



FORSCHUNGSBERICHT

Prozessintegrierte Modifikation des Biopolymers Polyhydroxybutyrat (PHB)

ModiBioPol

Stephanie Stute, Marco Lederer, Felix Berthold, Oliver Tröppner, Sophia Botsch, Philipp Wohlfahrt, Benjamin Baudrit, Thomas Hochrein, Martin Bastian

Bildung & Forschung

SKZ – Das Kunststoff-Zentrum

Danksagung

Das Vorhaben 22319 N der Forschungsvereinigung Fördergemeinschaft für das Süddeutsche Kunststoff-Zentrum e.V. (FSKZ) wurde über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" (AiF) im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Gefördert durch:



Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Unser Dank gilt weiterhin den Projektbegleitern sowie der AiF und dem DLR für deren Unterstützung.

Kurzfassung

Primäres Ziel des Forschungsvorhabens war die Weiterentwicklung und Anwendung des an der Technischen Hochschule Nürnberg (THN) entwickelten kontinuierlichen Prozesses für die Herstellung von Polyhydroxybutyrat (PHB) mit definierten und engverteilten mittleren Molmassen. Bisher ist weder in der Literatur und Patenten vermerkt noch in der Polyhydroxyalkanoat (PHA) -Community ein Verfahren oder laufende Arbeiten bekannt, in denen die Fermentation so gezielt gesteuert werden kann, dass eine "Wunsch-Molmasse" reproduzierbar erzielt wird. Im Fokus des Projekts steht hinsichtlich der Steuerung der Molmassen die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Verweilzeit unter steady-state Bedingungen in einer kontinuierlich betriebenen Reaktorkaskade und der resultierenden mittleren Molmassen bzw. der Molmassenverteilung. Dies wurden in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Hochproduktive, kontinuierliche Prozesse werden in der fermentativen Biopolymerherstellung noch kaum eingesetzt, zudem ist die gezielte Herstellung von PHB mit gewünschten Materialeigenschaften bisher nicht beschrieben. Verfügbares Wissen zu diesen Aspekten wird den breiteren Einsatz von PHA beschleunigen. Zudem wurde die Modifikation der Materialeigenschaften kommerziell erhältlichen PHB durch das Blenden mit Polyvinylacetat (PVAc) über einen Direktextrusionsprozess durchgeführt. Um die definierten Forschungsziele zu erreichen, erfolgte die Aufteilung der einzelnen Tätigkeiten auf insgesamt acht Arbeitspakete. Zunächst die notwendigen Rohstoffe und Geräte beschafft sowie sämtliche Projektschritte in Abstimmung mit dem projektbegleitenden Ausschuss koordiniert. In den darauffolgenden Arbeitspaketen erfolgten die Etablierung und Evaluierung eines kontinuierlichen Biosyntheseverfahrens über einen Zeitraum von mindestens 1000 Stunden. Parallel dazu wurde ein kontinuierliches Aufarbeitungsverfahren für die erzeugten Polymere entwickelt, das sowohl ökologische als auch ökonomische Gesichtspunkte berücksichtigt. Diese Schritte sollten die Grundlage für die in den folgenden Arbeitspaketen durchgeführten Untersuchungen zur gezielten Steuerung der Molekülmasse - insbesondere durch Variation der Nährmedium Zusammensetzung sowie Anpassung der Verweilzeit im Reaktor bilden. Zur Charakterisierung der Polymere wurden die Materialeigenschaften der synthetisierten Polymere umfassend quantifiziert. Zur ganzheitlichen Bewertung des kontinuierlichen Biosyntheseverfahrens wurde schließlich eine techno-ökonomische Analyse (TEA) sowie eine Lebenszyklusanalyse (LCA) durchgeführt. Beide Analysen basierten auf den im Projekt gewonnenen Prozessdaten und erlaubten eine fundierte Einschätzung des ökologischen und ökonomischen Impacts.

Abstract

The primary objective of the research project was the further development and application of the continuous process for the production of polyhydroxybutyrate (PHB) with defined and narrowly distributed average molar masses, developed at the Technische Hochschule Nürnberg (THN). To date, there is no mention in the literature or patents, nor is there any known method or ongoing work within the polyhydroxyalkanoate (PHA) community, in which fermentation can be controlled in such a targeted manner that a "desired molar mass" can be reproducibly achieved.

The focus of the project, in terms of controlling molar masses, was to investigate the relationship between residence time under steady-state conditions in a continuously operated reactor cascade and the resulting average molar masses or molar mass distribution. This relationship has not been described in the literature so far. Highly productive, continuous processes are still rarely used in fermentative biopolymer production, and the targeted production of PHB with desired material properties has not yet been described. Available knowledge on these aspects will accelerate the broader application of PHAs.

In addition, the modification of the material properties of commercially available PHB was carried out by blending it with polyvinyl acetate (PVAc) through a direct extrusion process.

To achieve the defined research objectives, the individual activities were divided into a total of eight work packages. Initially, the necessary raw materials and equipment were procured, and all project steps were coordinated in consultation with the project advisory committee. In the subsequent work packages, the establishment and evaluation of a continuous biosynthesis process were carried out over a period of at least 1,000 hours. In parallel, a continuous downstream processing method for the produced polymers was developed, taking into account both ecological and economic aspects.

These steps served as the foundation for the investigations into targeted molar mass control conducted in the following work packages—particularly through variation of the nutrient medium composition and adjustment of the residence time in the reactor. To characterize the polymers, the material properties of the synthesized polymers were comprehensively quantified.

For a holistic assessment of the continuous biosynthesis process, a techno-economic analysis (TEA) and a life cycle assessment (LCA) were finally conducted. Both analyses were based on the process data obtained during the project and allowed for a well-founded evaluation of the ecological and economic impact.

Inhaltsverzeichnis						
Inh	altsv	rzeichnis	.I			
Ab	kürzı	ıgsverzeichnisI	II			
Pro	ojekts	eckbriefI	V			
1	Einleitung6					
	1.1	Anlass für Forschungsvorhaben6				
	1.2	Problemstellung7				
	1.3	Zielsetzung9				
2	Stan	der Technik 1	.1			
	2.1	Eigene Vorarbeiten14				
		2.1.1 Eigene Vorarbeiten und Qualifikation (SKZ) 1	4			
		2.1.2 Eigene Vorarbeiten und Qualifikation (Technische Hochschu	le			
	Nür	berg) 14				
3	Lösı	ngsweg zur Erreichung des Forschungsziels 1	.7			
4	Dur	ıgeführte Arbeiten 1	9			
	4.1	Mikrobielle Synthese des PHB im kontinuierlichen Prozess				
		4.1.1 Herstellung von PHB mit konstanter Molmassenverteilung in	m			
	kon	nuierlichen Verfahren	1			
		4.1.2 Prozessintegrierte Steuerung der mittleren Molmasse durc	h			
	Proz	essparameter	2			
		4.1.3 Prozessintegrierte Steuerung der mittleren Molmasse durch d	ie			
	Näh	nedienzusammensetzung2	2			
	4.2	Entwicklung eines Verfahrens zur Extraktion von PHB im				
	Technikumsmaßstab22					
		4.2.1 Extraktion mittels NaClO	3			
		4.2.2 Extraktion mittels Dimethylcarbonat (DMC)2	4			
		4.2.3 Hitzeinaktivierung2	5			
	4.3	Durchführung Materialcharakterisierung26				
		4.3.1 Testmaterial ENMAT Y3000P2	6			

	4.3.2	Bestimmung	der	Scherviskositätsfunktion	mittels
Hochdruckkapillarrheometrie (HKR)2					
	4.3.3	Bestimmung de	r Schmelzefl	ussrate (MFR)	
	4.3.4	Bestimmung	der	Molmassenverteilung	mittels
Ge	lpermeat	ionschromatogra	phie (GPC).		
	4.3.5	Thermogravime	trische Anal	yse (TGA)	
	4.3.6	Dynamische Di	fferenzkalori	metrie (DSC)	
	4.3.7	Bestimmung de	r Abhängigk	eit der Dichte von Druck un	d Temperatur
mi	ttels pvT	-Messung			
	4.3.8	Bestimmung de	r Schmelzev	iskosität mittels Platte-Platte	Rheologie 39
	4.3.9	Herstellung der	r Probekörp	er für die Bestimmung de	er Zug- und
Scl	hlageigei	nschaften			41
	4.3.10	Bestimmung de	r Zugeigenso	haften	
	4.3.11	Bestimmung de	r Kerbschlag	zähigkeit	44
4.4	Unters	uchung der Blend	deigenschaft	en PHB/PVAc	
4.5	Techn	oökonomische Ai	nalyse und Ö	kobilanz	
	4.5.1	Untersuchungsr	ahmen und S	achbilanzen de Ökobilanz	
	4.5.2	Technoökonom	ische Analys	e	
Dis	kussion	der Ergebnisse.			54
5.1	Kontir	uierlichen Ferme	entation		
	5.1.1	Umsetzung des	Langzeitbetr	iebs der Fermentation	54
	5.1.2	Einflüsse der Vo	erweilzeiten	und Nährstoffe	59
5.2	Downs	stream Processing	g und Analyt	ik	60
	5.2.1	Hitzeinaktivieru	ing		60
	5.2.2	Abtrennung der	Zellen von d	ler Fermentationsbrühe	
	5.2.3	Extraktion mit N	Natriumhypo	chlorit	62
	5.2.4	Extraktion mit I	Dimethylcarb	oonat (DMC)	
	5.2.5	Analytik hinsicl	ntlich PHB-F	Reinheit und Molmassen	63
	5.2.6	Bewertung beid	er Extraktion	nsmethoden	71
	5.2.7	Lösemittelrückg	gewinnung		72

5

	5.3	Quantifizierung der Blendeigenschaften PHB/PVAc72		
		5.3.1	Quantifizierung der Viskositätsänderungen mittels MFR.	73
		5.3.2	Quantifizierung der Änderungen der Zugeigenschaften	74
		5.3.3	Quantifizierung der Änderungen der Kerbschlagzähigkeit	
	5.4	Ergebi	nisse der ökobilanziellen Betrachtung	78
		5.4.1	Wirkungsabschätzung	
		5.4.2	Interpretation	
	5.5	Ergebi	nisse der Technoökonomischen Skalierung	83
		5.5.1	Skalierung der kontinuierlichen Fermentation	
		5.5.2	Skalierung des Downstream Processing	
		5.5.3	Gesamtbetrachtung und Interpretation der Skalierung	
6	Zus	ammen	fassung	
	6.1	Kontir	nuierliche Fermentation und Biosynthese des PHB	96
	6.2 Direktextrusion von PHB und PVAc			
6.3 Analysemethoden zur Beurteilung der Materialqualität				97
	6.4	Ökobi	lanzielle Betrachtung	98
	6.5	Techn	oökonomische Analyse	98
	6.6	Weiter	rer Forschungsbedarf	99
7	Abb	oildungs	sverzeichnis	101
8	Literaturverzeichnis			

Abkürzungsverzeichnis

DMC	Dimethylcarbonat		
EtOH	Ethanol		
GWP	Global Warming Potential		
EP	Eutrophierungspotential		
DSP	Downstream Processing		
SW	Solvent Waste		
РНВ	Polyhydroxybutyrat		
TGA	Thermogravimetrische Analyse		
DSC	Dynamische Differenzkalori- metrie		
GPC	Gelpermeationschromatogra- phie		
HKR	Hochdruckkapillarrheometer		
РНА	Polyhydroxyalkanoate		
NaClO	Natriumhypochlorit		
Conti	Kontinuierlicher Prozess		

Projektsteckbrief

Im Forschungsprojekt "Prozessintegrierte Modifikation des Biopolymers Polyhydroxybutyrat (PHB)" (ModiBioPol) lag der Fokus auf der effizienten Herstellung biobasierter und biologisch abbaubarer Thermoplaste aus der Gruppe der Polyhydroxyalkanoate (PHA). Ziel war es, durch eine gezielte Optimierung der Herstellungsbedingungen im Bioreaktor die Effizienz der Produktion zu steigern und die Steuerung der Polymerstruktur hinsichtlich der Molmasse gezielt zu beeinflussen. Dies sollte es erlauben, die Materialeigenschaften präziser vorherzusagen und bedarfsgerecht einzustellen. Ausgehend von einem bestehenden kontinuierlichen Produktionsprozess für Polyhydroxybutyrat (PHB), der Rohglycerin als Kohlenstoffquelle nutzt, wurde zunächst die Medienzusammensetzung optimiert, um die Zellanzahl und damit die Menge der PHA-produzierenden Mikroorganismen zu maximieren. Durch eine Steigerung der Wachstumsrate und eine Erhöhung der Durchflussrate im kontinuierlichen Prozess wurde die Gesamtproduktivität des Verfahrens verbessert. Neben der Prozessoptimierung war ein weiteres Ziel die gezielte Modifikation der Polymereigenschaften. Dies sollte durch die Variation der Verweilzeit im Reaktor, um die Länge der Polymerketten zu steuern, erfolgen. Aufgrund technischer Herausforderungen bei der Prozessführung und der häufig sehr gering ausfallenden PHB-Einlagerung in den Zellen war es nicht möglich im gesetzten Zeitrahmen dieser Fragestellungen abschließend zu untersuchen. Darüber hinaus wurden erfolgreich Strategien zur Aufbereitung und Extraktion des Polymers aus der Biomasse entwickelt, die darauf abzielten, eine häufig auftretende, jedoch unerwünschte Degradation der Polymerkette zu minimieren. Mit dem Ziel das Eigenschafts- und Einsatzspektrum von PHB zu erweitern, wurde mithilfe von Direktextrusionsversuchen zudem Mischungen aus PHB und Polyvinylacetat hergestellt, um die Änderungen der Materialeigenschaften der resultierenden Polymerblends zu quantifizieren. Das Projekt wurde durch eine abschließende technoökonomische Analyse und eine Ökobilanz abgerundet. Es adressierte zentrale gesellschaftspolitische und wirtschaftliche Herausforderungen wie die Verbesserung der Ressourceneffizienz und die Reduzierung von Mikroplastik. ModiBioPol bietet insbesondere kleinen und mittleren Unternehmen (kmU) eine Möglichkeit, in ein zukunftsweisendes und schnell wachsendes Marktsegment einzusteigen und sich durch innovative Verfahren einen deutlichen Wettbewerbsvorteil zu sichern.

AiF/IGF-Projekt Projektnummer: 22319 N

"Prozessintegrierte Modifikation des Biopolymers Polyhydroxybutyrat (PHB)" Dauer: 01.07.2022 – 31.12.2024

Unterstützt durch den projektbegleitenden Ausschuss:

- Novamont S.p.A.
- Biomer
- SWK Innovations GmbH & Co. KG
- Linotech GmbH & Co. KG
- Expinos GmbH
- Carl Weiske GmbH & Co. KG
- Fraunhofer-Institut f
 ür Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen (IMWS)

- Dr. Rimpler GmbH
- e-nema GmbH
- Electrochaea GmbH
- Fritzmeier Umwelttechnik GmbH & Co. KG
- Südzucker AG
- Tecosol GmbH
- UnaveraChemLab
- One.five GmbH
- Bioenergie-Bayern GmbH

1 Einleitung

1.1 Anlass für Forschungsvorhaben

Mit dem Ziel zukünftig auf nachhaltige Kunststoffe für die Produktion essentieller Güter wie Verpackungsmaterialien zurückgreifen zu können, stellt der verstärkte Einsatz von Biopolymeren einen der wichtigsten Lösungsansätze dar [1]. Um der zunehmenden Verknappung primärer und fossiler Ressourcen, dem zunehmenden Ausstoß von Kohlenstoffdioxid sowie dem steigenden weltweiten Abfallaufkommen zu begegnen, müssen diese Biokunststoffe auf nachwachsenden Rohstoffen bzw. deren industriellen Restströme basieren und recyclingfähig bzw. biologisch abbaubar sein. Der Begriff Biokunststoff ist hier differenziert zu betrachten: Biobasierte Kunststoffe müssen nicht zwingend biologisch abbaubar sein (z. B. biobasiertes Polyethylentherephthalat, PET) [2], wohingegen einige wenige konventionelle, erdölbasierte Kunststoffe unter natürlichen Bedingungen tatsächlich auch biologisch zu organischer Materie und Kohlenstoffdioxid abgebaut werden (z. B. Polycaprolacton) [3].

Einer der wenigen Biokunststoffe, die sowohl biobasiert hergestellt werden und unter allen Bedingungen (im Boden, in Süß- und Salzwasser, Heim- und Industriekompostierung, unter anaerober Gärung etc.) biologisch abbaubar sind, ist Polyhydroxybutyrat (kurz PHB), welches zur Gruppe der Polyhydroxyalkanoate (kurz PHA) gehört. PHB bzw. PHA wird von vielen Bakterienarten als Speicherstoff in den Zellen in Form von Granula eingelagert, die bis zu 90 % des Zellgewichts ausmachen [4–6]. PHB und PHB-Derivate sind nahezu farblose Polyester mit thermoplastischen Verhalten, die aufgrund ähnlicher technischer Eigenschaften wie Polypropylen (PP) oder Polyethylen (PE) für viele gängige Verarbeitungsmethoden wie Spritzgießen, Extrusion, Folienblasen etc. geeignet sind.

Biopolymere nehmen derzeit global gesehen einen eher geringen Marktanteil von unter 1 % ein, jedoch ist die Nachfrage in den vergangenen Jahren stetig gestiegen. 2019 betrug die Gesamtproduktion an Biopolymeren weltweit ca. 2 Mio. Tonnen, für 2023 wurde bereits eine jährliche Produktion von 4 Mio. Tonnen verzeichnet [7]. Dies spiegelt sich auch bei PHA wider, hier wird eine Steigerung von 90.000 Tonnen pro Jahr erwartet [1]. Laut Nova Institut wurden 2019 PHB und PHB-Derivate erstmals über die verfügbaren Produktionsmengen nachgefragt, was das wachsende Interesse an diesen Biokunststoffen verdeutlicht.

Basierend auf der aktuellen Datenlage kann davon ausgegangen werden, dass sich die weltweite Produktionskapazität von biobasierten Kunststoffen bis ins Jahr 2028 auf etwa 7,43 Mio. t steigert. Über die Hälfte der produzierten Biopolymere wurde 2019 in Asien hergestellt. In Deutschland und Europa hingegen wird derzeit kaum bzw. nur im Pilotmaßstab produziert (vgl. Tabelle 1). Auch wenn die Marktnachfrage wächst, entstehen im Vergleich zu petrochemischen Kunststoffen noch deutlich höhere Herstellungskosten. Außerdem sind die besonderen Anforderungen an die Material- und Verarbeitungseigenschaften des PHA signifikante Marktzugangsbarrieren [8].

Land	РНА-Тур	Produktionsorganismus	Jahresproduktion Kilotonnen pro Jahr
	PHB, PHBV	Halomonas spp.	
China	PHBHHx	Cupriavidus necator	25 - 35
	РЗНВ4НВ	Escherichia coli	
LICA	РНВННх	Cupriavidus necator	15
USA	РЗНВ4НВ	Escherichia coli	15
Japan	PHBHHx	Cupriavidus necator	5,0
Brazil	РНВ	Bacillus spp.	0,1
Europa	Z. B. PHB, PHBV	Z. B. Alcaligenes latus, Escherichia coli	Pilotmaßstab

Tabelle 1: Weltweite Produktionskapazitäten von Polyhydroxyalkanoaten mit Bezug auf Länder, PHA-Typ, Produktionsorganismus und Jahresproduktion. In Europa gibt es derzeit lediglich Pilotanlagen, daher keine nennenswerte Jahresproduktion [9].

Im Forschungsvorhaben ModiBioPol sollten die biobasierten und biologisch abbaubaren Thermoplaste der Gruppe Polyhydroxyalkanoate durch gezielte Optimierung ihrer Herstellungsbedingungen reproduzierbarer als bisher hergestellt werden. Durch im Projekt zu erarbeitende Maßnahmen sollten die mittlere Molmasse und die Polydispersität der Molmassenverteilung gesteuert werden können, um die Materialeigenschaften gezielt vorherzusagen und einzustellen. Biokunststoffe werden am Markt bereits sehr stark nachgefragt, sodass durch dieses Vorhaben ein bedeutender Beitrag zur Verfügbarkeit und Weiterentwicklung von Biokunststoffen geleistet werden kann, der zahlreiche Industrieunternehmen betrifft. Im Kern adressierte das Projekt die Problematiken "Ressourceneffizienz" und "Mikroplastik" sowie "wirtschafts- und geopolitische Unabhängigkeit", die in naher Zukunft gesellschaftspolitisch und wirtschaftlich attraktive Lösungsansatz erfordern.

1.2 Problemstellung

Im Vergleich zu herkömmlichen, petrochemisch basierten Kunststoffen, bringt die Verwendung von PHA-Biopolymeren wie PHB viele Vorteile mit enormem Marktpotential, jedoch auch einige Herausforderungen mit sich.

Vorteile von PHA-Biopolymeren sind, dass sie aufgrund ihrer Synthese in Zellen biobasiert, bio-kompatibel und biologisch abbaubar sind sowie eine Vielzahl an möglichen chemischen Strukturen und Materialeigenschaften sowie nicht toxische Abbauprodukte aufweisen [8].

Eine grundlegende Herausforderung bei allen biotechnologischen Produktionsverfahren ist die herstellungsbedingte hohe Varianz zwischen Produktionschargen. Biologische Prozesse sind abhängig von verschiedenen Faktoren wie Temperatur, Substratkonzentration bzw. Sauerstoffverfügbarkeit sowie Metabolom der Zelle. Im für die Biosynthese von PHB-Polymeren üblichen Fed-Batch-Verfahren verändern sich diese Prozessbedingungen, v. a. hinsichtlich der Substrat- und Sauerstoffkonzentration mit fortschreitender Prozesszeit stetig. Dadurch kann die Produktqualität variieren und die Ergebnisse sind im Allgemeinen insgesamt schwerer reproduzierbar als in einem kontinuierlichen Prozess [9]. Daher müssen aktuelle Hersteller von PHB und PHB-Derivaten genau diese Hürden in ihren Prozessen bewältigen. Mit einem kontinuierlichen Verfahren können leichte und starke Schwankungen minimiert bzw. vermieden und eine stabile Produktqualität ermög-licht werden.

PHB in Reinform zeigt im Vergleich zu gängigen petrochemisch basierten Polymeren wie PP oder PE teilweise schlechtere mechanische und thermische Eigenschaften. Dies ist unter anderem durch den streng isotaktischen Aufbau und die damit verbundene hohe Kristallinität von 55 bis 80 % [10] bedingt. Dadurch sowie aufgrund einer langsamen Nachkristallisation weist PHB zwar eine geringere Bruchdehnung, aber ähnliche Zugfestigkeit wie z. B. konventionelles PP auf (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich der Stoffeigenschaften von PHB, Polypropylen (PP) und Low-density Polyethylen (LDPE) [10].

Polymer	Schmelz- temperatur T _m [°C]	Glasübergangs- temperatur T _g [°C]	Elastizitäts- modul E-Modul [GPa]	Zugfestig- keit δм [MPa]	Bruchdehnung ε _B [%]
PHB	180	4	3,5	40	5
РР	176	-10	1,7	38	400
LDPE	130	-30	0,2	10	620

Bei der Verarbeitung von Thermoplasten wie PHB ist das Plastifizieren des Kunststoffrohmaterials für die Formgebung der primäre, essenzielle Verarbeitungsschritt. Da bei PHB die Schmelztemperatur nahe der Zersetzungstemperatur liegt, sind neben einer guten Stabilisierung spezifische, präzise Techniken notwendig, um das Polymer bei der Verarbeitung nicht zu schädigen. Die verarbeitungsrelevanten Besonderheiten wie Bruchdehnung, Verarbeitungs- oder Zersetzungstemperatur müssen durch entsprechende Additive, eine sorgfältige Beschreibung der speziellen Materialeigenschaften und Verarbeitungsmaßnahmen sowie Schulungen im industriellen Umfeld etabliert werden [11].

Eine Verbesserung der grundlegenden mechanischen Eigenschaften von PHB kann durch im Produktionsorganismus synthetisierte Copolymere erreicht werden. Erste PHB-Copolymer-Varianten sind bereits käuflich erwerbbar, z. B: Polyhydroxybutyrat-co-valerat (PHBV; ENMAT von Tian-An Biopolymers).

Für die thermoplastische Verarbeitung ist neben der Bruchdehnung etc. auch die mittlere Molmasse und die Molmassenverteilung relevant. Natives PHB hat Molmassen von >500 kDa bis über 1 Million Da, was eine Verarbeitung im Spritzguss-Verfahren zulässt. Wenn die Schmelze durch dünne Düsen oder Schlitze, z. B. bei der Herstellung von Fasern und Folien, fließen muss, dann spielt die Rheologie eine entscheidende Rolle. Das hochmolekulare, geschmolzene PHB fließt in diesen Situationen nur unter hohem Druck in den Düsen bzw. Schlitzen, expandiert aber gleich nach dem Austritt aus der Düse und lagert sich dort zum Teil an den Außenwänden des Werkzeugs an. Bei der Herstellung von Fasern oder Folien werden diese Ablagerungen immer wieder mitgerissen, was zu Inhomogenitäten bzw. Störstellen in den Fasern und Folien führt. Bisher ist es nicht möglich, dieses Problem bei der Synthese im großen Maßstab zu lösen. Laut Aussagen von Dr. Hänggi (Fa. Biomer), aus persönlicher Kommunikation, sollte sich niedermolekulares PHB auf den oben beschriebenen Produktionsmaschinen wie die niedermolekularen Standard-Thermoplaste verhalten [11], die i. d. R. Molmassen unter 100 kDa aufweisen. Ein mögliches Molmassenziel mit wirtschaftlicher Anwendungsrelevanz im Projekt ist daher PHB mit Molmassen in einem ähnlichen Bereich. Bedingt durch die gängige Produktion im Fed-Batch-Verfahren ist es bisher nicht möglich, solch niedrige Molmassen zu produzieren sowie die Verteilung der Molmassen zu kontrollieren. Ein solcher Ansatz ist unseres Wissens bisher nirgends verfolgt worden und wird noch nicht verfolgt.

