

**Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung  
von Propylenoxid und Phenol mittels  
Ganzzellbiokatalyse unter Nutzung der  
Methan-Monooxygenase des Organismus  
*Methylosinus trichosporium* OB3b**

von der Fakultät 4 Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte  
Abhandlung

vorgelegt von

Ilka Madeleine Derwenskus geb. Mühlemeier

aus Ludwigsburg

Hauptberichter: Prof. Dr. Thomas Hirth

1. Mitberichter: Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Mitberichter: apl. Prof. Dr. Günter Tovar

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2022

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie der Universität Stuttgart

2022



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst, lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel, verfasst habe.

Ilka Derwenskus, Stuttgart den 21.09.2021



Diese Arbeit wurde im Rahmen des durch das Ministerium für Wissenschaft und Kunst (MWK), Baden-Württemberg geförderten Forschungsprojektes „Entwicklung eines Bioreaktors zur stofflichen Verwertung von Biogas“ (7533-10-5-/103/1) und als Teil des begleitenden Graduiertenprogramms „BBW ForWerts“ angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in verschiedenen wissenschaftlichen Zeitschriften (sog. „peer-reviewed journals“) veröffentlicht:

#### Publikation

Mühlemeier, Ilka Madeleine, Speight, Robert, und Strong, Peter James. „Biogas, Bioreactors and Bacterial Methane Oxidation“. In *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*, herausgegeben von Marina G. Kalyuzhnaya und Xin-Hui Xing, 213–35. Cham: Springer International Publishing, 2018. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5_14).



## Kurzfassung

Die wichtigen chemischen Synthesebausteine Propylenoxid und Phenol werden derzeit großtechnisch in mehrstufigen umweltbelastenden Prozessen hergestellt. Bei der Propylenoxidsynthese entstehen über das vorwiegend genutzte Chlorhydrinverfahren 2,1 t Calciumchlorid und 2,2 t Natriumchlorid pro Tonne Propylenoxid, dessen Entsorgung das Abwasser stark belastet. Phenol wird gegenwertig im industriellen Maßstab über die Hock'sche Phenolsynthese hergestellt, wobei als Nebenprodukt zwangsläufig große Mengen Aceton anfallen. Da für Aceton nur ein sehr geringer Marktpreis erzielt werden kann, wird dadurch die Gesamtwirtschaftlichkeit des Prozesses deutlich gemindert. Der notwendige Energieeintrag ist bei beiden chemischen Herstellungsverfahren wegen der hohen erforderlichen Temperaturen und des hohen erforderlichen Druckes erheblich (Bernhard et al., 2017; Jeffrey S. Plotkin, 2021; Schmidt, 2005; Winnacker, 2004). Aus den genannten Gründen wird derzeit intensiv an der Entwicklung nachhaltiger Verfahren zur Produktion beider Wertstoffe gearbeitet.

Ein umweltschonendes, biotechnologisches Verfahren zur Synthese beider Substanzen stellt die Biokatalyse ausgehend von den Edukten Propylen und Benzol mit Hilfe des Enzyms Methan-Monooxygenase (MMO) dar. Das Enzym wird auf natürliche Weise durch aerobe, methanotrophe Bakterien (MOB), wie z.B. *Methylosinus trichosporium* OB3b, gebildet. Im Metabolismus der MOB liegt das Enzym abhängig von den zugrundeliegenden Kulturbedingungen in löslicher (sMMO) oder gebundener Form (pMMO) vor. Im natürlichen Stoffwechsel ist dieses Enzym für die Oxidation von Methan zu Methanol verantwortlich. Es kann aber aufgrund seines breiten Substratspektrums in Abhängigkeit vom eingesetzten Ausgangsstoff auch zur Oxidation anderer n-Alkane, n-Alkene (z.B. Propylen) und von aromatischen Kohlenwasserstoffen (z.B. Benzol) eingesetzt werden.

Zur fermentativen Herstellung des Ganzzellbiokatalysators und zur Selektivoxidation von Propylen und Benzol wurde der Organismus *M. trichosporium* OB3b in dieser Arbeit sowohl im Rührkesselreaktor als auch erstmals in zwei unterschiedlichen Membranbioreaktoren eingesetzt.

Dabei wurden zunächst grundlegende Untersuchungen zur Erhöhung der Biomasseausbeute durch eine CO<sub>2</sub>-induzierte Verkürzung der Lag-Phase im Rührkesselreaktor durchgeführt. Anschließend erfolgte die Etablierung der Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b in den ausgewählten Membranbioreaktoren. Obwohl die Verwendung von Membranbioreaktoren zur Fermentation aerober, methanotropher Bakterien aufgrund des geringen Leistungseintrags sowie

der Möglichkeit zur getrennten, blasenfreien Begasung mit Methan- und Sauerstoff einen erheblichen sicherheitstechnischen Vorteil gegenüber Rührkesselreaktoren bieten können, existieren hierzu nach Kenntnisstand der Autorin bisher keine publizierten Daten. Durch die getrennte blasenfreie Begasung können zudem potentiell explosive Gasgemische vermieden werden, und eine bessere Substratverfügbarkeit durch die blasenfreie Begasung ist zu erwarten.

Die Ergebnisse der grundlegenden Versuche im Doppelmembranbioreaktor (DMBR) zeigen erstmals, dass eine Fermentation des Organismus *M. trichosporium* OB3b im DMBR bis zu einer Biomassekonzentration von  $0,84 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1}$  möglich ist. Die Biomassekonzentration liegt damit derzeit noch deutlich unter der im Rührkesselreaktor erreichten maximalen Biomassekonzentration von  $15,3 \pm 1,7 \text{ g L}^{-1}$ . Die Untersuchungen ermöglichen eine erste Orientierung um zukünftig sowohl die Produktivität als auch die Biomassekonzentration durch Optimierung der Prozessparameter, wie z.B. der Pumpgeschwindigkeit, der Erhöhung des Gasdruckes sowie einer Vergrößerung des Verhältnisses von Membranoberfläche zum Volumen der flüssigen Phase, zu steigern.

Auf Basis des Ganzzellbiokatalysators *M. trichosporium* OB3b wurde nachfolgend ein mehrstufiger Prozess zur Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid und von Benzol zu Phenol mit sequenzieller Cofaktorregeneration im Rührkesselreaktor entwickelt. Insbesondere für die Biokatalyse von Benzol zu Phenol mittels MMO wurde bisher lediglich die prinzipielle Machbarkeit publiziert. Es war daher notwendig, zunächst essentielle Parameter wie die Produkttoxizität und die zur Biokatalyse verwendete Biomassekonzentration hinsichtlich deren Einflusses auf die Reaktionskinetik zu untersuchen. Aufbauend auf den erzielten Ergebnissen konnte anschließend eine Strategie zur sequenziellen Cofaktor-Regeneration im Hinblick auf eine mehrfache Oxidationsreaktion evaluiert und optimiert werden. Zur Analyse beider enzymatischer Reaktionen wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein neuartiges Echtzeit-Membraneinlass-Massenspektrometer eingesetzt, welches die simultane Aufzeichnung einer Edukt- und Produktkinetik in der Flüssigphase in Echtzeit ermöglicht.

Um einen stabilen Prozess über einen möglichst langen Zeitraum aufrecht erhalten zu können, wurden experimentelle Daten zur Produkttoxizität von Propylenoxid und Phenol gegenüber *M. trichosporium* OB3b ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass Propylenoxid bei kurzzeitiger Exposition (30 min) bis zu einer Konzentration von 100 mM keinen signifikanten, toxischen Effekt auf den Ganzzellbiokatalysator aufweist. Phenol hingegen zeigte schon ab einer Konzentration von 50 mM eine wachstumsinhibierende Wirkung. Eine Langzeitexposition, die über die gesamte Dauer der Kultivierung erfolgte, mit beiden Substanzen führte – selbst bei

einer geringen Konzentration von 13 mM Propylenoxid bzw. von 30 mM Phenol – zur nahezu vollständigen Inhibition des Wachstums von *M. trichosporium* OB3b. Folglich ist ein kontinuierlicher Austrag beider Produkte aus dem Reaktor im Hinblick auf einen semi-kontinuierlichen Herstellungsprozess auf Basis des Ganzzellbiokatalysators zwingend erforderlich.

Dies konnte durch die Etablierung von geeigneten sequenziellen Regenerationsintervallen mit Methan und Sauerstoff erreicht werden. Gleichzeitig wurden dadurch auch die Cofaktoren des Ganzzellbiokatalysators regeneriert. Hierdurch wurde eine mehrfache Wiederverwendung des Ganzzellbiokatalysators für beide Oxidationsreaktionen ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit konnten dadurch mehr als drei Oxidationszyklen erfolgreich durchgeführt werden. Die Ergebnisse lassen jedoch erwarten, dass die Produktausbeute durch die Einführung zusätzlicher Regenerations- und Oxidationsphasen zukünftig weiter erhöht werden kann. Die zuvor genannten Erkenntnisse, in Verbindung mit dem Einsatz der in dieser Arbeit erstmals untersuchten prozessbegleitenden massenspektroskopischen Echtzeitanalytik, können somit zukünftig die Grundlage für eine mehrstufige semi-kontinuierliche Oxidation von Benzol zu Phenol und Propylen zu Propylenoxid auf Basis von *M. trichosporium* OB3b bilden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in einem neu entwickelten Doppelmembranbioreaktor bei kontinuierlicher Prozessführung die biokatalytische Oxidation sowohl von Propylen als auch von Benzol über einen Zeitraum von mindestens 6 h durchgeführt werden kann. Durch die Einführung einer kontinuierlichen Produktabtrennung sollte es daher möglich sein, die Wirtschaftlichkeit dieses Prozesses weiter zu verbessern. Aufgrund des breiten Substratspektrums der Methan-Monooxygenase eröffnen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten und technischen Grundlagen die Möglichkeit, zukünftig weitere Verfahren zu entwickeln, welche zur umweltverträglichen biokatalytischen Oxidation zahlreicher wichtiger chemischer Synthesebausteine, wie z.B. Ethylen zu Ethylenoxid, dienen können.

## Abstract

The chemicals propylene oxide and phenol are currently produced in a large scale in a multi-stage process with negative impact on the environment. During propylene oxide synthesis, the predominantly used chlorohydrin process produces 2.1 t of calcium chloride and 2.2 t of sodium chloride per metric ton of propylene oxide. Both byproducts have to be disposed causing heavily polluted wastewater. Phenol is currently produced in industrial scale by the Hock process, which inevitably produces large quantities of acetone as a by-product. Since only a very low market price can be obtained for acetone, the overall economic efficiency of the process is greatly reduced. The energy input required for both chemical production processes is considerable due to the high temperatures and pressure required (Bernhard et al., 2017; Jeffrey S. Plotkin, 2021; Schmidt, 2005; Winnacker, 2004). For this reasons the development of sustainable processes for the production of both valuable substances is currently in scope of many research projects.

An environmentally friendly, biotechnological process for the synthesis of both substances starting from the substrates propylene and benzene is the enzymatic biocatalysis using methanomonooxygenase (MMO). This enzyme is formed naturally by aerobic, methanotrophic bacteria (MOB), such as *Methylosinus trichosporium* OB3b. In the metabolism of MOB, the enzyme is present in soluble (sMMO) or bound (pMMO) form depending on the underlying culture conditions. In natural metabolism, this enzyme is responsible for the oxidation of methane to methanol. However, due to its broad substrate spectrum, it can also be used for the oxidation of other n-alkanes, n-alkenes (e.g. propylene) and ali-cyclic hydrocarbons (e.g. benzene).

For the fermentative production of the whole-cell biocatalyst and the selective oxidation of propylene as well as for benzene, the organism *M. trichosporium* OB3b was used in this study both in the stirred tank reactor and, for the first time, in two different membrane bioreactors.

For the production of the whole-cell biocatalyst, basic investigations were first carried out in the stirred tank reactor to increase the biomass yield by shortening the lag phase by supplying additional CO<sub>2</sub>.

Furthermore, the cultivation of *M. trichosporium* OB3b in membrane bioreactors was established. Although the use of membrane bioreactors for the fermentation of aerobic, methanotrophic bacteria can offer a considerable safety advantage over stirred tank reactors due to the low power input and the possibility of separate, bubble-free gassing with methane and oxygen, to the author's knowledge there are no published data available yet. The separate, bubble-

## ABSTRACT

---

free gassing avoids potentially explosive gas mixtures and can potentially enable a better substrate availability.

The results of the basic experiments in the double membrane bioreactor (DMBR) show for the first time that fermentation of the organism *M. trichosporium* OB3b in the DMBR is possible up to a biomass concentration of  $0.84 \pm 0.16 \text{ g L}^{-1}$ . The biomass concentration is thus currently still significantly below the maximum biomass concentration of  $15.3 \pm 1.7 \text{ g L}^{-1}$  achieved in the stirred tank reactor. The investigations provide an initial orientation for increasing both productivity and biomass concentration in the future by optimizing the process parameters, such as the pumping speed, increasing the gas pressure and increasing the ratio of membrane surface to liquid phase volume.

Based on the *M. trichosporium* OB3b whole-cell biocatalyst, a multistage process for the selective oxidation of propylene to propylene oxide and of benzene to phenol with sequential regeneration was developed in a stirred tank reactor. Since for the biocatalysis of benzene to phenol using MMO, only the basic feasibility has been published so far. Thus, it was necessary first to investigate essential operating parameters such as product toxicity and the biomass concentration used for biocatalysis with regard to their influence on the reaction kinetics. Based on the results obtained, a strategy for sequential cofactor regeneration was evaluated and optimized with respect to a multiple oxidation reaction. To investigate both reactions, a novel real-time membrane inlet mass spectrometer was used for the first time, which allowed the simultaneous recording of reactant and product kinetics in the liquid phase in real time.

In order to maintain a stable process over a long period of time, experimental data were collected on the product toxicity of propylene oxide and phenol to *M. trichosporium* OB3b. The results showed that propylene oxide had no significant toxic effect on the whole-cell biocatalyst at short-term exposure (30 min) up to a concentration of 100 mM. Phenol, on the other hand, showed a growth inhibitory effect at concentrations as low as 50 mM. A long-term exposure, which took place over the entire duration of cultivation, with both substances - even at a low concentration of 13 mM propylene oxide or of 30 mM phenol - led to the almost complete inhibition of the growth of *M. trichosporium* OB3b. Therefore, a continuous removal of both products is mandatory with respect to a semi-continuous production process.

Based on the knowledge gained, suitable sequential regeneration intervals with methane and oxygen were established to remove the products from the reaction medium and to regenerate the cofactors of the MMO over multiple oxidation cycles. This allowed multiple reuse of the whole cell biocatalyst for both propylene to propylene oxide and benzene to phenol oxidation

## ABSTRACT

---

reactions. Thus, at least three oxidation cycles for each substrate could be successfully performed in this work. By introducing additional regeneration and oxidation phases, it can be expected that the product yield could be further increased. The aforementioned findings, in conjunction with the use of in-process real-time mass spectroscopic analysis, which was investigated for the first time in this work, may thus in future form the basis for a multi-stage semi-continuous oxidation of benzene to phenol and propylene to propylene oxide based on *M. trichosporium* OB3b.

Within the scope of this work, it was shown that the biocatalytic oxidation of both propylene and benzene can be carried out over a period of at least 6 h in the newly developed double-membrane bioreactor in a continuous process. By introducing continuous product separation, it should be possible to further improve the economic efficiency of this process. Due to the broad substrate spectrum of the methane monooxygenase, the data and technical principles obtained in this work open up the possibility of developing further processes in the future, which can be used for the environmentally compatible biocatalytic oxidation of numerous important chemical synthesis building blocks, such as ethylene to ethylene oxide.

## Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich aussprechen an...

... Herrn Prof. Dr. Thomas Hirth für das entgegengebrachte Vertrauen, das stetige Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die vielen hilfreichen fachlichen Diskussionen und Treffen. Insbesondere möchte ich mich für die fortwährende Unterstützung nach dem Wechsel an das KIT bedanken.

... Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch (Universität Halle) und Herrn apl. Prof. Dr. Günter Tovar für die konstruktiven Gespräche zu dieser Arbeit und die Bereitschaft zur Übernahme der Gutachten.

... Dr. Matthias Stier für die inhaltliche Ausrichtung und die thematische Eingrenzung. Durch sein großes Engagement, seine fachliche Unterstützung war es mir möglich, diese Arbeit zielgerichtet durchzuführen.

... Dr. Franziska Seifert und allen beteiligten des Projektes ECOX II für die Einarbeitung in das neue Themengebiet und die gute Zusammenarbeit.

... Dr. James Strong, der mir ein meinen Forschungsaufenthalt an der University of Queensland in Brisbane (Australien) ermöglichte und mich stets bei der Erstellung von Publikationen unterstützte und bei fachlichen Fragen zur Verfügung stand.

... alle Studenten, deren Arbeiten ich im Laufe meiner Dissertation betreuen durfte, Ervin Sivic, Lukas Maier, Bernd Eppinger, Michael Kommander, Lorena Rincón Rincón, Gerhard Brebeck, Mykhailo Reidman, Sarah Uhl, Soniya Lal und Sandra Lichtenberger die die Untersuchungen im Labor, stets mit Motivation und Eigeninitiative durchgeführt haben.

... die Mitarbeiter des Innovationsfelds Funktionelle Inhaltsstoffe und des Innovationsfelds Wasser des Fraunhofer IGB insbesondere Hedwig Pilgram, Martina Wanner, Gerhard Gottschling, Lukas Kriem und Bryan Lotz für das motivierende und angenehme Arbeitsklima.

... Meinen Schwestern Swantje, Meike und Anke sowie ihren Partnern, meinen Eltern Rita und Jörg sowie meinen Schwiegereltern Karin und Karl-Heinz, meinem Mann Felix und unserer Tochter Palina, die mich auch in schwierigen Zeiten unterstützten und immer wieder aufheitert haben. Dies war stets ein großer Rückhalt für mich.

## Inhaltsverzeichnis

<i>Kurzfassung</i>	<i>I</i>
<i>Abstract</i>	<i>IV</i>
<i>Danksagung</i>	<i>VII</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>XI</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>XIII</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>XVI</i>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Ausgangssituation</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Zielsetzung</b>	<b>3</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Herstellverfahren für Propylenoxid und Phenol im industriellen Maßstab</b>	<b>6</b>
2.1.1 Oxidation von Propylen zu Propylenoxid	6
2.1.2 Oxidation von Benzol zu Phenol	9
2.1.3 Oxidation von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol	10
<b>2.2 Aerobe, methanotrophe Bakterien</b>	<b>10</b>
<b>2.3 <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b</b>	<b>12</b>
<b>2.4 Eigenschaften der Methan-Monooxygenase</b>	<b>14</b>
2.4.1 Membrangebundene Methan-Monooxygenase für die Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid	15
2.4.2 Lösliche Methan-Monooxygenase für die Selektivoxidation von Benzol zu Phenol	16
2.4.3 Strategien zur Kofaktor-Regeneration während der Oxidation von Benzol und Propylen	17
<b>3 Stand der Technik</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Reaktorkonzepte für die Fermentation aerober, methano-tropher Bakterien</b>	<b>20</b>
3.1.1 Kontinuierlicher Rührkesselreaktor	21
3.1.2 Blasensäulenreaktoren und Gaslift-Reaktoren	22
3.1.3 Membranbioreaktoren	24
3.1.4 Wirbelschicht- und Festbett-Reaktoren	27
<b>3.2 Membranen zur blasenfreien Begasung von Nährmedien mit Methan und Sauerstoff</b>	<b>28</b>
<b>4 Materialien und Methoden</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Membranscreening</b>	<b>30</b>

<b>4.2</b>	<b>Stammhaltung und Vorkulturen</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Zusammensetzung des Kultivierungsmediums</b>	<b>31</b>
<b>4.4</b>	<b>Verwendete Reaktortypen für die Fermentation von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b</b>	<b>32</b>
4.4.1	Kultivierung in Serumflaschen	32
4.4.2	Kultivierung im Schüttelkolben	32
4.4.3	Kultivierung im Rührkesselbioreaktor	33
4.4.4	Kultivierung im Hochzelldichtemembranbioreaktor	33
4.4.5	Kultivierung im neuartigen Doppelmembranbioreaktor	34
<b>4.5</b>	<b>Analytische Methoden</b>	<b>35</b>
4.5.1	Bestimmung der Biotrockenmasse	35
4.5.2	Quantifizierung der Formiatkonzentration mittels HPLC	35
4.5.3	Gaschromatographische Analyse (Mikro GC)	36
4.5.4	Quantifizierung leicht flüchtiger Substanzen mittels Echtzeit-Massenspektrometrie	36
<b>4.6</b>	<b>Untersuchungen zum Einfluss des CO<sub>2</sub>-Gehaltes auf die Fermentation</b>	<b>38</b>
<b>4.7</b>	<b>Untersuchungen zur Toxizität von Propylenoxid und Phenol auf <i>M. trichosporium</i> OB3b</b>	<b>38</b>
4.7.1	Wachstumsinhibierungstest mit kurzzeitiger Exposition	39
4.7.2	Wachstumsinhibierungstest mit Langzeitexposition	40
<b>4.8</b>	<b>Ganzzellbiokatalyse mit <i>M. trichosporium</i> OB3b</b>	<b>40</b>
4.8.1	Bestimmung einer geeigneten Biomassekonzentration für die Ganzzell-biokatalyse	40
4.8.2	Untersuchung eines einstufigen Prozesses zur Selektivoxidation von Propylen und Benzol ohne Regeneration des Ganzzellbiokatalysators	41
4.8.3	Untersuchung eines mehrstufigen Prozesses zur Selektivoxidation von Propylen und Benzol mit sequenzieller Regeneration des Ganzzellbiokatalysators	42
4.8.4	Versuche zur Ganzzellbiokatalyse im Doppelmembranbioreaktor	43
<b>4.9</b>	<b>Berechnung von Sekundärgrößen aus direkten Messwerten</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b><i>Ergebnisse und Diskussion</i></b>	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchung verschiedener Membranen für einen neu entwickelten Doppelmembranbioreaktor</b>	<b>46</b>
<b>5.2</b>	<b>Fermentation von <i>M. trichosporium</i> OB3b</b>	<b>49</b>
5.2.1	Kultivierung des Ganzzellbiokatalysators in ausgewählten Fermentationssystemen	50
5.2.2	Einfluss der Nährmedienzusammensetzung	54
5.2.3	Einfluss von CO <sub>2</sub> auf das Wachstumsverhalten in Serumflaschen	57
5.2.4	Einfluss von CO <sub>2</sub> auf das Wachstumsverhalten im Rührkesselreaktor	60
5.2.5	Gegenüberstellung ausgewählter Reaktorsysteme zur Herstellung des Ganzzellbiokatalysators	64
5.2.6	Zusammenfassung der Fermentationsergebnisse	67

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>5.3</b>	<b>Kontinuierliche Ganzzellbiokatalyse für die Oxidation von Propylen und Benzol</b>	<b>68</b>
5.3.1	Einfluss der Konzentration von Propylenoxid und Phenol auf die Wachstumskinetik von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b nach kurzzeitiger Exposition	70
5.3.2	Einfluss der Konzentration von Propylenoxid und Phenol auf die Wachstumskinetik von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b bei dauerhafter Exposition	72
5.3.3	Einfluss der Biomassekonzentration auf die Selektivoxidation von Propylen und Benzol	74
5.3.4	Untersuchungen zur Selektivoxidation ohne Regeneration im Rührkesselreaktor	76
5.3.5	Sequenzielle Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit intermittierenden Regenerationsphasen	78
5.3.6	Sequenzielle Selektivoxidation von Benzol zu Phenol mit intermittierenden Regenerationsphasen	88
5.3.7	Kontinuierliche Ganzzellbiokatalyse im Doppelmembranbioreaktor	94
5.3.8	Gegenüberstellung des Doppelmembranbioreaktors und des Rührkesselreaktors für die Ganzzellbiokatalyse	96
<b>6</b>	<b><i>Zusammenfassung und Ausblick</i></b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>117</b>
<b>8.1</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>117</b>
8.1.1	Geräteliste	117
8.1.2	Verwendete Chemikalien	118
8.1.3	Verwendete Verbrauchsmaterialien	120
8.1.4	Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums	121

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung	Einheit
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat	-
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	-
<b>BTM</b>	Biotrockenmasse	-
<b>C</b>	Elementarer Kohlenstoff	-
<b>CH<sub>4</sub></b>	Methan	-
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid	-
<b>C<sub>3</sub>H<sub>6</sub></b>	Propylen	-
<b>C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O</b>	Propylenoxid	-
<b>DMBR</b>	Doppelmembranbioreaktor	-
<b>FADH</b>	Formaldehyddehydrogenase	-
<b>FDA</b>	Formiatdehydrogenase	-
<b>FIA</b>	Fließinjektionsanalyse	-
<b>GC</b>	Gaschromatographie	-
<b>HDC</b>	<i>High density incubator</i>	-
<b>HPLC</b>	High-performance liquid chromatography	-
<b>HPPO</b>	Hydrogen peroxide to propylene oxide	-
<b>IGB</b>	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik	-
<b>k</b>	Kilo	-
<b>KIT</b>	Karlsruher Institut für Technologie	-
<b>M</b>	Molar	(Mol L <sup>-1</sup> )
<b><i>M. trichosporium</i></b>	<i>Methylosinus trichosporium</i>	-
<b>MDH</b>	Methanoldehydrogenase	-
<b>MS</b>	Massenspektrometer	-
<b>MBR</b>	Membranbioreaktor	-
<b>MMO</b>	Methan-Monooxygenase	-
<b>MMOB</b>	Methan-Monooxygenase Regulatorisches Protein	-
<b>MMOH</b>	Methan-Monooxygenase Hydroxylase	-
<b>MMOR</b>	Methan-Monooxygenase Reduktase	-
<b>MOB</b>	Aerobe, methanotrophe Bakterien	-
<b>n</b>	Anzahl biologischer Replikate	-

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Einheit</b>
<b>N</b>	Elementarer Stickstoff	-
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamidadenindinukleotid	-
<b>NADH</b>	Nicotinamidadenindinukleotid	-
<b>NADP</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	-
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid	-
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid	-
<b>n.b.</b>	Nicht bestimmt	-
<b>NMS</b>	Nitrate mineral salts	-
<b>OD<sub>600nm</sub></b>	Optische Dichte bei 600 nm	-
<b>pH</b>	<i>Potentia hydrogenii</i>	-
<b>pMMO</b>	Membrangebundene Methan-Monooxygenase	-
<b>PO</b>	Propylenoxid	-
<b>PTFE</b>	Polytetrafluorethylen	-
<b>P<sub>final</sub></b>	Erreichte Biomassekonzentration	g L <sup>-1</sup>
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute	-
<b>RuMP</b>	Ribulose-Monophosphat	-
<b>SEM</b>	<i>Secondary Electron Multiplier</i>	-
<b>sMMO</b>	Lösliche Methan-Monooxygenase	-
<b>t</b>	Zeit (z.B. Kultivierungsdauer)	(d); (h); (min)
<b>T</b>	Temperatur	(°C)
<b>TS</b>	Trockensubstanz	-
<b>UV</b>	Ultraviolett	-
<b>V</b>	Volumen	(L); (ml)
<b>(v/v)</b>	Verhältnis bezogen auf das Volumen	(%)
<b>(w/w)</b>	Verhältnis bezogen auf das Gewicht	-
<b>μ<sub>x</sub></b>	Spezifische Wachstumsrate	(h <sup>-1</sup> )

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gesamtprozesses für die direkte Oxidation von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol. ....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Epoxidationsreaktion von Propylen zu Propylenoxid.....	6
Abbildung 3: Herstellungsverfahren für Propylenoxid und ihr Marktanteil gezeigt am Beispiel der Jahre 2010 und 2015.....	7
Abbildung 4: Hauptroute des Chlorhydrin-Verfahrens.....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Oxidationsreaktion von Benzol zu Phenol. ....	9
Abbildung 6: Schematisierte Darstellung der Formaldehydassimilation.....	11
Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahme von <i>Methylophilus trichosporium</i> OB3b im Transmissionselektronenmikroskop. ....	12
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Serinwegs. ....	13
Abbildung 9: Kristallstruktur der pMMO aus dem Organismus <i>M. trichosporium</i> OB3b .....	16
Abbildung 10: Schematische Anordnung der sMMO-Untereinheiten.....	17
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Methan-Metabolismus mit den zugehörigen Enzymen. ....	18
Abbildung 12: Übersicht über wesentliche Reaktortypen zur Kultivierung von MOB. ....	21
Abbildung 13: Gezeigt ist der U-Loop-Reaktor zur Gasfermentation. ....	23
Abbildung 14: Aufnahmen der HDC10-Membranbioreaktoren der Firma CellIDEG.....	25
Abbildung 15: Doppelmembranbioreaktor für die Kultivierung von MOB. ....	26
Abbildung 16: Strukturformel von Polydimethylsiloxan. ....	28
Abbildung 17: Membranreaktor zu blasenfreien Begasung von Zellkulturen. ....	30
Abbildung 18: Darstellung des neu entwickelten DMBR.....	34
Abbildung 19: Fließbild des Aufbaus für die Fermentation von <i>M. trichosporium</i> OB3b im DMBR. ....	35
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Flüssigkeit und der Gase durch den Membraneinlass. ....	37
Abbildung 21: Schematischer Versuchsaufbau für die Echtzeit-Messung leicht flüchtiger Substanzen mit dem Massenspektrometer.....	37
Abbildung 22: Schematische Darstellung des Wachstumshinhibitionstests nach 30-minütiger Exposition. ....	39
Abbildung 23: Schematische Darstellung des Wachstumsinhibitionstests bei dauerhafter Exposition der Zellen mit Phenol und Propylenoxid.....	40
Abbildung 24: Darstellung der drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Regenerationsstrategien. ....	42
Abbildung 25: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur semikontinuierlichen Selektivoxidation im 1 L Rührkesselreaktor. ....	43

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 26: Fließbild für die Ganzzellbiokatalyse am Beispiel von Propylen zu Propylenoxid.....	44
Abbildung 27: Konzentrationsprofil von Gasen durch eine Membran. ....	47
Abbildung 28: Konzentration von Sauerstoff über die Zeit bei Begasung von Wasser durch dichte Silikonmembranen. ....	48
Abbildung 29: Blasenfreie Begasung von Wasser mit Methan über eine Silikonmembran. ...	49
Abbildung 30: Vergleich der Wachstumskinetik von <i>M. trichosporium</i> OB3b unter Verwendung von VE-Wasser, bidestilliertem Wasser und Milli-Q-Wasser. ...	51
Abbildung 31: Dargestellt ist die Wachstumskinetik von <i>M. trichosporium</i> OB3b im Rührkesselbioreaktor mit und ohne Kupfer.....	52
Abbildung 32: Dargestellt ist die Wachstumskinetik von <i>M. trichosporium</i> Ob3b im kommerziell erhältlichen HDC10-Inkubator. ....	53
Abbildung 33: Dargestellt ist die Wachstumskinetik von <i>M. trichosporium</i> Ob3b im neu entwickelten DMBR Reaktor. ....	54
Abbildung 34 A-D: Gezeigt sind Wachstumskinetiken mit unterschiedlichen (A) Eisen-, (B) Ammonium-, (C) Nitrat- und (D) Phosphatkonzentrationen im NMS-Medium.....	55
Abbildung 35 E-F: Gezeigt sind Wachstumskinetiken mit unterschiedlichen NaNO <sub>3</sub> -Konzentrationen (E) im NMS-Nährmedium und das optimierte NMS-Medium (F) Kultiviert wurde in HDC10-Inkubatoren. ....	56
Abbildung 36: Einfluss von extern zugeführtem CO <sub>2</sub> auf die Wachstumskinetik von <i>M. trichosporium</i> OB3b. ....	58
Abbildung 37: Zusammensetzung der Gase CO <sub>2</sub> , Sauerstoff und Methan ( % v/v) an drei unterschiedlichen Zeitpunkten während der Fermentation in Serumflaschen bei unterschiedlichen CO <sub>2</sub> -Konzentrationen. ....	59
Abbildung 38: Dargestellt ist das Verhältnis von CO <sub>2</sub> zu CH <sub>4</sub> in der Gasphase zur Verdeutlichung der Stoffwechselaktivität. ....	59
Abbildung 39: Dargestellt sind Fermentationen im 1 L Rührkesselreaktor ohne Kupfer (A/a) und mit Kupfer im NMS-Medium (B/b). ....	61
Abbildung 40: Wachstumskinetik von <i>M. trichosporium</i> OB3b in frischem NMS-Nährmedium im Anschluss an eine 30 min Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Propylenoxid A und Phenol B sowie die metabolische Aktivität nach der Behandlung mit Propylenoxid C und Phenol D als Funktion des Verhältnisses von CO <sub>2</sub> und CH <sub>4</sub> zu Beginn und am Ende des Versuches.....	71
Abbildung 41: Einfluss ausgewählter Propylenoxid- (A,C) und Phenol-Konzentrationen (B,D) auf das Wachstum von <i>M. trichosporium</i> OB3b bei dauerhafter Exposition.....	73
Abbildung 42: Effekt der Biomassekonzentration auf die Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid. ....	74
Abbildung 43: Effekt der Biomasse auf die Selektivoxidation von Benzol zu Phenol.....	75

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 44: Verlauf der Eduktkonzentration (Benzol und Propylen) sowie der jeweiligen Produktkonzentration (Phenol und Propylenoxid) während der Ganzzellbiokatalyse mit <i>M. trichosporium</i> OB3b. ....	78
Abbildung 45: Sequenzielle Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit drei Epoxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 30 min. ....	81
Abbildung 46: Sequenzielle Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit drei Epoxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 60 min. ....	82
Abbildung 47: Dargestellt ist Enzymaktivität der pMMO in Abhängigkeit von der Propylenkonzentration während der Ganzzellbiokatalyse. ....	83
Abbildung 48: Sequenzielle Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit drei Epoxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min mit Formiat als Elektronendonator. ....	86
Abbildung 49: Sequenzielle Oxidation von Benzol zu Phenol mit drei Oxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min und drei Regenerationszyklen über jeweils 30 min. ....	89
Abbildung 50: Sequenzielle Oxidation von Benzol zu Phenol mit drei Oxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min sowie einer intermittierenden Regenerationsphase von jeweils 60 min. ....	90
Abbildung 51: Sequenzielle Oxidation von Benzol zu Phenol mit drei Oxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min mit Formiat als Elektronendonator. ...	91
Abbildung 52: Dargestellt ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität der sMMO von der Benzolkonzentration während der Ganzzellbiokatalyse vor (Oxidation 1) und nach (Oxidation 2) der Regeneration der Zellen. ....	94
Abbildung 53: Ganzzellbiokatalyse von Propylen zu Propylenoxid (A) und Benzol zu Phenol (B) durch <i>M. trichosporium</i> OB3b im neu entwickelten Doppelmembranbioreaktor (DMBR). ....	94

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Volumetrische Zusammensetzung des mod. NMS-Nährmediums. ....	31
Tabelle 2: Variation der Medienbestandteile .....	32
Tabelle 3: Gaszusammensetzung für die Untersuchungen zum Einfluss von CO <sub>2</sub> auf die Fermentation von <i>M. trichosporium</i> OB3b.....	38
Tabelle 4: Wachstumsraten von <i>M. trichosporium</i> OB3b bei ausgewählten CO <sub>2</sub> Konzentrationen.....	58
Tabelle 5: Vergleich relevanter Fermentationsparameter für die Kultivierung von MOB ohne und mit zusätzlicher Zugabe von CO <sub>2</sub> in der Gasphase der in dieser Arbeit enthaltenen Daten mit bereits publizierter Daten von Acha et al. und Park et al. ...	63
Tabelle 6: Vergleich des Leistungseintrages ausgewählter Reaktortypen .....	64
Tabelle 7: Fermentationsparameter für die Fermentation im RK, im DMBR und im HDC10-Inkubator .....	66
Tabelle 8: Spezifische Wachstumsraten nach 30-minütiger Exposition der Zellen mit Propylenoxid bzw. Phenol und anschließender Reaktivierung in frischem Nährmedium. ....	72
Tabelle 9: Wesentliche Kenngrößen zur Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol im 20 mL Maßstab.....	75
Tabelle 10: Vergleich wesentlicher Kenngrößen zur Selektivoxidation von Benzol- und Propylen zu Phenol- und Propylenoxid.....	77
Tabelle 11: Enzymaktivität der pMMO bei der Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid über eine Zeitspanne von 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 30 min. ....	80
Tabelle 12: Enzymaktivität der pMMO bei der Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid über eine Zeitspanne von 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 60 min. ....	81
Tabelle 13: Enzymaktivität der pMMO bei der Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid über eine Zeitspanne von 30 min mit Formiat als Elektronendonator. ....	84
Tabelle 14: Gemessene Formiatkonzentrationen während der Versuchsdurchführung.....	85
Tabelle 15: Enzymaktivitäten der sMMO bei der Oxidation von Benzol zu Phenol über eine Zeitspanne von 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 30 min.....	89
Tabelle 16: Enzymaktivitäten der sMMO bei der Oxidation von Benzol zu Phenol über eine Zeitspanne von 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 60 min.....	90
Tabelle 17: Enzymaktivitäten der sMMO bei der Oxidation von Benzol zu Phenol über eine Zeitspanne von 30 min mit Formiat als Elektronendonator. ....	92
Tabelle 18: Übersicht über die Formiatkonzentration während der sequenzielle Oxidation von Benzol zu Phenol zu ausgewählten Zeitpunkten über die gesamte Prozessdauer. ....	92

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 19: Verwendete Versuchsparameter sowie die erreichte maximale Produktkonzentration und Enzymaktivität für die Ganzzellbiokatalyse von Propylen und Benzol im DMBR. ....	95
Tabelle 20: Ausgewählte Reaktor- und Prozesskenngrößen für die Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol im Rührkessel und im DMBR. ....	97
Tabelle 21: Liste der verwendeten Geräte.....	117
Tabelle 22: Liste der verwendeten Chemikalien.....	118
Tabelle 23: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	120
Tabelle 24: Komponenten für die Zusammensetzung des NMS-Mediums. ....	121
Tabelle 25: Zusammensetzung des NMS-Mediums .....	121



# 1 Einleitung

## 1.1 Ausgangssituation

Propylenoxid (PO) stellt ein wichtiges Zwischenprodukt bei der industriellen Herstellung von Polyetherpropylenen dar und bildet somit die Grundlage zur Produktion von maßgeschneider-ten Polyurethanen, welche z.B. bei der Schaumstoffherstellung für Matratzen, Isoliermateria-lien oder der Herstellung von Ausstattungselementen für Kraftfahrzeuge zum Einsatz kommen (Bernhard et al., 2017). Phenol wird zur Herstellung von verschiedenen pharmazeutischen Pro-dukten, Farbstoffen und Pflanzenschutzmitteln eingesetzt (Michałowicz and Duda, 2007). An-gesichts des Marktvolumens für Phenol von 23,17 Mrd. USD für das Jahr 2020 und 22,5 Mrd. USD für Propylenoxid im Jahr 2021 handelt es sich in beiden Fällen um Industriechemikalien von globaler Bedeutung (Expert market research, 2021; Markets and Markets, 2021).

Die Produktion beider Chemikalien basiert bis zum heutigen Tag auf chemischen Verfahren, welche die Umwelt aus ökologischen Gesichtspunkten stark belasten. Wesentliche Gründe stel-len unerwünschte Nebenprodukte und ein hoher Energieverbrauch, verursacht durch hohe Pro-zesstemperaturen und den zur Synthese notwendigen hohen Druck, dar. Bei der Propylenoxid-herstellung über den derzeit primär eingesetzten Chlorhydrinprozess fallen beispielsweise große Mengen Calciumchlorid an. Bei der Phenolsynthese über das Hock'sche Verfahren ent-steht neben Phenol auch ein sehr hoher Anteil Aceton. Eine detaillierte Erläuterung der Verfah-ren findet sich in den Kapiteln 2.1.1 und 2.1.2 dieser Arbeit (Bernhard et al., 2017; Weissermel and Arpe, 2008).

Eine zukünftige Alternative zu konventionellen chemischen Verfahren kann die biotechnologi-sche Oxidation von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol mittels Ganzzellbiokata-lyse darstellen. Die enzymatische Oxidation kann in diesem Fall bei moderaten Temperaturen (30°C), ohne Einsatz toxischer Lösemittel und ohne Bildung von potentiell umweltschädlichen Nebenprodukten erfolgen (Colby et al., 1977; Higgins et al., 1979; Stanley et al., 1992; Stanley and Dalton, 1992).

Eine Grundlage für ein solches Verfahren bildet das Enzym Methan-Monooxygenase (MMO), welches auf natürliche Weise durch aerobe, methanotrophe Bakterien (MOB), wie z.B. *Methy-losinus trichosporium* OB3b, gebildet wird. Anders als heterotrophe Bakterien sind MOB auf Basis der MMO in der Lage, Kohlenstoff ausgehend von Methan über Methanol als Intermediat zu assimilieren.

Das Treibhausgas Methan kommt natürlicherweise in Feuchtgebieten, Flussbetten, Seen und Ozeanen vor. Es entsteht aber auch durch anthropogene Quellen, wie z. B. Landwirtschaft, Mülldeponien, Erdgasspeicher sowie Biogasanlagen.

Die Verwendung von Methan als Substrat für biotechnologische Verfahren ist nicht nur im Hinblick auf den fortschreitenden globalen Klimawandel, sondern auch aus ökonomischen Gesichtspunkten erstrebenswert. Bezogen auf den enthaltenen Kohlenstoff ist das gasförmige Substrat derzeit kostengünstiger verfügbar als klassische biotechnologisch eingesetzte Kohlenhydrate wie Glucose. Zudem steht Methan als Substrat im Gegensatz zu Glucose für biotechnologische Prozesse nicht im direkten Konflikt mit der Verwendung als Nahrungsmittel. Es ist bereits beschrieben, dass MOB Methan aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen ohne weitere Aufbereitung in Gegenwart von Sauerstoff assimilieren können. Sie ermöglichen perspektivisch somit eine stoffliche Nutzung des Gases, welches derzeit in etwa 9.500 Biogasanlagen in Deutschland erzeugt wird (Fischer, 2020; Mühlemeier et al., 2018). Derzeit können zwischen 289 Nm<sup>3</sup> und 2179 Nm<sup>3</sup> Methan abhängig von der Art und der Menge des eingesetzten Substrats pro Anlage produziert werden (FNR, 2021).

Es ist bekannt, dass die MMO aufgrund ihres breiten Substratspektrums in der Lage ist, nicht nur Methan zu Methanol sondern auch weitere Alkane sowie ungesättigte, verzweigte, zyklische, aromatische und halogenierte Kohlenwasserstoffe (KW) zu hydroxylieren oder epoxidieren (Burrows et al., 1984; Colby et al., 1977; Grosse et al., 1999). Diese können somit in höherwertige Produkte umgewandelt werden (Patel et al., 2016; Sheets et al., 2016; Strong et al., 2015; Yoo et al., 2015; Zhang et al., 2016). Dabei ist die biokatalytische Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid durch MOB bereits durch Hill et al. (1990) publiziert wurden. Die Oxidation von Benzol zu Phenol wurde bisher lediglich im kleinen Maßstab demonstriert. (Burrows et al., 1984; Dalton et al., 1986; Hall, 1983; Higgins et al., 1981; Hyman et al., 1985).

Eine wesentliche Herausforderung bei der Fermentation von MOB stellt die effektive Versorgung der Mikroorganismen mit Methan dar. Das Gas ist schwer in Wasser löslich, so dass die Verfügbarkeit dieser Kohlenstoffquelle im wässrigen Kulturmedium bei hohen Zelldichten primär durch den Stoffübergang von Methan in die wässrige Phase limitiert ist (Bowman and Saylor, 1994). Der Eintrag des Gases in einen Bioreaktor kann zudem – in Anwesenheit von Sauerstoff unter Ausbildung von Gasblasen – zu potentiell explosiven Gasgemischen führen. Ein Ansatz, um die genannte Herausforderung zu adressieren, kann eine blasenfreie Begasung, z.B. durch den Einsatz geeigneter Membranen, darstellen. Nach Kenntnisstand der Autorin

existieren bisher jedoch keine Untersuchungen zur blasenfreien Begasung von geeigneten Nährmedien mit Methan und Sauerstoff.

Wenngleich die biokatalytische Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid und die Oxidation von Benzol zu Phenol bereits beschrieben wurde, fehlt es derzeit an grundlegenden Daten z.B. zur Toxizität der Edukte und Produkte auf MOB. Des Weiteren sind wesentliche Betriebsparameter, wie eine geeignete Biomassekonzentration, zur Etablierung eines idealerweise kontinuierlichen Verfahrens auf Basis von Bioreaktoren derzeit nicht bekannt. Bisher wurde die Verwendung von Membranbioreaktoren zur blasenfreien Methan- und Sauerstoffversorgung weder für die fermentative Herstellung von MOB, noch für die Ganzzellbiokatalyse von Benzol- zu Phenol oder von Propylen- zu Propylenoxid beschrieben.

### **1.2 Zielsetzung**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Verfahren zur fermentativen Herstellung des Ganzzellbiokatalysators *M. trichosporium* OB3b zu erarbeiten. Unter der Nutzung des Enzyms Methan-Monooxygenase soll anschließend ein Prozess zur Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid sowie zur Oxidation von Benzol zu Phenol ohne Bildung von unerwünschten Koprodukten entwickelt werden (Abbildung 1).

Hierbei ist ein Teilziel, die Lag-Phase des aeroben, methanotrophen Bakteriums (MOB) während der Fermentation im Bioreaktor zu verkürzen. Aus der Literatur geht hervor, dass eine CO<sub>2</sub>-Zugabe – zusätzlich zum natürlichen CO<sub>2</sub>-Anteil in der Umgebungsluft – das initiale Wachstum von MOB positiv beeinflussen kann. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, sollen in dieser Arbeit, neben dem Einfluss verschiedener Nährmedienkomponenten (Kap. 5.2.2), auch die Auswirkungen unterschiedlicher CO<sub>2</sub>-Konzentrationen auf die Wachstumskinetik während der Fermentation von *M. trichosporium* OB3b gemessen werden (Kap. 5.2.3 und Kap. 5.2.4).

Wie zuvor beschrieben, unterliegt die Fermentation von *M. trichosporium* OB3b aufgrund der Gefahr der Ausbildung von explosiven Sauerstoff-Methan-Gemischen sicherheitstechnischen Anforderungen. Es soll, in dieser Arbeit daher erstmals die Verwendung eines speziell zur Kultivierung und Ganzzellbiokatalyse mit MOB entwickelten neuartiger Doppelmembranbioreaktor eingesetzt werden. Hierzu soll zunächst ein kommerziell erhältlicher Membranbioreaktor, sowohl zur fermentativen Herstellung von *M. trichosporium* OB3b als auch zur Biokatalyse beider zuvor genannter Reaktionen etabliert und anschließend mit einem konventionellen Rührkesselreaktor verglichen werden (Kap. 5.2.1, Kap. 5.2.5, Kap. 5.2.6). Hierfür müssen zunächst

geeignete Membranen hinsichtlich Durchlässigkeit für die gasförmigen Substrate Methan und Sauerstoff charakterisiert werden. (Kap. 5.1).

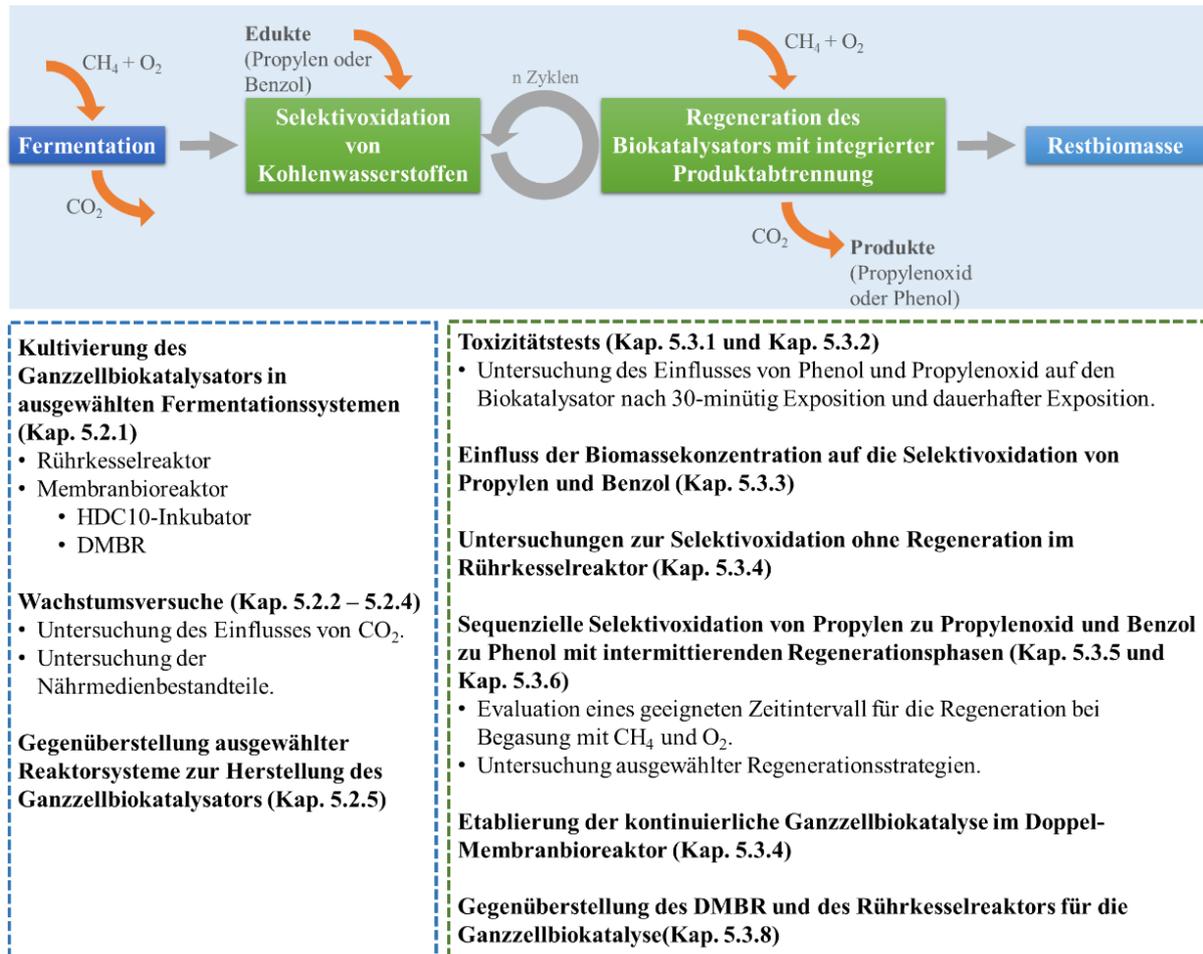


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gesamtprozesses für die direkte Oxidation von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol mittels Ganzzellbiokatalyse und der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Während die enzymatische Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid mittels MOB bereits beschrieben wurde, ist bisher lediglich die prinzipielle Machbarkeit der Oxidation von Benzol zu Phenol gezeigt worden. Zur optimalen Prozessführung für beide Edukte fehlen jedoch Daten, z.B. hinsichtlich einer geeigneten Biomassekonzentration während der Ganzzellbiokatalyse mittels *M. trichoproium* OB3b. Weiterhin sind aktuell nur unzureichende Daten zur Toxizität von Propylenoxid und keine toxikologischen Daten zu Phenol für den genannten Organismus in der Literatur verfügbar. Auch im Hinblick auf eine geeignete Oxidations- sowie Regenerationszeit für *M. trichoproium* OB3b sind lediglich erste Untersuchungen zum Einfluss des Substrates Propylen publiziert. Daten zur Oxidation von Benzol mit *M. trichosporium* OB3b wurden nach Wissensstand der Autorin bislang nicht publiziert. Ziel dieser Arbeit ist es daher, geeignete Reaktionsbedingungen und grundlegende Betriebsparameter – wie geeignete Oxida-

tions- und Regenerationsintervalle – und damit verbunden auch Prozessstrategien zur sequenziellen Produktabtrennung zu evaluieren, welche idealerweise eine stufenweise, semi-kontinuierliche Oxidation von Propylen und Benzol mit *M. trichosporium* OB3b ermöglichen. Zur Aufnahme von entsprechenden Edukt- und Produktkonzentrationen soll im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein Echtzeit-Membraneinlassmassenspektrometer eingesetzt werden (Kap. 5.3).

Ein grundlegendes Verständnis wesentlicher Kenngrößen soll die Grundlage für ein Scale-up des Prozesses und somit auch für eine zukünftige industrielle Nutzung von methanotrophen Bakterien für die biotechnologische Herstellung von wichtigen Synthesebausteinen schaffen.

## 2 Theoretische Grundlagen

In dieser Arbeit wurde der Organismus *M. trichosporium* OB3b als Ganzzellbiokatalysator für die Oxidation von Propylen zu Propylenoxid sowie Benzol zu Phenol eingesetzt. Im nachfolgenden Kapitel werden die für das Verständnis dieser Arbeit notwendigen theoretischen Grundlagen zusammengefasst.

### 2.1 Herstellverfahren für Propylenoxid und Phenol im industriellen Maßstab

Die industrielle Produktion von Propylenoxid und Phenol basiert derzeit auf chemischen Verfahren. Bei den meisten chemischen Verfahren entstehen Nebenprodukte, die nur einen geringen Marktpreis aufweisen oder deren Entsorgung zusätzliche Kosten verursacht. Eine direkte Oxidation von Propylen zu Propylenoxid oder von Benzol zu Phenol unter Vermeidung von Nebenprodukten ist daher aus industriellen und ökologischen Gesichtspunkten von großem Interesse. In den nachfolgenden Kapiteln werden zunächst die aktuellen Verfahren zur Herstellung von Propylenoxid (Kap. 2.1.1) und Phenol (Kap. 2.1.2) beschrieben und anschließend biotechnologische Alternativen zur direkten Oxidation beider Stoffe aufgezeigt (Kap. 2.1.3).

