter für das Zulaufverfahren wurden drei weitere, unabhängige Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Zulaufverfahren durchgeführt. Die Nitratzuflussraten betragen dabei  $12 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ,  $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  sowie  $40 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Abbildung 5.39 zeigt den experimentell ermittelten Wachstumsverlauf, sowie die Verläufe der Nitrat- und Nitritkonzentrationen im Vergleich zu den simulierten Verläufen. Der Verlauf der Molenströme von Wasserstoff und Kohlendioxid im Abgas ist in Anhang 9.14 dargestellt.

Die Verläufe der beiden Ansätze mit einer Zuflussrate von  $12 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und  $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  können durch das unter 5.4.2 beschriebene Modell mit den identifizierten Parametern gut dargestellt werden. Sowohl die Wachstumsverläufe, als auch die Verläufe der Nitrat- und Nitritkonzentration, weisen eine hohe Übereinstimmung mit den vom Modell vorhergesagten Verläufen auf. Wie zu sehen, konnte bei beiden Ansätzen keine Nitrat- oder Nitritakkumulation während des Untersuchungszeitraumes beobachtet werden. Die gute Vorhersage dieser Verläufe durch die Simulation deutet auf eine gute Bestimmung der Sättigungskonzentration für die beiden Elektronenakzeptoren hin. Eine detaillierte Diskussion der identifizierten formalkinetischen Parameter erfolgt unter Abschnitt 5.5.4.

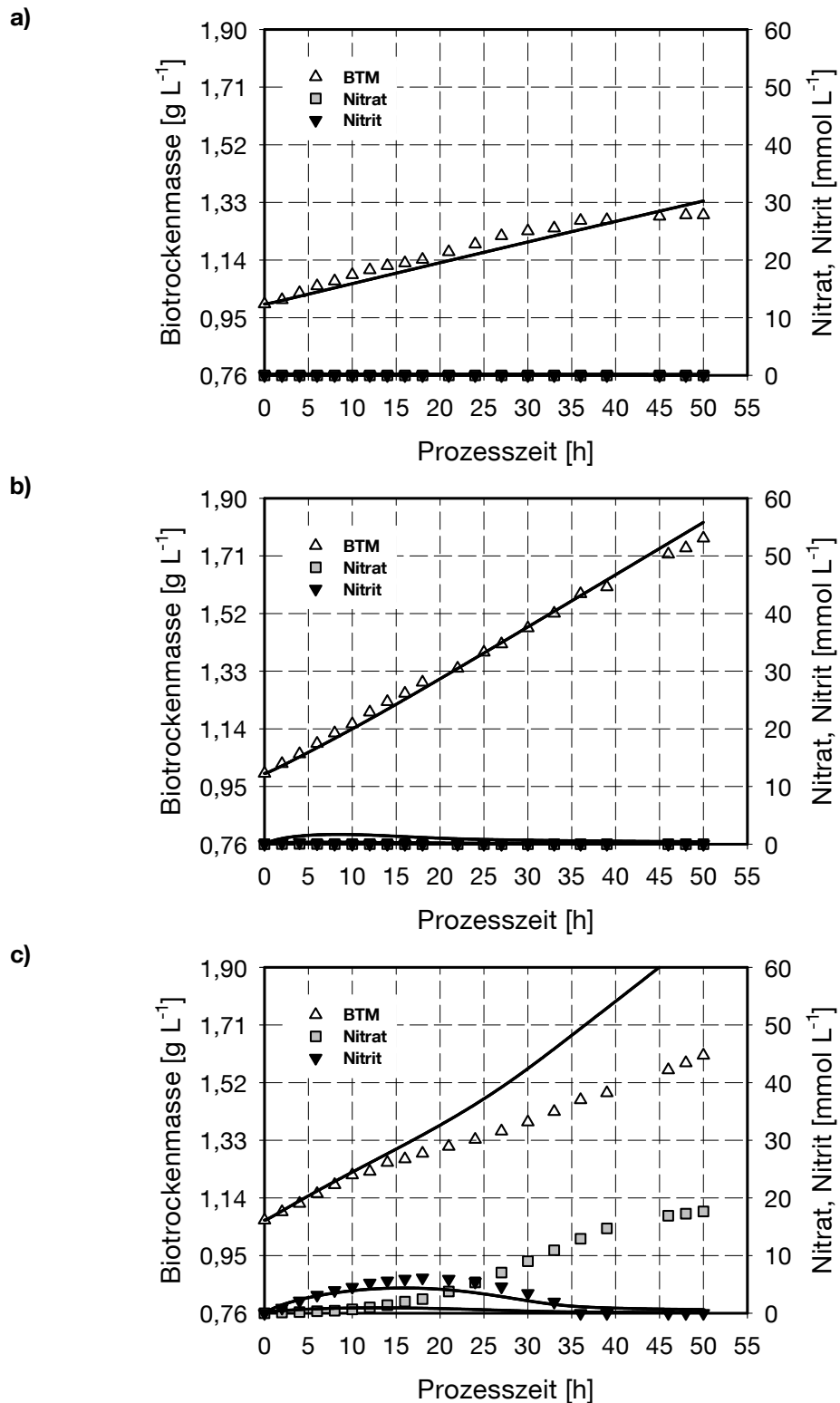


Abb. 5.39 Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*. Die Linien geben die simulierten Verläufe an. a) Zuflussrate 12 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; b) Zuflussrate 30 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. c) Zuflussrate 40 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>

Bei dem Ansatz mit einer Nitratzuflussrate von  $40 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  kann keine ausreichende Übereinstimmung zwischen den simulierten Verläufen und den experimentell ermittelten Daten beobachtet werden. Ab einer Prozesszeit von 10 Stunden weichen die gezeigten Verläufe der Biotrockenmassekonzentration sowie der Nitratkonzentration stark voneinander ab. Lediglich der Verlauf der Nitritkonzentration wird vergleichsweise gut durch die Simulation wiedergegeben. Die schlechte Modellvorlage bei diesem Ansatz steht im Widerspruch zu den anderen Validierungsuntersuchungen.

Bei dem Ansatz mit der höchsten Nitratzuflussrate von  $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  konnte eine gute Anpassung des Biotrockenmasse- sowie des Nitratverlaufs bei der Parameteridentifikation erreicht werden. Abweichungen zwischen Modell und Messung mussten lediglich für den Verlauf der Nitritkonzentration hingenommen werden. Die gesteigerte Nitratakkumulation nach 15 Stunden Kultivierungszeit könnte auf Unregelmäßigkeiten der Zuflussrate zurückzuführen sein. Eine solche Unregelmäßigkeit wurde nicht beobachtet, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Ursache für die Abweichung zwischen Simulation und Messdaten ist unbekannt.

Die gute Übereinstimmung von Simulation und Experiment der Ansätze mit einer Nitratzuflussrate von  $12 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und  $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  zeigen jedoch, dass das einfache formalkinetische Modell mit den identifizierten Parametern gut geeignet ist, um die chemolithoautotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Zulaufverfahren darzustellen.

#### 5.4.4 Diskussion der identifizierten formalkinetischen Parameter

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Identifikation der 9 formalkinetischen Parameter, die chemolithoautotrophe Nitratatmung im Zulaufverfahren von *Cupriavidus necator* gut beschrieben werden kann. In Tabelle 5.5 sind die identifizierten formalkinetischen Parameter im Vergleich zu den Parametern aus den Untersuchungen im Satzverfahren dargestellt.

Wie erwartet liegen die im Zulaufverfahren identifizierten Sättigungskonzentrationen für Nitrat und Nitrit deutlich unterhalb der im Satzverfahren bestimmten Konstanten. Die Sättigungskonzentration für Nitrat ( $K_{S,NO_3^-}$ ) ist mit  $0,232 \text{ mmol L}^{-1}$  um mehr als Faktor 10 geringer als die im Satzverfahren identifizierte Konstante von  $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ . Die Sättigungs-

konzentration für Nitrit als Elektronenakzeptor ( $K_{S,NO_2^-}$ ) ist mit  $0,792 \text{ mmol L}^{-1}$  um 74 % geringer als der im Satzverfahren bestimmte Wert.

**Tab. 5.5 Vergleich der identifizierten formalkinetischen Parameter der Untersuchungen im Satz- sowie Zulaufverfahren**

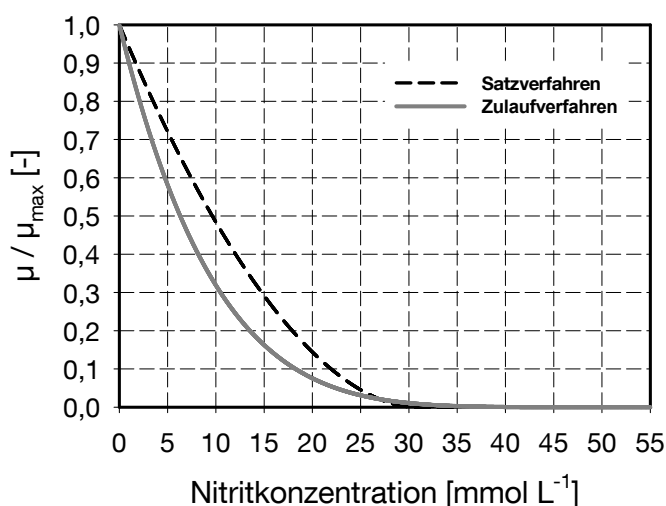
Parameter	Satz	Zulauf	Einheit
$\mu_{NO_3^-,max}$	0,509	0,749	$d^{-1}$
$Y_{X,NO_3^-}$	9,1	8,5	$g \text{ mol}^{-1}$
$K_{S,NO_3^-}$	2,7	0,232	$mmol \text{ L}^{-1}$
$F_{NO_3^-}$	3,27	-	$mmol \text{ L}^{-1}$
$\mu_{NO_2^-,max}$	0,195	0,391	$d^{-1}$
$Y_{X,NO_2^-}$	4,86	6,78	$g \text{ mol}^{-1}$
$K_{S,NO_2^-}$	3,07	0,792	$mmol \text{ L}^{-1}$
$c_{NO_2^-,max}$	30,73	53,92	$mmol \text{ L}^{-1}$
n	1,84	5,57	-
$K_{I,NO_3^-}$	-	4,06	$mmol \text{ L}^{-1}$

Diese hohe Abweichung ist auf die schlechte Identifizierbarkeit dieser Parameter im Satzverfahren zurückzuführen (siehe auch Abschnitt 3.3.2). Die geringere Nitrat-Sättigungskonzentration im Vergleich zu der Sättigungskonzentration für Nitrit bestätigt die beobachtete bevorzugte Verwertung von Nitrat als Elektronenakzeptor.

Die identifizierten Wachstumsraten sind mit  $0,749 \text{ d}^{-1}$  ( $\mu_{NO_3^-,max}$ ) sowie  $0,391 \text{ d}^{-1}$  ( $\mu_{NO_2^-,max}$ ) höher im Vergleich zu den Parametern der Satzkultivierung. Die Unterschiede zwischen den im Zulauf- und im Satzverfahren bestimmten Wachstumsraten sind mit 32% für Nitrat, sowie 50 % für Nitrit geringer als die bei den Sättigungskonzentration beobachteten Unterschiede.

Die im Zulaufverfahren identifizierten Zellertragskoeffizienten sind mit  $8,5 \text{ g mol}^{-1}$  ( $Y_{X,NO_3^-}$ ) sowie  $6,78 \text{ g mol}^{-1}$  mit den Ertragskoeffizienten der Satzuntersuchungen vergleichbar.

Eine Nitritkonzentration von  $53,92 \text{ mmol L}^{-1}$  im Medium führt zu einer vollständigen Inhibition des Wachstums. Diese Konzentration liegt deutlich höher als die im Satzverfahren bestimmte maximale Nitritkonzentration von  $30,73 \text{ mmol L}^{-1}$ . Aufgrund des höheren Exponenten  $n$  von  $5,57$  im Vergleich zu dem Exponent des Satzverfahrens ( $n = 1,84$ ) ist die Inhibition durch Nitrit bei beiden Modellen vergleichbar. Mit den Parametern des Zulaufverfahrens führt eine Nitritkonzentration von  $6,4 \text{ mmol L}^{-1}$  zu einer Halbierung der Wachstumsrate. Mit den Parametern der Satzuntersuchungen war diese Konzentration mit  $9,4 \text{ mmol L}^{-1}$  etwas höher. Abbildung 5.40 zeigt vergleichend den identifizierten Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und Nitritkonzentration der formalkinetischen Modelle des Satz- sowie des Zulaufverfahrens.



**Abb. 5.40 Vergleich des Zusammenhangs zwischen Wachstumsrate und Nitritkonzentration der im Satzverfahren sowie im Zulaufverfahren identifizierten formalkinetischen Modelle**

Im Gegensatz zu den Untersuchungen im Satzverfahren konnte durch die im Zulaufverfahren identifizierten Parameter eine starke Substratüberschussinhibition durch Nitrat nachgewiesen werden. Dies zeigt sich durch den geringen Wert der Nitratinhibierungskonstante ( $K_{i,\text{NO}_3^-}$ ) von  $4,06 \text{ mmol L}^{-1}$ .

#### **5.4.5 Modellbasierte Bestimmung des optimalen Volumenstromes sowie der Nitratkonzentration des Zuflusses im Satzverfahren**

Mit Hilfe des identifizierten formalkinetischen Modells der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Zulaufverfahren wurde ein optimales Nitratzuflussprofil sowie die optimale Nitratkonzentration im Zufluss bestimmt. Die

Identifikation des Zuflussprofils sowie der Nitratkonzentration erfolgte dabei nach der von Franco-Lara und Weuster-Botz 2005 beschriebenen Methode. Die generische Methode basiert auf einem Artifizialen Neuronalen Netzwerk (ANN) und erlaubt die Identifikation kontinuierlicher, nicht-linearer Zuflussprofile [Franco-Lara und Weuster-Botz 2005].

Die Bestimmung des optimalen Zuflussprofils erfolgt mit Hilfe eines genetischen Algorithmus (GA) mit 70 Individuen, Zweipunkt-Crossover, sowie einer Mutationswahrscheinlichkeit von 1%. Die Generationszahl des GA beträgt 70.

Als Zielwert der Optimierung wurde die maximale Biotrockenmassekonzentration nach einer Prozesszeit von 100 Stunden vorgegeben. Die Variablen der Bestimmung waren das Zuflussprofil sowie die Nitratkonzentration im Zufluss. Der Variationsbereich der Zuflussrate sowie der Nitratkonzentration lag zwischen  $0 \text{ mL h}^{-1}$  und  $2 \text{ mL h}^{-1}$ , beziehungsweise zwischen  $1 \text{ mol L}^{-1}$  und  $5 \text{ mol L}^{-1}$ . Die Biotrockenmassekonzentration sowie das Volumen zu Beginn der Untersuchung wurden zu  $1 \text{ g L}^{-1}$  sowie  $1,2 \text{ L}$  festgelegt.

In Abbildung 5.41 sind das identifizierte Nitratzuflussprofil sowie die Ergebnisse der daraus resultierenden Verläufe der simulierten Biotrockenmassekonzentration sowie der Konzentrationen von Nitrat und Nitrit dargestellt.

Wie zu sehen ist, steigt die Nitratzuflussrate während der gesamten Kultivierungszeit kontinuierlich an. Der Anstieg verlangsamt sich dabei zwischen einer Prozesszeit von 56 Stunden und 70 Stunden. Durch dieses Nitratzuflussprofil wird gewährleistet, dass keine hohen Nitrat- sowie Nitritkonzentrationen im Medium auftreten. Die durch die Simulation bestimmten maximal im Medium akkumulierten Mengen an Nitrat und Nitrit betragen  $0,496 \text{ mmol L}^{-1}$  sowie  $2,45 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Durch das optimale Zuflussprofil kann in einer Prozesszeit von 100 Stunden eine Biotrockenmassekonzentration von  $3,95 \text{ g L}^{-1}$  erreicht werden. Die Zunahme der Biotrockenmassekonzentration bis zu einer Prozesszeit von 50 Stunden beträgt  $1,01 \text{ g L}^{-1}$  bei einer Volumenzunahme von  $24 \text{ mL}$ . Bei der unter 5.4.3 beschriebenen Untersuchung zur Parametervalidierung mit einer konstanten Nitratzuflussrate von  $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  betrug die Zunahme der Biotrockenmassekonzentration im gleichen Untersuchungszeitraum lediglich  $0,775 \text{ g L}^{-1}$  bei einer Volumenzunahme von  $25 \text{ mL}$ . Das Gesamtvolumen nach der 100-stündigen Kultivierung beträgt  $1,272 \text{ L}$ .