1.3 Zielsetzung

Primäres Ziel des Forschungsvorhabens war die Anwendung des an der Technische Hochschule Nürnberg (THN) entwickelten kontinuierlichen Prozesses für die Herstellung von PHB mit definierten und engverteilten mittleren Molmassen. Bisher ist weder in der Literatur und Patenten vermerkt noch in der PHA-Community ein Verfahren oder laufende Arbeiten bekannt, in denen die Fermentation so gezielt gesteuert werden kann, dass eine "Wunsch-Molmasse" reproduzierbar erzielt wird.

Die dem Forschungsvorhaben zugrunde liegende Arbeitshypothese ist, dass die Molmassen und deren Verteilung von den Verfahrensparametern und den Umgebungsbedingungen der Zellen abhängen. Durch die gleichbleibenden Fermentationsbedingungen im kontinuierlichen Betrieb können diese Einflussfaktoren präzise und reproduzierbar eingestellt [8, 12] und so die Abhängigkeit der Molmassen von den Verfahrensbedingungen untersucht und optimiert werden. Die produzierten Polymerbatches sollen anschließend mit kommerziell erhältlichem PHB-Polymer (z. B. ENMAT Y3000P, Fa. TianAn) als Basis verglichen werden (PHB-Standard).

Im Fokus des Projekts steht hinsichtlich der Steuerung der Molmassen die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Verweilzeit unter steady-state Bedingungen in einer kontinuierlich betriebenen Reaktorkaskade und der resultierenden mittleren Molmassen bzw. der Molmassenverteilung. Dies wurden in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Dieser Ansatz ist innovativ und erfolgsversprechend. Hochproduktive, kontinuierliche Prozesse werden in der fermentativen Biopolymerherstellung noch kaum eingesetzt, zudem ist die gezielte Herstellung von PHA mit gewünschten Materialeigenschaften bisher nicht beschrieben. Verfügbares Wissen zu diesen beiden Aspekten wird den breiteren Einsatz von PHA beschleunigen.

Zur Zielerreichung wurden folgende Hypothesen überprüft:

- Durch ein kontinuierliches Verfahren zur Herstellung von PHB können engverteilte Molmassen reproduzierbar hergestellt werden.
- Die mittlere Molmasse und der PDI lassen sich durch eine systematische Variation der Herstellungsparameter gezielt beeinflussen.
- Die Extraktion des PHBs ist im größeren Maßstab unter Aspekten der Nachhaltigkeit umsetzbar.

- Das Verfahren ist auf Basis von Labordaten theoretisch auf industriellen Maßstab skalierbar und ökonomisch sowie ökologisch attraktiv (LCA).

2 Stand der Technik

Das Biopolymer PHB wird von einer Vielzahl von Bakterienarten synthetisiert, dient als mikrobieller Energiespeicherstoff und wird intrazellulär gebildet [5]. Unter präzisen definierbaren Mangelbedingungen wird PHB in Bakterienzellen eingelagert und liegt amorph in Form von Granula vor (Abbildung 1 links). Diese können bis zu 90 % des Zellgewichts ausmachen [5, 6, 13]. Für die großtechnische Herstellung von PHB wird häufig der Organismus *Cupriavidus necator* verwendet. Es handelt sich um ein einzelliges, stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium aus der Familie der Burkholderiaceae.



Abbildung 1 PHB in der Bakterienzelle und als Kunststoffprodukt. Links: Einige Bakterienarten lagern bis zu 90 % ihres Zellgewichts in Form von PHB-Granulat ein, die hier im Bild als weiße Körner zu sehen sind. Rechts: PHB kann zu vielen Kunststoffprodukten des Alltags verarbeitet werden, z. B. Shampoo-Flaschen aus PHBV; ebenfalls ist der biologische Abbau der Flaschen zu sehen [14].

Die PHB-Synthese findet bei C.necator nicht wachstumsassoziiert statt und kann gezielt durch z.B. Stickstoffmangel induziert werden. Für einen effizienten und wirtschaftlichen Prozess zur Herstellung von PHB müssen die grundlegenden Prozessbedingungen genau definiert sein: Das Wachstum der Zellen erfolgt unter optimaler Versorgung der Zellen mit Nährstoffen (Phase 1), so dass hohe Zellzahlen erreicht werden, und die PHB-Einlagerung unter Mangelbedingungen (Phase 2). Die PHB-Produktion muss somit entweder in zwei zeitlich getrennten Prozessschritten oder in mindestens zwei räumlich getrennten Bioreaktoren durchgeführt werden [5]. Im industriell üblichen Fed-Batch-Verfahren finden die Wachstums- und Produktionsphasen in einem Bioreaktor zeitlich nacheinander statt [15]: Die vorgelegten, essenziellen Nährstoffe werden in der Wachstumsphase durch den mikrobiellen Stoffwechsel aufgebraucht und anschließend nicht weiter zugeführt. Die PHB-Einlagerung kann durch diese Limitierung präzise induziert werden. Die für die PHB-Synthese benötigten Kohlenstoffquellen werden in der zweiten Prozessphase weiter zugeführt, um die PHB-Einlagerung zu ermöglichen und zu verstärken. Bei solchen diskontinuierlichen Fermentationsverfahren entstehen erhebliche Stand- und Rüstzeiten, da der Reaktor vor dem nächsten Produktionszyklus gereinigt und erneut befüllt werden muss [16].

Im Gegensatz zu diesen diskontinuierlichen Verfahren werden im kontinuierlichen Verfahren beide Prozessschritte in zwei oder mehreren Bioreaktoren örtlich getrennt voneinander und somit parallel realisiert [9]. Die im Projekt umgesetzte, kontinuierliche Betriebsweise als Chemostat (kurz für "chemical environment is static") bringt besondere Vorteile mit sich und eignet sich sowohl für die Produktion mit hoher Effizienz als auch für die Untersuchung der physiologischen Hintergründe von Fermentationsprozessen. Sobald ein Fließgleichgewicht (steady-state) erreicht ist, bleibt die Konzentration von Biomasse und allen Substraten konstant. Hierdurch können Zellwachstum und PHB-Bildung sowie die Auswirkungen einer Veränderung der Substratkonzentrationen genau untersucht werden. Beispiele für biotechnologische, kontinuierliche Prozesse sind die Herstellung von Aceton, Butanol oder 2-Propanol durch Clostridium acetobutylicum [15], die Ethanolproduktion durch Hefen wie Saccharomyces cerevisiea [14], die Produktion von Zitronensäure durch Aspergillus niger [16] sowie die Produktion von Wasserstoff durch fakultativ-anaerobe Bakterien [17]. Im Gegensatz zur PHA werden diese Produkte extrazellulär gebildet bzw. vom Produktionsorganismus ausgeschieden. Dies erleichtert die Aufreinigung des Produkts, weshalb diese Prozesse bereits gut etabliert sind.

Auch in der chemischen Industrie sind kontinuierliche Prozesse weit verbreitet, da bei gleicher oder besserer Produktivität deutlich kleinere Reaktoren benötigt werden, was die Anschaffungskosten einer neuen Anlage deutlich senkt bzw. bestehende Anlagen effizienter nutzbar macht. Ein Beispiel hierfür ist das Haber-Bosch-Verfahren zur kontinuierlichen Herstellung von Ammoniak [17]. Diese Vorteile kommen auch in biotechnologischen Prozessen wie zum Beispiel der Ethanolproduktion zum Tragen [8, 12].

PHA-Polymere wie PHB werden idealisiert als Homopolymere (Polymer aus gleichartigen Monomeren) dargestellt. Sie liegen jedoch meist als zufällige Copolymere oder als Block-Copolymere mit geringem Copolymer-Anteil vor. Neben dem chemischen Aufbau der produzierten Polymere ist die Kettenlänge bzw. die mittlere Molmasse (M_w) und die Polydispersität der Molmassenverteilung (PDI) maßgeblich für Verarbeitungseigenschaften wie die Schmelztemperatur und die Schmelzviskosität, aber auch für andere (mechanische) Materialeigenschaften. Polymere mit eher niedrigen Molmassen zeigen eine niedrigere Nullviskosität. Weiterhin sind sie im Vergleich zu Polymeren mit höheren mittleren M_w niedrigviskoser und zeigen eine höhere Kristallinität. Die mittlere Molmasse ist abhängig vom verwendeten Mikroorganismus, den biochemischen sowie physikalischen Wachstumsbedingungen sowie der gewählten Extraktionsmethode und liegt typischerweise im Bereich von 50 – 3.000 kDa [18–20]. Für die meisten industriellen Anwendung ist PHB mit M_w > 50 kDa geeignet [21].

Neben der mittleren Molmasse hat zudem die Molmassenverteilung einen großen Einfluss auf die Materialeigenschaften. Ein Maß für ihre Breite ist die sogenannte Polydispersität, die eine Vielzahl von physikalischen, mechanischen und rheologischen Eigenschaften der Polymere bestimmt. Eine niedrige Polydispersität, also eine enge Molmassenverteilung steht für eine hohe Anzahl an Ketten pro Fraktion, d. h. eine hohe Einheitlichkeit, wohingegen eine breite Molmassenverteilung mit hoher Polydispersität für eine kleine Anzahl an Ketten pro Fraktion, einer hohen Uneinheitlichkeit steht. Sowohl die mittlere Molmasse als auch die Polydispersität der Polymere werden durch die Polymersynthese vorgegeben und müssen wegen ihres großen Einflusses auf die Polymereigenschaften kontrolliert einstellbar und vor allem reproduzierbar sein. Dadurch wird es möglich, eine gleichbleibende Qualität der synthetisierten Polymere zu garantieren. Aus diesem Grund ist die kontinuierliche Kontrolle dieser Parameter während der Implementierung und Optimierung der kontinuierlichen Polymersynthese (z. B. mittels Gelpermeationschromatographie) unerlässlich.

Die Abhängigkeit der mittleren Molmasse und des PDI von der Prozesszeit bzw. der Verweilzeit im Bioreaktor wurde bisher überwiegend in Fed-Batch-Fermentationen untersucht. Hierbei zeigt sich, dass Fermentationszeit, Zeitpunkt der Nährstofflimitierung sowie Auswahl der verwendete Produktionsorganismus die mittlere Molmasse M_w stark beeinflussen können [12, 18, 22, 23]. In der Literatur wird beschrieben, dass die zahlenmittlere Molmasse (M_n) in einem einstufigen kontinuierlichen Prozess mit der Verdünnungsrate zunimmt. Der ermittelte PDI lag zwischen 1,9 und 2,3. Auf der Grundlage dieser Zahlen lag die gewichtsmittlere Molmasse (M_w) zwischen 500 und 1.000 g/mol. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die zahlenmittlere Molmasse z. B. auch mit Steigerung der Ammoniumsulfatkonzentration im Zulauf zunimmt [12, 18, 22, 23].

Neben der Fermentation ist die Extraktion und Aufreinigung der zweite Hauptbestandteil der Produktion von PHB und kann bis zu 50 % der Produktionskosten ausmachen [24–26]. Das intrazellulär vorliegende PHB wird im sogenannten Downstream Processing (DSP) überwiegend durch zwei Methoden aus den Zellen gewonnen. Das DSP kann zum einen durch Lösen des Polymers mittels Extraktion aus der intakten Zelle, zum anderen durch das Entfernen bzw. die Auflösung der nicht-PHA-Zellbestandteile erfolgen [27]. Für das DSP werden organische Lösemittel, starke Oxidationsmittel, Säuren und Laugen verwendet. Als Lösemittel werden vor allem im Labormaßstab bisher chlorierte Kohlenwasserstoffe wie Trichlorethan eingesetzt [25, 28, 29]. In den letzten 10 Jahren wurde eine Vielzahl an Extraktionsmethoden mit halogenfreien Lösemitteln und "green chemicals" wie beispielsweise Dimethylcarbonat [30, 31], Dimethylsulfoxid und anderen teils biobasierten Lösemitteln wie Ethanol [32] untersucht und entwickelt [33].

Die oben beschriebene Extraktion durch Lösemittel ist aktuell die am weitesten verbreitete Methode zur Gewinnung von PHB, jedoch sind die eingesetzten Chemikalien oft gesundheits- und umweltschädlich [30]. Zudem ist die Entsorgung dieser Chemikalien sowie die Rückgewinnung des Extraktionsmittels aufwändig und kostenintensiv. PHB kann auch durch disruptive Aufbereitung aus den Zellen gewonnen werden. Hierfür kommen beispielsweise Natriumhypochlorit [34], Schwefelsäure [35] oder Natronlauge [36] zum Einsatz. Auch diese hierzu verwendeten Chemikalien sind jedoch teils umwelt- bzw. gesundheitsgefährdend.

Der Einsatz halogenierter Lösemittel, starker Säuren und Laugen kann zur Verkürzung der Kettenlänge führen, was veränderte Stoff- und Verarbeitungseigenschaften bedeuten kann.[21, 37] Bei der Auswahl eines geeigneten Extraktionsmittels ist es daher wichtig, neben ökonomischen und ökologischen Aspekten auch den Einfluss auf die Polymerkette zu berücksichtigen.[38] Auch der Einfluss von Hitze kann degradierend auf das Polymer

wirken, weshalb bei einer Vorbehandlung der Biomasse, z.B. durch einem Zellaufschluss durch Detergenzien oder Hitze, beachtet werden muss. Durch einen Vorbehandlungsschritt werden die Zellen im besten Fall durchlässiger für Lösemittel und die Menge an eingesetztem Extraktionsmittel kann signifikant reduziert werden [39]. Bei klassischen Fed-Batch-Prozessen müssen im DSP bei jedem Produktionszyklus große Mengen Fermentationsbrühe zugleich aufbereitet werden. Bei kontinuierlichen Prozessen dagegen kann das DSP fortlaufend oder in kleineren Batches erfolgen, wodurch bei gleicher Produktivität auch hier deutlich kleinere Anlagen benötigt werden. Dies resultiert sowohl bei der Produktion als auch bei der Aufbereitung in verringerten Anschaffungs-, Betriebsund Wartungskosten.

2.1 Eigene Vorarbeiten

2.1.1 Eigene Vorarbeiten und Qualifikation (SKZ)

In einer Vielzahl verschiedener öffentlich geförderter und industriell finanzierter Projekte wird am SKZ fortwährend die Entwicklung, Verarbeitung und Analyse unterschiedlichster Kunststoffmaterialien durchgeführt. Die umfassenden Erfahrungen des SKZ zur Verfahrens-, Materialentwicklung und Prüfung von Biopolymeren wurde über Jahre hinweg durch die erfolgreiche Durchführung eigener Forschungsprojekte aufgebaut und vertieft. Eines dieser Projekte befasste sich beispielsweise mit der Entwicklung von Bio-Alternativen für weichmacherhaltige Vinylchlorid-Polymere (FNR 12NR045). Das wissenschaftliche Ziel lag darin, grundlegende Zusammenhänge bei Zugabe weichmachender Ingredienzien zu Biopolymeren zu erforschen. In einem weiteren Projekt (FNR 2219NR025) werden biobasierte Folien mit besonderen Barriereeigenschaften für die Anwendung im Lebensmittelbereich hergestellt und untersucht.

Auch für die Durchführung von ökonomischen und ökologischen Bewertungen von Prozess-, Material- und Produktentwicklungen liegt in der bestehenden SKZ-Forschungsgruppe "Nachhaltigkeit und Kreislaufwirtschaft" viel Erfahrung und Expertise vor (IGF Vorgaben 20195 N und 19347 N) Neben einem großen Maschinenpark für die Kunststoffaufbereitung und -verarbeitung kann am SKZ auf eine Fülle unterschiedlicher chromatographischer, thermischer, mechanischer, rheologischer und mikroskopischer Analysemethoden zurückgegriffen werden. Das vorhandene Knowhow in Kombination mit der breiten instrumentellen und maschinellen Ausstattung ermöglichen ein gezieltes und effektives Vorgehen innerhalb des beantragten Forschungsvorhabens.

2.1.2 Eigene Vorarbeiten und Qualifikation (Technische Hochschule Nürnberg)

Prof. Dr. Stephanie Stute (Fakultät Verfahrenstechnik, Technischen Hochschule Nürnberg (THN)) beschäftigt sich seit 2015 mit der ökologischen und ökonomischen Herstellung von Biopolymeren. Im Rahmen von erfolgreich durchgeführten, u. a. durch Drittmittel geförderten Forschungsprojekten und Abschlussarbeiten wurden bis 2018 die Grundlagen zur Realisierung eines kontinuierlich betriebenen zweitstufigen Prozesses für die Herstellung von PHB erarbeitet werden. In den folgenden Jahren konnte darauf aufbauend ein zweistufiger Produktionsprozess im Labormaßstab etabliert werden, dessen schematische Darstellung in Abbildung 2 zu sehen ist. In Stufe 1 werden die Zellen unter optimaler Nährstoffversorgung unter Zufluss von Nährmedium zum Wachstum angeregt. In Stufe 2 wird die Einlagerung von PHB durch einen gezielt gesetzten Nährstoffmangel induziert. Durch die Zuführung einer Kohlenstoffquelle über den Feed wird die PHB-Einlagerung verstärkt (Zulauf in Stufe 2). Aus dem Ablauf der Stufe 2 werden die Zellen zum Downstream Processing überführt.



Abbildung 2 Schematische Darstellung des an der THN entwickelten zweistufigen Fermentationsprozesses; Abkürzungen: PN = Probenahme; $O_2 = Begasung$; pH = pH-Sonde; $pO_2 = Sonde$ für Gelöstsauerstoff.

Die an der THN zur Produkt Aufreinigung und Polymerextratkion genutzte Methode basiert auf der disruptiven Extraktion mit Natriumhypochlorit. Sie ist für die Extraktion kleinerer Mengen PHB aus der Fermentationsbrühe für analytische Zwecke geeignet.

Seit 2018 wird die Antragstellerin durch wissenschaftliche Mitarbeiter und Laboringieneure bei ihrer Forschung in den Bereichen Prozessoptimierung, Prozessanalytik und Forschungskoordination unterstützt. Die Labore des Fachgebiets Bioverfahrenstechnik sind mit mehreren Bioreaktoren für die Fermentation und modernen Gerätschaften für die gängigen Methoden der Probenbearbeitung und -analyse ausgestattet, so dass in Kombination mit der langjährigen Erfahrung der Antragstellerin sowie der dem Fachbereich zugehörigen Laboringenieure und wissenschaftlichen Mitarbeiter eine erfolgreiche Bearbeitung des Projektes gewährleistet sein wird.

Außer den Forschungstätigkeiten am kontinuierlichen Prozess wurde 2020 erfolgreich ein Projekt zu Verarbeitung des Biopolymers Polyhydroxybutyrat im additiven Verfahren für

die Anwendung in medizinischen Implantaten für personalisierte Medizin im Rahmen eines interdisziplinären Projektes abgeschlossen. Somit besitzt die Arbeitsgruppe breit angelegtes Knowhow von der Biopolymerproduktion bis zur Verarbeitung. Zusätzlich stehen der Antragstellerin ein breites Spektrum an Laboren der internen und externen Fakultäten zur Verfügung. Die Ausrichtung der Forschungstätigkeiten soll auch zukünftig verstärkt auf gesellschaftspolitisch relevante Aufgabenstellungen der Bioökonomie gelegt werden. Das Forschungsvorhaben stellt daher eine sinnvolle Fortsetzung der bisherigen Forschung dar. Im Dezember 2020 wurde Prof. Dr. Stute in den Sachverständigenrat Bioökonomie Bayern berufen. Der Sachverständigenrat besteht seit 2016 und berät das Bayerische Wirtschaftsministerium zur Weiterentwicklung der Bioökonomie. Er unterstützt die Umsetzung und Evaluierung der bayerischen Bioökonomiestrategie und stellt hier wichtige Schlüsselstelle bei der Vernetzung von Forschung, Wirtschaft und Politik dar.

3 Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels

Um die oben definierten Forschungsziele zu erreichen, erfolgte die Aufteilung der einzelnen Tätigkeiten auf insgesamt acht Arbeitspakete. Eine schematische Darstellung der Abfolge der Arbeitspakete ist in Abbildung 3 dargestellt.



Abbildung 3 Fließschema der geplanten Arbeitspakete für das beantragte Forschungsvorhaben.

Bevor die praktischen Arbeiten beginnen konnten, wurden im Rahmen von Arbeitspaket 1 (AP1) zunächst die notwendigen Rohstoffe und Geräte beschafft sowie sämtliche Projektschritte in Abstimmung mit dem projektbegleitenden Ausschuss koordiniert.

In den darauffolgenden Arbeitspaketen AP2 und AP3 erfolgten die Etablierung und Evaluierung eines kontinuierlichen Biosyntheseverfahrens über einen Zeitraum von mindestens 500 Stunden. Parallel dazu wurde ein kontinuierliches Aufarbeitungsverfahren für die erzeugten Polymere entwickelt, das sowohl ökologische als auch ökonomische Gesichtspunkte berücksichtigt.

Diese Schritte bildeten die Grundlage für die in den Arbeitspaketen AP4 und AP5 durchgeführten Untersuchungen zur gezielten Steuerung der Molekülmasse – insbesondere durch Variation der Nährmedium Zusammensetzung sowie Anpassung der Verweilzeit im Reaktor. Im Rahmen von AP6 wurden anschließend die Materialeigenschaften der synthetisierten Polymere umfassend quantifiziert.

Zur ganzheitlichen Bewertung des kontinuierlichen Biosyntheseverfahrens wurde schließlich in Arbeitspaket 7 eine techno-ökonomische Analyse (TEA) sowie eine Lebenszyklusanalyse (LCA) durchgeführt. Beide Analysen basierten auf den im Projekt gewonnenen Prozessdaten und erlaubten eine fundierte Einschätzung des ökologischen und ökonomischen Impacts.

4 Durchgeführte Arbeiten

In diesem Kapitel werden die im Rahmen des Projekts eingesetzten Materialien, die durchgeführten Synthesen und Untersuchungen, die verwendeten Charakterisierungsmethoden und die Methoden für die technoökonomische Analyse sowie die Ökobilanz zusammengefasst.

4.1 Mikrobielle Synthese des PHB im kontinuierlichen Prozess

Die Basis für Experimente zur PHB-Synthese in den Bakterienzellen war ein Versuchsaufbau bestehend aus zwei miteinander gekoppelten Bioreaktoren (Abbildung 4).



Abbildung 4 Zweistufige Bioreaktorkaskade zur PHB-Herstellung an der TH Nürnberg; A: Versuchsaufbau mit Bioreaktoren vom Typ Minifors1 mit einem Arbeitsvolumen von 0,7 L bis 1,7 L; B: Schematische Darstellung.

Die Reaktoren sind über Schlauchverbindungen miteinander verbunden. Aus einem Feedbehälter wird Nährmedium, in dem Rohglycerin als Kohlenstoffquelle eingesetzt wird, über Pumpen kontinuierlich in Reaktor 1 gepumpt. Das Nährmedium enthält allen weiteren benötigten Nährstoffe basierend auf dem Nährmedium nach Lopar et al. [39] und wurde im Laufe des Projektes hinsichtlich der Ammoniumkonzentration angepasst. Aus dem Reaktor 1 wird die Fermentationsbrühe über ein Tauchrohr kontinuierlich mittels Pumpe abgezogen und in Reaktor 2 gefördert. Die Fermentationsbrühe weist an dieser Stelle im Idealfall hohe Zelldichten, aber noch geringe bis keine PHB-Einlagerung auf. Das Medium sollte hinsichtlich der Stickstoffkonzentration unter 0,2 g/mL liegen, um weitere Zellteilungen zu unterbinden und dafür die PHB-Einlagerung zu ermöglichen. In Reaktor 2 wird über einen weiteren Feed Rohglycerin zu gefördert, um die PHB-Einlagerung zu verstärken. Die Temperatur und der pH-Wert wurden konstant bei 33 °C und pH 7 gehalten. Der kontinuierliche Betrieb wurde in AP2 über einen längeren Zeitraum betrieben und die reproduzierbare Herstellung von PHB mit gleichbleibenden Molmassen und PDI untersucht.

In diesem Setup ist es möglich, das Wachstum der Zellen und die Einlagerung von PHB über folgende Parameter zu beeinflussen:

 Verweilzeit der Zellen unter den in Reaktor 1 und Reaktor 2 eingestellten Bedingungen (AP4)

Die Verweilzeit kann bei gleichbleibender Pumprate über das Arbeitsvolumen im jeweiligen Reaktor oder bei gleichbleibenden Volumen über eine Änderung der Pumprate geändert werden. Für die Bearbeitung des AP4 wurde das Verhältnis der Arbeitsvolumina zwischen Reaktor 1 und Reaktor 2 verändert, um den Einfluss unterschiedlicher Verweilzeit der Zellen in dem Reaktor 2 auf die PHB-Einlagerung untersuchen zu können. Um auch zahlenmäßig große Volumina-Verhältnisse V_{R1}/V_{R2} umsetzen zu können, wurde eine Reaktorkaskade mit Reaktoren mit einem größeren Arbeitsvolumen (0,65 L bis 4 L) für mehr Variationsmöglichkeiten in Betrieb genommen.

- Nährstoffkonzentrationen in den Feed-Strömen in Reaktor 1 und Reaktor 2 (AP5) Hier ist zu beachten, dass die sich in den jeweiligen Reaktorstufen einstellenden Konzentrationen im Wechselspiel mit der Zellzahl und der Stoffwechselaktivität der Zellen ergeben. Nach etwa 5-7 Volumenwechsel sollte sich ein Fließgleichgewicht – auch steady state genannt – eingestellt haben. Da aus der Literatur der Einfluss von Ammoniumsulfat auf die Molmassen von PHBV gekannt ist [12], sollte dieser Einflussfaktor auf die Molmassen von PHB untersucht werden.
- Sauerstoffkonzentration in Reaktor 1 und Reaktor 2
 Die Konzentration des in der Fermentationsbrühe gelösten Sauerstoffs wird zusätzlich zum biologiebedingten Einfluss durch die Anzahl der Zellen und deren Stoffwechselaktivität, durch die technischen Parameter Rührerdrehzahl und die Begasungsrate sowie die Viskosität der Fermentationsbrühe beeinflusst.

Die kontinuierliche Fermentation wurden zunächst mit dem Standardmedium (RM; für Rohglycerin mit Mineralsalzen) durchgeführt, in dem filtriertes Rohglycerin als Kohlenstoffquelle dient. Rohglycerin entsteht als Nebenprodukt bei der Biodieselherstellung und wurde von Tecosol GmbH bereitgestellt und vor den Versuchen durch Filtrieren aufbereitet, um Partikel abzutrennen. Die noch fehlenden Nährstoffe wie Ammonium, Phosphat, Sulfat, etc. wurden in definierten Mengen als Mineralsalze zugegeben.