#### 2.1.1 Oxidation von Propylen zu Propylenoxid

Propylen ( $C_3H_6$ ) (CAS Nr: 115-07-1) ist ein Alken und zählt aufgrund seiner Doppelbindung zu den ungesättigten Kohlenwasserstoffen. Das in Wasser schwachlösliche Gas ist farb- und geruchlos. Mit Luft bildet Propylen ein leicht entzündliches Gemisch (GESTIS-Stoffdatenbank, 2020a). Durch Aufbrechen der Doppelbindung und Integration eines Sauerstoffatoms entsteht das Epoxid 1,2-Epoxypropan (Propylenoxid, PO) (CAS Nr: 75-56-9), welches zu den wichtigsten Grundbausteinen in der chemischen Industrie zählt (Abbildung 2).

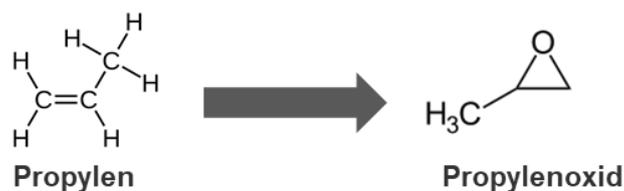


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Epoxidationsreaktion von Propylen zu Propylenoxid.

PO ist ein leicht entflammbarer Stoff mit der chemischen Formel  $C_3H_6O$ . Im Vergleich zu Propylen ist es leicht in Wasser löslich ( $681 \text{ g l}^{-1}$  bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). PO ist farblos und weist einen ätherischen Geruch auf (GESTIS-Stoffdatenbank, 2020b; Kahlich et al., 2011).

Es wird unter anderem bei der Synthese von Polyetherpropylenen für maßgeschneiderte Polyurethane eingesetzt, die beispielsweise bei der Schaumstoffherstellung für Matratzen, Isoliermaterialien oder Ausstattungselemente im Auto zum Einsatz kommen, Anwendung finden (Bernhard et al., 2017). Basierend auf verschiedenen zumeist chemischen Herstellungsprozessen lag die produzierte PO Menge für das Jahr 2015 bei etwa neun Millionen Tonnen (Bernhard et al., 2017). Das globale Marktvolumen für PO beträgt im Jahr 2021 etwa 22,5 Mrd. USD und wird bis zum Jahr 2026 voraussichtlich auf etwa 29,5 Mrd. USD ansteigen (Markets and Markets, 2021). Obwohl in den vergangenen Jahrzehnten an Verfahren zur umweltfreundlichen Produktion von PO geforscht wurde, stellt das Chlorhydrinverfahren bislang immer noch das bedeutendste Verfahren zur PO-Produktion dar. Die Verhältnisse der Marktanteile der eingesetzten Verfahren sind in in Abbildung 3 dargestellt (Bernhard et al., 2017).

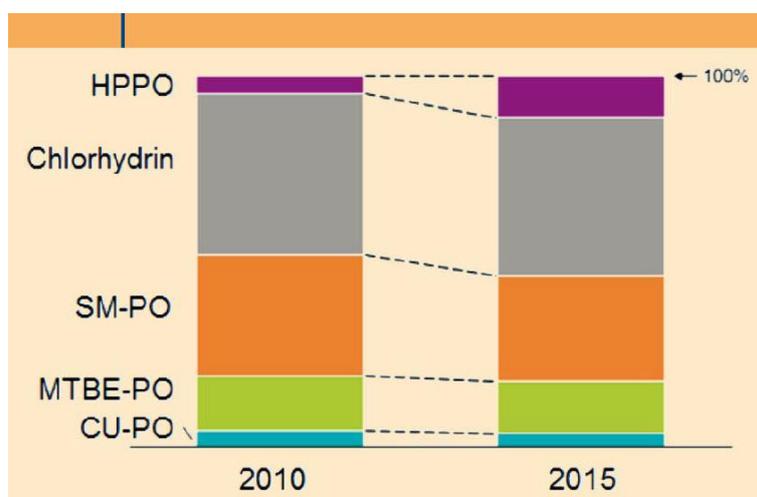


Abbildung 3: Herstellungsverfahren für Propylenoxid und ihr Marktanteil gezeigt am Beispiel der Jahre 2010 und 2015. Die Abbildung wurde aus Bernhard et al. 2017 übernommen. HPPO-Verfahren = „Hydrogen-Peroxide-to-Propylene-Oxide“-Verfahren, SMPO-Verfahren = „Styrol Monomer and Propylene Oxide“-Verfahren, MTBE-PO = „Methyl-tert-butyl-ether-Propylenoxide“-Verfahren, CU-PO = „Cumene-to-Propylene-Oxide“-Verfahren.

Bei dem Chlorhydrinverfahren wird Propylen bei 35 bis 50 °C und 2 bis 3 bar mit Chlor und Wasser zu den zwei isomeren Propylenchlorhydrinen umgesetzt. Anschließend werden die erhaltenen Isomere zusammen mit einer Lösung aus Calciumhydroxid und Natriumhydroxid aus einer Blasensäule in einen weiteren Reaktor überführt. Dort findet bei ca. 25 °C die Dehydrochlorierung der Chlorhydrine unter der Bildung von PO statt. Neben PO entstehen jedoch auch etwa 100 bis 150 kg des Koppelproduktes 1,2-Dichlorpropan pro Tonne PO, für welches es keinen bedeutenden Absatzmarkt gibt. Ein weiteres Problem liegt zudem in der Entstehung von ca. 2,1 t Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) und 2,2 t Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ) pro Tonne Propylenoxid (Abbildung 4). Die Entsorgung dieser Salze über das Abwasser resultiert in einer erheblichen Umweltbelastung (Bernhard et al., 2017; Weissermel and Arpe, 2008). Die Hauptsyntheseroute des Chlorhydrinverfahrens ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

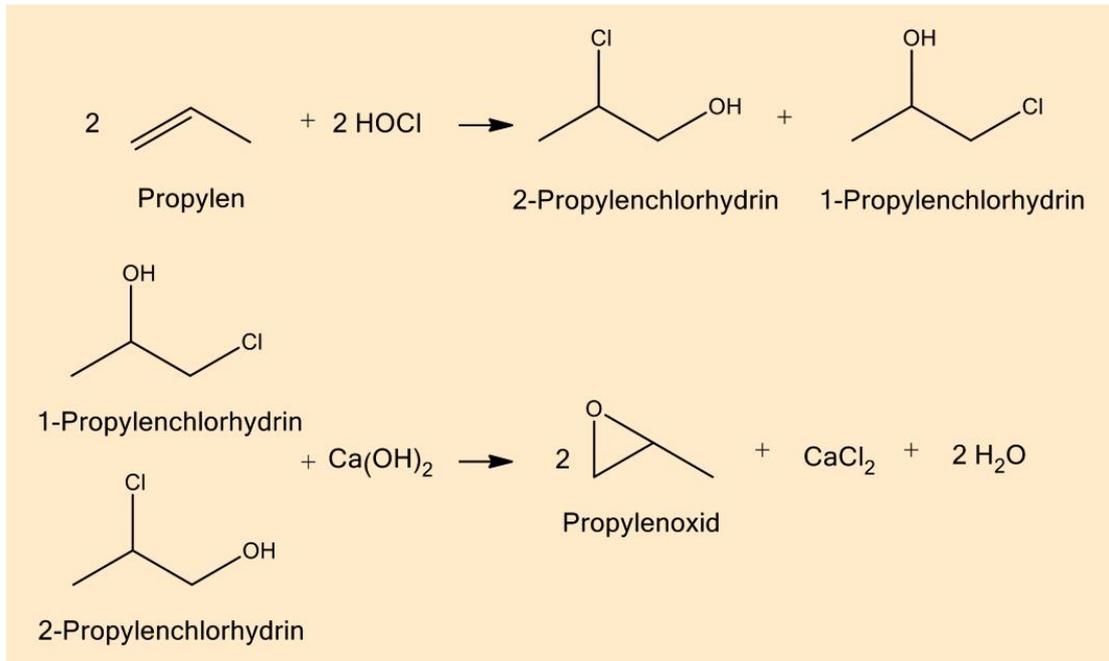


Abbildung 4: Hauptroute des Chlorhydrin-Verfahrens. Propylen wird mit Chlor und Wasser zu den zwei isomeren Propylenchlorhydrinen umgesetzt. In einem zweiten Schritt entsteht aus den Chlorhydrinen unter Abspaltung von Salzsäure Propylenoxid. Neben Propylenoxid entsteht zudem noch des Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>). Die Graphik wurde aus Bernhard et al. 2017 übernommen.

Weitere – wenngleich unbedeutendere – Verfahren zur Herstellung von PO sind das HPPO Verfahren („Hydrogen Peroxide to Propylene Oxide“-Verfahren) und der Oxiran-Prozess. Im Oxiran-Prozess wird zunächst ein organisches Hydroperoxid, z.B. aus Isobutan oder Ethylbenzol, gebildet. Diese werden zur Sauerstoffübertragung auf das Propylen eingesetzt. Als Koppelprodukte entstehen *tert.*-Butanol oder Methylphenylcarbinol. Diese Verfahren werden bei sehr hohen Temperaturen (bis 140 °C) und einem Druck von bis zu 60 bar durchgeführt. Aus diesem Grund konnte dieses Verfahren bislang noch keine wirtschaftliche Bedeutung erlangen (Bernhard et al., 2017; Winnacker, 2004). Des Weiteren entstehen auch zwischen 2,5 bis 3,5 t *tert.*-Butanol oder 2,2 bis 2,5 t Styrol, abhängig von den Ausgangskemikalien (Isobutan oder Ethylbenzol) pro produzierter Tonne PO (Kahlich et al., 2011).

Als deutlich umweltfreundlichere Möglichkeit zur Synthese von PO gilt das HPPO-Verfahren. Bei diesem Verfahren wird Propylen mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zu PO umgesetzt. Das einzige Nebenprodukt ist hierbei Wasser. Als limitierender Faktor für eine industrielle Anwendung erwies sich in der Vergangenheit die Verfügbarkeit des Eduktes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aktuelle Verfahren beruhen auf der Verwendung eines Katalysators auf Silikat-Basis, welche ein redoxaktives Übergangsmetall enthalten (Bernhard et al., 2017). Wesentliche Nachteile dieses Verfahrens sind die hohen Kosten der Ausgangsmaterialien und die erheblichen Sicherheitsanforderungen aufgrund des Einsatzes von hochkonzentriertem Wasserstoffperoxid (Khatib and Oyama, 2015).



### **2.1.3 Oxidation von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol**

Gegenüber den genannten chemischen Verfahren stellt die direkte Oxidation von Propylen zu Propylenoxid und von Benzol zu Phenol basierend auf dem Enzym MMO (Kap. 2.4.1) eine interessante biotechnologische Alternative dar. Hierfür kann das Enzym isoliert (in vitro) oder in Form von intakten Zellen (in vivo) eingesetzt werden (siehe Kap. 2.2) (Stanley et al., 1983; Stanley and Dalton, 1992). Wesentliche Vorteile der Ganzzellbiokatalyse sind unter anderem, dass die Zellyse sowie die Enzymbereinigung entfällt und die Zellen wiederholt verwendet werden können. Weiterhin ermöglicht die Ganzzellbiokatalyse eine einfache Implementierung von enzymatischen Kaskaden und die Versorgung mit Cofaktoren, die für die Biotransformation benötigt werden, ist deutlich leichter (Lin and Tao, 2017). Durch die enzymatische Katalyse kann die Umsetzung beider Edukte bei moderaten Temperaturen (30 °C) erfolgen (Colby et al., 1977; Higgins et al., 1979; Stanley et al., 1992; Stanley and Dalton, 1992). Zudem entstehen bei der Reaktion keine toxischen oder umweltschädlichen Nebenprodukte.

Bei der Oxidation mittels Ganzzellbiokatalyse diffundiert Propylen bzw. Benzol in die Zelle und wird durch die MMO umgesetzt. Die entstandenen Produkte PO und Phenol diffundieren anschließend aus der Zelle und liegen somit extrazellulär im Reaktionsmedium vor. Eine großtechnische Anlage zur direkten Oxidation von Kohlenwasserstoffen mittels aerober, methanotropher Bakterien existiert derzeit jedoch nicht. Wirtschaftliche Hindernisse stellen hierbei das langsame Wachstum der Organismen bedingt durch den schlechten Gastransfer der Kohlenstoffquelle Methan und der schlechte Sauerstofftransfer dar. Weitere Hindernisse für eine kommerzielle Nutzung stellen die besonderen Sicherheitsanforderungen an die Fermentationsanlagen, die bislang kurze maximale Oxidationsdauer von etwa einer Stunde sowie die Toxizität der Produkte auf die Zellen dar. Es ist ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, die genannten Herausforderungen und Hindernisse zu adressieren, um der industriellen Verwendung methanotropher Bakterien unter Nutzung der MMO ein Stück näher zu kommen.

Im Hinblick auf eine industrielle Anwendung sollen als ein wesentliches Ziel dieser Arbeit deshalb Möglichkeiten aufgezeigt werden, diese kritischen Prozessschritte ökonomischer zu gestalten.

## **2.2 Aerobe, methanotrophe Bakterien**

Aerobe, methanotrophe Bakterien (MOB) sind in der Lage, Methan als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Da sie basierend auf dieser Fähigkeit einen bedeutenden Beitrag

zur Verringerung der Methanemissionen leisten, sind MOB von erheblicher Bedeutung im globalen Kohlenstoffkreislauf (Hanson and Hanson, 1996; Park et al., 2002; Tol et al., 2003). Im Jahr 1970 wurden erstmals etwa einhundert Stämme durch Whittenbury isoliert, wodurch eine ausführliche Charakterisierung erfolgen konnte (Whittenbury et al., 1970b, 1970a). MOB sind gramnegative Bakterien und kommen hauptsächlich als Kokken, Vibrionen oder Stäbchen vor (Hanson and Hanson, 1996). Einige der MOB besitzen Flagellen und sind dadurch beweglich (Dedysh and Knief, 2018). Typischerweise werden MOB basierend auf ihrer 16S rRNA in drei Gruppen (Typ I, Typ II und Typ X) unterteilt. Vertreter von Typ I (z.B. *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylosoma* uvm.) und Typ X (z.B. *Methylococcus*, *Methylocalum*) gehören zu den  $\gamma$ -Proteobakterien, welche den Ribulose-Monophosphat-Weg (RuMP) zur Kohlenstoffassimilation nutzen. Vertreter der Typ II methanotrophen Bakterien, wie z.B. *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocapsa*, *Methylocella*, zählen zu den  $\alpha$ -Proteobakterien und assimilieren den Kohlenstoff über den sogenannten Serinweg (Han et al., 2009; Hanson and Hanson, 1996).

Im ersten Schritt des Kohlenstoffmetabolismus der MOB wird durch das Enzym Methan-Monooxygenase (MMO) das Methan ( $\text{CH}_4$ ) zu Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) oxidiert. Die MMO kann dabei in membrangebundener Form (pMMO) oder als im Zytoplasma gelöste MMO (sMMO) vorliegen (detaillierte Beschreibung in Kap. 2.4). Im weiteren Verlauf wird das entstandene Methanol u.a. durch das Enzym Methanol-Dehydrogenase (MDH) zu Formaldehyd umgewandelt. Anschließend erfolgt abhängig vom jeweiligen Bakterienstamm die Assimilation des Kohlenstoffes über den Serin- oder den Ribulose-Monophosphat-Weg (RuMP-Weg). Unter Bildung von  $\text{CO}_2$  wird im oxidativen Stoffwechsel Energie in Form von Reduktionsäquivalenten gewonnen (Acha et al., 2002; Merckx et al., 2001; Strong et al., 2015). Eine schematische Darstellung des Stoffwechselweges zeigt Abbildung 6.

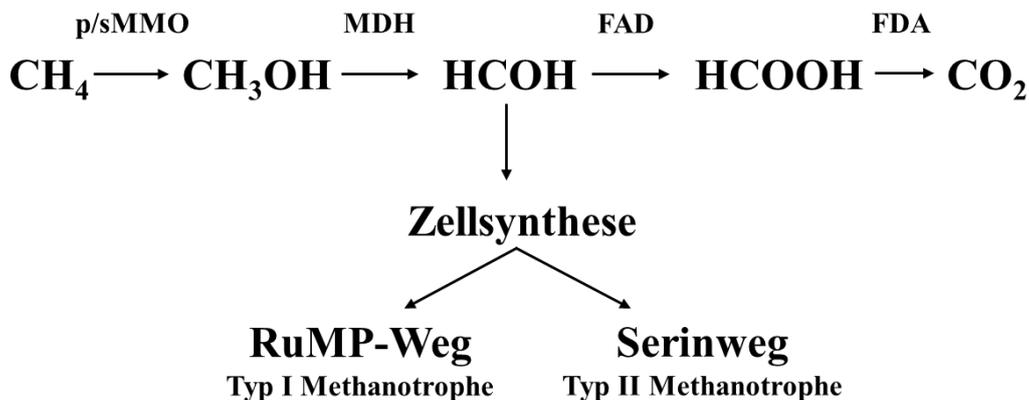


Abbildung 6: Schematisierte Darstellung der Formaldehydassimilation zur Biomassegewinnung mit den beteiligten Enzymen pMMO (membrangebundene Methan-Monooxygenase), sMMO (lösliche Methanmono-Oxygenase), MDH (Methanoldehydrogenase), FAD (Formaldehyddehydrogenase) und FDA (Formiatdehydrogenase). Die Abbildung wurde modifiziert nach (Acha et al., 2002).

Das gebildete Kohlenstoffdioxid könnten MOB zur Bildung von Biomasse nutzen. So können beispielweise die  $\alpha$ -Proteobakterien bis zu 50 % ihrer Biomasse aus  $\text{CO}_2$  assimilieren. Im Fall von  $\gamma$ -Proteobakterien liegt der Anteil hingegen bei lediglich 15 %. Für die Kultivierung von MOB – als wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit – bedeutet dies, dass die zur Verfügung stehende  $\text{CO}_2$ -Konzentration einen Einfluss auf die jeweilige Wachstumskinetik der Bakterien haben kann (Strong et al., 2015; Trotsenko and Murrell, 2008).

Neben ihrer Fähigkeit Methan als Kohlenstoffquelle zu nutzen, können MOB eine Vielzahl industriell interessanter Wertstoffe synthetisieren (näher beschrieben in Kap. 2.4). Dies macht sie für eine Reihe biotechnologischer Applikationen interessant. Beispiele für Wertstoffe sind Single-Cell-Proteine (SCP), Biopolymere (PHB), Ectoin, Lipide und Vitamin B12 (Strong et al., 2015). Darüber hinaus sind sie aufgrund der geringen Selektivität der MMO in der Lage, Bodenschadstoffe wie Tri-chlorethen, Dichlormethan, Chloroform, Vinylchlorid oder Dichlorethen abzubauen (Hakemian and Rosenzweig, 2007; Oldenhuis et al., 1989; Sullivan et al., 1998).

### 2.3 *Methylosinus trichosporium* OB3b

In dieser Arbeit wurde die prozesstechnische Verwendung des MOB *Methylosinus trichosporium* OB3b (*M. trichosporium* OB3b) als Ganzzellbiokatalysator untersucht. Die Abkürzung „OB3b“ steht für „odd ball Nr. 3b“ und beschreibt somit die typische kokkenförmige, runde Morphologie des Bakteriums. Eine Transmembranmikroskopaufnahme von *M. trichosporium* OB3b mit und ohne peripheren Transmembranstapeln ist in Abbildung 7 gezeigt.

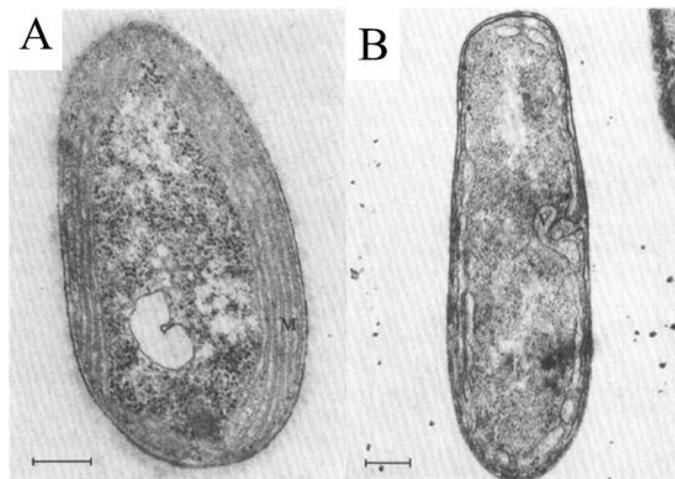


Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahme von *Methylosinus trichosporium* OB3b im Transmissionselektronenmikroskop. A: Kultivierung mit Methan/Sauerstoff im Verhältnis 5:1 (v/v). Zu erkennen sind die peripheren Membranstapel, die auf eine pMMO-Aktivität hinweisen. B: Kultivierung mit Methan/Sauerstoff im Verhältnis 1:5 (v/v). Das Fehlen der peripheren Membranstapel deutet auf sMMO-Aktivität hin. Der dargestellte Maßstabsbalken (jeweils links unten) entspricht 0,2 µm. Die Abbildung wurde übernommen aus Scott 1981 (Scott et al., 1981).

*M. trichosporium* OB3b wurde erstmals durch Whittenbury et al. (Whittenbury et al., 1970b, 1970a) isoliert und beschrieben. Stein et al. sequenzierten schließlich im Jahre 2010 das gesamte Genom (Stein et al., 2010). In der Natur kommt der Organismus überwiegend in den oberen Schichten von Mooren, Reisfeldern und Sumpfgebieten vor (Nazaries et al., 2013; Strong et al., 2015). Durch den anaeroben Abbau von organischem Material in tieferen Bodenschichten entsteht Methan. Durch die Atmosphäre gelangt Sauerstoff in die oberen Materialschichten, wodurch die Organismen sowohl mit Methan als auch Sauerstoff versorgt werden. Die optimalen Wachstumsbedingungen von *M. trichosporium* OB3b liegen bei einer Temperatur von 30 °C und einem pH-Wert von 6,0 bis 7,0 (Park et al., 1991). Der Organismus gehört zu den bislang am besten untersuchten Typ II ( $\alpha$ -Proteobakterien) MOB und stellt daher eine Art Modellorganismus für die Forschung dar. Wie in Kap. 2.2 beschrieben, nutzen Typ II methanotrophe Bakterien den Serinweg zur Kohlenstoffassimilation (Abbildung 8).

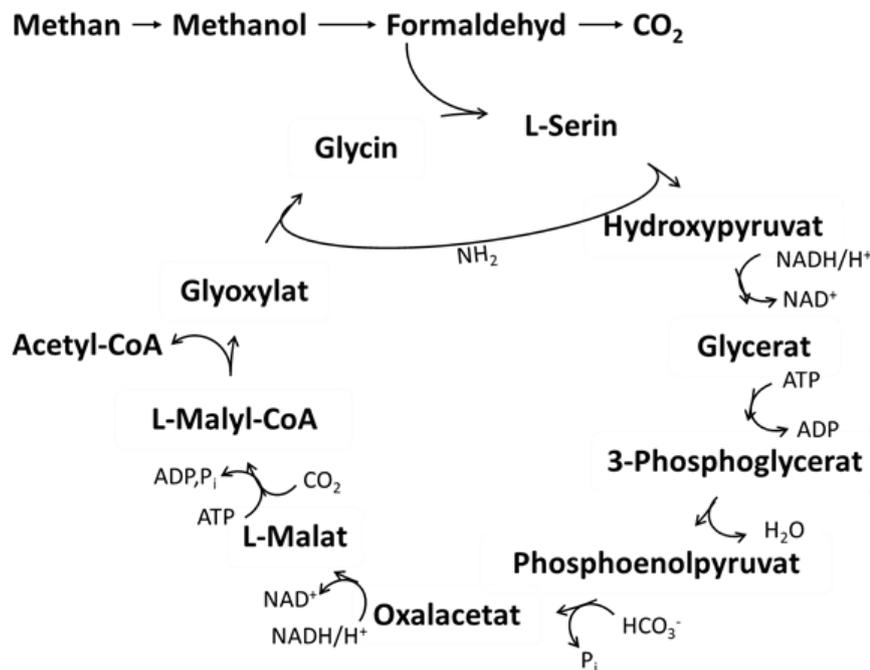


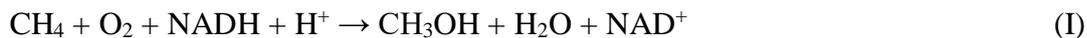
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Serinwegs. Ausgehend von der Kondensation von Methylentetrahydrofolat und Glycin wird Serin gebildet. Diese C3-Verbindung wird über eine Reihe von Transformationen zu Phosphoenolpyruvat umgewandelt. Durch das Einspeisen von CO<sub>2</sub> in den Serinzyklus kann im weiteren Verlauf Oxalacetat gebildet werden, wodurch anschließend Malat entsteht. Durch die Spaltung des Malats in zwei Kohlenstoffverbindungen entsteht wieder Glycin, womit der Zyklus geschlossen wird (Anthony, 1982; Dworkin et al., 2006).

Hierbei wird ausgehend von der Kondensation von Methylentetrahydrofolat und Glycin das Serin gebildet. Diese C3-Verbindung wird über eine Reihe von Transformationen zu Phosphoenolpyruvat umgewandelt. Durch das Einspeisen von CO<sub>2</sub> in den Serinzyklus kann im weiteren Verlauf Oxalacetat gebildet werden, wodurch anschließend Malat entsteht. Durch die Spaltung des Malats in zwei Kohlenstoffverbindungen entsteht wieder Glycin, wodurch der

Zyklus geschlossen wird (Abbildung 8) (Anthony, 1982; Dworkin et al., 2006). Über den Citratzyklus oder den Ribulose-5-phosphat-Weg wird Biomasse gebildet (Anthony, 2011). Für den Aufbau von Amino- bzw. Fettsäuren gelten Glycin bzw. Acetyl-CoA als Ausgangsmetabolite (Hanson and Hanson, 1996; Matsen et al., 2013). Damit im Serinweg das Phosphoenolpyruvat zu Oxaloacetat umgewandelt werden kann, werden pro zwei Moleküle Formaldehyd ein Molekül  $\text{CO}_2$  benötigt (Acha et al., 2002; Anthony, 1982; Park et al., 1991). Dabei wird das benötigte  $\text{CO}_2$  vom Organismus selbst gebildet (Kap. 2.2). Wie z.B. durch Acha et al. und Park et al. beschrieben, entstehen bei Fermentationen von *M. trichosporium* OB3b jedoch zu Beginn einer Fermentation nur geringe Mengen  $\text{CO}_2$ , weshalb durch die Zugabe von  $\text{CO}_2$  die anfängliche Lag-Phase verkürzt werden kann (Acha et al., 2002; Park et al., 1992, 1991).

## 2.4 Eigenschaften der Methan-Monooxygenase

Die Aktivierung der sehr starken C-H Bindung ( $104 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) im Methanmolekül erfordert hohe Temperaturen und es entstehen Nebenprodukte. Die MMO katalysiert die Reaktion von Methan zu Methanol hingegen bei niedrigen Temperaturen ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ohne die Bildung von Nebenprodukten (Balasubramanian et al., 2010). Die MMO stellt somit das Schlüsselenzym im Metabolismus der MOB dar. Die Hydroxylierungsreaktion läuft nach folgender Gleichung ab (Tinberg and Lippard, 2011).



Wie in Kap. (2.2) bereits erwähnt, kann die MMO als membrangebundene pMMO oder auch als lösliche sMMO vorliegen. Bei methanotrophen Bakterien hängt das Vorkommen von pMMO und sMMO entscheidend von der Kupferkonzentration im vorliegenden Nährmedium ab. So wird bei hohen Kupferkonzentrationen ( $>2.5 \text{ mmol g}^{-1} \text{ Zellen}$ ) die pMMO gebildet, wohingegen in Abwesenheit von Kupfer die sMMO synthetisiert wird (Dalton et al., 1986; Davis et al., 1987; Park et al., 1991; Scott et al., 1981; Stanley et al., 1992, 1983). Beide Enzyme weisen eine unterschiedliche Aminosäuresequenz auf und sind auf jeweils unterschiedliche metallische Cofaktoren angewiesen (Dalton, 2005; Hakemian and Rosenzweig, 2007; Trotsenko and Murrell, 2008). Mit der Ausnahme der Gattungen *Methylocella* und *Methyloferula* wird die pMMO von allen MOB exprimiert (Dedysh et al., 2015). Die sMMO findet sich hingegen nur in wenigen MOB, wie beispielsweise *M. trichosporium* OB3b. Wie von Trotsenko und Murrell publiziert, kann die Ausbildung der pMMO bei *M. trichosporium* OB3b zu einer gegenüber der sMMO um etwa 34 % erhöhten Methankonversion führen (Trotsenko and Murrell, 2008).

Beide MMOs sind in der Lage, neben Methan weitere Kohlenwasserstoffe zu hydroxylieren als auch zu epoxidieren. Wie zuvor erwähnt, ist die Methankonversion mit der pMMO effizienter, dafür ist die sMMO weniger selektiv und kann verwendet werden, um längere und komplexere Kohlenwasserstoffe zu hydroxylieren oder zu epoxidieren (detaillierte Beschreibung in 2.4.1 und 2.4.2). Auch der in dieser Arbeit eingesetzt Organismus *M. trichosporium* OB3b ist in der Lage, sowohl die sMMO als auch die pMMO zu exprimieren. Diese Tatsache macht den Organismus für den Einsatz als Ganzzellbiokatalysator für die Oxidation von Propylen zu Propylenoxid und von Benzol zu Phenol interessant. Weiterhin handelt es sich bei der MMO um ein wachstumsassoziiertes Enzym. Dies bedeutet, dass mit zunehmender Biomassekonzentration die Biokonversionsrate erhöht wird (Xin et al., 2002, 2003, 2010).

Die nachfolgenden Kapitel 2.4.1 und 2.4.2 geben einen Einblick in die Struktur und Funktionsweise beider Enzyme. Eine detailliertere Beschreibung der Struktur und Funktion sind in den Arbeiten von Chan et al. (2004), Dalton (2005), Hakemian and Rosenzweig (2007), Lieberman and Rosenzweig (2004) zu finden (Chan et al., 2004; Dalton, 2005; Hakemian and Rosenzweig, 2007; Lieberman and Rosenzweig, 2004).

#### **2.4.1 Membrangebundene Methan-Monooxygenase für die Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid**

Die pMMO besteht aus den drei Untereinheiten  $\alpha$  (pmoA),  $\beta$  (pmoB) sowie  $\gamma$  (pmoC) und ist in einem  $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ -Trimer angeordnet (Hakemian and Rosenzweig, 2007; Lieberman and Rosenzweig, 2004). Die drei Untereinheiten haben eine Größe von jeweils etwa 26 kDa ( $\alpha$ ), 45 kDa ( $\beta$ ) bzw. 23 kDa ( $\gamma$ ). Die pMMO ist intrazellulär in cytoplasmatischen Membranstapeln lokalisiert (Scott et al., 1981). Bislang wurde davon ausgegangen, dass das aktive Zentrum des Enzyms aus zwei Eisenatomen und ca. 15 Kupfer Atomen pro Molekül besteht (Trotsenko and Murrell, 2008). Blasubramanian et al. (2010) widerlegten diese Theorie jedoch und zeigten, dass das aktive Zentrum lediglich zwei Kupferatome aufweist. Des Weiteren fanden sie heraus, dass das aktive Kupferzentrum nicht innerhalb der Membran, sondern in der N-terminalen löslichen pmoB- bzw. spmoB-Untereinheit lokalisiert ist. Rekombinante spmoB-Fragmente binden Kupfer und weisen eine Methan- und Propylenoxidationsaktivität auf (Balasubramanian et al., 2010).

Die Kristallstruktur der pMMO ist in Abbildung 9 dargestellt. Das Reduktionsmittel für die pMMO ist bislang noch nicht ganz geklärt (Hakemian and Rosenzweig, 2007). In-vitro kann NADH als Reduktionsmittel fungieren. In aufgeschlossenen Zellen führte jedoch nur die Zugabe von Quinolin zu einer Enzymaktivität (Basu et al., 2003; Lieberman et al., 2003; Zahn and

DiSpirito, 1996). Mit Douroquinon als natürliches Reduktionsmittel wurden hierbei die besten Ergebnisse erzielt (Shiemke et al., 1995; Trotsenko and Murrell, 2008).

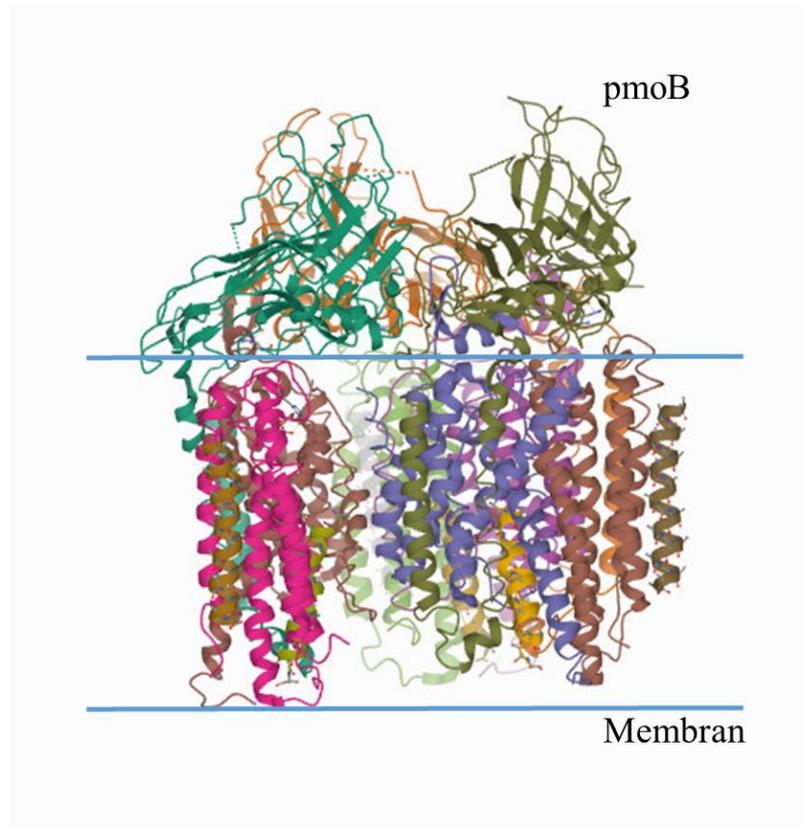


Abbildung 9: Kristallstruktur der pMMO aus dem Organismus *M. trichosporium* OB3b (Proteine Data Bank, 2020). Die Untereinheiten pmoA und pmoB sind innerhalb der Membran lokalisiert. In der Untereinheit pmoB ist das aktive Zentrum lokalisiert.

Neben Methan kann die pMMO Alkane bis zu einer Länge von 5-C-Atomen, wie beispielsweise Propylen sowie einige halogenierte Kohlenwasserstoffe hydroxylieren oder epoxidieren (Burrows et al., 1984; Merkx et al., 2001; Xin et al., 2002). Bei der Oxidation von Propylen aktiviert die MMO zunächst den molekularen Sauerstoff und oxidiert dann das Propylen zu Propylenoxid (Avdeeva and Gvozdev, 2019).

#### 2.4.2 Lösliche Methan-Monooxygenase für die Selektivoxidation von Benzol zu Phenol

Die sMMO ist im Cytoplasma lokalisiert und besteht aus drei Komponenten, einer Hydroxylase (MMOH), einer Reduktase (MMOR) und einem regulatorischen Protein (MMOB) (Scott et al., 1981). Als natürliches Reduktionsmittel dient NADH (Fox et al., 1989; Semrau et al., 2010). Die MMOH besteht aus drei Polypeptiden, welche als ein  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Dimer angeordnet sind. Die Peptide weisen eine Größe von jeweils etwa 60 kDa ( $\alpha$ ), 45 kDa ( $\beta$ ) bzw. 20 kDa ( $\gamma$ ) auf. Innerhalb der  $\alpha$ -Untereinheit der MMOH befindet sich das aktive Zentrum (Merkx et al., 2001).

Es besteht aus einem Glutamat- und Histidin-verbrückten Nicht-Häm-Dieisen-Zentrum und ist in einer bis- $\mu$ -hydroxo-Struktur angeordnet (Wang et al., 2015). Die MMOR hat eine Größe von etwa 38 kDa und dient dem Elektronentransfer von NADH zum aktiven Zentrum. Das regulatorischen Protein (MMOB) ist für die Enzymaktivität verantwortlich und weist eine Größe von etwa 15 kDa auf (Dalton, 2005; Ross and Rosenzweig, 2017; Trotsenko and Murrell, 2008). Das natürliche Reduktionsmittel der sMMO ist NADH (Fox et al., 1990; Semrau et al., 2010). Die Kristallstruktur ist in Abbildung 10 dargestellt.

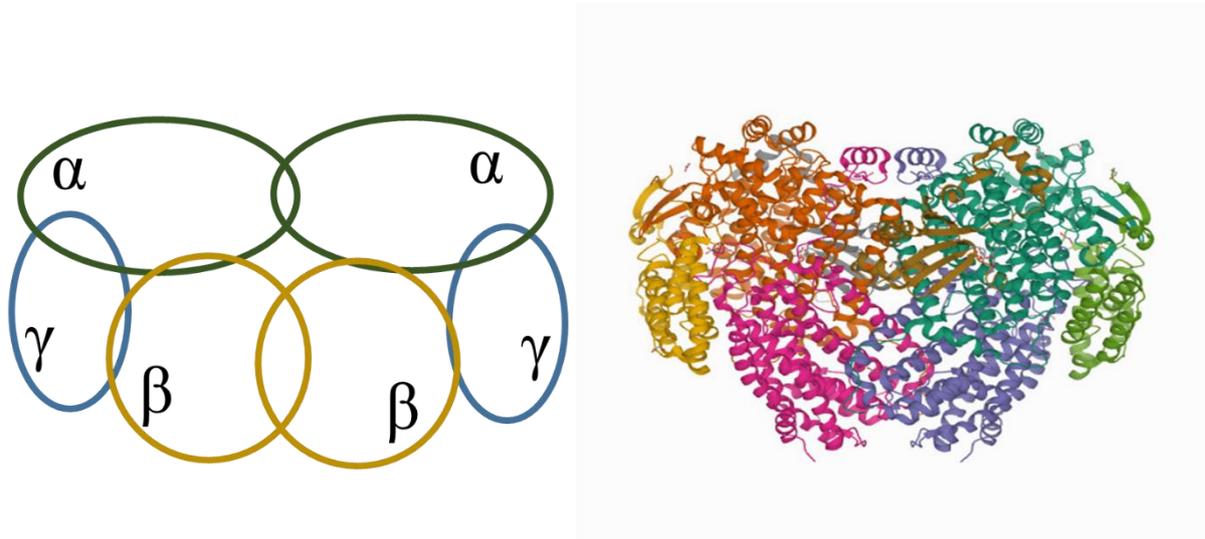


Abbildung 10: Schematische Anordnung der sMMO-Untereinheiten (links). Kristallstruktur der Hydroxylase und des regulatorischen Komplexes mit kleinen organischen Carboxylat-Gruppen im aktiven Zentrum der sMMO aus *M. trichosporium* OB3b (rechts) (Protein Data Bank, 2020)

Neben Methan kann die sMMO Alkane (bis C 8) sowie ungesättigte, verzweigte, zyklische, aromatische und halogenierte Kohlenwasserstoffe (KW) hydroxylieren oder epoxidieren (Burrows et al., 1984; Colby et al., 1977; Grosse et al., 1999). Damit ist ihr Substratspektrum größer als das der pMMO. Diese Tatsache macht die sMMO aus industrieller Sicht für einen Einsatz in der Bodensanierung, aber auch für die Anwendung als Biokatalysator, interessant (Dalton, 2005; Sullivan et al., 1998).

### 2.4.3 Strategien zur Kofaktor-Regeneration während der Oxidation von Benzol und Propylen

Wie zuvor erwähnt, kann abhängig vom jeweiligen Substrat bzw. Zielprodukt, sowohl die sMMO als auch die pMMO zur Ganzzellbiokatalyse eingesetzt werden (Kap. 2.4.1 und Kap. 2.4.2). In bisherigen Untersuchungen zeigte sich, dass eine Cofaktorregeneration für die Oxidation von Propylen zu Propylenoxid und von Benzol zu Phenol in beiden Fällen unerlässlich ist (Hou, 1984; Stanley et al., 1992; Xin et al., 2002). Im natürlichen Stoffwechsel der MOB werden die Cofaktoren durch eine Enzymkaskade regeneriert. In Abbildung 11 ist der Methan-

Metabolismus mit den zugehörigen Enzymen schematisch dargestellt. Zusätzlich zeigt Abbildung 11 die Oxidation von Benzol zu Phenol mit der sMMO und die Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid mittels pMMO. Sowohl Propylen als auch Benzol stellen hierbei sogenannte Nichtwachstumssubstrat dar. Die Oxidation von Methan wird in Anwesenheit der Nichtwachstumssubstrate inhibiert. Das bedeutet, dass der Organismus während der Biokatalyse bei der Edukte nicht in der Lage ist, ausreichend Cofaktoren zu regenerieren (Higgins et al., 1979; Xin et al., 2010).

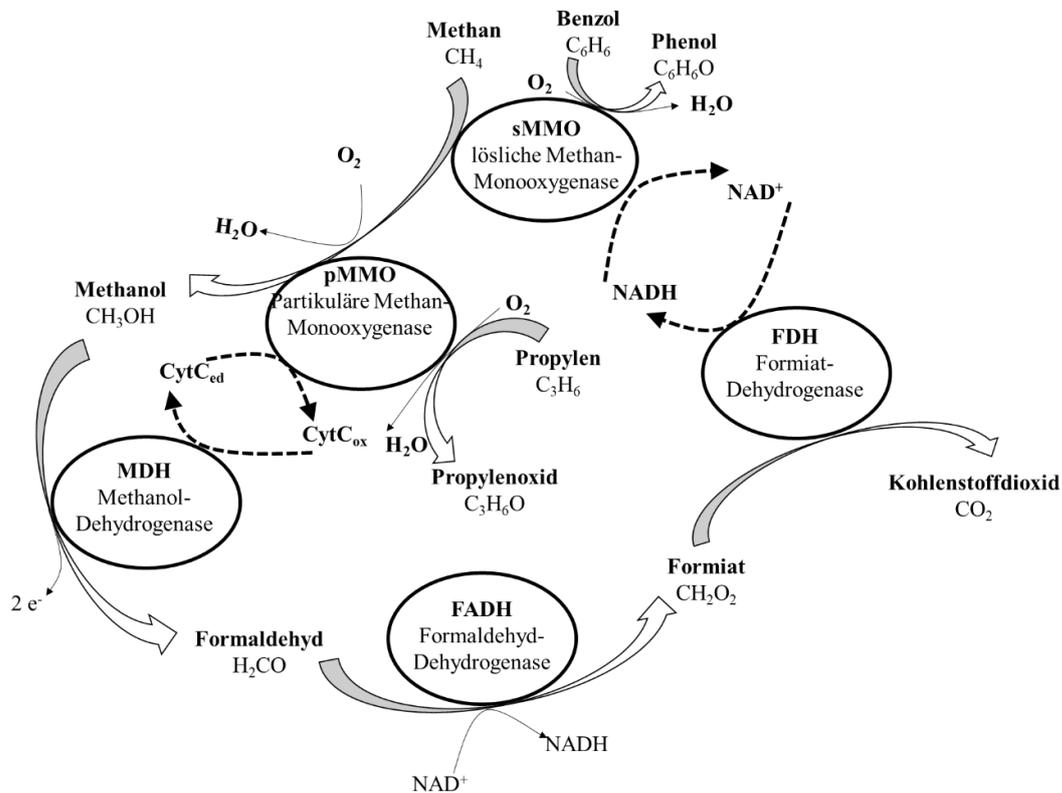


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Methan-Metabolismus mit den zugehörigen Enzymen sMMO (lösliche Methan-Monooxygenase), pMMO (membrangebundene Methan-Monooxygenase), MDH (Methanol-dehydrogenase), FADH (Formaldehyddehydrogenase) und FDH (Formiatdehydrogenase). Zusätzlich sind die Oxidationsreaktionen von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol inklusive der Kofaktorregenerierung skizziert. Modifiziert nach Hanson und Hanson (Hanson and Hanson, 1996).

Ohne die Zugabe eines zusätzlichen Elektronendonors endet die Oxidationsreaktion von Alkanen, Alkenen oder zyklischen Kohlenwasserstoffen mittels Methan-Monooxygenase, sowohl bei der pMMO als auch sMMO, bereits nach wenigen Minuten (Stanley and Dalton, 1992). Durch die gezielte Bereitstellung des Elektronendonors NADH oder dessen fortlaufende Bereitstellung über einen Regenerationszyklus durch die Zugabe von Formiat, Formaldehyd, Methanol oder Methan, kann die Oxidationsreaktion hingegen verlängert werden (Hou, 1984; Stanley et al., 1992; Stanley and Dalton, 1992). Die toxische Wirkung von Formiat, Formaldehyd und Methanol auf lebende Zellen hat zur Folge, dass diese potentiellen Substrate bei einer Ganzzellbiokatalyse nur in geringen Konzentrationen (Methanol > 2 mM, Formiat > 3 mM)

zugeführt werden können. Zudem handelt es sich bei den genannten Stoffen um kostenintensive Substanzen, weshalb die Regeneration mit Methan aus ökonomischen Gesichtspunkten eine sehr vielversprechende Alternative darstellt (Xin et al., 2002). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Regenerationsstrategien zur sequenziellen, mehrstufigen Regeneration der MMO auf Basis von Methan und Formiat erarbeitet (siehe Kap. 5.3.5 und 5.3.6).

### **3 Stand der Technik**

In dieser Arbeit wurden sowohl ein Rührkesselreaktor als auch erstmals zwei Membranbioreaktoren hinsichtlich der Fermentation von MOB zur Herstellung der sMMO und pMMO als auch der prozesstechnischen Durchführung der Ganzzellbiokatalyse von Benzol- und Propylen zu PO bzw. Phenol, untersucht. Alle wesentlichen, bislang für die biotechnologische Nutzung von MOB eingesetzten, Bioreaktoren werden in den folgenden Kapiteln beschrieben (Kap. 3.1.1 bis 3.1.4). Weiterführend wird zudem auf die Möglichkeit der blasenfreien Begasung mittels Membranen hinsichtlich eines effizienten Gaseintrages in flüssige Medien eingegangen (Kap. 3.2).

#### **3.1 Reaktorkonzepte für die Fermentation aerober, methanotropher Bakterien**

Für biotechnologische Anwendungen stehen derzeit eine Vielzahl von Reaktortypen zur Verfügung. Für die Fermentation von MOB werden bislang hauptsächlich der klassische Rührkesselreaktor (engl. „stirred-tank reactor“, „STR“) im Satzbetrieb und im kontinuierlichen Betrieb (engl. „continuous stirred-tank reactor“, CSTR) eingesetzt. Die größte technische Herausforderung bei der Gasfermentation im großen Maßstab ist ein effizienter Eintrag der schwer löslichen gasförmigen Substrate in die wässrige Phase (Mühlemeier et al., 2018; Munasinghe and Khanal, 2011). Wesentliche Einflussfaktoren auf die Gaslöslichkeit und die Transferrate sind die Temperatur, der Druck, die Medienzusammensetzung, der Oberflächenkontaktbereich der Gase (Gasblasengröße) sowie die Durchmischung des Reaktors (Chmiel, 2011).

Eine detaillierte Übersicht über alle wesentlichen Reaktortypen zur Gasfermentation findet sich im Buch „Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability“ (Kalyuzhnaya and Xing, 2018; Mühlemeier et al., 2018). Abbildung 12 gibt einen Überblick über alle wesentlichen Reaktortypen. Diese werden im Einzelnen in den nachfolgenden Kapiteln genauer beschrieben.

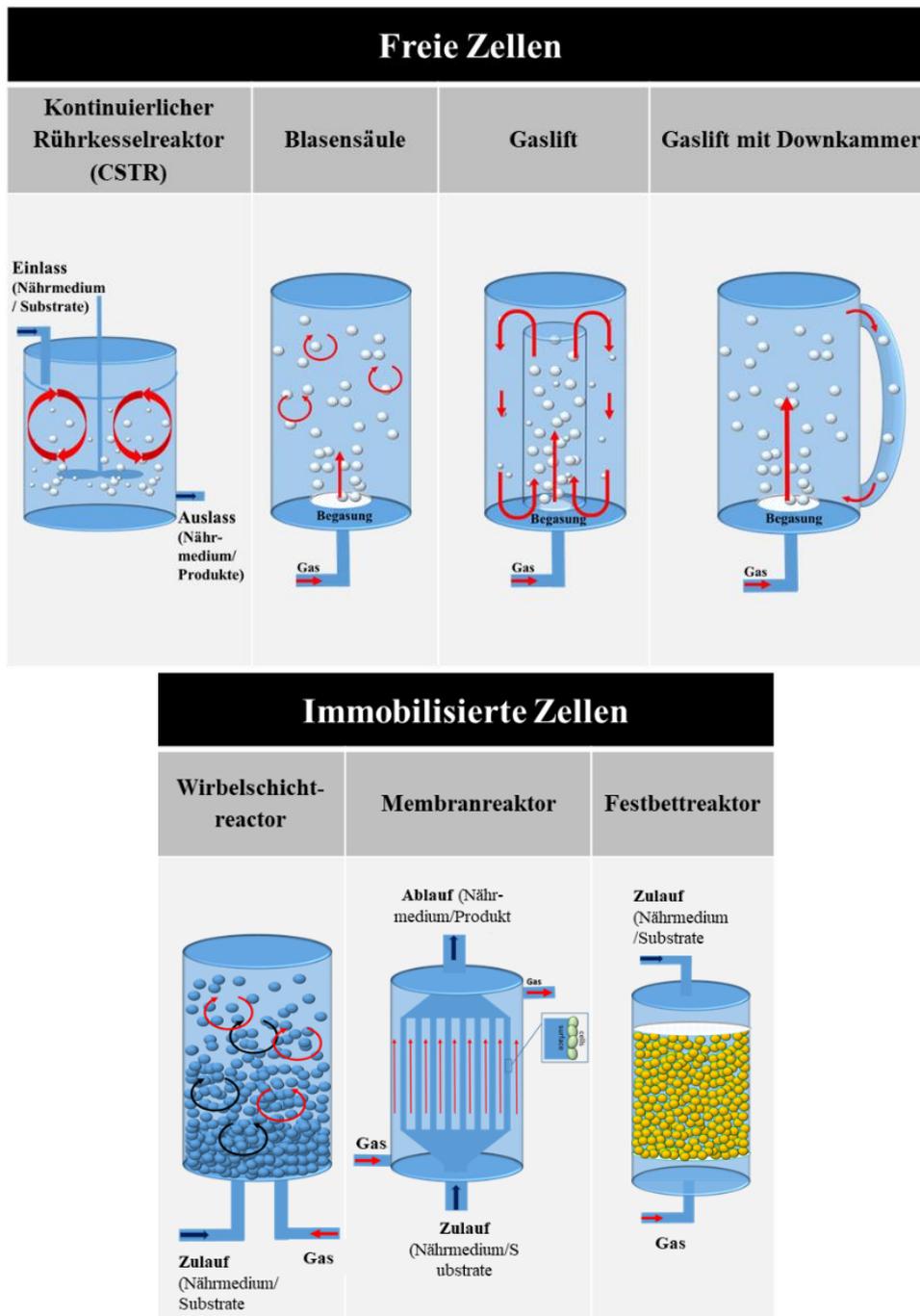


Abbildung 12: Übersicht über wesentliche Reaktortypen zur Kultivierung von MOB. Die roten Pfeile illustrieren den jeweiligen Gasfluss. Die blauen Pfeile zeigen den Stoffstrom. Die Abbildung wurde übernommen aus Mühlemeier et al. und geringfügig modifiziert (Mühlemeier et al., 2018).

### 3.1.1 Kontinuierlicher Rührkesselreaktor

Der in der Biotechnologie am umfangreichsten charakterisierte und am häufigsten eingesetzte Reaktor ist der Rührkesselreaktor (engl. „*Stirred tank reactor*“, STR) (Chmiel, 2011; Kalyuzhnaya and Xing, 2018). Der kontinuierlich betriebene Rührkesselreaktor (engl. „*Continuous stirred tank reactor*“, CSTR) erlaubt es, viele Fermentationsparameter zu variieren. Typischerweise besteht der Reaktor aus einem schlanken Glasbehälter welcher über Pratzen, Tragringe oder eine Standzarge fixiert wird. Über ein Rührwerk, welches über eine Antriebsstange

mit Motor und Getriebe von oben eingebaut ist, wird die Flüssigkeit im Reaktor durchmischt, sodass idealerweise weder Konzentrations- noch Temperaturgradienten entstehen. Zudem können pH-Elektroden zur pH-Überwachung und -Regelung, Temperaturfühler zur Temperaturüberwachung und -regelung angeschlossen werden. Ist es notwendig den Reaktor zusätzlich mit Gas zu versorgen, werden die Gase meist über eine Leitung unterhalb des Rührers in den Reaktor eingespeist. Durch den Rührer werden die Gase dispergiert und im Reaktor verteilt (Chmiel, 2011). Steigt allerdings der volumetrische Gasanteil im Hinblick auf das Gesamtvolumen des Reaktors, ist der CSTR nicht mehr effizient einsetzbar (Petersen et al., 2017; Villadsen et al., 2011). So können sich beispielsweise bei einem zu hohen Gasanteil Hohlräume um den Rührer bilden. Dies führt zu einer Minderung der ins flüssige Medium eingebrachten Energie und hat somit auch Einfluss auf den Massentransfer im Reaktor (Nienow and Lilly, 1979). Aus den genannten Gründen eignet sich der CSTR auch nur sehr bedingt für die großtechnische Produktion von SCP (Petersen et al., 2017).