Die bestimmte, optimale Nitratkonzentration im Zufluss beträgt  $4,15 \text{ mol L}^{-1}$ .



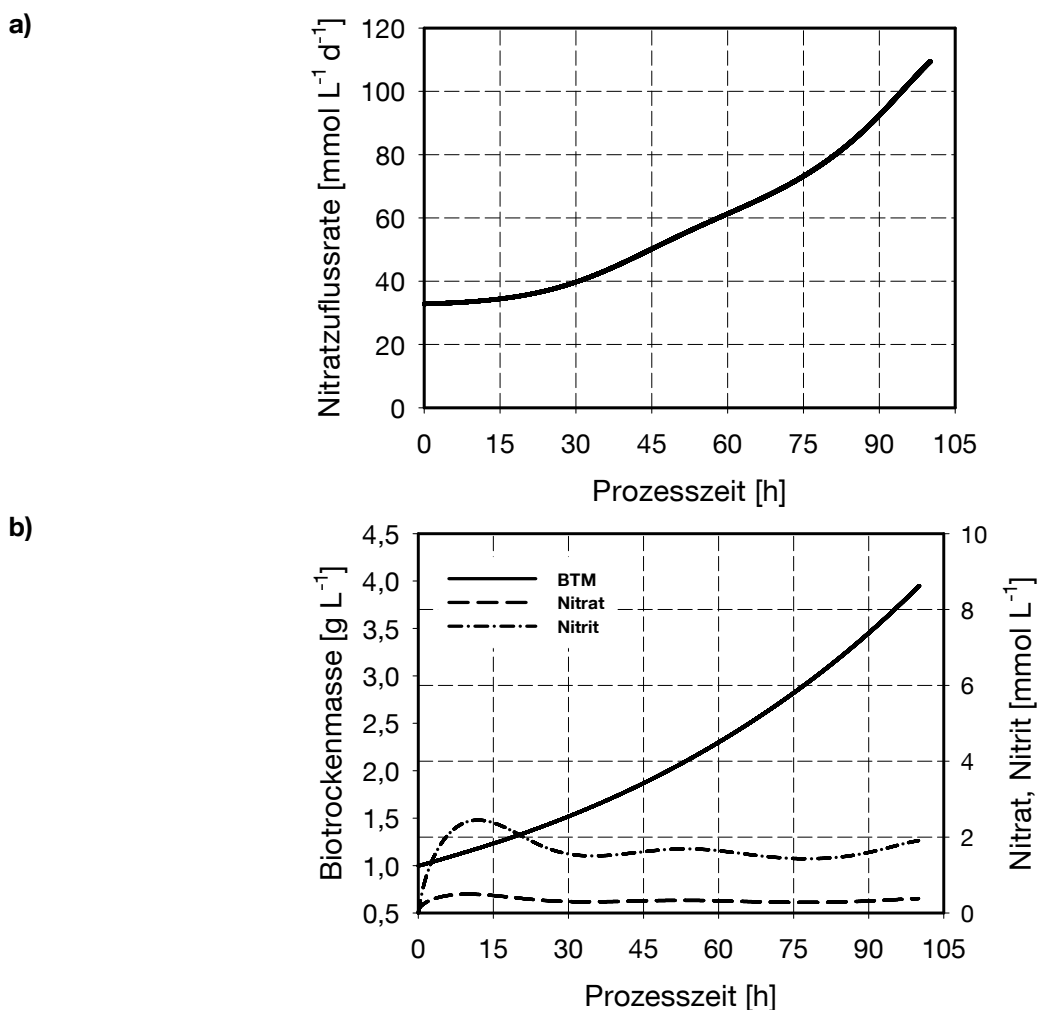
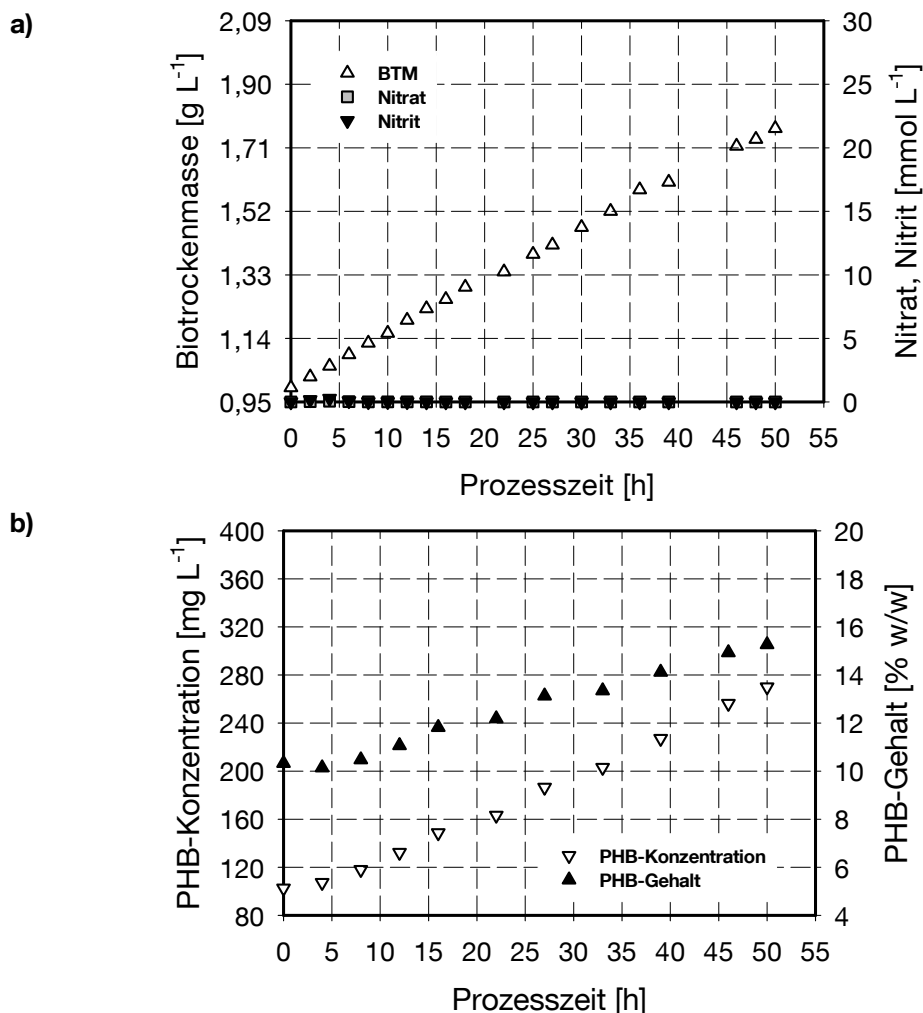


Abb. 5.41 a) Identifiziertes, optimales Nitratzuflussprofil für die chemolithoautotrophe Kultivierung von *Cupriavidus necator* im Zulaufverfahren mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor. b) Simulierter Verlauf der Biotrockenmassekonzentration sowie Verläufe der Nitrat- und Nitritkonzentration während der Kultivierung im Zulaufverfahren mit dem optimalen Nitratzuflussprofil.

## 5.5 Untersuchungen zur PHB-Akkumulation von *Cupriavidus necator* unter chemolithoautotrophen Bedingungen bei simultaner Nitratatmung

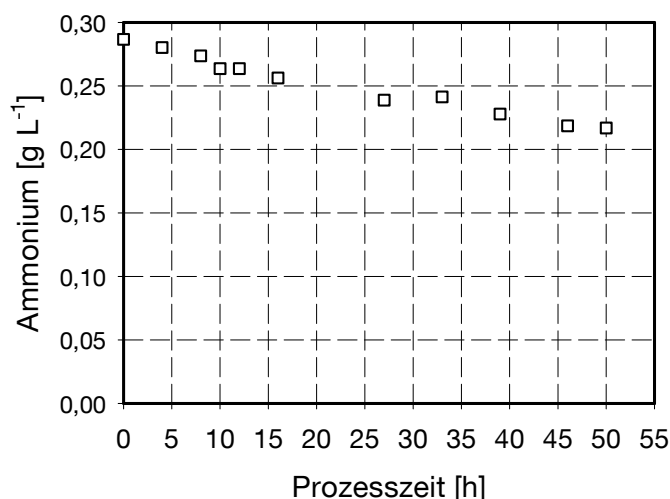
Untersuchungen zur PHB-Produktion mit *Cupriavidus necator* waren bereits Gegenstand vielfältiger Studien. Dabei wurden vor allem der Einfluss der Kohlenstoffquelle, sowie der Einfluss des limitierenden Substrates auf die PHB-Akkumulation untersucht. Alle bislang bekannten Ansätze wurden unter aeroben Bedingungen durchgeführt (vergleiche Abschnitt 3.2.5). Untersuchungen zur chemolithoautotrophen PHB-Produktion von *Cupriavidus necator* bei simultaner Nitratatmung sind bislang nicht bekannt.

Es ist bekannt, dass *Cupriavidus necator* auch unter nicht limitierenden Wachstumsbedingungen einen Teil des aufgenommenen Kohlenstoffs in Form von PHB fixiert [Du et al. 2001]. Zur Charakterisierung der wachstumsassoziierten PHB-Akkumulation von *Cupriavidus necator* wurde bei dem unter 5.3.3 beschriebenen Ansatz im Zulaufverfahren mit einer Nitratzuflussrate von  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  der PHB-Gehalt der Zellen bestimmt. Der PHB-Gehalt wurde dabei durch Detektion von Crotonsäure nach saurer Hydrolyse des zellinternen PHB bestimmt (Vergleiche Abschnitt 4.4.4). In Abbildung 5.42 sind der Wachstumsverlauf, der Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration, sowie der PHB-Gehalt der Zellen während der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Zulaufverfahren dargestellt.



**Abb. 5.42** Wachstumsassoziierte PHB-Produktion von *Cupriavidus necator* bei der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Zulaufverfahren ( $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Nitrat): a) Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration. b) Verlauf der PHB-Konzentration sowie des PHB-Gehaltes.

Der PHB-Gehalt der Zellen zu Beginn der Untersuchung beträgt 10,32 % w/w. Dies stimmt mit den von Du et al. 2001 beschriebenen Untersuchungen überein. Die Nitratadaptationsphase, sowie die Inkubation ohne Elektronenakzeptor vor Beginn der Kultivierung führen daher zu keinem gesteigerten PHB-Gehalt der Zellen. Nach einer Kultivierungszeit von 8 Stunden beginnt der PHB-Gehalt zu steigen. Zu diesem Zeitpunkt liegen im Medium noch  $0,274 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium (Startkonzentration  $0,288 \text{ g L}^{-1}$ ) vor (siehe Abbildung 5.43). Ein Einsetzen der Ammoniumlimitation zu diesem Zeitpunkt kann somit ausgeschlossen werden. Da zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung Nitrat oder Nitrit im Medium nachgewiesen werden kann, deutet das Einsetzen der PHB-Akkumulation auf eine Limitierung durch den Elektronenakzeptor hin.



**Abb. 5.43** Verlauf der Ammoniumkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Zulaufverfahren ( $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Nitrat).

Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums steigt der PHB-Gehalt bis auf 15,2 % w/w an. Zu diesem Zeitpunkt liegen noch  $0,217 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium im Medium vor. Der Nitritverbrauch während der Kultivierung betrug somit  $70 \text{ mg L}^{-1}$  (unter Vernachlässigung der Verdünnung).

Zur Untersuchung des Einflusses einer Ammoniumlimitation auf die PHB-Bildung während der chemolithoautotrophen Nitratatmung wurde erneut ein Ansatz im Satzverfahren mit einer Nitratzuflussrate von  $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte unter identischen Bedingungen. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen unlimitierten Ansatz, wurden diesem Ansatz jedoch zu Beginn der Kultivierung lediglich  $0,09 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium zugegeben. Durch diese Konzentration sollte zu Beginn der Untersuchung ein unlimitiertes Wachstum

gewährleistet werden. Mit einsetzender Ammoniumlimitation wird eine gesteigerte PHB-Akkumulation erwartet. Der Beobachtungszeitraum des Ansatzes wurde auf 80 Stunden verlängert. Abbildung 4.41 a zeigt den Wachstumsverlauf sowie den Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Zulaufverfahren mit verringerter Ammonium-Startkonzentration. Die Verläufe für die PHB-Konzentration, sowie für den PHB-Gehalt sind Abbildung 4.44 b zu entnehmen. Der Verlauf des Wasserstoff- und Kohlendioxidmolenstroms im Abgas des Bioreaktors sind in Anhang 9.15 dargestellt. Der PHB-Gehalt der Zellen zu Beginn der Untersuchung beträgt 11,45 % w/w.

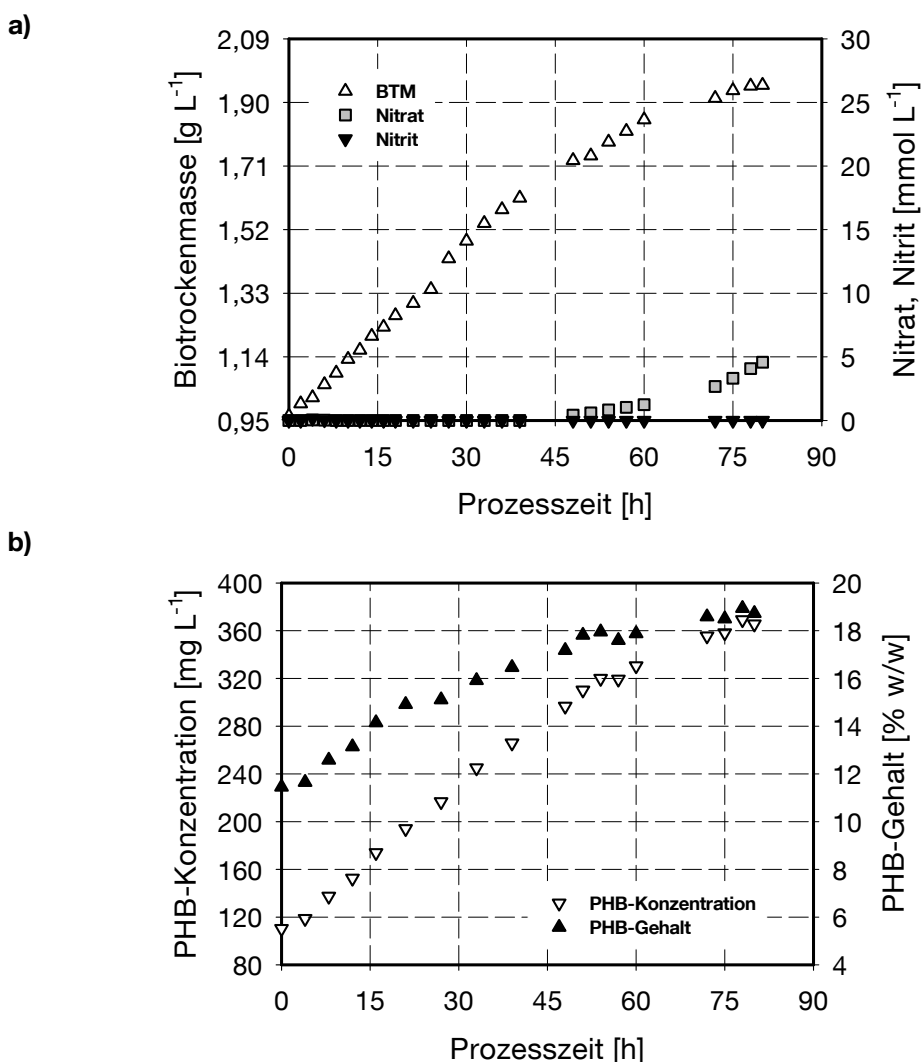
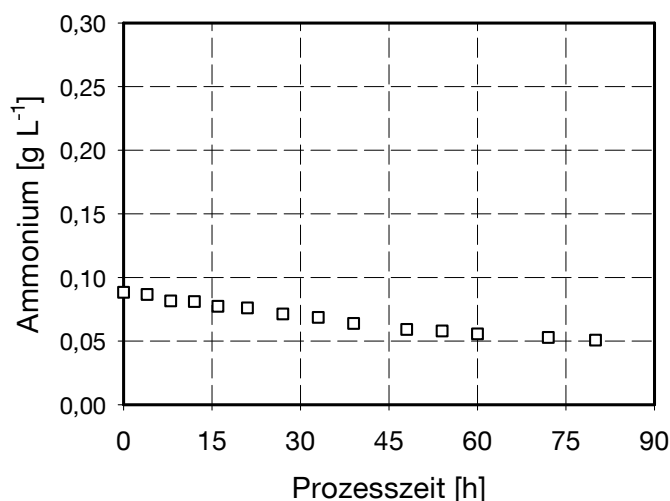


Abb. 5.44 PHB-Produktion von *Cupriavidus necator* bei der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Zulaufverfahren ( $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Nitrat) mit verringerter Ammoniumkonzentration ( $0,09 \text{ g L}^{-1}$ ) im Medium: a) Wachstumsverlauf, sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration. b) Verlauf der PHB-Konzentration sowie des PHB-Gehaltes.