Neben der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Prozessbedingungen und Molmassen und den daraus folgenden analytischen Aspekten, sollte auch PHB in ausreichenden Mengen für die Erprobung des Materials durch beteiligte kmU produziert werden. Für die Analytik wie TGA und GPC werden 1 - 10 g Probematerial, für die Fertigung der Schulterstäbe werden bis zu 200 g PHB, für die Verarbeitungstests werden min. 5 kg Polymer benötigt. Trotz der erfolgreichen kontinuierlichen Fermentationsläufe konnte die im Antrag angestrebte Produktion von PHB nicht in der erforderlichen Menge erreicht werden.

Um für Materialuntersuchungen und Verarbeitungstestläufe größere Mengen Biopolymer-Material gewinnen zu können, wurde die Biomassekonzentration in Reaktor 1 über eine Erhöhung der Ammoniumkonzentration gesteigert. Mit einer höheren Anzahl an Zellen, die in Stufe 2 zur PHB-Einlagerung zur Verfügung stehen, sollte so die volumetrische PHB-Ausbeute insgesamt erhöht werden. Um die benötigten PHB-Mengen produzieren zu können, wurde die Reaktorkaskade zusätzlich zu den Reaktoren mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 1,5 L in Reaktoren mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 4 L umgesetzt. Aufgrund von Lieferverzug von mehreren Monaten konnte diese Reaktorkaskade erst in der 2. Projekthälfte in Betrieb genommen werden. Der Wechsel in die Reaktorkaskade mit dem größeren Arbeitsvolumina stellte sich jedoch nicht als zielführend heraus, da für diese Reaktorkaskade eine andere Software für die Bedienung und Regelung genutzt werden musste. Diese Systemumstellung war mit den zeitlich und personell begrenzten Ressourcen und den Herausforderungen in anderen Arbeitspaketen nicht sinnvoll umsetzbar und konnte daher nicht weiterverfolgt werden.

4.1.1 Herstellung von PHB mit konstanter Molmassenverteilung im kontinuierlichen Verfahren

Ziel dieses APs war es PHB mit Hilfe des zweistufigen kontinuierlichen Fermentationsverfahrens, reproduzierbar und mit konstanten Molmassen herzustellen. Eine besondere Herausforderung war hierbei der Dauerbetrieb über mehrerer hundert Stunden mit vollfunktionstüchtiger technischer Ausstattung. Es kam wiederholt zum Verstopfen der Schläuche, die Nährmedium oder Fermentationsbrühe fördern, weshalb mehrere Versuchsreihen vorzeitig abgebrochen werden mussten. Das Blockieren der Schläuche wurde durch größere Schlauchdurchmesser, einen weiteren Filtrationsschritt des Rohstoffs Rohglycerin sowie geänderte Zudosierungsmodi des Glycerin-Feeds verhindert.

Der Dauerbetrieb bedeutet für die Sonden (pH, pO2) und den Antrieb der Bioreaktoren erhöhten Verschleiß und erhöhten Ausfall. Die zahlreichen technischen Ausfälle (Bsp: 3x defekter Rührer Antrieb während 18 Monate) zeigen, dass der kontinuierliche Betrieb hohe Anforderung an das technische Equipment durch Abnutzung und Verschleiß stellen. Der Antrieb als auch die Sonden konnten zwar repariert und der Betrieb wieder aufgenommen werden, dennoch mussten Versuchsreihen wiederholt abgebrochen und erneut gestartet werden, was zu erheblichen Zeitverlusten führte.

4.1.2 Prozessintegrierte Steuerung der mittleren Molmasse durch Prozessparameter

Die dem Forschungsvorhaben zugrunde liegende Arbeitshypothese ist, dass die Molmassen und deren Verteilung von den Verfahrensparametern und den Umgebungsbedingungen der Zellen abhängen. Durch gleichbleibende Fermentationsbedingungen im kontinuierlichen Betrieb sollten diese Einflussfaktoren präzise und reproduzierbar eingestellt und so die Abhängigkeit der Molmassen von den Verfahrensbedingungen untersucht und optimiert werden. In diesem Arbeitspaket war vorgesehen, die gezielte Beeinflussung der mittleren Molmasse der gebildeten Polymere durch die Verweilzeit zu untersuchen, die durch Änderung des Reaktionsvolumens in Reaktor 2 im Verhältnis zum Volumen von Reaktor 1 oder des Volumenstroms im Prozess verändert werden kann. Die Untersuchung zur Variation der Verweilzeit wurde über die verschiedene Volumina-Verhältnisse zwischen Reaktor 1 und Reaktor 2 umgesetzt. Untersucht werden sollten Volumina-Verhältnisse von R1:R2 von 1:1 bis 1:2,5 bei einer Durchflussrate von D = 0,1 1/h, wobei das Volumenverhältnis 1:1 den Ausgangsfall darstellt.

4.1.3 Prozessintegrierte Steuerung der mittleren Molmasse durch die Nährmedienzusammensetzung

In diesem Arbeitspaket sollte der Einfluss der Konzentration verschiedener essentieller Nährmedienbestandteile und die Art der Substratlimitierung auf die mittlere Molmasse und PDI untersucht werden. Da für Ammoniumsulfat in der Literatur bereits der Einfluss auf die Molmassen von PHBV für einen einstufigen kontinuierlichen Prozess beschrieben wurde [12], wurde als erster Ansatz die Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration im Zulauf zu Stufe 1 umgesetzt. Da trotz erfolgreich in Reaktor 2 umgesetzter Ammonium-limitierung, keine oder nur geringe PHB-Einlagerung nachweisbar war, wurde darüber hinaus die Glycerinkonzentration in Stufe 2 variiert. Sowohl in der Literatur als auch aus Vorversuchen ist bekannt, dass sich eine Glycerinkonzentration über 40 g/L negativ auf die spezifische Wachstumsrate auswirkt. Es ist durchaus denkbar, dass eine hohe Glycerinkonzentration sich ebenfalls negativ auf die PHB-Einlagerung auswirkt.

4.2 Entwicklung eines Verfahrens zur Extraktion von PHB im Technikumsmaßstab

Bei der kontinuierlichen Fermentation fallen je nach gewählter Verdünnungsrate und eingesetzten Reaktorvolumen bis zu 60 L Fermentationsbrühe pro Woche an, die gelagert oder weiterverarbeitet werden müssen. Da der Abbau des Speicherstoff PHB durch die zelleigene PHA-Depolymerase innerhalb weniger Minuten einsetzt, wurden die Zellen über Hitzeeinwirkung inaktiviert, um den Abbau des eingelagerten PHBs nach Verlassen der Fermentationsbrühe des Reaktors zu unterbinden. Ziel war es, die Zellen am Auslass des Reaktors 2 ohne Verluste durch zellinternen PHB-Abbau sammeln und bis zur satzweisen Extraktion lagern zu können (Details siehe 4.2.1 und 4.2.2). Proben für die Analytik wurden mittels Autoklavierens inaktiviert. Die anschließende Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation und die Extraktion des PHBs aus der Zellbiomasse über NaClO oder DMC.



Das Downstream Processing umfasst folgende prinzipielle Prozessschritte (Abbildung 5):

Abbildung 5 Überblicksschema zum Downstream Processing.

PHB wird von den Bakterien als Speicherstoff produziert und als intrazellulär gebildete Granula eingelagert. Um PHB aus der Zelle zu gewinnen, müssen die Zellen zunächst von der Fermentationsbrühe abgetrennt werden. Für die Extraktion des PHBs kann ein Schritt für die Zelldesintegration inkludiert werden, ist aber nicht zwingend erforderlich, da die verwendeten Lösemittel die Zellmembran und -wand ausreichend schädigen, so dass das PHB aus den Zellen herausgelöst werden kann. Das im Lösemittel gelöste PHB fällt nach Zugabe eines Fällungsmittels aus, kann abgetrennt und getrocknet werden. Als gängige Extraktionsmittel werden Chloroform und Natriumhypochlorit sowie Ethanol als Fällungsmittel eingesetzt. Ein Ziel des Projektes war die Erarbeitung einer Extraktionsmethode, die den Einsatz an potenziell gesundheits- und umweltgefährdenden Extraktionsmitteln minimiert. Ein vielversprechendes Extraktionsmittel ist beispielsweise Dimethylcarbonat (DMC), dessen Einsatz im Detail untersucht wurde. Als Referenz wurde die Extraktion mit Natriumhypochlorit (NaClO) verwendet.

4.2.1 Extraktion mittels NaClO

Die Extraktion des PHBs aus dem Zellmaterial basiert darauf, dass das Zellmaterial durch Natriumhypochlorit oxidativ abgebaut wird. Das PHB soll von diesem Abbau nicht betroffen sein und kann als Feststoff abgetrennt werden. Die Probe wird nach dem Autoklavieren mittels Zentrifugation pelletiert und das Pellet in Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Zellpellet im Verhältnis 1:30 mit 12%igem Natriumhypochlorit (NaClO) resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit wird mit Wasser verdünnt. Nach einer 20-stündigen Inkubation wird erneut abzentrifugiert, um die PHB-haltige Masse zu isolieren. Dieses Pellet wird anschließend mehrfach mit Wasser und Ethanol gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Abschließend wird das Pellet über Nacht bei 40-42 °C getrocknet und anschließend gewogen.



Abbildung 6 Übersicht zu den Extraktionsschritten mit Natriumhypochlorit. A: Schema zu den Prozessschritten, B: Realproben, C: Getrocknetes PHB.

4.2.2 Extraktion mittels Dimethylcarbonat (DMC)

Die PHB-Extraktion mittels DMC und Fällung mit Ethanol basiert auf einer Abwandlung der Methode von Samori et al. [31] und Mongili et al. [40] und wurde v.a. für die quantitative Gewinnung von PHB, z.B. nach einer Fed-Batch- oder nach einer kontinuierlichen Fermentation verwendet. Für qualitative Analysen, z.B. Stichproben oder zur groben Abschätzung des PHB-Gehaltes wurde die Extraktionsmethode mit Natriumhypochlorit eingesetzt.

Die abzentrifugierte feuchte oder getrocknete Biomasse wird gewogen und im Verhältnis 1:10 mit DMC versetzt. Die Mischung wird anschließend in einem Wasserbad bei 90 °C für 90 Minuten erhitzt, um das PHB aus der Biomasse zu extrahieren. Parallel dazu wird die doppelte Menge an Ethanol vorbereitet und im Kühlschrank auf 5 °C vorgekühlt. Nach der Extraktion wird die DMC-Phase, in der das PHB gelöst vorliegt, von einer eventuell vorhandener Wasserphase getrennt und filtriert. Das Filtrat wird zum gekühlten Ethanol gegeben, um PHB auszufällen. Die Lösung wird über Nacht bei 5 °C gelagert, wodurch das PHB sedimentiert. Anschließend wird der Überstand entfernt, und das PHB wird durch Zentrifugation isoliert. Das Pellet wird über Nacht bei 40-42 °C getrocknet und anschließend gewogen.



Abbildung 7 Gefälltes PHB in DMC-Ethanol-Lösung.

4.2.3 Hitzeinaktivierung

Bei dem umgesetzten kontinuierlichen Betrieb fallen je nach Verdünnungsrate und Reaktorvolumen zwischen 70 ml und 400 ml Fermentationsbrühe pro Stunde an. In dem Produktsammelbehälter werden anders als in den Bioreaktoren die Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur, Nährstoffe, etc. nicht mehr kontrolliert oder reguliert. D.h. die Zellen beginnen bei entsprechenden Bedingungen innerhalb weniger Minuten das eingelagerte PHB abzubauen. Dies sollte durch einen Inaktivierungsschritte mittels Hitze verhindert werden. Durch die Hitzeeinwirkung soll als Mindestanforderung das PHB abbauende Enzym, die PHB-Depolymerase, denaturiert werden. Ein durch die Hitzeeinwirkung stattfindender Zellaufschluss kann die nachfolgende Extraktion erleichtert, war jedoch nicht Ziel dieses Arbeitspakets.

Die Hitzeinaktivierung wurde mit drei Methoden im Labormaßstab getestet, die nach ihrem Funktionsprinzip unterteilt werden können: Batch-Reaktor, Rohr- bzw. Schlauchreaktor und kontinuierlicher Rührkesselreaktor (Abbildung 8). Der untersuchte Temperaturbereich wurde zwischen 60 °C und 80 °C gewählt, da die Hitzeinaktivierung an andere Abwärme produzierende Industrieprozesse gekoppelt werden sollte (z.B. Hygenisierung von Gärresten bei Biogasanlagen) und nicht degradierend auf das eingelagerte PHB wirken sollte. Der Effekt der Hitzeinaktivierung wurde über Lebendkeimzahlbestimmungen auf Agarplatten und über die Quantifizierung von gelösten Proteinen als Indikator für einen erfolgten Zellaufschluss erfasst.

Satzweise	Kontinuierlich		
Wasserbad	Rohr-bzw. Schlauchreaktor	Rührkessel	
KbE T/KbE T/KbE Reaktor 2 Hitze-Inaktivierung & Sammelbehälter	KEE T KEE Image: Constraint of the second s	Reakby 2 Hitze-bakityierwag Sammelbekiller	
Auffangbehälter in temperier- tem Wasserbad	Hitzeeinwirkung beim Durch- fluss durch Schlauch	Hitzeeinwirkung wäh- rend Verweilzeit im ge- rührten Behälter	

Abbildung 8. Übersicht zu den untersuchten Methoden der Hitzeinaktivierung [41].

Die Hitzeinaktivierung der für die Analytik aufbereiteten Proben erfolgte durch Autoklavieren (120 °C, 2 bar, min. 20 min).

4.3 Durchführung Materialcharakterisierung

Zur umfassenden Charakterisierung der Material- und Verarbeitungseigenschaften sowie der Molmassenverteilung der synthetisierten PHB-Polymerchargen wurde eine Reihe spezifischer Analysemethoden angewandt. Dazu zählten die Bestimmung der Molmassenverteilung und der Polydispersitätsindizes (PDI) mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) sowie die Viskositätsmessungen der Polymere unter Einsatz der Hochdruckkapillarrheometrie (HKR), der Schmelzeflussrate (MFR) und der Platte-Platte-Rheologie. Die Dichte wurde in Abhängigkeit von Temperatur und Druck durch pvT-Messungen bestimmt, während die mechanischen Eigenschaften durch Zug- und Schlagversuche evaluiert wurden. Die Reinheit der synthetisierten Polymere sowie deren thermische Eigenschaften wurden mittels thermogravimetrischer Analysen (TGA) und dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) überprüft.

4.3.1 Testmaterial ENMAT Y3000P

Die Untersuchung der in diesem Projekt synthetisierten PHB-Polymere erforderte die Entwicklung geeigneter Messmethoden für jede der oben erwähnten Prüfungen. Als Testmaterial zur Methodenentwicklung diente das kommerziell erhältliche PHB ENMAT Y3000P von TianAn Biopolymer, ein beiges PHB-Pulver.

Die aus dem Datenblatt des Referenzmaterials ersichtlichen Materialdaten sind in Tabelle 3 dargestellt. Aus dem Datenblatt sind weder Normen noch Messbedingungen ersichtlich nach denen die aufgeführten Messwerte bestimmt wurden. Aus diesem Grund wurden zur Entwicklung der Messmethoden für die Charakterisierung der hergestellten Polymere auf eigene Erfahrungen und gängige Normen zurückgegriffen. Somit kann es zu Abweichungen zwischen Soll- und Ist-Werten kommen.

Materialeigenschaft	Messwert
Dichte	1,25 g/cm ³
Schmelzeflussrate (MFR)	6-15 g/10 min
Streckspannung	31-36 MPa
Bruchdehnung	2.2 %
E-Modul	1.600-2.100 MPa
Biegemodul	2.500-3.200 MPa
Vicat Erweichungstemperatur	164 °C
HDT	135-145 °C
Schmelzpunkt	175-180 °C

Tabelle 3Materialdaten des Referenzmaterials ENMAT Y3000P.

4.3.2 Bestimmung der Scherviskositätsfunktion mittels Hochdruckkapillarrheometrie (HKR)

Zur Untersuchung der Schmelzeviskositätsfunktion der PHB-Proben wurde die Hochdruckkapillarrheometrie (HKR) als Messmethode verwendet, wobei die Messungen in Anlehnung an ISO 11443 mit einem Hochdruckkapillarrheometer RG20 der Firma Göttfert durchgeführt wurden. Das Rheometer verfügt über zwei Messkanäle. Für die Messungen wurden eine 20/1 Rundlochdüse und die dazugehörige Nulldüse verwendet, wobei die Kanallänge 256 mm und der Kanaldurchmesser 12 mm beträgt. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 185 °C in einem Schergeschwindigkeitsbereich von 10-1.500 s⁻¹. Das Material wurde in den Kanal eingefüllt und dabei von Hand vorverdichtet. Nach einer Aufheizzeit von fünf Minuten wurde mit der Messung begonnen. Die Materialien wurden vor der Messung für fünf Stunden bei 80 °C in einem Trockenofen vorgetrocknet. Die Befüllung des Messkanals mit dem feinen PHB-Pulver erwies sich als äußerst schwierig, sodass für die Messungen das mittels Messkneter hergestellte und mit Verarbeitungs- und Langzeitstabilisatoren versetzte Material vermahlen und im Anschluss nach Trocknung in den Messkanal des HKR eingefüllt und vermessen wurde. Das erhaltene Mahlgut ist in Abbildung 9 dargestellt.





Um die bei der Messung mit Rundkapillaren auftretenden Einlauf- bzw. Auslaufdruckverluste zu korrigieren, wurde zunächst die Bagley-Korrektur durchgeführt. Aufgrund der Strukturviskosität des Materials wurde außerdem die Weißenberg-Rabinowitsch-Korrektur angewandt, um die wahren Schergeschwindigkeiten zu erhalten. Das eingesetzte HKR ist Abbildung 10 dargestellt.



Abbildung 10 HKR RG20 der Firma Göttfert.



Abbildung 11 Scherviskositätsfunktion des Materials ENMAT Y3000P bei 185 °C.

Abbildung 11 zeigt die für das Testmaterial ENMAT Y3000P ermittelte Scherviskositätsfunktion bei 185 °C und die Viskosität ist in Abhängigkeit der Schergeschwindigkeit dargestellt. Tabelle 4 zeigt die zur oberen Abbildung gehörigen Messwerte.

 Tabelle 4
 Messwerte f
 ür die Scherviskosit
 ätsfunktion des Material ENMAT Y3000P.

Schergeschwindigkeit [s ⁻¹]	Viskosität [Pa*s]
10	127
51	125
103	95
465	42
1430	13

Die ermittelte Viskositätsfunktion zeigt für strukturviskose Polymere einen typischen Kurvenverlauf, wobei die hier dargestellte Messmethode im weiteren Projektverlauf für die synthetisierten PHB-Polymere Verwendung finden sollte. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass für eine einzige Messung mittels HKR Probenmengen von ca. 50-100 g benötigt werden, während im Projekt wesentlich niedrigere Probenmengen zur Verfügung standen (typischerweise <500 mg je Charge). Für einzelne Proben wurde daher auf die Platte-Platte-Rheologie (Abschnitt 4.3.8) zurückgegriffen, da hierfür wesentlich niedrigere Mengen an Probenmenterial benötigt werden.

4.3.3 Bestimmung der Schmelzeflussrate (MFR)

Die Bestimmung der Schmelzeflussrate (MFR) stellt eine weitere Methode zur Quantifizierung der Viskosität eines Polymers dar. Im Gegensatz zur HKR handelt es sich hierbei jedoch um eine Einpunkt-Messung anstelle einer Bestimmung über einen Schergeschwindigkeitsbereich. Ein signifikanter Vorteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass deutlich weniger Probenmaterial (ca. 5–10 g) benötigt wird.

Die Bestimmung der Schmelzeflussrate für dieses Projekt wurde gemäß ISO 1133-1 mit einem MFR-Gerät MI-4 der Firma Göttfert durchgeführt, wobei die Messung bei einer Temperatur von 185 °C und einem Gewicht von 2,16 kg erfolgte. Das Material wurde in den Kanal eingefüllt und dabei manuell vorverdichtet. Nach einer Aufheizzeit von fünf Minuten wurde mit der Messung begonnen. Die Materialien wurden vor der Messung für fünf Stunden bei 80 °C in einem Trockenofen vorgetrocknet.

Genau wie bei der HKR-Messung, wurde auch für die MFR-Messung das mittels Messkneter hergestellte und mit Verarbeitungs- und Langzeitstabilisatoren versetzte Material verwendet. Das verwendete MFR-Messgerät ist in Abbildung 12 dargestellt.



Abbildung 12 MFR-Messgerät MI-4 der Firma Göttfert.

Der für das Testmaterial erhaltene Messwert für die Schmelzeflussrate ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Messung des MFR-Wertes war ohne besondere Auffälligkeiten möglich, was die Methode für die Messung der im Zuge dieses Projektes hergestellten Proben anwendbar macht. Da die für die MFR-Messungen mindestens benötigten Probenmengen ca. 10 g betragen, konnten an den synthetisierten Proben keine MFR-Messungen durchgeführt werden, da die hergestellten Mengen je Charge nicht ausreichend waren.
Tabelle 5 Messwert für die Schmelzeflussrate des Material ENMAT Y3000P bei 185 °C.

Gewicht [kg]	Schmelzeflussrate [g/10min]
2,16	5,99 ±0,30

4.3.4 Bestimmung der Molmassenverteilung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC)

Zur Bestimmung der Molmassenverteilungen, der mittleren Molmassen sowie der Polydispersität der synthetisierten Polymere, wurden gelpermeationschromatographische Analysen (GPC) mittels GPC-Anlage der Firma Polymer Standards Service GmbH (PSS) durchgeführt (Abbildung 13). Bei der Gelpermeationschromatographie handelt es sich im ein flüssigchromatographisches Größenausschluss Verfahren, bei der die zu analysierende Probe in einem geeigneten Lösemittel vollständig gelöst und filtriert wird und über eine mit porösen Polymeren gefüllten Trennsäule anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden kann. Das verwendete Lösemittel sowie die Messbedingungen sind dabei stark von der Art des Polymers abhängig. Für PHB wurde das Lösemittel Chloroform verwendet und die Messung fand bei Raumtemperatur isotherm statt.



Abbildung 13 GPC-Gerät der Firma PSS.

4.3.4.1 Messbedingungen

Die in Tabelle 6 dargestellten Messparameter, Detektoren und Säulen wurden für die GPC-Analysen der PHB-Proben entwickelt und für die Messung aller Proben herangezogen. Die Kalibrierung der eingesetzten Brechungsindex- (RI-Detektor) und Lichtstreudetektoren (LS-Detektor) erfolgte mithilfe definierter und engverteilter GPC-Polystyrol-Standards, die direkt von Agilent Technologies bezogen wurden (Ready VLS-Kit für den LS-Detektor, ReadyCal Kit PS H für den UV-Detektor). Der RI-Detektor diente sowohl zur Bestimmung der relativen Molmassen als auch als Konzentrationsdetektor, während der LS-Detektor zur Ermittlung der absoluten Molmassen eingesetzt wurde.

Eluent Chloroform (CHCl₃) PSS SDV Vorsäule Säule PSS SDV linear Ultrahigh in CHCl₃ Trennbereich 100-30.000.000 Da Flussrate 1 ml/min 100 µl Injektionsvolumen Injektionssystem PSS SECcurity 1260 Autosampler Probenkonzentration 2 g/l30 °C Messtemperatur PSS SECcurity Differentialrefraktometer (RI-Detektor) Detektoren PSS SLD 7000/BI-MwA Lichtstreudetektor (LS-Detektor) PSS WinGPC UniChrom Auswertung

Tabelle 6Messparameter sowie verwendete Gerätebestandteile der GPC-Messungen.

4.3.4.2 Probenvorbereitung und Durchführung der Messungen

Die vollständige Lösung des eingewogenen Polymers ist von entscheidender Bedeutung für die präzise Bestimmung der Molmassen und deren Verteilungen. Nur durch eine vollständige Auflösung kann die exakte Konzentration des Polymers ermittelt werden, welche eine direkte Einflussgröße in der Berechnung der Molmasse darstellt. Zudem muss sichergestellt werden, dass nicht nur kürzere Polymerketten in Lösung gehen, sondern auch langkettige Makromoleküle vollständig gelöst vorliegen. Andernfalls kann es zu einer systematischen Unterschätzung der Molmasse und einer Verschiebung der Molmassenverteilung hin zu niedrigeren Werten kommen.

Ein wesentliches Problem von PHB stellt seine hohe Kristallinität dar, welche die vollständige Lösung des Polymers in Chloroform sowohl bei Raumtemperatur als auch bei erhöhter Temperatur ohne vorherige Modifikation erheblich erschwert. Um eine optimale Probenpräparation sowie eine vollständige Lösung des Testpolymers ENMAT Y3000P zu gewährleisten, wurden daher unterschiedliche Verfahren der Probenvorbereitung systematisch analysiert und evaluiert.

Im ersten Versuch wurde eine Suspension von ENMAT Y3000P in Chloroform mit einer Konzentration von 2 g/L hergestellt und für 12 Stunden bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Rühren inkubiert. Dabei konnte keine vollständige Lösung des Polymers festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob eine längere Rührzeit die Löslichkeit verbessert, wurde die Suspension für weitere 96 Stunden unter denselben Bedingungen gerührt. Auch nach dieser verlängerten Inkubationszeit blieb das Polymer weitgehend unlöslich. In einem weiteren Ansatz wurde die Suspension für 72 Stunden unter Rückfluss erhitzt, um die Löslichkeit durch erhöhte Temperatur und verlängerte Einwirkzeit zu optimieren. Dennoch konnte auch unter diesen Bedingungen keine vollständige Lösung des Polymers erzielt werden, was die hohe Kristallinität von PHB als wesentliche Ursache für die eingeschränkte Löslichkeit in Chloroform bestätigt.

Um die Kristallstruktur des Polymers gezielt aufzubrechen und seine Löslichkeit zu verbessern, wurde das Polymer in eine Aluminiumschale gegeben und auf einer Heizplatte auf eine Temperatur von 175 °C erhitzt, die knapp über dem Schmelzpunkt liegt.