Für die Fermentation von MOB wurde der CSTR beispielsweise von Gilman et al. 2015 zur Untersuchung des Effektes einer Methan- und Sauerstofflimitierung auf den Organismus *Methylomicrobium buryatense* 5GB eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C, einer relativ hohen Rührerdrehzahl von 1000 rpm sowie bei pH 8,8. Zur Substratversorgung wurden die Gase Methan und Sauerstoff vorab gemischt (Gilman et al., 2015). Wesentlich früher führten Park et al. (1991/1992) Fermentationen im CSTR durch. Ziel ihrer Arbeit war es, die pMMO-Synthese bzw. die sMMO-Synthese im Organismus *M. trichosporium* OB3b zu optimieren. Während der pMMO-Synthese erfolgte die Einleitung der Gase Methan und Sauerstoff in den Reaktor getrennt voneinander. Methan wurde mit 600 mL min<sup>-1</sup> und Sauerstoff mit 200 mL min<sup>-1</sup> zudosiert. Die Temperatur des Reaktors wurde auf 30 °C gehalten und der pH-Wert lag zwischen 4,2 und 6,8. Durchmischt wurde die Flüssigphase bei einer Rührerdrehzahl von 500 rpm. Außerdem wurde während der Fermentation eine Verdünnungsrate von 0,06 h<sup>-1</sup> eingestellt (Park et al., 1992, 1991). Die durch Park et al. publizierten Betriebsparameter bilden eine erste Grundlage zur Fermentation von *M. trichosporium* OB3b im CSTR und dienen daher auch als Basis für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Fermentationsversuche.

### **3.1.2 Blasensäulenreaktoren und Gaslift-Reaktoren**

Bei Blasensäulen oder auch Gaslift-Reaktoren handelt es sich um Bioreaktoren, welche in der Biotechnologie für Fermentationen mit großen Gasvolumenströmen eingesetzt werden. Durch das Einbringen der Gase am unteren Ende des Reaktors wird eine Durchmischung der flüssigen

Phase erzielt. Dies ermöglicht einen Betrieb ohne weitere mechanische Mischer und somit ohne zusätzlichen Energieeintrag. Wird der Blasensäulenreaktor durch ein coaxiales Rohr oder ein seitliches Rohr zur Mediumsrückführung erweitert, spricht man von einem Gaslift-Reaktor. Durch die zusätzliche Mediumsrückführung wird die Durchmischung im Reaktor verbessert. Bedingt durch den vergleichsweise geringen Energieeintrag sind Gaslift-Reaktoren im industriellen Maßstab, im Vergleich zu herkömmlichen CSTR, deutlich interessanter für Gasfermentationen. Zudem ist der volumenbezogene Stoffübergangskoeffizient ( $k_{LA}$ ) mit  $200 - 1800 \text{ h}^{-1}$  deutlich höher als im CSTR mit  $50 - 500 \text{ h}^{-1}$  (Bredwell et al., 1999; Chmiel, 2011; Yazdian et al., 2012). Zur Verbesserung der Rezirkulation der Gase kann zusätzlich eine Düse in den Reaktor integriert werden. Folglich wird in diesem Fall von einem Loop-Reaktor gesprochen. Die Düse dispergiert die Gase und als Folge des entstehenden Differentialdruckes wird eine Rezirkulation der Gase erreicht. Loop-Reaktoren können im Labormaßstab und im industriellen Maßstab mit einem Volumen von bis zu  $3000 \text{ m}^3$  betrieben werden (Baerns et al., 2014).

Eine weitere Modifikation des Loop-Reaktors stellt der U-Loop-Reaktor dar (Abbildung 13).

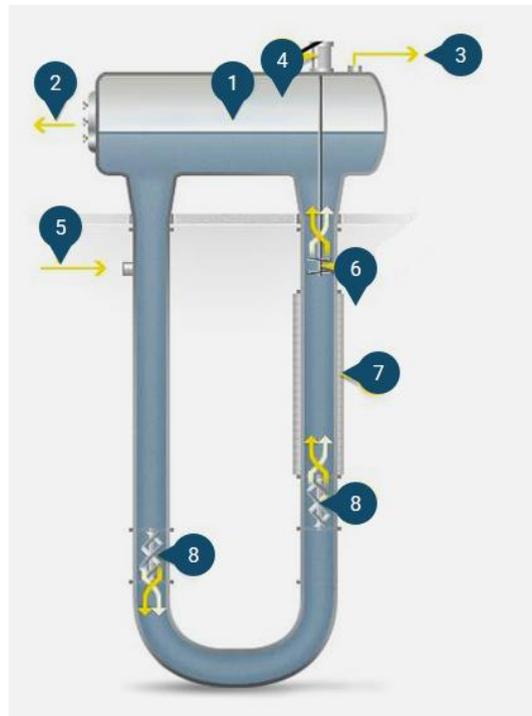


Abbildung 13: Gezeigt ist der U-Loop-Reaktor zur Gasfermentation. (1) Entgasungseinheit, (2) Kontinuierliche Ernte der Biomasse, (3)  $\text{CO}_2$ -Auslass, (4) Pumpendüse, (5) Einlass für das Nährmedium, (6) Propellerpumpe, (7) Kühlung, (8) statische Mischer (Petersen et al., 2017; Unibio, 2020).

Dieser unterscheidet sich hinsichtlich des klassischen Loop-Reaktors durch ein vertikales Rohr, in dem die Gas- und die Flüssigphase durch statische Mischer durchmisch werden. Der zylindrische Tank oberhalb des U-Rohrs dient dabei als Entgasungseinheit. Um dem Prozess etwaige durch den Stoffwechsel der verwendeten Mikroorganismen gebildeten Gase zu entziehen, ist

ein Rohrwärmetauscher integriert (Petersen et al., 2017). Wesentlicher Nachteil dieses Reaktorsystems ist die Tatsache, dass bei hohen Biomassekonzentrationen die durch die notwendige Pumpe verursachten Energiekosten steigen und sich der Gastransfer bei hohen Biomassekonzentrationen deutlich verschlechtert (Stone, 2017). Anwendung findet der U-Loop-Reaktor im industriellen Maßstab bei der Produktion von Single Cell Proteinen (SCP) auf Basis des Organismus *Methylococcus capsulatus*. Ein entsprechender Prozess wird derzeit beispielsweise von der Firma Unibio durchgeführt (Unibio, 2020).

### 3.1.3 Membranbioreaktoren

Membranbioreaktoren (MBR) werden in der Biotechnologie meist zur Dialyse, in der Abluftreinigung oder zur Zellrückhaltung eingesetzt (Chmiel, 2011). In MBR können Zellen frei oder immobilisiert vorliegen. Die Integration sogenannter dichter Membranen (Lösungs-Diffusions-Membranen) in einen Bioreaktor ermöglicht eine blasenfreie Begasung (Kahlig, 2018). Dies hat z.B. gegenüber CSTR den Vorteil, dass die Bildung explosiver Gasgemische bei der Fermentation von MOB mit Sauerstoff und Methan verhindert werden kann<sup>1</sup> (Yaws and Braker, 2001). Bei Nutzung makroporöser Membranen kann die blasenfreie Begasung jedoch nur bei sehr niedrigem Druck erfolgen, da sonst zweiphasige Gemische entstehen können. Beispielsweise legten Pen et al. (2014) einen Druck von ca. 0,13 bar an die integrierte makroporöse Membran an (Pen et al., 2014). Die Verwendung von dichten Membranen ermöglicht hingegen das Anlegen von höherem Druck. In dieser Arbeit wurden bis zu 4 bar Druck auf die Membran angelegt (Kap. 5.1).

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals geschüttelte Bioreaktoren zur blasenfreien Begasung von MOB eingesetzt, wie sie typischerweise in der Algenbiotechnologie eingesetzt werden, um eine ausreichende CO<sub>2</sub>-Versorgung der photoautotrophen Organismen zu gewährleisten. Die sogenannten Hochdichtekultivatoren (engl. „High-Density Cultivators“, HDC) sind mit einer 40 µm dünnen hydrophoben Polypropylen-Membran (TreoPore PDA 40) ausgestattet, welche den Boden der Reaktoren bilden (siehe Abbildung 14). Die Gase werden an der Membran vorbeigeleitet und gelangen durch diffusiven Stofftransport in das flüssige Medium.

---

<sup>1</sup>Für ein Methan-Luftgemisch liegt die untere Explosionsgrenze bei einem Methananteil von etwa 5 % und die obere Explosionsgrenze bei etwa 15 % (Yaws and Braker, 2001).

Die, bedingt durch den Stoffwechsel der jeweiligen Mikroorganismen entstehenden Gase können über eine zweite, in den Deckel des Reaktors integrierte Membran, entweichen (Bähr et al., 2016; CellDEG, 2020). Diese kommerziell erhältlichen Reaktoren bieten den Vorteil, dass die Kulturen blasenfrei begast werden können. Zudem bieten sie die Möglichkeit bis zu 45 Inkubatoren gleichzeitig zu verwenden. Das maximale Kultivierungsvolumen beträgt 2 L. In der Literatur sind bislang keine Fermentationsprozesse von MOB mittels Membranbioreaktoren beschrieben.

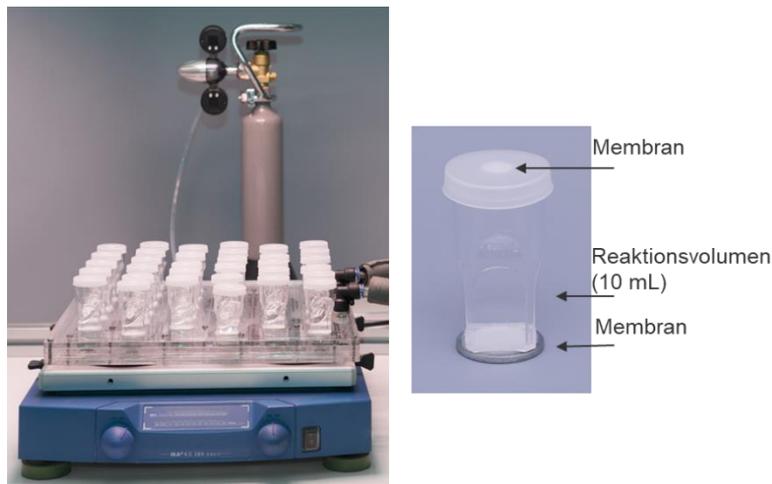


Abbildung 14: Aufnahmen der HDC10-Membranbioreaktoren der Firma CellDEG. Zu erkennen ist die Kultivierungsplattform mit den zugehörigen HDC10-Inkubatoren (links) sowie ein einzelner 10 mL-Inkubator (rechts) (CellDEG, 2020).

Im Hinblick auf Membranreaktoren wurden bislang hauptsächlich Prozesse zur Herstellung von Methanol mit MOB beschreiben. Pen et al. (2014) nutzten beispielsweise makroporöse Hohlfasermodule um MOB während der Methanolsynthese mit Methan und Luft zu versorgen (Pen et al., 2014). Auf DEAE-Zellulose-Membranen immobilisierte *M. trichosporium* OB3b Zellen wurden von Mehta et al. (1991) zur Produktion von Methanol eingesetzt (Mehta et al., 1991). Die Versorgung der Zellen erfolgte hierbei mit einem Methan-Sauerstoff Gemisch im Verhältnis 1:2. Die Experimente wurden bei 35 °C und pH 6,4 in 100 mM Phosphatpuffer mit 5 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Yu et al. (2003) demonstrierten die Verwendung eines MBR zur Zellrückhaltung. Hierbei wurde ein Hohlfasermembranmodul zur Zellrückhaltung verwendet. Dadurch wurde eine definierte Kupferkonzentration im Nährmedium über den zeitlichen Verlauf der Fermentation in einem klassischen CSTR erreicht. Zur eigentlichen Fermentation des Organismus *Methylococcus capsulatus* (Bath) wurde ein 5 L CSTR mit Methan (0,7 L min<sup>-1</sup>) und Sauerstoff (1,3 L min<sup>-1</sup>) begast. Der verwendete pH-Wert lag zwischen 6,8 und 7,4, bei einer Rührerdrehzahl zwischen 200 und 800 rpm. Mit dieser neuen Methode der Kultivierung gelang es den Autoren den Effekt der Kupferkonzentration im Nährmedium auf die Kupferkonzentration der Membran als auch die spez. Aktivität des Enzyms zu untersuchen.

Die optimale Kupferkonzentration während dieser Untersuchungen lag bei 30 bis 35  $\mu\text{M}$  (Yu et al., 2003).

Dichte Silikonmembranen fanden zur Herstellung von Methanol in der Arbeit von Duan et al. (2011) Verwendung. Duan et al. integrierten zwei Silikonschläuche in einen Rührkesselreaktor, sodass Sauerstoff und Methan getrennt voneinander blasenfrei in die wässrige Phase eingebracht werden konnten. Dabei variierten sie das Methan-Sauerstoff-Verhältnis zwischen 10:1 und 5:1. Während der Experimente wurde eine Temperatur von 30 °C und ein pH-Wert von 7,0 verwendet. Die Rührerdrehzahl variierte je nach Bedarf. Unter optimierten Bedingungen gelang es ihnen, 1,1 g L<sup>-1</sup> Methanol im Reaktionsmedium anzureichern (Duan et al., 2011). Weil für einen optimalen Stoffeintrag die Membranoberfläche bei diesem Prozess sehr hoch sein muss, ist diese Variante nicht für den großtechnischen Maßstab geeignet.

Ein Reaktor, der die blasenfreie Begasung von Methan und Sauerstoff räumlich getrennt voneinander gewährleisten kann und zudem skalierbar ist, wurde am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP) der Universität Stuttgart entwickelt. Dieser bislang nicht kommerziell erhältliche Doppelmembranbioreaktor (DMBR) basiert auf dem Prinzip einer Kammerfilterpresse (Abbildung 15, A). Der Reaktor besteht aus sechs Modulen (Abbildung 15, B). Ein Modul (siehe Abbildung 15 C) besteht jeweils aus einem Gaskompartiment sowie einer Flüssigkammer und einem zweiten Gaskompartiment. Die Kammern werden jeweils durch eine dichte Silikonmembran voneinander getrennt (Brebeck, 2018). Der Name des Reaktors leitet sich von den zwei zur Trennung der Flüssig- und Gasphase benötigten Membranen ab. Das Flüssigvolumen einer einzelnen Kammer beträgt 0,53 L, wodurch sich ein Gesamtreaktorvolumen von 3,18 L ergibt (siehe Kap. 4.4.5). Die Kultivierung von MOB im DMBR wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit untersucht.

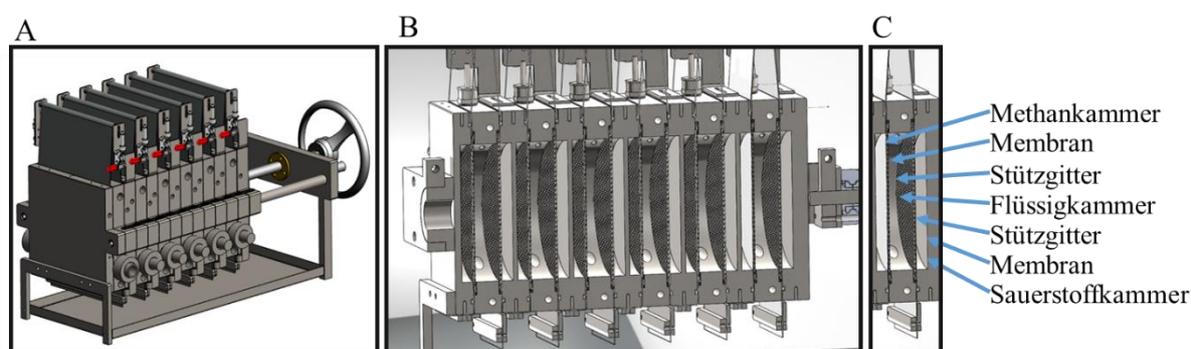


Abbildung 15: Doppelmembranbioreaktor für die Kultivierung von MOB. (A, B) DMBR mit 6 Modulen. (C) Ein Modul besteht aus je einem Gaskompartiment links, einer Flüssigkammer in der Mitte und einer Gaskompartiment rechts. Rechts ist ein Querschnitt des Reaktors dargestellt.

### 3.1.4 Wirbelschicht- und Festbett-Reaktoren

Eine weitere Möglichkeit für die Zellrückhaltung stellt die Immobilisierung der Zellen auf Trägermaterial dar. Die immobilisierten Zellen können anschließend entweder in Wirbelschichtreaktoren oder auch in Festbettreaktoren z.B. zur Ganzzellbiokatalyse eingesetzt werden. Im Fall des Wirbelschichtreaktors werden die Zellen an eine Trägerschicht immobilisiert. Durch eine aufwärtsgerichtete Strömung werden diese in einen fluidisierten Zustand versetzt, wodurch eine Durchmischung im Reaktor erzielt wird. Im Festbettreaktor liegen die Zellen hingegen immobilisiert an ein Trägermaterial vor. Das Flüssigmedium fließt dabei meist von oben in einem dünnen Film an den Zellen vorbei, wobei Gase in entgegengesetzter Richtung durch den Reaktor geleitet werden. Durch die Nutzung der Schwerkraft wird hierbei relativ wenig Energie benötigt. Beide genannten Reaktortypen finden typischerweise bei der Durchführung enzymatischer Reaktionen Verwendung und werden nicht zur Biomassegewinnung eingesetzt.

Shimomura et al. (1997) immobilisierten auf diese Weise methanoxidierende Bakterien in Alginatekügelchen zum Abbau von Trichlorethylen (TCE). Sie setzten einen 20 L Wirbelschichtreaktor ein, welcher mit den immobilisierten Zellen befüllt wurde. Zur Methan- und Luftversorgung wurden die Gase vorab gemischt und mit einer Flussrate von  $130 \text{ mL min}^{-1}$  zugeführt. Im Reaktor war zudem eine Gasrückführung integriert. So konnten die nicht verbrauchten Gase mit  $3 \text{ L min}^{-1}$  wieder dem Kreislauf zugeführt werden. Im gezeigten Prozess gelang es den Autoren die TCE-Konzentration nach 2,56 h von  $0,9$  bis  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $0,1$  bis  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  zu reduzieren (Shimomura et al., 1997). Ein Zwei-Phasen-Rieselfilterreaktor, eine Art Festbettreaktor, über den eine flüssige Phase von oben nach unten fließt, nutzten Lebrero et al. (2015) zum Methanabbau (Lebrero et al., 2015). Gepackt wurde ein 4 L-Reaktor mit den Außenmaßen  $1 \times 0,08 \text{ m}$ , mit  $1 \text{ cm}^3$  großen Würfeln aus Polyurethanschaum. Zum Abbau von Methan wurde ein Methan-Luft-Gemisch von unten mit  $1 \text{ L min}^{-1}$  zugeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zugabe einer nicht-wässrigen Phase zu einer verbesserten Methanreduktion führt (Lebrero et al., 2015).

Wenngleich die Immobilisierung von Zellen gegenüber dem Einsatz freier Zellen zusätzlichen präparativen Aufwand verursacht und auch die Regeneration der immobilisierten Zellen, z.B. durch das Zuführen von Cofaktoren, erschwert wird, funktionieren immobilisierte Ganzzellbiokatalysatoren häufig stabiler. Während ihrer Untersuchung zur Herstellung von Methanol aus Methan zeigten Patel et al. (2016) beispielsweise, dass die immobilisierten *Methylosinus sporium* Zellen im Vergleich zu freien Zellen eine deutlich bessere Aktivität von 52 bis 62 % nach sechs Oxidationszyklen zeigten (Patel et al., 2016).

## 3.2 Membranen zur blasenfreien Begasung von Nährmedien mit Methan und Sauerstoff

Da Sauerstoff und Methan unter atmosphärischem Druck nur eine sehr geringe Löslichkeit in Wasser aufweisen, spielt der Gaseintrag in die flüssige Phase bei der Fermentation von MOB, eine entscheidende Rolle (Chmiel, 2011). Dabei bietet die blasenfreie Begasung über Membranen wesentliche prozesstechnische Vorteile gegenüber der direkten Begasung unter Blasenbildung. Ein entscheidender Vorteil im Hinblick auf die Prozesssicherheit besteht darin, dass durch die Verwendung dichter Membranen keine Blasenkoaleszenz auftreten kann und somit keine explodierfähigen Gasblasen entstehen können. Des Weiteren entstehen keine blasenbedingten Scherkräfte und es kommt deshalb nicht zur unerwünschten Schaumbildung. Dies wiederum hat zur Folge, dass der Einsatz von Antischaummitteln reduziert werden kann (Chmiel, 2011; Hambach, 1994).

Eine blasenfreie Begasung über dichte Polymermembranen wurde bereits bei der Fermentation von Säugertierzellen, zur zellfreien Proteinsynthese sowie zur Synthese von Methanol mittels MOB eingesetzt (Duan et al., 2011; Hambach, 1994; Kahlig, 2018; Pen et al., 2014). Eine blasenfreie Begasung kann dabei über makroporöse oder dichte Membranen erfolgen (Duan et al., 2011; Pen et al., 2014). Polymermembranen mit Poren von 0,1 µm bis 0,45 µm werden als makroporöse Membranen bezeichnet (Ahmed and Semmens, 1992; Baker, 2012). Im Vergleich zu dichten Membranen ist der Stofftransport in makroporösen Membranen erhöht (Kraume, 2003). In makroporösen Membranen findet der Stofftransport durch Konvektion und Knudsen-Diffusion statt (Wilhelm, 2008). Durch den Begriff Knudsen-Diffusion wird der Zusammenstoß von Molekülen mit der Porenwand beschrieben, der häufiger stattfindet als der mit anderen Teilchen. Die blasenfreie Begasung kann in makroporösen Membranen jedoch nur bei geringem Druck gewährleistet werden.

In dieser Arbeit wurde Polydimethylsiloxan-Membranen (PDMS) verwendet, da sie eine blasenfreie Begasung gewährleisten und als Dichtung fungieren. PDMS hat die chemische Formel  $(C_2H_6OSi)_n$  (siehe Abbildung 16) und gehört somit zur Gruppe der Silicone (GESTIS-Stoffdatenbank, 2021c).

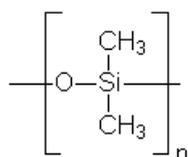


Abbildung 16: Strukturformel von Polydimethylsiloxan (PDMS) mit der Summenformel  $(C_2H_6OSi)_n$ .

Die Siliziumatome werden durch Sauerstoffatome verbunden, wodurch sich die folgende Molekülstruktur ergibt. Die organischen Seitenketten verleihen den Siliconen ihre folgenden Eigenschaften.

Bei PDMS handelt es sich um ein inertes Polymer, welches gegen Oxidation hochresistent ist. Die Viskosität des Polymers ist abhängig von der jeweiligen Molmasse. PDMS-Membranen zeichnen sich des Weiteren durch ihre gute thermische und chemische Beständigkeit aus (Balgobin, 2012). Darüber hinaus weisen PDMS-Membranen eine gute Durchlässigkeit für Sauerstoff und Methan auf. Die Löslichkeit hängt wiederum von dem Lennard-Jones-Potential des Sorbens und damit von zahlreichen weiteren Parametern ab. Dies sind unter anderem die kritische Temperatur, die Molekülgröße, die Van-der-Waals-Kräfte sowie die Kettenbeweglichkeit der Polymersegmente und die Glasübergangstemperatur (Melin and Rautenbach, 2007; Robb, 1968; Tremblay et al., 2006). Die Permeabilität von Sauerstoff in PDMS-Membranen ist deutlich höher als in anderen Materialien (Robb, 1968). Aufgrund der genannten Eigenschaften eignen sich kommerziell erhältliche dichte PDMS-Membranen prinzipiell zur blasenfreien Begasung von MOB mit Methan und Sauerstoff, weshalb sie zu diesem Zweck in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurden.

## 4 Materialien und Methoden

In den nachfolgenden Kapiteln werden die in dieser Arbeit eingesetzten Materialien und Methoden beschrieben. Eine Geräteliste aller eingesetzten Geräte befindet sich im Angang in Tabelle 21.

### 4.1 Membranscreening

Das Membranscreening für den neu entwickelten DMBR wurde in einem von A. Kahlig (2018) entwickelten Membranreaktor durchgeführt (Kahlig, 2018). Der Reaktor besteht im Wesentlichen aus einem Deckel, dem Reaktorboden und einem Einbauteil (Abbildung 17). Durch das Einsetzen einer Membran zwischen Deckel und Unterboden wird die Flüssigkammer von der Gaskammer getrennt. Eine detaillierte Beschreibung des Reaktors findet sich in der Arbeit von A. Kahlig (2018). Die zu testenden dichten Silikonmembranen mit der Dicke zwischen 0,5 und 5 mm wurden kreisförmig mit einem Durchmesser von 76 mm ausgestochen und in den Reaktor eingespannt. Die Membran trennt dadurch die Gaskammer von der Flüssigkammer. Die Gase Methan, Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff wurden durch das Anlegen von Druck (2 und 4 bar) durch die Membran in die Flüssigkeit eingetragen. Sowohl die Methan- als auch Kohlenstoffdioxid-Konzentration in der Flüssigphase wurde anschließend mit einem Echtzeit-Massenspektrometer der Firma Variolytics, wie in Kap. 4.5.4 beschrieben, erfasst. Die Sauerstoffkonzentration wurde mittels einer Sauerstoffelektrode der Firma Presense gemessen.

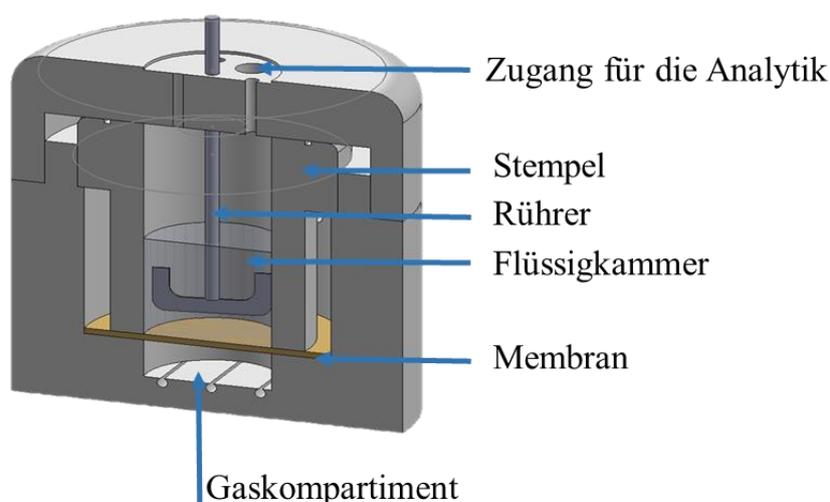


Abbildung 17: Membranreaktor zu blasenfreien Begasung von Zellkulturen. Über die Membran oberhalb der Gaskammer gelangen die Gase blasenfrei in das Medium. Die Gelöstgaskonzentration von Sauerstoff, Methan und CO<sub>2</sub> wurde direkt in der wässrigen Phase mit einem Sauerstoffsensoren bzw. dem Echtzeit-Massenspektrometer gemessen. Eine detaillierte Beschreibung des verwendeten Reaktors findet sich in der Arbeit von A. Kahlig (2018).

## 4.2 Stammhaltung und Vorkulturen

Der in dieser Arbeit verwendete Organismus *Methylophilus trichosporium* OB3b wurde von Prof. Dr. M. Pietzsch (Arbeitsgruppe für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Die Stammhaltung erfolgte in Serumflaschen in mod. NMS-Medium (siehe Angang Kap. 4.3) bei 4 °C. Um ausreichend Vorkultur für die Versuche in Serumflaschen, in den Membranbioreaktoren (HDC10, CellDEG) und in den Rührkesselreaktoren (DasGip, Eppendorf) zu erzeugen, wurden ausgehend von der Stammhaltung 500 mL Erlenmeyerkolben mit 200 mL mod. NMS-Medium mit einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,1 bis 0,3 inokuliert. Anschließend wurden die Kulturen zweimal pro Tag mit einer Gasmischung bestehend aus 30 % v/v Methan und 70 % v/v Luft begast. Die Gasversorgung erfolgte über einen sterilen Filter mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  und einer Filterfläche von 20  $\text{cm}^2$  (Midisart 2000, Sartorius stedim).

## 4.3 Zusammensetzung des Kultivierungsmediums

Für die Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b wurde mod. NMS-Medium aus der Arbeit von A. Griethe eingesetzt (Griethe, 2018). Die detaillierte Zusammensetzung der einzelnen Lösungen 1 – 6 des Nährmediums ist in Tabelle 24 im Anhang aufgelistet. Die einzelnen Lösungen wurden separat autoklaviert (121 °C, 20 min) und, wie in Tabelle 1 beschrieben, zusammengeführt.

Tabelle 1: Volumetrische Zusammensetzung des mod. NMS-Nährmediums. Die detaillierte Zusammensetzung der Stammlösungen 1 bis 6 ist im Anhang Kap. 8.1.4 dargestellt.

Lösung	Menge für 1 L
#1 NMS (2-fach konzentriert)	500 mL
#2 Magnesiumsulfat (100x $\text{Mg}^{2+}$ )	10 mL
#3 Natriumhydrogencarbonat (100x $\text{HCO}_3^-$ )	10 mL
#4 Eisencitrat (100x $\text{Fe}^{2+}$ )	10 mL
#5 Spurenelemente (500x Spurenelemente)	2 mL
#6 Kupfer (1000x $\text{Cu}^{2+}$ )	1 mL
Wasser (MilliQ)	167 mL (für pMMO), 168 mL (für sMMO)

Um den Einfluss ausgewählter Medienbestandteile zu untersuchen, wurden Stammlösungen der zu variierenden Medienbestandteile (siehe Tabelle 2) hergestellt und autoklaviert (121 °C, 20 min). Auf Basis der Stammlösungen wurde die Zusammensetzung des Nährmediums, wie in Tab. 2 dargestellt, variiert.

Tabelle 2: Variation der Medienbestandteile

Medien Bestandteile	Originalmedium (mM)	Variation (mM)
Nitrat	10	5; 20
Ammonium	-	5; 10; 20
Phosphat	25	5; 10; 25; 40
Eisen	0,05 (Eisensulfat)	0,05 (Eisencitrat)

#### 4.4 Verwendete Reaktortypen für die Fermentation von *Methylosinus trichosporium* OB3b

Zur Fermentation von *M. trichosporium* OB3b wurden ausgewählte Reaktortypen eingesetzt. Diese sind in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

##### 4.4.1 Kultivierung in Serumflaschen

Die Kultivierung in Serumflaschen mit einem Gesamtvolumen von 240 ml und einem Flüssigvolumen von 20 mL erfolgte bei 30 °C auf einem Orbitalschüttler (KS 4000i control, IKA Works Inc.) bei 150 rpm. Für das Inokulum wurden die Zellen aus der Stammhaltung bei 17 g für 10 min und 4 °C zentrifugiert (HERAEUS Fresco 17 Centrifuge, Thermo Scientific), in 1 mL mod. NMS-Medium resuspendiert und anschließend erneut bei 4000 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde nachfolgend verworfen und das Zellpellet in 1 mL mod. NMS-Medium gelöst. Es erfolgte anschließend die Überführung der Zellen in Serumflaschen mit 19 mL Nährmedium. Die Serumflaschen wurden mit einem Butyl-Hohlstopfen und einer Bördelkappe luftdicht verschlossen. Als Kohlenstoffquelle wurden 100 mL Methan über eine Spritze mit einem vorgesetzten Sterilfilter (Porengröße = 0,25 µm) zugesetzt.

##### 4.4.2 Kultivierung im Schüttelkolben

Um ausreichend Biomasse für die Versuche in den Membranbioreaktoren (HD10) und im Rührkessel zu erzeugen, wurde die Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b im Schüttelkolben durchgeführt. Hierfür wurde die Kultur über einen sterilen Filter zweimal pro Tag für 10 min mit 100 mL min<sup>-1</sup> mit einem Methan-Luftgemisch (30 %<sub>v/v</sub> Methan) begast. Als Inokulum diente die Vorkultur aus den Serumflaschen (Kap. 4.4.1). Die Zellen zum Inokulieren der Schüttelkolben wurden analog zum Inokulum der Serumflaschen (Kapitel 4.4.1) zentrifugiert, gewaschen, in 1 mL mod. NMS-medium resuspendiert und die Schüttelkolben anschließend mit einer Start OD<sub>600</sub> = 0,3 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte auf einem Orbitalschüttler bei 150 rpm.

#### 4.4.3 Kultivierung im Rührkesselbioreaktor

Die Kultivierung im Rührkesselreaktor erfolgte im 1 L DASGIP<sup>®</sup> Parallel Bioreaktor System der Firma Eppendorf. In diesem System konnten für eine Mehrfachbestimmung bis zu vier Reaktoren gleichzeitig betrieben werden. Die Fermentation erfolgte bei einer Temperatur von 30 °C und einer Rührerdrehzahl von 800 rpm. Der pH-Wert wurde durch eine interne Säureregulation konstant bei 6,7 gehalten. Die Versorgung der Kultur mit Methan und Sauerstoff erfolgte durch ein Methan-Luftgemisch (30 %<sub>v/v</sub> Methan), welches zuvor durch ein Gasmischgerät (GMS\_3CH, Fa. QCal) kontinuierlich gemischt wurde. Der Eintrag in die Rührkesselreaktoren erfolgte bei einem Gasvolumenstrom von 0,5 L min<sup>-1</sup>. Zur Messung des Effektes von CO<sub>2</sub> auf die Wachstumskinetik der MOB wurde die Gaszusammensetzung mit dem Gasmischgerät (GMS\_3CH, Fa. QCal) entsprechend der Versuche variiert und das Gasgemisch ebenfalls mit 0,5 L min<sup>-1</sup> in die Rührkesselreaktoren eingebracht.

Die Inokulation erfolgte bei einer optischen Dichte im Bereich von OD<sub>600</sub> = 0,1 - 0,3. Das benötigte Kulturvolumen wurde in sterile, konische Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2898 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 mL NMS-Medium resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in sterile Spritzen mit Kanülen aufgenommen und über ein Septum in den Reaktor injiziert. Zur Aufzeichnung der Biomassekonzentration wurde einmal pro Tag eine Probe aus dem Reaktor entnommen und in einem Spektrophotometer U-2900 (Hitachi High-Technologies Corporation) bei 600 nm vermessen.

#### 4.4.4 Kultivierung im Hochzelldichtemembranbioreaktor

Zur Untersuchung des Einflusses ausgewählter Medienbestandteile auf die Wachstumskinetik von *M. trichosporium* OB3b und für den Vergleich der unterschiedlichen Reaktortypen wurde in dieser Arbeit erstmals die Kultivierung in HDC10-Membranbioreaktoren der Firma CellDEG etabliert. Die Kultivierung hierfür erfolgte auf einem Orbitalschüttler bei 300 rpm und 30 °C. Zu Beginn jeder Kultivierung wurden die Membranbioreaktoren (V= 10 mL) mit einer OD<sub>600</sub> = 0,1-0,3 inokuliert. In Abhängigkeit der zu untersuchenden Medienbestandteile wurde das Medium hergestellt (Kapitel 4.3). Auf der Screening-Plattform konnten maximal 22 Wachstumskinetiken parallel aufgenommen werden. Die Änderung der Zelldichte wurde über ein nichtinvasives Messverfahren mittels High-Range-Transmission-Turbidity-Sensor (HRTTS, CellDEG) detektiert. Um eine organismenspezifische Kalibriergerade zu erstellen, wurde das Signal des HRTTS mit dem Signal der photometrischen Bestimmung korreliert. Die photometrische Messung erfolgte an einem Spectrophotometer bei 600 nm.

#### 4.4.5 Kultivierung im neuartigen Doppelmembranbioreaktor

Der DMBR (Abbildung 18) wurde vor der Verwendung für 20 min bei 100 °C Dampfsterilisiert. Anschließend wurde der Reaktor mit NMS-Medium gespült und mit 3,4 L NMS-Medium befüllt. Die Inokulation erfolgte über eine Spritze mit Kanüle direkt in den DMBR. Die Fermentation wurde bei 30 °C, einem Pumpendurchsatz von 2,2 L min<sup>-1</sup> und ohne pH-Regelung durchgeführt. Die Begasung der Bakteriensuspension erfolgte über das Anlegen von 1 bar Druck auf die Gaskammer mit Methan (100 %<sub>v/v</sub>) und Sauerstoff (100 %<sub>v/v</sub>). Über die jeweilige Membran diffundierten die Gase blasenfrei in die Bakteriensuspension. Zur Aufzeichnung der Biomassekonzentration wurde einmal pro Tag eine Probe aus dem Reaktor entnommen und in einem Spektrophotometer bei 600 nm vermessen. Ein schematische Darstellung der Fermentation ist in Abbildung 19 gezeigt.

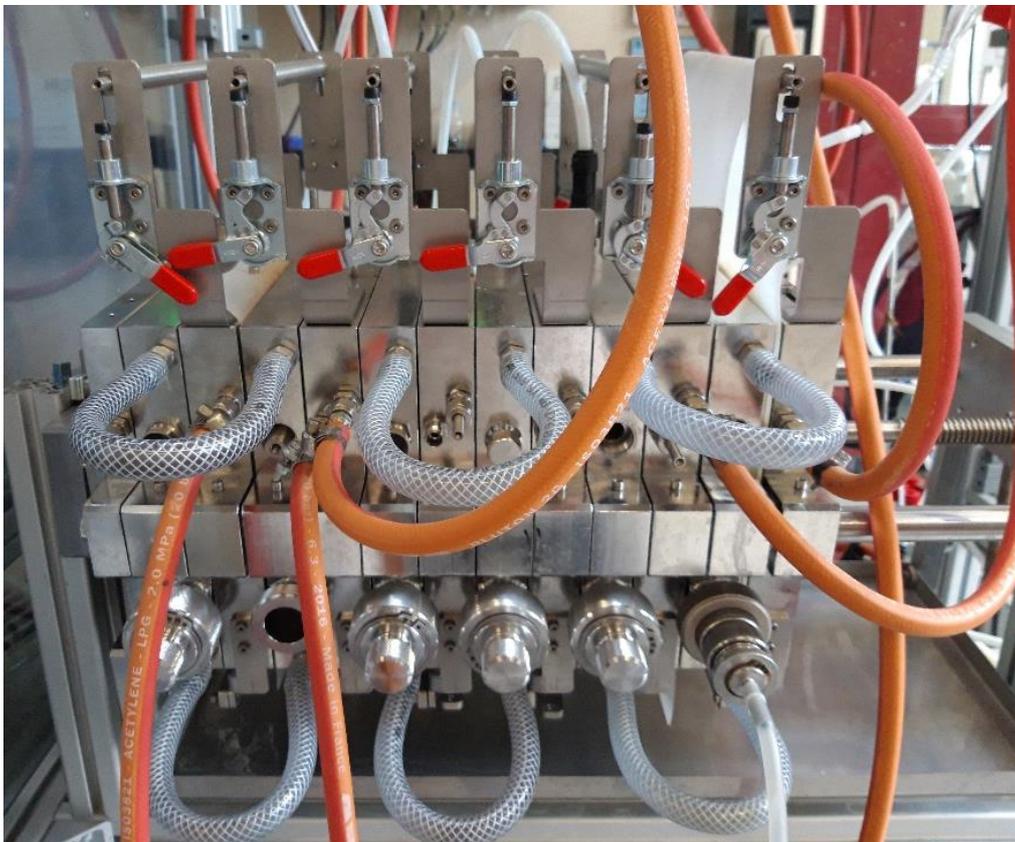


Abbildung 18: Darstellung des neu entwickelten DMBR. Gezeigt sind sechs Flüssigkammern. Diese werden jeweils durch zwei PDMS-Membranen von den Gaskammern abgetrennt. Die Membranen werden durch Stützgitter stabilisiert, sodass sich diese bei Anlegen von Druck nicht durchbiegen.

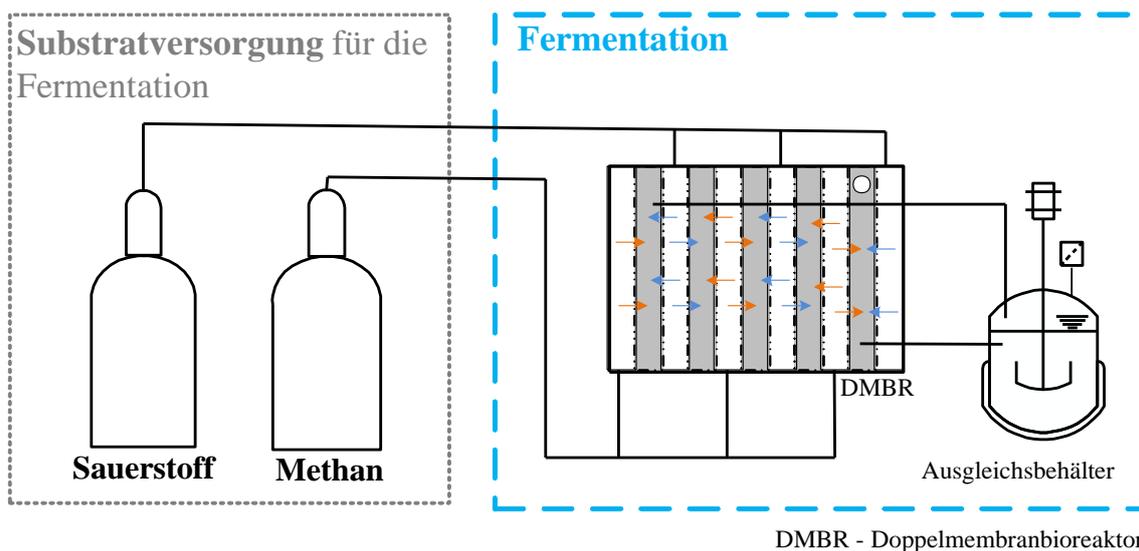


Abbildung 19: Fließbild des Aufbaus für die Fermentation von *M. trichosporium* OB3b im DMBR. Jede Flüssigkammer wird sowohl mit Sauerstoff (blaume Pfeile) als auch mit Methan (orange Pfeile) über eine Silikonmembran blasenfrei begast. Hierfür wird ein Druck von ca. 1 bar an die Membran angelegt. Die Bestimmung der Biomassekonzentration erfolgte manuell über die photometrische Messung der OD<sub>600</sub>.

## 4.5 Analytische Methoden

Die in dieser Arbeit eingesetzten analytischen Methoden sind in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

### 4.5.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurde eine OD/BTM-Korrelation aufgenommen. Hierzu wurde zunächst das Leergewicht von Glasröhrchen bestimmt. Um in den Messbereich der eingesetzten Waage zu gelangen, wurde abhängig von der Zelldichte, ein definiertes Volumen der Zellsuspension in die Glasröhrchen gefüllt. Nach Vermessung der OD<sub>600</sub> mittels Spektrophotometer wurden die Glasröhrchen bei 2898 g für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Röhrchen bis zur vollständigen Trocknung bei 50 °C inkubiert und diese anschließend auf der Analysenwaage gewogen. Um den Salzgehalt des NMS-Mediums herauszurechnen zu können, wurde nach dem gleichen Schema eine Probe (Blank) nur mit NMS-Medium vermessen. Daraus berechnet sich das Nettogewicht der Zellen wie folgt:

$$BTM = (Probe - Blank) * eingesetztes\ Volumen \quad (1)$$

Probe: Gewicht der Röhrchen mit Nährmedium inkl. Zellen

Blank: Gewicht der Röhrchen mit Nährmedium

### 4.5.2 Quantifizierung der Formiatkonzentration mittels HPLC

Zur Quantifizierung des Formiatgehaltes wurden dem Reaktor zu ausgewählten Zeitpunkten Proben (2 mL) entnommen und diese in Eppendorfgefäßen bei 2898 g für 10 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde filtriert (0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße) und anschließend mit 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  verdünnt, um in die Nachweißgrenze der HPLC-Methode zu kommen. Dieses wurde ebenfalls als Fliesmittel in der nachfolgenden HPLC eingesetzt. Weiterhin wurde die Probe mittels HPLC (Perkin Elmer) bei einer Temperatur von 45 °C und einem Volumenstrom von 0,6 ml  $\text{min}^{-1}$  über eine Laufzeit von 50 min mit einer Aminex HPX-87H Säule und einem RI-Detektor analysiert. Die Retentionszeit von Formiat lag bei 13,6 min.

### **4.5.3 Gaschromatographische Analyse (Mikro GC)**

Zur Bestimmung der Gaszusammensetzung im Kopfraum der verwendeten Serumflaschen wurden die Gase mittels Mikro-GC 490 der Firma Agilent Technologies mit einem integrierten Thermal Conductivity Detector (TCD) analysiert. Sauerstoff und Methan wurden mit einer 10 m MS5A-Säule analysiert. Die Quantifizierung von  $\text{CO}_2$  erfolgte unter Verwendung einer 10 m PPQ-Säule bei einer Temperatur von 60 °C. Die Injektionstemperatur betrug 110 °C und die Injektionszeit 40 ms. Ein Backflush von 7,5 ms wurde eingestellt. Argon diente als Trägergas.

### **4.5.4 Quantifizierung leicht flüchtiger Substanzen mittels Echtzeit-Massenspektrometrie**

Die Quantifizierung der eingesetzten Edukte Propylen und Benzol und der Produkte Propylenoxid und Phenol während der Versuche zur Ganzzellbiokatalyse wurde mit einem Echtzeit-Membraneinlass-Massenspektrometer (MIMS) der Firma Variolytics durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine nichtinvasive Messmethode, mit welcher die zu bestimmenden Substanzen direkt in der Flüssigkeit gemessen werden können. Das Massenspektrometer (MS) wird über zwei Kapillaren, welche durch ein Septum direkt in die zu messende Flüssigkeit eingebracht werden, an den jeweiligen Reaktor angeschlossen (Abbildung 21). Eine Schlauchpumpe, welche im Gerät integriert ist, pumpt die zu messende Flüssigkeit mit 9 ml  $\text{min}^{-1}$  durch den Membraneinlass wieder zurück in den Reaktor. Über einen Unterdruck, welcher an die Membran im Membraneinlass angelegt wird, werden lediglich die leicht flüchtigen Substanzen in das MIMS gezogen (siehe Abbildung 20).

Das MS misst die Ionenströme der flüchtigen Substanzen. Um die gemessenen Ionenströme in einer Konzentration (mM) angeben zu können, ist es daher notwendig, das MS zu kalibrieren.

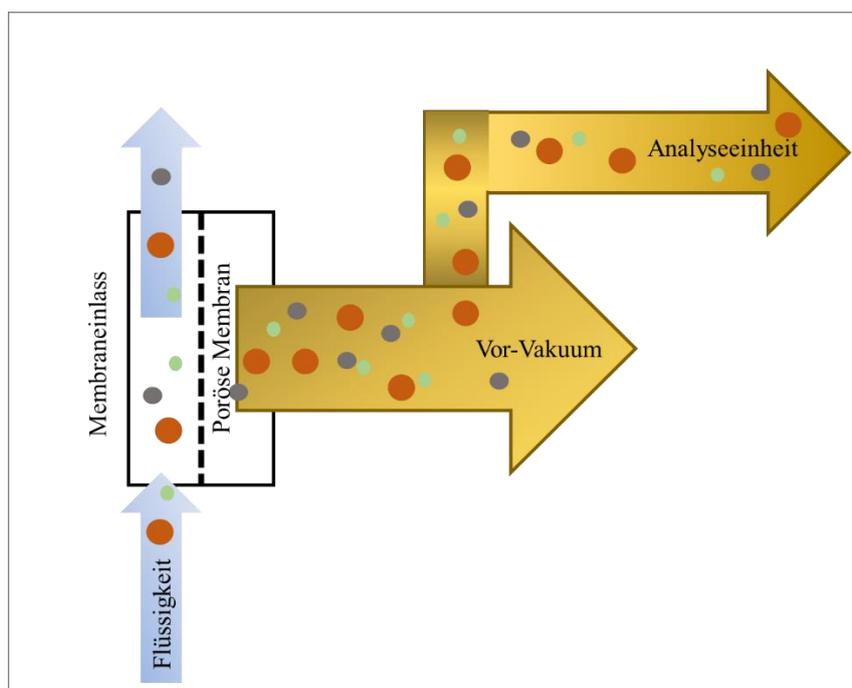


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Flüssigkeit und der Gase durch den Membraneinlass. Durch das angelegte Vakuum an die poröse Membran gelangen die leicht flüchtigen Komponenten in die Analyseeinheit des Echtzeit-Massenspektrometers.

Für alle verwendeten Gase wurde eine Zweipunktkalibrierung durchgeführt. Hierfür wurde eine 125 mL Serumflasche mit 50 mL Wasser befüllt und auf 25 °C temperiert. Anschließend wurde das MIMS an die Serumflasche angeschlossen (siehe Abbildung 21). Für den ersten Kalibrierungspunkt (0 mM) wurde das Wasser mit Argon begast, sodass alle anderen sich im Wasser befindlichen Gase ausgetragen wurden. Für den zweiten Punkt der Kalibrierung wurde das Wasser in der Serumflasche mit 100 %<sub>v/v</sub> des zu kalibrierenden Gases bis zur vollständigen Sättigung begast.

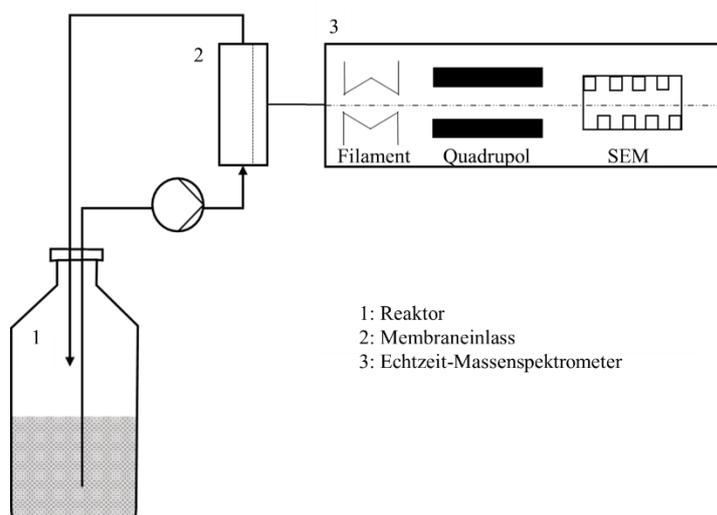


Abbildung 21: Schematischer Versuchsaufbau für die Echtzeit-Messung leicht flüchtiger Substanzen mit dem Massenspektrometer der Firma Variolytics. Alle durch den Organismus *M. trichosporium* OB3b katalysierten Oxidationsreaktionen wurden mittels Echtzeit-Membraneinlass-Massenspektrometer aufgezeichnet.

Die Kalibrierung des MIMS mit allen flüssigen Chemikalien erfolgte über mindestens vier Messpunkte. Hierfür wurde je eine Stammlösung der zu kalibrierenden Substanz hergestellt. Diese wurde mittels Spritze und Kanüle über min. vier Schritte in das Messwasser hinzugefügt. Um die Konzentration im Wasser zu errechnen, wurde die Spritze jeweils vor und nach der Zugabe gewogen. Über Formel 2 (siehe Kap. 4.9) konnte anschließend die Konzentration im Wasser errechnet werden.

## 4.6 Untersuchungen zum Einfluss des CO<sub>2</sub>-Gehaltes auf die Fermentation

Die Untersuchungen zum Einfluss des CO<sub>2</sub>-Gehaltes auf die Fermentation von *M. trichosporium* OB3b wurde sowohl in Serumflaschen als auch im Rührkesselreaktor durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte gemäß Kap. 4.4.1 und Kap. 4.4.3. In beiden Reaktorsystemen wurde der Methangehalt reduziert um die gewünschte Konzentration von CO<sub>2</sub> hinzufügen zu können. Die genaue Gaszusammensetzung ist in Tabelle 3 im Detail aufgelistet. In Serumflaschen wurden die Gase Methan und CO<sub>2</sub> über eine Spritze mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße = 0,25 µm) mittels Kanüle injiziert. Im Rührkesselreaktor wurden die Gase vorab mittel Gas-mischgerät gemischt und mit 0,5 L min<sup>-1</sup> in die Rührkesselreaktoren eingetragen.

Tabelle 3: Gaszusammensetzung für die Untersuchungen zum Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Fermentation von *M. trichosporium* OB3b.

Gas	Standard	Variation I	Variation II
Methan	30 % <sub>v/v</sub>	25 % <sub>v/v</sub>	20 % <sub>v/v</sub>
Luft	70 % <sub>v/v</sub>	70 % <sub>v/v</sub>	70 % <sub>v/v</sub>
CO <sub>2</sub>	-	5 % <sub>v/v</sub>	10 % <sub>v/v</sub>

## 4.7 Untersuchungen zur Toxizität von Propylenoxid und Phenol auf *M. trichosporium* OB3b

Propylenoxid und Phenol können durch ihren lipophilen Charakter einen negativen Einfluss auf bakterielle Zellwände haben. In der Zelle interagieren sie mit hydrophoben Bestandteilen und die Substanzen reichern sich in den Lipidschichten an (siehe hierzu Kap. 5.3.1 und 5.3.2). Dies führt zu einer Veränderung der Membranstabilität. Um eine langzeitstabile Selektivoxidation mit dem Organismus *M. trichosporium* OB3b durchführen zu können, musste daher zunächst

untersucht werden, wie hoch die maximale Produktkonzentration und die maximale Expositionsdauer gewählt werden kann, um den Ganzzellbiokatalysator nicht zu schädigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierfür zwei Versuchsreihen durchgeführt. Ein Wachstumsinhibierungstest, bei welchem der Ganzzellbiokatalysator für einen Zeitraum von 30 min mit den Edukten und Produkten in Kontakt gebracht wurde, sowie ein Versuch zur dauerhaften Exposition des MOB über zwei Tage. Beide Versuchsreihen sind nachfolgend beschrieben.