Wie zu sehen ist, setzt nach einer Prozesszeit von 4 Stunden die PHB-Akkumulation ein. Zu diesem Zeitpunkt liegen im Medium  $0,086 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium vor (Abbildung 5.45). Im folgenden Zeitraum ist im Vergleich zu dem Ansatz ohne Ammoniumlimitation keine deutliche Steigerung der PHB-Akkumulation zu beobachten. Nach einer Zeit von 48 Stunden beträgt der PHB-Gehalt des Ansatzes mit Ammoniumlimitation  $17,18 \text{ \% w/w}$ . Der PHB-Gehalt des Ansatzes ohne Ammoniumlimitation war mit  $15,27 \text{ \% w/w}$  nach 50 Stunden nur geringfügig niedriger.

Nach 72 Stunden Kultivierungszeit ist ein deutliches Abflachen der Biotrockenmassekurve zu beobachten. Ab diesem Zeitpunkt kann im Rahmen der Messgenauigkeit keine weitere Zunahme des PHB-Gehaltes beobachtet werden. Nach 80 Stunden beträgt der PHB-Gehalt der Zellen  $18,73 \text{ \% w/w}$ .

Bereits nach 48 Stunden setzt eine Nitratakkumulation im Medium ein. Am Ende des Untersuchungszeitraumes nach 80 Stunden liegen  $4,58 \text{ mmol L}^{-1}$  Nitrat im Medium vor. Bei dem zuvor beschriebenen Ansatz ohne Ammoniumlimitation konnte bis zum Ende der Kultivierung (50 Stunden) kein Nitrat oder Nitrit im Medium nachgewiesen werden. Nach 80 Stunden liegen noch  $0,051 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium im Medium vor. Der Ammoniumverbrauch betrug somit  $37,6 \text{ mg L}^{-1}$  (unter Vernachlässigung der Verdünnung).



**Abb. 5.45** Verlauf der Ammoniumkonzentration bei der PHB-Produktion chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Zulaufverfahren ( $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Nitrat).

Die hier beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass unter chemolithoautotrophen Bedingungen bei simultaner Nitratatmung durch eine

Ammoniumlimitation die Bildung des Speicherstoffes PHB nicht deutlich gesteigert werden konnte. Der PHB-Gehalt nach 80-stündiger Kultivierung im Zulaufverfahren bei einer anfänglichen Ammoniumkonzentration von  $0,09 \text{ g L}^{-1}$  betrug lediglich 18,73 %. Der in der Literatur beschriebene PHB-Gehalt von bis zu 80 % konnte mit diesem Ansatz nicht erreicht werden [Ishizaki et al. 2001].

Eine mögliche Ursache für die verminderte PHB-Akkumulation trotz Ammoniumlimitation könnte in den besonderen Stoffwechseleigenschaften von *Cupriavidus necator* liegen. Wie bereits unter Abschnitt 3.2 dargestellt kann der Organismus Nitrat nicht nur als Elektronenakzeptor für die Energiegewinnung, sondern auch als Stickstoffquelle für die Zellsynthese nutzen. Das für die Nitratassimilation verantwortliche Enzym, die assimilatorische Nitratreduktase wird durch Ammonium reprimiert. Durch die geringe Konzentration an Ammonium zu Beginn der Untersuchung kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Enzym aktiv in der Zelle vorliegt. Der geringere Ammoniumverbrauch des Ansatzes mit Ammoniumlimitation ( $37,6 \text{ mg L}^{-1}$  nach 80 Stunden), im Gegensatz zu dem Ansatz ohne Limitation ( $70 \text{ mg L}^{-1}$  nach 50 Stunden) bestätigt diese Annahme. Da sowohl der Biomassertrag, als auch der PHB-Gehalt der beiden Ansätze nach einer Kultivierungszeit von 50 Stunden vergleichbar ist, ist es möglich, dass ein Teil des Stickstoffbedarfs der Zelle bei dem limitierten Ansatz über Nitratfixierung gedeckt wird. Ein weiteres Indiz für die Änderung des Stoffwechsels bei geringen Ammonium-Konzentrationen ist die einsetzende Nitratakkumulation nach 48 Stunden bei dem Ansatz mit einer geringen Ammonium-Anfangskonzentration.

Es zeigt sich somit, dass *Cupriavidus necator* in der Lage ist, die Ammoniumlimitation zu umgehen. Eine Ammoniumlimitation ist somit nicht geeignet, um unter chemolithoautotrophen Bedingungen bei simultaner Nitratatmung die PHB-Synthese zu induzieren. In zukünftigen Studien sollte daher die Induktion der PHB-Synthese aufgrund anderer Limitationen, wie beispielsweise einer Phosphatlimitation, untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

*Cupriavidus necator* hat durch seine Fähigkeit, unter limitierenden Bedingungen den Speicherstoff Polyhydroxybutyrat zu bilden, das Potential zu einer weiteren Verbreitung biologisch abbaubarer Kunststoffe auf der Basis nachwachsender Rohstoffe beizutragen. Bislang untersuchte Verfahren zur chemolithoautotrophen Kultivierung von *Cupriavidus necator* mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor konnten aufgrund des Explosionsrisikos des benötigten Gasgemisches aus Wasserstoff und Sauerstoff nicht industriell realisiert werden. Eine bislang nicht beachtete Alternative zur Sauerstoffatmung ist die Fähigkeit von *Cupriavidus necator* Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor für die Energiegewinnung zu nutzen und so das Explosionsrisiko auszuschließen.

Grundlage für die Auslegung eines industriellen Prozesses zur chemolithoautotrophen Kultivierung von *Cupriavidus necator* mit Nitrat als Elektronenakzeptor ist die Kenntnis reaktionskinetischer Daten (Wachstumsraten, Substrataffinität, Zellertragskoeffizienten, usw.). Solche reaktionstechnischen Daten sind für die chemolithoautotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bislang nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung der Reaktionskinetik der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator*.

Durch Voruntersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung konnte ein Referenzprozess zur Kultivierung von *Cupriavidus necator* DSM 428 im Satzverfahren etabliert werden, welcher reproduzierbare und verlässliche Daten für die Bestimmung der reaktionskinetischen Parameter liefert. Die wesentlichen Merkmale dieses Referenzprozesses sind eine anfängliche Adaptation der Zellen an chemolithoautotrophe Bedingungen von 12 Stunden, in der eine Nitratanfängskonzentration von  $4,7 \text{ mmol L}^{-1}$  vollständig veratmet wird. Als Inokkulum für die Untersuchungen im Satzverfahren wurden heterotroph, mit Fruktose kultivierte Zellen bei simultaner Nitratatmung eingesetzt. Die Studien zur chemolithoautotrophen Nitratatmung wurden im Anschluss an die Adaptationsphase durch Zugabe von Nitrat gestartet. Die reaktionstechnischen Untersuchungen erfolgten bei einem pH von 7,0 und einer Temperatur von  $30^\circ\text{C}$ . Alle Ansätze mit einem Arbeitsvolumen von 1,2 L wurden mit einem Gesamtvolumenstrom von  $2,22 \text{ L h}^{-1}$  ( $0,031 \text{ vvm}$ ) begast. Die Molenströme der Komponenten des zugeführten Gasgemisches aus Wasserstoff, Kohlendioxid sowie Stickstoff (Trägergas) betragen dabei  $0,053 \text{ mol h}^{-1}$  (59,54%)  $\text{H}_2$ ,  $0,0071 \text{ mol h}^{-1}$  (7,98%)  $\text{CO}_2$  sowie  $0,0289 \text{ mol h}^{-1}$  (32,48%)  $\text{N}_2$ . Durch diese Einstellungen

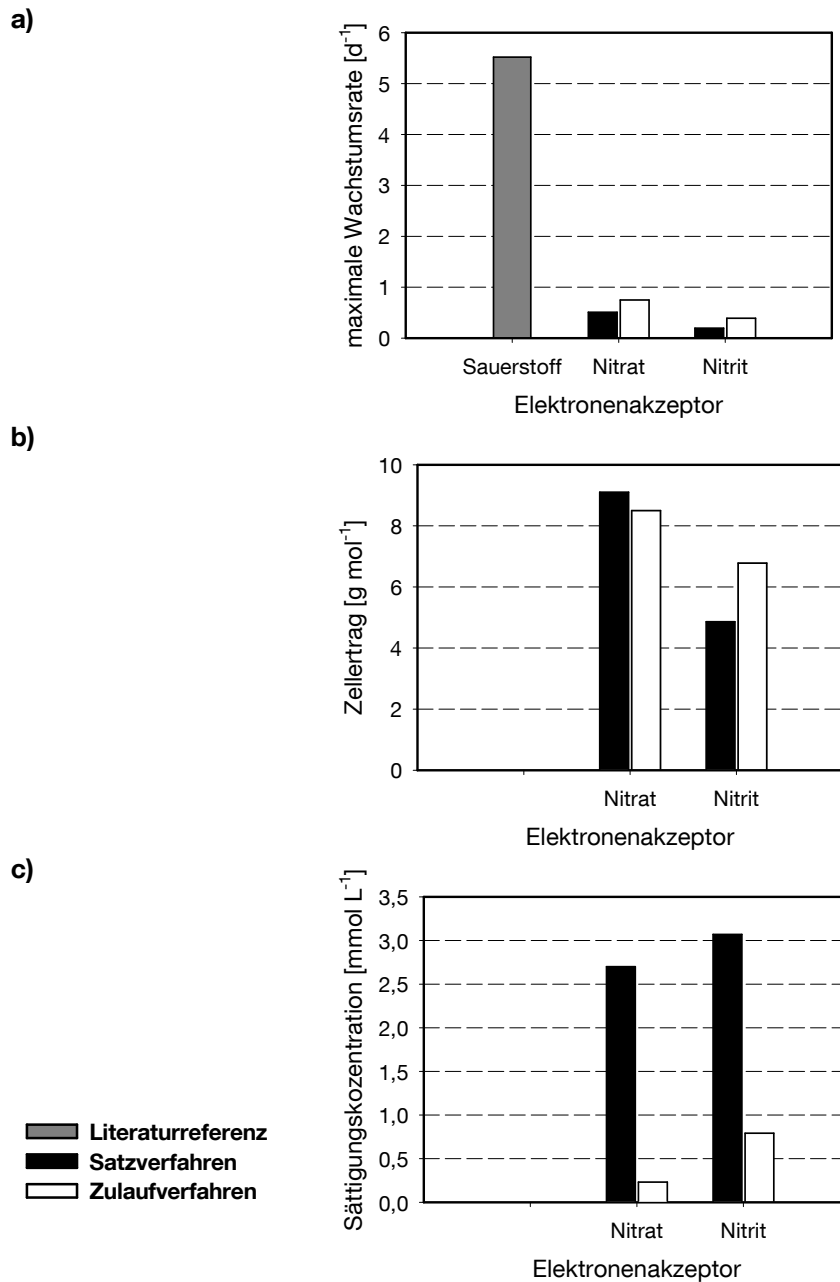
konnte gewährleistet werden, dass die Substratgase Wasserstoff und Kohlendioxid zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung zu einer Limitation des Wachstums führten. Die reaktionskinetischen Untersuchungen erfolgten zunächst im Satz- und später im Zulaufverfahren.

Die chemolithoautotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator* lässt sich bei Überschuss von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> als schrittweise Reduktion von Nitrat zu Nitrit und anschließend zu molekularem Stickstoff, ohne Akkumulation von gasförmigen Zwischenprodukten, beschreiben. Zur formalkinetischen Beschreibung der spezifischen Wachstumsrate wurde ein Ansatz der simultanen Substratverwertung (Nitrat und Nitrit) gewählt ( $\mu = \mu_{\text{NO}_3^-} + \mu_{\text{NO}_2^-}$ ). Darüber hinaus wurde bei der Erstellung des formalkinetischen Modells zur Beschreibung der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Satzverfahren die Inhibition durch einen Überschuss an Nitrit im Medium, sowie eine bevorzugte Verwertung von Nitrat als Elektronenakzeptor aufgrund des Überschusses dieses Elektronenakzeptors zu Beginn der Kultivierung berücksichtigt. Das resultierende formalkinetische Modell enthält 9 Parameter zur Beschreibung des chemolithoautotrophen Wachstums von *Cupriavidus necator*.

Die Parameteridentifikation erfolgte anhand von zwei Satzexperimenten mit einer Nitratanfängskonzentration von 12 mmol L<sup>-1</sup> sowie 23,5 mmol L<sup>-1</sup>. Anschließend wurden die identifizierten Parameter mit Hilfe zweier unabhängiger Experimente mit Nitratanfängskonzentrationen von 14 mmol L<sup>-1</sup> und 19 mmol L<sup>-1</sup> validiert. Mit diesem einfachen formalkinetischen Modell konnte eine gute Übereinstimmung der simulierten Konzentrationsverläufe mit den experimentellen Daten der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Satzverfahren erreicht werden.

Die identifizierten formalkinetischen Parameter zeigen, dass die spezifische Wachstumsrate mit Nitrat als Elektronenakzeptor höher ist, als bei der Nitritreduktion (0.509 d<sup>-1</sup> bzw. 0.195 d<sup>-1</sup>). Der spezifische Zellertrag bei Wachstum mit Nitrat (9,1 g mol<sup>-1</sup>) ist ebenfalls größer im Vergleich zum Wachstum mit Nitrit (4,86 g mol<sup>-1</sup>). Darüber hinaus konnte eine starke Inhibition durch das während des Wachstums gebildeten Nitrits nachgewiesen werden. Eine Nitritkonzentration von 9,6 mmol L<sup>-1</sup> führt bereits zu einer Halbierung der Wachstumsrate. Erst nach einer starken Abnahme des im Medium vorgelegten Nitrats gewinnt die Nitritatmung an Bedeutung. Bereits eine Nitratkonzentration von 3,27 mmol L<sup>-1</sup> führt zu einer Halbierung der spezifischen Wachstumsrate mit Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor.