Sobald das vollständige Schmelzen erreicht war, wurde die Aluminiumschale mit dem geschmolzenen Polymer rasch in kaltes Wasser getaucht, um eine schnelle Abkühlung und damit eine amorphe Erstarrung des Materials zu gewährleisten. Anschließend wurde das erstarrte Polymer gewogen und in Chloroform bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Rühren suspendiert. Bereits nach zwei Minuten löste sich das Polymer vollständig auf, was eine deutliche Verbesserung der Löslichkeit im Vergleich zu den vorherigen Versuchen darstellt. Die resultierende Lösung konnte daraufhin erfolgreich mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) analysiert werden. Hier soll darauf hingewiesen werden, dass im Zuge des Schmelzens des Polymers zu einer thermischen Schädigung des Polymers kommen kann, welches gegebenenfalls die Molekülmasse negativ beein-flusst.

Die Molmassenverteilung sowie die mittlere Molmasse des Polymers wurden sowohl relativ (mit RI-Detektor) als auch absolut (mit LS-Detektor) bestimmt.

Die erhaltenen Messwerte sind in Tabelle 7 und die Molmassenverteilung in graphsicher Form ist in Abbildung 14 dargestellt.

Tabelle 7Mittlere Molmasse (Mw) sowie Polydispersitätsindex (PDI) des untersuchten Test-
polymers ENMAT Y3000P.

RI-Detektor				
M _w [Da]	PDI			
472.290	2,17			
LS-Detektor				
M _w [Da]	PDI			
444.178	2,17			



Abbildung 14 Molmassenverteilung des Testmaterials ENMAT Y3000P in Chloroform.

Wie aus den ermittelten Daten zu erkennen ist, besteht zwischen den gemessenen Werten für die mittlere Molmasse des PHB lediglich ein geringer Unterschied zwischen der relativen Messung mittels RI-Detektor und der absoluten Messung mittels LS-Detektor. Dieser Unterschied ist mit ca. 6 % im Fehlerbereich der Messmethode von ca. 10 %.

Die mögliche Ungenauigkeit bei der Einwaage oder beim Lösen des Polymers (zum Beispiel bei verunreinigten Proben), hat einen sehr starken Einfluss auf die Bestimmung der absoluten Molmasse mit dem LS-Detektor, da bereits geringe Fehler in der Konzentration signifikante Auswirkungen auf die LS-Ergebnisse haben. Im Gegensatz dazu ist die Bestimmung der Molmassen und Molmassenverteilung mittels RI-Detektor weniger empfindlich gegenüber solchen Fehlern. Da die Messwerte der beiden Detektoren nahezu identisch im Fehlerbereich der Methode liegen, ist es in diesem Fall zuverlässiger, sich auf die relativen Molmassenbestimmungen mittels RI-Detektor zu stützen. Dies ist insbesondere relevant, da bei der Messung der synthetisierten Polymere oft nicht reine Polymere, sondern solche mit geringen Mengen an organischen oder anorganischen Verunreinigungen aus der Biosynthese vorliegen. Diese verunreinigten Polymere lassen sich häufig nicht vollständig schmelzen und lösen, da die Rückstände unlösliche Fermentationsprodukte oder Chemikalien sind, die in der Aufbereitung verwendet wurden. In der vorliegenden Untersuchung wurde festgestellt, dass sich infolge der Verwendung des RI-Detektors ein vergrößerter Fehler zwischen dem eingewogenen Polymer/Rückstand und dem tatsächlichen Polymergehalt in der Lösung ergibt. Dies hat zur Folge, dass die Analyse mittels RI-Detektor als verlässlicher erscheint als die Messung der absoluten Molmasse mit dem LS-Detektor.

4.3.5 Thermogravimetrische Analyse (TGA)

Die Analysen zur Bestimmung der Zersetzungsprozesse und der Reinheit der synthetisierten Polymere, wurden mittels thermogravimetrischer Analyse (TGA) durchgeführt. Unter Stickstoffatmosphäre wurden beginnend bei 30 °C mit einer Heizrate von 10 K/min die Proben (ca. 10 mg) auf 600 °C aufgeheizt. Der temperaturabhängige Massenverlust der Proben wurde über eine Präzisionswage bestimmt. Das verwendete Messgerät (TG 209 F1 Libra der Firma Netzsch) ist in Abbildung 15 dargestellt.



Abbildung 15 TGA TG 209 F1 Libra der Firma Netzsch.

Das Thermogramm des Testmaterials ENMAT Y3000P ist in Abbildung 16 graphisch dargestellt. Es zeigt eine einzelne Abbaustufe mit einer Onset-Temperatur von 284 °C. Der Abbauprozess ist bei einer Temperatur von 303 °C vollständig abgeschlossen, wobei eine Massenänderung von 100 % beobachtet wird. Dies weist darauf hin, dass die analysierte Probe ein reines Polymer ohne anorganische Füllstoffe oder andere Additive ist, die abweichende Zersetzungsprozesse aufweisen könnten.



Abbildung 16 Thermogramm des Testmaterials ENMAT Y3000P.

4.3.6 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Zur Bestimmung des Schmelzverhaltens der synthetisierten Polymere, wurde die Dynamsiche Differenzkalorimetrie (DSC) als Messmethode angewendet. Bei der DSC wird der Wärmefluss zu einer Probe und einer Referenz in Abhängigkeit von der Temperatur oder Zeit gemessen. Während der Messung wird die Temperatur beider Proben in einem definierten Heiz- oder Kühlprogramm kontrolliert, und Unterschiede im Wärmefluss werden erfasst. Thermische Ereignisse wie Schmelzen, Glasübergänge oder Kristallisation führen zu endo- oder exothermen Signalen in der DSC-Kurve.

Um die thermische Vorgeschichte der Probe zu eliminieren und ausschließlich die intrinsischen Materialeigenschaften zu analysieren, wird in der Differentialscanningkalorimetrie (DSC) ein zweistufiges Heizverfahren angewendet. Dabei erfolgt zunächst eine erste Aufheizphase, in der thermische Vorbelastungen, etwa durch vorherige Verarbeitung oder Lagerung, ausgeglichen werden. Anschließend wird die Probe kontrolliert abgekühlt, bevor in einer zweiten Aufheizphase die eigentlichen Materialeigenschaften, wie beispielsweise die Schmelztemperatur, bestimmt werden. Diese zweite Heizkurve gilt als repräsentativ, da sie frei von äußeren Einflüssen der Probenhistorie ist und ausschließlich die charakteristischen thermischen Übergänge des Materials widerspiegelt.

Das verwendete DSC-Gerät (DSC 204 F1 Phoenix der Firma Netzsch) ist in Abbildung 17 dargestellt.



Abbildung 17 DSC 204 F1 Phoenix der Firma Netzsch.

Die Messungen wurden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt mit einer Probenmenge von jeweils ca. 10 mg und einer Heiz-/Kühlrate von 10 K/min. Abbildung 18 zeigt das DSC-Thermogramm des Testmaterials ENMAT Y3000P es sind sowohl die ersten als auch die zweiten Aufheiz- und Abkühlkurven dargestellt. Die Schmelztemperatur des Materials (2. Aufheizung) konnte auf 178,5°C, die Kristallisationstemperatur (erste Aufheizung) auf 65,5 °C bestimmt werden, was mit den Sollwerten gut übereinstimmt.



Abbildung 18 DSC-Thermogramm des Testmaterials ENMAT Y3000P (grün erste Aufheizung, blau 1. Abkühlung, rot 2. Aufheizung, violett 2. Abkühlung).

Im Rahmen der Untersuchung der im Projektverlauf synthetisierten Proben zeigte sich, dass ca. die Hälfte dieser Materialien ein thermisches Verhalten aufwies, das dem des Referenzmaterials ENMAT Y3000P weitgehend entspricht. Die bei der ersten und zweiten Heizphase aufgenommenen DSC-Kurven wichen nur geringfügig voneinander ab (siehe Abbildung 19), was auf eine hohe thermische Stabilität und Reproduzierbarkeit hinweist. Einige andere synthetisierte Proben hingegen (siehe Abbildung 20) zeigten während der ersten Heizphase lediglich einen einzelnen Peak. In der zweiten Heizphase traten jedoch teilweise zusätzliche Schultern in den Kurven auf, was auf beginnende Abbauprozesse der Polymerstruktur hinweist. Es ist anzunehmen, dass der beobachtete Abbau durch im Synthese- oder Aufbereitungsprozess verbliebene Substanzen (zum Beispiel nicht gänzlich abgetrennte Rückstände des starken Oxidationsmittels NaClO) begünstigt wird. Die Messwerte der durchgeführten DSC-Untersuchungen sind Tabelle 22 zusammengefasst.



Abbildung 19 DSC-Kurve einer in einem Kolbenversuch synthetisierten Probe (Probe 1) mit lediglich einem Schmelzpeak in der zweiten Aufheizung (rot erste Aufheizung, blau 1. Abkühlung, grün 2. Aufheizung, violett 2. Abkühlung).



Abbildung 20 DSC-Kurve einer im Fed-Batch-Prozess synthetisierten Probe (Probe 47) mit zwei Schmelzpeaks in der zweiten Aufheizung (violett erste Aufheizung, blau 1. Abkühlung, braun 2. Aufheizung, schwarz 2. Abkühlung).

4.3.7 Bestimmung der Abhängigkeit der Dichte von Druck und Temperatur mittels pvT-Messung

Das Abkühlen einer Polymerschmelze und die damit einhergehenden Zustandsänderungen im Material können durch das pvT-Diagramm veranschaulicht werden. Dieses Diagramm beschreibt die Wechselwirkungen zwischen Druck (p), spezifischem Volumen (v) und Temperatur (T) und ermöglicht eine detaillierte Analyse des Kristallisationsverhaltens des Polymers.

Zur Charakterisierung des Abkühl- und Kristallisationsverhaltens der synthetisierten Polymerchargen wurde eine pvT-Messung am Testmaterial ENMAT Y3000P durchgeführt. Da das Material während der Messung über einen längeren Zeitraum hohen Temperaturen ausgesetzt ist, wurde auf das unter Abschnitt 0 mithilfe eines Messkneters hergestellte und mit einem Verarbeitungsstabilisator versehene Compound zurückgegriffen. Aufgrund der geringen zugesetzten Mengen ist eine signifikante Beeinflussung der Materialeigenschaften durch den Stabilisator nicht zu erwarten.

Vor den Messungen wurden die Granulate für fünf Stunden bei 80 °C in einem Vakuumtrockenschrank vorgetrocknet. Die Messungen erfolgten isotherm, beginnend bei der höchsten Temperatur mit steigenden Druckwerten. Das pvT-Verhalten wurde mittels eines Hochdruck-Kapillarrheometers RG20 der Firma Göttfert bestimmt.

Angesichts der Temperaturempfindlichkeit von PHB (Degradationstemperatur 220 °C) sowie der potenziellen thermischen Degradation während der Messung wurde eine maximale Temperatur von 220 °C festgelegt. Die Untersuchung erfolgte im Druckbereich zwischen 100 bar und 1200 bar, um das Verhalten des Materials unter unterschiedlichen Belastungsbedingungen zu analysieren (Abbildung 21).



Abbildung 21 pvT-Diagramm des Testmaterials ENMAT Y3000P.

Wie zu erwarten war, ist im oben dargestellten pvT-Diagramm ein deutlicher Sprung im spezifischen Volumen der Polymerschmelze, um den Schmelzpunkt des Polymers zu erkennen. Dieser Sprung rührt daher, dass es durch das Aufbrechen der dicht gepackten Kristallstruktur zu einer Expansion der Schmelze und somit zu einer Verringerung der Dichte kommt. Extrapolation der Kurven auf Normaldruck liefert eine Dichte des Polymers von 1,24 g/cm³, was sehr gut mit dem Sollwert von 1,25 g/cm³ des ENMAT Y3000P übereinstimmt.

Da die für die pvT-Messungen mindestens benötigten Probenmengen ca. 50 g betragen, konnten an den synthetisierten Proben keine pvT-Messungen durchgeführt werden, da die hergestellten Mengen je Charge nicht ausreichend waren.

4.3.8 Bestimmung der Schmelzeviskosität mittels Platte-Platte Rheologie

Die Bestimmung der Scherviskositätsfunktion des Testmaterials bei niedrigen Schergeschwindigkeiten wurde mit einem Platte-Platte Rheometer der Firma Anton in einem Schergeschwindigkeitsbereich zwischen 0,01 und 100 s⁻¹ bei einer Messtemperatur von 180 °C in Rotation durchgeführt. Vor der Messung wurde das Material für 5 Stunden bei 80 °C vorgetrocknet. Gemessen wurde von niedrigen Schergeschwindigkeiten zu höheren Schergeschwindigkeiten. Die resultierende Scherviskositätsfunktion ist in Abbildung 22 dargestellt. Die erhaltenen Messwerte sind in Tabelle 8 aufgelistet. Sowohl die Erst- und Wiederholungsmessung zeigen einen nahezu identischen Kurvenverlauf, was die Wiederholbarkeit der Messung verdeutlicht.



Abbildung 22 Viskositätsfunktion des Testmaterials ENMAT Y3000P bei 180 °C in einem Schergeschwindigkeitsbereich zwischen 0,01 und 100 s⁻¹.

Schergeschwin- digkeit [s ⁻¹]	Viskosität [Pa*s] Erstmes- sung	Viskosität [Pa*s] Wie- derholungsmessung
0,010	580	580
0,015	513	513
0,022	554	472
0,032	523	447
0,046	504	431
0,068	492	420
0,100	482	411
0,147	475	406
0,215	470	403
0,316	467	400
0,464	465	398
0,681	462	397
1,000	460	395
1,470	456	392
2,150	453	389
3,160	448	386
4,640	440	381
6,810	430	372
10,000	416	359
14,700	393	343
21,500	362	319
31,600	314	285
46,400	243	227
68,100	176	166
100,000	120	102

Tabelle 8Messwerte für die Scherviskosität des Testmaterials ENMAT Y3000P mittels Scherviskosität ermittelt mittels Platte-Platte Rheometer.

4.3.9 Herstellung der Probekörper für die Bestimmung der Zug- und Schlageigenschaften

Da im Rahmen des Projekts lediglich geringe Mengen an synthetisiertem PHB zur Verfügung standen, wurde die Herstellung der Prüfkörper mittels Spritzgusses ausgeschlossen. Stattdessen fiel die Wahl auf den Laborkneter (Probenmenge <50 g), eine Laborplattenpresse sowie den Thermo Haake MiniLab Mikro-Compounder, da diese Verfahren eine Verarbeitung kleinerer Materialmengen ermöglichen.

Für die Entwicklung geeigneter Prüfmethoden sowie die Herstellung der Probekörper (Zug- und Schlagstäbe) zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften wurde das Testmaterial ENMAT Y3000P verwendet. Die Herstellung der Prüfkörper erfolgte in einem ersten Versuch direkt aus dem Polymerpulver über eine Plattenpresse. Zunächst wurde das Testmaterial ENMAT Y3000P getrocknet und anschließend direkt zu Platten und Zugstäben verarbeitet. Hierfür kam eine Laborplattenpresse zum Einsatz, wobei die Verpressung unter einer Temperatur von 180 °C und einem Druck von 100 bar durchgeführt wurde. Es wurde ein Pressrahmen für Standard-1A Zugprüfkörper (DIN EN ISO 527-2) sowie runde Platten mit einem Durchmesser von 100 mm verwendet.

Die so hergestellten Prüfkörper wiesen jedoch signifikante Lufteinschlüsse auf (Abbildung 23) was ihre Eignung für die geplanten mechanischen Prüfungen erheblich beeinträchtigte.



Abbildung 23 Über eine Plattenpresse hergestellte Prüfkörper aus pulverförmigem ENMAT Y3000P.

Um diese Lufteinschlüsse zu vermeiden und potenzielle Schädigungen des Polymers während der Verarbeitung zu minimieren, wurde entschieden, das pulverförmige Testmaterial vor der Herstellung der Prüfkörper einem zusätzlichen Verarbeitungsschritt mittels Laborkneter der Firma Brabender (Abbildung 24) zu unterziehen.



Abbildung 24 Messkneter der Firma Brabender.

Dabei erfolgte eine Plastifizierung des Materials nach der Zugabe geeigneter Stabilisatoren zur Erhöhung der Verarbeitungs- und Langzeitstabilität. Hierzu wurden jeweils 0,05 % Irganox 1010 und 0,05 % Irgafos 168 in einer Polymermatrix aus 99,9 % ENMAT Y3000P eingesetzt.

Für die Präparation wurde das PHB-Pulver zunächst gemeinsam mit den Stabilisatoren abgewogen und zu einem Dry Blend trocken vermischt. Anschließend erfolgte das einminütige Kneten der Mischung im Laborkneter bei 180 °C. Das nach dem Abkühlen erhaltene Material wurde dann mittels Plattenpresse (180 °C, 100 bar) zu quadratischen Platten (200x200x4 mm³) gepresst, aus welchen über eine Fräse Schlagstäbe entnommen wurden. Die so erhaltenen Platten wiesen eine leicht raue Oberflächenstruktur, jedoch keine Lufteinschlüsse auf.

Zur Fertigung standardisierter 5A-Zugprüfkörper (DIN EN ISO 527-2 5A) wurde das hergestellte Dry Blend direkt im Thermo Haake MiniLab (Abbildung 25) weiterverarbeitet. Hierfür wurden kleine Mengen von etwa 5 g des Dry Blends in das Gerät eingebracht und mittels konischer Schnecken sowie eines Bypass-Systems bei einer Temperatur von 180 °C für ca. eine Minute bei einer Drehzahl von 50 min⁻¹ plastifiziert und homogenisiert (Abbildung 25 links). Anschließend erfolgte der Transfer des plastifizierten Materials in die Spritzgusseinheit der Maschine (Abbildung 25 rechts), wo die Zugprüfkörper hergestellt wurden.



Abbildung 25 Thermo Haake MiniLab.

Die erhaltenen Zugprüfkörper sind in Abbildung 26 dargestellt. Sowohl die Zugprüfkörper als auch die hergestellten Platten für die Schlagstäbe wiesen nach der Herstellung aufgrund der hohen Empfindlichkeit das PHB eine leichte Gelbfärbung auf, was auf eine geringfügige Schädigung des Polymers durch die Verarbeitung hinweisen könnte.



Abbildung 26 Über Thermo Haake MiniLab hergestellte Zugstäbe des Testmaterials EN-MAT Y3000P.

4.3.10 Bestimmung der Zugeigenschaften

Die Zugprüfung wurde in Anlehnung an DIN EN ISO 527 durchgeführt. Für die Untersuchungen kam eine Universal-Prüfmaschine (Typ: Z010, Fa. Zwick-Roell) zum Einsatz. Es wurde der E-Modul, die Zugfestigkeit sowie die maximale Bruchdehnung bestimmt. Für die Bestimmung der Zugeigenschaften des Testmaterials ENMAT Y3000P wurden die unter 4.3.9 hergestellten Zugprüfkörper 5A verwendet. Vor der Messung wurden die Prüfkörper für sieben Tage im Normklima konditioniert. Die Zuggeschwindigkeit betrug 5 mm/min zur Bestimmung der Bruchdehnung und 1 mm/min zur Bestimmung des E-Moduls. Für das Testsystem wurden folgende Parameter ermittelt.

Materialeigenschaft	Messwert
Streckspannung	33 MPa
Bruchdehnung	1,8 %
E-Modul	2.600 MPa

Tabelle 9Materialdaten des Referenzmaterials ENMAT Y3000P.

Geringe Abweichungen in den Messwerten zwischen Datenblatt- und ermittelten Werten sind vermutlich unterschiedliche Prüfbedingungen, wie die Größe und Herstellungsverfahren der Zugstäbe und der Zuggeschwindigkeiten zurückzuführen. Weiterhin kann es sein, dass es durch die Verarbeitung des sehr empfindlichen PHB bereits zu einer geringfügigen Schädigung des Polymers und somit einer Versteifung kam. Dies kann jedoch kaum vermieden werden.

4.3.11 Bestimmung der Kerbschlagzähigkeit

Die Messungen der Kerbschlagzähigkeit wurden in Anlehnung an DIN EN ISO 179-1 an gekerbten Schlagstäben, edgewise mit einem 0,5 J Schlagpendel im Normklima und nach 16-stündiger Konditionierung der Proben durchgeführt.

4.4 Untersuchung der Blendeigenschaften PHB/PVAc

Da im Rahmen des Projekts lediglich geringe Mengen an PHB für detaillierte Untersuchungen, insbesondere zur Mechanik und zum Fließverhalten, zur Verfügung standen, wurde in Abstimmung mit dem pbA über alternative Untersuchungen beraten. Besonders vielversprechend erwies sich dabei die Untersuchung des Blendverhaltens von PHB mit dem deutlich weicheren und flexibleren Polyvinylacetat (PVAc) als Blendpartner, mit dem Ziel, die mechanischen Eigenschaften des PHB zu verbessern, die maßgeblich durch dessen hohe Kristallinität beeinflusst werden. Vor diesem Hintergrund wurden am SKZ Blendversuche mit zwei kommerziell erhältlichen PHB- und PVAc-Polymeren durchgeführt, um deren (Kalt)Schlag-, Zug- und Viskositätseigenschaften zu analysieren.

Mithilfe einer Direktextrusionsanlage bestehend aus einem Doppelschneckenextruder (Abbildung 27 rechts), einer Extrusionsdüse (Abbildung 28) und einem Glättwerk (Abbildung 29) wurden insgesamt 5 unterschiedliche PHB/PVAc Blends hergestellt und direkt zu Bändern mit den Abmaßen von 35x3,0 mm verarbeitet.



Abbildung 27 Direktextrusionsanlage Dr. Collin ZK 25 T (rechts) mit Glättwerk (links).



Abbildung 28 Extrusionsdüse (Fa. Dr. Collin).



Abbildung 29 Glättwerk (Fa. Dr. Collin).

Die für die Direktextrusion verwendete Compoundierschneckenkonfiguration ist in Abbildung 30 dargestellt.



Abbildung 30 Schneckenplan für die Direktextrusion.

Nach Absprache mit dem pbA, wurde sich für die Blend- und Direktextrusionsversuche beiden Polymere Biomer P316P (geeignet für Extrusion) und dem PVAc Vinnex 2525 der Wacker Chemie AG entschieden. Um den Einfluss des PVAc auf die Materialeigenschaften des PHB bewerten zu können, wurden die in Tabelle 10 dargestellten Rezepturen hergestellt. Zusätzliche Additivierungen der Polymere waren nicht notwendig.

Tabelle 10 Rezepturen der hergestellten PHB/PVAc Blends.

Probenbezeichnung	Biomer P316P [Gew. %]	Vinnex 2525 [Gew. %]
B01	100	0
B02	90	10
B03	80	20
B04	70	30
B05	60	40

Die verwendeten Prozessparameter sind in Tabelle 11 dargestellt. Vor der Verarbeitung wurden die Materialien für fünf Stunden bei 80 °C vorgetrocknet.

Tabelle 11	Prozessparameter für	die Herstellung	der PHB/PVAc	Blends mittels	Direktextru-
sion.					

Prozessparameter							
Probenname			B01	B02	B03	B04	B05
Schmelzetem	peratur	[°C]	169	169	169	169	169
Schmelzedrug	:k	[bar]	20	22	22	22	23
Schneckendre	ehzahl	[1/min]	160	120	100	100	100
Drehmoment		[%]	58	62	64	65	65
Vakuumdruc	k	[mbar]	atm.	atm.	atm.	atm.	atm.
	Durch-	soll	5	5	5	5	5
Gesamt	satz	ist					
	[kg/h]	150					
	Name		Biomer P316	Biomer P316P PHB			
Waage 1	Durch-	[%]	100	90	80	70	60
	satz						
	Name		Vinnex 2525	PVAc	1	1	
Waage 2	Durch- satz	[%]	-	10	20	30	40
	Einzug	soll	kalt	kalt	kalt	kalt	kalt
	[°C]	ist					
	T ₇ 1 (0C)	soll	145	145	145	145	145
Tem		ist	145	145	145	145	145
	T ₇ 2 10C1	soll	160	160	160	160	160
	122 [°C]	ist	160	160	160	160	160
	T ₇ 3 [ºC]	soll	160	160	160	160	160
	125 [C]	ist	160	161	160	160	160
per T	T ₇ 4 [0C]	soll	160	160	160	160	160
atu	124 [C]	ist	160	160	160	160	160
ren	Adapter	soll	160	160	160	160	160
	Tz5 [°C]	ist	158	160	160	160	160
	Klemm-	soll	168	169	169	169	169
	flansch Tz5 [°C]	ist	168	169	168	169	169
	Werk-	soll	165	170	170	170	170
	zeug Tz6 [°C]	ist	165	170	170	170	170
	Walze	soll	15	30	30	30	30
	oben	ist	16	30	30	30	30
	Walze	soll	40	55	55	55	30
Collin Glätt-	mitte	ist	40	55	55	55	30
werk	Walze	soll	30	30	30	15	15
	unten	ist	30	30	30	16	15
	Dreh- zahl	[1/min]	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58

Aus den hergestellten Bändern wurden schließlich mittels Fräse Schlag- sowie Zugprüfkörper entnommen und auf ihre mechanischen- ((Kalt)Schlag- sowie Zugeigenschaften) und Fließeigenschaften vergleichend untersucht (siehe Abschnitt 5.3).

4.5 Technoökonomische Analyse und Ökobilanz

Das Ziel dieses Arbeitspakets war es auf Basis des Laborprozesses (siehe Kapitel 4.1 und 4.2) eine Ökobilanz nach ISO 14040/44 durchzuführen. Zusätzlich wurde ebenfalls eine technoökonomische Analyse durchgeführt, um zu veranschaulichen wie ökonomisch der Prozess bei einer Skalierung auf 10.000 t t/a ist.

4.5.1 Untersuchungsrahmen und Sachbilanzen de Ökobilanz

Die Ökobilanz orientiert sich an den Ökobilanz Normen DIN EN ISO 14040/44 und ist demnach in folgende Schritte gegliedert:

- Festlegung des Untersuchungsrahmens
- Erstellung der Sachbilanz
- Wirkungsabschätzung
- Interpretation

Die Wirkungsabschätzung sowie die Interpretation sind in Kapitel 5.4 zu finden und wurden mit der Software *LCA for Experts* (Version 10.8.0.14, ehemals *GaBi*) durchgeführt.