#### 4.7.1 Wachstumsinhibierungstest mit kurzzeitiger Exposition

Für den Wachstumshinhibierungstest wurde die Bakteriensuspension auf  $0,33 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  verdünnt und für eine Dreifachbestimmung auf drei Probengefäße pro Testkonzentration aliquotiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen entweder mit Propylenoxid (0 mM, 1 mM, 13 mM, 50 mM, 100 mM) oder Phenol (0 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 70 mM), für eine Dauer von 30 min auf einem Orbitalschüttler bei 150 rpm bei einer Temperatur von  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nachfolgend wurden die Zellen zweimal bei  $2898 \text{ g}$  für 10 min zentrifugiert und mit NMS-Medium gewaschen. Die Zellen wurden mit einer Biomassekonzentration von  $0,1 - 0,15 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  in 25 mL Medium injiziert und in einer 250 mL Serumflasche gemäß der in Kap. 4.4.1 beschriebenen Methode kultiviert. Zweimal täglich erfolgte eine Probennahme zur Bestimmung der Biomassekonzentration. Die entnommene Probe wurde mittels Spectrophotometer analysiert. Zusätzlich wurde die Veränderung der Gaszusammensetzung im Kopfraum der Serumflaschen mittels Mikro GC (detaillierte Beschreibung in Kap. 4.5.3) analysiert. Eine schematische Darstellung der Versuchsdurchführung ist in Abbildung 22 dargestellt.

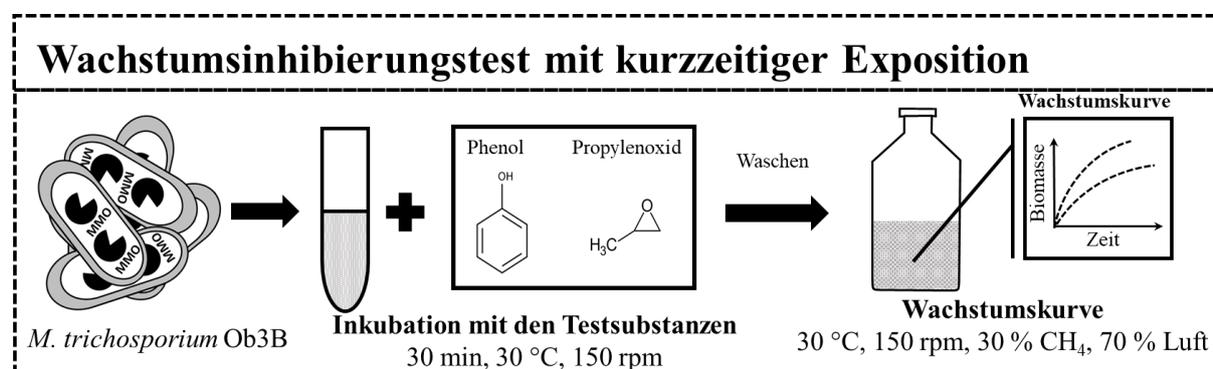


Abbildung 22: Schematische Darstellung des Wachstumshinhibierungstests nach 30-minütiger Exposition. Die verwendete Bakteriensuspension wurde auf  $0,33 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  verdünnt und für 30 min mit den Testsubstanzen Phenol und Propylenoxid inkubiert. Anschließend wurden die Testsubstanzen durch Zentrifugieren bei  $2898 \text{ G}$  für 10 min aus der Zellsuspension abgetrennt. Der Überstand wurde entnommen und die Zellen in NMS-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer Biomassekonzentration von  $0,1 - 0,15 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  in 25 mL Medium überführt und in einer 250 mL Serumflasche gemäß der in Kap. 4.4.1 beschriebenen Methode kultiviert. Die Biomassekonzentration wurde durch die tägliche Messung der optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) aufgezeichnet. Zusätzlich wurde die Veränderung der Gaszusammensetzung im Kopfraum der Serumflaschen mittels Mikro GC (detaillierte Beschreibung in Kap. 4.5.4) analysiert.

## 4.7.2 Wachstumsinhibierungstest mit Langzeitexposition

Um zu untersuchen, ob eine Langzeitexposition der Zellen mit Propylenoxid oder Phenol einen negativen Einfluss auf die Wachstumskinetik von *M. trichosporium* OB3b hat, erfolgte ein Versuchsansatz mit einer dauerhaften Exposition der Zellen mit beiden Substanzen. Die Versuchsdurchführung ist schematisch in Abbildung 23 dargestellt.

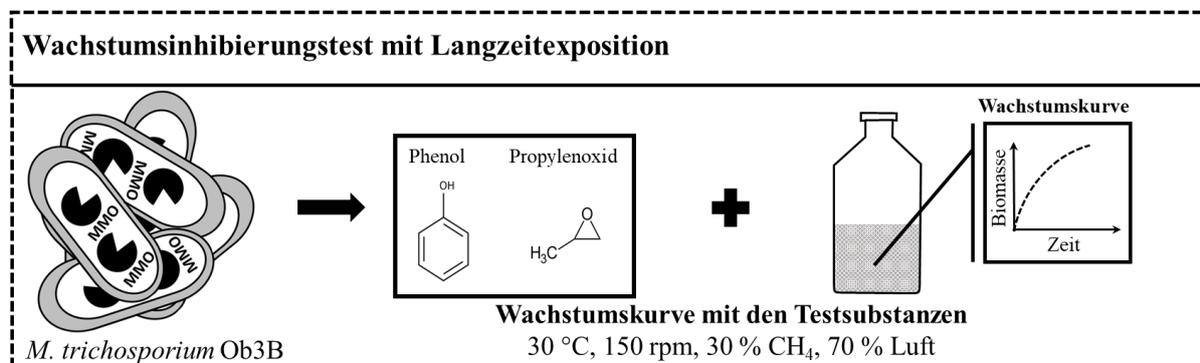


Abbildung 23: Schematische Darstellung des Wachstumsinhibierungstests bei dauerhafter Exposition der Zellen mit Phenol und Propylenoxid. Hierfür wurde eine Serumflasche mit einem Gesamtvolumen von 250 mL mit 25 mL NMS-Medium befüllt und mit einer Zelldichte von 0,1 bis 0,15 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> inokuliert. Anschließend wurden die Testsubstanzen hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte gemäß Kap. 4.4.1. Der Verlauf der Biomassekonzentration wurde durch tägliche Messung der Optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) überwacht. Zusätzlich wurde die Veränderung der Gaszusammensetzung im Kopfraum der Serumflaschen mittels Mikro-GC (detaillierte Beschreibung in Kap. 4.5.4) analysiert.

Hierfür wurden zunächst Serumflaschen mit einem Gesamtvolumen von 250 mL mit 25 mL sterilem NMS-Medium befüllt. Die Inokulation der Serumflaschen erfolgte mit einer Startkonzentration von 0,1 bis 0,15 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>. Anschließend wurde abhängig vom jeweiligen Versuch Propylenoxid in den Konzentration 0, 13, 100 mM oder Phenol 0, 30, 70 mM hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte gemäß Kap. 4.4.1. Die Biomassekonzentration wurde über einen Versuchszeitraum von zwei Tagen durch Messung der optischen Dichte beobachtet. Zusätzlich wurde die Veränderung der Gaszusammensetzung im Kopfraum mittels Mikro-GC (detaillierte Beschreibung in Kap. 4.5.3) analysiert.

## 4.8 Ganzzellbiokatalyse mit *M. trichosporium* OB3b

### 4.8.1 Bestimmung einer geeigneten Biomassekonzentration für die Ganzzellbiokatalyse

Die Versuche zur Bestimmung einer geeigneten Biomassekonzentration für die Oxidation von Benzol zu Phenol sowie von Propylen zu Propylenoxid erfolgten in Serumflaschen mit einem Gesamtvolumen von 250 mL und einem Flüssigvolumen von 35 mL bei einer Temperatur von 30 °C. Nach Zugabe des NMS-Mediums wurden die Serumflaschen mit einem Septum und

einer Aluminiumkappe gasdicht verschlossen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Edukte (Propylen oder Benzol) mittels Spritze und Kanüle. Um den Versuch zu starten, wurden Zellen aus der Vorkultur entnommen und für 10 min bei 2898 g zentrifugiert. Anschließend wurden diese in 3 mL bis 5 mL NMS-Medium resuspendiert und mittel Spritze und Kanüle in die Serumflaschen injiziert. Propylen, Propylenoxid, Benzol und Phenol wurden während des Versuches mittels Echtzeit-Membraneinlass-Massenspektrometer (Prototyp, Variolytics), wie in Kap. 4.5.4 beschrieben, analysiert.

### **4.8.2 Untersuchung eines einstufigen Prozesses zur Selektivoxidation von Propylen und Benzol ohne Regeneration des Ganzzellbiokatalysators**

Nachdem die Selektivoxidation erfolgreich in kleinem Maßstab durchgeführt etabliert werden konnte, wurde der Prozess in den 1 L Maßstab im Rührkesselreaktor übertragen. Hierfür erfolgte zunächst eine Fermentation zur Herstellung des Ganzzellbiokatalysators, wie in Kap. 4.4.3 beschrieben. Für die nachfolgenden Versuche zur Oxidation von Propylen zu Propylenoxid wurde ein zweiter Rührkesselreaktor vorbereitet, mit NMS-Medium befüllt, die Temperierung auf 30 °C und die Rührergeschwindigkeit auf 800 rpm eingestellt. Sowohl zur Messung der Edukte als auch der Produkte wurde das MIMS (beschrieben in Kap. 4.5.4) an den Reaktor angeschlossen. Nachdem der Reaktor für etwa 30 min mit Luft bei einer Begasungsrate von 0,5 L h<sup>-1</sup> begast wurde, erfolgte eine Begasung des Reaktors mit 100 % Propylen für 3 min bei einer Begasungsrate von 2 L h<sup>-1</sup>. Damit während der Reaktion kein Propylen aus dem Reaktor entweicht, wurden die Zuluftleitung und die Abluftleitung mit einer Schlauchklemme verschlossen. Durch Zugabe der Zellen in den Bioreaktor (Endkonzentration 3 g L<sup>-1</sup>) wurde die Reaktion gestartet.

Für die Oxidation von Benzol zu Phenol wurde das Echtzeit-Massenspektrometer direkt an den Wachstumsreaktor angeschlossen (Abbildung 21). Um Methan aus dem Reaktor auszutreiben und die Zellen hinreichend mit Sauerstoff zu versorgen, wurde der Reaktor für 30 min bei einer Begasungsrate von 0,5 L h<sup>-1</sup> mit Sauerstoff begast. Durch Zugabe von Benzol, aus einer Stammlösung (Konzentration Benzol in der Stammlösung 1,77 g L<sup>-1</sup>) wurde die Reaktion gestartet. Dabei sollte eine Startkonzentration von ca. 10 mM erreicht werden.

### 4.8.3 Untersuchung eines mehrstufigen Prozesses zur Selektivoxidation von Propylen und Benzol mit sequenzieller Regeneration des Ganzzellbiokatalysators

Um ausreichend Biomasse für die semikontinuierliche Ganzzellbiokatalyse zur Verfügung zu stellen, wurde zunächst, wie in Kap. 4.4.3 beschrieben, eine Fermentation von *M. trichosporium* OB3b durchgeführt. Anschließend wurde, wie in Kap. 4.8.2 beschrieben, ein zweiter Reaktor vorbereitet. Die Zugabe der Zellen in das frische NMS-Medium erfolgte manuell mit einer Spritze mit Kanüle. Die Startkonzentration der Biomasse betrug  $3 \text{ g L}^{-1}$ . Um die Zellen mit ausreichend Substrat zu versorgen, wurde der Reaktor anschließend für 1 h mit einem Methan-/Luftgemisch ( $30 \%_{\text{v/v}}$  Methan) bei einem Gasvolumenstrom von  $0,5 \text{ L min}^{-1}$  begast. Anschließend erfolgte die Selektivoxidation je nach Versuch durch Zugabe von Propylen für 3 min bei einem Volumenstrom von  $0,5 \text{ L h}^{-1}$ , bzw. durch Zugabe von Benzol aus einer Stammlösung (Konzentration Benzol in der Stammlösung  $1,77 \text{ g L}^{-1}$ ) mittels Spritze und Nadel. Nach einer 30-minütigen Oxidationsphase schloss sich ein Regenerationsintervall an. Zur Regeneration der Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene Regenerationsstrategien näher untersucht (Abbildung 24).

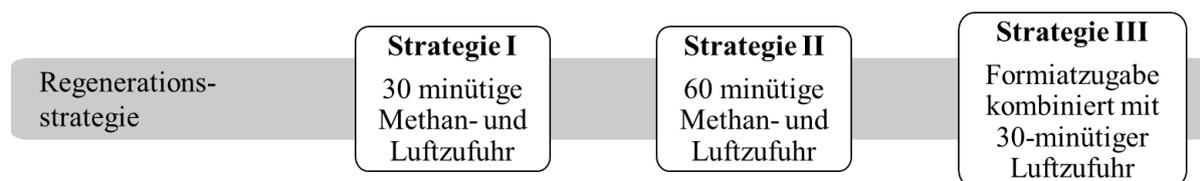


Abbildung 24: Darstellung der drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Regenerationsstrategien.

Gemäß Strategie I wurden die Zellen im Anschluss an die Oxidationsreaktion für 30 min mit einem Methan-Luftgemisch ( $30 \%_{\text{v/v}}$  Methan) bei einem Gasvolumenstrom von  $0,5 \text{ L min}^{-1}$  begast. Der Begasungszeitraum wurde im Rahmen von Strategie II auf 60 min erweitert. Gemäß Strategie III erfolgte die Zugabe von 20 mM Formiat (flüssig) in Form von Natriumformiat direkt in die Flüssigphase zu Beginn der Selektivoxidation, womit sich die Regenerierung der Cofaktoren deutlich von Strategie I und II unterschied (Abbildung 24). Zusätzlich zur Formiatzugabe wurde der Reaktor gemäß Strategie III im Anschluss an die 30-minütige Selektivoxidation zum Zwecke der Sauerstoffversorgung sowie zur Produktabtrennung für 30 min mit Sauerstoff bei einem Volumenstrom von  $0,5 \text{ L h}^{-1}$  begast. Im Anschluss an das erste Regenerationsintervall schloss sich eine erneute Selektivoxidation von 30 min an. Für die Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid wurde der Reaktor erneut für 3 min mit Propylen bei einem Volumenstrom von  $0,5 \text{ L h}^{-1}$  begast. Für die Selektivoxidation von Benzol zu Phenol erfolgte

die Zugabe von erneut 1,12 mM Benzol mittels Spritze und Nadel. Sowohl die Selektivoxidation als auch die sequenzielle Regeneration wurde standardmäßig dreimal durchgeführt. Um zu zeigen, dass weitere Oxidations- und Regenerationszyklen möglich sind, wurde in einem weiteren Versuch ein vierter Zyklus angefügt. Eine schematische Darstellung des Prozesses findet sich in Abbildung 25.

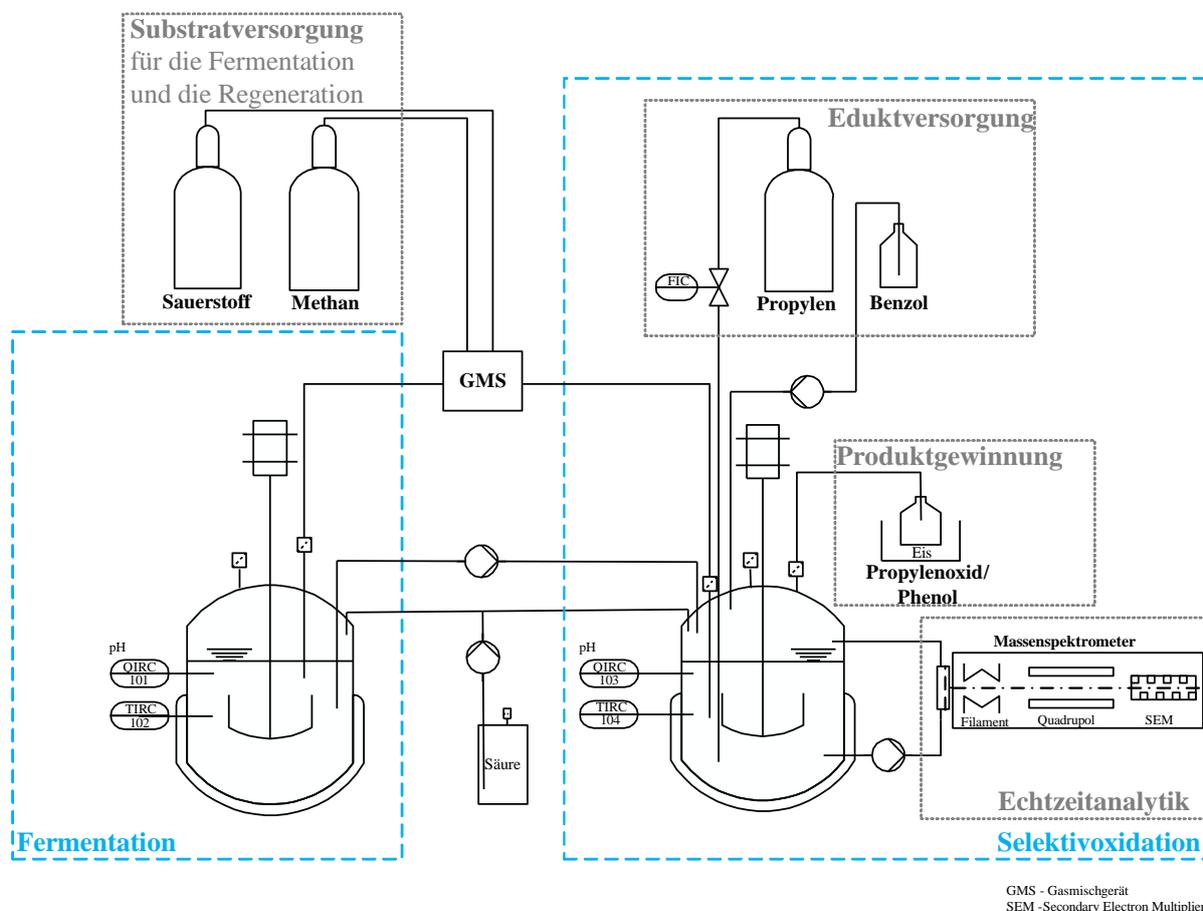


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur semikontinuierlichen Selektivoxidation im 1 L Rührkesselreaktor mit Substratversorgung und angeschlossenem Echtzeit-Membraneinlass-Massenspektrometer. GMS: Gasmischsystem, SEM: Secondary Electron Multiplier.

#### 4.8.4 Versuche zur Ganzzellbiokatalyse im Doppelmembranbioreaktor

Für die Ganzzellbiokatalyse im DMBR wurde zunächst, wie in Kap. 4.4.3 beschrieben, Biomasse im Rührkesselreaktor bereitgestellt. Zur Quantifizierung der Edukte und Produkte wurde das Echtzeit-Membraneinlass-Massenspektrometer am Auslass des DMBR über eine Probenentnahmestelle angeschlossen. Nach dem Befüllen des DMBRs mit NMS-Medium wurde das Medium mit Sauerstoff (100 %<sub>v/v</sub>) und Propylen (100 %<sub>v/v</sub>) angereichert. Hierzu wurden je 1 bar Druck an das Gaskompartiment angelegt. Nach vollständiger Sättigung der Gase im DMBR wurde der Ganzzellbiokatalysator (Endkonzentration 3 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>) zum Versuchsstart in den DMBR injiziert. Die Ganzzellbiokatalyse erfolgte bei 30 °C über einen Zeitraum von ca. 7 h. Ein Fließbild des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 26 dargestellt.

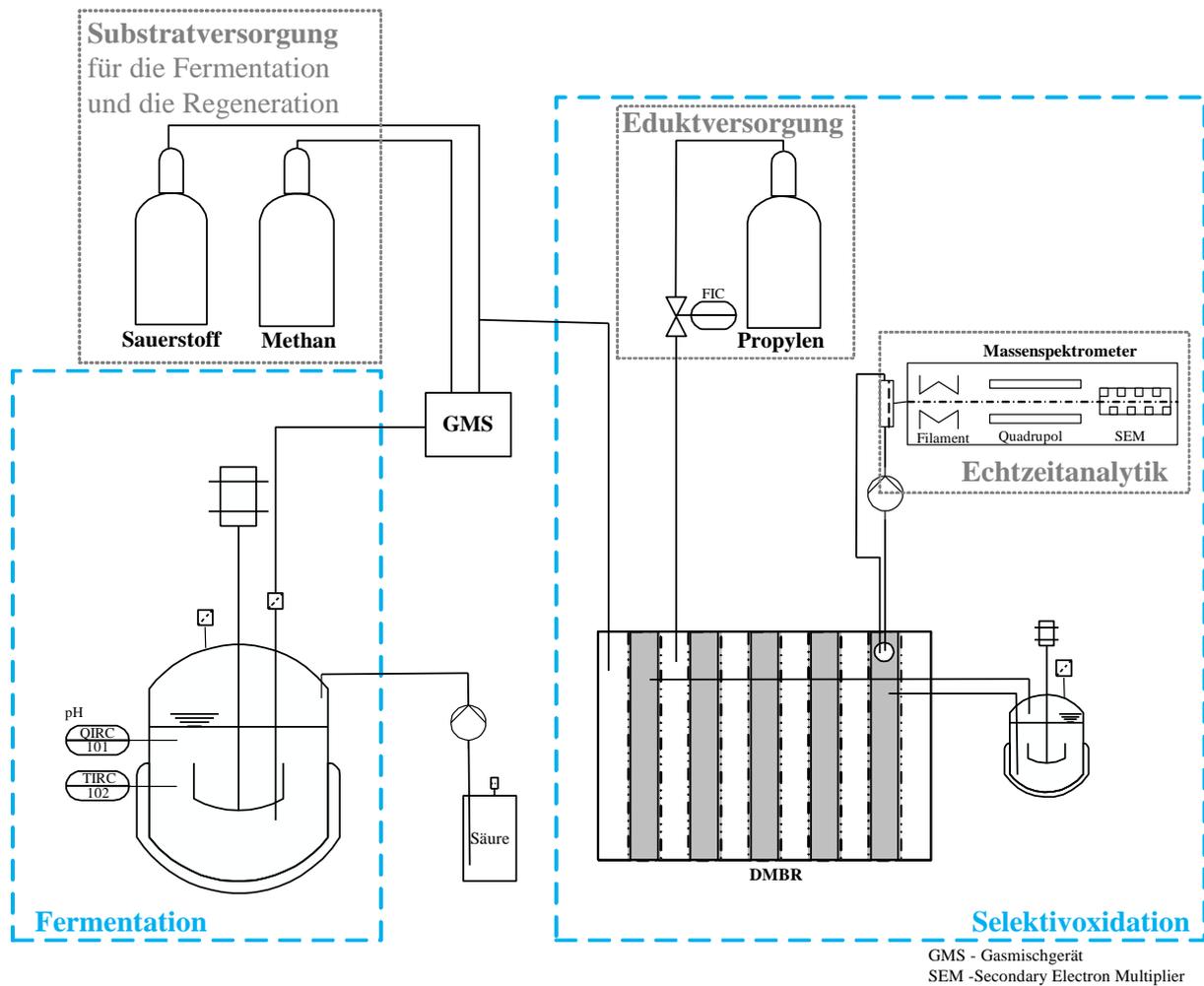


Abbildung 26: Fließbild für die Ganzzellbiokatalyse am Beispiel von Propylen zu Propylenoxid. Für die Selektivoxidation im DMBR wurde eine Kammer (0,6 L) des DMBR eingesetzt. Für die analytische Bestimmung der Edukte und Produkte wurde ein Echtzeit-Membraneinlass-Massenspektrometer an den DMBR angeschlossen.

## 4.9 Berechnung von Sekundärgrößen aus direkten Messwerten

Zur Beschreibung der in dieser Arbeit eingesetzten Prozesse wurden Sekundärgrößen berechnet. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die biomassespezifische Wachstumsrate  $\mu$  (Dimension:  $\text{h}^{-1}$ ) gemäß Gleichung 1.

$$\mu = \frac{\ln C_x(t_x) - \ln C_x(t_0)}{t_x - t_0} \quad (1)$$

$\mu$ : Wachstumsrate ( $\text{h}^{-1}$ )

$t_x$ : Zeit (h)

$t_0$ : Anfangszeit

$C_x$ : Biomassekonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt ( $\text{g L}^{-1}$ )

Berechnung von Konzentrationen in einer Flüssigkeit:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2 \quad (2)$$

V: Volumen (L)

C: Konzentration (g L<sup>-1</sup>)

Zur Bewertung der katalytischen Leistung des Ganzzellbiokatalysators wurde die biomassespezifische Enzymaktivität U gemäß Gleichung 2 berechnet.

$$U = \frac{C_{Produkt}}{t * g_{BTM}} \quad (3)$$

U: Enzymaktivität (µmol Substrat bzw. Produkt min<sup>-1</sup> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>)

C: Konzentration (µmol)

t: Zeit (min)

g<sub>BTM</sub> Biotrockenmasse (g)

Um eine Bewertung der eingesetzten Reaktortypen zu ermöglichen, wurde die Produktivität Q<sub>P</sub> (Dimension: kg h<sup>-1</sup>) eines Ansatzes gemäß Gleichung 3 und die Produktivität Q<sub>P,R</sub> (Dimension: kg L<sub>Reaktor</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) des untersuchten Reaktors gemäß Gleichung 4 berechnet.

$$Q_P = \frac{P_{final} \cdot V_L}{t_{präp} + t_{prod}} \quad (4)$$

V<sub>L</sub>: Flüssigvolumen (L)

P<sub>final</sub>: Endkonzentration des Produktes (g L<sup>-1</sup>)

t<sub>prod</sub>: Produktionszeit (h)

t<sub>präp</sub>: Rüstzeit (h)

$$Q_{P,R} = \frac{P_{final} \cdot V_L}{(t_{präp} + t_{prod}) \cdot V_R} \quad (5)$$

V<sub>R</sub>: Reaktorvolumen (L)

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Eine der größten technischen Herausforderungen im Zuge dieser Arbeit stellte die potentiell explosive Gasmischung von Methan und Sauerstoff, welche für die Fermentation des Organismus *M. trichosporium OB3b* eingesetzt werden kann, dar. Um das Sicherheitsrisiko zu minimieren, wurde am IGVP der Universität Stuttgart ein Doppelmembranbioreaktor (DMBR) zur getrennten blasenfreien Begasung beider Gase entwickelt. Damit ein optimaler Betrieb des Reaktors gewährleistet werden kann, wurden hierfür Silikonmembranen zwischen 1 mm und 5 mm hinsichtlich ihrer diffusiven Eigenschaften für Sauerstoff als auch Methan untersucht. Diese Ergebnisse sind in Kapitel 5.1 dargestellt.

Die in Kapitel 5.2 dargestellten Ergebnisse umfassen die Fermentation von *M. trichosporium OB3b* in ausgewählten Reaktortypen. Neben der Aufnahme von Wachstumskinetiken im Rührkesselreaktor, DMBR und in membranbasierten HDC10-Inkubatoren wurde hier insbesondere der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Lag-Phase während der Fermentation untersucht. Ziel dieser Versuche war es, eine Grundlage für den späteren Vergleich der genannten Reaktorkonzepte zu erarbeiten (Kap. 5.2.5). Es erfolgte in diesem Zusammenhang zudem eine grundlegende Untersuchung zum Einfluss wesentlicher Nährmedienbestandteile auf die Wachstumskinetik des Organismus.

Die Ergebnisse zur Ganzzellbiokatalyse von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol mittels *M. trichosporium OB3b* sind in Kapitel 5.3 dargestellt. Im Fokus dieser Untersuchungen stand zunächst die inhibierende Wirkung der Produkte Propylenoxid und Phenol auf das Wachstum des MOB. Weiterhin wurden Versuche zum Einfluss der Biomassekonzentration des Ganzzellbiokatalysators auf die Selektivoxidation beider Substrate durchgeführt. Die Regeneration des Ganzzellbiokatalysators erfolgte anhand drei verschiedener Methoden (siehe Kap. 4.8.3). Darauf aufbauend wurde eine Strategie zur semikontinuierlichen mehrstufigen Selektivoxidation im Rührkesselreaktor und im DMBR etabliert. Ein abschließender Vergleich der eingesetzten Reaktorkonzepte, im Hinblick auf den Einsatz für die Ganzzellbiokatalyse, wird in Kapitel 5.3.8 beschrieben (siehe Abbildung 1).

### 5.1 Untersuchung verschiedener Membranen für einen neu entwickelten Doppelmembranbioreaktor

Für den Betrieb des neu entwickelten Doppelmembranbioreaktors war es notwendig, zunächst geeignete Membran zur blasenfreien Begasung mit Sauerstoff und mit Methan zu identifizieren.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Membranwerkstoffe aus Polydimethylsiloxan (PDMS) für Methan und Sauerstoff geeignet sind und zudem im Vergleich zu anderen Membranwerkstoffen die höchsten Durchlässigkeitswerte aufweisen. (Beeskow-Strauch et al., 2015; Dominghaus, 2013; Elias, 2009; Hwang et al., 1971; Jordan and Koros, 1990; Robb, 1968). Hwang et al. untersuchten erstmals die Gasdurchlässigkeit von Membranen. Hierbei identifizierten sie fünf wesentliche Schritte (Abbildung 27):

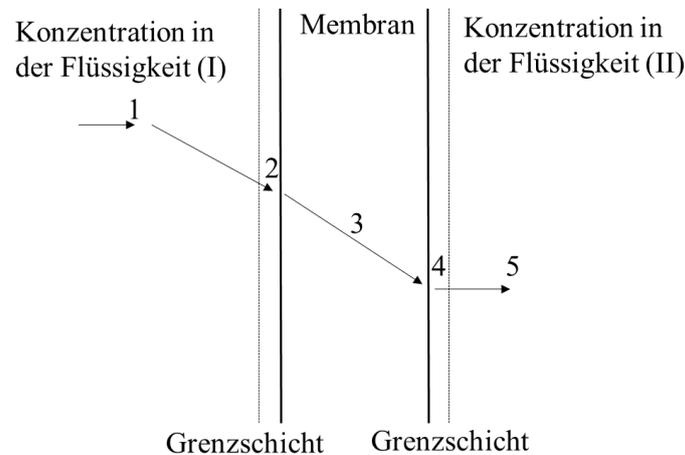


Abbildung 27: Konzentrationsprofil von Gasen durch eine Membran. Graphik wurde nach Hwang et al. 1971 verändert.

1. Diffusion in die Flüssigkeit (I)
2. Sorption in die Membran
3. Diffusion durch die Membran
4. Desorption aus der Membran
5. Diffusion in die Flüssigkeit (II)

Im DMBR soll das Nährmedium für die Bakterien aus einer Gasphase über eine Membran blasenfrei begast werden. Daher wurde in dieser Arbeit die Gasdurchlässigkeit aus einer Gasphase durch eine Membran in eine Flüssigkeit untersucht. Nach der Definition von Hwang et al. entfällt somit die Diffusion in die Flüssigkeit (Schritt 1.). Die Membran hat neben der Begasungsfunktion noch eine zweite Funktion als Dichtung im DMBR. Aus den genannten Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit dichte Silikonmembranen mit einer Schichtdicke zwischen 0,5 mm und 5 mm auf ihre diffusiven Eigenschaften hinsichtlich Sauerstoff, Methan und Kohlenstoffdioxid getestet.

In Abbildung 28 ist die Sauerstoffkonzentration über die Zeit bei diffusiver Begasung durch Silikonmembranen mit unterschiedlicher Schichtdicke aufgetragen. Bei Anlegen von 2 bar

Druck bei 25 °C zeigte sich, dass mit abnehmender Membrandicke der Stoffeintrag in die Flüssigkeit zunahm. So reicherte sich über die maximale Messzeit von 65 min eine maximale Sauerstoffkonzentration von  $3,6 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$  bei Verwendung einer Silikonmembran mit einer Schichtdicke von 1 mm im Wasser an. Im Vergleich hierzu wurde beim Begasen durch eine 5 mm Membran eine maximale Konzentration von lediglich  $2 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$  erreicht. Die Ergebnisse legen daher die Vermutung nahe, dass die Diffusion von Sauerstoff aus der flüssigen Phase in die Gasphase mit zunehmender Membrandicke schneller abläuft als nachfolgend die Diffusion in die flüssige Phase über die Membran möglich ist.

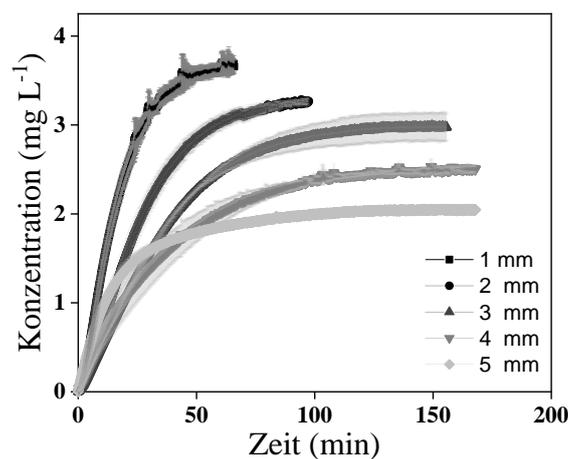


Abbildung 28: Konzentration von Sauerstoff über die Zeit bei Begasung von Wasser durch dichte Silikonmembranen mit einem Durchmesser zwischen 1 mm und 5 mm bei 25 °C und 2 bar Druck. Der Gelöstsauerstoff wurde mittels Echtzeit-Massenspektrometer detektiert. Die Untersuchungen erfolgten wie in der Methode in Kap. 4.1 beschrieben. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Ervin Sivic erhoben (Sivic, 2016).

Neben der Schichtdicke der Membran haben die Temperatur, der auf die Membran angelegte Druck und der Salzgehalt im Wasser einen wesentlichen Einfluss auf die Löslichkeit von Gasen in der Flüssigphase. Ergebnisse zum Einfluss des Drucks und der Temperatur auf die Methankonzentration in Wasser sowie im verwendeten Nährmedium sind in Abbildung 29 dargestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Methanlöslichkeit mit max.  $16 \text{ mg L}^{-1}$  bei 4 bar Druck etwa doppelt so hoch ist wie bei 2 bar. Die Temperatur hat im Vergleich zum Druck einen geringeren Einfluss. Ein Vergleich der Temperaturen von 25 °C und 30 °C ergab einen Unterschied in der Methankonzentration von  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Einen wesentlich höheren Einfluss als die Temperatur hat die Salzkonzentration im NMS-Medium. Bei Anlegen von 2 bar Druck bei 30 °C wurde eine maximale Löslichkeit von Methan in Wasser von ca.  $7,6 \text{ mg L}^{-1}$  gemessen. Dies bedeutet eine Reduktion von  $4,2 \text{ mg L}^{-1}$  der Gelöstgaskonzentration von Methan im NMS-Medium. Da die optimale Kultivierungstemperatur für den Organismus *M. trichosporium* OB3b in NMS-Medium 30 °C beträgt (siehe Kapitel 2.3), zeigen die Ergebnisse des

Membranscreenings (Abbildung 29,A), dass der Gaseintrag somit im Hinblick auf eine Kultivierung in einem Membranreaktor im Wesentlichen über das Anlegen des Druckes auf die Membran gesteuert werden kann.

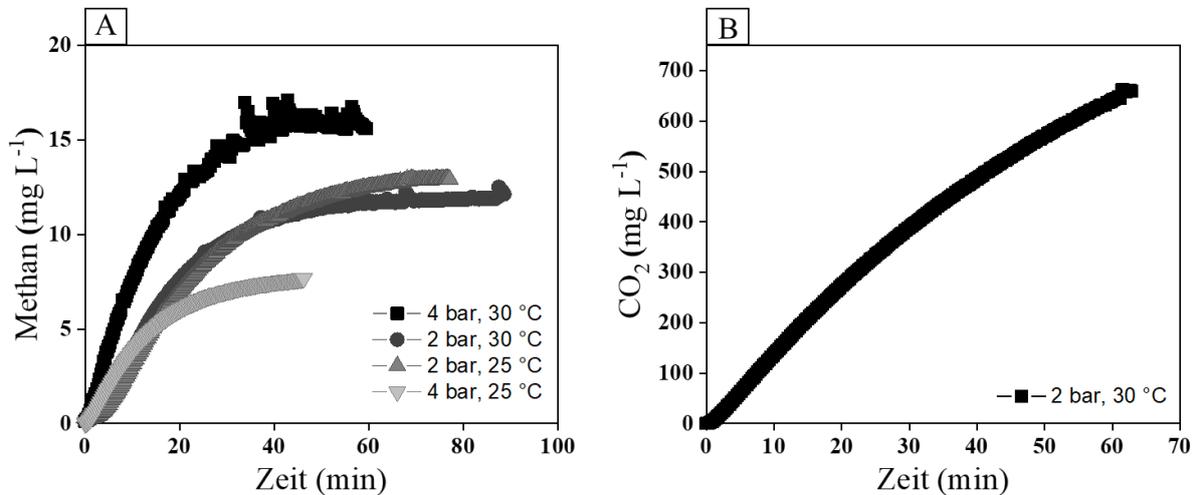


Abbildung 29: Blasenfreie Begasung von Wasser mit Methan über eine Silikonmembran mit einer Schichtdicke von 0,5 mm bei unterschiedlichem Druck (2 bar und 4 bar) sowie unterschiedlicher Temperatur 25 °C und 30 °C (A). Blasenfreie Begasung von Wasser mit CO<sub>2</sub> über eine Silikonmembran mit einer Schichtdicke von 5 mm bei 2 bar Druck und 30 °C (B). Daten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Lukas Maier (2017) erhoben (Maier, 2017).

Neben Sauerstoff und Methan wurde auch die Diffusion von CO<sub>2</sub> bei 2 bar Druck und 30 °C untersucht (Abbildung 29,B). Im Vergleich zu der Löslichkeit von Methan und Sauerstoff ist die erreichte CO<sub>2</sub>-Konzentration mit ca. 659 mg L<sup>-1</sup> deutlich höher. Dies zeigt, dass auch die Verwendung von Biogas, einem Gemisch aus Methan und CO<sub>2</sub>, als Substratquelle auf Basis einer Silikonmembran prinzipiell möglich ist. Biogas stellt eine kostengünstige, dezentrale Möglichkeit dar, eine Kohlenstoffquelle, die nicht in Konflikt mit Nahrungsmitteln steht für Biotechnologie-Anwendungen einzusetzen. Die Toleranz von MOB gegenüber Fremdgasen wie z.B. H<sub>2</sub>S im Biogas ermöglicht es, das Biogas ohne weitere Aufarbeitung als Kohlenstoffquelle für die Fermentation einsetzen zu können (Zhang et al., 2016). So könnte das Methan aus den ca. 9000 Biogasanlagen, die in Deutschland ca. 123 Nm<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> Biogas produzieren, zur Fermentation von MOB eingesetzt werden (FNR, 2018; Mühlemeier et al., 2018).

## 5.2 Fermentation von *M. trichosporium* OB3b

Die Fermentation von Mikroorganismen im Rührkesselreaktor ist schon seit vielen Jahrzehnten in der Biotechnologie standard. Aufgrund der schlechten Skalierbarkeit und wegen des erhöhten Sicherheitsrisikos der Gasfermentation mit Methan und Sauerstoff sind neue Fermentationssysteme Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten (Duan et al., 2011; Pen et al., 2014; Pe-

tersen et al., 2017). In dieser Arbeit wurden Fermentationen in drei Reaktorsystemen durchgeführt, um diese hinsichtlich wesentlicher operativer Kenngrößen miteinander vergleichen zu können. Hierfür wurden Versuche in einem Rührkesselreaktor, in HDC10-Kultivatoren und im neu entwickelten DMBR durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind in Kap. 5.2.1 dargestellt.

Neben dem verwendeten Bioreaktorsystem haben auch die eingesetzten Nährmedienbestandteile einen wesentlichen Einfluss auf die Wachstumskinetik von Mikroorganismen (Chmiel, 2018). Untersuchungen zum Einfluss der Nährmedienzusammensetzung sind in Kap. 5.2.2 dargestellt.

Aus bisherigen Veröffentlichungen geht hervor, dass durch die Zugabe von CO<sub>2</sub> die Lag-Phase von MOB verkürzt werden kann (Acha et al., 2002). Deshalb wurde der Einfluss von CO<sub>2</sub> in der vorliegenden Arbeit zunächst in Serumflaschen untersucht (Kap.5.2.3) und die erhaltenen Erkenntnisse anschließend auf den 1-L Maßstab in einen Rührkesselreaktor übertragen (gezeigt in Kap. 5.2.4).

### **5.2.1 Kultivierung des Ganzzellbiokatalysators in ausgewählten Fermentations-systemen**

Vorversuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass bei Herstellung von NMS-Nährmedium mit bidestiliertem Wasser kein Wachstum des Organismus *M. trichosporium* OB3b zu verzeichnen war. Aus diesem Grund wurden nachfolgend Wachstumskinetiken unter Verwendung von vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) und mit Reinstwasser aus einer Milli-Q-Anlage für die Herstellung von NMS-Medium aufgenommen. Dargestellt sind die Ergebnisse in Abbildung 30. Die Daten zeigen, dass sich Milli-Q-Wasser für die Fermentation am besten eignet. Die Reproduzierbarkeit im Vergleich zum VE-Wasser verbessert sich. Zudem wurde eine deutlich kürzere Lag-Phase beobachtet. Aus diesen Gründen wurden alle weiteren Versuche mit Milli-Q-Wasser durchgeführt.

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen aus dem 20 mL Maßstab (Abbildung 30) wurde die Fermentation in einem kontinuierlich begasten Rührkesselreaktor (DasGip) mit einem Arbeitsvolumen von 1 L etabliert (siehe in Kap. 4.4). Zudem erfolgte analog die Kultivierung in HDC10-Inkubatoren (siehe in Kap. 4.4.4) und im neu entwickelten DMBR (siehe in Kap. 4.4.5).

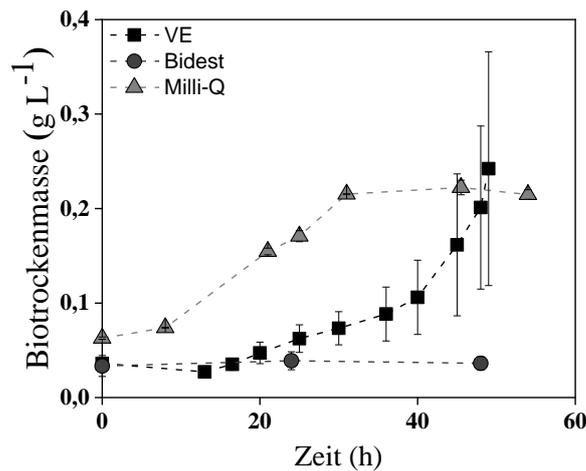


Abbildung 30: Vergleich der Wachstumskinetik von *M. trichosporium* OB3b unter Verwendung von VE-Wasser, bidestilliertem Wasser und Milli-Q-Wasser. Durchgeführt wurden die Kultivierungen in Serumflaschen mit einem Flüssigvolumen von 20 mL bei 30 °C analog zu der in Kap. 4.4.1 beschriebenen Methode. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Lorena Rincón Rincón erhoben (Rincón Rincón, 2017).

Aufgrund des potenziell entzündlichen Gasgemisches aus Methan und Luft stellt die Fermentation im größeren Maßstab aus prozesstechnischer Sicht eine erhebliche Herausforderung dar, solange sich die Zusammensetzung des Gasgemisches innerhalb der Explosionsgrenzen bewegt. Dies ist ein wesentlicher Grund dafür, dass bisherige Kultivierungen methanotropher Bakterien unter Nutzung von Methan als Kohlenstoffquelle überwiegend im kleinen Schüttelkolbenmaßstab (20 - 5000 mL) durchgeführt wurden (siehe Tabelle 5) (Acha et al., 2002; Park et al., 1992, 1991). Um eine Absenkung der Methankonzentration in einen potentiell explosiven Bereich (5 % und 15 % Methan in Luft) zu verhindern, wird Methan mit einem Anteil von 30 % im Überfluss zugegeben. Dadurch stellt Sauerstoff als Substrat während der Fermentation einen limitierenden Faktor dar. Aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen ist ein Vergleich der hier dargestellten Fermentationsdaten mit Daten aus der Literatur nur bedingt möglich. Um eine Basis zum Vergleich unterschiedlicher Bioreaktoren zu schaffen, wurde daher zunächst eine Vergleichsfermentation im Rührkesselreaktor mit und ohne Kupfer im Nährmedium durchgeführt (Abbildung 31). Die vorliegenden Daten zeigen, dass *M. trichosporium* OB3b mit Kupfer durch die Expression der pMMO deutlich höhere Wachstumsraten als bei der Fermentation ohne Kupfer aufweist (mit Cu  $0,139 \text{ h}^{-1}$  im Zeitraum berechnet von 0 - 4 h, ohne Cu  $0,046 \text{ h}^{-1}$  im Zeitraum berechnet von 0-19 h). Zudem wurden deutlich höhere Biomassekonzentrationen bei der Zugabe von Kupfer erreicht (mit Cu  $15,4 \pm 2,5 \text{ g L}^{-1}$ , ohne Cu  $9,1 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ ). Diese Beobachtungen korrelieren mit den wenigen in der Literatur beschriebenen Effekten von Kupfer auf die Wachstumskinetik aerober, methanotropher Bakterien (Leak and Dalton, 1986; Park et al., 1992, 1991). Leak und Dalton (1986) zeigten z.B. in ihren Untersuchungen

einen Effekt von Kupfer auf die Wachstumskinetik des methanotrophen Organismus *Methylococcus capsulatus* (Bath). Bei Zugabe von Kupfer wiesen die Zellen in der genannten Studie durch die Ausbildung der pMMO eine um 38 % gesteigerte Kohlenstoffkonversion auf (Leak and Dalton, 1986).

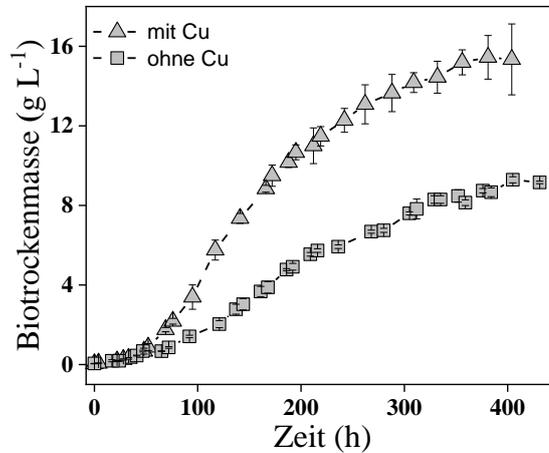


Abbildung 31: Dargestellt ist die Wachstumskinetik von *M. trichosporium* OB3b im Rührkesselbioreaktor mit und ohne Kupfer. Die Fermentation erfolgte im 1 L DasGip Bioreaktor wie in Kap. 4.4.3 beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die mittlere Standardabweichung aus  $n \geq 3$  Messungen. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Kommander erhoben (Kommander, 2019).

Für die Fermentation von *M. trichosporium* OB3b im kleinen Maßstab wurden bisher überwiegend Schüttelkolben oder sogenannte Serumflaschen eingesetzt (Acha et al., 2002; Bowman and Sayler, 1994; Griethe, 2018; Koh et al., 1993). In beiden Fällen nimmt der Gasraum im Kultivierungsgefäß ein Vielfaches des Volumens der Flüssigphase ein. Folglich ist das zur Verfügung stehende Reaktionsvolumen verhältnismäßig gering. Zudem ist hierbei das Einstellen der Gasatmosphäre von 30 % Methan und 70 % Luft sehr zeitintensiv (siehe Kap. 4.4.1 und 4.4.2.). Eine kontinuierliche Gaszufuhr sowie ein kontinuierlicher Gasaustrag sind in diesen Systemen aufgrund des Fehlens adäquater Sicherheitsvorkehrungen sehr schwer umsetzbar.

Im HDC10-Inkubator kann hingegen eine kontinuierliche blasenfreie Begasung der Kultur über eine Membran gewährleistet werden. Dadurch kann ein unnötig großer Gasraum im Reaktionsgefäß vermieden werden. Das Verhältnis des Kultivierungsvolumens zum Gesamtvolumen ist im Fall der HDC10-Inkubatoren mit 2:1 gegenüber den eingesetzten Serumflaschen (12,5:1) deutlich größer. Zudem können in Abhängigkeit von der verwendeten Plattform mehrere Proben gleichzeitig kultiviert werden (siehe Kap. 4.4.4). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b erstmals im HDC10-Inkubator erfolgreich etabliert werden.

Abbildung 32 zeigt die Wachstumskinetik des Stammes über einen Zeitraum von 256 h. Es wurde eine maximale Biomassekonzentration von  $0,79 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  sowie eine maximale Wachstumsrate von  $0,03 \text{ h}^{-1}$  (im Zeitraum berechnet von 22 h bis 44 h) erreicht. Das HDC10-System wurde in dieser Arbeit erstmals zur Kultivierung aerober, methanotropher Bakterien eingesetzt, weshalb ein Vergleich der Wachstumsraten und maximalen Biomassekonzentration mit der Literatur ausschließlich mit anderen Systemen möglich ist. Dabei liegt die Wachstumsrate in den HDC10-Inkubatoren deutlich unter den aus der Literatur bekannten Werten (mit Kupfer im Nährmedium  $\mu = \text{max. } 0,12 \text{ h}^{-1}$ ) (Bowman and Saylor, 1994; Koh et al., 1993; Park et al., 1992, 1991). Möglicherweise ist die alleinige Diffusion der Substrate durch die Membran nicht ausreichend und wirkt sich limitierend auf die Wachstumsrate aus. Für zukünftige Anwendungen kann das Kultivierungssystem, z.B. durch das Anlegen von leichtem Überdruck oder eine Erhöhung der Membranfläche, optimiert werden, sodass voraussichtlich auch höhere Wachstumsraten erreicht werden können.

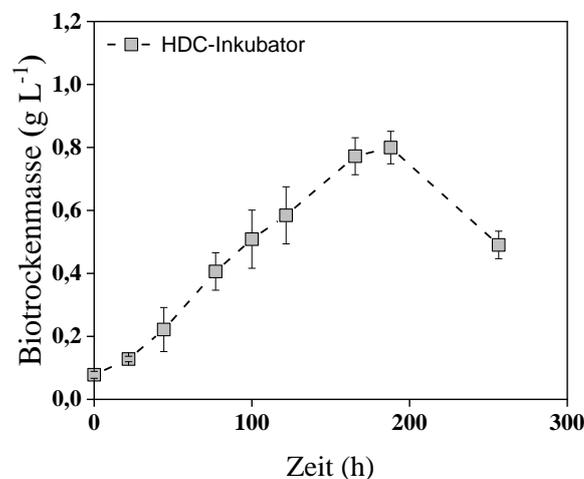


Abbildung 32: Dargestellt ist die Wachstumskinetik von *M. trichosporium* Ob3b im kommerziell erhältlichen HDC10-Inkubator der Firma Cell-DEG. Die Fermentation erfolgte bei 30 °C und 300 rpm. Methan und Luft wurden vorab durch das GMS\_3CH (30 % v/v Methan und 70 % v/v Luft) gemischt und der Plattform bei einem konstanten Gasstrom von  $0,5 \text{ l h}^{-1}$  zugeführt. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die mittlere Standardabweichung aus  $n = 3$  Messungen.

Jedoch gibt es auch bei dieser Form der Kultivierung zwei wesentliche Nachteile. Zum einen sind Bioreaktoren nur bis 2 L kommerziell erhältlich, zum anderen wird, bedingt durch die Bauart des Reaktors, eine erhebliche Menge Methan in die unmittelbare Umgebung freigesetzt.

Im neu entwickelten DMBR werden die Gase hingegen durch eine gezielte Gasführung über die Kulturbrühe direkt metabolisiert und gelangen somit nur in geringem Maße in die Atmosphäre (Aufbau siehe Kap. 4.4.5). Die Bauart des DMBR ist an die einer Kammerfilterpresse angelehnt und somit auch entsprechend modular skalierbar. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Fermentation von *M. trichosporium* OB3b im DMBR gezeigt werden (Abbildung

33). Die maximal erreichte Biomassekonzentration lag nach 236 h bei  $0,95 \text{ g L}^{-1}$ . Die maximale spezifische Wachstumsrate betrug  $0,04 \text{ h}^{-1}$ .