**Abb. 6.1 Vergleich ausgewählter Modellparameter nach Parameteridentifikation im Satz- und Zulaufverfahren. a) maximale Wachstumsrate, b) Zellertrag, c) Sättigungskonzentration**

Zur Beschreibung der chemolithoautotrophen Nitratatmung im Zulaufverfahren wurde aufgrund der geänderten Kultivierungsbedingungen das formalkinetische Modell geringfügig modifiziert. So wurde ein zuvor genutzter Schaltterm, welcher die Bevorzugung von Nitrat bei einem Überschuss dieses terminalen Elektronenakzeptors beschreibt, nicht mehr berücksichtigt, da zu Beginn der Untersuchungen im Zulaufverfahren keine hohen Nitratkonzentrationen im Medium vorliegen. In Abhängigkeit der Nitratkonzentration des Zuflusses wurde eine Akkumulation der beiden Elektronenakzeptoren Nitrat und Nitrit im Medium

beobachtet. Daher wurde eine gegenseitige Beeinflussung der Elektronenakzeptoren Nitrat und Nitrit in Form einer kompetitiven Inhibierung berücksichtigt. Ein simultanes Auftreten hoher Nitrat und Nitritkonzentration lag bei Untersuchungen im Satzverfahren nicht vor. Darüber hinaus wurde eine Substratüberschussinhibierung durch im Medium akkumuliertes Nitrat aufgrund zu hoher Nitratzufuhr bei der Modellerstellung berücksichtigt.

Die reaktionstechnischen Untersuchungen zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Zulaufverfahren wurden bei konstanten Zulaufraten durchgeführt. Zur Parameteridentifikation wurden zwei Ansätze mit einer Nitratzuflussrate von 20 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> sowie 50 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> verwendet. Die Validierung des identifizierten kinetischen Modells erfolgte im Anschluss durch drei weitere, unabhängige Experimente mit Nitratzuflussraten von 12 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, 30 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> sowie 40 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Die chemolithoautotrophe Nitratatmung mit *Cupriavidus necator* kann durch das zuvor identifizierte kinetische Modell gut beschrieben werden.

Die identifizierten maximalen Wachstumsraten für die Nitrat- beziehungsweise Nitritreduktion lagen mit  $\mu_{\text{NO}_3, \text{max}} = 0,749 \text{ d}^{-1}$  sowie  $\mu_{\text{NO}_2, \text{max}} = 0,391 \text{ d}^{-1}$  etwas höher im Vergleich zu den Wachstumsraten bei der Satzkultivierung (siehe Abbildung 6.1). Die im Zulaufverfahren identifizierten Zellertragskoeffizienten sind mit  $Y_{\text{X}, \text{NO}_3} = 8,5 \text{ g mol}^{-1}$ , sowie  $Y_{\text{X}, \text{NO}_2} = 6,78 \text{ g mol}^{-1}$  mit den Ertragskoeffizienten der Satzuntersuchungen vergleichbar.

Eine größere Abweichung der formalkinetischen Parameter konnte lediglich bei den bestimmten Sättigungskonzentrationen für Nitrat und Nitrit beobachtet werden. So lagen die im Zulaufverfahren bestimmten Sättigungskonzentrationen mit 0,232 mmol L<sup>-1</sup> für Nitrat sowie 0,792 mmol L<sup>-1</sup> für Nitrit deutlich unter den im Satzverfahren bestimmten Konzentrationen (2,7 mmol L<sup>-1</sup> für Nitrat beziehungsweise 3,07 mmol L<sup>-1</sup> für Nitrit). Diese Abweichung könnte auf die bekannte schlechte Identifizierbarkeit dieser Parameter im Satzverfahren zurückzuführen sein [Baltes et al. 1994]. Darüber hinaus konnte im Zulaufverfahren eine starke Inhibition des Wachstums durch den Elektronenakzeptor Nitrat nachgewiesen werden (Inhibitionskonstante 4,06 mmol L<sup>-1</sup>).

Die bislang berichteten maximalen spezifischen Wachstumsraten von *Cupriavidus necator* DSM 428 bei der chemolithoautotrophen Kultivierung mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor betragen bis zu 5,52 d<sup>-1</sup> [Sonnleitner et al. 1979]. Diese

Wachstumsrate ist um mehr als 80 % größer als die bei diesen reaktionskinetischen Untersuchungen erstmals quantifizierte maximale Wachstumsrate mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor. Üblicherweise wird lediglich von einer Verringerung um 20 % bei dem Ersatz von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor durch Nitrat ausgegangen [Hulsbeek et al. 2002]. Im Vergleich zu anderen Mikroorganismen scheint die Fähigkeit von *Cupriavidus necator* unter chemolithoautotrophen Bedingungen Nitrat zu reduzieren stark eingeschränkt. So wurden beispielsweise vor kurzem für *Acidovorax* sp. oder *Acinetobacter* sp. bei chemolithoautotropher Nitratatmung maximale Wachstumsraten von bis zu  $3,27 \text{ d}^{-1}$  beschrieben [Vasiliadou et al., 2006].

Die maximale Wachstumsrate für *Paracoccus denitrificans* mit Wasserstoff als Elektronendonator, sowie Nitrat als Elektronenakzeptor wurde zu  $0,831 \text{ d}^{-1}$  bestimmt [Strohm et al 2007] Der Zellertragskoeffizient bei den beschriebenen Untersuchungen betrug  $7,2 \text{ g mol}^{-1}$ . Diese Werte sind mit den hier beschriebenen Parametern für die chemolithoautotrophe Nitratatmung von *Cupriavidus necator* vergleichbar.

### **Ausblick**

Eine Nutzung von *Cupriavidus necator* zur Gewinnung von Polyhydroxybutyrat (PHB) aus Kohlendioxid mit Wasserstoff als Elektronendonator und Nitrat als Elektronenakzeptor ist nur sinnvoll zu realisieren, wenn es gelingt, Möglichkeiten zur Wachstumslimitierung von *Cupriavidus necator* unter diesen Bedingungen aufzuklären und nachfolgend mit Hilfe eines gezielten metabolischen Designs des Stoffwechsels diese Limitierungen zu überwinden. Die grundsätzliche Frage, wieso bei *Cupriavidus necator* ein so geringes Wachstum bei der Nitratatmung unter chemolithoautotrophen Bedingungen im Vergleich zur Sauerstoffatmung vorliegt, lässt sich nur über detaillierte biochemische Analysen klären. Hierzu könnten Studien des Energiestoffwechsels, der  $\text{CO}_2$ -Fixierung sowie metabolische Stoffflußanalysen unter chemolithoautotrophen Bedingungen mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor sinnvoll sein. Die Kenntnis der kürzlich publizierten Genomsequenz von *Cupriavidus necator* ist dabei eine gute Grundlage zur Planung solcher Studien.

Die hier gewonnenen neuen kinetischen Erkenntnisse zur chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* können zu einer Verbesserung bei der Auslegung autotropher Denitrifikationsanlagen zur Trinkwassergewinnung beitragen. Darüber hinaus ist aufgrund der geringen Sättigungskonzentrationen

eine Nischenanwendung zur simultanen Produktion von PHB bei der Nitratentfernung aus Trinkwasser prinzipiell denkbar. Ein solches Verfahren sollte jedoch auf bewährte Methoden der Zellrückhaltung zurückgreifen, um wirtschaftliche Raum-Zeit-Ausbeuten zu erreichen.

## 7 Literaturverzeichnis

**Ahrens, J. & Schlegel, H.G.** (1966): „Zur Regulation der NAD-abhängigen Hydrogenase-Aktivität“, Archiv für Mikrobiologie 55, S. 257-265

**Almeida, J.S.; Julio,S.M.; Reis, M.A.M.; Carrondo, M.J.T.** (1995): “Nitrite Inhibition of Denitrification by *Pseudomonas fluorescens*”, Biotechnology and Bioengineering Vol. 46, S. 194-201

**Almeida, J.S.; Reis, M.A.M.; Carrondo, M.J.T.** (1995): “Competition Between Nitrate and Nitrite Reduction in Denitrification by *Pseudomonas fluorescens*”, Biotechnology and Bioengineering Vol. 46, S. 476-484

**Ampe, F.; Leonard, D.; Lindley, N.D.** (1996) : “Growth performance and pathway flux determine substrate preference of *Alcaligenes eutrophus* during growth on acetate plus aromatic compound mixtures”, Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 46, S. 562-569

**Aragno, M.; Walther-Mauruschat, A.; Mayer, F.; Schlegel, H.G.** (1977): „Micromorphology of Gram-Negative Hydrogen Bacteria“, Archives of Microbiology Vol. 114, S. 93-100

**Baltes, M.; Schneider, R.; Sturm, C.; Reuss, M.** (1994): „Optimal Experimental Design for Parameter Estimation in Unstructured Growth Models“, Biotechnology Progress Vol. 10,S. 480-488

**Bernhard, M.; Benelli, B.; Hochkoepler, A.; Zannoni ,D.; Freidrich, B.** (1997): „Functional and structural role of the cytochrome b subunit of the membrane-bound hydrogenase complex of *Alcaligenes eutrophus* H16”, European Journal of Biochemistry Vol. 248, S. 179-186

**Bernhard, M.; Friedrich, B.; Siddiqui, R.A.** (2000): „*Ralstonia eutropha* TF93 Is Blocked in Tat-Mediated Protein Export“, Journal of Bacteriology Vol. 182, No. 3, S. 581-588

**Blackkolb, F. & Schlegel, H.G.** (1969): „Katabolische Repression und Enzymhemmung durch molekularen Wasserstoff bei *Hydrogenomonas*“, Archiv für Mikrobiologie 62, S. 129-143

**Bowien, B. & Kusian, B.** (2002): „Genetics and control of CO<sub>2</sub> assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*“, Archives of Microbiology 178, S. 85-93

**Bowien, B.; Mayer, F.; Codd, G.A.; Schlegel, H.G.** (1976): „*Purification, Some Properties and Quaternary Structure of the D-Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase of Alcaligenes eutrophus*“, Archives of Microbiology 100, S. 157-166

**Burgdorf, T.; Lenz, O.; Buhrke, T.; van der Linden, E.; Jones, A.K.; Albracht, S.P.J.; Friedrich, B.** (2005): „*[NiFe]-Hydrogenases of Ralstonia eutropha H16: Modular Enzymes for Oxygen-Tolerant Biological Hydrogen Oxidation*“, Journal of Microbiology and Biotechnology Vol. 10, S. 181-196

**Chang, C.C. & Tseng, S.K.** (1998): „*Immobilization of Alcaligenes eutrophus using PVA crosslinked with sodium nitrate*“, Biotechnology Techniques Vol. 12, No. 12, S. 865-868

**Chang, C.C.; Tseng, S.K.; Huang, H.K.** (1999): „*Hydrogenotrophic denitrification with immobilized Alcaligenes eutrophus for drinking water treatment*“, Biosource Technology 69, S. 53-58

**Chmiel, H.** (1991): Bioprozesstechnik 1, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, S. 139-190

**Choi, J. & Lee, S. Y.** (1999): „*Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation*“, Applied Microbiology and Biotechnology 51, S. 13-21

**Contois, D.E.** (1959): „*Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures*“, Journal of General Microbiology Vol. 21, No. 1; S. 40-50

**Cramm, R.; Büsch, A.; Strube, K.** (2006): „*NO-dependent transcriptional activation of gene expression in Ralstonia eutropha H16*“, Biochemical Society Transactions Vol. 34, part 1, S. 182-184

**Cramm, R.; Pohlmann, A.; Friedrich, B.** (1999): „*Purification and characterization of the single-component nitric oxide reductase from Ralstonia eutropha H16*“, FEBS Letters Vol. 460, S. 6-10

**Cramm, R.; Siddiqui, R.A.; Friedrich, B.** (1997): „*Two Isofunctional Nitric Oxide Reductases in Alcaligenes eutrophus H16*“, Journal of Bacteriology Vol. 179, No. 21, S. 6769-6777

**Cypionka, H.** (1999): Grundlagen der Mikrobiologie, Springer Verlag, Berlin, S. 90-176

**Davis, D.H.; Doudoroff, M.; Stanier, R.Y.; Mandel M.** (1969): "Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* Vol.19, S. 375-390

**DeCicco, B.T. & Stukus, P.E.** (1968): "*Autotrophic and Heterotrophic Metabolism of Hydrogenomonas: I. Growth Yields and Patterns Under Dual Substrate Conditions*", *Journal of Bacteriology* Vol. 95, No.4, S. 1469-1475

**Dijkhuizen, L & Harder, W** (1984): "*Current views on the regulation of autotrophic carbon dioxide fixation via the Calvin cycle in bacteria*", *Antonie van Leeuwenhoek* 50, S. 473-487

**Du, G.; Chen, J.; Yu, J.; Lun S.** (2001): "*Kinetic Studies on poly-3-hydroxybutyrate formation by *Ralstonia eutropha* in a two-stage continuous culture system*", *Process Biochemistry* 37, S. 219-227

**Ferguson, S.J.** (1987): "*Denitrification: a question of the control and organization of electron and ion transport*", *Trends in Biochemical Sciences* 12, S. 354-357

**Franco-Lara, E. & Weuster-Botz, D.** (2005): "*Estimation of optimal feeding strategies for fed-batch bioprocesses*", *Bioprocess and Biosystems Engineering* 27, S. 255-262

**Friedrich, B.; Heine, E.; Finck, A.; Friedrich, C.G.** (1981): "*Nickel requirement for Active Hydrogenase Formation in *Alcaligenes eutrophus**", *Journal of Bacteriology* Vol. 145, No. 3, S. 1144-1149

**Friedrich, C.G. & Friedrich, B** (1983): "*Regulation of Hydrogenase Formation Is Temperature Sensitive and Plasmid Coded in *Alcaligenes eutrophus**", *Journal of Bacteriology* Vol. 153, No. 1, S. 176-181

**Friedrich, C.G.; Friedrich, B.; Bowien, B.** (1981): "*Formation of Enzymes of Autotrophic Metabolism During Heterotrophic Growth of *Alcaligenes eutrophus**", *Journal of General Microbiology* Vol. 122, S. 69-78

**Friedrich, C.G.; Schneider, K.; Friedrich, B.** (1982): "*Nickel in the Catalytically Active Hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus**", *Journal of Bacteriology* Vol. 152, No.1, S. 42-48

**Friedrich, T. & Weiss, H.** (1997): "*Modular Evolution of the Respiratory NADH:Ubiquinone Oxidoreductase and the Origin of its Modules*", *Journal of theoretical Biology* 187, S. 529-540

**Gottschalk, G.; Eberhardt, U.; Schlegel, H.G.** (1964): „*Verwertung von Fructose durch Hydrogomonas H16 (I.)*“, Archiv für Mikrobiologie 48, S. 95-108

**Haverkamp, G.K.; Ranke, H.; Freidrich, C.G.** (1995): „*Kinetic parameters for hydrogen evolution by the NAD-linked hydrogenase of Alcaligenes eutrophus*“, Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 44, S. 514-518

**Heinzle, E. & Lafferty, R.M.** (1980): „*A Kinetic Model for Growth and Synthesis of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid (PHB) in Alcaligenes eutrophus H16*“, European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 11, S. 8-16

**Hirsch, P.; Georgiev, G. ; Schlegel, H.G.** (1963): „*CO<sub>2</sub>-Fixierung durch Knallgasbakterien: III. Autotrophe und organotrophe CO<sub>2</sub>-Fixierung*“, Archiv für Mikrobiologie 46, S. 79-95

**Ho, C.M.; Tseng, S.K.; Chang, Y.J.** (2001): „*Autotrophic denitrification via a novel membrane-attached biofilm reactor*“, Letters in Applied Microbiology 33, S. 201-205

**Hogrefe C.; Römermann, D.; Friedrich, B.** (1984): „*Alcaligenes eutrophus Hydrogenase Genes (Hox)*“, Journal of Bacteriology Vol. 158, No. 1, S. 43-48

**Ishizaki, A. & Tanaka, K.** (1990): „*Batch Culture of Alcaligenes eutrophus ATCC 17697<sup>T</sup> Using Recycled Gas Closed Circuit Culture System*“, Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 69, No. 3, S. 170-174