Untersuchungsrahmen:

Die deklarierte Einheit wurde dabei zunächst auf die Herstellung eines kg PHB aus dem Laborprozess definiert. Es handelt sich um eine cradle-to-gate-Betrachtung, bei der folgende Prozesse berücksichtigt wurden:

- Bereitstellung der Rohstoffe
- Herstellung des Produkts
- Entsorgung der Abfälle

Da es sich um ein Forschungsvorhaben und keinen realen Prozess handelt, wurden folgende Prozesse nicht berücksichtigt:

- Transporte zum Herstellungswerk / Labor
- Transporte vom Herstellungswerk zu Kunden
- Verpackung der Rohstoffe

Die Datengrundlage für die Sachbilanz bildet der kontinuierliche Prozess aus Kapitel 4.1 sowie die Aufbereitung aus Kapitel 4.2 und wurde in Zusammenarbeit mit der TH Nürnberg erhoben. Die im kontinuierlichen Prozess (Abbildung 31) hergestellten Mengen an PHB wurden ohne Einbeziehung eines Effizienzfaktors auf 1 kg skaliert. Die Herstellung des PHB wurde in drei Prozesschritte aufgeteilt: der kontinuierliche Prozess (CONTI), das Downstream Processing (DSP) und die Entsorgung der Abfälle aus dem Downstream Prozess (SW).



Abbildung 31 Prozessschema für die Herstellung von 1 kg PHB im kontinuierlichen Verfahren. Da insbesondere der Downstream Prozess und die darin genutzten Lösemittel einen erheblichen Anteil an den Umweltauswirkungen haben, wurden zudem zwei Szenarien betrachtet, die ein Recycling der Lösemittel beinhalten. Beim vorliegenden Prozess handelt es sich um einen Labormaßstab, während im optimierten industriellen Prozess davon auszugehen ist, dass weniger Material und weniger Lösemittel eingesetzt werden, und/oder dieses zumindest zum Teil zurückgewonnen wird. Um eine dennoch notwendige Aufbereitung der genutzten Lösemittel zu berücksichtigen, wurde ein closed-loop Recycling des EtOH und des DMC zu 50 % bzw. 80 % modelliert. Dadurch verringert sich der Einsatz von neuen Lösemitteln im DSP, sowie der Aufwand der Lösemittelentsorgung im Prozess SW.

Sachbilanz:

Die für die Sachbilanz notwendigen Daten (Tabelle 12 bis Tabelle 14) wurden primär im Labor aufgenommen. Im Falle von Datenlücken (Energie- und Druckluftverbrauch der Prozesse) wurden diese geschätzt oder anderweitig angenähert und dokumentiert.

Input	Menge	Einheit	Datensatz
Dobalyzaarin	5 46	a/h	DE: Glycerine by-product rapeseed methyl
Kongrycerin	5,40	g/11	ester (RME) (price allocated)
NaOH	0.072	a/h	DE: Sodium hydroxide (caustic soda) mix
NaOH	0,972	g/11	(100%)
Antifoam	0,052	g/h	Polydimethylsiloxan (Approximation)
Wasser	81,94	g/h	RER: Water (deionised)
Energie	0,12	kWh/h	DE: Electricity grid mix (2022)
Druckluft	0,014	Nm ³ /h	RER: Compressed air
Output	Menge	Einheit	Datensatz
Rohprodukt I	87,8	g/h	Input in Conti II
Abluft O ₂	3,45	g/h	Oxygen [Inorganic emissions to air]
Abluft CO ₂	0.55	/1	Carbon dioxide (biotic) [Inorganic emissions
	0,55	g/11	to air]

Input	Menge	Einheit	Datensatz
Rohprodukt I	87,80	g/h	Output in Conti I
Rohglycerin	3,08	g/h	DE: Glycerine by-product rapeseed methyl ester (RME) (price allocated)
NaOH	0,240	g/h	DE: Sodium hydroxide (caustic soda) mix (100%)
Antifoam	0,05	g/h	Polydimethylsiloxan (Approximation)
Wasser	40,875	g/h	RER: Water (deionised)
Energie	0,12	kWh/h	DE: Electricity grid mix (2022)
Druckluft	0,0412	Nm ³ /h	RER: Compressed air
Output	Menge	Einheit	Datensatz
Fermentations- brühe	120	g/h	Input in DSP
Abluft O ₂	10,388	g/h	Oxygen [Inorganic emissions to air]
Abluft CO ₂	1,657	g/h	Carbon dioxide (biotic) [Inorganic emissions to air]

Tabelle 13Sachbilanz kontinuierlicher Prozess Stufe II

In beiden Stufen des kontinuierlichen Prozesses wurde das Kühlwasser bzw. eine für den Kompressor notwendige Energie ausgeklammert, da keine belastbaren Werte vorlagen und davon ausgegangen werden kann, dass dessen Beitrag zu den Umweltwirkungen weniger als 1 % ausm. Der angegebene Energieverbrauch umfasst die Leistung des Rührers, sowie eine Heiz- und Kühlenergie. Von der Nährlösung wurden lediglich das Rohglycerin, sowie der Antifoam berücksichtigt. Alle weiteren Salze liegen in einer zu geringen Konzentration vor und wurden somit nicht betrachtet, da ebenfalls davon ausgegangen werden kann, dass sie unter die Abschneidekriterien fallen. Des Weiteren wird nur der kontinuierliche Prozess betrachtet. Alle Beiträge bis zum Erreichen des kontinuierlichen Betriebs (wie z.B. die Aktivierung des Organismus) werden ausgeklammert. Es wurde aber darauf geachtet, dass 99 % der eingesetzten Masse- und Energiebeiträge abgedeckt wurden.

Input	Menge	Einheit	Datensatz
Fermentationsbrühe	2,78	kg	Output in Conti II
DMC	10	kg	Eigene Modellierung siehe Tabelle 16
FtOH	20	la	DE: Ethanol (96%) (hydrogenation with ni-
LIOII	20	ĸg	tric acid)
Energie	1,18	kWh/h	DE: Electricity grid mix (2022)
Output	Menge	Einheit	Datensatz
Gefälltes und ge-	0.036	ka	Produkt
trocknetes PHB	0,050	ĸg	TIOUUKI
Wässrige Lösung	1 79	Ira	DE: Municipal wastewater treatment (vari-
(nach Zentrifuge)	1,78	кд	able sludge treatment)
3-Stoff Gemisch:	20.95	Ira	Lagut in SW
DMC, EtOH, H ₂ O	50,85	кд	input in Sw
Pagidual biomaga	0.114	kg	GLO EOL: Biological waste to compost-
Residual blomass	0,114		ing- auxiliary dataset

Die Energie des DSP setzt sich zusammen aus der Energie, die für folgende Prozesse benötigt wird: Extraktion, Trocknung, Sterilisation und Zentrifugieren. Das Dreistoffgemisch wird dem Prozess SW zugeführt, die wässrige Lösung, sowie die Biomassen Restströme werden entsorgt.

Im Fall der Szenarien verändern sich die Mengen der eingesetzten Lösemittel folgendermaßen.

Input	Menge des Lösemittels in kg pro Szenario			
	0 % Recycling 50 % Recycling		80 % Recycling	
DMC	10	5	2	
EtOH	20	10	4	

Tabelle 15 Änderung der eingesetzten Lösemittel nach Szenario.

Input	Menge	Einheit	Datensatz
Mathanal	64	~	DE: Methanol from natural gas (integrated
Wiethanoi	04	g	technologies)
<u> </u>	20	~	DE: Carbon monoxide via synthesis gas
0	20	g	(by-product hydrogen)
O ₂	16	g	DE: Oxygen (gaseous)
Output	Menge	Einheit	Datensatz
DMC	90	g	Input in DSP
H2O	10	~	DE: Municipal wastewater treatment (vari-
	18	g	able sludge treatment)

Tabelle 16Sachbilanz Annäherung Herstellung DMC

Da für DMC kein passender Datensatz vorliegt, wurde die Herstellung von DMC angenähert. Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus ist in Gleichung (1) gezeigt. Der Katalysator *CuCl* sowie die Reaktionsenergie wurden nicht berücksichtigt, da es sich um eine exotherme Reaktion handelt.

$$2 CuCl + 2 CH_3OH + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow 2 Cu(OCH_3)Cl + H_2$$

$$2 Cu(OCH_3)Cl + CO \rightarrow (CH_3O)_2CO + 2 CuCl$$
(1)

Tabelle 17 Entsorgung Azeotrop.

Input	Menge	Einheit	Datensatz		
Dreistoffge-					
misch: DMC, E-	30,85	kg Output aus DSP			
tOH, H ₂ O					
Energie	28	MJ	DE: Electricity grid mix (2022)		
Output	Menge	Einheit	Datensatz		
H ₂ O	0,85	kg	DE: Municipal wastewater treatment (varia-		
			ble sludge treatment)		
DMC	10	kg	DE: Hazardous waste (high calorific value) in		
			waste incineration plant (15% H2O content)		
EtOH	20	kg	DE: Hazardous waste (high calorific value) in		
			waste incineration plant (15% H2O content)		

Die Auftrennung des nach dem Downstream Processing anfallenden 3-Stoff Gemisch stellt eine Herausforderung dar, da die drei Lösemittel im vorliegenden Mischungsverhältnis miteinander ein Azeotrop bilden (Tabelle 17). Zum vereinfachten Umgang in der Ökobilanz wurde angenommen, dass eine Energie von 28 MJ benötigt wird, um die anfallende Menge von 30,85 kg Lösemittelgemisch aufzutrennen. Das entspricht der aufsummierten Energie *E*, die nach Gleichung 2 notwendig ist, die Lösemittel einzeln zu verdampfen.

$$E = \Delta H_v \cdot m_{LM} + c_v \cdot m_{LM} \cdot \Delta T \tag{2}$$

Anschließend werden die Lösemittel einzeln entsorgt bzw. thermisch verwertet oder je nach Szenario teilweise intern zurückgeführt. Während bei der thermischen Verwertung ein Vorteil außerhalb der Systemgrenzen entsteht, wird bei einem teilweisen Recycling der Einsatz der Lösemittelmenge im DSP dementsprechend reduziert.

4.5.2 Technoökonomische Analyse

Ziel ist es, die einzelnen Prozessschritte auf eine Produktionsmenge von 10.000 Tonnen PHB pro Jahr zu skalieren. Der Fokus liegt dabei auf den notwendigen Beschaffungskosten für das Material sowie den laufenden Produktionskosten, welche auf Basis der im Labormaßstab erhaltenen Daten skaliert werden. Die Preise werden dabei, wo mengenmäßig relevant und verfügbar, durch konkrete Angebote, andernfalls durch Recherche handelsüblicher Preise und Annahme einer Kostenreduktion bis 50%, ermittelt. Bei der Skalierung sollen Einbußen bei der spezifischen Ausbeute oder der Produktqualität vermieden werden. Dafür ist es notwendig, die Wachstumsparameter und Prozessbedingungen für die Mikroorganismen aus den Vorversuchen möglichst unverändert beizubehalten. Dies gilt insbesondere für kritische Punkte, wie die Durchmischung und die damit verbundenen lokalen Nährstoffgradienten oder mechanischen Belastungen der Mikroorganismen durch Scherkräfte [42]. Daher läuft die Skalierung des Laborprozesses auf großindustriellen Maßstab in der Praxis über den Zwischenschritt der Demonstrationsanlage im Pilotmaßstab ab. In diesem Schritt werden die Prozessbedingungen konsolidiert und technologischen Probleme des Produktionsmaßstabes erkannt und behoben, um zusätzliche hohe Kosten im industriellen Produktionsmaßstab zu vermeiden [43]. In dieser theoretischen Analyse des technoökonomischen Potentials kann dieser Schritt nicht betrachtet werden und es wird angenommen, dass die Laborergebnisse eins zu eins übertragbar sind. Die bisherigen Versuche dieses Projekts zeigten, dass eine Laufzeit der einzelnen Fermentationen von 1400 Stunden erreicht werden kann. Für die 8.760 h eines Jahres ergeben sich so sechs Fermentationszyklen pro Jahr und es bleiben noch 60 h je Zyklus für die Entleerung, Reinigung, Befüllung und den erneuten Aufbau eines Steady-States. Bei unveränderten Dilutionsbedingungen ergibt sich für die Produktion von 10.000 t ein im Vergleich zu Fed-Batch-Systemen mit gleicher Jahresproduktion geringes Reaktionsvolumen von 1.226 m³ pro Fermentationsstufe. Um eine ausreichende Durchmischung des Reaktionsraumes zu gewährleisten, wird dieses auf sechs Fermenter je Stufe aufgeteilt. Mit 205 m³ liegen diese noch im Bereich der kommerziell erhältlichen Bioreaktoren, was teure Sonderanfertigungen verhindert und sich so positiv auf die Investitionskosten auswirkt. Auch vermindert sich die Zeit bis zum Erreichen des SteadyStates und die Zyklen können zeitlich versetzt gefahren werden, was die Ausfallzeiten durch Wartung und Anfahren minimiert [44].

Betrachtet werden insgesamt drei verschiedene Szenarien: "Ungünstig" bewegt sich dabei am oberen Rand der Kostenabschätzung, jedoch nicht im unrealistischen Bereich. "Optimistisch" betrachtet gleichermaßen realistische Annahmen, jedoch am unteren Ende der Kostenspanne. "Grundlegend" beinhaltet Annahmen aus allen Bereichen der Kostenabschätzungen, wodurch es preislich zwischen den beiden anderen Szenarien liegt, aber nicht zwangsläufig das Wahrscheinlichste ist.

5 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden werden die wesentlichen Ergebnisse der im Rahmen des Projekts durchgeführten Arbeiten zusammenfassend dargestellt und diskutiert. Den Ausgangspunkt bildet die Entwicklung und Durchführung der kontinuierlichen Fermentation, gefolgt von der Optimierung des nachgeschalteten Downstream Processings inklusive der analytischen Charakterisierung der im Prozess synthetisierten Polymere.

Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der Untersuchung und Quantifizierung der Blendeigenschaften von Polyhydroxybutyrat (PHB) mit Polyvinylacetat (PVAc), mit dem Ziel, das Eigenschaftsprofil des Biopolymers gezielt zu erweitern. Abschließend erfolgt eine umfassende Bewertung des Gesamtprozesses im Hinblick auf seine ökologische und ökonomische Tragfähigkeit, unter Anwendung einer Ökobilanz sowie einer techno-ökonomischen Analyse.

5.1 Kontinuierlichen Fermentation

Die folgenden Kapitel befassen sich mit der Diskussion der Ergebnisse zur kontinuierlichen Fermentation.

5.1.1 Umsetzung des Langzeitbetriebs der Fermentation

Während der Projektlaufzeit wurden insgesamt zehn kontinuierliche Fermentationen durchgeführt (Tabelle 18). Angaben zur Analyse des PHB sind in 5.2.5 zu finden.

Konti-Nr.	Laufzeit in h	Reaktortypus (R1 / R2)		
1	k.A.	Minifors 1 / Minifors 1		
2	192	Minifors 1 / Minifors 1		
3	98	Minifors 1 / Minifors 1		
4	166	Minifors 1 / Minifors 1		
5	1126	Minifors 1 / Minifors 1		
6	336	Minifors 2 / Minifors 2		
7	194	Minifors 1 / Minifors 1		
8	574	Minifors 1 / Minifors 1		
9	192	Minifors 1 / Minifors 1		
10	788	Minifors 1 / Minifors 1		

Tabelle 18Übersicht zu den kontinuierlichen Fermentationen.

Die in der ersten Projekthälfte gestarteten kontinuierlichen Prozesses Nr.1 bis Nr. 4 wurden v.a. für die technische Optimierung des Versuchsaufbaus benötigt. Mit zunehmender Laufzeit der kontinuierlichen Prozesse (z.B. Konti Nr. 5 mit 1126 h) ergaben sich zunehmend technische Herausforderungen, die bei zeitlich kürzeren Prozessen nicht auftraten oder nicht ins Gewicht gefallen sind. Eine wiederholt auftretende Herausforderung war die Schaumbildung in beiden Reaktorstufen bei den benötigten Begasungsraten und Rührerdrehzahlen. Durch den sich massiv aufbauenden Schaum wurde die Zugabe von Lauge als pH-Korrekturmittel und die Zugabe des Feeds erschwert, da aufgrund des Schaums die Flüssigkeiten nicht direkt, sondern nur zeitlich versetzt in das Reaktionsvolumen gelangten, was die Regelung im Falle des pH-Werts auf den Sollbereich unmöglich machte. Die Zudosierung des Antischaummittels über die Schaumsonde erwies sich als nicht zeitlich ausreichend, weshalb zu einem Beimischen des Antischaummittels zum Nährmedium übergangen wurde. Teils waren hohe Mengen Antischaummittel notwendig, um den Prozess stabil zu halten und einen vorzeitigen Abbruch zu verhindern. Abbildung 32 zeigt beispielhaft den Effekt durch die Zugabe eines Antischaummittels über einen Feed.



Abbildung 32 Durch die Zugabe des Antischaummittels kann die Schaummittel deutlich reduziert werden.

Das zu Beginn verwendete Antischaummittel war über mehrere Monate hinweg nicht lieferbar, weshalb Versuche mit anderen verfügbaren Antischaumitteln zur Identifizierung der geeigneten Dosierung durchgeführt wurden. Hierbei zeigte sich, dass eine hohe Konzentration des Antischaummittels Struktol J673A sich negativ auf das Wachstum der Zellen auswirkt. Die Auswirkungen des Antischaummittels und Effekte der Konzentration auf Zellenphysiologe und die Analytik des PHBs konnte im Zeitrahmen des Projektes nicht im Detail untersucht werden. Das Antischaummittel würde in der in Schüttelkolben als mindestens erforderlichen identifizierten Konzentration eingesetzt.

Für den kontinuierlichen Prozess ist die kontinuierliche Förderung von Nährmedien in den Reaktor und von Fermentationsbrühe aus dem Reaktor essenziell. Die für die Prozessteuerung maßgeblichen Größen sind hier die Flussraten in Bezug auf das Volumen des Reaktors. Hier stellte sich heraus, dass die Regelung der verwendeten Schlauchpumpen über die Förderraten der Pumpen als nicht dauerhaft mit konstanten Flussraten umsetzbar ist, da hier mit zunehmender Prozesszeit aufgrund der einsetzten Schlauchaufweitung die geförderte Volumenrate abnimmt (Abbildung 33 B). Die Regelung wurde daher über Waagen unter den Vorlagenbehältern umgesetzt.



Abbildung 33 Die zu Beginn des Projektes verwendete Regelung der Flussraten über die Schlauchpumpen zeigte ein über die Zeit dynamisches Verhalten. A: Im Versuchsaufbau Verwendete 6-fache Schlauchpumpe, B: Schwankende Flussraten bei der Regelung über die Schlauchpumpe aufgrund der Schlauchaufweitung.

Die technische Realisierung der Regelung erwies sich insbesondere im Hinblick auf die Pumpen und Regelstrecken als sehr anspruchsvoll (siehe Abbildung 34).



Abbildung 34. Detailliertes Schema zur zweistufige Bioreaktorkaskade, aus dem die Anzahl der Pumpen und der damit verbundene Regelungsaufwand gut erkennbar wird [45].

Neben Problemen durch Schaumbildung zeigten sich beim Langzeitbetrieb über mehrere 100 Stunden häufig Einschränkungen bei der Prozessregelung durch Ausfall der Sonden (pH, pO2, Antischaum), Verschleiß und Ausfall der Rührerantriebe und Ausfall der für die Regelung eingesetzten Software. Dies erschwerte es den Prozess über längere Zeitintervalle stabil zu fahren und zuverlässig steady-state Bedingungen zu erreichen.

Für das AP 2 soll hier exemplarisch ein Versuch (Konti 5) näher beschrieben werden (Abbildung 35). Ein erster Steady-State stellte sich in Stufe 1 nach der Anfahrphase ab ca. 17 h bis zur Prozesszeit von 380 h ein, in dem 17 gresBTM/L gebildet wurden. Nach Schaumproblemen und einer dadurch bedingte Fehlregulierung des pH-Werts sowie einer Kontamination mit einem Luftkeim beim Wechsel des Nährmediumsbehälter pendelte sich der Prozess ab t = 600 h zumindest bei Stufe 1 auf eine 500 h anhaltende stabile kontinuierliche Biomasseproduktion ein (Abbildung 35).

Bei Wechsel des Vorlaufmediums nach 530 h Stunden wurde Nährmedium mit erhöhter Ammoniumkonzentration eingesetzt, um die Biomasse zu steigern. Hierdurch konnte ab ca. 620 h Betrieb die mittlere BTM-Konzentration um ca. 30 % auf 22 g_{res}BTM/L gesteigert werden. Vermutlich kam es bei diesem Wechsel des Vorlaufbehälters zu einer Kontamination mit dem Luftkeim *Sphingomonas paucimobilis*. Ca. 120 h nach Auftreten der Kontamination konnte der Produktionsorganismus *C. necator* den Fremdkeim jedoch vollständig überwachsen, weshalb der Prozess fortgesetzt wurde. Neben technischen Störungen stellt eine Kontamination ein kritisch zu bewertendes Risiko bei kontinuierlichen Prozessen dar. Der Prozess erwies sich jedoch auch unter diesen Gesichtspunkten als unerwartet robust und stabil.



Abbildung 35 Validierungslaufs mit über 1100 h kontinuierlichen Betrieb mit einer Verdünnungsrate D = 0,1 h⁻¹ (BTM = Biotrockenmasse). Im oberen Graph (A) sind die Ergebnisse die Stufe 1 (Biomasse-Generierung), im unteren Graphen (B) sind die Ergebnisse der Stufe 2 (PHB-Einlagerung) gezeigt. Die Textfelder beschreiben aufgetretene Probleme und technische Ausfälle. Trotz zahlreicher technischer Defekte und Zwischenfälle sowie einer Kontamination durch einen Luftkeim erwies sich der Prozess als robust und pendelte sich ab t = 600 h zumindest bei Stufe 1 auf einen stabilen Zustand ein.

In der zweiten Stufe führten ein defekter Antrieb des Rührwerks zweimal (170 h – 483 h und ab 960 h) zu ungenügender Durchmischung und einem kritischen Sauerstoffpartialdruck pO2 von <4 % und verhinderte so das ein Einstellen eines steady-state. Ein relevantes Ergebnis aus diesem technischen Defekt ist, dass während des Zeitraums mit schlechter Sauerstoffversorgung die PHB-Einlagerung von über 4 gPHB/L nicht ansatzweise erzielt werden konnte. Trotz dieser Umstände konnte für Reaktorstufe 1 für mindestens 500 h ein stabiler steady-state erreicht und somit kontinuierlich Biomasse und PHB produziert werden.

Insgesamt konnten zahlreiche wichtige Schwachstellen im Dauerbetrieb (z. B. Verstopfen von Schläuchen durch Partikel, vorzeitiger Versuchsabbruch durch zu starke Schaumbildung im Bioreaktor) identifiziert und langfristig behoben werden. Trotz der oben genannten Herausforderungen konnte der Prozess über 1100 Stunden bzw. über 45 Tage kontinuierlich betrieben werden. Hierbei wurde in Reaktorstufe 1 für mindestens 500 Stunden ein stabiler Zustand mit einer kontinuierlichen Biomasseproduktion von 22 g_{res}BTM/L (\pm 10 %) erreicht (Abbildung 35 A). Diese Ergebnisse wurden mehrfach in anderen kontinuierlichen Versuchsläufen bestätigt.

In diesen Basisversuch und den weiteren kontinuierlichen Prozessen konnten trotz erfolgreicher Limitierung des Ammoniumgehalts in Reaktor 2 als Trigger für die Einlagerung von PHB und ausreichender Versorgung mit Glycerin nur geringe PHB-Mengen nachgewiesen werden. Dies könnte durch eine erhöhte Sulfatkonzentration in Reaktor 2 zurückzuführen sein. Da für die beabsichtigte Erhöhung des Ammoniumkonzentration zur Steigerung der Zelldichte Ammonium als Sulfatsalz eingesetzt wurde, aber der Sulfatverbrauch durch die Zellen üblicherweise deutlich unter dem Ammoniumverbrauch liegt, kommt es folglich zu einer Erhöhung der Sulfatkonzentration in Reaktor 1 und folglich ebenfalls zu Erhöhung in Reaktor 2. In Reaktor 2 wurden bis zu 10 g/L Sulfat gemessen, was möglicherweise die PHB-Einlagerung in Reaktor 2 inhibiert hat. Ein weiterer denkbarer Grund für die geringen PHB-Mengen könnte die Sauerstoffversorgung der Zellen in Reaktor 1 sein, was sich möglicherweise nachhaltig auf die Zellphysiologie ausgewirkt hat und so die PHB-Einlagerung in Stufe hemmte. In einem Versuch, in dem der Rührer in Reaktor 2 ausgefallen war und somit die Sauerstoffversorgung der Zellen, während der PHB-Einlagerung unzureichend war, konnte ebenfalls kein PHB extrahiert werden. Die Synthese von PHB benötigt NADPH als Cosubstrat, das wiederum in direkt oder indirekt sauerstoffabhängigen Stoffwechselprozessen gebildet wird. Steht den Zellen Sauerstoff oder NADPH nicht zu Verfügung, kann die PHB-Biosynthese nicht erfolgen.

Die kontinuierliche Prozessführung ist bei Bioprozessen im Gegensatz zu chemischen Verfahren noch unüblich und wird kaum im industriellen Maßstab umgesetzt. Im Rahmen dieses und anderer nicht gezeigten Versuche konnten wichtige technische und prozesstechnische Schwachstellen im kontinuierlichen Dauerbetrieb identifiziert und eliminiert werden. In wissenschaftlichen Veröffentlichungen wurde bisher die PHB-Produktion über max. 260 Stunden gezeigt [42]. Der gezeigte kontinuierlicher Betrieb über 1100 Stunden ist daher eine herausragende Leistung und ein wichtiger Schritt hin zu einer wirtschaftlichen Verwertung auch im größeren Maßstab.

5.1.2 Einflüsse der Verweilzeiten und Nährstoffe

Die Beeinflussung der Molmasse des PHBs sollte durch die Variation der Verweilzeiten der Zellen in Reaktor 2 (AP4), in dem die PHB-Einlagerung stattfindet, und durch Veränderung von Nährstoffkonzentrationen (AP5) untersucht werden. Aufgrund der oben beschriebenen technischen Herausforderungen und der häufig sehr gering ausfallenden PHB-Einlagerung war es nicht möglich im gesetzten Zeitrahmen dieser Fragestellungen abschließend zu untersuchen.