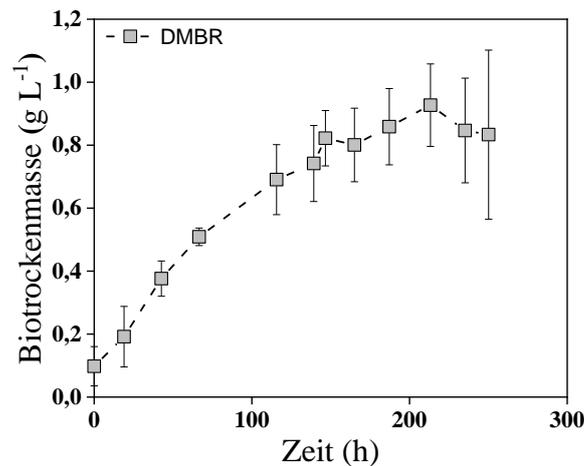


Abbildung 33: Dargestellt ist die Wachstumskinetik von *M. trichosporium* Ob3b im neu entwickelten DMBR Reaktor (Kap. 4.4.5). Die Fermentation erfolgte bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  und einer Pumpgeschwindigkeit von  $2,2 \text{ l min}^{-1}$ . Methan und Luft wurden getrennt voneinander bei einem 1 bar Druck über die jeweilige Membranfläche zugeführt.

## 5.2.2 Einfluss der Nährmedienzusammensetzung

Neben dem Einfluss des Reinheitsgrades des zur Kultivierung verwendeten Wassers (Kap. 5.2.1 Abbildung 30), wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss von wesentlichen Nährmedienskomponenten wie Ammonium, Nitrat, Kupfer, Phosphat und Eisen auf die Wachstumskinetik von *M. trichosporium* OB3b untersucht. Die Versuche wurden in HDC10-Inkubatoren, wie in Kap. 4.4.4, beschrieben durchgeführt. Im hier verwendeten mod. NMS-Nährmedium, zuvor beschrieben durch Griethe (2018), wird Eisensulfat als Eisenquelle eingesetzt (Burrows et al., 1984; Griethe, 2018; Higgins et al., 1981). Eisen stellt einen zentralen Bestandteil vieler Enzyme dar und ist somit ein essentiell für den mikrobiellen Metabolismus (Chmiel, 2018). Auch die MMO hat Eisenatome im aktiven Zentrum integriert (Kap. 2.4). Daher ist eine optimale Versorgung von Eisen von enormer Bedeutung. Da Eisensulfat jedoch ohne Anwesenheit von Komplexbildnern dazu neigt aus dem Kulturmedium auszufallen und den Organismen somit nur noch vermindert zur Verfügung steht, wurde das Eisensulfat durch Eisencitrat ersetzt. Abbildung 35 A zeigt, dass sowohl mit Eisencitrat als auch mit Eisensulfat die gleiche max. Wachstumsrate von  $0,03 \text{ h}^{-1}$  erzielt wurde. Da das Eisencitrat gegenüber Eisensulfat jedoch als Stammlösung eine längere Haltbarkeit aufweist und deshalb nicht vor jeder Fermentation erneut hergestellt werden muss, wurden alle weiteren Fermentationen im Rahmen dieser Arbeit mit Eisencitrat durchgeführt.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

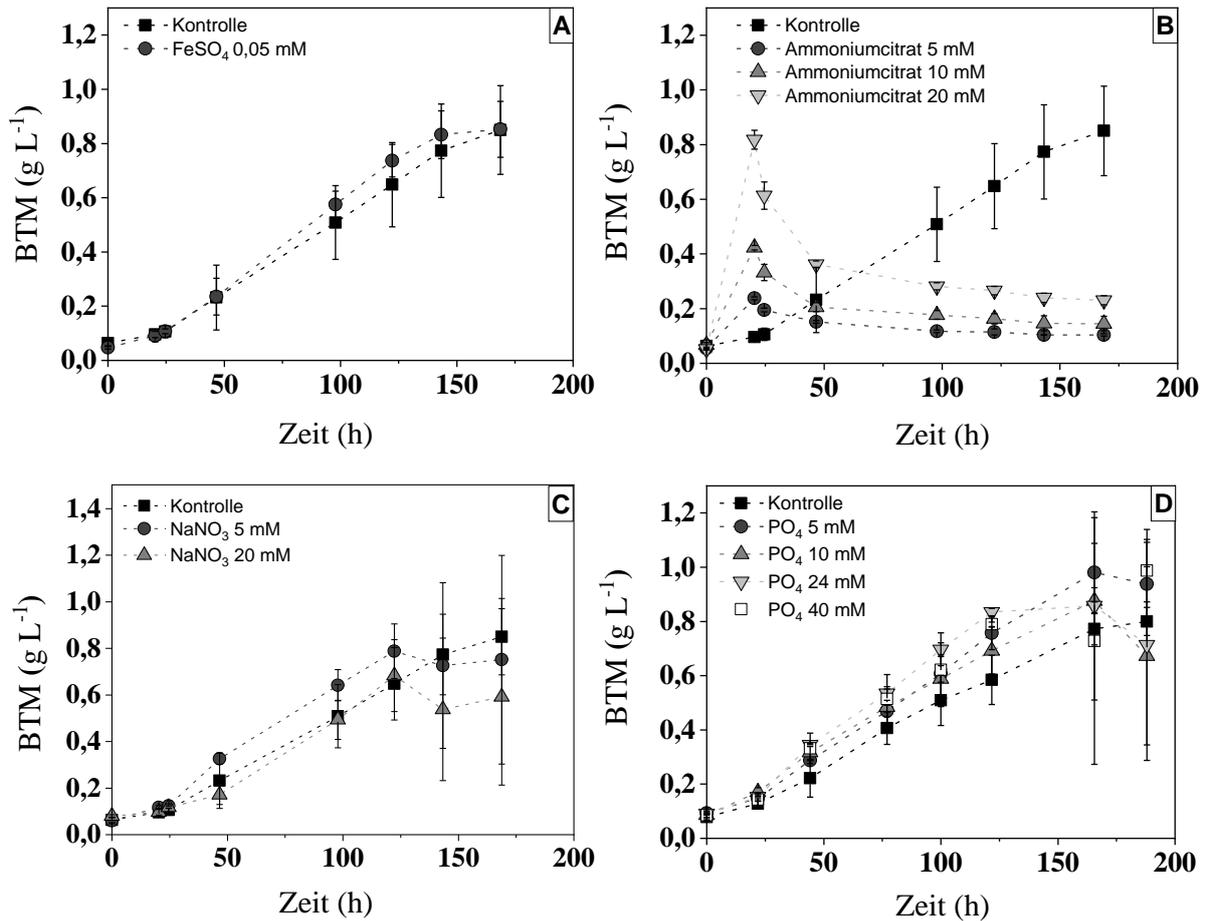


Abbildung 34 A-D: Gezeigt sind Wachstumskinetiken mit unterschiedlichen (A) Eisen-, (B) Ammonium-, (C) Nitrat- und (D) Phosphatkonzentrationen im NMS-Medium. Kultiviert wurde in HDC10-Inkubatoren nach der in Kap. 4.4.4 beschriebenen Methode. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die mittlere Standardabweichung aus  $n = 3$  Messungen. Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Ervin Sivic (Sivic, 2020).

Abbildung 34 B zeigt, dass der Einsatz unterschiedlicher Stickstoffquellen einen erheblichen Einfluss auf das Wachstum von *M. trichosporium* OB3b hat. Stickstoff ist dabei ein wesentlicher Bestandteil für den Aufbau von z.B. Proteinen und Nucleinsäuren. Nach einer Fermentationsdauer von ca. 20 h wird mit 20 mM Ammoniumcitrat im NMS-Medium eine Biomassekonzentration von ca.  $0,81 \pm 0,016 \text{ g L}^{-1}$  erreicht. Im Vergleich dazu liegt zu diesem Zeitpunkt die Biomassekonzentration bei der Kontrollprobe mit Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) bei ca.  $0,09 \pm 0,011 \text{ g L}^{-1}$ . Die Kontrollprobe erreicht erst nach 168 h eine vergleichbare Biomassekonzentration von  $0,58 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1}$ . Im Vergleich zu der Wachstumskinetik mit Nitrat als Stickstoffquelle setzte die Absterbephase des MOBs mit Ammonium bereits nach 20 h ein (Abbildung 34 B). Die Variation der Natriumnitratkonzentration hatte hingegen keinen wesentlichen Einfluss gezeigt (Abbildung 34 C).

Da Phosphat einen wesentlichen Beitrag bei der Speicherung und Übertragung von Energie im Stoffwechsel und bei der Synthese von DNA und RNA hat (Chmiel, 2018), wurden in dieser

Arbeit unterschiedliche Phosphatzusammensetzungen getestet. Dabei wurden die Konzentrationen von  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  variiert. Die Variation des Phosphatgehaltes hatte jedoch keinen großen Einfluss auf die Wachstumskinetiken (siehe Abbildung 34 D). Deshalb ist davon auszugehen, dass die Phosphatkonzentration bereits optimal im NMS-Nährmedium eingestellt ist.

Natriumcarbonat dient als  $\text{CO}_2$  Quelle (Dehnicke, 1996). Durch dessen Zugabe soll eine Verkürzung der Lag-Phase erreicht werden. Die Erhöhung der Natriumhydrogencarbonat-Konzentration führte zunächst zu einem Anstieg der Wachstumsrate. Jedoch stagnierte das Zellwachstum bereits nach einer Fermentationsdauer von ca. 44 h (siehe Abbildung 35 E). Ohne die Zugabe von  $\text{NaHCO}_3$  konnten sogar höhere Biomassekonzentrationen erreicht werden. Neben  $\text{CO}_2$  scheint eine andere Einflussgröße einen stärkeren Einfluss auf die Lag-Phase zu haben. Eine mögliche Ursache könnte eine unzureichende Substratversorgung der Vorkultur sein. Wird die Vorkultur nicht optimal versorgt, benötigen die Zellen einen längeren Zeitraum um sich wieder an die neue Umgebung anzupassen. Dies wiederum kann in einer verlängerten Lag-Phase resultieren.

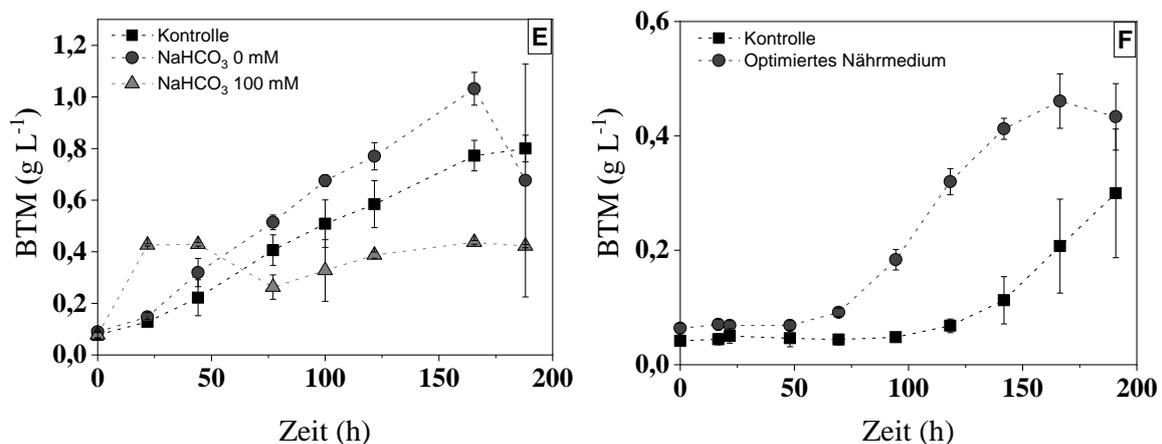


Abbildung 35 E-F: Gezeigt sind Wachstumskinetiken mit unterschiedlichen  $\text{NaNO}_3$ -Konzentrationen (E) im NMS-Nährmedium und das optimierte NMS-Medium (F). Kultiviert wurde in HDC10-Inkubatoren nach der in Kap. 4.4.4 beschriebene Methode. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die mittlere Standardabweichung aus  $n = 3$  Messungen. Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Ervin Sivic (Sivic, 2020).

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen (Abbildung 34 A-E und Abbildung 35 E-F) wurde nachfolgend ein optimiertes Nährmedium entwickelt und eingesetzt. Hierbei wurde Eisencitrat als Eisenquelle verwendet, die  $\text{NaNO}_3$ -Konzentration und die Komponenten des Phosphatpuffers ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,012 mM und 18,99 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) wie im Standardmedium beibehalten.  $\text{NaHCO}_3$  kam in diesem Ansatz nicht zum Einsatz. Wenngleich die maximale Biotrockenmassekonzentration im Vergleich zu den vorherigen Ansätzen, mit  $0,46 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  für das optimierte Nährmedium und  $0,36 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$  für das ursprüngliche NMS-Medium relativ

gering ist, weist das optimierte Nährmedium eine deutlich verkürzte Lag-Phase auf (Abbildung 35, F).

Eine wesentliche verbesserung zum bisherigen NMS-Medium konnte nicht erzielt werden. Damit wurde bestätigt, dass das standard NMS-Medium bereits weitestgehend optimiert ist. lediglich die Eisenquelle wurde verändert. Daher ist das NMS-Medium auch für längere Fermentationszeiträume bestens geeignet.

### 5.2.3 Einfluss von CO<sub>2</sub> auf das Wachstumsverhalten in Serumflaschen

MOB haben abhängig von den zugrundeliegenden Kultivierungsbedingungen natürlicherweise eine sehr lange Lag-Phase von etwa 8 h bis 10 h und weisen zudem geringe Wachstumsraten und schlechte Biokonversionsraten im Vergleich zu heterotrophen Bakterien auf (Park et al., 1992, 1992, 1991; Xing et al., 2006). Durch die Zugabe von CO<sub>2</sub> als Cosubstrat kann jedoch eine Verkürzung der Lag-Phase und damit eine erhöhung der Produktivität erreicht werden (Acha et al., 2002). Begründet ist dies im Serinweg, den Typ II methanotrophe Bakterien zum Aufbau von Zellmaterial nutzen (Hanson and Hanson, 1996). Für den Serinweg benötigen die Bakterien 2 mol Formaldehyd und 1 mol Kohlenstoffdioxid (Acha et al., 2002; Anthony, 1982; Park et al., 1991). Wird das CO<sub>2</sub> direkt über die Gasphase zugeführt, können die Bakterien schneller mit dem Aufbau von Biomasse beginnen, da sie dieses nicht selbst, ausgehend von Methan synthetisieren müssen. Wie in Kap. 2.2 im Detail beschrieben, wurde in dieser Arbeit daher der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf den Organismus *M. trichosporium* OB3b im 20 mL Maßstab unter Ausbildung der pMMO, also mit der Zugabe von Kupfer im Nährmedium, untersucht.

Um Rückschlüsse ziehen zu können, in wie weit sich eine Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Gehaltes auf die Wachstumskinetik des Organismus *M. trichosporium* OB3b auswirkt, wurden vier verschiedene CO<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 0 % und 15 % in der Gasphase eingestellt. Da Methan im Überschuss vorliegt, wurde der Methananteil zugunsten des CO<sub>2</sub>-Anteils gesenkt. Tabelle 4 zeigt, dass sich die Verdopplungszeit (T<sub>d</sub>) bei Zugabe von 10 % CO<sub>2</sub> gegenüber dem Kontrollversuch ohne CO<sub>2</sub> von 22 h auf 14 h verkürzt. Nach 42 h sinkt die Verdopplungszeit von 12 h (T<sub>d</sub>) bei einer Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Anteils auf 15 % sogar auf 9 h. Folglich erhöht sich auch die maximale Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) durch die Zugabe von 15 % CO<sub>2</sub> von 0,058 h<sup>-1</sup> auf 0,074 h<sup>-1</sup> (Tabelle 4). Im späteren Verlauf der Kultivierung konnte mit zunehmender Biomassekonzentration hingegen kein Effekt auf die Wachstumskinetik beobachtet werden. Die maximale Biomassekonzentration nach einer Kultivierungsdauer von 42 h betrug in allen Ansätzen ca. 0,4 g L<sup>-1</sup> (Abbildung 36). Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von CO<sub>2</sub> zu Beginn der Fermentation (0 bis 21 h) einen positiven Effekt auf das Biomassewachstum hat. Dies korreliert

mit den Untersuchungen von Acha et al. 2002 (Acha et al., 2002). Ferner zeigen die Ergebnisse, dass die Zugabe von zusätzlichem CO<sub>2</sub> über den weiteren zeitlichen Verlauf der Fermentation nicht schädlich für den Organismus ist, jedoch auch zu keinem zusätzlichen Biomassezuwachs führt. Die Ergebnisse legen zudem nahe, dass sich eine mögliche zukünftige Verwendung von Biogas – ein Gasgemisch aus CO<sub>2</sub> und Methan – als Kohlenstoffquelle zu Beginn der Fermentation positiv auf das Wachstum von *M. trichosporium* OB3b auswirken könnte.

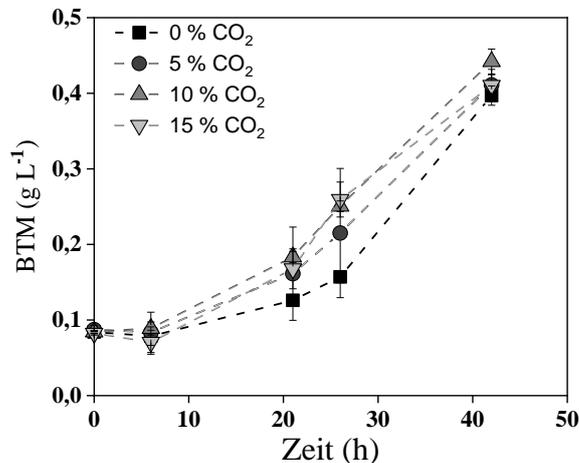


Abbildung 36: Einfluss von zusätzlichem CO<sub>2</sub> auf die Wachstumskinetik von *M. trichosporium* OB3b. Durchgeführt wurden die Versuche in Serumflaschen mit 20 mL Flüssigvolumen gemäß der in Kap. 4.6 beschriebenen Kultivierungsmethode. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die mittlere Standardabweichung aus n = 3 Versuchen.

Tabelle 4: Wachstumsraten von *M. trichosporium* OB3b bei ausgewählten CO<sub>2</sub> Konzentrationen

	0 % CO <sub>2</sub>	5 % CO <sub>2</sub>	10 % CO <sub>2</sub>	15 % CO <sub>2</sub>
Wachstumsrate $\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,058 <sup>a</sup>	0,058 <sup>b</sup>	0,062 <sup>c</sup>	0,074 <sup>c</sup>
t <sub>d</sub> nach 21 h (h)	22	16	14	14
t <sub>d</sub> nach 42 h (h)	12	12	11	9

a) Berechnet zwischen 26 h und 42 h; b) Berechnet zwischen 21 h und 26 h; c) Berechnet zwischen 21 h und 26 h. (n=3).

Zusätzlich zu dem Verlauf der Biomassekonzentration, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Gaszusammensetzung im Gasraum der Serumflaschen mittels Micro-GC zu drei ausgewählten Zeitpunkten analysiert (Methode beschrieben in Kap. 4.5.3). In Abbildung 37 (A bis D) sind die absoluten Messwerte von Methan, Sauerstoff und CO<sub>2</sub> dargestellt. In allen Versuchsansätzen lag Methan deutlich im Überschuss vor, wohingegen Sauerstoff den wesentlichen limitierenden Faktor darstellte. Es wird deutlich, dass der vorhandene Sauerstoff nach einer Fermentationsdauer von 45 h in fast allen Ansätzen nahezu aufgebraucht wurde. Auch die daraus resultierende Zunahme des CO<sub>2</sub>-Gehalts konnte in allen Ansätzen beobachtet werden.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

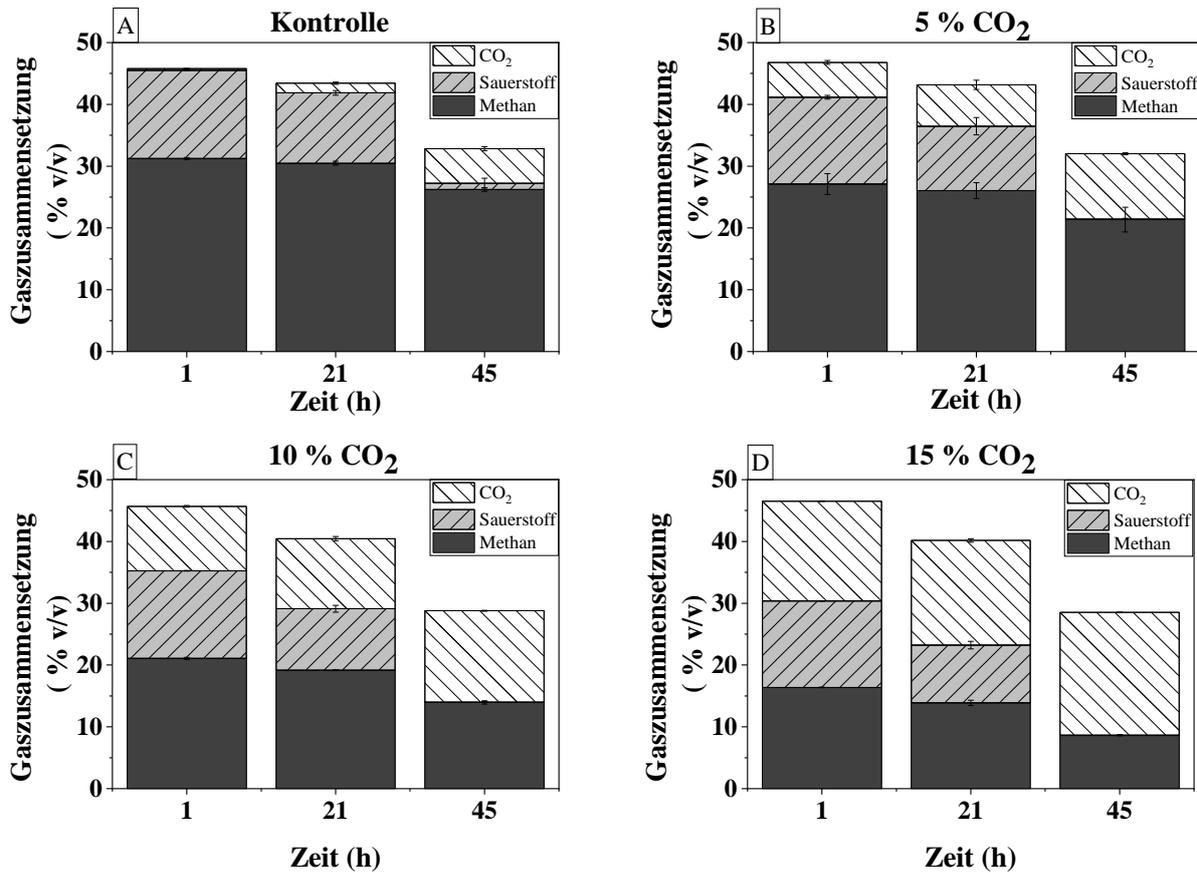


Abbildung 37: Zusammensetzung der Gase CO<sub>2</sub>, Sauerstoff und Methan (% v/v) an drei unterschiedlichen Zeitpunkten während der Fermentation in Serumflaschen bei unterschiedlichen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die mittlere Standardabweichung aus n = 3 Versuchen.

Aus den gewonnenen Daten konnte die Berechnung des Verhältnisses von CO<sub>2</sub> zu CH<sub>4</sub> zu den verschiedenen Zeitpunkten erfolgen (Abbildung 38).

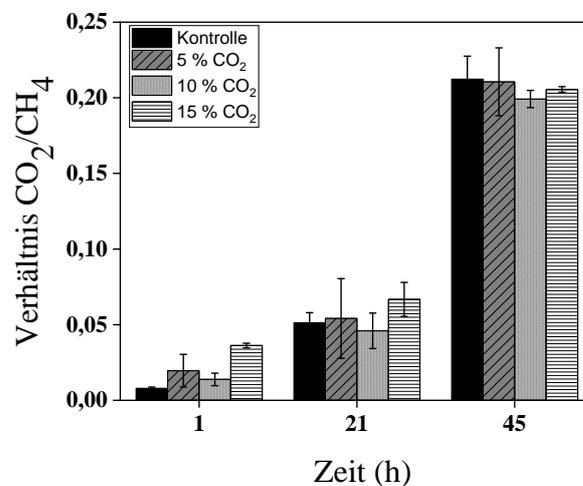


Abbildung 38: Dargestellt ist das Verhältnis von CO<sub>2</sub> zu CH<sub>4</sub> in der Gasphase zur Verdeutlichung der Stoffwechselaktivität.

Das Verhältnis ermöglicht eine Aussage über die Stoffwechselaktivität der MOB: Je höher der Wert ist, desto effektiver wird Methan in CO<sub>2</sub> umgewandelt. Alle Ansätze zeigen übereinstimmend die niedrigsten Werte zu Beginn der Fermentation und die höchsten Werte nach 45 h.

Diese Ergebnisse korrelieren somit mit den in Abbildung 36 dargestellten Wachstumskinetiken. Interessant ist dabei der Vergleich der Verhältnisse zu den jeweiligen Zeitpunkten. Zu Beginn der Fermentation ist das Verhältnis von  $\text{CH}_4$  zu  $\text{CO}_2$  bei Zugabe von 15 %  $\text{CO}_2$  am größten. Ohne Zugabe von zusätzlichem  $\text{CO}_2$  ist das Verhältnis am kleinsten. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen bei der Zugabe von  $\text{CO}_2$  schneller damit beginnen, Methan zu metabolisieren und somit schneller Biomasse aufzubauen. Im Laufe der Fermentationen gleicht sich das Verhältnis von  $\text{CH}_4$  zu  $\text{CO}_2$  in allen Proben an. Die Ergebnisse zeigen, dass eine zusätzliche  $\text{CO}_2$ -Zugabe bei fortschreitender Fermentationsdauer keinen Einfluss mehr auf die metabolische Aktivität der Zellen hat.

Die Arbeitsgruppe um Acha et al. (2002) zeigte in ihren Untersuchungen ebenfalls einen positiven Einfluss von  $\text{CO}_2$  auf die Lag-Phase einer Mischkultur aus methanotrophen und heterotrophen Bakterien (Acha et al., 2002). In ihrer Mischkultur identifizierten sie zwei methanotrophe Bakterienstämme, zum einen *Methylococcus capsulatus*, welcher zu den Typ I methanotrophen Bakterien zählt, sowie *Methylobacterium sp.*, der wie *M. trichosporium* OB3b den Typ II methanotrophen Bakterien zuzuordnen ist. Acha et al. gingen in ihrer Studie davon aus, dass das Wachstum von *Methylobacterium sp.* durch das zugesetzte  $\text{CO}_2$  positiv beeinflusst wird und somit auch maßgebliche Bedeutung für das Zellwachstum hat. Wie auch in der Arbeit von Acha et al. (2002) beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem Typ II methanotrophen Organismus gearbeitet, welcher den Serinweg zur Biomasseassimilation verwendet (im Detail beschrieben in Kap. 2.3). Wird kein zusätzliches  $\text{CO}_2$  zur Kultivierung zugegeben, können die Bakterien nur auf das in der Luft enthaltene  $\text{CO}_2$  zugreifen und haben erst im späteren Verlauf ausreichend  $\text{CO}_2$  aus ihrem Stoffwechsel für den Serinweg zur Verfügung. Daraus resultiert eine relativ lange Lag-Phase. Durch zusätzliche Einspeisung von  $\text{CO}_2$  zu Beginn des Prozesses kann die Lag-Phase verkürzt werden. Die hier gezeigten Daten stehen somit im Einklang mit der Veröffentlichung von Acha et al. (2002). Eine Verkürzung der Lag-Phase durch eine gezielte  $\text{CO}_2$ -Zugabe konnte in dieser Arbeit somit auch für *Methylosinus trichosporium* OB3b gezeigt werden.

### **5.2.4 Einfluss von $\text{CO}_2$ auf das Wachstumsverhalten im Rührkesselreaktor**

Wie im vorherigen Kapitel dargelegt, hat die Zugabe von  $\text{CO}_2$  bei der Fermentation von *M. trichosporium* OB3b in Serumflaschen einen positiven Einfluss durch die Verkürzung der Lag-Phase auf das Wachstumsverhalten hat. Um zu untersuchen, wie sich dieser Sachverhalt in

einem kontinuierlich betriebenen Prozess auswirkt, wurden Wachstumskinetiken im 1 L-Rührkesselreaktor mit kontinuierlicher Begasung aufgezeichnet. Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 39, A/a, zeigen die Fermentation im 1 L-Rührkesselreaktor ohne Kupfer.

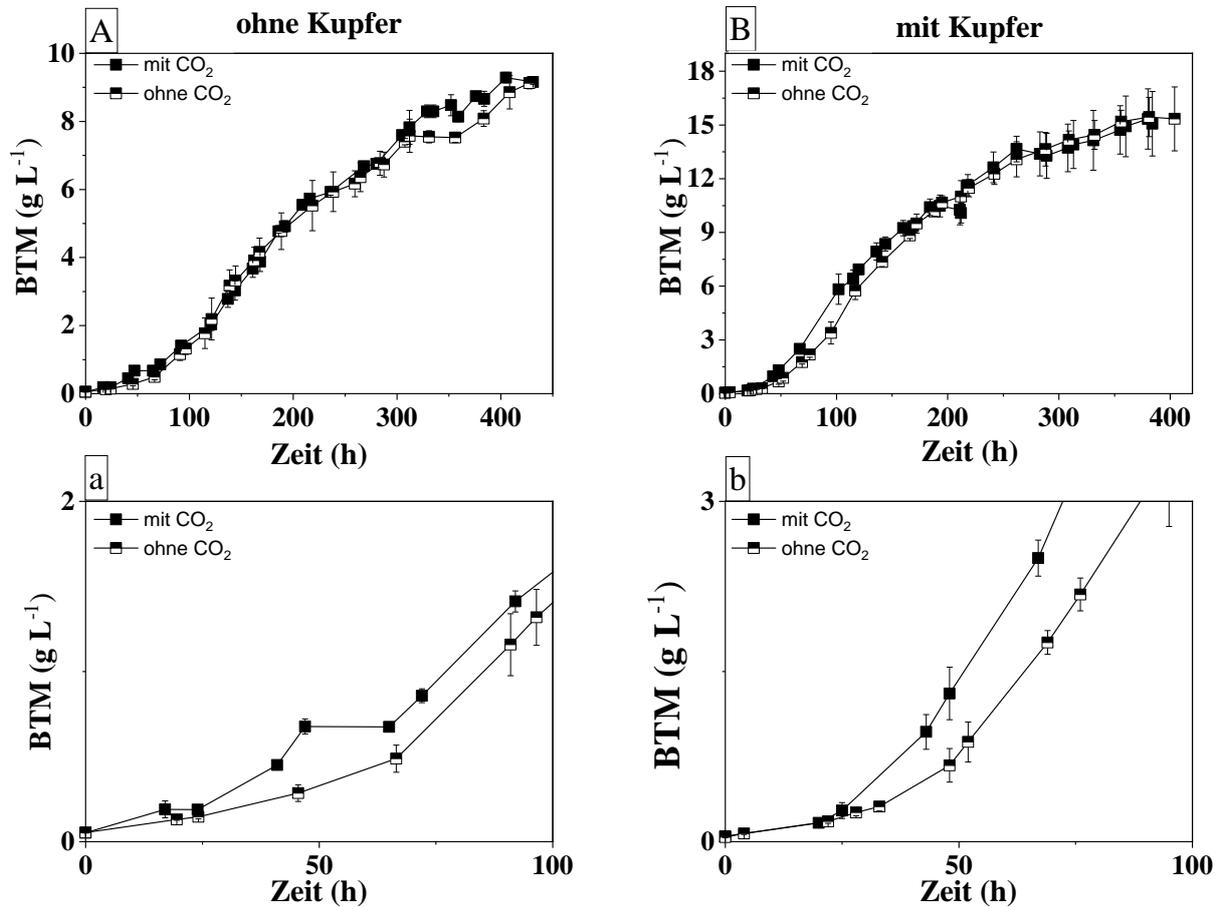


Abbildung 39: Dargestellt sind Fermentationen im 1 L Rührkesselreaktor ohne Kupfer (A/a) und mit Kupfer im NMS-Medium (B/b). Oben ist jeweils die gesamte Fermentation dargestellt, unten sind die ersten 100 h der Fermentation aufgezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die mittlere Standardabweichung aus  $n = 3$  Versuchen. Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Michael Kommander (Kommander, 2019).

In A ist die gesamte Fermentationszeit über einen Zeitraum von 400 h dargestellt, in a sind die ersten 100 h der Fermentation aufgezeigt. Durch die Zugabe von 10 %  $\text{CO}_2$  konnte die max. Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) in der Fermentation ohne Kupfer, d.h. unter Ausbildung der sMMO von  $0,046 \text{ h}^{-1}$  (berechnet im Zeitraum von 0-19 h) auf  $0,076 \text{ h}^{-1}$  (berechnet im Zeitraum von 0-17 h) gesteigert werden. Durch die Steigerung der Wachstumsrate verkürzt sich ebenfalls die Verdopplungszeit für die Fermentation ohne Kupfer von 15,1 h auf 5 h. Deutlich wird die Verkürzung der Lag-Phase bei dem Vergleich der Wachstumsraten im Zeitraum von ca. 0 -50 h. Ohne Zugabe von zusätzlichem  $\text{CO}_2$  lag die Wachstumsrate bei  $\mu = 0,037 \text{ h}^{-1}$  (berechnet im Zeitraum von 0-45 h), woraus sich eine Verdopplungszeit von  $t_d = 18,8 \text{ h}$  errechnet. Die Zugabe von 10 %  $\text{CO}_2$  verkürzt die Verdopplungszeit um ca. 6 h und erhöht die Wachstumsrate im Zeitraum von 0-47 h auf  $\mu = 0,055 \text{ h}^{-1}$ . Die maximal erreichbare Biomassekonzentration lag mit aber auch

ohne Zugabe von CO<sub>2</sub> bei ca. 9 g L<sup>-1</sup> (Tabelle 5). Die vorliegenden Daten korrelieren mit den durch Park et al. 1991 publizierten Beobachtungen. Park et al. untersuchten neben dem Einfluss von CO<sub>2</sub> in der Gasphase auch den Einfluss von NaHCO<sub>3</sub> auf das Wachstumsverhalten von *M. trichosporium* OB3b. Durch die zusätzliche Einspeisung von NaHCO<sub>3</sub> bzw. CO<sub>2</sub> konnte die Lag-Phase verkürzt werden und die Wachstumsrate gesteigert werden. Die höchste Wachstumsrate wurde bei der Zugabe von CO<sub>2</sub> in den Gasstrom erzielt. Park et al. erzielten Wachstumsraten von  $\mu_{\max} = 0,065 - 0,090 \text{ h}^{-1}$  durch das Mischungsverhältnis von Luft/CO<sub>2</sub> 9:1 in einer 5 L Fermentation ohne Kupferzusatz (Park et al., 1991).

Der Zuwachs der Biomassekonzentration während der Fermentation mit Kupfer ist in Abbildung 39, B/b dargestellt. In B ist der gesamte Fermentationsverlauf dargestellt, in b ist eine detaillierte Ansicht der ersten 100 h der Fermentation abgebildet. Analog zur Fermentation ohne Kupfer resultierte auch hier eine Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Anteils in einer verkürzten Lag-Phase. Entgegen der zuvor gezeigten Ergebnisse ist  $\mu_{\max}$  bei der Fermentation mit Kupfer ohne die Bereitstellung von zusätzlichem CO<sub>2</sub> mit  $0,0139 \text{ h}^{-1}$  (berechnet im Zeitraum von 0-4 h) am höchsten. Für die Fermentation sowohl ohne als auch mit zusätzlichem CO<sub>2</sub> wurden im Zeitraum von 0 bis 20 h vergleichbare Wachstumsraten erzielt ( $\mu = 0,067$  im Zeitraum von 0-22 h (mit Cu ohne CO<sub>2</sub>);  $\mu = 0,061$  im Zeitraum von 0-20 h, mit Cu mit CO<sub>2</sub>). Da sich die Substratversorgung der Organismen mit Methan und Sauerstoff über den zeitlichen Verlauf der Fermentation verschlechtert, könnte die höhere maximale Wachstumsrate bei der Kultivierung ohne CO<sub>2</sub> durch die kürzere Zeitspanne der aufgenommenen Messwerte zurückzuführen sein. Für die Fermentation mit CO<sub>2</sub> liegen lediglich nur Daten zur Biomassekonzentration über einen Zeitraum von 4 h vor. Daher kann für diesen Zeitraum keine  $\mu_{\max}$  errechnet werden. Der positive Einfluss der CO<sub>2</sub>-Zugabe auf das Wachstum der Zellen zeigte sich ab einer Fermentationsdauer von etwa 25 h. Nach etwa 50 h war beispielsweise bei Zugabe von 10 % CO<sub>2</sub> eine Erhöhung der Wachstumsrate von  $0,052 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,069 \text{ h}^{-1}$  zu beobachten. Folglich konnte auch die Verdopplungszeit im selben Zeitraum von 13,2 h auf 10,1 h verkürzt werden. Ähnliche Versuche wurden von Park et al. 1992 publiziert. Bei kontinuierlicher Begasung einer *M. trichosporium* OB3b Kultur in einem 5 L Fermenter mit 10 % CO<sub>2</sub> im Luftstrom wurde im Vergleich zur Fermentation ohne CO<sub>2</sub> keine Lag-Phase mehr beobachtet (Park et al., 1992). Ein tabellarischer Vergleich der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit Literaturdaten ist in Tabelle 5 dargestellt. Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse untermauern bestehende Erkenntnisse zum Einfluss von CO<sub>2</sub> auf das Wachstum von *M. trichosporium* OB3b unter Betrachtung der sMMO und der pMMO. Der Einfluss des Cosubstrats konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals auch für 1 L Rührkesselreaktoren im Fed-Batch Betrieb gezeigt werden.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 5: Vergleich relevanter Fermentationsparameter für die Kultivierung von MOB ohne und mit zusätzlicher Zugabe von CO<sub>2</sub> in der Gasphase der in dieser Arbeit enthaltenen Daten mit bereits publizierter Daten von Acha et al. und Park et al..

Parameter	diese Arbeit				Acha et al. (2002)		Park 1991/1992	
<b>Organismus</b>	<i>M. trichosporium</i> OB3b				Mischkultur (methanotrophe-heterotrophe Bodengemeinschaft)		<i>M. trichosporium</i> OB3b	
<b>Volumen</b>	1 L				250 mL		5 L	
<b>Temperatur (°C)</b>	30				27		30	
<b>pH-Wert</b>	6,9				6,8		6	
<b>Rührerdrehzahl (rpm)</b>	800				Schüttelkolben		350-700	
<b>Begasungsrate ( L h<sup>-1</sup>)</b>	0,5				einmalig		Methan: 150-500 mL h <sup>-1</sup> Luft (mit 10 % CO <sub>2</sub> ): 450-1500 mL h <sup>-1</sup>	
<b>Zuluft CO<sub>2</sub></b>	0 %		10 %		0-11,6 kPa		7,5 %	
<b>Methan</b>	30 %		30 %		25,9 kPa		25 %	
<b>Luft</b>	70 %		60 %		77,8 kPa		67,5 %; 75 % davon 10 % CO <sub>2</sub>	
<b>Maximale spezifische Wachstumsrate <math>\mu_{\max}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>- Cu</b>	<b>+ Cu</b>	<b>- Cu</b>	<b>+ Cu</b>	<b>- Cu</b>	<b>+ Cu</b>	<b>- Cu</b>	<b>+ Cu</b>
	0,046 (0-19 h)	0,139 (0-4 h)	0,076 (0-17 h)	0,101 (20- 25 h)	k.A.	k.A.	0,065-0,090	0,12
<b>Verdopplungszeit <math>t_d</math> (h)(aus <math>\mu_{\max}</math>)</b>	15,1	5	10,3	6,9	k.A.	k.A.	10,6-7,7	5,8
<b>Wachstumsrate <math>\mu</math> (h<sup>-1</sup>) (im Zeitraum von ca. 0-50 h)</b>	0,037 (0-45 h)	0,052 (0-52 h)	0,055 (0-47 h)	0,068 (0-48 h)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
<b>Verdopplungszeit <math>t_d</math> (h)(aus <math>\mu</math> 0-50 h)</b>	18,8	13,2	12,7	10,1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
<b>Erreichte max. Biomassekonzentration ( g L<sup>-1</sup>)</b>	9,1 ± 0,3	15,4 ± 2,5	9,2 ± 0,36	15,3 ± 3,9	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

### 5.2.5 Gegenüberstellung ausgewählter Reaktorsysteme zur Herstellung des Ganzzellbiokatalysators

Aktuell stellt der Rührkesselreaktor den am häufigsten eingesetzten Fermenter-Typ für die industrielle, biotechnologische Produktion von Wertstoffen dar (Petersen et al., 2017). Dies ist im Wesentlichen auf eine gute Durchmischung der Kultur und einen moderaten volumetrischen Gaseintrag zurückzuführen. Wird der volumetrische Gaseintrag im Vergleich zum Gesamtvolumenfluss größer, eignet sich der Rührkesselreaktor jedoch nur noch bedingt (genauer beschrieben in Kap. 3.1.1). Der sogenannte U-Loop-Reaktor, welcher bereits für die Produktion von Single-Cell-Proteinen (SCP) eingesetzt wird, stellt im Fall von gasförmigen Substraten aufgrund seines hohen Stoffübergangskoeffizienten eine vielversprechende Alternative zum klassischen Rührkessel dar (Chmiel, 2018; Yazdian et al., 2012). Allerdings ist der Energieeintrag in dieses System gegenüber dem DMBR vergleichsweise hoch (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich des Leistungseintrages ausgewählter Reaktortypen

Reaktortyp	P in W/m <sup>3</sup>	Literatur
DMBR	1000-3000	(Brebeck, 2018)
Rührkessel	500-10000	(Baerns et al., 2014; Chmiel, 2018)
U-Loop	5000- 50000	(Petersen et al., 2017)

Eine vielversprechende Methode zur blasenfreien Begasung über Membranen, um den Gaseintrag in Nährmedien zu optimieren, wurde in der Arbeit von Kahlig beschrieben (Kahlig, 2018). Auf Grundlage der durch Kahlig gewonnenen Erkenntnisse wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Doppelmembranbioreaktor (DMBR) entwickelt und dieser nachfolgend zur Fermentation von *M. trichosporium* Ob3b sowie zur biokatalytischen Oxidation von Propylen und Benzol eingesetzt.

Um abschätzen zu können, ob dieser Reaktortyp im Vergleich zum Rührkesselreaktor bei der Fermentation, der Ganzzellbiokatalyse Vorteile bietet, wurden in dieser Arbeit verschiedene Fermentationen sowie die Ganzzellbiokatalyse von Benzol und Propylen in beiden Reaktortypen durchgeführt. Zusätzlich wurde vergleichend ein kommerziell erhältlicher Membranreaktor von der Firma CellDEG zur Fermentation eingesetzt, der sogenannte HDC10-Inkubator. Wachstumskinetiken von *M. trichosporium* Ob3b in den drei genannten Bioreaktorsystemen sind bereits in Kap. 5.2.1 detailliert beschrieben. In diesem Kapitel werden die drei eingesetzten

Reaktortypen hinsichtlich der wesentlicher Prozessgrößen, wie z.B. ihrer Produktivität, verglichen und die Ergebnisse auf Basis verfügbarer Literatur diskutiert. Ein Vergleich der Reaktortypen hinsichtlich der Ganzzellbiokatalyse ist in Kap. 5.3.8 dargestellt.

In dieser Arbeit wurde mit dem Rührkesselreaktor eine maximale Biotrockenmassekonzentration von  $15,3 \pm 1,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erreicht. Im Vergleich dazu wurden in den beiden Membranreaktoren mit jeweils  $0,84 \pm 0,16 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  im DMBR und  $0,79 \pm 0,05 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  HDC10-Inkubator deutlich niedrigere Biomassekonzentration erzielt. Auch die max. Wachstumsrate ist im Rührkesselreaktor mit  $0,13 \text{ h}^{-1}$  deutlich höher als in den Membranreaktoren. Im DMBR wurde eine Wachstumsrate von  $0,04 \text{ h}^{-1}$  und im HDC10-Inkubator von  $0,03 \text{ h}^{-1}$  erreicht. Fermentationen in einem ähnlichen Maßstab (300 mL) wurden von Xing et al. (2006) publiziert. Mit einer maximalen Biomassekonzentration von  $0,67 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  liegen die Daten von Xing et al. deutlich unterhalb der in dieser Arbeit erreichten maximalen Biotrockenmassekonzentration im Rührkesselreaktor. In einer vergleichbaren Größenordnung liegen dagegen die erreichten BTM-Konzentrationen in den verwendeten Membranreaktoren. Ähnliche Biomassekonzentrationen wie in dieser Arbeit erreichte Griethe (2018) bei einer Fermentation mit einem Rührkesselreaktor bereits nach 92,5 h, allerdings unter Verwendung von Methanol als Kohlenstoffquelle. Ursächlich hierfür ist u.a. die gute Löslichkeit von Methanol in der Flüssigphase. Eine Gasfermentation wurde von Han et al. (2009) in einem 5 L-Fermenter durchgeführt. Nach ca. 240 h erreichten Han et al. eine Biomassekonzentration von ca.  $1,6 \text{ g L}^{-1}$ . Durch die Zugabe von Paraffin war es ihnen möglich, die Biomassekonzentration um das 7-fache zu erhöhen. Dies resultierte in einer erhöhten Biomassekonzentration von etwa  $14 \text{ g L}^{-1}$  nach 240 h (Han et al., 2009). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Fermentationen konnten für die Kultivierung mit Kupfer ohne weitere Optimierungsmaßnahmen Werte in einer ähnlichen Größenordnung erzielt werden (Abbildung 31, Tabelle 7). Nach Kenntnisstand der Autorin existieren derzeit keine publizierten Daten zur Fermentation aerober, methanotropher Bakterien in Membranreaktoren. Membranreaktoren wurden bislang lediglich zur Produktion von Methanol eingesetzt, jedoch nicht für die Fermentation des Ganzzellbiokatalysators *M. trichosporium* OB3b (Duan et al., 2011; Pen et al., 2014).

Neben der maximalen Biomassekonzentration und der erreichten Wachstumsrate gibt es weitere Kenngrößen, die für einen Vergleich der Reaktortypen herangezogen werden können. Dazu zählt zum Beispiel der Leistungseintrag und die Produktivität im Hinblick auf einen Ansatz (Batch)  $Q_P$  und auch den jeweiligen Reaktor  $Q_{PR}$ . Es spielen zudem auch Sicherheitsaspekte eine entscheidende Rolle. Einige dieser Kenngrößen sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgeführt. Im Hinblick auf den Leistungseintrag weist der neu entwickelte DMBR mit 1000 bis 3000

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

$W/m^3$  unter den getesteten Bedingungen den geringsten Wert auf. Betrachtet man hingegen die Produktivität bezogen auf einen Ansatz  $Q_P$  und bezogen auf einen Reaktor  $Q_{P,R}$ , so weist der Rührkessel die höchsten Werte auf.

Tabelle 7: Fermentationsparameter für die Fermentation im RK, im DMBR und im HDC10-Inkubator

Parameter	RK	DMBR	HDC10-Inkubator
Flüssigvolumen $V_L$ (L)	1	0,6 je Kammer 3 gesamt (1,8 L Gesamtvolumen)	0,01
$V_R$ (L)	1,6	3,4	0,02
Rüstzeit $t_{\text{präp}}$ (h)	3	4	2,5
Begasungsrate ( $L h^{-1}$ )	0,5	-	0,5
Druck (bar)	-	1	-
Methan (% $_{v/v}$ )	30	100	30
Luft (% $_{v/v}$ )	70	-	70
Sauerstoff (% $_{v/v}$ )	-	100	-
Durchmischung	Rührer 900 rpm	Schlauchpumpe $2,2 L min^{-1}$	Orbitalschüttler 150 rpm
Membranoberfläche ( $cm^2$ )	-	80 <sub>je Membran</sub> 960 <sub>gesamt</sub>	3
Verhältnis Membranoberfläche zu Flüssigvolumen ( $m^{-1}$ )	-	160 <sub>gesamt</sub> 80 <sub>je Gas</sub>	3
Stofftransport	Konvektion	Diffusion	Diffusion
Blasenbildung	Ja	Nein	Nein
Bildung potentiell explosiver Gasgemische	Ja	Nein	Nein
Gasmischung vorab erforderlich	Ja	Nein	Ja
Fermentationsdauer $t_{\text{prod}}$ (h)	404	236	256
Endkonzentration Produkt <sub>Biomasse</sub> $P_{\text{final}}$ ( $g L^{-1}$ )	$15,3 \pm 1,7$	$0,84 \pm 0,16$	$0,79 \pm 0,05$
Wachstumsrate $\mu_{\text{max}}$ ( $h^{-1}$ )	0,13 (0-4 h)	0,04 (0-18 h)	0,03 (22- 44 h)
Verdopplungszeit $t_d$ (h)	10,3	19	28
Produktivität eines Ansatzes $Q_P$ ( $g h^{-1}$ )	0,04	0,011	0,00003
Produktivität eines Reaktors $Q_{P,R}$ ( $g L^{-1} h^{-1}$ )	0,023	0,0031	0,001

Die Entscheidung, welcher Reaktortyp idealerweise zum Einsatz kommt, ist aufgrund der deutlich unterschiedlichen Konzepte der Reaktoren, abhängig von dem jeweiligen Ziel des Vorhabens. Unter Vernachlässigung von Sicherheitsaspekten, wie z.B. dem großen Volumen im

Kopfraum und der damit verbundenen Gefahr der Bildung explosiver Gasgemische, stellt der Rührkesselreaktor das produktivste System zur Erzeugung von *M. trichosporium* Ob3b dar. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Verfügbarkeit von Rührkesselreaktoren sowie die relativ geringen Investitionskosten. Sollen jedoch Fermentationsparameter variiert werden, einhergehend mit einer hohen Probenanzahl, eignen sich HDC10-Inkubatoren sehr gut. Je nach Plattform können 45 Wachstumskinetiken bei geringen Volumeneinsatz gleichzeitig aufgenommen werden. In Zukunft stellt auch der DMBR eine vielversprechende Alternative zum Rührkesselreaktor dar. Eine Optimierung wäre z.B. durch Variation des angelegten Druckes auf die Membranen, eine Erhöhung des Pumpendurchsatzes für eine verbesserte Durchmischung und eine Vergrößerung des Verhältnisses der Membranoberfläche zu dem eingesetzten Flüssigvolumen möglich.

### 5.2.6 Zusammenfassung der Fermentationsergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die zur Kultivierung eingesetzte Wasserqualität einen erheblichen Einfluss auf die Wachstumskinetik von *M. trichosporium* OB3b hat. Die Untersuchungen zu verschiedenen Wasserqualitäten (Abbildung 30) ergaben, dass reproduzierbare Wachstumskinetiken nur mit Milli-Q Wasser aufgenommen werden konnten, weshalb es auch für alle weiterführenden Versuche verwendet wurde.

Um den Organismus *M. trichosporium* OB3b als Ganzzellbiokatalysator einsetzen zu können, ist es erforderlich, zunächst ausreichend Biomasse zu produzieren. Bislang werden aufgrund sicherheitstechnischer Beschränkungen Untersuchungen häufig nur im mL-Maßstab durchgeführt. Neben der Fermentation im klassischen Rührkesselreaktor wurden in dieser Arbeit Membranbioreaktoren zu Kultivierung des methanotrophen Bakteriums eingesetzt. Es konnten damit erstmalig Wachstumskinetiken in HDC10-Inkubatoren und in einem neuartigen DMBR aufgezeichnet werden. Die maximal erreichte Biotrockenmassekonzentration im HDC10-Membranbioreaktor liegt mit  $0,79 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  in der selben Größenordnung wie im DMBR ( $0,84 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1}$ ).

Im Gegensatz zur Wasserqualität zeigte die Konzentration unterschiedlicher Nährmedienkomponenten, wie beispielsweise des Phosphatpuffers, Natriumnitrat oder die verwendete Eisenquelle, einen geringeren Einfluss auf die Wachstumskinetik (Kap. 5.2.2). Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde das NMS-Medium, wie ursprünglich beschrieben durch Griethe (2018), unverändert für alle weiteren Versuche eingesetzt (Griethe, 2018). Folglich wurden alle Versuche zur Ganzzellbiokatalyse (ab Kap 5.4) im NMS-Medium durchgeführt.

Eine Verkürzung der Lag-Phase konnte durch Zugabe von zusätzlichem CO<sub>2</sub> erreicht werden.

Dies konnte im kleinen Maßstab für die Kultivierung in Serumflaschen und im 1 L Rührkesselreaktor gezeigt werden.

Der Vergleich der unterschiedlichen Reaktortypen zeigt, dass unter den untersuchten Bedingungen mit dem Rührkesselreaktor im Hinblick auf eine hohe Biomassekonzentration die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Es konnte zudem erstmals die Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b in zwei Membranbioreaktoren etabliert werden. Diese Kultivierungsmethoden weisen insbesondere unter dem Gesichtspunkt der Prozesssicherheit durch die Möglichkeit einer blasenfreien Begasung mit Methan und Sauerstoff deutliche Vorteile gegenüber einer Kultivierung im klassischen Rührkesselreaktor auf.