**Ishizaki, A. & Tanaka, K.** (1991): „*Production of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid from Carbon Dioxide by Alcaligenes eutrophus ATCC 17697<sup>T</sup>*“, Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 71, No. 4, S. 254-257

**Ishizaki, A.; Tanaka, K.; Taga, N.** (2001): „*Microbial production of Poly-D-3-Hydroxybutyrate from CO<sub>2</sub>*“, Applied Microbiology and Biotechnology 57, S. 6-12

**Karr, D.B.; Waters, J.K.; Emerich, D.W.** (1983): „*Analysis of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate in Rhizobium japonicum bacterioids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection*“, Applied and Environmental Microbiology Vol. 46, S. 1339-1344

**Karus, M.** (2003): „*Marktüberblick: Bio-Kunststoffe auf Basis nachwachsender Rohstoffe*“ <http://www.nova-institut.de/>

**Kester, R.A.; de Boer, W.; Laanbroek, H.J.** (1997) : „*Production of NO and N<sub>2</sub>O by Pure Cultures of Nitrifying and Denitrifying Bacteria during Changes in Aeration*“, Applied and Environmental Microbiology Vol. 63, No. 10, S. 3872-3877



**Klarskov K.; Bartsch, R.G.; Meyer, T.E.; Cusanovich, M.A.; Van Beeumen, J.J.** (1997): "Cytochromes *c*-552 from two strains of the hydrogenotrophic bacterium *Alcaligenes eutrophus* are sequence homologs of the cytochromes *c*<sub>8</sub> from the denitrifying *Pseudomonas*", *Biochimica et Biophysica Acta* 1343, S. 144-151

**Kömen, R.; Zannoni, D.; Ingledew, W.J.; Schmidt, K.** (1991): „*The electron transport system of Alcaligenes eutrophus H16 – I. Spectroscopic and thermodynamic properties*“, *Archives of Microbiology* 155, S. 382-390

**König, C. & Schlegel H.G.** (1968): "Langfristiges organotrophes Wachstum von *Hydrogenomonas H16* im Chemostaten", *Archiv für Mikrobiologie* 62, S. 41-55

**Kurt, M.; Dunn, I.J.; Bourne, J.R.** (1986): "Biological Denitrification of Drinking Water Using Autotrophic Organisms with H<sub>2</sub> in a Fluidized-Bed Biofilm Reactor", *Biotechnology and Bioengineering* Vol. XIX, S. 493-501

**Leadbeater, L. & Bowien, B.** (1984): "Control of Autotrophic Carbon Assimilation in *Alcaligenes eutrophus* by Inactivation and Reactivation of Phosphoribulokinase", *Journal of Bacteriology* Vol. 157, No. 1, S. 95-99

**Lee, K-C. & Rittmann, B.E.** (2000): „A novel hollow-fiber membrane biofilm reactor for autohydrogenotrophic denitrification of drinking water“, *Water Science and Technology* Vol. 41, No. 4-5, S. 219-226

**Lee, S.Y.** (1996): "Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria", *Trends in Biotechnology* Vol. 14, S. 431-438

**Lengler, J.W.; Drews, G.; Schlegel, H.G.** (1999): *Biology of the Prokaryotes*, Thieme Verlag, Stuttgart, S. 244-259

**Levenspiel, O.** (1980): „*The monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situation*“, *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 22, S. 1671-1687

**Lohmeyer, M & Friedrich, C.G.** (1987): "Nickel transport in *Alcaligenes eutrophus*", *Archives of Microbiology* Vol 149, S. 130-135

**Luengo, Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera E.R.** (2003): "Bioplastics from microorganisms", *Current Opinion in Microbiology* 6, S. 251-260

**Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe E.V.** (2007): „Marktanalyse Nachwachsende Rohstoffe Teil II“,

<http://www.biowerkstoffe.info/cms35/Literatur.798.0.html>

**Monod, J.** (1942): *Recherches sur la connaissance des cultures bacteriennes*, 2<sup>nd</sup> edition, Hermann, Paris

**Moser, H.** (1958): *"The Dynamcis of Bacterial Populations Maintained in the Chemostat"*, Wash, Carnegie Inst. Publs., N 614, S. 160-165

**Müller, R.J.** (2000): *"Biologisch abbaubare Kunststoffe"*, *Biologie in unserer Zeit* Vol. 30 Nr. 4, S. 218-225

**Munnack, A.** (1989): *"Optimal Feeding Strategy for Identification of Monod-Type Models by Fed-Batch Experiments"*, *Computer Applications in Fermentation Technology: Modelling and Control of Biotechnological Processes* -Fish, N.M.; Fox, R.I.; Thornhill, N.F. (Editors)

**Nomura, C.T. & Taguchi, S.** (2007): *"PHA synthase engineering toward superbicatalysts for custom-made biopolymers"*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, S. 969-979

**Pederson, E.N.; McChalicher, C.W.J.; Srienc, F.** (2006): *"Bacterial Synthesis of PHA Block Copolymers"*, *Biomacromolecules* Vol. 7, No. 6; S. 1904-1911

**Pfützner, J. & Schlegel, H.G.** (1973): *"Denitrifikation bei Hydrogenomonas eutropha Stamm H16"*, *Archiv für Mikrobiologie* 90, S. 199-211

**Pfützner, J.; Linke, H.A.B.; Schlegel, H.G.** (1970): *"Eigenschaften der NAD-spezifischen Hydrogenase aus Hydregomonas H16"*, *Archives of Microbiology* Vol. 71, S. 67-78

**PlasticsEurope** (2006): „Geschäftsbericht 2006 Im Europäischen Team PlasticsEurope Deutschland e.V.“ <http://www.vke.de/de/infomaterial/>

**Präve P.; Faus, U.; Sittig, W.; Sukatsch, D.A. (Editors)** (1994): *Handbuch der Biotechnologie*, R. Oldenburg Verlag, München, Wien, S. 20-404

**Reardon, K.F.; Mosteller, D.C.; Bull Rogers, J.D.** (2000): *"Biodegradation Kinetics of Benzene, Toluene, and Phenol as Single and Mixed Substrates for Pseudomonas putida F1"*, *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 69, No. 4; S. 385-400

**Reddy, C.S.K.; Ghai, R.; Kalia, R.V.C.** (2003): *"Polyhydroxyalkanoates: an overview"*, *Biosource Technology* Vol. 87, S. 137-146

**Rees, E.; Siddiqui, R.A.; Köster, F.; Schneider, B.; Friedrich, B.** (1997): „Structural Gene (*nirS*) for the Cytochrome *cd<sub>1</sub>* Nitrite Reductase of *Alcaligenes eutrophus* H16“, Applied and Environmental Microbiology Vol. 63, No. 2, S. 800-802

**Repaske, R. & Mayer, R.** (1976): “Dense Autotrophic Cultures of *Alcaligenes eutrophus*”, Applied and Environmental Microbiology Vol. 32, No. 4, S. 592-597

**Repaske, R. & Repaske C.** (1976): “Quantitative Requirements for Exponential Growth of *Alcaligenes eutrophus*”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 32, No. 4, S. 585-591

**Repaske, R.; Ambrose, C.A.; Repaske, A. C.; De Lacy, M.L.** (1971): “Bicarbonate Requirement for Elimination of the Lag Period of *Hydrogenomonas eutropha*”, Journal of Bacteriology Vol. 107, No. 3, S. 712-717

**Rittenberg, S.C. & Goodman, N.S.** (1969): “Mixotrophic Growth of *Hydrogenomonas eutropha*”, Journal of Bacteriology Vol. 98, No. 2, S. 617-622

**Sander, R.** (1999): “Compilation of Henry’s law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry”, <http://www.ppch-mainz.mpg.de/~sander/res/henry.html>

**Sann, R.; Kostka, S. & Friedrich, B.** (1994): „A cytochrome *cd<sub>1</sub>*-type nitrite reductase mediates the first step of denitrification in *Alcaligenes eutrophus*“, Archives of Microbiology 161, S. 453-459

**Satorius, I.** (2007) “Bio-Kunststoffe: Zukunftsmarkt für nachwachsende Rohstoffe?“, Kongressbeitrag: BMELV-Syposium Nachwachsende Rohstoffe“, <http://www.bmelv.de>

**Schäferjohann, J.; Bednarski, R.; Bowien, B** (1996): „Regulation of CO<sub>2</sub> Assimilation in *Ralstonia eutropha*: Premature Transcription Termination within the *cbb* Operon“, Journal of Bacteriology Vol. 178, No. 23, S. 6714-6719

**Schlee, D. und Kleber, H.-P. (Editors)** (1991): Biotechnologie, Gustav Fischer Verlag, Jena

**Schlegel, H.G.** (1992): Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag, Stuttgart, S. 231-396, S. 555-558

**Schlegel, H.G.; Gottschalk, G.; Von Bartha, R.** (1961): „Formation and Utilization of Poly-β-Hydroxybutyric Acid by Knallgas Bacteria (*Hydrogenomonas*)“, Nature No. 4787, S. 463-465

- Schwartz, E.; Henne, A.; Cramm, R.; Eitinger, T.; Friedrich, B.; Gottschalk, G.** (2003): „*Complete Nucleotide Sequence of pHG1: A Ralstonia eutropha H16 Megaplasmid Encoding Key Enzymes of H<sub>2</sub>-based Lihoautotrophy and Anaerobiosis*“, Journal of Molecular Biology Vol. 323, S. 369-383
- Siddiqui, R.A.; Warnecke-Eberz, U.; Hengsberger, A.; Schneider, B.; Kostka,S.; Friedrich, B.** (1993): „*Structure and Function of a Periplasmic Nitrate Reductase in Alcaligenes eutrophus H16*“, Journal of Bacteriology Vol. 175, No. 818, S. 5867-5876
- Siedow, A.; Cramm, R.; Siddiqui, R.A.; Friedrich,B.** (1999): “*A Megaplasmid-Borne Anaerobic Robonucleotide Reductase in Alcaligenes eutrophus H16*“, Journal of Bacteriology Vol. 181, No. 16, S. 4919-4928
- Sonnleitner, B. ; Heinzle, E.; Braunegg, G.; Lafferty, R.M.** (1979): „*Formal Kinetics of Poly-β-Hydroxybutyric Acid (PHB) Production in Alcaligenes eutrophus H16 and Mycoplana rubra R14 With Respect to the Dissolved Oxygen Tension in Ammonium-Limited Batch Cultures*“, European Journal of Applied Microbiology 7, S. 1-10
- Squio, C.R.; Marangoni, C.; De Vecchi, C.S.; Aragao, G.M.F.** (2003): “*Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by Ralstonia eutropha*“, Applied Microbiology and Biotechnology 61, S. 257-260
- Steinbüchel, A. & Fächtenbusch, B.** (1998): „*Bacterial and other biological systems for polyester production*“, Trends in Biotechnology Vol. 16, S. 419-427
- Stouthammer,A.H.; Boogerd, F.C.; Van Verseveld, H.W.** (1982): “*The bioenergetics of denitrification*“, Antonie van Leeuwenhoek 48, S. 545-553
- Strohm, T.O.; Griffin, B.; Zumft, W.G.; Schink, B.** (2007): „*Growth Yields in Bacterial Denitrification and Nitrate Ammonification*“, Applied and Environmental Microbiology Vol. 73, No. 5, S. 1420-1424
- Tabillion, R. & Kaltwasser, H.** (1977): „*Energieabhängige <sup>63</sup>Ni-Aufnahme bei Alcaligenes eutrophus Stamm H1 und H16*“, Archives of Microbiology Vol. 113, S 145-151
- Tabillion, R.; Weber, F.; Kaltwasser, H.** (1980): „*Nickel requirement for Chemolitotrophic Growth in Hydrogen-Oxidizing Bacteria*“, Archives of Microbiology Vol. 124, S. 131-136

**Takeshita, T. & Ishizaki, A.** (1996): "Influence of Hydrogen Limitation on Gaseous Substrate Utilization in Autotrophic Culture of *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697<sup>T</sup>", *Journal of Fermentation and Biotechnology* Vol. 81, No. 1, S. 83-86

**Tanaka, K. & Ishizaki, A.** (1994): "Production of Poly-D-3-Hydroxybutiric Acid from Dioxide by a Two-Stage Culture Method Employing *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697<sup>T</sup>", *Journal of Fermentation and Bioengineering* Vol. 69, No. 3, S. 170-174

**Tanaka, K.; Ishizaki, A.; Kanamaru, T.; Kawano, T.** (1994): "Production of Poly(D-3-Hydroxybutyrate) from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> by High Cell Density Autorophic Cultivation of *Alcaligenes eutrophus*", *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 45, S. 268-275

**Teissier, G.** (1936): „Les lois quantitatives de la croissance“, *Ann. Physiol. Physiochem. Biol.* 12, S. 529-572

**Van der Linden, E.; Burgdorf, T.; de Lacey, A.L.; Buhrke, T.; Scholte, M.; Fernandez, V.M.; Friedrich, B.; Albracht, S.M.J.** (2005): „An improved purification procedure for the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*: new insights into its (in)stability and spectroscopic properties“, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* Vol. 11, S. 247-260

**Vandamme, P. & Coenye, T.** (2004): „Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found“, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* Vol. 54, S. 2285-2289

**Vanechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., False, E. Verschraegen, G.** (2004): „*Wautersia* gen. Nov., a novel genu accomodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. Nov.“, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* Vol. 54, S. 317-327

**Vasiliadou, I.A.; Siozios, S.; Papadas, I.T.; Bourtzis, K.; Pavlou, S.; Vayenas, D.V.** (2006): „Kinetics of Pure Cultures of Hydrogen-Oxidizing Denitrifying Bacteria and Modeling of the Interactions Among Them in Mixed Cultures“, *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 95, No.3, October 20, 2006, S. 513-525

**Vasiliadou, I.A.; Siozios, S.; Papadas, I.T.; Bourtzis, K.; Pavlou, S.; Vayenas, D.V.** (2006): "Kinetics of Pure Cultures of Hydrogen-Oxidizing Denitrifying Bacteria and Modelling of the Interactions Among Them in Mixed Cultures", *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 95, Issue 3, S. 513-525

- Walther-Mauruschat, A.; Aragno, M.; Mayer, F.; Schlegel, H.G.** (1977): „*Micromorphology of Gram-Negative Hydrogen Bacteria*“, Archives of Microbiology 114, S. 101-110
- Wang, J.-H.; Baltzis, B.C.; Lewandowski, G.A.** (1995): „*Fundamental Denitrification Kinetic Studies with Pseudomonas denitrificans*“, Biotechnology and Bioengineering Vol. 47, S. 26-41
- Warnecke-Eberz, U. & Friedrich, B.** (1993): „*Three nitrate reductase activities in Alcaligenes eutrophus*“, Archives of Microbiology 159, S. 405-409
- Weast, R.C.; Lide, D.R.; Astle, M.J.; Beyer, W.H.** (1989-1990): „*Handbook of chemistry and physics*“, 70<sup>th</sup> edn. CRC, Boca Raton, FL
- Weuster-Botz, D.; Stevens, S.; Hawrylenko, A.** (2002): „*Parallel-operated stirred-columns for microbial process development*“ Biochemical Engineering Journal 11, S. 69-72
- Wilde, E.** (1962): „*Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydregomonas*“, Archiv für Mikrobiologie 43, S. 109-137
- Wolf, K.-H.** (1991): Kinetik in der Bioverfahrenstechnik, Behr's Verlag, Hamburg, S. 117-144
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y.** (1995): „Transfer of two *Burgholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia picketii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov.“, Microbiology and Immunology Vol. 39, S897-904
- Zumft, W. G.** (1997): „*Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification*“, Microbiology and Molecular Biology Reviews Vol. 61, No. 4, S. 533-616
- Zumft, W.G.** (1991): „*The Denitrifying Prokaryotes*“, The Prokaryotes Vol. 1 - Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.-H. (Editors), Springer Verlag, New York, S. 554-582
- Zumft, W.G.; Dreusch, A.; Löchelt, S.; Cuyppers, H.; Friedrich, B.; Schneider, B.** (1992): „*Derived amino acid sequences of the nosZ gene (respiratory N<sub>2</sub>O reductase) from Alcaligenes eutrophus, Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas stutzeri reveal potential copper-binding residues*“, European Journal of Biochemistry Vol. 208, S. 31-40