Der in der Literatur beschriebene Zusammenhang, dass die zahlenmittlere Molmasse Steigerung der Ammoniumsulfatkonzentration im Zulauf zunimmt [12] konnte nicht bestätigt werden, weil vermutlich aufgrund einer zu hohen Sulfatkonzentration die PHB- Einlagerung ausblieb. Da in dieser Veröffentlichung nur Angaben zur Ammoniumkonzentration im Zulauf, aber keine Angaben zu den Konzentrationen im Reaktor gemacht wurden, ist eine genauere Einschätzung nicht möglich.

Laut Wang *et al.* [46] kann eine zu hohe Sulfatkonzentration die PHB-Produktion in *Burkholderia cepacia* hemmen. In den Versuchen wurden gezeigt, dass Sulfatkonzentrationen über 1,25 g/L sich signifikant auf die PHB-Einlagerung auswirken. Bei der höchsten untersuchten Sulfatkonzentration von 1,92 g/L sank die PHB-Einlagerung auf 50 % ab. Die Autoren gaben als Ursache hierfür eine Konkurrenz zwischen der durch die erhöhte Sulfatverfügbarkeit begünstigte Zellteilung mit der PHB-Einlagerung an. Da in dieser Studie ein Bakterium, das während des Wachtsums PHB einlagern kann, und ein auf Glucose basierendes Nährmedium eingesetzt wurde, bleibt die Übertragbarkeit auf das in diesem Projekt verwendete Bakterium *C. necator* fraglich, das PHB hauptsächlich unter Nährstoff getriggerter Einschränkung des Wachstums einlagert.

Für die Variation der Verweilzeit wurde eine weitere Reaktorkaskade in Betrieb genommen, die über das größere Arbeitsvolumen einen breiteren Variationsbereich ermöglicht. Die Umsetzung des kontinuierlichen Betriebs in der zusätzlichen Reaktorkaskade stellte sich als technisch aufwendig heraus, da für diese Reaktorkaskade eine andere Software für die Bedienung und Regelung genutzt werden musste. Da die Lieferung eines für diese Reaktorkaskade benötigten Reaktors mehrere Monate verzögert erfolgte, war die Systemumstellung im verbleibenden Projektzeitrahmen in Kombination mit den Herausforderungen in anderen Arbeitspaketen nicht zielführend umsetzbar. Die Variation der Verweilzeiten und Ermittlung der Molmassen konnten daher nicht weiterverfolgt werden.

5.2 Downstream Processing und Analytik

Wichtige Aspekte des Downstream Processings waren technische Umsetzbarkeit, wirtschaftliche und nachhaltige Aspekte sowie Molmassen erhaltende Methoden.

Um die im kontinuierlich betriebenen Prozess auch kontinuierlich anfallende Fermentationsbrühe mit bis zu 60 L pro Woche sinnvoll verarbeiten zu können, müssen Schritte zur Inaktivierung des Zellstoffwechsels zwingend und zu Abtrennung der Zellen aus der Fermentationsbrühe idealerweise kontinuierlich erfolgen. Die Extraktion für die Analytik erfolgte hauptsächlich über Natriumhypochlorit. Für die Gewinnung des PHBs in größere Menge würde die Extraktion mit den Green Solvent DMC erarbeitet.

5.2.1 Hitzeinaktivierung

Es wurden drei Methoden zur thermischen Inaktivierung von *C. necator* aus einer kontinuierlichen Produktion getestet, wobei Temperaturen zwischen 60 °C und 80 °C verwendet wurden: Inaktivierung im Wasserbad bei kontinuierlich zulaufender Fermentationsbrühe, Inaktivierung durch das Durchströmen eines in einem Wasserbad befindlichen Schlauchs (Typ Rohrreaktor) und Pumpen durch einen temperieren Rührkessel (Typ Rührkessel).

Mindestanforderung an diesen Inaktivierungsschritt war die Denaturierung der PHB-abbauenden PHB-Depolymerase. Die Wirksamkeit der Hitzeinaktivierung wurde im Ausplattierungsverfahren zur Bestimmung der Lebendkeimzahl ermittelt. Ein bei der Hitzebehandlung auftretender Zellaufschluss kann die nachfolgende Extraktion begünstigen und wurde ebenfalls in Vorversuchen untersucht (Abbildung 36). Die Vorversuche zeigten, dass die Hitzeinaktivierung zu Zelllyse führt, was die PHB-Extraktion potentiell unterstützen kann.



Abbildung 36 Aufgrund der im Funktionsprinzip Rohrreaktor umgesetzte Hitzeeinwirkung bei 80 Grad freigesetzte Proteinkonzentrationen bei vier Versuchen (V1 bis V4). Proteinkonzentrationen würden mittels Biuret-Nachweis bestimmt. Die Hitzebehandlung führte zu einem Anstieg gelöster Proteine am Ablauf der zur Hitzeinaktivierung eingesetzten Schlauchreaktors (Ablauf HI) auf das nahezu Dreifache im Vergleich zu Konzentration im Reaktor 2 (RefR2), was auf Hitze bedingte Zelllyse hinweist. Die Zelllyse scheint im Sammelbehälter weiterhin stattzufinden [41].

Prinzipiell konnte gezeigt werden, dass mit Temperaturen bei 80 °C die höchste Reduktion der Lebendkeimzahl mit bis zu 99,99 % umgesetzt werden konnte. Trotz effizientester Inaktivierung der Zellen zeigte die Umsetzung im Rohrreaktor im Labormaßstab technische Probleme (z.B. Verstopfung des Schlauchs). Hier sind weitere Anpassungen Material und Aufbau sinnvoll. Ein Rohrreaktor bietet entscheidende Vorteile gegenüber einem Rührkesselreaktor, da alle Mikroorganismen im Rohreaktor dieselbe Verweilzeit und Temperaturbehandlung erfahren. Dadurch kann die Reaktionszeit gezielt auf Organismus und Temperatur abgestimmt werden, was prinzipiell eine vollständige Inaktivierung ermöglichen kann. Im Gegensatz dazu weist der Rührkessel eine Verweilzeitverteilung auf, was bedeutet, dass ein Teil der Mikroorganismen den Reaktor vorzeitig - also mit einer kürzeren als der durchschnittlichen Verweilzeit. Daher kann im Rührkessel nicht garantiert werden, dass alle Zellen ausreichend lang behandelt werden, um eine vollständige Inaktivierung zu erzielen.

Die für die Analyse genommenen Proben ergab keine nachweisbaren Mengen an PHB. Da PHB auch als Hitzeschutz für Zellen diskutiert wird, sollten weitere Versuche mit PHB-positiven Proben durchgeführt werden.

5.2.2 Abtrennung der Zellen von der Fermentationsbrühe

Ein maßgeblich prozesslimitierender Schritt bei der Verarbeitung großer Mengen von Fermentationsbrühe war die Zellernte mittels Zentrifugation. Um PHB für Verarbeitungsversuche bereitstellen zu können, müssen bis zu 60 L Fermentationsbrühe wöchentlich verarbeitet werden können. Erst durch den Kauf einer Standzentrifuge, mit der pro Durchlauf die Zellen aus 3 L anstatt nur aus 0,24 L im Vergleich zur Tischzentrifuge abgetrennt werden konnten, konnte die Arbeitszeit deutlich reduziert werden (Tabelle 19). Für die Verwendung der industriell üblichen Tellerseparatoren war das anfallende Volumen nicht ausreichend. Die Zellenernte stellte für die Aufbereitung größerer Mengen Fermentationsbrühe einen signifikanten Flaschenhals dar.

Tabelle 19 Übersicht zu benötigter Arbeitszeit für die Zentrifugation von 60 L Fermentationsbrühe mit den zur Verfügung stehenden Zentrifugen

	Standzentrifu (Hettich)	ıge	Tischzentrifug (Eppendorf)	Tischzentrifuge (Eppendorf)		
Gefäße	4		6			
Max. Volumen pro Gefäß	0,75	L	0,04	L		
Max. Volumen gesamt	3	L	0,24	L		
Dauer pro Durchlauf	20	min	10	min		
Anzahl Durchläufe bei 60 L	20		250			
Benötigte Zentrifugationszeit	6,7	h	41,7	h	•	

5.2.3 Extraktion mit Natriumhypochlorit

Die Extraktion mittels Natriumhypochlorit (NaClO) wurde als Referenzmethode für den Großteil der Proben durchgeführt, da diese Methode bereits zu Projektbeginn ausreichend etabliert vorlag. Die im Zuge der Probenvorbereitungen aufgetretenen Auffälligkeiten im Schmelzverhalten wurden teilweise auf bereits abreagiertes NaClO oder auf aus der Fermentation mitgeführte Substanzen wie Antischaummittel zurückgeführt. Für Details siehe 5.2.5.

Bei Extraktionsversuchen mit frisch bezogenem NaClO im Vergleich zum gelagerten und vermutlich bereits teilweise abreagierten NaClO zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der extrahierten PHB-Masse. Ausgehend von der gleichen Fermentationsbrühe konnte mit mutmaßlich abreagiertem NaClO eine Masse von 3,7 g/L erzielt werden. Mit frischem Reagenz scheint neben der Biomasse auch PHB zersetzt worden zu sein, da lediglich 1,0 g/L extrahiert werden konnte. Dass NaClO mit steigender Konzentration und Einwirkdauer PHB zersetzt, wurde im Zusammenhang mit der Verwendung als Dispersion mit Chloroform beschrieben [47].

5.2.4 Extraktion mit Dimethylcarbonat (DMC)

DMC wurde als Lösemittel für eine umweltfreundliche Extraktionsmethode unter den Aspekten nichtfossiler Ursprung, biologische Abbaubarkeit und geringer Toxizität erarbeitet. Durch schrittweise Optimierungen konnte zuverlässig PHB mit hoher Reinheit >99 % extrahiert werden. Hinsichtlich der nachfolgenden Analytik zeigten mit DMC extrahierte Proben keine Auffälligkeiten z.B. hinsichtlich des Schmelzverhaltens oder brauner Rückstände (siehe auch 4.3.4.)

Um den Einsatz des Fällungsmittels Ethanol zu reduzieren, wurden verschiedene Volumina-Verhältnisse untersucht. Bei den untersuchten Fällungsmittelverhältnissen von 1:2, 1:3 und 1:4 (DMC:Ethanol) zur Extraktion von PHB aus in Kolbenversuchen kultivierten Bakterien konnte in der nachgeschalteten Bestimmung der Molmassen mittels GPC keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 20)**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** Es wurde eine mittlere Molmasse M_w von 180.593 Da und ein PDI von 2,08 bei einer relativen Abweichung von 4 % ermittelt (Messmethode siehe 4.3.4).

Tabelle 20 Übersicht zum Einfluss verschiedener Volumenverhältnisse zwischen DMC und dem Fällungsmittel Ethanol. Es konnte weder bei der mittleren Molmasse noch beim PDI ein nennenswerter Einfluss festgestellt werden

Nr.	Extraktion	GPC-Analyse					
	Beschreibung	Mw [Da]	MW	Stabw.	PDI	MW	Stabw.
8	DMC - EtOH 1:2	188.290			2,06		
9	DMC - EtOH 1:3	179.670	180.593	4,0%	2,02	2,08	3,2%
10	DMC - EtOH 1:4	173.820			2,15		

Im Zuge der weiteren Optimierungen wurden die Abtrennung der Restbiomasse durch eine Filtration mit Edelstahlfilter und die Rückgewinnung des ausgefallenen PHB aus der organischen Lösung durch eine Vakuumfiltration ersetzt. Ein weiterer Vorteil dieser Filtrationsschritte ist, dass größere Volumina in kürzerer Zeit verarbeitet werden können. Dies ist vor allem auch hinsichtlich des im Antrag formulierten Ziels der Extraktion im Technikumsmaßstab von großem Vorteil.

Die Reinheit sowie die thermophysikalischen Eigenschaften des mit DMC extrahierten PHB sind als sehr gut zu bewerten. Die Ergebnisse zeigen, dass DMC ein wirksames Lösungsmittel zur Gewinnung von PHB aus Biomasse ist und in Anbetracht der geringen Toxizität und der hohen biologischen Abbaubarkeit von DMC im Leckage-Fall eine echte Alternative zur Verwendung von umweltschädlichen chlorierten Lösungsmitteln darstellt. Die mögliche Rückgewinnung von DMC als Lösemittel und Ethanol als Fällungsmittel unterstreichen den Beitrag zu Ressourceneffizenz und Nachhaltigkeit.

5.2.5 Analytik hinsichtlich PHB-Reinheit und Molmassen

Insgesamt wurden 48 Proben mit unterschiedlichen Probenursprung extrahiert und analysiert. Von den 48 Proben stammten 9 Proben aus Schüttelkolbenversuchen und 39 Proben aus in Bioreaktoren durchgeführten Versuchen. 43 Proben wurden mit Natriumhypochlorit und 9 Proben mit DMC extrahiert. Von den 43 mit Natriumhypochlorit extrahierten Proben wiesen 7 Proben für analytische Untersuchungen nicht ausreichende Materialmengen auf, bei 22 Proben bildeten sich beim Schmelzversuch zur Vorbereitung für die GPC-Messungen braune Rückstände ließen sich nicht schmelzen und lösen. Folglich waren lediglich 14 Proben, die mit NaCIO extrahiert wurden, hinsichtlich der Molmassen analysierbar. Alle mit DMC extrahierten Proben konnten hinsichtlich der Molmassen untersucht werden.

Die Reinheit der im Zuge dieses Projektes synthetisierten Proben wurde, wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben, mittels TGA-Messungen analysiert. Proben hoher Reinheit zeichneten sich durch einen einzigen Abbauprozess bei einer Onset-Temperatur von ca. 280 °C aus mit im Idealfall keiner Restmasse bei einer Temperatur von 600 °C. Abbildung 37 zeigt das Thermogramm einer im kontinuierlichen Syntheseprozess hergestellten und mittels DMC extrahierten PHB-Probe (Probe 42) hoher Reinheit.



Abbildung 37 Thermogramm eines einer im kontinuierlichen Syntheseprozess hergestellten und mittels DMC extrahierten PHB-Probe (Probe 42) hoher Reinheit.

Abbildung 38 zeigt ein exemplarisches Thermogramm einer Probe mit geringer Reinheit. Bei der dargestellten Probe handelt es sich um eine mittels kontinuierlichem Biosyntheseverfahren hergestellte Probe (Probe 39), die mit NaClO extrahiert wurde. In der Thermogravimetrischen Analyse lassen sich vier deutliche Abbauprozesse identifizieren, wobei eine vergleichsweise hohe Restmasse von 23,96 % verbleibt. Das Polymer weist in diesem Fall noch signifikante Verunreinigungen durch Reststoffe und Abbauprodukte aus der Fermentation und Extraktion auf, welche sich durch unterschiedliche thermische Zersetzungsprozesse manifestieren. Generell zeigten mit NaClO extrahierte Proben eine tendenziell geringere Reinheit als solche, die mit DMC behandelt wurden. Eine tabellarische Übersicht aller untersuchten Proben und ihrer jeweiligen Messergebnisse ist in Tabelle 22 dargestellt.



Abbildung 38 Thermogramm eines einer im kontinuierlichen Syntheseprozess hergestellten und mittels DMC extrahierten PHB-Probe (Probe 39) niedriger Reinheit.

Ein auffälliges Merkmal der mit NaClO extrahierten Proben war, wie oben beschrieben, deren eingeschränktes Löslichkeitsverhalten sowie das Auftreten brauner Rückstände nach dem Schmelzversuch zur Probenvorbereitung für die GPC-Analysen, wie in Abbildung 39 ersichtlich. Diese Eigenschaften erschwerten in mehreren Fällen die Durchführung der Gelpermeationschromatographie und verhinderten mitunter gänzlich die Bestimmung der Molmassen. Betroffen waren sowohl Proben aus Schüttelkolben- als auch aus Bioreaktorversuchen, bei denen NaClO als Extraktionsmittel eingesetzt wurde.

Insbesondere bei den Bioreaktoransätzen war der Zusatz großer Mengen an Antischaummittel erforderlich, um übermäßige Schaumbildung während der Fermentation zu kontrollieren. Hier naheliegend, dass Rückstände des Antischaummittels – abhängig vom Prozessverlauf und den jeweiligen Prozessabschnitten – während des Downstream Prozesses nicht vollständig entfernt werden konnten. In Kombination mit der NaClO-Extraktion oder potenziellen Abbauprodukten des Hypochlorits könnte dies zu einer unvollständigen Reinigung geführt haben, die die molmassenbasierte Analytik signifikant beeinträchtigt.

In der thermogravimetrischen Analyse (TGA) spiegelte sich das unzureichende Reinigungsverhalten wider: Hier zeigten NaClO-extrahierte Proben Restmassen von bis zu 26 %. Eine solche Abnahme der Reinheit der PHB-Proben bei der Verwendung von NaClO ist bereits in der Literatur bekannt [47]. Im Projekt wurde mit 12 Vol.-% NaClO gearbeitet. Durch dessen Abreagieren war die effektive Konzentration vermutlich deutlich geringer, was schließlich die Reinheit des synthetisierten PHB und den Proteinrest deutlich negativer beeinflusst, was die hohen Rückstände in den TGA-Analysen erklärt.


Abbildung 39 Aufgrund von Verunreinigungen nicht schmelzbare PHB-Proben.

Von 43 mit NaClO extrahierten Proben konnten lediglich 14 hinsichtlich der Molmassen untersucht werden. Alle 9 mit DMC extrahierten Proben wiesen unabhängig von den Details der Extraktion in der Regel eine Reinheit von > 99 % auf und konnten problemlos mit GPC hinsichtlich der Molmassen analysiert werden.

Proben mit einer Reinheit von mehr als 95 % (TGA) und entsprechendem DSC-Verhalten (ein einziger Schmelzpeak in der ersten Aufheizung (siehe Tabelle 22) konnten erfolgreich mittels GPC gemessen werden. Details zur Messmethode siehe 4.3.4. Prinzipiell wiesen alle 19 hinsichtlich der Molmassen untersuchbare Proben einen PDI bei ca. 2 (+/-13 %). Eine Probe zeigte mit einem PDI von 4,15 eine im Vergleich zu den übrigen Proben sehr breite Molmassenverteilung und sowohl im Chromatogramm der GPC-Analysen (siehe Abbildung 40), als auch in der zweiten Aufheizung der DSC-Kurven (siehe Abbildung 41) zwei deutliche Peaks (siehe Tabelle 22).



Abbildung 40 Molmassenverteilung einer im Fed-Batch-Prozess synthetisierten und mit NaClO extrahierten Probe (Probe 47) mit vermutetem deutlichem thermischem Abbau aufgrund von Reststoffen aus der Synthese; gemessen in Chloroform.

Dies deutet darauf hin, dass im Falle dieser Probe der Abbau des Polymers im Vergleich deutlich stärker stattgefunden hat als bei den restlichen Proben, die teilweise in der zweiten Aufheizung lediglich leichte Schultern zeigen. Dies ist vermutlich auf das Vorhandensein von, den Abbauprozess verstärkenden, Rückstände (zum Beispiel das stark oxidierend wirkende NaClO) aus dem DSP zurückzuführen. Diese Probe zeigte auch in der TGA-Analyse lediglich eine Reinheit von 93 %.



Abbildung 41 DSC-Kurve einer im Fed-Batch-Prozess synthetisierten und mit NaClO extrahierten Probe (Probe 47) mit zwei Schmelzpeaks mit vermutetem deutlichem thermischem Abbau aufgrund von Reststoffen aus der Synthese mit zwei Schmelzpeaks in der zweiten Aufheizung (violett erste Aufheizung, blau 1. Abkühlung, braun 2. Aufheizung, schwarz 2. Abkühlung.

Die mittleren Molmassen zeigten mit 68 % Abweichung eine deutlich größere Streuung als die PDI-Werte und reichten von 29.289 Da bis 416.830 Da, wobei Proben aus Schüttelkolbenversuchen tendenziell höhere mittlere Molmassen über 170.000 Da und Proben aus kontinuierlichen Prozessen eher mittlere Molmassen im Bereich von 29.289 bis 135.000 Da aufwiesen. Die relativ hohe Streuung bei den GPC-Analysen kann daher rühren, dass es beim notwendigen Schmelzprozess zur Probenvorbereitung für die GPC-Analyse aufgrund der nicht ausreichend abgetrennten Rückstände aus der Fermentation bei einer Extraktion, zum Beispiel mit NaClO, bereits zu einer leichten irreversiblen thermischen Schädigung des Polymers kommt, die jedoch im Vergleich zu den DSC-Messungen aufgrund der wesentlich niedrigeren Temperaturen und Einwirkzeit der Temperatur geringer ausfällt. Aus diesem Grund können zwar bei den DSC-Analysen gegebenenfalls Schultern bei den zweiten Aufheizungen auftreten (Abbildung 41), die sich jedoch bei den GPC-Analysen nicht als separate Peaks erkenntlich sind (siehe Abbildung 42). Ein Zusammenhang zwischen mittlerer Molmasse und Extraktionsmethode war nicht erkennbar.

Die Extraktion mit dem starken Oxidationsmittel Natriumhypochlorit scheint bei der verwendeten Konzentration bzw. der Konzentration des abreagierten NaClO keinen starken degradierenden Effekt hinsichtlich der Polymerkettenlänge zu haben. Die PDI weisen mit ca. 2 auf relativ enge Molmassenverteilungen hin. Dies ist auch in Deckung mit den Ergebnissen von Hahn et al. [47]. Zudem zeigt sich in den ersten Aufheizungen der DSC-Messungen in fast allen Fällen lediglich ein einziger Schmelzpeak, der dann jedoch bei der zweiten Aufheizung teilweise Schultern aufweist. Dies deutet in diesen Fällen auf eine teilweise Degradation der Polymere während des Schmelzens in der DSC hin (vergleiche Abschnitt 4.3.6).



Abbildung 42 Molmassenverteilung einer synthetisierten Probe einer synthetisierten Probe mit vermutetem geringem thermischem Abbau aufgrund von Reststoffen aus der Synthese aufgrund von Reststoffen aus der Synthese in Chloroform (grün UV-Signal, rot RI-Signal).

Das Referenzmaterial ENMAT Y3000P wies eine mittlere Molmasse von 472.290 Da und einen PDI von 2,17 auf. In Tabelle 21 sind exemplarisch die Molmassen zum in 4.3.4 näherbeschriebenen Versuch aufgeführt. Aufgrund der teils zu geringen PHB-Mengen und den oben beschriebenen Schwierigkeiten hinsichtlich des Lösens konnten nur sehr eingeschränkt Effekte der Prozessführung auf die Molmassen und die Molmassenverteilung untersucht werden (Tabelle 22).

Tabelle 21 GPC- sowie TGA-Messung zu in Abbildung 35 gezeigten kontinuierlichen Prozess über 1126 h (Konti 5). Es sind Proben aus dem Reaktor 1 und Reaktor 2 aufgeführt. Alle Proben wurden mit NaClO extrahiert. Probe 27 weist eine für den kontinuierlichen Betrieb hohe mittlere Molmasse auf. Dies ist auf die Probenahme zu Beginn des kontinuierlichen Betriebs zurückzuführen.