### **5.3 Kontinuierliche Ganzzellbiokatalyse für die Oxidation von Propylen und Benzol**

Die Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid mittels MOB wurde nach Kenntnisstand der Autorin bislang lediglich durch Hill et al. (1990) in einem kontinuierlicher Rührkesselreaktor (CSTR) und einem *packed-bed bubble-column reactor* (PBR) durchgeführt (Hill et al., 1990). Die Selektivoxidation von Benzol zu Phenol wurde in der Literatur bislang nur im Labor-Maßstab im Satzbetrieb beschrieben (Burrows et al., 1984; Dalton et al., 1986; Hall, 1983; Higgins et al., 1981; Hyman et al., 1985). Um einen kontinuierlichen Prozess zur Ganzzellbiokatalyse von Propylen zu Propylenoxid und von Benzol zu Phenol zu entwickeln, mussten deshalb zunächst grundlegende Betriebsparameter ermittelt werden. Es ist bekannt, dass Propylenoxid und Phenol toxisch auf Mikroorganismen wirken. Während Propylenoxid biologische Makromoleküle wie DNA oder Enzyme alkyliert, kann sich die Anwesenheit von Phenol aufgrund der hydrophoben Eigenschaften und der möglichen Bildung freier Radikale, negativ auf das Wachstums von Mikroorganismen auswirken (Habets-Crützen and de Bont, 1985; Michałowicz and Duda, 2007). Damit die Zellen während der kontinuierlichen Selektivoxidation von Propylen und Benzol nicht in erheblichem Maße von den Produkten Propylenoxid und Phenol geschädigt werden, ist es wichtig, die kritischen Konzentrationen beider Substanzen zu kennen. Aufgrund der Tatsache, dass die hierzu benötigten Daten in der Literatur nur unzureichend beschrieben sind, wurden zur Ermittlung der kritischen Konzentration Versuche zur Kurzzeit- und zur Langzeit-Exposition durchgeführt (Methode in Kap. 4.8). Im ersten Versuch wurden die Zellen für 30 Minuten gemeinsam mit der Zielsubstanz im Nährmedium inkubiert. In der zweiten Versuchsreihe erfolgte eine Langzeitexposition der Testsubstanzen Propylenoxid und Phenol über den gesamten Fermentationsverlauf. Die hierbei erzielten Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln 5.3.1 und 5.3.2 beschrieben und diskutiert.

Ein weiterer wichtiger Betriebsparameter für die Selektivoxidation von Propylen und Benzol ist eine geeignete Biomassekonzentration. Je höher die Biomassekonzentration gewählt wird, desto höher ist die zu erwartete Produktausbeute. Im Hinblick auf die Produktivität können jedoch limitierende Effekte, wie z.B. eine unzureichende Sauerstoffverfügbarkeit oder aber auch ein Mangel an verfügbaren Cofaktoren, auftreten. Bislang ist der Einfluss der Biomassekonzentration auf die Selektivoxidation in der Literatur nur unzureichend beschrieben. Die wenigen publizierten Daten variieren zudem sehr stark. Hill et al. führten ihre Versuche beispielsweise bei einer Zellkonzentration von  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  durch (Hill et al., 1990). Eine weitaus höhere Biomassekonzentration zwischen 5 bis  $60 \text{ g L}^{-1}$  wurde von Hall für die Ganzzellbiokatalyse von Propylen zu Propylenoxid eingesetzt (Hall, 1983). Es sind bisher keine Daten hinsichtlich der Auswirkungen einer Variation der Biomassekonzentration auf die Oxidation von Benzol zu Phenol mittels *M. trichosporium* OB3b veröffentlicht.

Um zu untersuchen, inwiefern die Biomassekonzentration wesentliche Prozesskenngrößen wie die Produktbildungsrate beeinflusst, wurden in dieser Arbeit bei der Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid sowie bei der Oxidation von Benzol zu Phenol jeweils zwei unterschiedliche Biomassekonzentrationen eingesetzt. Die Kinetik der Ganzzellbiokatalyse wurde zudem erstmals in der Flüssigphase mittels Echtzeit-Massenspektrometer verfolgt. Bislang konnten sowohl die Edukte als auch die Produkte der Selektivoxidationen nur offline mittels konventioneller HPLC-Methoden aufgenommen werden. Die Ergebnisse der zuvor genannten Untersuchungen sind nachfolgend in Kapitel 5.3.3 dargestellt.

Die vorangegangenen Versuche zur Bestimmung der Toxizität der Substrate und Produkte haben gezeigt, dass sich eine kurzzeitige Exposition der Zellen mit Propylenoxid und Phenol nur geringfügig auf die Vitalität der Zellen auswirkt (siehe Kap. 5.3.1). Eine längere Exposition führte jedoch zu einem stark negativen Effekt auf die Wachstumskinetik des Organismus. Es ist daher vorteilhaft, die Produkte im Hinblick auf einen kontinuierlichen Prozess aus dem Reaktionsmedium abzutrennen. Zudem zeigen die in Kapitel 5.3.4 gezeigten Ergebnisse, dass die Ganzzellbiokatalyse mit dem MOB *M. trichosporium* OB3b nur für einen Zeitraum von ca. 100 min durchgeführt werden kann. Dies bedeutet wiederum, dass es notwendig ist, den Zellen bei der Selektivoxidation nach einer definierten Prozessdauer (z.B. 30 min) essentielle Cofaktoren für die Oxidationsreaktion zur Verfügung zu stellen. Um die Zellen als Ganzzellbiokatalysator über einen längeren Zeitraum einsetzen zu können, ist daher eine Regeneration empfehlenswert. Möglich ist eine Regeneration mit Methan, Methanol oder Formiat. Methanol und Formiat können jedoch abhängig von der Konzentration ebenfalls toxisch auf die Bakterien

wirken (Kap. 2.4.3) (Stanley et al., 1992; Xin et al., 2010). Deshalb ist Methan zur Regeneration vorteilhaft. Die Regeneration mit Methan bietet zusätzlich jedoch noch weitere Vorteile. Methan ist kostengünstig sowie dezentral aus Erdgas oder Biogas verfügbar. Zudem können in Kombination mit einem Luftstrom sowohl Phenol als auch Propylenoxid über den Gasstrom ausgetragen werden. Aus diesen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Regeneration der Zellen nach einer 30 min Oxidationsphase mit Methan und Luft für 30 min (Strategie I), für 60 min (Strategie II) und für 30 min mit Luft und einmaliger Formiatzugabe (III) durchgeführt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse werden in Kapitel (5.3.5 und 5.3.6) diskutiert. Zusätzlich wurde eine neuartige Strategie zur Selektivoxidation im neu entwickelten DMBR untersucht (Kap. 5.3.7). In Kap. 5.3.8 werden die Ergebnisse, welche im Rührkesselreaktor und im DMBR erzielt wurden, für eine Bewertung der Systeme gegenübergestellt.

### **5.3.1 Einfluss der Konzentration von Propylenoxid und Phenol auf die Wachstumskinetik von *Methylosinus trichosporium* OB3b nach kurzzeitiger Exposition**

Im Hinblick auf eine mehrfache sequenzielle Selektivoxidation wurde zunächst eine Inkubationszeit von 30 Minuten zur Ermittlung des Einflusses der Produkte Propylenoxid und Phenol auf den Ganzzellbiokatalysator ausgewählt. Unmittelbar nach der Exposition wurden die Zellen in frisches Medium überführt, sodass eine Wachstumskinetik auf Basis mit den zuvor exponierten Zellen aufgezeichnet werden konnte (Methode beschrieben in Kap. 4.7). Die Expositionsdauer von 30 min leitet sich aus Versuchen von Hill et al., 1990 ab. Hill et al. zeigten, dass eine 30 minütige Oxidationsphase gefolgt von einer 30 minütigen Regenerationsphase eine vorteilhafte Prozessstrategie für die Oxidation von Propylen zu Propylenoxid unter Verwendung von MOB darstellt (Hill et al., 1990).

Die Exposition der Zellen mit Propylenoxid bis zu einer Konzentration von 100 mM zeigte keinen negativen Einflüsse im Hinblick auf das Wachstum der Zellen (Abbildung 40, A). Bei allen eingesetzten Konzentrationen zeigen die Wachstumskurven einen nahezu identischen Verlauf. Die max. Wachstumsrate lag bei allen Versuchen bei  $0,05 \text{ h}^{-1}$  (Tabelle 8). Diese Ergebnisse werden ebenfalls durch den Vergleich des Verhältnisses von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{CH}_4$  zu Beginn und am Ende der Kultivierung untermauert (Abbildung 40, C). Das Verhältnis von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{CH}_4$ , als Maß für die metabolische Aktivität der Zellen, ist unabhängig von der zugrundeliegenden Propylenoxid-Konzentration nach 47 h deutlich gestiegen. Ähnliche Untersuchungen in Bezug auf die Toxizität von Propylenoxid auf aerobe, methanotrophe Bakterien untersuchten Richards et al. (1994). Für Ihre Untersuchungen setzten sie den Organismus *Methylococcus capsulatus*

(Bath) ein, welcher zu den Typ I methanotrophen Bakterien gezählt wird. Die Untersuchungen ergaben, dass die Zellen nur bei geringen Propylenoxid-Konzentrationen unter Wachstumsbedingungen regeneriert werden konnten (Richards et al., 1994). Die von Richards et al. beschriebene kritische Konzentration liegt mit 13 mM Propylenoxid deutlich unter den in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen von 100 mM für Propylenoxid und 30 mM für Phenol für *M. trichosporium* OB3b (Typ II).

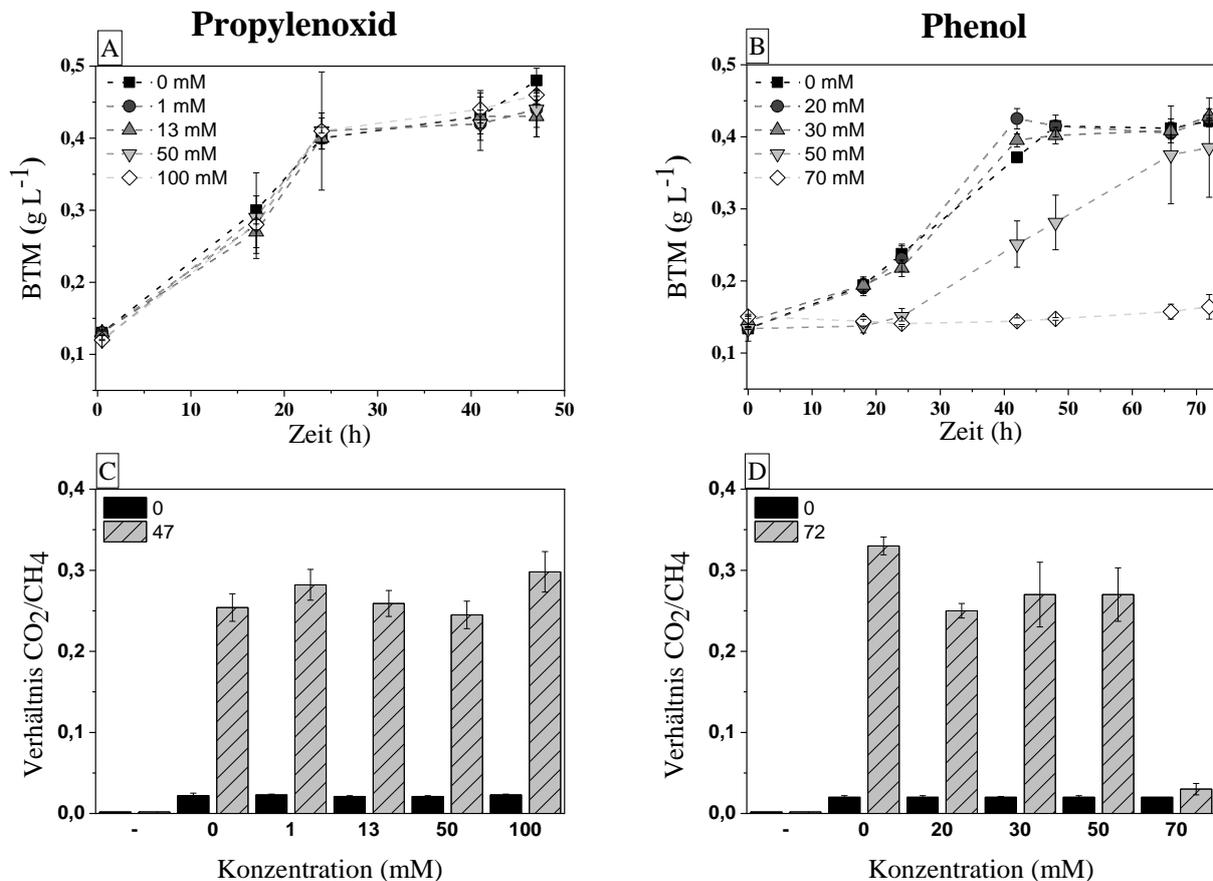


Abbildung 40: Wachstumskinetik von *M. trichosporium* OB3b in frischem NMS-Nährmedium im Anschluss an eine 30 minütige Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Propylenoxid A und Phenol B sowie die metabolische Aktivität nach der Behandlung mit Propylenoxid C und Phenol D als Funktion des Verhältnisses von CO<sub>2</sub> und CH<sub>4</sub> zu Beginn und am Ende des Versuches. Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Sarah Uhl (Uhl, 2019).

Bei einer 30 min Exposition mit Phenol (Abbildung 40, B) scheinen Konzentrationen von bis zu 30 mM keinen negativen Einfluss auf *M. trichosporium* OB3b zu haben. Bei diesen Ansätzen wurde gegenüber der Kontrolle ohne Phenol nahezu identische Wachstumskurven aufgenommen. Das Verhältnis von CO<sub>2</sub> zu CH<sub>4</sub> bewegte sich ebenfalls auf einem vergleichbaren Niveau. Bei der Exposition der Zellen mit Phenol-Konzentrationen von 50 mM wurde ein vergleichbarer CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub>-Quotient berechnet, allerdings zeigen die Wachstumskinetiken eine deutlich verlängerte Lag-Phase. Eine vollständige Inhibition des Wachstums einhergehend mit einem geringen CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub>-Quotient, war ab einer Konzentration von 70 mM Phenol zu beobachten. Die

max. Wachstumsraten ( $\mu_{\max}$ ) in Abhängigkeit von der Konzentration spiegeln diese Ergebnisse wider (siehe Tabelle 8). Bei vollständiger Regeneration der Zellen, nach 30-minütiger Exposition, liegt  $\mu_{\max}$  bei  $0,03 \text{ h}^{-1}$ . Dies konnte für die eingesetzten Phenolkonzentrationen von 1 bis 30 mM gezeigt werden. Bei kurzzeitiger Exposition der Zellen mit 50 mM Phenol sinkt  $\mu_{\max}$  auf  $0,02 \text{ h}^{-1}$ . Ab einer Konzentration von 70 mM Phenol konnte keine Wachstumsrate mehr ermittelt werden.

Tabelle 8: Spezifische Wachstumsraten nach 30-minütiger Exposition der Zellen mit Propylenoxid bzw. Phenol und anschließender Reaktivierung in frischem Nährmedium.

Konzentration [mM] des Produktes	Max. Wachstumsrate $\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ] für Propylenoxid	Max. Wachstumsrate $\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ] für Phenol
0	$0,05 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,00$
1	$0,05 \pm 0,01$	n.d.
13	$0,05 \pm 0,00$	n.d.
20	n.d.	$0,03 \pm 0,00$
30	n.d.	$0,03 \pm 0,00$
50	$0,05 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$
70	n.d.	$0,00 \pm 0,00$
100	$0,05 \pm 0,00$	n.d.

n.d. nicht definiert

Diese Ergebnisse zeigen keine signifikanten negativen Einflüsse der jeweiligen Substanzen auf die Zelle bis zu einer spezifischen kritischen Konzentration bei Exposition über einen kurzen Zeitraum. Im Vergleich zu anderen Organismen wie *E. coli*, welcher Phenolkonzentrationen nur bis 19 mM toleriert oder *Pseudomonas putida* S12, welcher Phenolkonzentrationen bis 5 mM toleriert, sind die kritischen Konzentrationen von bis zu 100 mM für Propylenoxid und 30 mM für Phenol für *M. trichosporium* OB3b vergleichsweise hoch (Kim et al., 2014; Wierckx et al., 2005).

### 5.3.2 Einfluss der Konzentration von Propylenoxid und Phenol auf die Wachstumskinetik von *Methylosinus trichosporium* OB3b bei dauerhafter Exposition

Um zu untersuchen, ob auch die Dauer der Exposition von Propylenoxid und Phenol einen Einfluss auf *M. trichosporium* OB3b hat, wurde der Organismus dem permanenten Einfluss, der Substanzen Propylenoxid und Phenol ausgesetzt (Kap 4.7.2). Im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen wurden die Testsubstanzen nicht von den Zellen abgetrennt. Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer Langzeitexposition schon geringe Konzentrationen beider Substanzen das Wachstum vollständig hemmen können (Abbildung 41). Im Fall von Propylenoxid

konnte schon bei einer Zugabe von 13 mM kein Wachstum mehr festgestellt werden (Abbildung 41 A). Auch das Verhältnis von CO<sub>2</sub> zu CH<sub>4</sub> zeigt, dass unter diesen Bedingungen keine Stoffwechselaktivität mehr vorlag. Nach einer Kultivierungsdauer von 51 h gleicht das Verhältnis beider Gase dem Verhältnis zu Beginn der Fermentation (Abbildung 41, C).

Das Hinzufügen von Phenol in das Nährmedium hat ähnliche negative Auswirkungen auf die Wachstumskinetik wie Propylenoxid. Es konnte kein Wachstum bei allen untersuchten Konzentrationen detektiert werden (Abbildung 41, B) Analog dazu lag über die gesamte Kultivierungsdauer ein konstantes CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> Verhältnis bei allen Konzentrationen, mit Ausnahme der Kontrollkultivierung, vor (Abbildung 41).

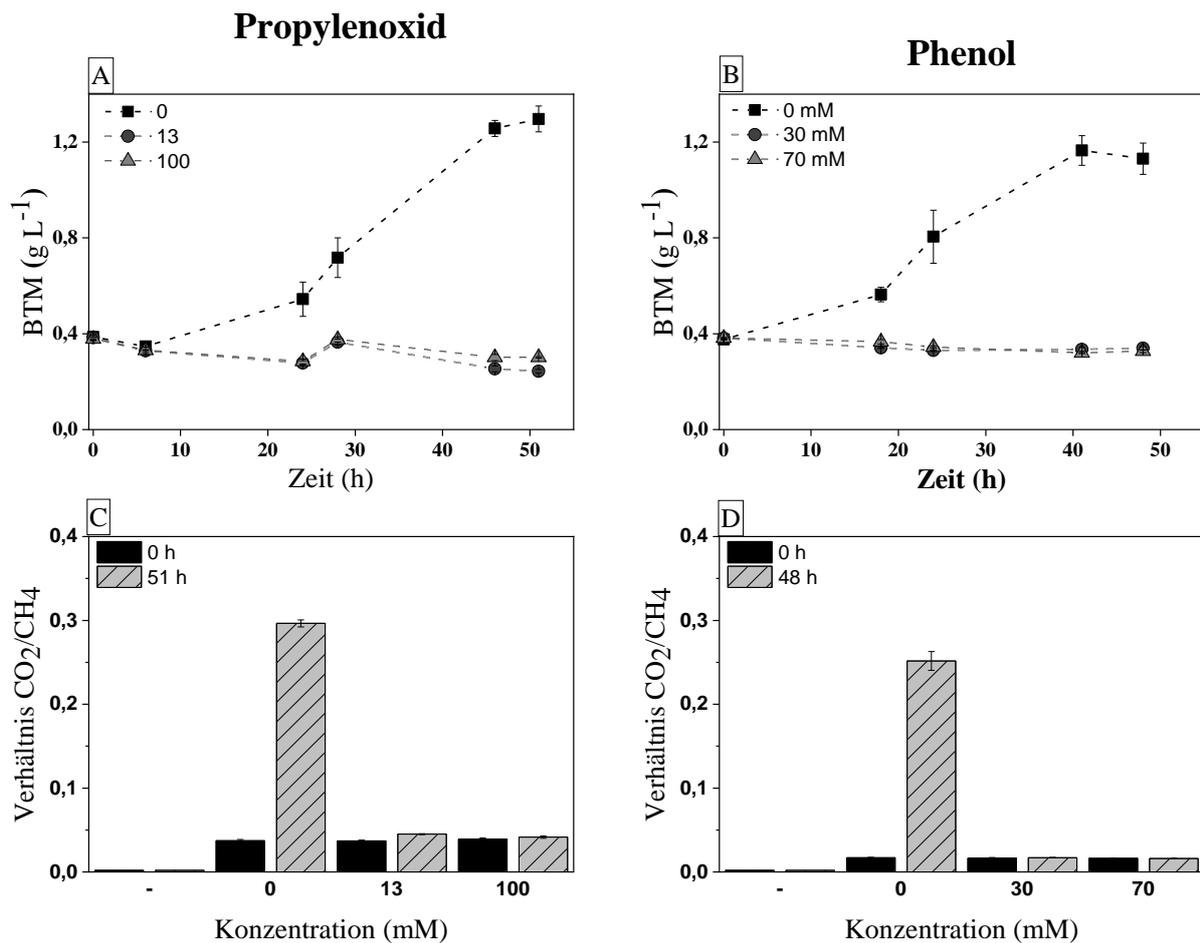


Abbildung 41: Einfluss ausgewählter Propylenoxid- (A,C) und Phenolkonzentrationen (B,D) auf das Wachstum von *M. trichosporium* OB3b bei dauerhafter Exposition. Das Verhältnis von Kohlenstoffdioxid zu Methan in der Gasphase ermöglicht Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der Zellen (C, D). Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Sarah Uhl (Uhl, 2019).

### 5.3.3 Einfluss der Biomassekonzentration auf die Selektivoxidation von Propylen und Benzol

Die Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid mittels Ganzzellbiokatalyse wurde zunächst im 20 mL-Maßstab über eine Dauer zwischen 74 und 92 min untersucht (Kapitel 4.8.1). Die höchste Konzentration mit  $3,5 \pm 0,88$  mM Propylenoxid wurde beim Einsatz von  $5,5 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse erzielt (Abbildung 42, Tabelle 9). Unter Verwendung von  $2,5 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse konnte lediglich eine Propylen-Endkonzentration von  $1,5 \pm 0,36$  mM erreicht werden. Die spezifische Enzymaktivität wies für beide untersuchten Biomassekonzentrationen mit  $39 \mu\text{mol}_{\text{PO}} \text{ min}^{-1} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$  keinen signifikanten Unterschied auf. Die ermittelte Enzymaktivität steht in Einklang mit den durch *Stanley et al.* publizierten Werten für das methanotrophe Bakterium *Methylococcus capsulatus* Bath (Stanley et al., 1992). Ohne die Zugabe eines Elektrodendonors erreichten *Stanley et al.* Enzymaktivitäten zwischen 4 und 35  $\text{nmol}_{\text{PO}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{BTM}}^{-1}$ .

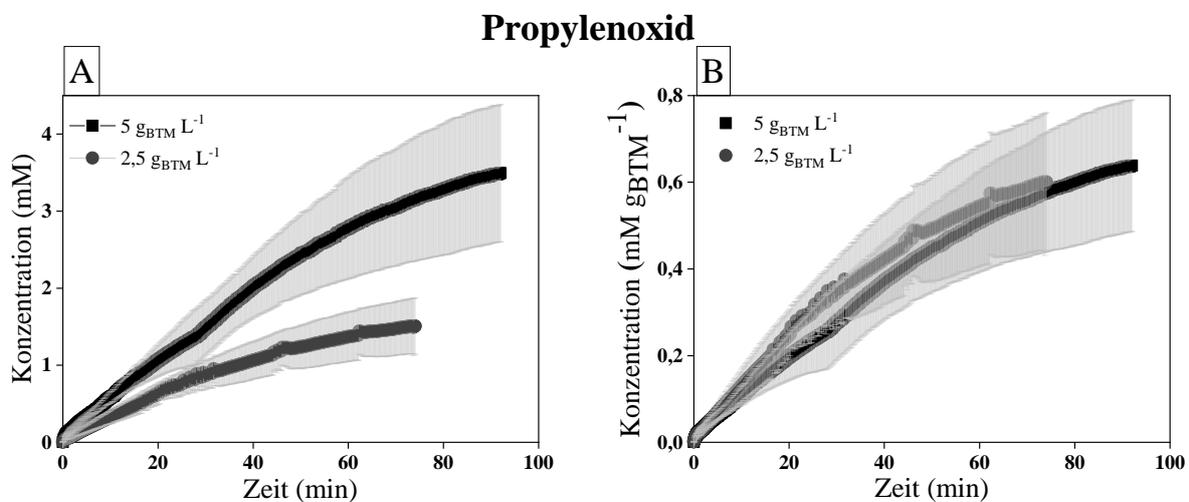


Abbildung 42: Effekt der Biomassekonzentration auf die Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid. A zeigt die absolute Propylenoxid Konzentration über die Zeit aufgetragen. B zeigt die Propylenoxidkonzentration pro g Biotrockenmasse über die Zeit dargestellt. Die Propylenoxid-Konzentration wurde mittels Echtzeit-Massenspektrometer (Kap. 4.5.4) aufgezeichnet. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte sowie die mittlere Standardabweichung aus  $n = 3$  Messungen. Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Sarah Uhl (Uhl, 2019).

Die Oxidation von Benzol zu Phenol wurde analog zur Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid in 250 mL Serumflaschen über einen Zeitraum von 60 min durchgeführt (Kap. 4.8.2). Wie auch bei der Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid war hier zu beobachten, dass eine höhere Biomassekonzentration bei gleicher Prozessdauer mehr Benzol oxidiert. So entstand beim Einsatz einer Biotrockenmassekonzentration von  $7,9 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$  eine Konzentration von  $2,6 \pm 0,16$  mM Phenol, wohingegen bei einer Biomassekonzentration von  $3,1 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  lediglich  $1,6 \pm 0,18$  mM Phenol gebildet wurden. Im Hinblick auf die Enzymaktivität zeigt sich,

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

dass eine geringere Biomassekonzentration mit  $20 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  eine um 25 % höhere biomassespezifische Aktivität aufweist (Abbildung 43, Tabelle 9).

Tabelle 9: Wesentliche Kenngrößen zur Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol im 20 mL Maßstab.

	Propylenoxid		Phenol	
Biomassekonzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ]	$5,5 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,4$
Versuchsdauer [min]	92	74	60	60
Produktkonzentration [mM]	$3,5 \pm 0,88$	$1,5 \pm 0,36$	$1,6 \pm 0,18$	$2,6 \pm 0,16$
Max Enzymaktivität [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ]	$39 \pm 0,04$	$39 \pm 0,03$	$20 \pm 0,02$	$16 \pm 0,01$

Nach Kenntnisstand des Autors wurden bisher keine vergleichbaren Untersuchungen mit dem Organismus *M. trichosporium* OB3b durchgeführt. Es existieren jedoch bereits Untersuchungen mit anderen Benzen-oxidierenden Organismen. Hierzu gehören z.B. die Stämme *Pseudomonas putida* und *E. coli*. In Untersuchungen von Wierckx et al. zeigte *Pseudomonas putida* S12 einen maximalen Produkttiter von 1,5 mM Phenol. Dabei setzte der Organismus Glucose zu Phenol mit einer Phenolausbeute von 6,7 % (mol/mol) um (Wierckx et al., 2005). Kim et al. (2014) konnten im Schüttelkolbenmaßstab bis zu  $419 \text{ mg L}^{-1}$  (4,5 mM) Phenol mit dem genetisch-modifizierten Stamm *E. coli* BL21 erzeugen. In einem Fed-Batch-Prozess wurde eine Phenolkonzentration von  $1,69 \text{ g L}^{-1}$  (18 mM) erzielt (Kim et al., 2014).

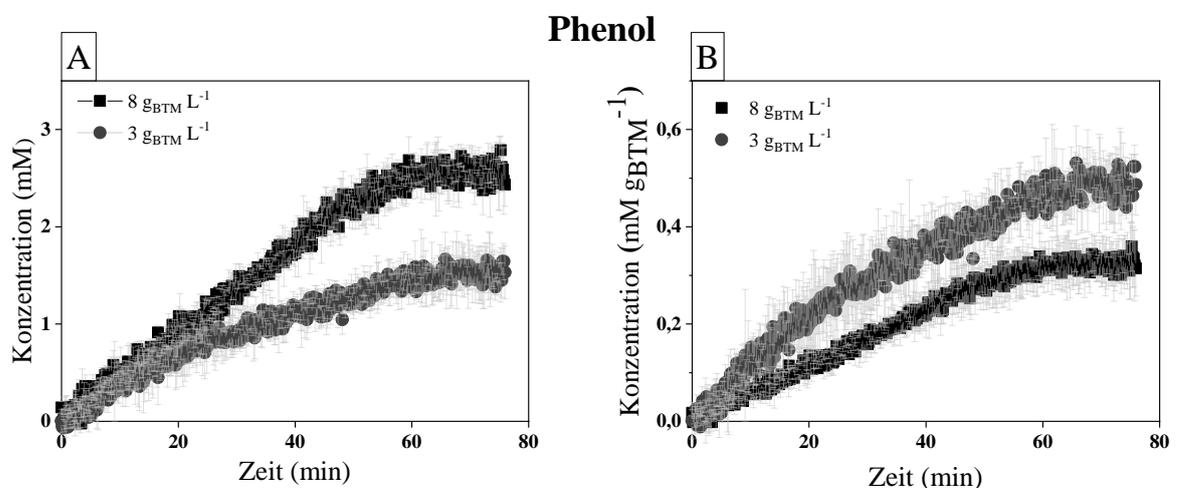


Abbildung 43: Effekt der Biomasse auf die Selektivoxidation von Benzol zu Phenol. A zeigt die absolute Phenol-Konzentration über die Zeit aufgetragen. B zeigt Die Phenolkonzentration pro g Biotrockenmasse über die Zeit dargestellt. Die spezifische Phenolkonzentration wurde mittels Echtzeit-Massenspektrometer (Kap. 4.5.4) aufgezeichnet. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte sowie die mittlere Standardabweichung aus  $n = 3$  Replikaten. Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Sarah Uhl (Uhl, 2019).

Die Untersuchungen zeigen, dass prinzipiell höhere Biomassekonzentration bis zu  $8 \text{ g L}^{-1}$  geeignet sind, um Kohlenstoffverbindungen wie Propylen und Benzol zu epoxidieren bzw. zu oxidieren. Es können jedoch limitierende Effekte durch zu wenig gelösten Sauerstoff beim Einsatz einer Biomassekonzentration größer als  $3 \text{ g L}^{-1}$  auftreten. Um derartige Effekte weitestgehend zu vermeiden, wurden die weiterführenden Versuche zur Selektivoxidation in dieser Arbeit mit einer Biomassekonzentration von  $3 \text{ g L}^{-1}$  durchgeführt.

Bei allen Versuchen zeigte sich die höchste biokatalytische Aktivität in den ersten Minuten der Oxidationsreaktion. Danach sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit bis sie etwa 60 min nach Versuchsbeginn gänzlich zum Erliegen kommt. Dies könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen liegt die Vermutung nahe, dass der vorhandene Sauerstoff in der Flüssigkeit relativ schnell für die Oxidationsreaktion verbraucht wird. Das Nachlösen von Sauerstoff aus der Gasphase in die Flüssigphase scheint ursächlich dafür zu sein, dass die Reaktionsgeschwindigkeit nach einigen Minuten abnimmt bis schließlich nicht mehr ausreichend Sauerstoff für die Oxidation zur Verfügung steht. Zum anderen werden für die Reaktionen Cofaktoren (NADH) benötigt (beschrieben in Kap. 2.4.3). Sobald diese aufgebraucht sind, kann die Reaktion nicht mehr stattfinden. Stanley und Dalton publizierten eine Aktivität von  $548 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{BTM}}^{-1}$  unter Zugabe von  $1 \text{ mM}$  Methanol (Stanley and Dalton, 1992). Diese Aktivität ist ca. um das 10-fache höher als die hier erreichten Werte. Die Zugabe von Methanol für die Cofaktorregeneration scheint sich somit positiv auf die Reaktion auszuwirken. Versuche ohne Elektronendonoren von Higgins et al. (1979) zeigten mit dem Organismus *M. trichosporium* OB3b mit  $35 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{BTM}}^{-1}$  eine vergleichbare Aktivität wie in dieser Arbeit. Die Regenerierung des Ganzzellbiokatalysators im Anschluss an eine Epoxidierungs- oder Oxidationsphase scheint daher zwingend notwendig zu sein, um nachfolgend weitere Epoxidierungs- oder Oxidationsreaktionen durchführen zu können. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass nach einer 30 min Epoxidierungs- oder Oxidationsreaktion die jeweilige kritische Produktkonzentration von  $100 \text{ mM}$  Propylenoxid bzw.  $30 \text{ mM}$  Phenol nicht erreicht wird (Kap. 5.3.1 und Kap. 5.3.2). Folglich sollte daher im Hinblick auf einen kontinuierlichen Prozess mit mehrfachen sequentiellen Oxidationsphasen nach einer 30-minütigen Epoxidierungs- oder Oxidationsreaktion eine Regenerationsphase angeschlossen werden.

### **5.3.4 Untersuchungen zur Selektivoxidation ohne Regeneration im Rührkesselreaktor**

Die Oxidationsreaktion von Propylen zu Propylenoxid war im Rührkesselreaktor ohne Zugabe eines Elektronendonors, z.B. in Form von Methan, Methanol oder Formiat, sowie ohne

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Sauerstoff über einen Zeitraum von 108 min und 195 min möglich (Tabelle 10). Die Reaktionsgeschwindigkeit nahm nach einer Anfangsphase deutlich bis zum vollständigen Erliegen der Reaktion hin ab (Abbildung 44).

Die Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass – wie auch in den vorangegangenen Versuchen zur Untersuchung des Biomasseinflusses auf die Ganzzellbiokatalyse (Kap. 5.3.3) – Sauerstoff sowie die fehlenden Elektronendonoren für das vorzeitige Ende der Reaktion verantwortlich sind. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit denen von Stanley und Dalton (Stanley et al., 1992).

Tabelle 10: Vergleich wesentlicher Kenngrößen zur Selektivoxidation von Benzol- und Propylen zu Phenol- und Propylenoxid.

Versuchsnummer	Propylenoxid			Phenol <sup>(c)</sup>	
	1	2	Stanley and Dalton 1992	1	2
Eingesetzte Biomasse [g L <sup>-1</sup> ]	1,8	1,8	0,5 mg <sub>BTM</sub> ml <sup>-1</sup>	3	3,1
Dauer [min]	195	108	15-30	93	100
Produktkonzentration [mM]	1,9	1,8	n.a.	6,8	6,6
Max Enzymaktivität [μmol min <sup>-1</sup> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> ]	16	16	4 bis 28 nmol min <sup>-1</sup> g <sub>BTM</sub> <sup>(a)</sup> 548 nmol min <sup>-1</sup> mg <sub>BTM</sub> <sup>(b)</sup>	1158	3250

<sup>(a)</sup> ohne Elektronendonor; <sup>(b)</sup> mit Elektronendonor; <sup>(c)</sup> keine Literaturdaten vorhanden

Des Weiteren wurde während dieser Untersuchungen beobachtet, dass sich mit zunehmender Reaktionsdauer mehr Propylenoxid als Propylen in der flüssigen Phase anreichert. Dies lässt sich durch die bessere Löslichkeit von Propylenoxid gegenüber Propylen in Wasser erklären. Folglich kann somit davon ausgegangen werden, dass sich im Gasraum des Reaktors ein Großteil des Propylens befindet, welches sich über die Zeit in der Flüssigkeit nachlöst. Dementsprechend beeinflusst der Gasübergang aus dem Gasraum in die Flüssigkeit direkt die Reaktionsgeschwindigkeit. Bei einer max. Enzymaktivität von 16 μmol min<sup>-1</sup> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> konnte eine Gesamtkonzentration von 1,9 mM Propylenoxid erreicht werden. Stanley und Dalton erzielten bei ihren Experimenten ohne Elektronendonoren deutlich geringere Enzymaktivitäten (Stanley et al., 1992).

Aus Abbildung 44, B ist ersichtlich, dass die Oxidation von Benzol zu Phenol über einen Zeitraum von etwa 100 min möglich ist. Wie auch bei der Oxidationsreaktion von Propylen zu Propylenoxid kann hieraus geschlussfolgert werden, dass auch in diesem Fall sowohl die Elektronendonoren als auch der Sauerstoff limitierende Faktoren darstellen. Die maximale enzymatische Aktivität lag in den Versuchen zwischen 1158 und 3250 μmol min<sup>-1</sup> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>. Diese

wurde unmittelbar zu Beginn der Oxidationsreaktion beobachtet. Nach den ersten drei Minuten sinkt die biomassespezifische Enzymaktivität auf 833 bis 284  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Die Enzymaktivität liegt damit deutlich über der Enzymaktivität bei der Oxidationsreaktion von Propylen zu Propylenoxid. Es ist denkbar, dass dies u.a. auf die unterschiedliche Behandlung der Zellen vor der Oxidationsreaktion zurückzuführen ist. So wurden die Zellen für die Oxidation von Propylen vor der Hinzugabe in den Reaktor zur Aufkonzentrierung zentrifugiert. Während dieser Zeit sind die Zellen sowohl sauerstoff- als auch methanlimitiert. Dies kann direkten Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Des Weiteren ist die Löslichkeit von Benzol im Nährmedium deutlich höher als die Löslichkeit von Propylen. Dies kann ebenfalls einen direkten Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Weiterhin wird während der Begasung mit Propylen Sauerstoff aus dem Reaktor ausgetragen, wodurch deutlich weniger Sauerstoff für die Ganzzellbiokatalyse zur Verfügung steht.

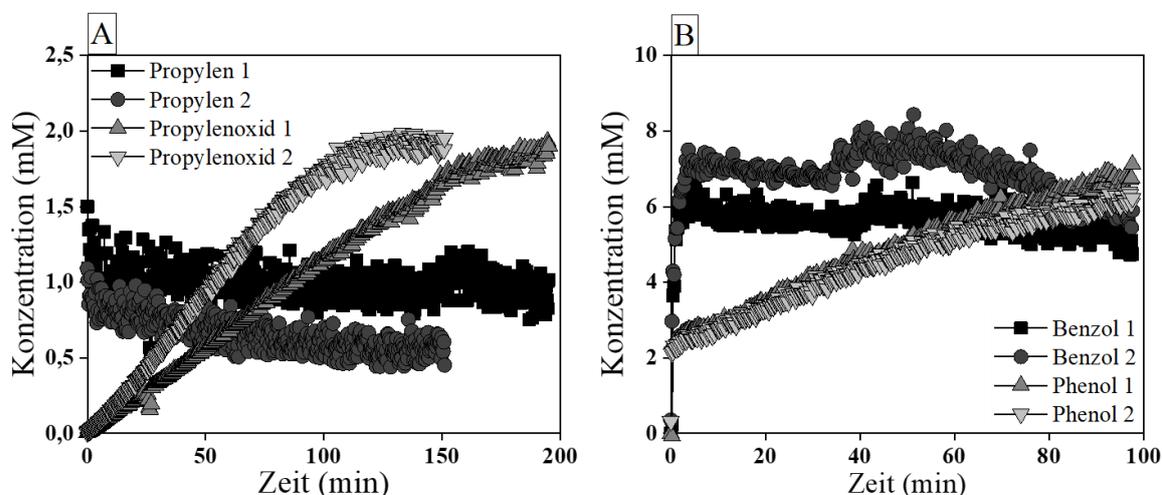


Abbildung 44: Verlauf der Eduktkonzentration (Benzol und Propylen) sowie der jeweiligen Produktkonzentration (Phenol und Propylenoxid) während der Ganzzellbiokatalyse mit *M. trichosporium* OB3b von Propylen (A) und Benzol (B) im 1 L Rührkesselreaktor. Die Ganzzellbiokatalyse wurde bei 30 °C und 800 rpm durchgeführt. Sowohl die Produkt- als auch Eduktkonzentration wurden mittels Echtzeit-Massenspektrometer aufgezeichnet (Kap. 4.8.2). Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Soniya Lal (Lal, 2019).

### 5.3.5 Sequenzielle Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit intermittierenden Regenerationsphasen

Die Versuche ohne Regeneration des Ganzzellbiokatalysators zeigten, dass sowohl in Serumflaschen (Kap. 5.3.3) als auch im Rührkesselreaktor (Kap. 5.3.4) schon nach weniger als 2 h keine Enzymaktivität mehr vorliegt. Untersuchungen von Xin et al. 2002 zeigen im Hinblick auf eine mehrfache Verwendung des Biokatalysators, dass aufgrund der toxischen Eigenschaften von Methanol und Formiat die Regeneration mit Methan und Sauerstoff vorteilhaft ist (Xin et al., 2002). In vorangegangenen Forschungsarbeiten lag der Fokus der Untersuchungen meist auf

der Identifikation eines geeigneten Elektronendonors (Higgins et al., 1981; Oldenhuis et al., 1989; Stanley and Dalton, 1992; Xin et al., 2002). Eine geeignete Zeitspanne für die Regeneration des Ganzzellbiokatalysators, wurde bislang aber nur unzureichend beschrieben. Es fehlt ebenfalls an praktikablen Prozessstrategien zur gezielten sequenziellen Regeneration von *M. trichosporium* OB3b mit dem Ziel einer mehrstufigen Verwendung des Biokatalysators. Um diese Wissenslücke zu schließen, wurden in der vorliegenden Arbeit drei unterschiedliche Prozessstrategien zur Cofaktor-Regeneration untersucht. Die Regeneration, welche sich nach einer 30-minütigen Oxidationsreaktion angeschlossen hatte, sollte neben der Regeneration der Cofaktoren auch dem zusätzlichen Sauerstoffeintrag auch der Produktabtrennung dienen.

In Strategie I folgte nach einer 30 min Oxidationsphase eine 30-minütige Regenerationsphase mit Methan und Luft (30 %<sub>v/v</sub> Methan). In Strategie II wurde der Ganzzellbiokatalysator über eine Zeitspanne von 60 Minuten mit Methan und Luft (30 %<sub>v/v</sub> Methan) regeneriert. Während dieser Zeit erfolgte zugleich die Produktabtrennung. In Strategie III wurde Formiat als Elektronendonator zu Beginn der Oxidationsreaktion in der Flüssigphase vorgelegt. Um die Produkte in Strategie III abzutrennen und erneut Sauerstoff in das System einzubringen, wurde der Bioreaktor nach einer Prozessdauer von 30 Minuten für weitere 30 Minuten mit Luft begast. Eine detaillierte Beschreibung der Versuchsdurchführung ist in Kap. 4.8.3 aufgeführt. Ein Überblick über die Strategien befindet sich in Abbildung 24. Die Regeneration des Ganzzellbiokatalysators dient primär dazu, die Co-Faktoren für die Biokatalase zu regenerieren. Durch die Begasung mit Methan und Luft (Strategie I und II) werden zudem überschüssiges Edukt und das gebildete Produkt aus dem Reaktionsmedium ausgetragen. Somit ist eine relativ einfache Produktabtrennung möglich. Dies zeigt sich in der Abnahme der Produktkonzentration während der Regeneration (Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 49, Abbildung 50). Eine Reduktion der jeweiligen Konzentration ist im Hinblick auf inhibitorische Effekte des Eduktes sowie des Produktes auf den Biokatalysator vorteilhaft.

Durch die manuelle Gaszufuhr von Propylen über ein Rotameter unterliegt die in das Reaktionsmedium zugeführte Propylenmenge Schwankungen, welche eine exakte Reproduktion der Versuche erschweren. Dies erklärt die starken Schwankungen der Eduktkonzentrationen (Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 48), weshalb nachfolgend die einzelnen Oxidationsversuche dargestellt sind (n = 3). Die Ergebnisse zeigen, dass das zugeführte Propylen in allen Versuchen nicht vollständig epoxidiert wurde, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass das Substrat in allen Experimenten zur Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid im Überschuss vorlag. Die Ergebnisse legen jedoch zudem die Vermutung nahe, dass in einzelnen Ver-

suchen offenbar Teile des zugeführten, leicht flüchtigen Propylens aufgrund von Undichtigkeiten am verwendeten Bioreaktor aus dem Reaktorinneren entweichen konnten. Die Ergebnisse mit 30 minütiger Regeneration (Abbildung 45) zeigen beispielweise einen leichten Abfall der Propylenkonzentration während der Oxidationsreaktion. Im Versuch mit einer 60 minütigen Regenerationsphase (Abbildung 46) sowie in den Versuchen mit Formiat als Elektronendonator (Abbildung 48) steigt die Propylenkonzentration während der Epoxidierung in allen Replikaten hingegen leicht an. Offenbar löst sich hierbei Propylen aus der Gasphase in das Reaktionsmedium nach.

*Strategie I* (Regeneration für 30 min mit 30 %<sub>v/v</sub> Methan und Luft)

Die Ergebnisse zur semikontinuierlichen Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit einer Regenerationszeit von 30 min (Strategie I) sind in Abbildung 45 dargestellt.

Zu Beginn der Oxidationsreaktion (OX 1) war ein starker Anstieg der Propylenkonzentration zu verzeichnen. Die anfängliche Enzymaktivität nach 24 s lag bei  $3,6 \pm 0,2,0 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Nach einigen Sekunden sank die Enzymaktivität auf  $0,6 \pm 0,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Nach einer Oxidationsdauer von 30 min wurde der erste Regenerationszyklus eingeleitet. Durch das Begasen der Kultur mit 30 % Methan und 70 % Luft zeigte sich im ersten Regenerationszyklus (RE1) zunächst über ca. 2 min ein erneuter Anstieg der Enzymaktivität. Mit  $4,4 \pm 2,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  lag diese Enzymaktivität im dritten Zyklus (OX 3) sogar über der initialen Enzymaktivität im ersten Zyklus. Die Produktzunahme setzte sich fort bis das Propylen vollständig aus dem Kulturmedium ausgestrippt war. Ab diesem Zeitpunkt wurde ebenfalls das Produkt Propylenoxid durch die Begasung aus dem Reaktionsmedium ausgetragen. Das Produkt könnte somit einfach in reiner Lösung für die Weiterverarbeitung in einer Eisfalle aufgefangen werden. Bei erneuter Zugabe von Propylen konnte die Epoxidierung (OX2) erneut mit einer biomassespezifischen Enzymaktivität von  $3,6 \pm 2,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  durchgeführt werden. Auch ein dritter Epoxidierungszyklus (OX3) war anschließend möglich. Alle drei Zyklen der biologischen Triplikate weisen ähnliche Verläufe und ähnliche Enzymaktivitäten (siehe Tabelle 11) auf.

Tabelle 11: Enzymaktivität der pMMO bei der Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid über eine Zeitspanne von 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 30 min.

Zeitinterval		OX 1	OX 2	OX 3
Initialphase	Enzymaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	$3,6 \pm 2,0$	$3,6 \pm 2,7$	$4,4 \pm 2,6$
Weiterer Verlauf		$0,6 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,4$
Start der Regenerationsphase		$5,8 \pm 3,2$	$2,1 \pm 1,3$	$6,6 \pm 4,8$

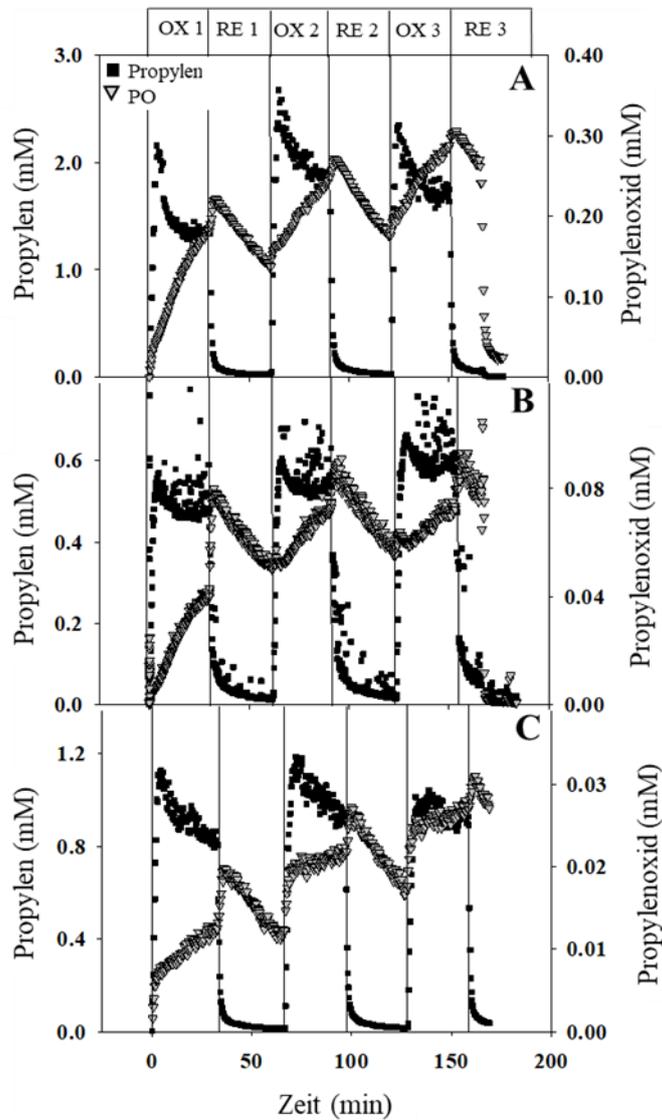


Abbildung 45: Sequenzielle Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit drei Epoxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 30 min. Dargestellt ist die Konzentration von Propylen (■) und Propylenoxid (▼), aufgenommen mittels Echtzeit-Massenspektrometer. Dargestellt sind drei Replikate (n = 3). Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Sandra Lichtenberger (Lichtenberger, 2020).

*Strategie II* (Regeneration für 60 min mit 30 %<sub>v/v</sub> Methan und Luft)

Die Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid mit einer 60 min Regeneration mit Methan und Luft ist in Abbildung 46 dargestellt. Die Enzymaktivitäten sind für die einzelnen Abschnitte in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Enzymaktivität der pMMO bei der Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid über eine Zeitspanne von 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 60 min.

Zeitintervall		OX 1	OX 2	OX 3
Initialphase	Enzymaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	3,1 ± 0,6	4,0 ± 1,6	6,0 ± 1,6
Weiterer Verlauf		0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Start der Regenerationsphase		7,7 ± 4,3	6,5 ± 2,3	8,8 ± 4,2

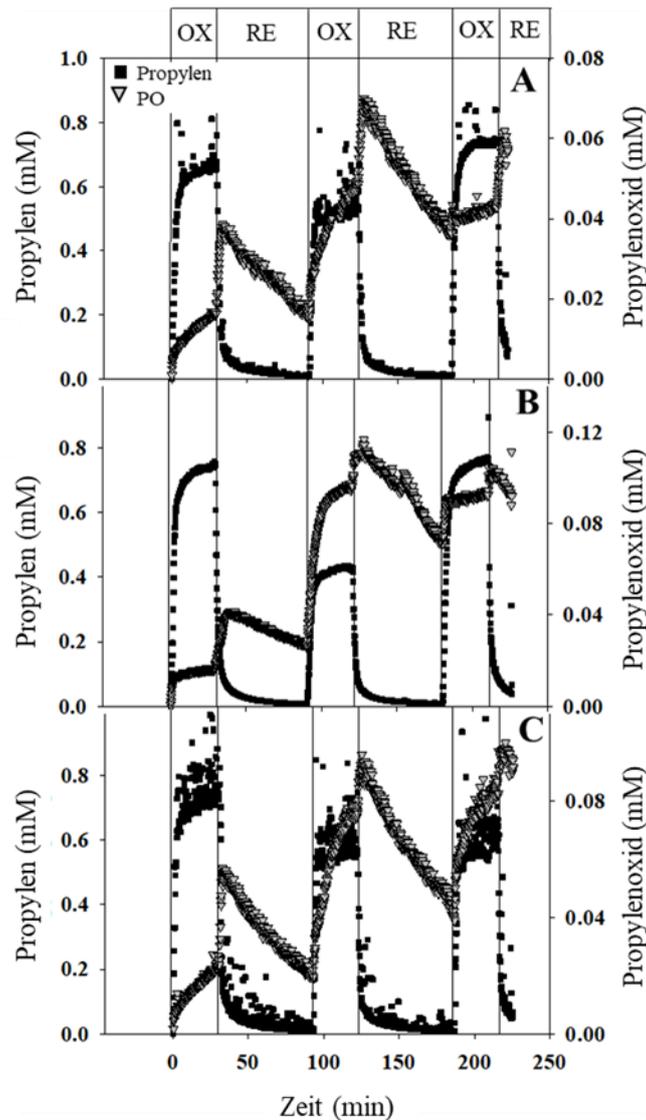


Abbildung 46: Sequenzielle Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit drei Epoxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 60 min. Dargestellt ist die Konzentration von Propylen (■) und Propylenoxid (▼), aufgenommen mittels Echtzeit-Massenspektrometer. Dargestellt sind drei Replikate (n = 3). Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Lichtenberger (Lichtenberger, 2020).

Der Verlauf der Propylen- als auch der Propylenoxidkonzentration ähnelt dem Verlauf bei einer 30-minütigen Regenerationszeit. Zu Beginn der Oxidationsphase (OX1) lag die Enzymaktivität bei  $3,1 \pm 0,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Nach einigen Sekunden sank sie jedoch auf  $0,1 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  und blieb bis zum Beginn der Regenerationsphase (RE1) nahezu konstant. Unmittelbar nach Start der Regenerationsphase stieg auch in diesen Versuchen die Enzymaktivität zunächst wieder über einen Zeitraum von etwa 5 Minuten an. Die Enzymaktivität ist mit einem Wert von  $4,0 \pm 1,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  etwas höher als die initiale Enzymaktivität. Die Epoxidierungsphase konnte im Anschluss zwei weitere Male durchgeführt werden, was wiederum zeigt, dass eine erfolgreiche Regeneration des Biokatalysators möglich war. Zusätzlich zur erfolgreichen sequenziellen Regeneration von *M. trichosporium* Ob3B konnte sowohl das Edukt als auch das Produkt erfolgreich aus dem flüssigen Reaktionsmedium ausgestrippt werden. Auffällig ist bei

allen Versuchen, dass bei niedrigeren Propylenkonzentrationen im Medium mehr Propylenoxid produziert wurde. Dies kann mit der durch Baici 2015 sowie Lin et al. 2001 beschriebenen Substrathemmung begründet werden (Baici, 2015; Lin et al., 2001). Die beschriebene Substrathemmung scheint jedoch für die enzymkatalysierte Reaktion durch *M. trichosporium* OB3b reversibel zu sein. Wird das Substrat somit aus dem Reaktionsmedium ausgetragen, kann die Enzymreaktion erneut durchgeführt werden. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität in Bezug auf die eingesetzte Substratkonzentration ist in der Abbildung 47 dargestellt.