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Tab. 8.1 Abkürzungen chemischer Formeln bzw. Namen

Abkürzung	Begriff
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cyt	Cytochrom
Fe	Eisen
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
H <sub>2</sub>	molekularer Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
MBH	Membrangebundene Hydrogenase
N <sub>2</sub>	molekularer Stickstoff
N <sub>2</sub> O	Lachgas
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NAP	periplasmatische Nitratreduktase
NAR	membrangebundene Nitratreduktase
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
NIR	Nitritreduktase
NO	Stickstoffmonooxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOR	Stickstoffmonooxidreduktase
NOS	Lachgasreduktase
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OD <sub>660</sub>	Optische Dichte bestimmt bei 660 nm
p	Modellparameter
PGA	Phosphoglycerat
PHA	Ployhydroxyalkanoat

Abkürzung	Begriff
PHB	Polyhydroxybutyrat
pHG1	Megaplasmid von <i>Cupriavidus necator</i> DSM 428
PRK	Phosphoribulokinase
RuBisCo	Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase
SH	Im Cytoplasma gelöste Hydrogenase
UQ	Ubichinon (oxidierte Form)
UQH	Ubichinon (reduzierte Form)

Tab. 8.2 Abkürzungen der Prozessgrößen

Abkürzung	Einheit	Begriff
$C_{\text{CO}_2, \text{fl}}$	mol L <sup>-1</sup>	Konzentration an gelöstem Kohlendioxid
$C_{\text{CO}_3^{2-}}$	mol L <sup>-1</sup>	Karbonatkonzentration
$C_{\text{H}_2\text{CO}_3}$	mol L <sup>-1</sup>	Kohlensäurekonzentration
$C_{\text{HCO}_3^-}$	mol L <sup>-1</sup>	Bikarbonatkonzentration
$C_i$	mol L <sup>-1</sup>	Konzentration der Komponente <i>i</i>
$C_{i, \text{ab}}$	mol L <sup>-1</sup>	Konzentration der Komponente <i>i</i> im Abfluss
$C_{i, \text{fl}}$	mol L <sup>-1</sup>	Konzentration der Komponente <i>i</i> in der Flüssigphase
$C_{i, \text{zu}}$	mol L <sup>-1</sup>	Konzentration der Komponente <i>i</i> im Zufluss
$C_{\text{NO}_3^-}$	mol L <sup>-1</sup>	Nitratkonzentration
$C_{\text{NO}_3^-, \text{zu}}$	mol L <sup>-1</sup>	Nitratkonzentration im Zufluss
$C_{\text{NO}_2^-}$	mol L <sup>-1</sup>	Nitritkonzentration
$C_{\text{NO}_2^-, \text{max}}$	mol L <sup>-1</sup>	maximale Nitritkonzentration, bei welcher kein Wachstum mehr eintritt
$C_P$	mol L <sup>-1</sup>	Produktkonzentration
$C_{P, \text{max}}$	mol L <sup>-1</sup>	Maximale, kritische Produktkonzentration
$C_{\text{PHB}}$	mg L <sup>-1</sup>	PHB-Konzentration
$C_S$	g L <sup>-1</sup>	Substratkonzentration
$C_x$	g L <sup>-1</sup>	Biotrockenmassekonzentration



Abkürzung	Einheit	Begriff
$C_{X,0}$	$\text{g L}^{-1}$	Startbiotrockenmassekonzentration
$C_{X,t}$	$\text{g L}^{-1}$	Biotrockenmassekonzentration zur Prozesszeit $t$
$D$	$\text{h}^{-1}$	Verdünnungsrate
$E$	-	Extinktion
$F$	$\text{L h}^{-1}$	Volumenstrom
$F_{\text{ab}}$	$\text{L h}^{-1}$	Volumenstrom des Abflusses eines Rührkesselreaktors
$F_{\text{NO}_3^-}$	$\text{mol L}^{-1}$	Schaltparameter
$F_{\text{zu}}$	$\text{L h}^{-1}$	Volumenstrom des Zuflusses eines Rührkesselreaktors
$k_d$	$\text{h}^{-1}$	Absterberate
$K_{H,i}$	$\text{mol L}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$	Henrykonstante der Komponente $i$
$K_{S,\text{NO}_3^-}$	$\text{mol L}^{-1}$	Sättigungskonzentration für Nitrat
$K_{S,\text{NO}_2^-}$	$\text{mol L}^{-1}$	Sättigungskonzentration für Nitrit
$K_{i,\text{NO}_3^-}$	$\text{mol L}^{-1}$	Nitratinhibitionskonstante
$K_{i,S}$	$\text{mol L}^{-1}$	Inhibitionskonstante des limitierenden Substrats
$K_S$	$\text{ml L}^{-1}$	Sättigungskonzentration
$K_S$	$\text{mol L}^{-1}$	Dissoziationskonstante
$m_S$	$\text{h}^{-1}$	Erhaltungsstoffwechselkoeffizient
$n$	-	Exponent
$n_{\text{ges}}$	$\text{mol L}^{-1}$	Gesamtstoffmenge
$\dot{n}_{\text{ges}}$	$\text{mol h}^{-1}$	Gesamtstrom
$n_i$	$\text{mol L}^{-1}$	Stoffmenge der Komponente $i$
$p$	Pa	Druck
$p_{\text{ges}}$	Pa	Gesamtdruck
$p_i$	Pa	Partialdruck der Komponente $i$ in der Gasphase
$q_i$	$\text{h}^{-1}$	Spezifische Aufnahmegeschwindigkeit der Komponente $i$
$q_{\text{NO}_3^-}$	$\text{mol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$	spezifische Nitrataufnahmerate
$q_{\text{NO}_2^-}$	$\text{mol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$	spezifische Nitritaufnahmerate
$q_P$	$\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit

Abkürzung	Einheit	Begriff
$q_{S,\mu}$	$\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Spezifische Substrataufnahmegeschwindigkeit für das Wachstum
$q_{S,m}$	$\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Spezifische Substrataufnahmegeschwindigkeit für die Erhaltung
R	$\text{kPa L mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	Ideale Gaskonstante
$r_i$	$\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Bildungs- bzw. Verbrauchsgeschwindigkeit der Komponente $i$
RZA	$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$	Raum-Zeit-Ausbeute
$S_i(t)$	$\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	Steigung zum Zeitpunkt $t$
$t$	h	Prozesszeit
T	$^{\circ}\text{C} / \text{K}$	Temperatur
$t_d$	H	Verdopplungszeit
V	L	Volumen
$V_R$	L	Reaktionsvolumen
$y_i$	-	Molenbruch (Anteil) der Komponente $i$
$Y_{X,S}$	$\text{g g}^{-1}$ oder $\text{g mol}^{-1}$	Zellertragskoeffizient
$Y_{X,\text{NO}_3^-}$	$\text{g mol}^{-1}$	Zellertragskoeffizient für Nitrat
$Y_{X,\text{NO}_2^-}$	$\text{g mol}^{-1}$	Zellertragskoeffizient für Nitrit
$\mu$	$\text{h}^{-1}/\text{d}^{-1}$	spezifische Wachstumsrate
$\mu_{\text{max}}$	$\text{h}^{-1} / \text{d}^{-1}$	maximale spezifische Wachstumsrate
$\mu_{\text{NO}_3^-}$	$\text{d}^{-1}$	spezifische Wachstumsrate der Nitratreduktion
$\mu_{\text{NO}_2^-}$	$\text{d}^{-1}$	spezifische Wachstumsrate der Nitritreduktion
$\mu_{\text{NO}_3^-, \text{max}}$	$\text{d}^{-1}$	maximale spezifische Wachstumsrate bei der Nitratreduktion
$\mu_{\text{NO}_2^-, \text{max}}$	$\text{d}^{-1}$	maximale spezifische Wachstumsrate bei der Nitritreduktion
$\tau$	h	Hydrodynamische Verweilzeit
% v/v	-	Volumenprozent
% w/w	-	Gewichtsprozent

Tab. 8.3 Besonderheiten der verwendeten Einheiten

Einheit	Besonderheit
L	In der biotechnologischen Fachliteratur wird die Einheit Liter mit großem L geschrieben, um Verwechslungen mit der Zahl 1 in manchen Schrifttypen zu vermeiden. Konsequenterweise wird entsprechend mL, $\mu$ L etc. geschrieben. Bei der Angabe von Konzentrationen und Volumina ist es üblich, Liter anstelle von Kubikmeter zu verwenden.
g	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Masse üblicherweise die Einheit Gramm anstelle von Kilogramm verwendet.
h	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Zeit in den Einheiten von $\mu$ , q usw. üblicherweise die Einheit Stunde anstelle von Sekunde verwendet.

## 9 Anhang

### 9.1 Verwendete Geräte und Materialien

Gerät/Material	Typ	Verwendung	Hersteller
Ab-/Zuluftfilter	AcroR 37TF (PTFE; 0,2 µm)	Kultivierung	Pall
Aludeckel mit Septum für Rollrandflasche 100 mL	Ø 20 mm	Heterotrophe Kultivierung	VWR
Aludeckel mit Septum für Rollrandflasche 2mL	Ø 11 mm	Analyse	VWR
Analytische Waage	AG285 (0,01/0,1 mg-81/210mg)	Einwaage der Chemikalien BTM-Bestimmung	Mettler-Toledo
Analytische Wage	E121245 (10 mg-8210g)	Einwaage der Chemikalien	Ohaus
Autoklav	H+E Autoklav	Sterilisation	H+P Labortechnik
Blasensäule		Heterotrophe Kultivierung	Infors
Probenahmeröhrchen	7, 3,2 mL Vacutainer <sup>tm</sup>	Probennahme	Bellin Industrial Estate
Chromatographiesäule	Grom-Sil SAX 5µm	Nitrat- Nitritbestimmung	Alltech Grom
Chromatographiesäule	Aminex HPX-87H	Crotonsäurebestimmung	BioRad
Fermentationssystem	Fedbatch-pro	Heterotrophe Kultivierung	DASGIP
Gaschromatograph	Micro-GC CP4900	Abgasanalytik	Varian
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LD	Trocknen von Zellmasse	Martin Christ GmbH
HPLC-System	Smartline	Analytik	Knauer
Inkubator	Profors	Heterotrophe Kultivierung	Infors
IRIS	Version 4.11	Bioreaktorkontrolle Bioreaktorregelung	Infors
Kanülen	Stericon (0,9x70 mm)	Medienzugabe in Labfors	Braun
Küvetten	Einmal-Mikroküvetten	Analyse	A.Hartenstein
Laborbioreaktor 2L	Labfors	chemolithoautotrophe Kultivierung	Infors
Laborbioreaktor 7,5 L	Labfors	heterotrophe Kultivierung	Infors

<b>Gerät/Material</b>	<b>Typ</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
MATLAB	R2006b	Parameteridentifikation	Mathworks
Mehrfachrührplatz	Variomag P15	Heterotrophe Kultivierung	H+P Labortechnik
Mikrotiterplattenphotometer EL808		Analytik	Bio-Tek Instruments
Photometer	Genesys 20	Analyse	Thermo Spectronic
pH-Sonde (autoklavierbar)	HA405-DPA-SC-S8	pH-Messung im Bioreaktor	Mettler-Toledo
Pipetten	Research	Analyse	Eppendorf
Pipettenspitzen (1000µL)	Diamond D1000	Analyse	Gilson
Pipettenspitzen (200µL)	Diamond D200	Analyse	Gilson
Pumpe	BVP	Zellernte	Ismatec
Pumpe	Mehrkanalpumpe (205U)	Zuflusspumpe	Watson Marlow
Pumpenschläuche	Maprene2-Schläuche	Medienzugabe Zellernte Titrationsmittel	Watson Marlow
Rollrandflasche	1,5 mL	Analyse	VWR
Rollrandflasche	100 mL	Heterotrophe Kultivierung	VWR
Septum	16 bzw. 12 mm	Medienzugabe in Labfors	Infors HT
Siliconschläuche		Medienzugabe Zellernte Titrationsmittel	Carl-Roth
Spritzen	1 mL/ 5 mL/ 10 mL/ 20 mL/ 50 mL	Medienzugabe Probennahme	Braun
Spritzenfilter	Rotilabo R steril (Zellulosemischer; 0,22µm)	Kultivierung	Carl-Roth
Spritzenfilter	Einmalspritzenfilter (PET; 0,2 µm; 25 mm)	Kultivierung	Carl-Roth
Zentrifuge	Biofuge stratos	Analyse	Thermo Electron Coop.
Zentrifuge	Rotixa 50 RS	Aufkonzentrierung	Hettich
Zentrifugenröhrchen	Dispossable Conical Tube	Probenahme	Nalgene Nunc International

## 9.2 Verwendete Chemikalien

Tab. 9.1 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Formel	Reinheitsgrad	Hersteller	Produktnummer
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN	≥ 99%	Merck	100030
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	p.a.	Merck	101145
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	≥ 98%	Merck	102378
Chrom(III)-chlorid-Hexahydrat	CrCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	≥ 96%	Merck	102487
Cobalt(II)-Chlorid-Hexahydrat	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	99-102%	Merck	102539
Dicyanocobinamid	C <sub>50</sub> H <sub>72</sub> CoN <sub>13</sub> O <sub>8</sub>	≥ 95%	Sigma	C3021
EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	> 99%	Sigma	E 5513
EDTA-Dinatriumdihydrat	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> *2H <sub>2</sub> O	99-101%	Merck	108418
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	99-102%	Merck	103943
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	≥ 99,9%	Merck	100983
D(-)-Fructose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	≥ 99%	Merck	1.04007
Crotonsäure	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	≥ 99%	Merck	802650
Glycerin	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	~ 87%	Merck	104091
Kaliumsulfat	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	≥ 99%	Merck	105153
Kuper(II)-chlorid-Dihydrat	CuCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	> 99%	Merck	109987
Kohlendioxid 3.5	CO <sub>2</sub>	≥ 99,5%	Air Liquide	57,3 bar/ B10
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	99-101%	Merck	105833
Methanol	CH <sub>3</sub> OH	≥ 99,9%	Roth	7342
Natriumchlorid	NaCl	≥ 99,5%	Merck	106404
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	99-102%	Merck	106346
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecanhydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O	> 99%	Carl-Roth®	T1061
Natriumhydroxid-Plätzchen	NaOH	≥ 99%	Merck	106498
Natriummolybdat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	≥ 99,5%	Merck	106521
Natriumnitrat	NaNO <sub>3</sub>	≥ 99,5%	Merck	106537
Nickelsulfat-Hexahydrat	NiSO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O	> 99%	Merck	106727

<b>Bezeichnung</b>	<b>Formel</b>	<b>Reinheitsgrad</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Produktnummer</b>
Nitratstandardlösung	$\text{NaNO}_3$	1 g L <sup>-1</sup> Nitrat	Merck	119811
Nitritstandardlösung	$\text{NaNO}_2$	1 g L <sup>-1</sup> Nitrit	Merck	119899
PHB	$[\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}]_n$	-	Aldrich	363502
ortho-Phosphorsäure 85%	$\text{H}_3\text{PO}_4$	min 85 %	Merck	100573
pH-Kalibrierlösungen pH 7	-	-	Carl-Roth®	P7132
pH-Kalibrierlösungen pH 9	-	-	Carl-Roth	P7142
Schwefelsäure 95-97%	$\text{H}_2\text{SO}_4$	95-97%	Merck	100731
Stickstoff 5.0	$\text{N}_2$	≥ 99,99%	Air Liquide	300 bar/B50
Wasserstoff 5.0	$\text{H}_2$	≥ 99,99%	Air Liquide	300 bar/12xB50