	Fermentation		GPC-	Analyse		TGA-Analyse		
Nr.	Stufe	Prozesszeit [h]	Anmerkung	Mw [Da]	PDI	Reinheit [%]	Restmasse [%]	Abbaustufen
0	Referenzmate	rial ENMAT Y30	00P	472.290	2,17	100,09	-0,09	1
21		44	Anlaufphase	-	-	97,81	2,19	1
22		145	steady-state	135.300	2,11	95,71	4,29	1
23	Realttor 1	164	steady-state	-	-	83,01	16,99	2
24	ICCARIOI I	188	steady-state	-	-	64,96	35,04	3
25		197	steady-state	-	-	73,40	26,60	2
26		332	steady-state	-	-	96,74	3,26	1
27		20	Anlaufphase	305.150	2,05	97,80	2,20	1
28		26	Anlaufphase			97,34	2,66	1
29		121	steady-state	127.820	2,05	95,01	4,99	2
30	Reaktor 2	140	steady-state			91,78	8,22	3
31	1	148	steady-state	163.040	2,34	90,41	9,59	3
32	1	174	defekter Rührer	-	-	86,57	13,43	3
33	1	309	defekter Rührer	-	-	92,49	7,51	2
34	Produkt-B.			-	-	77,97	22,03	4

Nr.		DETAILS		GPC-Ar	ıalyse		TGA-Analys	se	DSC-Analyse 2.	Aufheizung	DSC-Analyse 1	Aufheizung
	Fermentation	Extraktionsmitt cl	Analytik (*nicht geschmolzen/ nicht gelöst; - zu wenig Material)	Mw [Da]	ICId	Reinheit [%]	Restmasse [%]	Anzahl Abbaustufen	Schmelztemperatur [°C]	Anzahl Schmelzpeaks	Schmelztemperatur [°C]	Anzahl Schmelzpeaks
0	ENMAT Y3000P			472.290	2,17	100,09	-0,09	1	177,3	1	178,5	-
	EMK	NaClO	*	,		97,75	2,25	1	177,4	1	178,7	-
5	EMK	NaClO	* :			98,70	1,30	1	179,1	1 .	180,6	
ب	EMK FMK	NaCIO NaCIO	*	- 256.210	- 1 80	97,30 97.22	2,70 2.78		176,4	1	179,3	
- 50	EMIK	NaClO	*			93.75	6.25	2	176.7	1-2	178	-
9	EMK	NaClO		309.500	1,82	90,10	96,90	2	178,7	1	179,1	-
7	EMK	DMC		416.830	1,82	99,98	0,02	1	177,5	1	182,5	1
8	EMK	DMC		188.290	2,06	100,40	-0,40	1	176	1	181,9	1
6 01	EMK	DMC		173.820	2,02	99,23 00.78	0,77	- 1	174,3		174,3 178	
11	Batch	NaClO	*	-		98.73	0,22	-	176.3		178.5	
12	EMK	DMC		222.630	1,95	66,77	0,23	1	175,5	2	178	-
13	EMK	NaClO	*	-		80,01	19,99	3	174,1	1	176	1
14	EMK	NaClO				95,00	5,00	1	177,1	1-2	178,3	1
15	Konti 3, Produkt-B.	NaCIO	* :	,		93,01	6,99	2	169,7	1-2	171,5	
16	Konti 4	NaCIO	*			87,52	12,48		175,9	1	177,8	1
17	Konti 4 Vonti 4	NaCIO	' *	1		93,00	7,00	,	- 176 0	ı c		
10	Vonti 4 Brodult D	NaCIO	. *			01.41	10,50	ç c	1/0,0	7 -	1/1/9	
20	Konti 4, Frodukt-B. Konti 4 Produkt-B	NaCIO	· *			01,41 81 83	18.17	0 6	100,2		167.4	
21	Konti 5	NaClO	,			97.81	2.19	,	177.1	1-2	178.3	-
22	Konti 5	NaClO		135.300	2,11	95,71	4,29	. 1	-		-	
23	Konti 5	NaClO	*			83,01	16,99	2	-			
24	Konti 5	NaClO				64,96	35,04	3				
25	Konti 5	NaClO				73,40	26,60	2	-			
26	Konti 5	NaClO	*			96,74 67.60	3,26		- 1707		- 101	
17	Konti 5	NaCIO	*	061.608	2,05	97.30	2,20	Υ.	1/9,0	1 -	181,/ 1705	1
29	Konti 5	NaClO		127.820	2,05	95,01	4,99	- 2		• 1		• 1
30	Konti 5	NaClO	*			91,78	8,22	3	-			
31	Konti 5	NaClO		163.040	2,34	90,41	9,59	3	172,8	1-2	173	1
32	Konti 5	NaClO		'		86,57	13,43	е С		T		
55 24	Konti 5 December D	NaCIO	ı *	ı		77.07	10,7	7	- 1701		- 1691	
35	Konti 6, Produkt-B.	NaClO	*			77.10	22.90	4	174.1	1	172.9	
36	Konti 6, Produkt-B.	NaClO	*			78,92	21,08	3	172,6	1-2	175,4	3
37	Konti 6, Produkt-B.	NaOH + SDS	*	1		78,41	21,59	3		0		1
38	Konti 6, Produkt-B.	NaOH + SDS	*			83,94	16,06	3	-	0		
39	Konti 6, Produkt-B.	NaCIO	*			76,04	23,96	4	171,1	1-3		
40	Konti 6, Produkt-B.	NaClO N-ClO	*	29.289	1,88	93,25	6,75 5 44	2 0	155,1	2	164,3	
41	Konti 6 Produkt-B.	DMC	÷	- 93 379	2.71	94,20 99 78	5, 44 0 22	7	1/2,2	1-0 1	175.5	- -
43	Konti 6, Produkt-B.	DMC		235.555	2,60	99,98	0,02	- 2	175,6	. 1	179,6	
44	Konti 6, Produkt-B.	DMC		30.297	2	99,31	0,69	1	163,1	2	168,2	2
45	Konti 6, Produkt-B.	NaClO		87.059	4,15	93,00	7,00	1	166,1 // 154	2	167,9	1
46	FedBatch	DMC		119.140	1,89	<u>99,86</u>	0,14	2	172,5	1-2	174.9	
4/	FedBatch E-JD atch (mit Camact)	NaCIO		71 147	2,40	98,65 02 50	1,37	_	1/1,8,// 165,0	7	174,9	Т
49	Fedbatch (mit Garrest)	INACIO		/1.14/	1, 74	60,06	0,41	T	-			'

Tabelle 22 Tabellarische Darstellung der Analytik Ergebnisse der synthetisierten PHB-Proben.

Von zwei der synthetisierten Polymere (Probe 44, synthetisiert im kontinuierlichen Prozess und extrahiert mittels DMC und Ethanol sowie Probe 46, synthetisiert über einen Fed-Batch-Prozess und extrahiert mittels DMC und Ethanol) konnten ausreichend große Mengen PHB gewonnen werden, so dass zusätzlich zu den oben genannten Analysen Platte-Platte Rheometer-Messungen zur Bestimmung der Schmelzeviskositätsfunktion analog zu 4.3.8 durchgeführt werden konnten. In Abbildung 43 sind die entsprechenden Messkurven graphisch dargestellt, in Tabelle 23 die dazugehörigen Messwerte.



Abbildung 43 Auftragung der Viskositätsfunktion über die Schergeschwindigkeit für das Testmaterial ENMAT Y3000P (blau), Probe 44 (grau) und Probe 46 (gelb).

Sowohl Probe 44 als auch Probe 46 zeigen dabei eine deutlich niedrigere Viskosität als das Testmaterial ENMAT Y3000P. Dies korreliert gut mit den ermittelten Molmassen M_w: Während für ENMAT Y3000P mit einer Molmasse M_w von 472.000 Da die höchste Viskosität ermittelt wurde, nimmt diese für Probe 46 mit einem M_w von 119.140 Da, zu Probe 44 mit einem M_w von 30.297 Da bedingt durch die kürzeren Polymerketten erwartungsgemäß deutlich ab.

Schergeschwindig- keit [s ⁻¹]	Viskosität [Pa*s] EN- MAT Y3000P	Viskosität [Pa*s] Probe 44	Viskosität [Pa*s] Probe 46
0,010	580	5,53	22,58
0,015	513	4,00	18,56
0,022	554	0,00	15,55
0,032	523	2,16	14,34
0,046	504	2,23	12,01
0,068	492	1,95	10,40
0,100	482	1,88	9,48
0,147	475	1,62	8,65
0,215	470	1,47	8,04
0,316	467	1,32	7,65
0,464	465	1,22	7,22
0,681	462	1,18	6,93
1,000	460	1,11	6,43
1,470	456	1,04	6,04
2,150	453	0,97	5,71
3,160	448	0,86	5,36
4,640	440	0,79	5,00
6,810	430	0,72	4,65
10,000	416	0,64	4,39
14,700	393	0,59	4,23
21,500	362	0,53	4,00
31,600	314	0,50	3,83
46,400	243	0,46	3,84
68,100	176	0,38	3,83
100,000	120	0,36	3,81

Tabelle 23Messwerte für die Scherviskosität des Testmaterials ENMAT Y3000P, Probe 44und Probe 46 mittels Scherviskosität ermittelt mittels Platte-Platte Rheometer.

5.2.6 Bewertung beider Extraktionsmethoden

Beide Methoden können im weiteren Verlauf des Projektes für die Extraktion angewendet werden und haben das Potential auch im größeren Maßstab umsetzbar zu sein. Die gewonnene Reinheit durch die DMC-Methode lag zuverlässig über 99 % und damit höher als die der NaClO-Methode (Tabelle 22), Hinsichtlich der nachfolgenden Analytik zeigten die mit DMC extrahierte Proben keine Auffälligkeiten z.B. hinsichtlich des Schmelzverhaltens oder brauner Rückstände (siehe auch 4.3.4.) und die Molmassen konnten zuverlässig in der nachfolgenden GPC-Analytik untersucht werden. Die mit NaClO extrahierte Proben wiesen häufig Verunreinigungen auf, die die Analytik erschwerten bzw. unmöglich machten, so dass lediglich 14 von 36 Proben mit ausreichender Materialmenge hinsichtlich der Molmassen analysierbar waren.

Neben dem Aspekt der Reinheit der Proben und damit der Produktqualität sind auch die Kosten für das Downstream Processing hinsichtlich CAPEX (Investitionen wie Geräte, etc. und OPEX (Beschaffung und Entsorgung der Chemikalien, etc.) wichtige wirtschaftliche Entscheidungsfaktoren. Da der Verbrauch und die Entsorgung von natriumhypochlorit-haltigen Restströmen weder wirtschaftlich noch aus Nachhaltigkeitsüberlegungen attraktiv sind, kann geschlussfolgert werden, dass DMC sowohl hinsichtlich Produktreinheit als auch unter wirtschaftlichen und ökologischen Aspekten auf Grund der möglichen Lösemittelrückgewinnung eine sinnvolle Extraktionsalternative zu Methoden basierend auf halogenhaltigen Lösemitteln wie Chloroform oder Natriumhypochlorit ist.

5.2.7 Lösemittelrückgewinnung

Bereits im Labormaßstab bei der Aufreinigung von Biomasse im Gramm-Bereich verursachte der Verbrauch von Löse- und Fällungsmittel hohe Kosten bei der Anschaffung und Entsorgung. Im Sinne der wirtschaftlichen und ökologischen Nachhaltigkeit wurde daher abweichend vom Projektplan die Rückgewinnung des Lösemittels DMC und des Fällungsmittels Ethanol im Rahmen von Abschlussarbeiten in Kooperation mit Prof. Dr. Armin Beier (Fachbereich Thermische Verfahrenstechnik, THN) untersucht.

Die Auftrennung des ternären Gemisches aus Ethanol, Wasser und DMC mittels Destillation ist nach aktuellem Kenntnisstand aufgrund des komplexen Dampf-Flüssig-Gleichgewicht technisch herausfordernd, aber prinzipiell auch unter wirtschaftlichen Aspekten umsetzbar [48]. Eine Masterarbeit, in der die Optimierung der Destillation (z.B. durch Einsatz eines Schleppmittels) untersucht wird, ist derzeit noch in Bearbeitung.

Das Extraktionsmittel NaClO kann nicht rückgewonnen werden, da es bei der Extraktion abreagiert. Hier ist in der großtechnischen Umsetzung die Entsorgung zu beachten. In der Technoökonomischen Analyse erwies sich der Chemikalienverbrauch als der kritische Kostentreiber (Details siehe 5.5.2), was die Relevanz des Chemikalienrecycling bei der Extraktion mit DMC zeigt.

5.3 Quantifizierung der Blendeigenschaften PHB/PVAc

Ziel dieser Untersuchung war es, die Veränderungen der Materialeigenschaften des Biopolymers PHB durch das Blenden mit unterschiedlichen Anteilen an PVAc zu quantifizieren. Dazu wurden, wie zuvor beschrieben, mittels Direktextrusion Bänder mit einer Abmessung von 35 mm \times 3 mm und variierenden Mischungsverhältnissen der beiden Polymere hergestellt. Die resultierenden Rezepturen sind in Tabelle 24 dargestellt.

Probenbezeichnung	Biomer P316P [Gew. %]	Vinnex 2525 [Gew. %]
B01	100	0
B02	90	10
B03	80	20
B04	70	30
B05	60	40

Tabelle 24 Hergestellte PHB/PVAc Blendrezepturen.

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften wurden aus den extrudierten Bändern mittels Fräse Schulterstäbe gefertigt. Diese wiesen eine Dicke h von 3 mm, eine Breite b von 10 mm und eine Länge des parallelen Bereichs von 80 mm auf, bei einer Gesamtlänge von 150 mm.

Für die Schlagversuche wurden Schlagstäbe (Dicke h von 3mm und Breite b von 8 mm) entnommen, gekerbt, unter den Bedingungen von -30 °C sowie Raumtemperatur (RT) konditioniert und anschließend geprüft. Die Zugversuche erfolgten gemäß den normativen Vorgaben, wobei die Schulterstäbe entsprechend konditioniert und anschließend bei Raumtemperatur getestet wurden.

Für die Durchführung der MFR-Messungen wurden die hergestellten Bänder mittels Schere auf geeignete Größen zerkleinert. Vor der Messung erfolgte eine Trocknung der Proben über einen Zeitraum von fünf Stunden bei 80 °C. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 180 °C und einem Gewicht von 2,16 kg durchgeführt.

5.3.1 Quantifizierung der Viskositätsänderungen mittels MFR

Die erhaltenen MFR-Messwerte für die Bestimmung der Schmelzeviskositätsänderungen durch das Mischen von PHB mit PVAc, sind in Abbildung 44 und Tabelle 25 graphisch und tabellarisch dargestellt.

Probe	Biomer P316P [Gew. %]	Vinnex 2525 [Gew. %]	Gewicht [kg]	Tempe- ratur [°C]	MFR [g/10min.]	Standardabwei- chung [g/10min.]
B01	100	0	2,16	180	10,7	0,5
B02	90	10	2,16	180	9,6	0,3
B03	80	20	2,16	180	8,0	0,4
B04	70	30	2,16	180	6,8	0,3
B05	60	40	2,16	180	5,6	0,3

Tabelle 25	MFR-Messwerte	der PHB/PV	Ac Blends
Tabelle 25	MFR-Messwerte	der PHB/PV	Ac Blend





Für das reine PHB wurde ein MFR-Wert von 10,7 g/10 min ermittelt (Abbildung 44) welcher in sehr guter Übereinstimmung mit dem im technischen Datenblatt angegebenen Wert von 10 g/10 min liegt. Es lässt sich deutlich erkennen, dass eine Erhöhung des PVAc-Anteils von 0 % auf 40 % mit einer kontinuierlichen Reduktion des MFR-Wertes und folglich einer Erhöhung der Viskosität einhergeht. Diese Abhängigkeit zeigt eine nahezu direkte Proportionalität zum PVAc-Anteil und spiegelt eine scheinbar höhere Schmelzeviskosität des PVAc im Vergleich zum PHB wider. Konkret führt eine Erhöhung des PVAc-Gehalts um 40 % zu einer Reduktion des MFR-Wertes um 47 %, von 10,7 g/10 min bei 0 % PVAc auf 5,6 g/10 min bei 40 % PVAc.

5.3.2 Quantifizierung der Änderungen der Zugeigenschaften

Zur quantitativen Charakterisierung der Zugeigenschaften der verschiedenen PHB/PVAc-Blends wurden Zugversuche unter Raumtemperaturbedingungen durchgeführt. Eine Zusammenfassung der ermittelten Messwerte findet sich in Tabelle 26. Die zugehörigen Graphiken sind in Abbildung 45 dargestellt.



Abbildung 45Spannungs-Dehnungs-Diagramme der hergestellten PHB/PVAc Blends.Tabelle 26Messwerte der Bestimmung der Zugeigenschaften.

Probe	Et [MPa]	δ _γ [Mpa]	εγ [%]	бм [Мра]	ем [%]	бв [Мра]	ЕВ [%]
B01	$\frac{1140 \pm 35}{35}$	25,0±0,1	$11,2 \pm 0,1$	24,8 ± 0,4	10,7 ± 0,9	24,6± 0,4	11,4 ± 1,3
B02	936 ± 27	21,5 ± 0,3	16,6 ± 0,6	21,5 ± 0,3	16,6 ± 0,6	$18,7 \pm 1,3$	24,6 ± 3,5
B03	737 ± 8	$18,2 \pm 0,2$	16,9 ± 0,2	$\begin{array}{c} 18,2 \pm \\ 0,2 \end{array}$	16,9 ± 0,2	9,7 0,9	50,2 ± 6,6
B04	562 ± 4	-	-	15,9 ± 0,1	66,6 ± 6,0	13,3 ± 0,9	228,2 ± 21,0
B05	418 ± 11	-	-	$\begin{array}{c} 16,9 \pm \\ 0,5 \end{array}$	297,3 ± 3,8	15,4± 8,1	299,4 ± 3,6

Wie erwartet zeigt das reine PHB (B01) mit einem gemessenen Elastizitätsmodul von 1140 MPa und einer Bruchdehnung von 11,4 % ein deutlich sprödes Versagensverhalten. Mit steigender PVAc-Konzentration im Blend (B02-B05) verringern sich sowohl die Steifigkeit als auch die Festigkeit des Materials. Da PVAc im Vergleich zu PHB ein weicheres und elastischeres Polymer ist, führt seine Zugabe zu einer signifikanten Reduktion des Elastizitätsmoduls auf bis zu 418 MPa bei einem PVAc-Anteil von 40 %, was einer Abnahme um 63 % entspricht. Gleichzeitig steigt die Bruchdehnung mit zunehmendem PVAc-Gehalt um das 26-Fache an. Dies begünstigt die Ausbildung eines duktilen Verhaltens mit einer ausgeprägten plastischen Verformung und einer verlängerten Dehnungszone vor dem Bruch. Die durch die PVAc-Zugabe reduzierte Steifigkeit und erhöhte

Dehnbarkeit können die Verarbeitung des Materials erleichtern, insbesondere für Anwendungen, die eine erhöhte Flexibilität erfordern.

Die erhaltenen Messwerte für E-Modul und Bruchdehnung sind in Abbildung 46 und Abbildung 47 graphisch dargestellt.



Abbildung 46 Abhängigkeit des Elastizitätsmoduls E_t von den Proben vom Mischverhältnis PHB/PVAc.



Abbildung 47 Abhängigkeit des Bruchdehnung ε_t vom Mischverhältnis PHB/PVAc.

5.3.3 Quantifizierung der Änderungen der Kerbschlagzähigkeit

Die Änderungen der Kerbschlagzähigkeiten bei Raumtemperatur sowie bei -30 °C wurden and den direkt extrudierten Proben durchgeführt, die mittels Fräse aus den hergestellten Bändern entnommen wurden. Die Ergebnisse der Messungen sind in tabellarisch in Tabelle 27 sowie graphisch in Abbildung 48 und Abbildung 49 dargestellt.

Probe	Temperatur [°C]	Kerbschlagzähigkeit [kJ/m ²]
B01	22,3	$3,62 \pm 0,44$
B02	22,3	$5,16 \pm 0,45$
B03	22,3	$5,09 \pm 0,43$
B04	22,3	$2,76\pm0,52$
B05	22,3	$1,67 \pm 0,40$
B01	-30,0	$1,21 \pm 0,05$
B02	-30,0	$1,27 \pm 0,16$
B03	-30,0	$1,28 \pm 0,26$
B04	-30,0	1,30 ± 0,21
B05	-30,0	$1,61 \pm 0,29$

Tabelle 27 Messwerte der Bestimmung der Kerbschlagzähigkeit bei Raumtemperatur und - 30 °C.

Wie aus den Messdaten bei Raumtemperatur abzulesen ist, steigt die Kerbschlagzähigkeit des Blends aus PHB und PVAc mit Zugabe von PVAc zunächst um ca. 42 % an, bevor sie bei höheren PVAc-Anteilen auf ca. 46 % des Ursprungswertes absinkt. Bei niedrigen PVAc-Anteilen wirkt PVAc als Weichmacher für das PHB und erhöht dessen Duktilität, da das Material eine höhere Energiedissipation bei Stoßbelastung besitzt. Bei weiteren PVAc-Zugaben kommt es vermutlich jedoch zu einer zunehmenden Phasenseparation, wodurch sich sprödere Bereiche im Material ausbilden. Dies begünstigt die Rissausbreitung, wodurch die Kerbschlagzähigkeit wieder abnimmt.



Abbildung 48 Abhängigkeit der Schlagzähigkeit vom Mischverhältnis PHB/PVAc bei Raumtemperatur.

Wie aus den Messdaten bei -30 °C abzulesen ist, bleibt die Kerbschlagzähigkeit für alle Blends auf einem niedrigen Niveau, zeigt jedoch mit steigendem PVAc-Anteil eine leichte Zunahme um ca. 33 %. Da sowohl PHB als auch PVAc bei dieser Temperatur unterhalb ihrer jeweiligen Glasübergangstemperatur (0-5 °C für PHB, 44 °C für PVAc) liegen, befinden sie sich im glasartigen, spröden Zustand. Dies führt zu einem spröden Bruchverhalten mit geringer Energieaufnahme. Die leichte Zunahme der Kerbschlagzähigkeit bei höheren PVAc-Anteilen könnte auf eine veränderte Phasenmorphologie zurückzuführen sein, die die Rissausbreitung minimal beeinflusst. Dennoch bleibt das gesamte Material durch die fehlende plastische Verformungsfähigkeit spröde, weshalb keine signifikante Verbesserung der Schlagzähigkeit beobachtet wird.



Abbildung 49 Abhängigkeit der Schlagzähigkeit vom Mischverhältnis PHB/PVAc bei -30 °C.

5.4 Ergebnisse der ökobilanziellen Betrachtung

5.4.1 Wirkungsabschätzung

Aus ökologischer Perspektive wurden die in Tabelle 28 gezeigten Umweltwirkungen mittels einer Ökobilanz untersucht. Neben dem prominentesten Indikator der Ökobilanz, dem Treibhausgaspotential, wurden mit dem Eutrophierungs-, Landnutzungs- und Wassernutzungspotential Indikatoren ausgewählt, die insbesondere bei biobasierten Materialien von Relevanz sind.

Aspekt	Indikator	Kürzel & Einheit
Klimawandel	Treibhausgaspotential über 100 Jahre inkl.	GWP 100 in kg CO ₂ -äq.
	Biogener Treibhausgase	
Eutrophierung	Eutrophierungspotential	EP-freshwater in kg PO43
		äq.
Landnutzung	Landnutzungspotential	Land Use in m ² äq.
Wassernutzung	Wassernutzungspotential	Water Use in m ³ – äq.

Tabelle 28 Ökologische Aspekte gemäß CML-Methode [48].

Indikator	Szenario 0 % Recyc- ling	Szenario 50 % Recyc- ling	Szenario 80 % Recyc- ling
GWP 100 [kg CO ₂ - äq.]	3213	1713	813
EP-freshwater[kg PO_4^{3-} - äq.]	2,55E-03	2,33E-03	2,20E-03
Land Use [m ² äq.]	3408	4545	5228
Water Use [m ³ – äq.]	203	106	48

Tabelle 29 Ökologische Effekte des Gesamtprozesses.

Die Beiträge der einzelnen Prozessschritte (siehe Abbildung 50) zum Treibhausgas-, Eutrophierungs-, Wassernutzungs- und Landnutzungspotential sind in Tabelle 30 bis Tabelle 33 dargestellt. Insbesondere beim Solvent Waste (SW) werden durch die thermische Verwertung Energie und Wärme rückgewonnen, die Vorteile außerhalb der Systemgrenze darstellen und somit in einer negativen Zahl resultieren.



Abbildung 50 Zuordnung der Flüsse zu den Prozessen CONTI, DSP und SW.

Tabelle 30	Einfluss der Prozesse u	and Prozessschritte zum	Treibhausgaspotential	GWP	100.
------------	-------------------------	-------------------------	-----------------------	-----	------

Prozess und Unter-	GWP 100 [kg CO ₂ -eq.]		
prozess	0 % Recycling	50 % Recycling	80 % Recycling
Conti	93		
Materialien	1		
Glycerin.	17		
Energie	74		
Sonstiges	1		
DSP	1579	798	329
Materialien	1564	782	313
Energie	16	16	16
Sonstiges	0	0	0
SW	1540	822	391
Energie	104	104	104
Verbrennung	2398	1199	480
Vorteile	-962	-481	-192

Prozess und Unter-	EP freshwater [kg -eq.]			
prozess	0 % Recycling	50 % Recycling	80 % Recycling	
CONTI	1,43E-03			
Materialien	5,04E-06			
Glycerin.	1,02E-03			
Energie	3,94E-04			
Sonstiges	1,03E-05			
DSP	2,43E-03	1,27E-03	5,78E-04	
Materialien	2,32E-03	1,16E-03	4,64E-04	
Energie	8,36E-05	8,36E-05	8,36E-05	
Sonstiges	3,06E-05	3,06E-05	3,06E-05	
SW	-1,32E-03	-3,75E-04	1,89E-04	
Energie	5,51E-04	5,51E-04	5,51E-04	
Verbrennung	9,47E-05	4,73E-05	1,89E-05	
Vorteile	-1,98E-03	-3,95E-04	-3,95E-04	

 Tabelle 31
 Einfluss der Prozesse und Prozessschritte zum EP von Frischwasser EP freshwater.

Tabelle 32Einfluss der Prozesse und Prozessschritte zum Wassernutzungspotential Water Use.

Prozess und Unter-	Water Use [m ³ äq.]				
prozess	0 % Recycling	50 % Recycling	80 % Recycling		
CONTI	6,32				
Materialien	0,11				
Glycerin.	0,54				
Energie	2,05				
Sonstiges	3,62				
DSP	8,51	4,44	2,00		
Materialien	8,14	4,07	1,63		
Energie	0,44	0,44	0,44		
Sonstiges	-0,06	-0,06	-0,06		
SW	187,78	95,31	39,83		
Energie	2,87	2,87	2,87		
Verbrennung	195,21	97,61	39,04		
Vorteile	-10,27	-5,14	-2,05		

 Tabelle 33
 Einfluss der Prozesse und Prozessschritte zum Landnutzungspotential Land Use.

Prozess und Unter-	Land Use [m ² äq.]			
prozess	0 % Recycling	50 % Recycling	80 % Recycling	
CONTI	4685			
Materialien	19			
Glycerin.	4037			
Energie	619			
Sonstiges	9			
DSP	657	394	237	
Materialien	525	263	105	
Energie	131	131	131	
Sonstiges	0	0	0	
SW	-1934	-534	306	
Energie	3	3	3	
Verbrennung	195	98	39	
Vorteile	-10	-5	-2	

5.4.2 Interpretation

Die Ergebnisse aus Tabelle 30 bis Tabelle 33 sind im Folgenden in Abbildung 51 und Abbildung 52 dargestellt. Zunächst wird der Einfluss der einzelnen Prozessschritte auf das Treibhausgaspotential dargestellt, beschrieben und diskutiert. Anschließend werden die verbleibenden drei Umweltindikatoren betrachtet.



Abbildung 51 Einfluss der Prozessschritte auf den GWP 100 im Gesamtprozess (oben links), sowie innerhalb der einzelnen Prozesse (CONTI oben rechts, DSP unten links und SW unten rechts) für die drei Szenarien der Lösemittelrückgewinnung.

Die Teilprozesse des Downstream Processing DSP sowie des Lösemittelrecyclings SW tragen beide etwa gleichermaßen zum Treibhausgaspotential bei. Der kontinuierliche Prozess CONTI spielt beim betrachteten Laborprozess nur eine untergeordnete Rolle. Innerhalb des CONTI-Prozesses tragen hauptsächlich der Energieverbrauch (ca. 80 %) und das verwendete Glycerin (ca. 20 %) zum Treibhausgaspotential bei. Das Treibhausgaspotential des Downstream Prozesses wird dominiert vom Einsatz der Lösemittel. Ein Recycling der Lösemittel von 50 % bzw. 80 % verringert demnach das Treibhausgaspotential um 50 % bzw. 80 %. Bei der Lösemittelverwertung hat die Verbrennung der Lösemittel den dominanten Einfluss. Die Energie, die zur Auftrennung angenommen spielt hier nur eine untergeordnete Rolle, sodass auch hier ein Lösemittelrecycling von 50 % bzw. 80 % eine Verringerung des Treibhausgaspotentials um 50 % bzw. 80 % zur Folge hat. Analog zum sinkenden Treibhausgaspotential, das durch die geringere Verbrennung der Lösemittel im Falle eines Recyclings entsteht, verringern sich auf die Benefits, die außerhalb des Systems durch eine Energie- und Wärmerückgewinnung erreicht werden könnten.