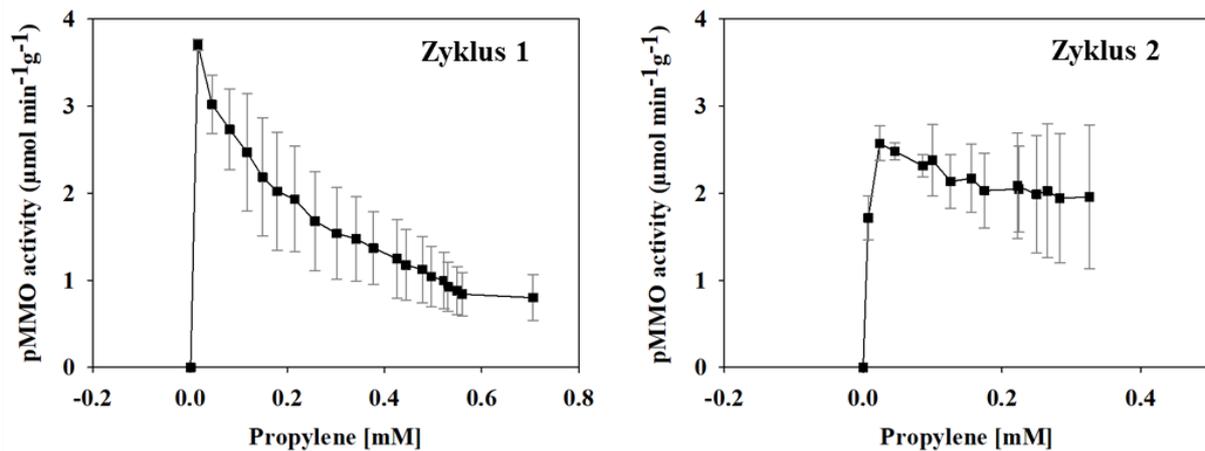


Abbildung 47: Dargestellt ist Enzymaktivität der pMMO in Abhängigkeit von der Propylenkonzentration während der Ganzzellbiokatalyse vor (Zyklus 1) und nach der Regeneration (Zyklus 2) der Zellen. Mit zunehmender Substratkonzentration sinkt die Enzymaktivität. Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Lichtenberger (Lichtenberger, 2020).

Mit steigender Substratkonzentration sinkt die Enzymaktivität. Der asymptotische Kurvenverlauf deutet dabei vermutlich auf eine Substrathemmung hin. Auch Ensign et al. (1992) beobachteten, dass Propylen bei höheren Konzentrationen scheinbar einen negativen Einfluss auf die Monooxygenase beim Abbau von 1,2-Dichloropropylen mit dem Organismus *Xanthobacter* hat. Bei Zugabe von 9,4 µmol Propylen lag die Aktivität bei 88 %. Durch die Zugabe von 47 µmol sank die Aktivität auf 47 %. Die Autoren vermuteten, dass Propylen und 1,2-Dichloropropylen konkurrieren (Ensign et al., 1992). Ein konkurrierendes Verhalten von zwei Substraten liegt zwar in dieser Arbeit nicht vor, dennoch wurde ebenfalls eine Reduktion der Enzymaktivität bei Erhöhung der Substratkonzentration sowohl für Propylen als auch für Benzol beobachtet. Weiterhin zeigen die Versuche mit einer Regenerationszeit von 60 min, dass mehr Produkt gewonnen werden konnte je weniger Substrat dem Reaktionsmedium zugeführt wurde. Dass es sich bei der Substrathemmung möglicherweise um einen reversiblen Prozess handelt, kann durch die Erhöhung der Enzymaktivität zu Beginn der Regenerationsphase (R1) erklärt werden. Durch das Begasen mit Methan und Luft wird das Substrat Propylen aus dem Reakti-

onsmedium ausgetragen und somit die Substratkonzentration verringert. Dadurch kann die Reaktion wieder durch die MMO katalysiert werden.

Neben der Substrathemmung hat möglicherweise auch die Sauerstofflimitation einen Einfluss auf die Enzymaktivität. Durch das Begasen mit Propylen zu Beginn der Oxidationsreaktion wurde der Sauerstoff teilweise aus dem Reaktionsmedium ausgetrieben. Dass Sauerstoff essenziell für die Reaktion ist, zeigten Degn et al. 1985. In ihren Versuchen stoppte die NADH-Reduktion sobald kein Sauerstoff mehr vorhanden war (Degn et al., 1985). Richards et al. 1994 untersuchten die Biotransformation von Propylen zu Propylenoxid mit dem Organismus *Methylococcus capsulatus* (Bath) ohne Sauerstoff. Die Daten zeigen, dass die Zellen ab einer Propylenoxidkonzentration von 13 mM nicht mehr regeneriert werden konnten. Sauerstoff dient in dieser Reaktion als terminaler Elektronenakzeptor (Richards et al., 1994).

### Strategie III (Regeneration mit Formiat und 30-minütiger Luftzufuhr)

Alternativ zur Regeneration des Biokatalysators mit Methan können die für die Reaktion notwendigen Co-Faktoren auch in Form von Formiat zugeführt werden. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, dass das flüssige Formiat – im Gegensatz zu Methan – direkt im Reaktionsmedium während der Oxidation vorgelegt werden kann. Wesentlicher Nachteil ist, dass Formiat ab einer kritischen Konzentration toxisch auf *M. trichosporium* OB3b wirken kann (Xin et al., 2002). Für eine kontinuierliche Epoxidierung ist es zudem unabdingbar, der Reaktion ausreichend Sauerstoff hinzuzuführen. Da neben der Sauerstoffzufuhr auch die Produkte nach einer Reaktionsdauer von etwa 30 min aufgrund ihrer Toxizität (siehe hierzu Kap. 5.3.1 und 5.3.2) ausgetragen werden sollten, muss neben der 30-minütigen Epoxidierungsphase auch in diesem Fall eine Zeitspanne für die Luft- bzw. Sauerstoffzufuhr vorgesehen werden (Kap. 4.8.3).

Tabelle 13: Enzymaktivität der pMMO bei der Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid über eine Zeitspanne von 30 min mit Formiat als Elektronendonator.

Zeitintervall		Versuche	OX 1	OX 2	OX 3
Initialphase	Enzymaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	A	329,6	63,1	151,3
		B	41,0	71,0	10,8
		C	30,5	86,8	52,5
Weiterer Verlauf		Durchschnitt	$6,1 \pm 1,9$	$2,0 \pm 1,1$	$7,2 \pm 7,1$
Start der Regenerationsphase		Durchschnitt	$141,3 \pm 40,3$	$27,6 \pm 15,1$	$24,5 \pm 34,7$

Abbildung 48 zeigt die Ergebnisse zur Epoxidierung von Propylen zu Propylenoxid in Anwesenheit von Formiat. Die resultierenden Enzymaktivitäten sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die erste Epoxidierungsphase (OX1) wies einen ähnlichen Verlauf wie die vorangegangenen Versuche ohne Formiat auf. Nach wenigen Sekunden sank die Enzymaktivität beispielsweise in Versuch A von zuvor max.  $329,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  auf  $6,1 \pm 1,9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Durch die Zugabe von Luft nach einer Reaktionsdauer von 30 min konnte die Enzymaktivität erneut für einen Zeitraum zwischen 5 min und 10 min auf max.  $141,3 \pm 10,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  erhöht werden. Dieser Anstieg der Enzymaktivität konnte jedoch nicht aufrechterhalten werden, da durch die Luftzufuhr Propylen ausgestrippt wurde und somit kein Edukt für die Biokatalyse mehr zur Verfügung stand. In den beiden nachfolgenden Zyklen lagen nach der Luftzufuhr mit einer Enzymaktivität von jeweils max.  $86,8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  (Versuch C) und  $151,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  (Versuch A) deutlich geringere Enzymaktivitäten vor. Hou (1984) beschreiben ebenfalls den Verlust der anfänglichen Enzymaktivität nach der Cofaktor-Regeneration von *M. trichosporium OB3b* bei zweimaligem Hinzufügen von Methanol (Hou, 1984). Nach der Regeneration waren die Propylenoxid-Konzentrationen um ca. 2/3 geringer als zu Beginn des Versuchs (nach dem ersten Zyklus erzielten sie  $2 \text{ mM g}^{-1}$  Propylenoxid, nach dem zweiten Zyklus lag die Konzentration nur noch  $0,5 \text{ mM g}^{-1}$ ). Ein weiterer Umstand der womöglich zum Verlust der Enzymaktivität geführt haben könnte, ist ein vorzeitiger Verbrauch des zu Beginn der Reaktion vorlegten Formiats (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Gemessene Formiatkonzentrationen während der Versuchsdurchführung.

		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
<b>Formiat (mM)</b>	A	0,76	0,67	0,35	0,18	0	0	0
	B	0,95	0,89	0,61	0,40	0,12	0	0
	C	0,82	0,78	0,43	0,38	0,07	0	0

Im Vergleich zu den Versuchen mit einer 30- bzw. 60- minütigen Regeneration mit Methan wurden bei den Versuchen mit Formiat insgesamt deutlich höhere Enzymaktivitäten erreicht. Auch Hou et al. (1984) beschrieben den positiven Effekt von Formiat auf die Oxidationsreaktion von Propylen zu Propylenoxid mit *Methylococcus capsulatus* CRL M1 (Hou, 1984). In der Arbeit von Hou konnte gezeigt werden, dass 10 mM Formiat einen größeren Effekt auf die Reaktion hatte als 40 mM Formiat. Neben dem Formiat als Elektronendonator könnte auch die höhere Substratmenge einen positiven Einfluss auf die Reaktion gehabt haben. Die Enzymaktivität sank jedoch in der zweiten und dritten Oxidationsphase deutlich ab. Ursächlich hierfür könnte die Produktinhibierung gewesen sein. Durch die deutlich höhere Startkonzentration von

Propylen konnte deutlich mehr Propylenoxid generiert werden. Dadurch wurde die kritische Produktkonzentration von 1 mM schneller als bei den Versuchen in Strategie I und II erreicht. Zum anderen könnte die geringere Enzymaktivität in OX 2 und OX 3 auch in der geringeren Formiatkonzentration begründet sein.

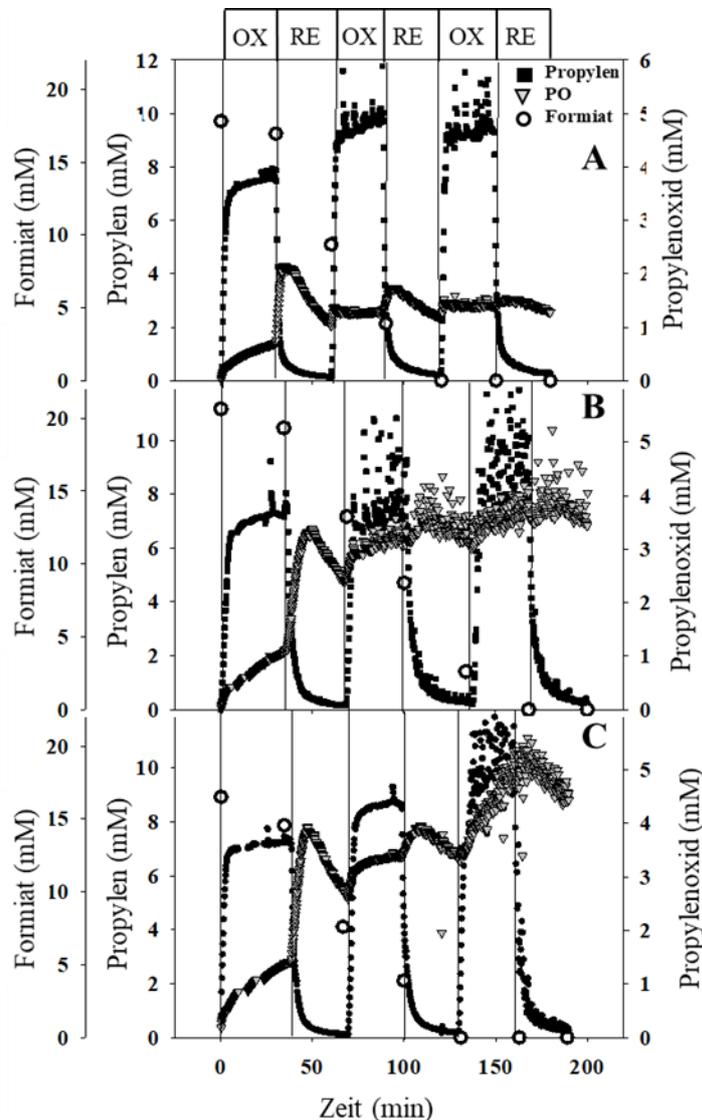


Abbildung 48: Sequenzielle Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit drei Epoxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min mit Formiat als Elektronendonator. Dargestellt ist die Konzentration von Formiat (○), Propylen (■) und Propylenoxid (▼), aufgenommen mittels Echtzeit-Massenspektrometer. Dargestellt sind drei Replikate (n=3). Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Sandra Lichtenberger (Lichtenberger, 2020).

### *Zusammenfassung der Versuche zur Regeneration von Propylen zu Propylenoxid*

Grundsätzlich zeigten die Versuche, dass eine Regenerationszeit von 30 Minuten zwar ausreicht um den Ganzzellbiokatalysator zu regenerieren, eine vollständige Abtrennung des Propylenoxids jedoch erst bei einer Regenerationsdauer von 60 min möglich war.

Eine 30-minütige Regenerationszeit wurde auch durch Richards et al 1994 für die Regeneration des methanotrophen Bakteriums *Methylococcus capsulatus* Bath vorgeschlagen, sobald die Enzymaktivität einen Wert von  $150 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}_{\text{BTM}}$  unterschreitet (Richards et al., 1994). Die in dieser Arbeit mit *M. trichosporium* OB3b erhobenen Daten zeigen, dass eine Enzymaktivität in der selben Größenordnung durch Regeneration mit Methan und Luft nicht erreicht werden konnte. Allerdings wurde bei den Versuchen mit Formiat als Elektronendonator Enzymaktivitäten in einer ähnlichen Größenordnung gemessen ( $126 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}_{\text{BTM}}$  und  $140 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}_{\text{BTM}}$ ). Ursächlich hierfür könnte Produktinhibierung als Resultat des nicht vollständig ausgeprägten Propylenoxids bei einer Regenerationszeit von 30 min sein. Stanley et al. 1992 beobachteten eine Inhibierung der pMMO mit *Methylococcus capsulatus* Bath bei Propylenoxid-Konzentrationen über 1 mM (Stanley et al., 1992). Bei den Versuchen in der vorliegenden Arbeit lag die Propylenoxid-Konzentration mit Formiat bei der Oxidationsphase deutlich über 1 mM. Bei den Versuchen mit der 30- und 60 min-Regeneration waren die Konzentrationen unter 1 mM. Hier sind die Enzymaktivitäten ähnlich geblieben. Die hier gezeigten Ergebnisse untermauern somit die Beobachtungen von Stanley et al. 1992.

Bei den Untersuchungen zur Toxizität der Produkte (Kap. 5.3.1 und 5.3.2) hat sich zudem gezeigt, dass Propylenoxid bei Inkubationszeiten von mehr als 30 min toxisch auf *M. trichosporium* OB3b wirkt. Diese Tatsache könnte ebenfalls eine Auswirkung auf die Enzymaktivität gehabt haben. Hill et al. 1990 untersuchten die kontinuierliche Oxidation von Propylen zu Propylenoxid mit *M. trichosporium* OB3b ebenfalls über einen Zeitraum von 30 min mit anschließender Regeneration über 30 min mit Methan und Sauerstoff in einem Rührkesselreaktor (Hill et al., 1990). Nach 28 h erreichten sie eine Zelldichte von  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  und erzielten eine Ausbeute von  $5,9 \text{ mg (Propylenoxid) g}^{-1}$  (Propylen). Ähnliche Ausbeuten von  $5,4 \text{ mg g}^{-1}$  wurden in dieser Arbeit mit einer 60 min Regeneration bei Zugabe von  $0,8 \text{ mM}$  Propylen erzielt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass alle untersuchten Prozessstrategien (I-III) eine erfolgreiche Regeneration von *M. trichosporium* OB3b ermöglichen. Hierdurch wiederum konnten prinzipiell zwei zusätzliche Oxidationszyklen durchgeführt werden. Nach der Regeneration mit Methan und Luft für 30 min (Strategie I) konnte ein erneuter Oxidationszyklus mit ähnlichen Enzymaktivitäten wie im ersten Zyklus erzielt werden. Dies war ebenfalls bei der Regeneration mit Methan und Luft für 60 min (Strategie II) der Fall. Die höchste Enzymaktivität wurde mit  $329,6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  mit Formiat als Elektronendonator gemessen.

### 5.3.6 Sequenzielle Selektivoxidation von Benzol zu Phenol mit intermittierenden Regenerationsphasen

Wie auch bei der Ganzzellbiokatalyse von Propylen zu Propylenoxid wurden in dieser Arbeit verschiedene Regenerationsstrategien für die Oxidation von Benzol zu Phenol untersucht. Da Phenol einen stark adsorbierenden Charakter besitzt und daher Teile des Produktes an die Peripherie des Reaktors adsorbieren können, wurde im ersten Oxidationszyklus eine erhöhte Eduktkonzentration von 7,86 mM Benzol im Reaktionsmedium vorgelegt. In den anschließenden Zyklen (OX2 und OX3) reichte eine Konzentration von 1,12 mM Benzol aus, um das entstandene Produkt unmittelbar mittels Echtzeit-Massenspektroskop nachzuweisen zu können.

In den Abbildungen 49, 50 und 51 zeigt sich, dass das hinzugefügte Edukt über die komplette Prozessdauer nicht vollständig oxidiert wurde. Somit lag Phenol stets im Überschuss vor. Während in allen Oxidationszyklen (OX1 bis OX3) Phenol gebildet wurde, konnte nur in den Oxidationszyklen zwei und drei (OX2 und OX3) eine leichte Abnahme der Benzol-Konzentration, beobachtet werden. Colby et al. (1977) untersuchten ebenfalls die Oxidation von Benzol mit dem methanotrophen Organismus *Methylococcus capsulatus*. Sie erreichten eine Phenolmenge von 3  $\mu\text{mol}$  nach einer 12-minütigen Oxidationsreaktion und einer initialen Eduktmenge von 450  $\mu\text{mol}$  Benzol. In der vorliegenden Arbeit wurden mit *M. trichosporium* OB3b, bedingt durch eine deutlich längere Oxidationszeit von dreimal 30 Minuten, deutlich höhere Phenolkonzentrationen bis 3 mM (Strategie III) erzielt. Alle durchgeführten Versuche sind in den Abbildung 49 bis Abbildung 51 dargestellt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelzonen Regenerationsstrategien gezeigt und diskutiert.

*Strategie I* (Regeneration für 30 min mit 30 %<sub>v/v</sub> Methan und Luft)

Die sequenzielle Oxidation von Benzol zu Phenol mit einer intermittierenden Regeneration mit Methan und Luft über einen Zeitraum von 30 min ist in Abbildung 49 dargestellt. Die Oxidationsreaktion beginnt direkt bei initialer Zugabe des Eduktes. Nach der Initialphase sinkt die Enzymaktivität (Tabelle 15) von  $374,0 \pm 105,2 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  auf  $7,2 \pm 2,0 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ . Durch das Begasen mit Methan und Luft (RE1) war es möglich, sowohl Teile des Produktes als auch Eduktes aus dem Reaktionsmedium auszustrippen.

Das Zeitintervall von 30 Minuten reichte jedoch nicht aus, um das Produkt vollständig auszutragen. Auffällig ist jedoch die geringere Enzymaktivität im zweiten Oxidationszyklus (OX2) von  $183,4 \pm 10,3 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  sowie von  $112,2 \pm 28,3 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  in OX3. Dieser Rückgang

steht möglicherweise im Zusammenhang mit der versuchsbedingten Erhöhung der Eduktzugabe in OX1. Ähnlich wie in OX1 fällt die Enzymaktivität auch in OX2 und OX3 nach kurzer Zeit deutlich ab (Tabelle 15).

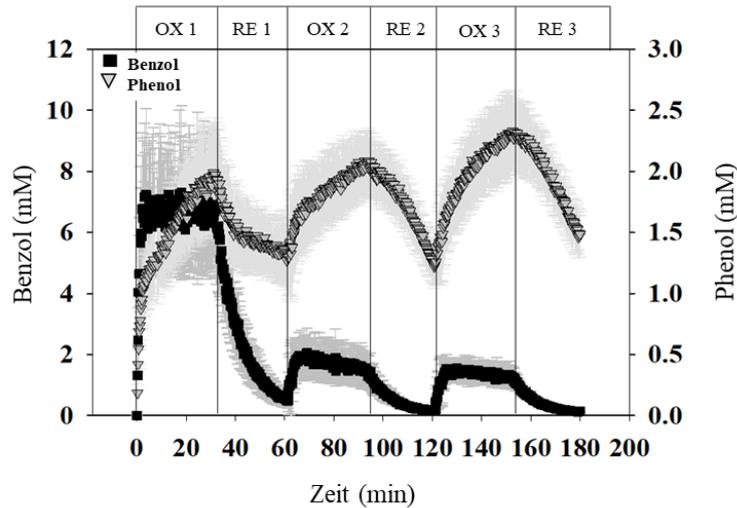


Abbildung 49: Sequenzielle Oxidation von Benzol zu Phenol mit drei Oxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min und drei Regenerationszyklen über jeweils 30 min. Dargestellt ist die Konzentration von Benzol (■) und Phenol (▼), aufgenommen mittels Echtzeit-Massenspektrometer. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte aus drei Replikaten (n=3). Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Sandra Lichtenberger (Lichtenberger, 2020).

Tabelle 15: Enzymaktivitäten der sMMO bei der Oxidation von Benzol zu Phenol über eine Zeitspanne von 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 30 min.

Zeitintervall		OX 1	OX 2	OX 3
Initialphase	Enzymaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	$374,0 \pm 105,2$	$183,4 \pm 40,3$	$112,2 \pm 28,3$
Weiterer Verlauf		$7,7 \pm 2,0$	$4,5 \pm 2,1$	$6,8 \pm 1,4$

### Strategie II (Methan und Luft über einen Zeitraum von 60 min)

Die mehrstufige Oxidation von Benzol zu Phenol mit einer intermittierenden Regeneration durch Methan und Luft über einen Zeitraum von 60 min ist in Abbildung 50 dargestellt.

Die initiale Enzymaktivität (Tabelle 16) ist mit  $258,7 \pm 47,3 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  höher als im weiteren Verlauf der Oxidationsreaktion. Im Anschluss an die Initialphase sinkt die Enzymaktivität, wie bereits in den zuvor beschriebenen Versuchen beobachtet, auf einen Wert von  $7,9 \pm 0,9 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  ab.

Anders als bei einer Regenerationszeit von 30 min werden sowohl Edukt als auch Produkt im Zeitintervall von 60 min fast vollständig aus dem Reaktionsmedium ausgestrippt. Die Reaktionskinetik in allen weiteren Oxidationszyklen (OX2-OX4) folgt einem ähnlichen Verlauf.

Lediglich die initiale Enzymaktivität reduzierte sich geringfügig auf  $163,0 \pm 38,8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  (OX2 im Vergleich zu OX1). Alle Enzymaktivitäten sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

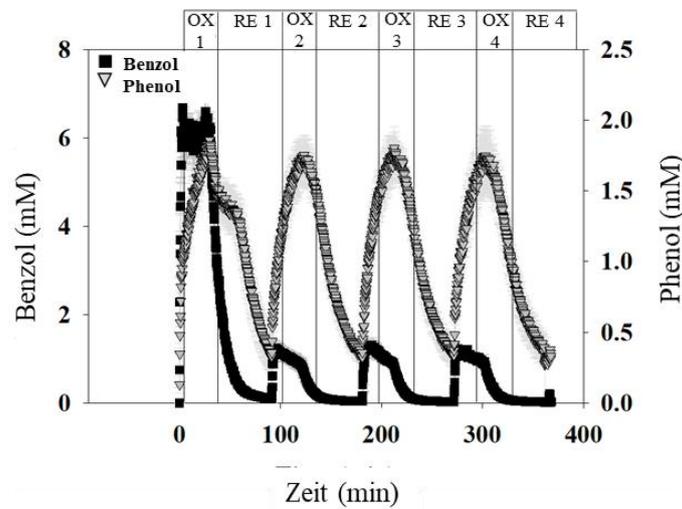


Abbildung 50: Sequenzielle Oxidation von Benzol zu Phenol mit drei Oxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min sowie einer intermittierenden Regenerationsphase von jeweils 60 min. Dargestellt ist die Konzentration von von Benzol (■) und Phenol (▼), aufgenommen mittels Echtzeit-Massenspektrometer. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte aus drei Replikaten (n=3). Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Sandra Lichtenberger (Lichtenberger, 2020).

Tabelle 16: Enzymaktivitäten der sMMO bei der Oxidation von Benzol zu Phenol über eine Zeitspanne von 30 min mit intermittierenden Regenerationsphasen über jeweils 60 min.

Zeitintervall		OX 1	OX 2	OX 3	OX 4
Initialphase	Enzymaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	$258,7 \pm 7,3$	$163,0 \pm 38,8$	$116,9 \pm 11,8$	$131,7 \pm 20,8$
Weiterer Verlauf		$7,9 \pm 0,9$	$8,1 \pm 0,2$	$8,0 \pm 1,1$	$8,4 \pm 1,2$

### Strategie III (mit Formiat)

Die Regeneration von *M. trichosporium* mit Formiat stellt eine weitere Möglichkeit dar, die notwendigen Cofaktoren zu regenerieren (Kap. 2.4.3). Die Konzentration von Benzol, Phenol und Formiat während der Oxidationsreaktion ist in Abbildung 51 dargestellt. Analog zur Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid wurde Formiat einmalig zu Beginn der Oxidationsreaktion im Reaktionsmedium vorgelegt. Der Reaktor wurde nach einer Reaktionsdauer von 30 min für weitere 30 min dem Ziel der Sauerstoffversorgung und Produktabtrennung mit Luft begast (Kap. 4.8.3). Die Oxidation von Benzol zu Phenol erfolgte direkt mit der Injektion des Eduktes. Während der Initialphase der Reaktion betrug die Enzymaktivität max.  $596,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  in Versuch C (Tabelle 17). Nach der kurzen Anfangsphase sank auch in diesen Versuchen die Enzymaktivität auf  $5,9 \pm 1,0 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ . Die Enzymaktivitäten liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie bei den Versuchen mit Methan und Luft.

Die Enzymaktivität im zweiten und dritten Oxidationszyklus (OX2 und OX3) war jedoch geringer als die Enzymaktivität, welche durch eine Regeneration mit Methan und Luft (OX2 und OX3) erzielt werden konnte. Hierfür kann es mehrere Gründe geben. Dadurch, dass das Phenol während des ersten Begasungszyklusses (RE1) mit Luft nicht vollständig ausgetragen wurde – die Enzymaktivität stieg während der ersten Regenerationsphase sogar auf  $17,8 \pm 2,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  an – könnte die Menge an Produkt im Reaktionsmedium inhibierend auf die Ganzzellbiokatalyse wirken. Der Phenolanstieg (RE1) könnte auf den positiven Effekt des Sauerstoffeintrags auf die Enzymreaktion zurückzuführen sein. Vermutlich wird mehr Benzol oxidiert als durch die Begasung ausgetragen wird.

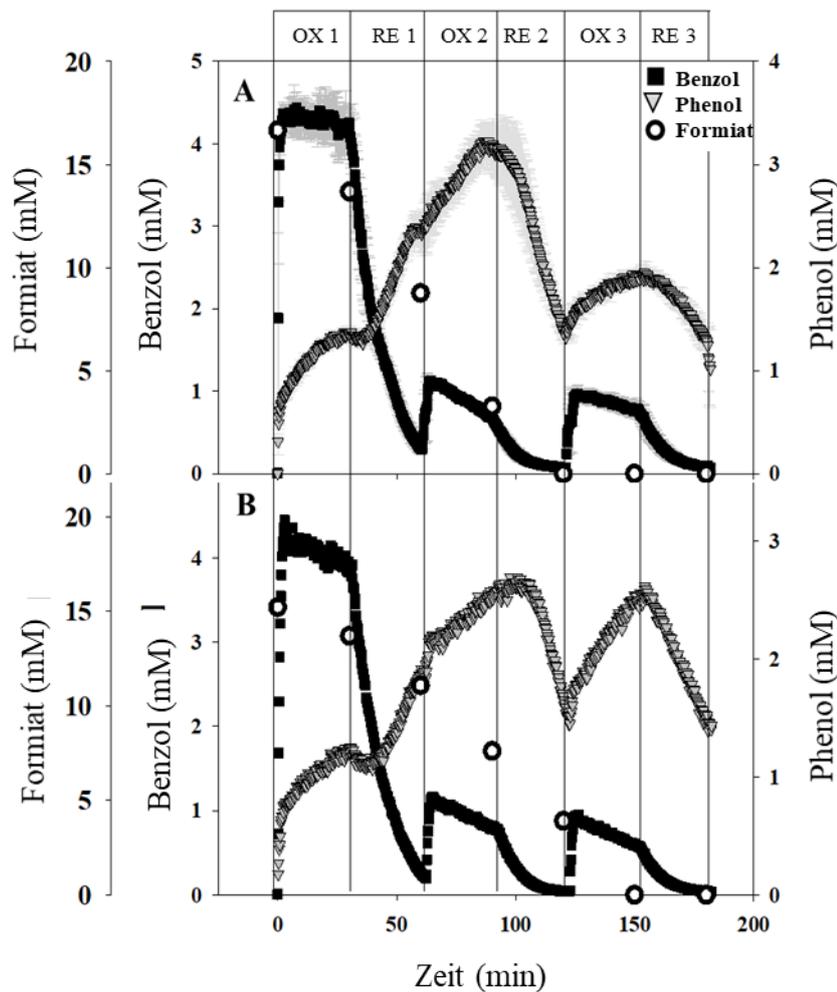


Abbildung 51: Sequenzielle Oxidation von Benzol zu Phenol mit drei Oxidationsphasen über eine Zeitspanne von jeweils 30 min mit Formiat als Elektronendonator. Jeder Oxidationsphase folgte eine 30-minütige Begasung mit Luft um Sauerstoff einzutragen und das Produkt auszutragen. Dargestellt ist die Konzentration von Benzol (■) und Phenol (▼) sowie Formiat (○), aufgenommen mittels Echtzeit-Massenspektrometer. Dargestellt sind in der oberen Graphik jeweils Mittelwerte aus zwei Replikaten (n=2). Die dritte Wiederholung ist in der unteren Graphik separat aufgezeigt. Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Lichtenberger (Lichtenberger, 2020).

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Durch eine zweite Benzolinjektion (OX2) konnte eine erneute Produktbildung bis zu einer Phenolkonzentration von etwa 3 mM erreicht werden. Mit max.  $140,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  war die Enzymaktivität in OX2 jedoch etwas geringer als in OX1 (max.  $596,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ). Möglicherweise war zu diesem Zeitpunkt die Formiatkonzentration bereits zu gering, um eine gleichbleibende Enzymaktivität zu gewährleisten. Dies könnte auch der Grund dafür gewesen sein, dass das entstandene Phenol in der zweiten Begasungsphase (RE2) nahezu vollständig ausgetragen werden konnte. Obwohl Formiat zum Zeitpunkt des dritten Oxidationszyklus komplett verbraucht war (Tabelle 18), konnte noch eine dritte Oxidationsperiode durchgeführt werden. Offenbar lagen somit intrazellulär noch genügend Cofaktoren vor.

Tabelle 17: Enzymaktivitäten der sMMO bei der Oxidation von Benzol zu Phenol über eine Zeitspanne von 30 min mit Formiat als Elektronendonator.

Zeitintervall			OX 1	OX 2	OX 3
Initialphase	Enzymaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{cdw}}^{-1}$ )	A	398,6	109,7	84,2
		B	222,2	116,7	147,2
		C	596,4	140,4	114,4
		D	207,3	64,3	80,5
Verlaufphase	Enzymaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{cdw}}^{-1}$ )	Durchschnitt	$5,9 \pm 1,0$	$6,1 \pm 1,6$	$6,0 \pm 2,1$
Beginn der Regeneration		Durchschnitt	$17,8 \pm 2,3$	-	-

Tabelle 18: Übersicht über die Formiatkonzentration während der sequenzielle Oxidation von Benzol zu Phenol zu ausgewählten Zeitpunkten über die gesamte Prozessdauer.

		0 min	30 min	60 min	90 min	20 min	150 min	180 min
Formiat (mM)	A	$16,7 \pm 0,4$	$13,7 \pm 0,7$	$8,7 \pm 2,0$	$3,3 \pm 2,4$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
	B	15,21	13,7	11,08	7,6	3,9	0,0	0,0
	C	$16,7 \pm 0,4$	$13,7 \pm 0,7$	$8,7 \pm 2,0$	$3,3 \pm 2,4$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

### *Zusammenfassung für die Oxidation von Benzol zu Phenol*

Die erfolgreiche Regeneration von *M. trichosporium* OB3b konnte sowohl mit Methan als auch mit Formiat in allen Versuchen zur Oxidation von Benzol zu Phenol gezeigt werden. Innerhalb der vorgesehenen Regenerationsintervalle konnten Edukt und Produkt aus dem Reaktionsmedium ausgetragen werden. Im Vergleich zu der Ganzzellbiokatalyse von Propylen zu Propylenoxid wurde kein Anstieg der Enzymaktivität unmittelbar zu Beginn der Regenerationsphase

beobachtet. Dies ist ein Indiz dafür, dass genug Sauerstoff über die gesamte Prozessdauer im Reaktor verfügbar war. Durch die Zugabe des flüssigen Benzols wurde der vorhandene Sauerstoff im Gasraum des Reaktors somit nicht ausgetragen. Dies deutet zudem darauf hin, dass sich Sauerstoff aus dem Gasraum in das Reaktionsmedium nachlösen kann.

Die Produktabtrennung war bei der Regeneration mit Methan und Luft mit einem Regenerationsintervall von 60 min am effektivsten. Im Anschluss an die Regenerationsphasen (RE1 bis RE4) war eine erneute Produktbildung zu beobachten. Die höchste Enzymaktivität wurde jedoch im ersten Reaktionszyklus (RE1) detektiert. Die Abnahme der Enzymaktivität könnte – wie auch bei der Ganzzellbiokatalyse von Propylen zu Propylenoxid (Kap. 5.3.5) – Resultat einer Produktinhibierung sein. Einen inhibitorischen Effekt phenolischer Verbindungen zeigte beispielweise auch Moonen (2005) für den Organismus *Pseudomonas fluorescens* ACB (Moonen, 2005). Bei Zugabe von 0,2 mM Phenol wurde die Enzymaktivität um 17 % reduziert. Gaal und Neujahr (1981) zeigten, dass eine Phenolkonzentration über 1 mM die Phenol-Hydroxylase und die Catechol-1,2-Oxygenase in *Trichosporum cutaneum* inhibierte. Bei geringeren Konzentrationen zwischen 0,01 mM und 0,1 mM erfolgte hingegen eine Enzyminduktion (Gaal and Neujahr, 1981). Dass 1 mM Phenylacetylen eine reversible Inhibierung der Hydroxylase-Einheit (MMOH) in *Methylococcus capsulatus* hervorruft, zeigten Kagle und Hay 2006. In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen zur Ganzzellbiokatalyse mit *M. trichosporium* wurden Phenolkonzentrationen deutlich über 1 mM erzielt. Die höchste Phenolkonzentration mit  $2,7 \pm 0,2$  mM wurde in den Versuchen mit Formiat erreicht, welche in einer stark reduzierten Enzymaktivität im folgenden Oxidationszyklus (OX2) resultierte. Die hier gezeigten Daten stehen somit in Einklang mit den Beobachtungen von Moonen (2005) sowie Gaal und Neujahr (1981) (Gaal and Neujahr, 1981).

Durch die vollständige Produktabtrennung bei 60-minütigen Regenerationsintervallen können die inhibierenden Effekte von Benzol aber auch Phenol deutlich reduziert werden. Hall (1983) beschrieb, dass eine 30-minütige Regeneration für die Regeneration des Cofaktors NADH ausreichend ist (Hall, 1983). Richards et al. 1994 hingegen beobachteten, dass die sMMO gegenüber der pMMO in *Methylococcus capsulatus* die doppelte Zeit zur Regeneration benötigt. Die Daten von Hall legen ebenfalls eine Mindestdauer von 60 min für ein Regenerationsintervall nahe.

Eine weitere mögliche Erklärung für die sinkende Enzymaktivität ab dem zweiten Oxidationszyklus (OX2), könnte eine unzureichende Cofaktor-Regeneration oder auch ein Mangel an Sauerstoff im Reaktionsmedium darstellen. Es ist hierbei insbesondere zu berücksichtigen, dass

*M. trichosporium* durch das Begasen mit Methan und Luft in die Lage versetzt wird, Biomasse aufzubauen. Hierfür wird Sauerstoff benötigt und direkt verwertet. Dies wirkt einer angestrebten Anreicherung von Sauerstoff im Reaktionsmedium für die Oxidationsreaktion direkt entgegen. Auch eine Substratinhibierung könnte für eine geringere Enzymaktivität verantwortlich sein. So zeigt Abbildung 52, dass die Enzymaktivität mit steigender Benzolkonzentration sinkt.

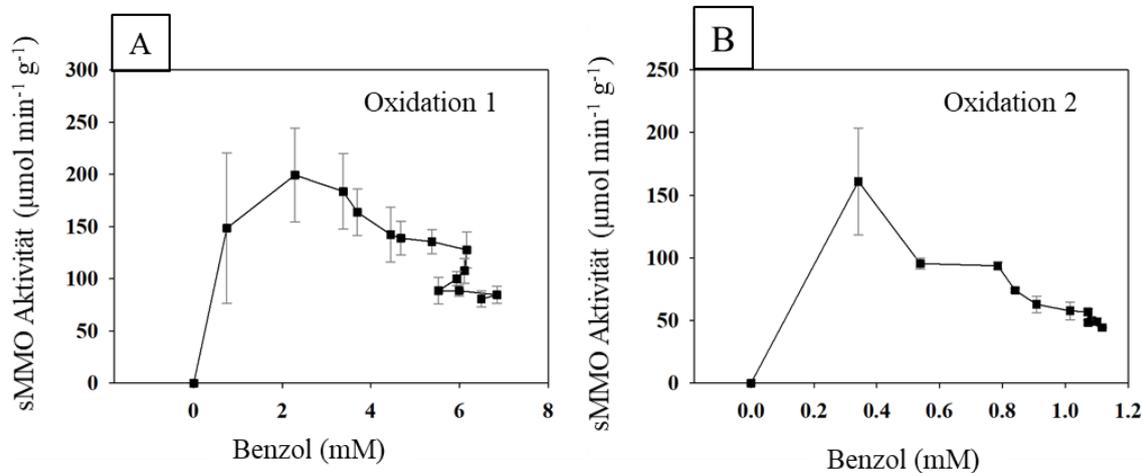


Abbildung 52: Dargestellt ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität der sMMO von der Benzolkonzentration während der Ganzzellbiokatalyse vor (Oxidation 1) und nach (Oxidation 2) der Regeneration der Zellen. Mit zunehmender Substratkonzentration sinkt die Enzymaktivität. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte aus drei Replikaten (n=3). Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Sandra Lichtenberger (Lichtenberger, 2020).

### 5.3.7 Kontinuierliche Ganzzellbiokatalyse im Doppelmembranbioreaktor

Die Ganzzellbiokatalyse für das gasförmige Edukt Propylen sowie für das flüssige Edukt Benzol wurde im Rahmen dieser Arbeit als Proof of Concept in einem neu entwickelten Doppelmembranreaktor (DMBR) durchgeführt (Kap. 4.8.4).

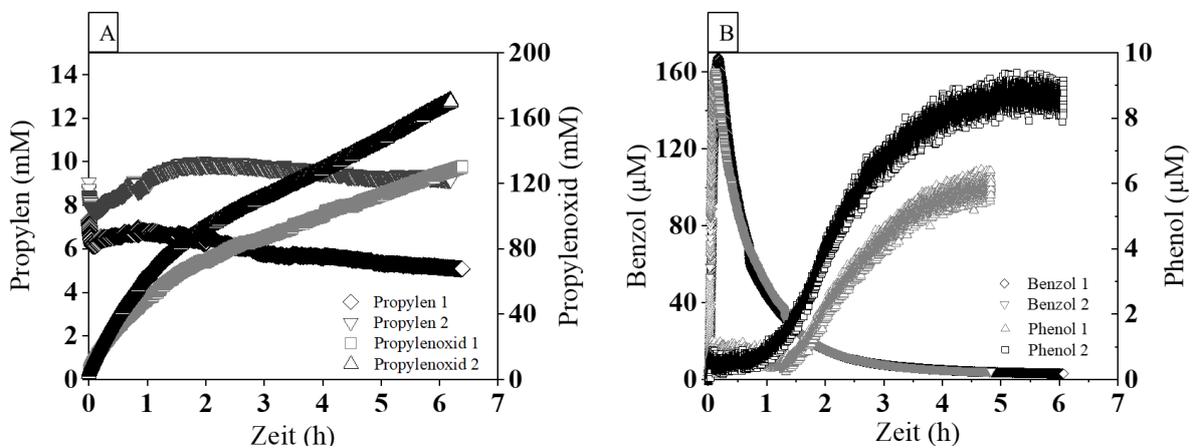


Abbildung 53: Ganzzellbiokatalyse von Propylen zu Propylenoxid (A) und Benzol zu Phenol (B) durch *M. trichosporium* OB3b im neu entwickelten Doppelmembranbioreaktor (DMBR). Dargestellt sind die Eduktverbrauchs- und Produktbildungskinetik aus jeweils zwei Versuchen aufgenommen mittels Echtzeit-Massenspektrometer.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Abbildung 53 sind die Eduktverbrauchs- und Produktbildungskinetik für die Ganzzellbiokatalyse von Propylen zu Propylenoxid (A) sowie von Benzol zu Phenol (B) dargestellt. Die dazugehörigen Versuchsparameter und die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Der DMBR bietet die Möglichkeit, die Zellsuspension unter räumlicher Trennung beider Gase kontinuierlich mit Sauerstoff und mit Propylen zu versorgen. Im Fall von Benzol wurde das Substrat zu Beginn des Versuches einmalig zugegeben (siehe Kap. 4.8.4).

Durch das kontinuierliche Begasen mit Sauerstoff und Propylen konnte eine kontinuierliche Selektivoxidation zu Propylenoxid über eine Gesamtdauer von min. 6 h durchgeführt werden (Abbildung 53). Dabei wurde bei einer maximalen Enzymaktivität von  $465 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  eine maximale Produktkonzentration von bis zu 170 mM erzielt. Da Propylenoxid im Vergleich zum Edukt gut in Wasser löslich ist und sich durch die Begasung kontinuierlich Propylen im wässrigen Medium nachlösen konnte, überschritt die Produktkonzentration ab etwa 2,5 h bzw. 3,5 h die Eduktkonzentration im Reaktor. Bereits Xin et al. (2002) haben in einem kontinuierlichen Prozess in einem 50 mL Schüttelkolben, welcher zu einem Rührkesselreaktor umfunktioniert wurde, in einem Flüssigvolumen von 25 mL bis 30 mL über 12 Tage Propylen zu Propylenoxid mit *Methylomonas sp.* GYJ3 oxidiert. Mit einer Ausbeute von ca.  $250 \mu\text{mol d}^{-1}$  bis  $300 \mu\text{mol d}^{-1}$  liegen die publizierten Werte jedoch deutlich unter den in dieser Arbeit erreichten  $28,3 \text{ mM h}^{-1}$ . Nach 12 Tagen erreichten Xin et al. eine Konzentration von 3,2 mM Propylenoxid (Xin et al., 2002).

Tabelle 19: Verwendete Versuchsparameter sowie die erreichte maximale Produktkonzentration und Enzymaktivität für die Ganzzellbiokatalyse von Propylen und Benzol im DMBR.

	<b>Propylen zu Propylenoxid</b>		<b>Benzol zu Phenol</b>	
Versuchsnummer	1	2	1	2
Eingesetzte Biomasse ( $\text{g L}^{-1}$ )	3,1	3,6	2,8	2,3
Dauer (min)	383	371	212	316
Produktkonzentration (mM)	130	170	7,5*	10,4*
Max Enzymaktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{cdw}}^{-1}$ )	449	465	0,018	0,027
* Angabe in $\mu\text{M}$				

Im Gegensatz zu Propylenoxid konnten im DMBR für Phenol nur vergleichsweise geringe Produktkonzentrationen von maximal 10,4  $\mu\text{M}$  erreicht werden. Abbildung 53 deutet zudem – aufgrund der starken Abnahme des Eduktes innerhalb der ersten Stunde ohne Produktbildung – darauf hin, dass Teile der Edukte aus dem DMBR diffundieren konnten.

Ein weiterer Grund für die insgesamt geringen Produktkonzentrationen könnte eine Adsorption des Produktes an den Membranoberflächen sowie an den Einlassschläuchen des Massenspektrometers sein.

Somit konnte auch erst nach Sättigung der entsprechenden Oberflächen eine Detektion im Massenspektroskop erfolgen. Dadurch wäre auch der geringe Produktanstieg zu Beginn des Versuches zu erklären. Insgesamt wurde im Vergleich zur Ganzzellbiokatalyse von Propylen zu Propylenoxid in diesen Versuchen nur eine sehr geringe Enzymaktivität von max. 0,027  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  erreicht.

### **5.3.8 Gegenüberstellung des Doppelmembranbioreaktors und des Rührkesselreaktors für die Ganzzellbiokatalyse**

Im Rührkesselreaktor können die Gase Propylen und Sauerstoff aus sicherheitstechnischen Gründen nicht gleichzeitig in die Zellsuspension eingetragen werden. Der daraus resultierende Sauerstoffmangel führte zu einem Ende der Oxidationsreaktion nach max. 3,25 h (siehe Kap. 5.3.4). Um einen Sauerstoffeintrag über eine längere Prozessdauer zu gewährleisten und gleichzeitig auch Cofaktoren zu regenerieren, wurde der Einfluss unterschiedlicher Regenerationsstrategien untersucht und in den Kap. 5.3.5 und 5.3.6 ausführlich beschrieben. Ferner wurde, um während der Ganzzellbiokatalyse kontinuierlich Sauerstoff in das System einbringen zu können, ein neuartiger DMBR entwickelt, welcher einen kontinuierlichen Sauerstoffeintrag über Silikonmembranen ermöglicht. Im folgenden Kapitel werden die beiden in dieser Arbeit verwendeten Reaktortypen hinsichtlich wesentlicher Prozesskenngrößen wie der Rüstzeit, der Oxidationsdauer, der Endkonzentration des Produktes ( $P_{\text{final}}$ ), der max. Enzymaktivität, der Produktivität sowohl des Ansatzes ( $Q_{\text{P}}$ ) als auch des Reaktors ( $Q_{\text{P,R}}$ ) gegenübergestellt (Tabelle 20). Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass sich der DMBR prinzipiell für das gasförmige Substrat Propylen eignet.

Gegenüber dem Rührkesselreaktor wurde eine längere Oxidationsdauer, bedingt durch die kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff und Propylen, und eine deutlich höhere max. Propylenoxidkonzentration von ca. 170 mM erreicht. Die max. Enzymaktivität von 449  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  liegt dabei in einer ähnlichen Größenordnung wie die von Stanley und Dalton (1992)

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

gemessene Enzymaktivität. Sie untersuchten die Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit dem Organismus *Methylococcus capsulatus* Bath in 9,5 ml-Schüttelkolben mit 0,5 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> bei einem Flüssigvolumen von 1 mL (siehe auch Tabelle 10) (Stanley and Dalton, 1992). Im Vergleich zu den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen gaben Stanley und Dalton 1 mM jedoch Methanol als Elektronendonator zur Reaktion hinzu. Dies ist bei dem Einsatz des DMBR hingegen nicht notwendig. Der DMBR ermöglicht bei der Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid gegenüber dem verwendeten Rührkesselreaktor eine Steigerung der Produktivität des Ansatzes Q<sub>P</sub> um den Faktor 40 sowie der Produktivität des Reaktors Q<sub>P,R</sub> um das 60-fache.

Tabelle 20: Ausgewählte Reaktor- und Prozesskenngrößen für die Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol im Rührkessel und im DMBR.

Parameter	RK		DMBR	
	P zu PO	B zu Ph	P zu PO	B zu Ph
Flüssigvolumen V <sub>L</sub> (L)	1		0,6	
Rüstzeit t <sub>präp</sub> (h)	2,5		2	
V <sub>R</sub> (L)	1,6		1	
Oxidationsdauer t <sub>prod</sub> (h)	3,25	1,6	6,3	3,3
Endkonzentration Produkt P <sub>final</sub> (mM)	1,9	6,8	170	10,4*
Max Enzymaktivität (μmol min <sup>-1</sup> g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> )	16	3250	449	0,027
Produktivität eines Ansatzes Q <sub>P</sub> (mmol h <sup>-1</sup> )	0,33	1,6	12,3	1,2**
Produktivität eines Reaktors Q <sub>P,R</sub> (mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,2	1,03	12,3	1,2***

\* Angabe in μM; \*\* Angabe μmol h<sup>-1</sup>; \*\*\*Angabe μmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

Im Gegensatz zu den Versuchen zur Biokatalyse von Propylen zu Propylenoxid zeigte der Rührkesselreaktor bei der Selektivoxidation von Benzol zu Phenol eine deutlich höhere Produktivität als der DMBR. Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass das leicht-flüchtige Benzol, bedingt durch die offene Betriebsweise, leichter aus dem DMBR entweichen konnte. Im Vergleich zum Rührkesselreaktor kann beim Betrieb des DMBR die Abluft, wegen der kontinuierlichen Sauerstoffzufuhr, nicht verschlossen werden (genauere Beschreibung in Kap. 4.8.3 und Kap. 4.8.4). Zudem besitzen die Membranen eine große Oberfläche an welche die geringen Produktmengen adsorbieren können. Es ist denkbar, dass das ent-

standene Phenol dadurch nicht vollständig durch das Echtzeit-Membraneinlassmassenspektrometer detektiert werden konnte. Nicht zuletzt aufgrund der verringerten Eduktkonzentration bei den Versuchen von Benzol zu Phenol im DMBR, sind diese Ergebnisse nur eingeschränkt mit den Versuchen im Rührkesselreaktor vergleichbar. Erstrebenswert wäre es eine kontinuierliche Benzolversorgung zu integrieren, um zukünftig eine deutlich effektivere Selektivoxidation zu erreichen. Zusammenfassend scheint der DMBR eine vielversprechende Alternative zum konventionellen RK zu sein. Durch eine kontinuierliche Zugabe von Sauerstoff kann eine deutlich höhere Enzymaktivität erzielt werden.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Verfahren zur Produktion des Ganzzellbiokatalysators *M. trichosporium* OB3b bereit zu stellen, sowie jeweils einen Prozess zur anschließenden biokatalytischen Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid und zur Oxidation von Benzol zu Phenol ohne Bildung von umweltbelastenden Nebenprodukten zu entwickeln.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde zunächst ein Fermentationsprozess für den Organismus *M. trichosporium* OB3b in einem klassischen Rührkesselreaktor, in einem eigens zur Gasfermentation entwickelten Doppelmembranbioreaktor (DMBR) sowie in membranbasierten HDC10-Inkubatoren der Firma CellDEG, entwickelt. Dabei konnten geeignete Betriebsparameter zur Kultivierung in den genannten Bioreaktortypen ermittelt werden. Es erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zudem erstmals die Aufzeichnung von Wachstumskinetiken von *M. trichosporium* OB3b in Membranbioreaktoren, welche eine blasenfreie Begasung der Kultur mit den gasförmigen Substraten Methan sowie Sauerstoff ermöglichen. Dadurch Vermeidung einer potentiell explosiven Gasmischung sicherheitstechnische Vorteile gegenüber konventionellen Rührkesselreaktoren bieten.

Die maximale erreichte Biomassekonzentration lag unter den untersuchten Kultivierungsbedingungen in den eingesetzten Membranreaktoren bei  $0,84 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1}$  (DMBR) bzw. bei  $0,79 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  (HDC10 Inkubator) und somit deutlich unterhalb der maximalen Konzentration im Rührkesselreaktor ( $15,3 \pm 1,7 \text{ g L}^{-1}$ ). Wenngleich hinsichtlich der Biomassekonzentration somit auch im neu entwickelten Membranbioreaktor noch ein erheblicher Optimierungsbedarf besteht, war der notwendige Leistungseintrag mit 1000 bis  $3000 \text{ W/m}^3$  unter den getesteten Bedingungen gegenüber dem Rührkesselreaktor vergleichsweise gering. Wesentliche Ansatzpunkte für eine Weiterentwicklung könnten eine Vergrößerung der Membranfläche des DMBR und die Optimierung der Fermentationsparameter, wie z.B. die Pumpgeschwindigkeit oder der Druck auf die Membran darstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der DMBR aufgrund der Möglichkeit zur getrennten Gaszufuhr ein vielversprechendes Reaktorsystem sowohl im Hinblick auf die Fermentation von MOB als auch für die Ganzzellbiokatalyse gasförmiger und flüssiger Substrate darstellt. Im Hinblick auf die Fermentation von *M. trichosporium* OB3b können zukünftig essentielle Parameter wie z.B. die Fließgeschwindigkeit des Mediums durch den Reaktor oder der Gasdruck auf die Membran optimiert werden.