### 9.3 Exemplarischer Verlauf einer Kultivierung in Rollrandflaschen

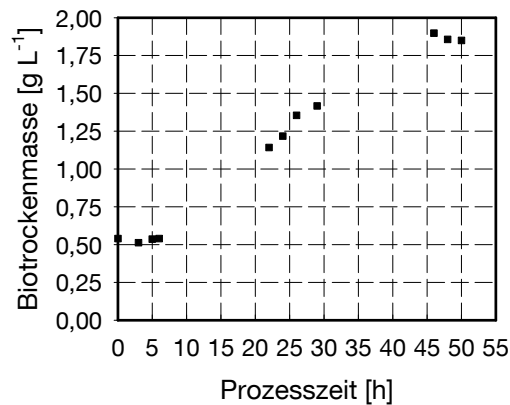


Abb. 9.1 Exemplarischer Wachstumsverlauf der heterotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* in Rollrandflaschen zur Herstellung eines Inokkulum für Kultivierungen im 200 mL-Maßstab (35,3 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration, 5 g L<sup>-1</sup> Fruktose)

### 9.4 Pumpenkennlinie der Mehrkanalpumpe 205U für die Zudosierung der Nitratlösung bei Untersuchungen im Zulaufverfahren

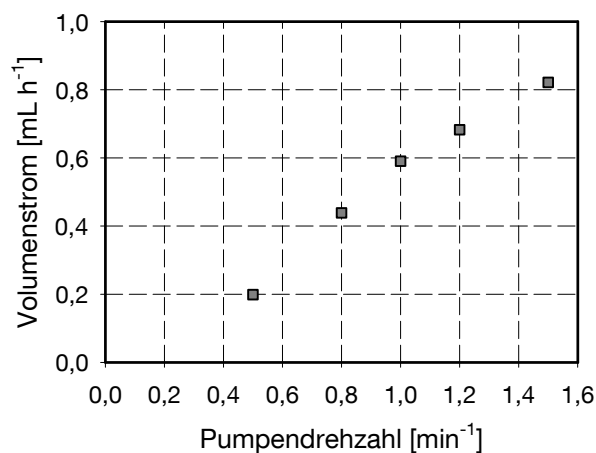
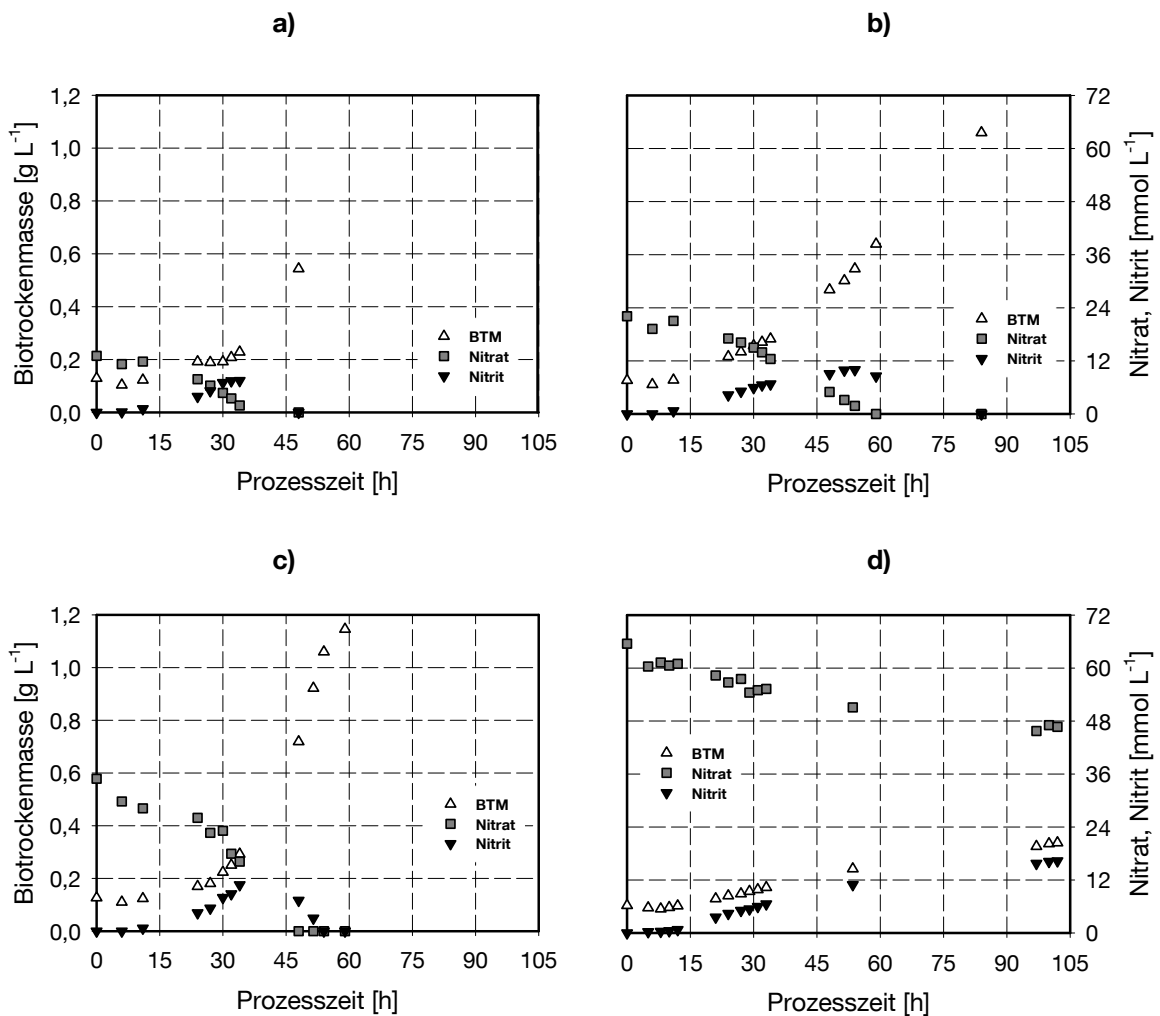


Abb. 9.2 Abhängigkeit des geförderten Volumenstroms von der Pumpendrehzahl der Mehrkanalpumpe 205U. Gefördertes Medium 1 mol L<sup>-1</sup> Natriumnitratlösung. Pumpenschlauch-Innendurchmesser 0,5 mm.



## 9.5 Wachstumsverläufe sowie Verläufe der Nitrat- und Nitritkonzentration der in Tabelle 5.1 zusammengefassten Untersuchungen zum Einfluss der Nitrat- anfangskonzentration auf die heterotrophe Nitratatmung



**Abb. 9.3** Wachstumsverlauf sowie Verlauf der Nitrat- & Nitritkonzentration von *Cupriavidus necator* bei variierender Nitratanfängskonzentration. a) 12,4 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration. b) 22,1 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration. c) 34,7 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration. d) 61,5 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration

## 9.6 Verlauf der Ammoniumkonzentration während der unter 5.1.6 dargestellten heterotrophen Nitratatmung im Rührkesselreaktor

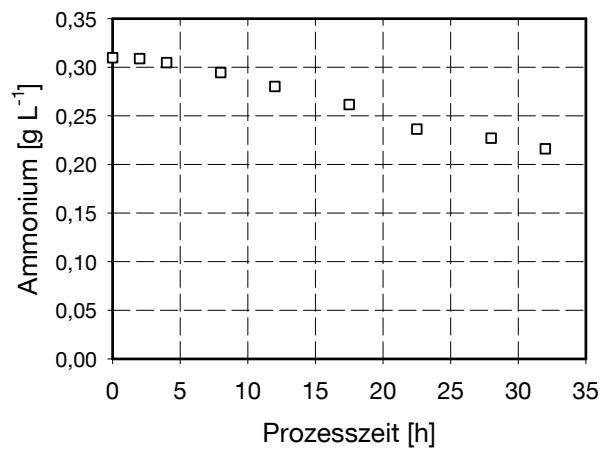


Abb. 9.4 Verlauf der Ammoniumkonzentration während der heterotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* im Rührkesselreaktor (34,88 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration, 5 g L<sup>-1</sup> Fruktose).

## 9.7 Wachstumsverläufe sowie Verläufe der Nitrat- und Nitritkonzentration der in Tabelle 5.3 zusammengefassten Untersuchungen zur Bestimmung des pH-Optimums der chemolithoautotrophen Nitratatmung

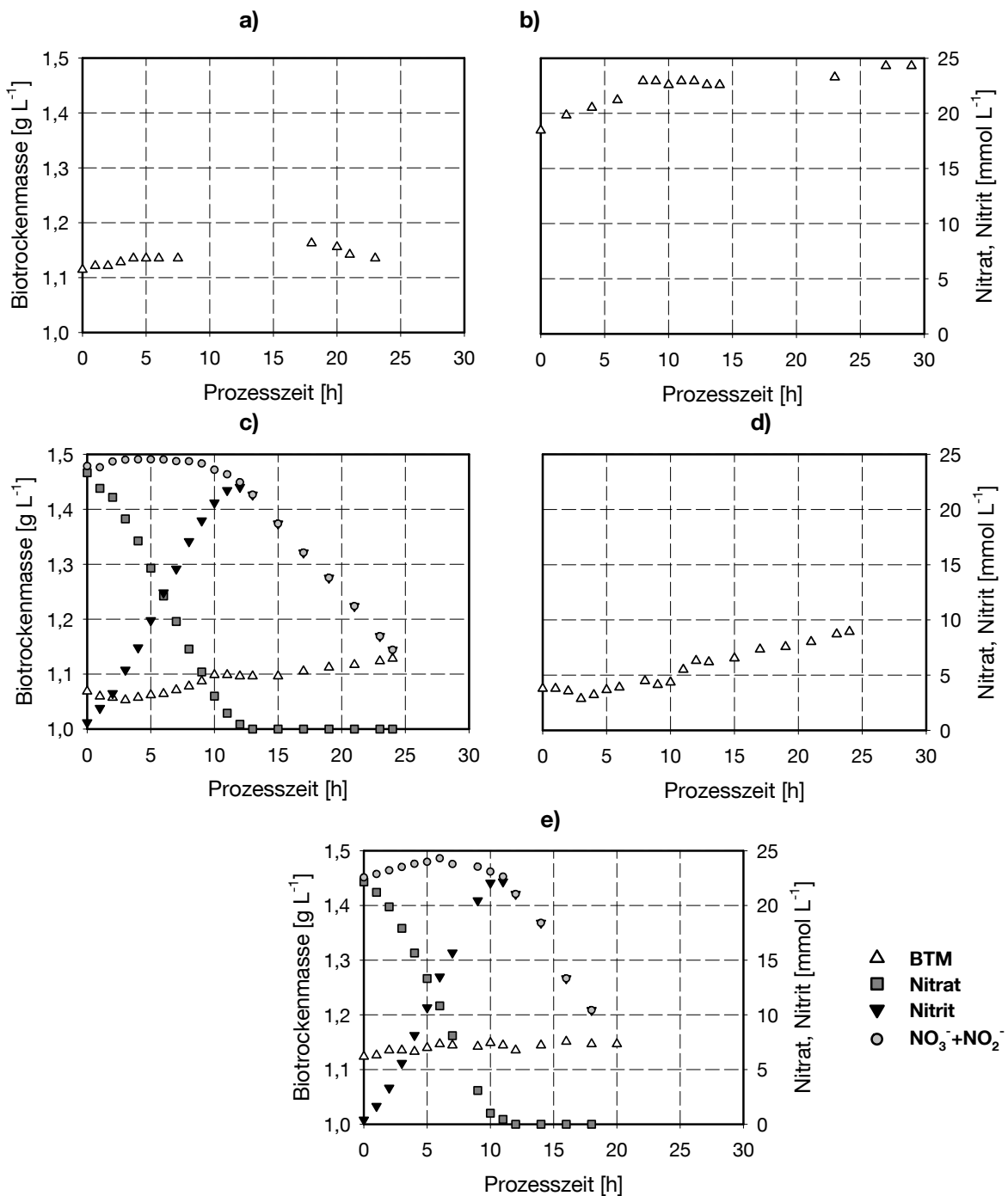


Abb. 9.5 Wachstumsverlauf sowie Verlauf der Nitrat- und Nitritkonzentration während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bei variierendem pH. a) pH 7,5. b) pH 7,4. c) pH 7,2. d) pH 7,0. e) pH 6,8

## 9.8 Verlauf der Molenströme von Wasserstoff und Kohlendioxid im Abgas der in Tabelle 5.3 zusammengefassten Untersuchungen zur Bestimmung des pH-Optimums der chemolithoautotrophen Nitratatmung

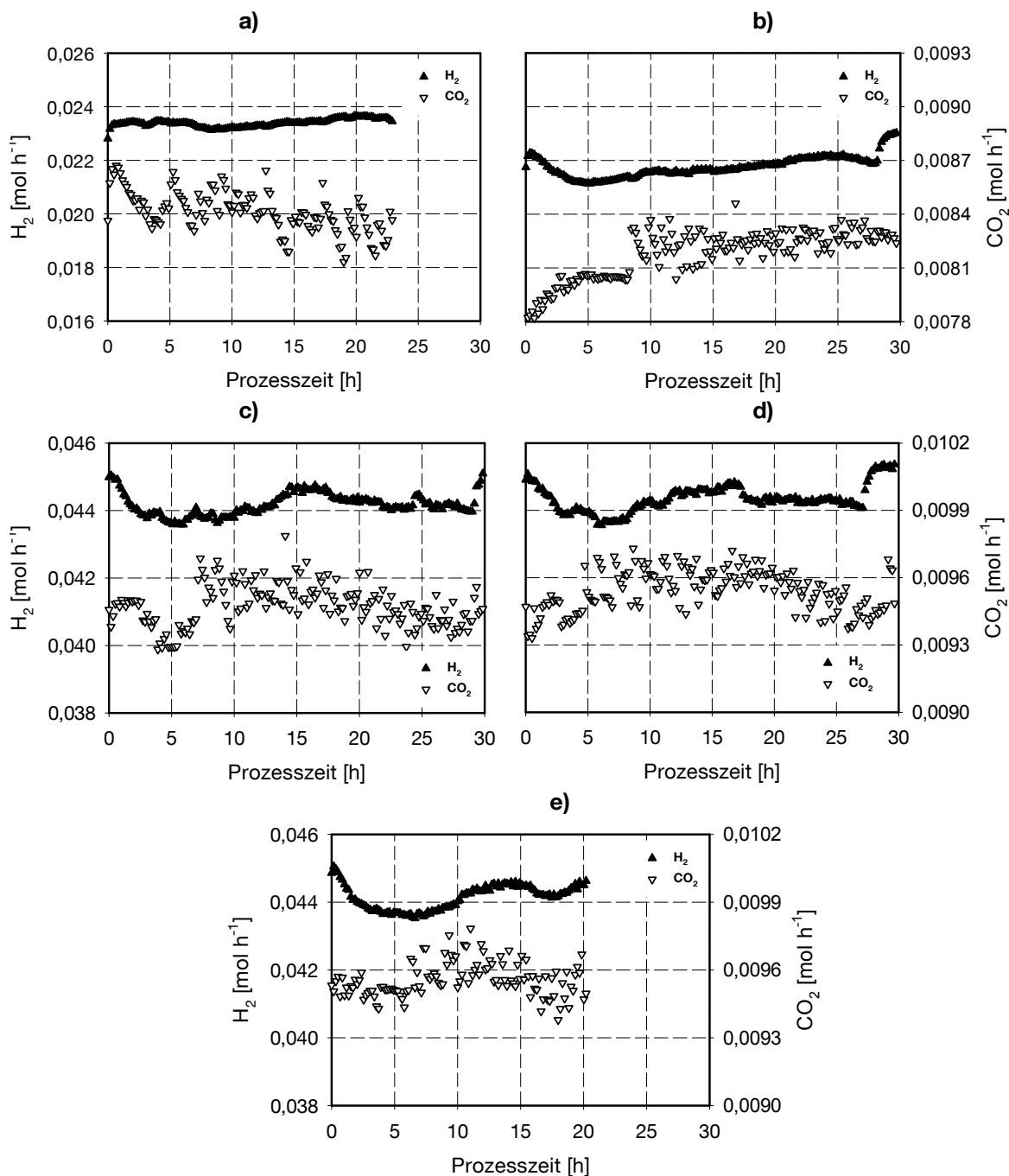


Abb. 9.6 Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bei variierendem pH. a) pH 7,5. b) pH 7,4. c) pH 7,2. d) pH 7,0. e) pH 6,8

## 9.9 Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL6

Tab. 9.2 Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL6

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	9,46·10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2,84·10 <sup>-5</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,84·10 <sup>-4</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,89·10 <sup>-4</sup>
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	9,46·10 <sup>-6</sup>
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,89·10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,84·10 <sup>-5</sup>

## 9.10 Verlauf der Molenströme von Wasserstoff und Kohlendioxid im Abgas der in Abschnitt 5.2.3 dargestellten Untersuchung zum Einfluss der eingesetzten Spurenelementlösung, sowie der Eisenquelle auf die chemolithoautotrophe Nitratatmung

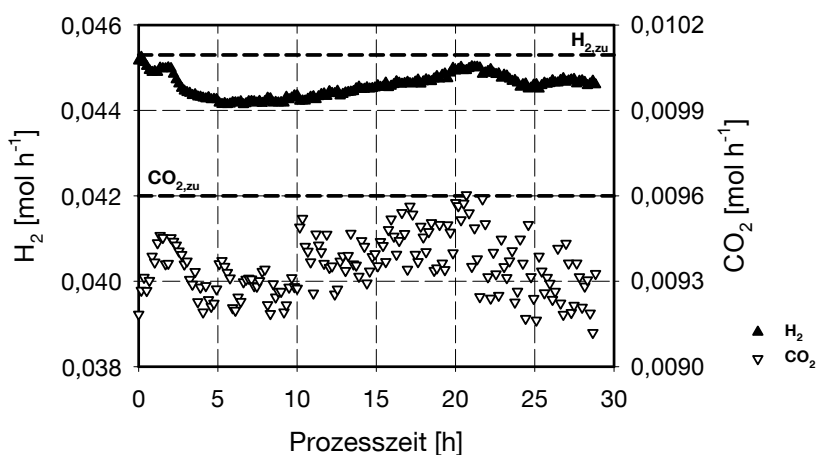
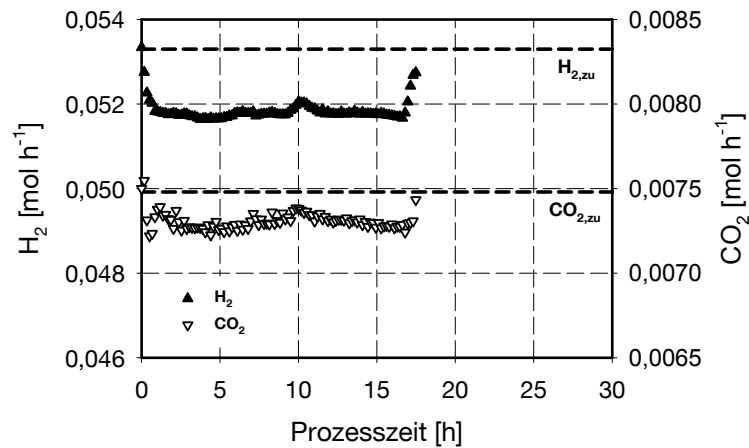


Abb. 9.7 Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bei der Untersuchung zum Einfluss der eingesetzten Spurenelementlösung sowie der Eisenquelle (Nitratanfängskonzentration 22,5 mmol L<sup>-1</sup>).

### 9.11 Verlauf der Molenströme von Wasserstoff und Kohlendioxid im Abgas der in Abschnitt 5.3.2 dargestellten Untersuchung zur Identifikation der formalkinetischen Parameter im Satzverfahren

a)



b)

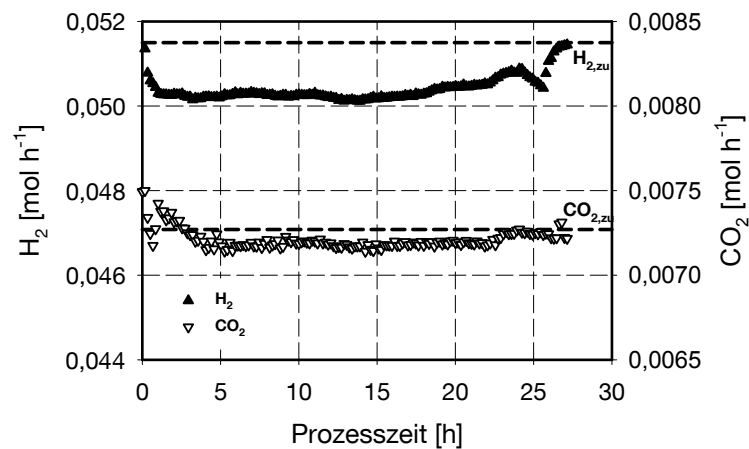
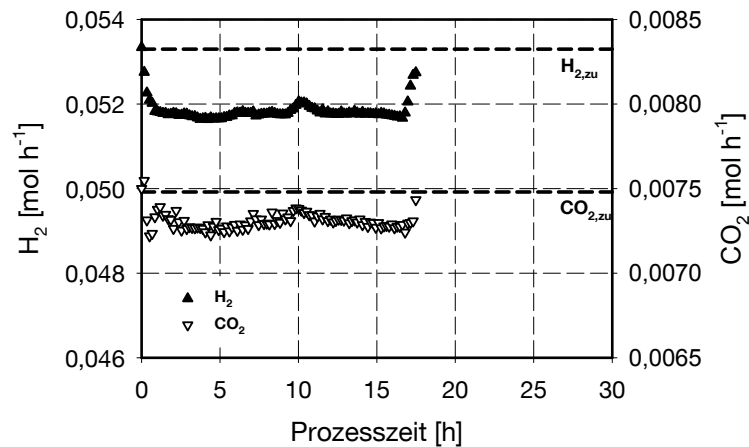


Abb. 9.8 Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bei den Untersuchungen zur Identifikation der formalkinetischen Parameter im Satzverfahren. a) 12 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration. b) 23,5 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration

## 9.12 Verlauf der Molenströme von Wasserstoff und Kohlendioxid im Abgas der in Abschnitt 5.3.3 dargestellten Untersuchung zur Validierung der identifizierten formalkinetischen Parameter im Satzverfahren

a)



b)

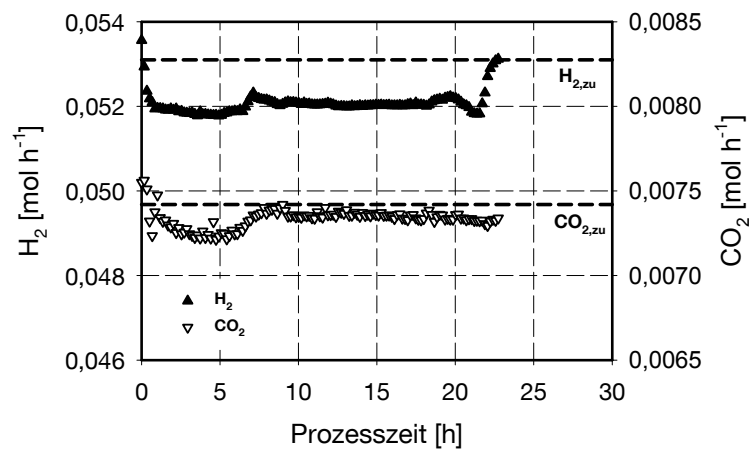
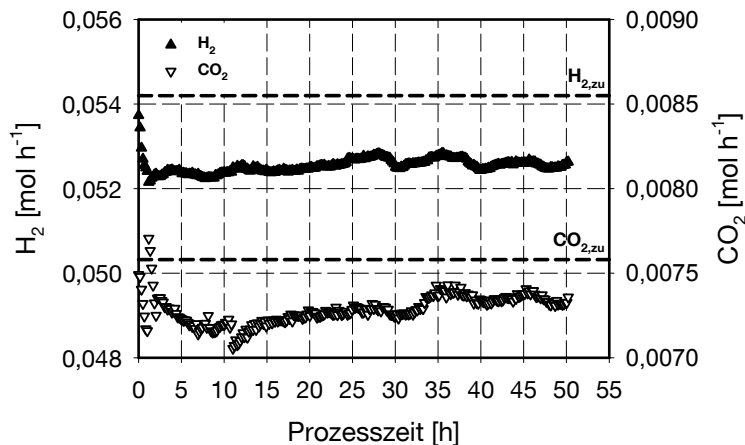


Abb. 9.9 Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bei den Untersuchungen zur Validierung der identifizierten formalkinetischen Parameter im Satzverfahren. a) 14 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration. b) 19 mmol L<sup>-1</sup> Nitratanfängskonzentration

### 9.13 Verlauf der Molenströme von Wasserstoff und Kohlendioxid im Abgas der in Abschnitt 5.3.2 dargestellten Untersuchung zur Identifikation der formalkinetischen Parameter im Zulaufverfahren

a)



b)

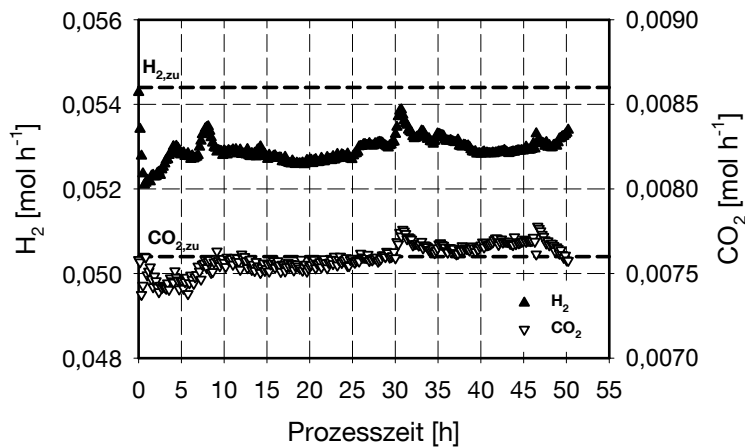
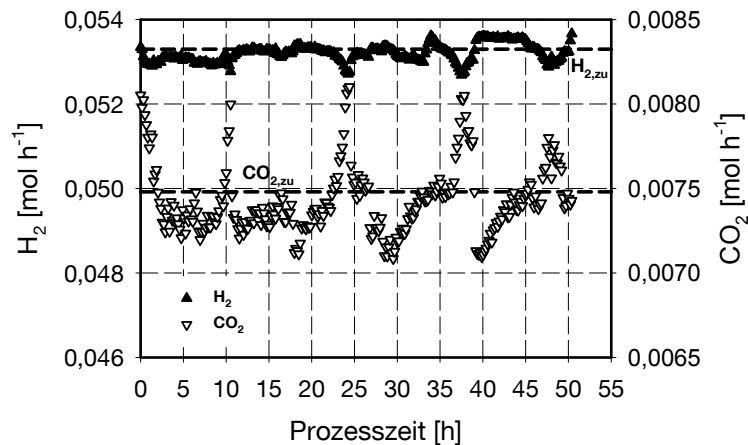


Abb. 9.10 Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bei den Untersuchungen zur Identifikation der formalkinetischen Parameter im Zulaufverfahren a) Zuflussrate  $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ; b) Zuflussrate  $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

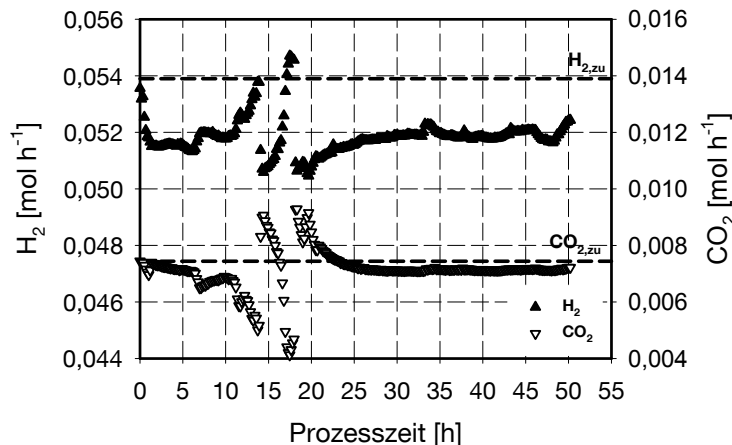


### 9.14 Verlauf der Molenströme von Wasserstoff und Kohlendioxid im Abgas der in Abschnitt 5.3.3 dargestellten Untersuchung zur Validierung der identifizierten formalkinetischen Parameter im Zulaufverfahren

a)



b)



c)

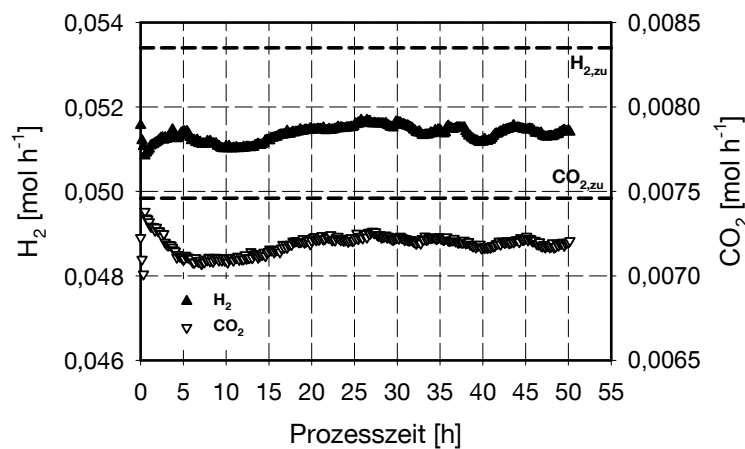


Abb. 9.11 Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bei den Untersuchungen zur Validierung der identifizierten formalkinetischen Parameter a) Zuflussrate 12  $mmol L^{-1} d^{-1}$ ; b) Zuflussrate 30  $mmol L^{-1} d^{-1}$ . c) Zuflussrate 40  $mmol L^{-1} d^{-1}$

### 9.15 Verlauf der Molenströme von Wasserstoff und Kohlendioxid im Abgas der in Abschnitt 5.5 beschriebenen Untersuchung zur PHB-Akkumulation von *Cupriavidus necator* unter chemolithoautotrophen Bedingungen bei simultaner Nitratatmung

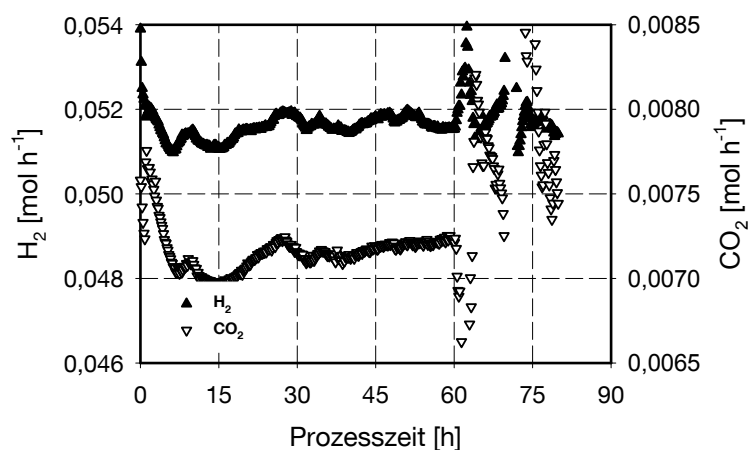


Abb. 9.12 Verlauf des Wasserstoff- sowie Kohlendioxidmolenstromes während der chemolithoautotrophen Nitratatmung von *Cupriavidus necator* bei der Untersuchung zur PHB-Akkumulation mit verringerter Ammoniumkonzentration (0,09 g L<sup>-1</sup>) im Medium (Zuflussrate 30 mmol L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)