Eine konstruktive Maßnahme zur Verbesserung der Substratverfügbarkeit wäre beispielsweise die Erhöhung des Verhältnisses von Membranoberfläche zum Volumen der flüssigen Phase.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Lag-Phase während der Fermentation von *M. trichosporium* OB3b durch eine Zugabe von zusätzlichem CO<sub>2</sub> verkürzt werden kann. Die Zugabe von CO<sub>2</sub> gegen Ende der Fermentation zeigte hingegen keinen wesentlichen Einfluss auf die Wachstumskinetik. Die Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass Biogas – ein Gemisch aus Kohlenstoffdioxid und Methan – als Substratquelle für die Fermentation von *M. trichosporium* OB3b geeignet ist. Der Einsatz von Biogas als Substrat zur fermentativen Herstellung des Ganzzellbiokatalysators und zur enzymatischen Oxidation von Plattformchemikalien könnte somit zukünftig eine interessante alternative Wertschöpfungsmöglichkeit gegenüber der konventionellen energetischen Nutzung dieses Gasgemisches darstellen. Speziell im Hinblick auf den derzeitigen Rückgang der Anzahl der Biogasanlagen in Deutschland bedingt durch den Wegfall von Subventionen durch das neu geschaffene EEG könnte die enzymatische Synthese von Plattformchemikalien auf Basis von Biogas zukünftig unter bioökonomischen Gesichtspunkten an Bedeutung gewinnen. Es war daher im Anschluss an die Etablierung eines geeigneten Fermentationsprozesses zur Erzeugung von *M. trichosporium* OB3b Biomasse ein weiteres wesentliches Ziel dieser Arbeit, einen Prozess zur semi-kontinuierlichen Ganzzellbiokatalyse von Benzol zu Phenol und Propylen zu Propylenoxid unter Verwendung von MMO zu entwickeln.

Für eine mehrfache sequenzielle Ganzzellbiokatalyse mussten zunächst grundlegende essenzielle Prozessparameter, wie die jeweilige kritische Konzentration (Toxizität) für Propylenoxid und Benzol, eine geeignete Biomassekonzentration zur Durchführung der Biokatalyse, die maximal mögliche Dauer der Oxidationsreaktion sowie Möglichkeiten zur Regeneration des Biokatalysators ermittelt werden. Bislang waren lediglich einige wenige Prozessparameter wie z.B. die Oxidations- und Regenerationsparameter für die Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit einer Regeneration des Ganzzellbiokatalysators in der Literatur beschrieben (Hill et al., 1990; Hou, 1984). Im Hinblick auf die Ganzzellbiokatalyse von Benzol zu Phenol mit *M. trichosporium* OB3b war bisher lediglich die prinzipielle Machbarkeit gezeigt worden (Burrows et al., 1984; Dalton et al., 1986; Hall, 1983; Higgins et al., 1981; Hyman et al., 1985).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl Propylenoxid als auch Phenol bei kurzzeitiger Exposition bis zu einer Konzentration von jeweils 100 mM bzw. 30 mM keine inhibitorischen Effekte auf das Wachstum von *M. trichosporium* OB3b aufweisen. Für Propylenoxid sind dies deutlich höhere Konzentrationen als in bisher beschriebenen Untersuchungen (Richards et al.,

1994). Nach Kenntnisstand der Autorin wurden bislang keine Untersuchungen zur Ermittlung der toxischen Phenolkonzentrationen für *M. trichosporium* OB3b veröffentlicht.

Bei einer 30-minütigen Exposition des Organismus mit den Produkten zeigten jedoch bereits geringere Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die Wachstumskinetik. Im Hinblick auf einen kontinuierlichen Prozess zur Biokatalyse beider Substanzen mit *M. trichosporium* OB3b bedeutet dies, dass Propylenoxid und Phenol nach einer Expositionsdauer von maximal 30 min ab einer Konzentration von 100 mM bzw. 30 mM aus dem Reaktionsmedium entfernt werden sollten, um einer Verringerung der Enzymaktivität des Ganzzellbiokatalysators entgegenzuwirken.

Neben der kritischen Substrat- und Produktkonzentration stellt die für die Ganzzellbiokatalyse verwendete Biomassekonzentration einen entscheidenden Prozessparameter dar. Bei einer zu geringen Biokatalysatormenge wird nur wenig Produkt gebildet. Ist die Biomassekonzentration hingegen zu hoch, können limitierende Effekte – wie z.B. eine Sauerstofflimitierung – auftreten. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Biomassekonzentrationen zur Selektivoxidation von Propylen zu Propylenoxid und Benzol zu Phenol untersucht. Bei den eingesetzten Biomassekonzentrationen von 2,5 g L<sup>-1</sup> bzw. 5 g L<sup>-1</sup> wurden die Reaktionskinetiken der Epoxidationsreaktionen von Propylen zu Propylenoxid in dieser Arbeit erstmals in Echtzeit mittels eines neuartigen Membranmassenspektrometers aufgezeichnet. In diesen Messungen wurden keine limitierenden Effekte beobachtet. Die Enzymaktivität zeigte mit  $39 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ , genau wie die biomassespezifische Produktausbeute mit max. 0,6 mM g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> für beide untersuchten Biomassekonzentrationen keinen signifikanten Unterschied. Bei der Ganzzellbiokatalyse von Benzol zu Phenol hingegen sank die Enzymaktivität bei höheren Biomassekonzentrationen von  $20 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  auf  $16 \pm 0,01 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Dieser Effekt tritt möglicherweise durch sauerstofflimitierende Effekte auf. Damit einhergehend sank auch die biomassespezifische Ausbeute von etwa 0,5 mM g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> auf 0,3 mM g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde für alle weiteren Versuche zur Ganzzellbiokatalyse beider Edukte im größeren Maßstab eine Biomassekonzentration von etwa 3 g L<sup>-1</sup> eingesetzt.

Die Epoxidation von Propylen zu Propylenoxid mit *M. trichosporium* OB3b wurde zunächst als Batch-Prozess in einem 1 L-Rührkesselreaktor durchgeführt und konnte über eine Reaktionsdauer von 195 min bei einer maximalen Enzymaktivität von  $16 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  aufrechterhalten werden. Die Produktkonzentration lag am Ende des Versuchszeitraums bei etwa 1,9 mM Propylenoxid. Analog hierzu wurde bei der Ganzzellbiokatalyse von Benzol zu Phenol

nach einer maximalen Prozessdauer von 100 min eine Produktkonzentration von 6,8 mM erreicht. Die Enzymaktivität lag dabei mit maximal  $3250 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  deutlich höher als bei den Versuchen mit Propylen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte zum einen die bessere Löslichkeit von Benzol im wässrigen Medium und zum anderen die technisch bedingte bessere Sauerstoffversorgung sein. So wurde das Substrat im Fall von Propylen in das flüssige Reaktionsmedium begast, wodurch Sauerstoff ausgetragen wird. Im Fall von Benzol wurde das flüssige Substrat hingegen direkt in das Reaktionsmedium dosiert.

Sowohl die Versuche in Serumflaschen (25 mL) als auch im 1 L-Rührkesselreaktor zeigten, dass eine kontinuierliche Ganzzellbiokatalyse ohne Regeneration des Biokatalysators aufgrund von inhibitorischen Effekten und des Verbrauchs der Cofaktoren für beide Reaktionen nicht praktikabel ist. Daher wurde in dieser Arbeit ein mehrstufiger Prozess mit einer sequenziellen 30 min Oxidationsreaktion und anschließenden Regenerationsintervallen für beide Reaktionen etabliert. In bisherigen Publikationen sind nur sehr wenige Daten hinsichtlich geeigneter Strategien zur Cofaktorregenerierung für *M. trichosporium* OB3b zur Oxidation von Propylen und Benzol zu finden. Deshalb wurden in dieser Arbeit empirische Daten für drei unterschiedlicher Regenerationsstrategien erhoben (Kap. 5.3.5 und 5.3.6.).

Bei der Ganzzellbiokatalyse von Propylen wurde die beste Propylenoxid-Abtrennung bei einer sequenziellen Begasung mit Methan und Sauerstoff in Intervallen von 60 min erzielt (siehe Strategie II). Die absolute Propylenoxid-Konzentrationen gemäß Strategie I – bei 30-minütiger Begasung – und Strategie II unterscheiden sich nur unwesentlich (Strategie II:  $0,23 \pm 0,18 \text{ mM}$ , Strategie II  $0,14 \pm 0,03 \text{ mM}$ ). Die höchste Enzymaktivität von  $329,61 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  wurde nach Zugabe von Formiat (Strategie III, Propylen zu Propylenoxid) erreicht, wobei in diesen Versuchen auch deutlich höhere Propylenkonzentrationen eingesetzt wurden. Mit  $596,37 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$  erreichte auch die Enzymaktivität bei der Oxidation von Benzol zu Phenol gemäß Strategie III den höchsten Wert. Durch die Einführung von sequenziellen Regenerationsintervallen war es möglich bis zu vier Oxidationszyklen auf Basis des eingesetzten Biokatalysators durchzuführen.

Bei den Versuchen zur Ganzzellbiokatalyse von Benzol zu Phenol zeigte sich, dass eine Begasung mit Methan und Luft über eine Dauer von 60 min (Strategie II) dazu genutzt werden kann, das Produkt vollständig aus dem Reaktionsmedium auszutragen. Nachfolgende Oxidationsreaktionen können dadurch ohne Verlust von Enzymaktivität über mehrere Zyklen durchgeführt werden. Bei Zugabe von Formiat zur Cofaktorregeneration konnte das Produkt in der ersten Begasungsphase hingegen nicht ausgetragen werden. Erst in der zweiten Begasungsphase, nach

vollständigem Verbrauch des Formiats, konnte eine Produktabtrennung erfolgen. Im Rahmen aller drei untersuchten Strategien konnten jeweils mehr als 4 mM Phenol über die Gesamtprozessdauer erzeugt werden (Strategie I:  $4,1 \pm 0,45$  mM; Strategie II:  $4,8 \pm 0,2$  mM; Strategie III:  $4 \pm 0,1$  mM).

In einem *Proof of Concept* wurde in dieser Arbeit ferner für das gasförmige Substrat Propylen gezeigt, dass mit der Ganzzellbiokatalyse im DMBR deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich der max. Enzymaktivität wie auch der Produktivität des Reaktors  $Q_{P,R}$  erzielt werden konnten als zuvor im RK (Kap. 5.3.8). Nach dem Kenntnisstand der Autorin konnte in dieser Arbeit auf Basis einer Prozessoptimierung erstmals eine semikontinuierliche Selektivoxidation im 1 L-RK und DMBR für Benzol und Propylen mit dem Ganzzellbiokatalysator *M. trichosporium* OB3b gezeigt werden.

Im Hinblick auf die Selektivoxidation wäre es sowohl im Fall des DMBR als auch des RK vorteilhaft, den Prozess weitestgehend zu automatisieren, sodass beispielsweise die Edukte immer in gleicher Menge zudosiert werden können. Zudem könnten Produkte beim Erreichen einer kritischen Konzentration ausgestrippt und gesammelt werden, um anschließend gezielt Regenerationszyklen einzuleiten. Sowohl Regenerationszeiten als auch die Dauer der Oxidationsreaktion könnten somit dynamisch gestaltet werden. Eine interessante Möglichkeit zur Steuerung eines Oxidationsprozesses kann das in dieser Arbeit erstmals verwendete Echtzeit-Membraneinlass-Massenspektrometer sein, mit dem eine Detektion aller relevanten Substanzen möglich war.

Die Eduktzugabe erfolgte in dieser Arbeit stets im Überschuss und könnte zukünftig ebenfalls geregelt werden. Dies wäre nicht nur im Hinblick auf eine Eduktinhibierung, sondern auch unter ökonomischen Gesichtspunkten vorteilhaft. Nach vollständiger Oxidation des Eduktes könnte über das MIMS beispielsweise direkt ein Regenerationszyklus eingeleitet und dieser anschließend nach vollständiger Abtrennung des Produktes aus dem Reaktionsmedium beendet werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten bilden somit eine zusätzliche Grundlage um die technische Durchführung der untersuchten Prozesstrategien zukünftig durch den Einsatz von Echtzeitanalytik automatisieren zu können. Insbesondere bilden die gewonnenen Erkenntnisse zur mehrstufigen sequentiellen Biokatalyse, der Cofaktorregeneration und auch die in dieser Arbeit untersuchte Echtzeitanalytik flüssiger sowie gasförmiger Edukte und Produkte mittels MS zukünftig die Möglichkeit, das breite Substratspektrum der Methan-Monooxygenase zur Oxidation einer Vielzahl weiterer kurzkettiger Alkane, wie z.B. Ethylen, zu nutzen.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- Acha, V., Alba, J., Thalasso, F., 2002. The absolute requirement for carbon dioxide for aerobic methane oxidation by a methanotrophic-heterotrophic soil community of bacteria. *Biotechnol. Lett.* 24, 675–679.
- Ahmed, T., Semmens, M.J., 1992. Use of sealed end hollow fibers for bubbleless membrane aeration: experimental studies. *J. Membr. Sci.* 69, 1–10. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(92\)80162-D](https://doi.org/10.1016/0376-7388(92)80162-D)
- Anthony, C., 2011. How Half a Century of Research was Required to Understand Bacterial Growth on C1 and C2 Compounds; the Story of the Serine Cycle and the Ethylmalonyl-CoA Pathway. *Sci. Prog.* 94, 109–137. <https://doi.org/10.3184/003685011X13044430633960>
- Anthony, C., 1982. *The biochemistry of methylotrophs*. Academic Press, London ; New York.
- Avdeeva, L.V., Gvozdev, R.I., 2019. Effect of Heavy Metal Salts on Propylene Oxidation by Methanotrophic Bacteria. *Russ. J. Phys. Chem. B* 13, 1020–1025. <https://doi.org/10.1134/S1990793119060022>
- Baerns, M., Behr, A., Brehm, A., Gmehling, J., Hinrichsen, K.-O., Hofmann, H., Onken, U., Palkovits, R., Renken, A., 2014. *Technische Chemie*. John Wiley & Sons.
- Bähr, L., Wüstenberg, A., Ehwald, R., 2016. Two-tier vessel for photoautotrophic high-density cultures. *J. Appl. Phycol.* 28, 783–793. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0614-5>
- Baici, A., 2015. Multiple Interactions: Essential Activation and Liberation, in: Baici, A. (Ed.), *Kinetics of Enzyme-Modifier Interactions: Selected Topics in the Theory and Diagnosis of Inhibition and Activation Mechanisms*. Springer, Vienna, pp. 357–366. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1402-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1402-5_7)
- Baker, R., 2012. *Membrane Technology and Applications*, 3. Edition. ed. Wiley, Chichester, West Sussex ; Hoboken.
- Balasubramanian, R., Smith, S.M., Rawat, S., Yatsunyk, L.A., Stemmler, T.L., Rosenzweig, A.C., 2010. Oxidation of methane by a biological dicopper centre. *Nature* 465, 115–119. <https://doi.org/10.1038/nature08992>
- Balgobin, R., 2012. Bubble-free oxygen and carbon dioxide mass transfer in bioreactors using microporous membranes. *Electron. Thesis Diss. Repos.*

- 
- Basu, P., Katterle, B., Andersson, K.K., Dalton, H., 2003. The membrane-associated form of methane mono-oxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a copper/iron protein. *Biochem. J.* 369, 417–427. <https://doi.org/10.1042/BJ20020823>
- Beeskow-Strauch, B., Schicks, J., Zimmer, M., 2015. Evaluation of CH<sub>4</sub> Gas Permeation Rates through Silicone Membranes and Its Possible Use as CH<sub>4</sub>-Extractor in Gas Hydrate Deposits. *Energies* 8, 5090–5106. <https://doi.org/10.3390/en8065090>
- Bernhard, M., Anton, J., Schmidt, F., Sandkaulen, F., Pascaly, M., 2017. Über den Technologiewandel in der Propylenoxid-Herstellung. *Chem. Unserer Zeit* 51, 198–209. <https://doi.org/10.1002/ciuz.201700764>
- Bowman, J.P., Sayler, G.S., 1994. Optimization and maintenance of soluble methane monooxygenase activity in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biodegradation* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1007/BF00695208>
- Brebeck, G., 2018. Entwicklung und Charakterisierung eines Membranreaktors zur blasenfreien Begasung methanotropher Bakterien. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Bredwell, M.D., Srivastava, P., Worden, R.M., 1999. Reactor Design Issues for Synthesis-Gas Fermentations. *Biotechnol. Prog.* 15, 834–844. <https://doi.org/10.1021/bp990108m>
- Burrows, K.J., Cornish, A., Scott, D., Higgins, I.J., 1984. Substrate Specificities of the Soluble and Particulate Methane Mono-oxygenases of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiology* 130, 3327–3333. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-12-3327>
- CellDEG, 2020. Product Family [WWW Document]. Celldeg. URL <https://celldeg.com/products/product-family/> (accessed 1.14.21).
- Chan, S.I., Chen, K.H.-C., Yu, S.S.-F., Chen, C.-L., Kuo, S.S.-J., 2004. Toward Delineating the Structure and Function of the Particulate Methane Monooxygenase from Methanotrophic Bacteria. *Biochemistry* 43, 4421–4430. <https://doi.org/10.1021/bi0497603>
- Chmiel, H., 2018. Bioprozesstechnik | Horst Chmiel | Springer [WWW Document]. URL <http://www.springer.com/de/book/9783827424761> (accessed 2.14.17).
- Chmiel, H. (Ed.), 2011. Bioprozesstechnik, 3rd ed. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2477-8>
- Colby, J., Stirling, D.I., Dalton, H., 1977. The soluble methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Its ability to oxygenate n-alkanes, n-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds. *Biochem. J.* 165, 395–402.
-

- 
- Dalton, H., 2005. The Leeuwenhoek Lecture 2000 The natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360, 1207–1222. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1657>
- Dalton, H., Colby, J., Stirling, D.I., 1986. Microbiological process for oxidizing organic compounds.
- Davis, K.J., Cornish, A., Higgins, I.J., 1987. Regulation of the Intracellular Location of Methane Mono-oxygenase During Growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b on Methanol. *Microbiology*, 133, 291–298. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-2-291>
- Dedysh, S., Naumoff, D., Vorobev, A., Kyrpides, N., Woyke, T., Shapiro, N., Crombie, A., Murrell, J., Kalyuzhnaya, M., Smirnova, A., Dunfield, P., 2015. Draft Genome Sequence of *Methyloferula stellata* AR4, an Obligate Methanotroph Possessing Only a Soluble Methane Monooxygenase. *Genome Announc.* 3, e01555-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01555-14>
- Dedysh, S.N., Knief, C., 2018. Diversity and Phylogeny of Described Aerobic Methanotrophs, in: Kalyuzhnaya, M.G., Xing, X.-H. (Eds.), *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*. Springer International Publishing, Cham, pp. 17–42. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5_2)
- Degn, H., Cox, R.P., Toftlund, H. (Eds.), 1985. *Gas Enzymology: Proceedings of a Symposium held at Odense University, Denmark, 28–29 May 1984*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5279-9>
- Dehnicke, K., 1996. *Holleman-Wiberg, Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 101. Auflage. Von Nils Wiberg. Walter de Gruyter, Berlin/New York, 1995. 2033 S., geb. 158.00 DM. ISBN 3–11–012641–9. *Angew. Chem.* 108, 2696–2696. <https://doi.org/10.1002/ange.19961082135>
- Dominghaus, D.-I.H., 2013. *Kunststoffe: Eigenschaften und Anwendungen*. Springer-Verlag.
- Duan, C., Luo, M., Xing, X., 2011. High-rate conversion of methane to methanol by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Bioresour. Technol.* 102, 7349–7353. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.096>
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), 2006. *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY.
- Elias, H.-G., 2009. *Makromoleküle: Physikalische Struktur und Eigenschaften*. John Wiley & Sons.
- Ensign, S.A., Hyman, M.R., Arp, D.J., 1992. Cometabolic degradation of chlorinated alkenes by alkene monooxygenase in a propylene-grown *Xanthobacter* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3038–3046. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.9.3038-3046.1992>
-

- Expert market research, 2021. Global Phenol Market to Grow at a CAGR of 5.3% over the Forecast Period of 2021-2026. [WWW Document]. URL <https://www.expertmarket-research.com/pressrelease/global-phenol-market> (accessed 8.16.21).
- Fischer, M., 2020. Letzte Ausfahrt EEG 2021: Biogasbranche erwartet Trendwende [WWW Document]. URL <https://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/de-letzte-ausfahrt-ee-2021-biogasbranche-erwartet-trendwende> (accessed 8.20.21).
- FNR, 2021. FNR - Biogas: Faustzahlen [WWW Document]. URL <https://biogas.fnr.de/daten-und-fakten/faustzahlen> (accessed 8.20.21).
- FNR, 2018. Basisdaten Bioenergie Deutschland 2018 27.
- Fox, B.G., Froland, W.A., Dege, J.E., Lipscomb, J.D., 1989. Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. Purification and properties of a three-component system with high specific activity from a type II methanotroph. *J. Biol. Chem.* 264, 10023–10033.
- Fox, B.G., Froland, W.A., Jollie, D.R., Lipscomb, J.D., 1990. Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Methods Enzymol.* 188, 191–202. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)88033-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)88033-7)
- Gaal, A., Neujahr, H.Y., 1981. Induction of phenol-metabolizing enzymes in *Trichosporon cutaneum*. *Arch. Microbiol.* 130, 54–58. <https://doi.org/10.1007/bf00527072>
- GESTIS-Stoffdatenbank, 2021a. GESTIS-Stoffdatenbank [WWW Document]. Benzol. URL <https://gestis.dguv.de/data?name=010060> (accessed 1.7.21).
- GESTIS-Stoffdatenbank, 2021b. GESTIS-Stoffdatenbank [WWW Document]. Phenol. URL <https://gestis.dguv.de/data?name=010430> (accessed 1.7.21).
- GESTIS-Stoffdatenbank, 2021c. GESTIS-Stoffdatenbank [WWW Document]. Polydimethylsiloxan. URL <https://gestis.dguv.de/data?name=535513> (accessed 1.20.21).
- GESTIS-Stoffdatenbank, 2020a. GESTIS-Stoffdatenbank [WWW Document]. Propylen. URL [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis\\_de/010100.xml?f=templates\\$fn=default-doc.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/010100.xml?f=templates$fn=default-doc.htm$3.0) (accessed 12.4.20).
- GESTIS-Stoffdatenbank, 2020b. GESTIS-Stoffdatenbank [WWW Document]. Propylenoxid. URL [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis\\_de/012010.xml?f=templates\\$fn=default-doc.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/012010.xml?f=templates$fn=default-doc.htm$3.0) (accessed 12.4.20).

- Gilman, A., Laurens, L.M., Puri, A.W., Chu, F., Pienkos, P.T., Lidstrom, M.E., 2015. Bioreactor performance parameters for an industrially-promising methanotroph *Methylobacillus buryatense* 5GB1. *Microb. Cell Factories* 14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0372-8>
- Griethe, A., 2018. Untersuchungen zur biotechnischen Nutzung der löslichen Methan-Monooxygenase aus *Methylosinus trichosporium* OB3b. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Grosse, S., Laramee, L., Wendlandt, K.-D., McDonald, I.R., Miguez, C.B., Kleber, H.-P., 1999. Purification and Characterization of the Soluble Methane Monooxygenase of the Type II Methanotrophic Bacterium *Methylocystis* sp. Strain WI 14. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3929–3935.
- Habets-Crützen, A.Q.H., de Bont, J.A.M., 1985. Inactivation of alkene oxidation by epoxides in alkene- and alkane-grown bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 428–433. <https://doi.org/10.1007/BF00252785>
- Hakemian, A.S., Rosenzweig, A.C., 2007. The Biochemistry of Methane Oxidation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 223–241. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061505.175355>
- Hall, M.C., 1983. Microbiological process for the preparation of hydroquinone. EP0073134A2.
- Hambach, B., 1994. Der Einsatz von Wirbelschichtreaktoren in der Zellkulturtechnik - Beiträge zur Verfahrensentwicklung - JuSER. RWTH Aachen, Jülich.
- Han, B., Su, T., Wu, H., Gou, Z., Xing, X.-H., Jiang, H., Chen, Y., Li, X., Murrell, J.C., 2009. Paraffin oil as a “methane vector” for rapid and high cell density cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 669–677. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1866-2>
- Hanson, R.S., Hanson, T.E., 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439–471.
- Higgins, I.J., Best, D.J., Hammond, R.C., Scott, D., 1981. Methane-oxidizing microorganisms. *Microbiol. Rev.* 45, 556–590.
- Higgins, I.J., Hammond, R.C., Sariaslani, F.S., Best, D., Davies, M.M., Tryhorn, S.E., Taylor, F., 1979. Biotransformation of hydrocarbons and related compounds by whole organism suspensions of methane-grown *Methylosinus trichosporium* OB 3b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 671–677.
- Hill, A.H., Kelley, R.L., Srivastava, V.J., Akin, C.A., Hayes, T.D., Frank, J.R., 1990. Bench-Scale Co-Oxidative Production of Propylene Oxide by Methanotrophs [WWW Document]. 3 Inst. Gas Technol. IGT Annu. Oil Gas Coal Environ. Biotechnol. Symp. New

- Orleans U. S. 3-6 Dec 1990. URL <https://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc1113961/> (accessed 3.21.19).
- Hou, C.T., 1984. Propylene oxide production from propylene by immobilized whole cells of *Methylosinus* sp. CRL 31 in a gas-solid bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 1–4.
- Hwang, S.-T., Tang, T.E.S., Kammermeyer, K., 1971. Transport of dissolved oxygen through silicone rubber membrane. *J. Macromol. Sci. Part B* 5, 1–10.  
<https://doi.org/10.1080/00222347108212517>
- Hyman, M.R., Sansome-Smith, A.W., Shears, J.H., Wood, P.M., 1985. A kinetic study of benzene oxidation to phenol by whole cells of *Nitrosomonas europaea* and evidence for the further oxidation of phenol to hydroquinone. *Arch. Microbiol.* 143, 302–306.  
<https://doi.org/10.1007/BF00411254>
- Jeffrey S. Plotkin, 2021. What's New in Phenol Production? - American Chemical Society [WWW Document]. URL <https://web.archive.org/web/20191027122212/https://www.acs.org/content/acs/en/pressroom/cutting-edge-chemistry/what-s-new-in-phenol-production-.html> (accessed 1.7.21).
- Jordan, S.M., Koros, W.J., 1990. Permeability of pure and mixed gases in silicone rubber at elevated pressures. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 28, 795–809.  
<https://doi.org/10.1002/polb.1990.090280602>
- Kahlich, D., Wiechern, U., Lindner, J., 2011. Propylene Oxide, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. American Cancer Society.  
[https://doi.org/10.1002/14356007.a22\\_239.pub2](https://doi.org/10.1002/14356007.a22_239.pub2)
- Kahlig, A., 2018. Entwicklung eines Fed-Batch-Reaktors zur Analyse und Sensitivitätsbetrachtung von zellfreien Expressionssystemen in vitro, *Berichte aus Forschung und Entwicklung*. Fraunhofer Verlag, Stuttgart.
- Kalyuzhnaya, M.G., Xing, X.-H., 2018. Methane biocatalysis: paving the way to sustainability.
- Khatib, S.J., Oyama, S.T., 2015. Direct Oxidation of Propylene to Propylene Oxide with Molecular Oxygen: A Review. *Catal. Rev.* 57, 306–344.  
<https://doi.org/10.1080/01614940.2015.1041849>
- Kim, B., Park, H., Na, D., Lee, S.Y., 2014. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of phenol from glucose. *Biotechnol. J.* 9, 621–629.  
<https://doi.org/10.1002/biot.201300263>

- Koh, S.-C., Bowman, J.P., Saylor, G.S., 1993. Soluble Methane Monooxygenase Production and Trichloroethylene Degradation by a Type I Methanotroph, *Methylomonas methanica* 68-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 960–967.
- Kommander, M., 2019. Bachelorarbeit: Vergleich eines Rührkesselbioreaktors mit einem neu entwickelten Membranbioreaktor zur Fermentation aerober methanotropher Bakterien, Hochschule Biberach.
- Kraume, M., 2003. *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik: Grundlagen und apparative Umsetzungen*, 2004. Edition. ed. Springer, Berlin.
- Lal, S., 2019. Masterarbeit: Biotransformation of propylene and benzene by *Methylosinus trichosporium* OB3b in stirred tank reactor, Hochschule Biberach.
- Leak, D.J., Dalton, H., 1986. Growth yields of methanotrophs 7.
- Lebrero, R., Hernández, L., Pérez, R., Estrada, J.M., Muñoz, R., 2015. Two-liquid phase partitioning biotrickling filters for methane abatement: Exploring the potential of hydrophobic methanotrophs. *J. Environ. Manage.* 151, 124–131.
- Lichtenberger, S., 2020. Masterarbeit: Influence of regeneration periods on the whole cell biocatalyst *Methylosinus trichosporium* OB3b of benzene and propylene, University of Hohenheim.
- Lieberman, R.L., Rosenzweig, A.C., 2004. Biological Methane Oxidation: Regulation, Biochemistry, and Active Site Structure of Particulate Methane Monooxygenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39, 147–164. <https://doi.org/10.1080/10409230490475507>
- Lieberman, R.L., Shrestha, D.B., Doan, P.E., Hoffman, B.M., Stemmler, T.L., Rosenzweig, A.C., 2003. Purified particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a dimer with both mononuclear copper and a copper-containing cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 3820–3825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0536703100>
- Lin, B., Tao, Y., 2017. Whole-cell biocatalysts by design. *Microb. Cell Factories* 16, 106. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0724-7>
- Lin, Y., Lu, P., Tang, C., Mei, Q., Sandig, G., Rodrigues, A.D., Rushmore, T.H., Shou, M., 2001. Substrate Inhibition Kinetics for Cytochrome P450-Catalyzed Reactions. *Drug Metab. Dispos.* 29, 368–374.
- Maier, L., 2017. Bachelorarbeit: Charakterisierung eines Membranreaktors für die Kultivierung methanotropher Bakterien, Universität Stuttgart.

- Markets and Markets, 2021. Propylene Oxide Market Global Forecast to 2026 | MarketsandMarkets [WWW Document]. URL <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/propylene-oxide-market-55659975.html> (accessed 8.16.21).
- Matsen, J.B., Yang, S., Stein, L.Y., Beck, D.A.C., Kalyuzhanaya, M.G., 2013. Global Molecular Analyses of Methane Metabolism in Methanotrophic Alphaproteobacterium, *Methylosinus trichosporium* OB3b. Part I: Transcriptomic Study. *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00040>
- Mehta, P.K., Ghose, T.K., Mishra, S., 1991. Methanol biosynthesis by covalently immobilized cells of *Methylosinus trichosporium*: Batch and continuous studies. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 551–556. <https://doi.org/10.1002/bit.260370609>
- Melin, T., Rautenbach, R. (Eds.), 2007. Modellierung des Stofftransportes in Membranen, in: *Membranverfahren: Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*, VDI-Buch. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 71–115. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34328-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34328-8_3)
- Merkx, M., Kopp, D.A., Sazinsky, M.H., Blazyk, J.L., Müller, J., Lippard, S.J., 2001. Dioxygen Activation and Methane Hydroxylation by Soluble Methane Monooxygenase: A Tale of Two Irons and Three Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2782–2807. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010803\)40:15<2782::AID-ANIE2782>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010803)40:15<2782::AID-ANIE2782>3.0.CO;2-P)
- Michałowicz, J., Duda, W., 2007. Phenols – Sources and Toxicity. *Pol. J. Environ. Stud.* 16, 347–362.
- Moonen, M.J.H., 2005. Novel oxygenases acting on phenolic compounds.
- Mühlemeier, I.M., Speight, R., Strong, P.J., 2018. Biogas, Bioreactors and Bacterial Methane Oxidation, in: Kalyuzhnaya, M.G., Xing, X.-H. (Eds.), *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*. Springer International Publishing, Cham, pp. 213–235. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5_14)
- Munasinghe, P.C., Khanal, S.K., 2011. Chapter 4 - Biomass-derived Syngas Fermentation into Biofuels, in: Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S.C., Dussap, C.-G., Gnansounou, E. (Eds.), *Biofuels*. Academic Press, Amsterdam, pp. 79–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00004-8>
- Nazaries, L., Murrell, J.C., Millard, P., Baggs, L., Singh, B.K., 2013. Methane, microbes and models: fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. *Environ. Microbiol.* 15, 2395–2417. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12149>
- Nienow, A.W., Lilly, M.D., 1979. Power drawn by multiple impellers in sparged agitated vessels. *Biotechnol. Bioeng.* 21, 2341–2345. <https://doi.org/10.1002/bit.260211214>

- 
- Oldenhuis, R., Vink, R.L., Janssen, D.B., Witholt, B., 1989. Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2819–2826.
- Park, S., Brown, K.W., Thomas, J.C., 2002. The effect of various environmental and design parameters on methane oxidation in a model biofilter. *Waste Manag. Res.* 20, 434–444. <https://doi.org/10.1177/0734242X0202000507>
- Park, S., Hanna, L., Taylor, R.T., Droege, M.W., 1991. Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. I: Production of soluble methane monooxygenase. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 423–433. <https://doi.org/10.1002/bit.260380412>
- Park, S., Shah, N.N., Taylor, R.T., Droege, M.W., 1992. Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b: II. Production of particulate methane monooxygenase. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 151–157. <https://doi.org/10.1002/bit.260400121>
- Patel, S.K.S., Selvaraj, C., Mardina, P., Jeong, J.-H., Kalia, V.C., Kang, Y.C., Lee, J.-K., 2016. Enhancement of methanol production from synthetic gas mixture by *Methylosinus sporium* through covalent immobilization. *Appl. Energy* 171, 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.03.022>
- Pen, N., Soussan, L., Belleville, M.-P., Sanchez, J., Charmette, C., Paolucci-Jeanjean, D., 2014. An innovative membrane bioreactor for methane biohydroxylation. *Bioresour. Technol.* 174, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.001>
- Petersen, L.A.H., Villadsen, J., Jørgensen, S.B., Gernaey, K.V., 2017. Mixing and mass transfer in a pilot scale U-loop bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 344–354. <https://doi.org/10.1002/bit.26084>
- Protein Data Bank, R.P.D., 2020. RCSB PDB - 6VK8: Crystal Structure of *Methylosinus trichosporium* OB3b Soluble Methane Monooxygenase Hydroxylase and Regulatory Component Complex with small organic carboxylate at active center [WWW Document]. URL <https://www.rcsb.org/structure/6VK8> (accessed 11.27.20).
- Proteine Data Bank, R.P.D., 2020. RCSB PDB - 3CHX: Crystal structure of *Methylosinus trichosporium* OB3b particulate methane monooxygenase (pMMO) [WWW Document]. Proteine Data Bank PDB. URL <https://www.rcsb.org/structure/3CHX> (accessed 11.27.20).
- Richards, A.O., Stanley, S.H., Suzuki, M., Dalton, H., 1994. The Biotransformation of Propylene to Propylene Oxide by *Methylococcus capsulatus* (Bath): 3. Reactivation of Inactivated Whole Cells to Give a High Productivity System. *Biocatal. Biotransformation* 8, 253–267. <https://doi.org/10.3109/10242429408998210>
- Rincón Rincón, L., 2017. Masterarbeit: Hydroxylierung von Benzen durch *Methylosinus trichosporium* OB3b, Universität Stuttgart.
-

- 
- Robb, W.L., 1968. Thin Silicone Membranes-Their Permeation Properties and Some Applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 146, 119–137. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1968.tb20277.x>
- Ross, M.O., Rosenzweig, A.C., 2017. A tale of two methane monooxygenases. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 22, 307–319. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1419-y>
- Schmidt, R.J., 2005. Industrial catalytic processes—phenol production. *Appl. Catal. Gen., Industrial Catalytic Processes* 280, 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2004.08.030>
- Scott, D., Brannan, J., Higgins, I.J., 1981. The Effect of Growth Conditions on Intracytoplasmic Membranes and Methane Mono-oxygenase Activities in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiology* 125, 63–72. <https://doi.org/10.1099/00221287-125-1-63>
- Semrau, J.D., DiSpirito, A.A., Yoon, S., 2010. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 496–531. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x>
- Sheets, J.P., Ge, X., Li, Y.-F., Yu, Z., Li, Y., 2016. Biological conversion of biogas to methanol using methanotrophs isolated from solid-state anaerobic digestate. *Bioresour. Technol.* 201, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.035>
- Shiemke, A.K., Cook, S.A., Miley, T., Singleton, P., 1995. Detergent Solubilization of Membrane-Bound Methane Monooxygenase Requires Plastoquinol Analogs as Electron Donors. *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 421–428. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1413>
- Shimomura, T., Suda, F., Uchiyama, H., Yagi, O., 1997. Biodegradation of trichloroethylene by *Methylocystis* sp. strain M immobilized in gel beads in a fluidized-bed bioreactor. *Water Res.* 31, 2383–2386.
- Sivic, E., 2020. Masterarbeit: Optimization of a membrane bioreactor for the bubble-free aeration with *Methylosinus trichosporium* OB3b, University of Stuttgart.
- Sivic, E., 2016. Bachelorarbeit: Sauerstoffdiffusion durch dichte Membranen zur biotechnologischen Anwendung, Universität Stuttgart.
- Stanley, S.H., Dalton, H., 1992. The Biotransformation of Propylene to Propylene Oxide by *Methylococcus Capsulatus* (Bath): 1. Optimization of Rates. *Biocatal. Biotransformation* 6, 163–175. <https://doi.org/10.3109/10242429209014893>
- Stanley, S.H., Prior, S.D., Leak, D.J., Dalton, H., 1983. Copper stress underlies the fundamental change in intracellular location of methane mono-oxygenase in methane-oxidizing organisms: Studies in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* 5, 487–492. <https://doi.org/10.1007/BF00132233>
-

- Stanley, S.H., Richards, A.O., Suzuki, M., Dalton, H., 1992. The Biotransformation of Propylene to Propylene Oxide by *Methylococcus Capsulatus* (Bath): 2. A Study of the Biocatalyst Stability. *Biocatal. Biotransformation* 6, 177–190. <https://doi.org/10.3109/10242429209014894>
- Stein, L.Y., Yoon, S., Semrau, J.D., DiSpirito, A.A., Crombie, A., Murrell, J.C., Vuilleumier, S., Kalyuzhnaya, M.G., Camp, H.J.M.O. den, Bringel, F., Bruce, D., Cheng, J.-F., Copeland, A., Goodwin, L., Han, S., Hauser, L., Jetten, M.S.M., Lajus, A., Land, M.L., Lapidus, A., Lucas, S., Médigue, C., Pitluck, S., Woyke, T., Zeytun, A., Klotz, M.G., 2010. Genome Sequence of the Obligate Methanotroph *Methylosinus trichosporium* Strain OB3b. *J. Bacteriol.* 192, 6497–6498. <https://doi.org/10.1128/JB.01144-10>
- Stone, K.A., 2017. A mini review on bioreactor configurations and gas transfer enhancements for biochemical methane conversion. *Biochem. Eng. J.* 10.
- Strong, P.J., Xie, S., Clarke, W.P., 2015. Methane as a Resource: Can the Methanotrophs Add Value? *Environ. Sci. Technol.* 49, 4001–4018. <https://doi.org/10.1021/es504242n>
- Sullivan, J.P., Dickinson, D., Chase, H.A., 1998. Methanotrophs, *Methylosinus trichosporium* OB3b, sMMO, and Their Application to Bioremediation. *Crit. Rev. Microbiol.* 24, 335–373. <https://doi.org/10.1080/10408419891294217>
- Tinberg, C.E., Lippard, S.J., 2011. Dioxygen Activation in Soluble Methane Monooxygenase. *Acc. Chem. Res.* 44, 280–288. <https://doi.org/10.1021/ar1001473>
- Tol, R.S.J., Heintz, R.J., Lammers, P.E.M., 2003. Methane Emission Reduction: An Application of FUND. *Clim. Change* 57, 71–98. <https://doi.org/10.1023/A:1022196517982>
- Tremblay, P., Savard, M.M., Vermette, J., Paquin, R., 2006. Gas permeability, diffusivity and solubility of nitrogen, helium, methane, carbon dioxide and formaldehyde in dense polymeric membranes using a new on-line permeation apparatus. *J. Membr. Sci.* 282, 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.05.030>
- Trotsenko, Y.A., Murrell, J.C., 2008. Metabolic Aspects of Aerobic Obligate Methanotrophy\*, in: *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 183–229. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)00005-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)00005-6)
- Uhl, S., 2019. Masterarbeit: Selectiv oxidation of propylene and benzene by aerobic methanotrophic bacterium *Methylosinus trichosporium* OBeb, Hochschule Biberach.
- Unibio, 2020. U Loop Fermentor [WWW Document]. Unibio. URL <https://www.unibio.dk/technology/u-loop-fermentor/> (accessed 1.13.21).

- 
- Villadsen, J., Nielsen, J., Lidén, G., 2011. *Bioreaction Engineering Principles*. Springer Science & Business Media.
- Wang, W., Liang, A.D., Lippard, S.J., 2015. Coupling Oxygen Consumption with Hydrocarbon Oxidation in Bacterial Multicomponent Monooxygenases [WWW Document]. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00312>
- Weissermel, K., Arpe, H.-J., 2008. *Industrial Organic Chemistry*. John Wiley & Sons.
- Whittenbury, R., Davies, S.L., Davey, J.F., 1970a. Exospores and Cysts Formed by Methane-utilizing Bacteria. *Microbiology*, 61, 219–226. <https://doi.org/10.1099/00221287-61-2-219>
- Whittenbury, R., Phillips, K.C., Wilkinson, J.F., 1970b. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61, 205–218.
- Wierckx, N.J.P., Ballerstedt, H., Bont, J.A.M. de, Wery, J., 2005. Engineering of Solvent-Tolerant *Pseudomonas putida* S12 for Bioproduction of Phenol from Glucose. *Appl Env. Microbiol* 71, 8221–8227. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8221-8227.2005>
- Wilhelm, S., 2008. *Wasseraufbereitung: Chemie und chemische Verfahrenstechnik*, 7th ed, VDI-Buch. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-68887-7>
- Winnacker, K., 2004. *Chemische Technik: Prozesse und Produkte. Neue Technologien*. Wiley-VCH.
- Xin, J.-Y., Cui, J.-R., Chen, J.-B., Li, S.-B., Xia, C.-G., Zhu, L.-M., 2003. Continuous biocatalytic synthesis of epoxypropane using a biofilm reactor. *Process Biochem.* 38, 1739–1746. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00262-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00262-5)
- Xin, J.-Y., Cui, J.-R., Zhu, L.-M., Chen, J.-B., Xia, C.-G., Li, S.-B., 2002. Epoxypropane biosynthesis by *Methylomonas* sp. GYJ3: batch and continuous studies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6.
- Xin, J.-Y., Zhang, Y.-X., Dong, J., Zhou, Q.-Q., Wang, Y., Zhang, X.-D., Xia, C.-G., 2010. Epoxypropane biosynthesis by whole cell suspension of methanol-growth *Methylosinus trichosporium* IMV 3011. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 701–708. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0225-x>
- Xing, X.-H., Wu, H., Luo, M.-F., Wang, B.-P., 2006. Effects of organic chemicals on growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochem. Eng. J.* 31, 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.06.001>
- Yaws, C.L., Braker, W., 2001. *Matheson Gas Data Book*. McGraw Hill Professional.
-

- Yazdian, F., Shojaosadati, S.A., Nosrati, M., 2012. Mixing Studies in Loop Bioreactors for Production of Biomass from Natural Gas. *Iran J Chem Chem Eng Vol* 31.
- Yoo, Y.-S., Han, J.-S., Ahn, C.-M., Kim, C.-G., 2015. Comparative enzyme inhibitive methanol production by *Methylosinus sporium* from simulated biogas. *Environ. Technol.* 36, 983–991. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.971059>
- Yu, S.S.-F., Chen, K.H.-C., Tseng, M.Y.-H., Wang, Y.-S., Tseng, C.-F., Chen, Y.-J., Huang, D.-S., Chan, S.I., 2003. Production of High-Quality Particulate Methane Monooxygenase in High Yields from *Methylococcus capsulatus* (Bath) with a Hollow-Fiber Membrane Bioreactor. *J. Bacteriol.* 185, 5915–5924. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.5915-5924.2003>
- Zahn, J.A., DiSpirito, A.A., 1996. Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Bacteriol.* 178, 1018–1029. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1018-1029.1996>
- Zhang, W., Ge, X., Li, Y.-F., Yu, Z., Li, Y., 2016. Isolation of a methanotroph from a hydrogen sulfide-rich anaerobic digester for methanol production from biogas. *Process Biochem.* 51, 838–844. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.003>

## 8 Anhang

### 8.1 Materialien und Methoden

#### 8.1.1 Geräteliste

Tabelle 21: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Model	Hersteller
<b>Analysenwaage</b>	Entris 224L-18	Sartorius, Göttingen, DE
<b>Autoklav</b>	Fedegari FVS 3	Ibs Tecnomara, Fernwald, DE
<b>Echtzeit- Membraneinlassmassenspektrometer</b>	Prototyp	Variolytics GmbH
<b>Feldemissions-Raster-elektronenmikroskop</b>	LEO 1530 VP	Zeiss, DE
<b>Fließinjektionsanalysator</b>	QuickChem 8500	Lachat Instruments, Milwaukee, USA
<b>Gasmischgerät</b>	GMS_3CH	QCal GmbH
<b>GC</b>	Mikro-GC 490	Agilent Technologie
<b>HPLC</b>	HPLC	Perkin Elmer
<b>Membranreaktor</b>	HDC10-Inkubator	CellDEG GmbH
<b>Inkubator</b>	INCU-Line	VWR International, DE
<b>Magnetrührer</b>	IKA RCT standard	Lab Logistics Group, Meckenheim, DE
<b>Mikrozentrifuge</b>	Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<b>Orbitalschüttler</b>	KS 4000i control	IKA Works Inc.
<b>Reinstwasseranlage</b>	Aquintus	MembraPure, Henningsdorf, Berlin
<b>Rührkesselreaktor</b>	DasGip	Eppendorf
<b>Spektrophotometer</b>	U-2900	Hitachi High-Technologies Corporation
<b>Photometer</b>	High-Range-Transmission-Turbidity-Sensor	CellDEG GmbH

## ANHANG

Gerät	Model	Hersteller
<b>Spritzen</b>	Sterile Einmalspritzen 3 mL	Henke Sass Wolf
<b>Sterilfilter</b>	Midisart 2000	Satorius stedim
<b>Sterile Einmalnadeln</b>	Einmalnadeln 23G	Henke Sass Wolf
<b>Thermoschüttler</b>	MHR 11	DITABIS, Pforzheim, DE
<b>Trockenschrank</b>	UF 750 plus	Memmert, Schwabach, DE
<b>Vakuumpumpe</b>	MZ 2C	VACUUBRAND, Wertheim, DE
<b>Vortex-Mischer</b>	7-2020	NeoLab Migge, Heidelberg, DE
<b>Waage</b>	FCB 6k0.02B	Kern und Sohn GmbH, Balingen, DE
<b>Zentrifuge</b>	Pico 17	Heraeus, Hanau, DE
<b>Zentrifuge</b>	Heraeus Multifuge 1 S-R	Thermo Fisher Scientific, USA

### 8.1.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 22: Liste der verwendeten Chemikalien

Name	Summenformel	Hersteller
<b>Aceton (z. A.)</b>	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	Th. Geyer, DE
<b>Acetylchlorid (z. A.)</b>	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> ClO	Merck, Darmstadt, DE
<b>Ammoniumhydrogencarbonat</b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	VWR International, Ohio, USA
<b>Biotin (reinst)</b>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	AppliChem, Darmstadt, DE
<b>Borsäure (z. A.)</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Merck-Millipore, DE
<b>Butylhydroxytoluol (reinst)</b>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<b>Calciumchlorid-Dihydrat (reinst)</b>	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	VWR International, DE
<b>Cobalt(III)-chlorid-Hexahydrat (z. A.)</b>	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	Merck-Millipore, DE
<b>Cobalt(II)-nitrat-Hexahydrat (z. A.)</b>	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Merck-Millipore, DE
<b>Dimethylsulfoxid</b>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Merck-Schuchardt, DE
<b>Di-Kaliumhydrogenphosphat (reinst)</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	neoLab Migge, Heidelberg, DE

ANHANG

Name	Summenformel	Hersteller
<b>Eisen(III)-citrat-Hydrat (reinst)</b>	$C_6H_5FeO_7 \cdot H_2O$	Applichem, Darmstadt, DE
<b>Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat</b>	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck-Millipore, DE
<b>Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat</b>	$Cl_3Fe \cdot 6H_2O$	Merck-Millipore, DE
<b>Eisessig</b>	$C_2H_4O_2$	VWR International, DE
<b>Ethanol (z. A.)</b>	$C_2H_5OH$	Merck-Millipore, DE
<b>Kalium-Dihydrogenphosphat (reinst)</b>	$H_2KO_4P$	neoLab Migge, DE
<b>Kaliumhydroxid (z. A.)</b>	KOH	Merck-Millipore, DE
<b>Kaliumnitrat (rein)</b>	$KNO_3$	AppliChem, DE
<b>Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (reinst)</b>	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	Merck-Millipore, DE
<b>Magnesiumchlorid-Hexahydrat (reinst)</b>	$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	Häberle Labortechnik, Lonsee Ettlenschieß, DE
<b>Magnesiumsulfat-Heptahydrat (reinst)</b>	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Carl Roth, DE
<b>Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat (reinst)</b>	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	Merck-Millipore, DE
<b>Methanol (z. A.)</b>	$CH_3OH$	Carl Roth, DE
<b>Natriumacetat</b>	$C_2H_3NaO_2$	Merck-Millipore, DE
<b>Natriumhydrogencarbonat</b>	$NaHCO_3$	Carl Roth, DE
<b>Natriumhydroxid (z. A.)</b>	NaOH	Merck-Millipore, DE
<b>Natriummolybdat-Dihydrat (z. A.)</b>	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	Merck-Millipore, DE
<b>Methyl-Tridecanoat (z. A.)</b>	$CH_3(CH_2)_{11}COOCH_3$	Merck-Millipore, DE
<b>Methylpentadecanoat</b>	$CH_3(CH_2)_{13}CO_2CH_3$	Sigma-Aldrich, USA
<b>Wasserstoffperoxid (technisch)</b>	$H_2O_2$	Th. Geyer, DE
<b>Zinksulfat-Heptahydrat (rein)</b>	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	Merck-Millipore, DE

### 8.1.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 23: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Spezifikation	Hersteller
<b>Bördelkappe</b>	11 mm, Aluminium mit Naturkautschuk-Septum	Altmann Analytik, München, DE
<b>Filterpapier</b>	MN 85/70, Glasfaser, d: 0,55 mm	Macherey-Nagel, Düren, DE
<b>Filter (PTFE)</b>	N1690-64	BOLA, DE
<b>Glasgefäß</b>	1,5 mL, Braunglas 1,5 mL, Klarglas	Altmann Analytik, München, DE
<b>Halb-Mikro-Küvette</b>	10 x 4 x 45 mL, Polystyrol	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Kanüle</b>	0,8 x 50 mm, Rostfreier Stahl	Henke-Sass Wolf, Tuttlingen, DE
<b>Reaktionsgefäße</b>	1,5 mL, Polypropylen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
<b>Reaktionsgläser</b>	Pyrex 612-20, 20 x 200 mm	Thermo Fischer Scientific
<b>Spritzen</b>	20 mL, PP	Henke-Sass Wolf
<b>Spritzenvorsatzfilter</b>	Minisart NML, Celluloseacetat, d: 0,2 µm Puradisc FP 30, Celluloseacetat, d: 0,2µm	Sartorius, Göttingen, DE VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
<b>Sterilfilter</b>	Midisart 2000 PTFE, d <sub>p</sub> : 0,2 µm Satobran P Midi Caps, d <sub>p</sub> : 0,2 µm	Sartorius, Göttingen, DE
<b>Pipettenspitzen</b>	5000 µL, Polypropylen 1250 µL, Polypropylen 200 µL, Polypropylen	Th. Geyer, Renningen, DE
<b>Probenröhrchen</b>	2 mL, Polypropylen	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, DE
<b>Glaskugeln</b>	Zirkonia/Glas, d: 0,5 mm	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<b>Zentrifugenröhrchen</b>	15 mL, Polypropylen 50 mL, Polypropylen	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA

### 8.1.4 Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums

Tabelle 24: Komponenten für die Zusammensetzung des NMS-Mediums.

Lösung	Chemikalie	Menge [mM]
<b>#1 (2x NMS)</b>	NaNO <sub>2</sub>	20
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	30
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,096
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Zur Regulation von pH 6.7
<b>#2 (100x Mg<sup>2+</sup>)</b>	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	165
<b>#3 (100x HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</b>	NaHCO <sub>3</sub>	600
<b>#4 (100x Fe<sup>2+</sup>)</b>	FeC <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	5
<b>#5 (500x Spurenelemente)</b>	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1
	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,80
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,198
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,20
	KI	0,5
<b>#6 (1000x Cu<sup>2+</sup>)</b>	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,08

Tabelle 25: Zusammensetzung des NMS-Mediums

Lösung	Menge für 1 L
<b>#1</b>	500 mL
<b>#2</b>	10 mL
<b>#3</b>	10 mL
<b>#4</b>	10 mL
<b>#5</b>	2 mL
<b>#6</b>	1 mL
<b>MiliQ-Wasser</b>	167 mL (für pMMO), 168 mL (für sMMO)