Abbildung 52 Einfluss der Prozessschritte auf den GWP 100 (oben links), das EP freshwater (oben rechts), Land Use (unten links) und Water Use (unten rechts) der Teilprozesse für die drei Szenarien.

Der Anteil der Teilprozesse CONTI, DSP und SW am Treibhausgaspotential ist nicht auf die anderen Einflussfaktoren übertragbar.

Das Eutrophierungspotential Frischwasser entsteht im Basisszenario zu über 60 % durch den DSP. Der Rest entsteht im CONTI. Die Verwertung der Lösemittel erwirkt hier Benefits außerhalb der Systemgrenzen, die das Eutrophierungspotential senken. Dieser Effekt verringert sich beim Recycling der Lösemittel um 50 % und ist nicht mehr vorhanden bei einem Lösemittelrecycling von 80 %. Beim Lösemittelrecycling von 80 % ist ebenfalls der Einfluss des DSP verringert, sodass der größte Teil des Eutrophierungspotentials durch den CONTI-Prozess verursacht wird.

Das Landnutzungspotential wird dominiert vom CONTI-Prozess. Demnach haben die Szenarien keinen großen Einfluss. Analog zum Eutrophierungspotential ergibt sich beim SW ein Benefit der Verbrennung, der bei 80 % Lösemittelrecycling aufgehoben ist. Die Verringerung des DSP durch ein Lösemittelrecycling ist sichtbar, jedoch im Vergleich zum CONTI-Prozess nicht ausschlaggebend.

Das Wassernutzungspotential wird dominiert vom SW, ein Recycling des Lösemittels um 50 % bzw. 80 % reduziert somit auch das Wassernutzungspotential.

Abbildung 51 zeigt eindrücklich, dass der Einfluss der Teilprozesse auf die unterschiedlichen Einflussfaktoren unterschiedlich groß ist. Die Szenarien des Lösemittelrecyclings wurden im Hinblick auf deren Auswirkung auf das Treibhausgaspotential konzipiert und haben demnach hier auch einen größeren Einfluss als bei den Einflussfaktoren Landnutzungpotential und Eutrophierungspotential. Auch wenn aktuell an der Auftrennung des Azeotrops und eines damit einhergehenden Lösemittelrecyclings geforscht wird [49], so ist zum jetzigen Stand kein Recycling der Lösemittel umsetzbar, das die entworfenen Szenarien voraussetzen. Auch wird deutlich, dass für eine Optimierung des Prozesses im Zuge einer Skalierung nicht nur auf das Treibhausgaspotential geachtet werden darf, sondern eine holistische Betrachtung unumgänglich ist. Insbesondere das Landnutzungspotential hinsichtlich des eingesetzten Glycerins sowie das Wassernutzungspotential des SW ist nicht außer Acht zu lassen, da es trotz eines niedrigen Treibhausgaspotentials hier zu erheblichen Umwelteinflüssen kommen kann.

Auf Basis der materiellen Eigenschaften wurde ein Vergleich mit PP durchgeführt. In Anbetracht der ähnlichen Kompostierbarkeit und der Gemeinsamkeit der biobasierten Rohstoffe wäre ein Vergleich von PHB mit Papier insbesondere im Hinblick auf Wasserund Landnutzung für zukünftige Forschungsprojekte spannend

5.5 Ergebnisse der Technoökonomischen Skalierung

5.5.1 Skalierung der kontinuierlichen Fermentation

Zunächst wird der kontinuierliche Teil der Fermentation betrachtet. Im produktivsten Laborzyklus wurden für 45 g PHB 282 g Rohglycerin eingesetzt, was hochgerechnet eine Jahresmenge von 62.800 t ergibt. Die Kosten für den Reststoff Rohglycerin unterliegen Schwankungen und bewegen sich im Bereich zwischen 150 €/t und 250 €/t [50]. Ausgehend vom unteren Ende der Preisspanne ergibt sich ein Kostenbeitrag von 0,94 €/kg PHB für das Szenario "Optimistisch", für "Ungünstig" basierend auf dem Einkaufspreis von 250 €/t ein Kostenbeitrag von 1,57 €/kg. Für "Grundlegend" wird der Mittelwert von 1,26 €/kg PHB gewählt

Der nächste Kostenfaktor ist das Prozesswasser, von welchem 632.000 m³ benötigt werden. Entscheidend ist hier, wie oft das bei der Zentrifugation der Fermentationsbrühe anfallende Wasser recycliert werden kann. Der Aufwand für die Aufbereitung des recycelten Wassers hängt von der Beschaffenheit und Menge der Substanzen ab, die das Wachstum des Mikroorganismus inhibieren. Aufgrund von bekannten Experimenten zur Wiederverwendung von Wasser in biotechnologischen Prozessen werden hier eine zweimalige und eine viermalige Wiederverwendung des Wassers aus der Fermentationsbrühe betrachtet [51-53]. Das Szenario "Ungünstig" basiert auf der Annahme, dass für den industriellen Prozess wie im Labor vollentsalztes Wasser nötig ist. Hier liegt der Preis bei 3,08 €/m³, was bei zweimaligem Rezyklieren einen Kostenbeitrag von 0,10 €/kg PHB ergibt [54]. Die Qualität konventionellen Wassers ist in der Regel für industrielle Prozesse ausreichend, weshalb für das Szenario "Grundlegend" bei ebenfalls zweimaligem Rezyklieren mit einem niedrigem Wasserpreis für Großabnehmer von 1,28 €/m3 ein Kostenpunkt von 0,04 €/kg errechnet wird [55]. Eine weitere Senkung der Kosten ist standortabhängig durch den Bezug von Industriewasser möglich. Für die Betrachtung des Szenarios "optimistisch" wird daher ein Wasserpreis von 0,30 €/m³ sowie das viermalige Rezyklieren angenommen, was in einem Kostenbeitrag von aufgerundet 0,01 €/kg PHB resultiert [56].

Das zur Anpassung des pH-Wertes benötigte Natriumhydroxid wurde im Labor in Reinform zugegeben, in industrieüblichen Mengen wird es meist in Form einer 50%igen wässrigen Lösung gehandelt, von welcher gemäß der Skalierung jährlich 12.480 t benötigt werden. Bestellt in 1300 kg Gebinden ergäbe sich ein Beitrag von 0,77 €/kg [57]. Nach einem Angebot der Firma BEUFA beträgt bei Lieferung in 24.000 kg Gebinden der Kostenbeitrag nur 0,345 €/kg PHB. Da hier ein konkretes Angebot vorliegt, wird der günstigere Kostenbeitrag für alle Szenarien übernommen. Darüber hinaus wird aus diesem Kostenpunkt abgeleitet, dass eine Kostenreduktion um 50 % bei Skalierung der Gebindegrößen realistisch ist. Es wird weiterhin angenommen, dass dieser Skalierungseffekt nicht spezifisch für NaOH gilt, sondern auf weitere Chemikalien übertragbar ist. Tabelle 34 findet sich eine Übersicht über alle weiteren für die Fermentation benötigten Salze, Chemikalien und Spurenelemente, sowie deren Jahresmengen und den damit verbundenen Kosten. Die Kosten sind entsprechend einer hypothetischen Kostenreduktion den Szenarien zugeordnet. Keine Kostenreduktion für das Szenario "Ungünstig", 50% Ersparnis entsprechend des Skalierungseffekts von NaOH für "Optimistisch" und eine konservative Kostenreduktion auf 75% im Szenario "Grundlegend".

Substanz	Menge [kg]	"Ungünstig" ohne Mengenrabatt [Tsd. €]	"Grundlegend" 25% Mengenrabatt [Tsd. €]	"Optimistisch" 50% Mengenrabatt [Tsd. €]
KH ₂ PO ₂	1.140.000	11.300 [58]	8.475	5.650
((NH) ₄) ₂ SO ₄	4.660.000	3.600 [59]	2.700	1.800
NH ₄ Fe(III)Citrat	21.000	970 [60]	728	485
CoCl ₂	255	495 [61]	371	248
MgSO ₄	297.000	225 [62]	169	113
CaCl ₂ 2H ₂ O	8.500	128 [63]	96	64
H_2SO_4	84.800	51 [64]	38	26
Na ₂ MoO ₄	38	48 [61]	36	24
ZnSO ₄	127	44 [61]	33	22
H ₃ BO ₃	380	21 [61]	16	11
NiCl ₂	25	11 [61]	8	6
MnCl ₂	38	10 [61]	7	5
CuCl ₂	13	7 [61]	5	4
Antifoam	17.500.000	1.180 [65]	885	590
SUMME		18,1 Mio. €	13,6 Mio. €	9,0 Mio. €
Kostenbeitrag je kg PHB		1,81 €/kg	1,36 €/kg	0,90 €/kg

Tabelle 34Übersicht über benötigte Mengen und Kosten der Salze und Chemikalien des Nähr-mediums für die skalierte, kontinuierliche PHB-Produktion.

Ein weiterer wichtiger Skalierungspunkt der Synthese ist die Belüftung des Bioreaktors. Hier sind die Kosten maßgeblich von der Kompressoreffizienz abhängig. Nach einer Analyse von Atlas Copco belaufen sich die Kosten für Druckluft auf $0,03 \notin$ /Nm³ bis $0,054\notin$ /Nm [66]. Der Bedarf der kontinuierlichen Synthese beträgt im Labor $0,055 \text{ Nm}^3$ /h. Hochgerechnet auf die Laufzeit der skalierten Anlage ergibt sich so ein Jahresverbrauch von 1,5 Mio. Nm³ Druckluft. Der Kostenbeitrag für das Szenario "Ungünstig" orientiert sich am Preis von $0,054 \notin$ /Nm³ und beläuft sich so auf $1,52 \notin$ /kg PHB. Für das Szenario "Grundlegend" wird ein Kostenbeitrag von $0,71 \notin$ /kg betrachtet, basierend auf einem Druckluftpreis von $0,3 \notin$ /Nm³. Als weitere Möglichkeit lässt sich der Preis aus der Effizienz moderner Kompressoren-Systeme abschätzen, welcher nach FESTO bis zu $0,09 \text{ kWh/Nm}^3$ beträgt. Mit einem Industriestrompreis von 2024 in Höhe von $0,1699 \notin$ /kWh ergeben sich so Preise von $0,015 \notin$ /Nm³ [67]. Daraus resultieren Kosten von $0,42 \notin$ /kg PHB, welche für das Szenario "Optimistisch" übernommen werden.

Neben der Druckluft verbrauchen auch Rühren, Pumpen und die Temperierung der Reaktoren Energie. Für das Temperieren wird als erstes die zum Ausgleich des Wärmeverlustes nötige Energie E mittels Formel 3 berechnet. Dazu wird eine Heizeffizienz η von 80%, eine Isolierung des Reaktors mit PU-Schaum (Dicke d = 0.05 m, Wärmeleitfähigkeit $\lambda = 0.025$ Wm⁻¹K⁻¹) sowie eine Temperaturdifferenz von 23 K (Differenz zwischen Reaktortemperatur 33 °C und Außentemperatur 10 °C) angenommen. Des Weiteren wird der 200 m³ Reaktor als Zylinder mit r = 3.2 m und h = 6.3 m und die Betriebszeit desselben mit t = 8400 h angenommen. *E* Multipliziert mit den 12 Bioreaktoren ergibt einen Gesamtenergiebedarf von 277 MWh.

$$E = \frac{Q \cdot t}{\eta} = \frac{A \cdot \lambda \cdot \Delta T \cdot t}{d \cdot \eta} = \frac{2\pi \cdot r \cdot (h + r) \cdot \lambda \cdot \Delta T \cdot t}{d \cdot \eta}$$
(3)

Als nächstes wird die zum Aufheizen notwendige Energie E_{Heiz} mit Formel 4 abgeschätzt. Dazu wird die Wärmekapazität von Wasser $C_W = 4190 \text{ Jkg}^{-1}\text{K}^{-1} = 1,164 \text{ Wh} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ mit der Masse *m* der Fermentationsbrühe von 200.000 kg und der Anzahl der Aufheizzyklen pro Jahr n = 36 (6 Zyklen je 6 Produktionsstränge) sowie der gleichen Temperaturdifferenz und Effizienz von oben multipliziert. Der resultierende Energiebedarf beträgt 241 MWh.

$$E_{Heiz} = C_W \cdot m \cdot n \cdot \Delta T \cdot \eta^{-1} \tag{4}$$

Die Energiekosten für Rühren und Pumpen wurden entsprechend der Leistungsaufnahme in Tabelle 35Tabelle 35 berechnet. Jeder der sechs Produktionsstränge benötigt 4 Pumpen: Input des Nährmediums in Reaktor 1, Weiteleitung in Reaktor 2, Zugabe der Nährlösung in Reaktor 2 und Auspumpen ins DSP. Alle Energiebeiträge aufsummiert ergeben einen Kostenbeitrag von 0,03 €/kg PHB.

Bezeichnung	Leistungsauf- nahme	Anzahl Geräte	Betriebsstunden	Energiebedarf
Rührwerke [68, 69]	11 kW	12	8400 h	1.109 MWh
Pumpen [70]	0,18 kW	24	8400 h	36 MWh
Ausgleich Heizverlust nach Formel 3				277 MWh
Aufheizen nach Formel 4				241 MWh
Summe				1663 MWh
Resultierender Kosten- beitrag pro kg PHB				0,03 €/kg

Tabelle 35 Energieverbrauch und resultierende Kosten für Rühren, Heizen und Pumpen.

In Abbildung 53 ist die Summe der Kostenbeiträge für die drei Szenarien dargestellt. Die Hauptkosten entstehen durch die Kosten des Glycerins, sowie der benötigten Salze und Chemikalien, insbesondere der Natronlauge. Aber auch die Druckluft macht einen nicht

unerheblichen Teil der Kosten aus. Die Kosten für Wasser und Energie sind vergleichsweise vernachlässigbar.



Abbildung 53 Kostenzusammensetzung der kontinuierlichen Fermentationsschritte skaliert auf 10.000 t pro Jahr.

5.5.2 Skalierung des Downstream Processing

Aus der skalierten kontinuierlichen Fermentation entstehen jährlich 618.000 m³ Fermentationsbrühe, die im Downstream Processing (DSP) aufgearbeitet werden müssen. Da im Gegensatz zur Fermentation keine Beladezeiten nötig sind, kann ein kontinuierlicher 24/7/365 Betrieb zu 8760 h pro Jahr angenommen werden. So werden dem DSP 70,5 m³/h an Fermentationsbrühe zugeführt.

Der erste Schritt des DSP besteht in der Zellinaktivierung, bei dem die Fermentationsbrühe rasch auf 60 °C oder 70 °C erhitzt werden muss, um den Abbau von PHB zu verhindern. Die benötigte Energie wird aus der Wärmekapazität des Wassers abgeschätzt: Um die 618.000 m³ wässrige Lösung von 33°C auf 60 °C zu erhitzen, werden 18,9 GWh Energie benötigt, was mit dem Industriestrompreis in einem Beitrag von 0,32 €/kg PHB resultiert. Dieser wird für die Szenarien "Optimistisch" und "Grundlegend" übernommen. Für das Szenario "Ungünstig" wird ein Aufheizen auf 70 °C angenommen, was 26,6 GWh verbraucht und Kosten von 0,45 €/kg PHB bedeutet. Den Abschätzungen liegt eine Effizienz von 100% zugrunde, da die Temperatur nicht lange gehalten werden muss und die Energie nach der Zellinaktivierung teilweise wieder zurückgewonnen und so zum Vorwärmen des Prozesswassers oder dem Heizen der Räumlichkeiten verwendet werden kann und dort Kosten eingespart werden können, die in dieser Analyse nicht betrachtet werden.

Das Abscheiden der verbleibenden Biomasse erfolgt mittels Zentrifuge. Geeignete Zentrifugen haben eine Leistungsaufnahme von 75 kW bis 90 kW, was im kontinuierlichen Betrieb über 8760 h in einem Kostenbeitrag von 0,01 ϵ /kg PHB für alle Szenarien verursacht [71]. Nach dem Zentrifugieren folgt die Extraktion des PHB aus den erhaltenen 220.000 t Biofeuchtmasse. Um 1 kg Biofeuchtmasse aufzuarbeiten, wurden im Labor 10 kg DMC und 20 kg Ethanol verwendet und anschließend als Lösemittelabfall entsorgt. Bei einer linearen Skalierung würden so 2.200.000 t DMC und 4.400.000 t Ethanol benötigt. Nach einem Angebot der Firma GETCHEM CO. LTD. Beläuft sich der Preis bei Lieferung in Gebinden von 23 t auf 672 ϵ /t DMC. Für Ethanol liegt der Weltmarktpreis bei 0,45 ϵ /l, bzw. umgerechnet mit der Dichte von 0,789 kg/l bei 570 ϵ /t [72]. Unter Anbetracht der oben genannten Mengen ergäbe sich so ein Kostenbeitrag von fast 400 ϵ /kg PHB, was eine wirtschaftliche Vermarktung unabhängig aller anderer Kosten unmöglich machen würde.

Daher muss für eine wirtschaftliche Skalierung des Prozesses eine Kostenreduktion in der Skalierung angenommen werden. Eine Option diese zu erreichen, ist die Rückgewinnung der Lösemittel zur Wiederverwendung. Für das grundlegende und das ungünstige Szenario wird daher eine Rückgewinnungsrate von 90 % angenommen, für das optimistische Szenario 99 %. Die zweite Möglichkeit, den Verbrauch der Lösemittel zu senken, ist den Prozess zu optimieren, sodass weniger Lösemittel pro kg PHB verbraucht werden. Nach Samori et. al. wird für die Extraktion des PHB nur die doppelte Menge statt der zehnfachen Menge DMC benötigt, was auch die benötigte Menge Ethanol um den Faktor fünf reduziert [31]. Diese Annahme wird für die beiden Szenarien "Grundlegend" und "Optimistisch" übernommen, für "Ungünstig" wird die benötigte Menge aus den Laborversuchen übernommen. Eine Übersicht der getroffenen Annahmen für die einzelnen Szenarien sowie die daraus resultierenden Kostenbeiträge sind in Tabelle 36 gezeigt.

Tabelle 36 Übersicht der Kosten für DMC und Ethanol in Abhängigkeit unterschiedlicher Rückgewinnungsraten und nach Samori et. al. reduziertem Lösemitteleinsatz für eine Produktion von 10.000 t PHB pro Jahr [31].

	"Ungünstig"	"Grundlegend"	"Optimistisch"
Benötigte Menge DMC pro kg PHB	10 kg	2 kg	2 kg
Rückgewinnungsrate	90%	90%	99%
Resultierende Jahreskosten DMC bei 672 €/t	149 Mio. €	29,8 Mio. €	2,98 Mio. €
Benötigte Menge Ethanol pro kg PHB	20 kg	4 kg	4 kg
Rückgewinnungsrate	90%	90%	99%
Resultierende Jahreskosten Ethanol bei 570 €/t	253 Mio. €	50,7 Mio. €	5,1 Mio. €
Kombinierter Kostenbeitrag je kg PHB	40,20 €/kg	8,05 €/kg	0,81 €/kg

Die hohe Rückgewinnung der Lösemittel spart große Mengen an Ressourcen, benötigt jedoch Energie. Da aktuell kein konkretes Verfahren vorliegt, erfolgt die Abschätzung der Energiekosten ausgehend von der minimalen Trennarbeit ΔG_{min} nach Formel 5. Diese berechnet sich aus den Stoffmengen n_i und den Molenbrüchen x_i der einzelnen Komponenten, sowie der Temperatur T = 298 K und der allgemeinen Gaskonstante R = 8,314 J/mol·K.

$$\Delta G_{min} = -RT \sum n_i \cdot ln(x_i) \tag{5}$$

 n_i und x_i sowie die zu deren Berechnung notwendigen Molaren Massen von Ethanol, DMC und Wasser finden sich zusammen mit der Zusammensetzung der jeweiligen Szenarien in Tabelle 37.

Kompo- nente	Molare Masse [g/mol]	"Grundlegend" / "Optimistisch"		"Ungünstig"			
		Anteile [kg]	Stoff- menge n _i [mol]	Molenbrüche x _i	Anteile [kg]	Stoffmenge n _i [mol]	Molenbrüche x _i
Ethanol	46,07	4	68,9	0,528	20	434,5	0,723
DMC	90,08	2	22,2	0,135	10	111	0,185
Wasser	18,02	1	55,5	0,337	1	55,5	0,092

Tabelle 37Zusammensetzung des ternären Gemischs für die verschiedenen Szenarien, sowiedie mit den molaren Massen berechneten Stoffmengen und Molenbrüche.

Zur Abschätzung der benötigten Prozessenergie wird die theoretische Trennarbeit mit einem Faktor multipliziert. Dieser ist stark prozessabhängig und reicht von 2 für simple Trennverfahren bis über 50 bei der Abtrennung von stark wässrigen Ethanol-Wassergemischen [73, 74]. Nicht berücksichtigt dabei werden etwaige eingesetzte Hilfsstoffe und deren Aufbereitung. Auch die benötigte Reinheit hat großen Einfluss auf die notwendige Energiemenge. Da es keine Anhaltspunkte zu einem möglichen Prozess gibt, wird für das optimistische Szenario ein niedriger Faktor von 5 gewählt, der sich in der Größenordnung üblicher Trennungen von zwei Phasen bewegt [75]. Für die anderen Szenarien wird ein Faktor von 10 gewählt, der ein etabliertes Trennverfahren mit Azeotropen widerspiegelt [75, 76]. Der Faktor könnte aufgrund des hier vorliegenden, komplexen Trennverfahrens mit mehreren Azeotropen auch weit über den vorgenommenen Schätzungen liegen. Die nach Formel 3 berechnete minimale Trennarbeit und die daraus abgeschätzte Prozessenergie und Kostenbeitrag sind in Tabelle 38 gezeigt.

	"Ungünstig" 1 – 10 – 20 kg H ₂ O – DMC – EtOH	"Grundlegend" 1 – 2 – 4 kg H ₂ O – DMC – EtOH	"Optimistisch" 1 – 2 – 4 kg H ₂ O – DMC – EtOH
Theoretische minimale Trennarbeit für 1 kg Fer- mentationsbrühe (FB)	1,14 MJ	0,37 MJ	0,37 MJ
Faktor zur Schätzung der Prozessenergie	10	10	5
Prozessenergie je kg FB	11,41 MJ	3,69 MJ	1,84 MJ
Gesamtenergie bezogen auf 220 kt FB	698 GWh	225 GWh	111 GWh
Gesamtkosten bei 0,1699 €/kWh	118,5 Mio. €	38,2 Mio. €	19,1 Mio. €
Kostenbeitrag je kg PHB	11,85€	3,82 €/kg	1,91 €/kg

Tabelle 38Schätzung der zur Lösemittelrückgewinnung benötigten Energie und des resultie-renden Kostenbeitrags auf Basis der minimalen Trennarbeit.

Der letzte Schritt des DSP ist die Trocknung des aus der Extraktion gewonnen PHB. Im Labor wurde die Trocknung für 72 h bei 40 °C im Trockenschrank durchgeführt. Um den Trocknungsprozess zu beschleunigen, wird im industriellen Maßstab eine möglichst hohe Temperatur gewählt. Nach Ergebnissen von Chen et al. kann PHB weitgehend ohne Auswirkungen auf das Polymer bei 60 °C getrocknet werden [77]. Konkrete Heizprogramme müssen für die jeweilige Anlage getestet und an die Restfeuchte des Produkts angepasst werden. Zur Orientierung wird der thermische Trockner TT120 von der Firma Neue Herbold GmbH herangezogen, für den eine Kapazität von bis zu 1000 kg pro Stunde angegeben wird. Dieser besitzt drei Heizregister mit 30 kW Leistung und einen 30 kW Motor [83]. Mit der Gesamtleistung von 120 kW und 8760 Betriebsstunden im Jahr wird eine Leistung von 1,1 GWh benötigt. Dafür fallen Kosten in Höhe von 0,02 € pro kg fertigem PHB an. Dieser Preisanteil wird für alle drei Szenarien übernommen.

In Abbildung 54 ist die Gesamtbetrachtung des DSP gezeigt. Hier wird deutlich, dass mit den im Laborprozess eingesetzten Mengen DMC und Ethanol selbst bei 90 %iger Lösemittelrückgewinnung der Kostenbeitrag von 52,53 €/kg keinen konkurrenzfähigen Verkaufspreis ermöglicht.





5.5.3 Gesamtbetrachtung und Interpretation der Skalierung

In dieser Skalierung wurden die reinen Betriebskosten, ohne Kosten für Personal und Grundstück, ohne Kosten für Anschaffung und Aufbau der Anlage, ohne anfallende Wartungskosten und Versicherungen, betrachtet. Die Summe der Betriebskosten beläuft sich auf 5,72 €/kg PHB im Szenario "Optimistisch" und 17,89 €/kg im Szenario "Grundlegend". Das Szenario "Ungünstig" wird aufgrund der im vorherigen Kapitel aufgezeigten hohen Kosten im DSP nicht weiter aufgeführt.

5.5.3.1 Zusammensetzung der Betriebskosten

Im Szenario "Optimistisch" sind die Anteile für DSP und kontinuierliche Fermentation an den Betriebskosten mit 54 % bzw. 46 % etwa gleich. Im dreimal so teuren Szenario "Grundlegend" hat das DSP mit 79 % einen deutlich größeren Anteil der Betriebskosten und ist damit auch ursächlich für den großen Kostenunterschied der beiden Szenarien.

Für das Szenario "Optimistisch" sind die einzelnen Kostenanteile zusammengefasst in Abbildung 55 dargestellt. Der größte Kostenfaktor ist mit 33 % die Prozessenergie zur Lösemittelrückgewinnung. Die Kosten für die eingesetzte Menge An Ethanol und DMC im DSP machen 14 % des PHBs aus. Abseits der Lösemittelrückgewinnung machen die Energiekosten für Fermentation und DSP, zusammengesetzt aus "Druckluft", "Heizen, Rühren, Pumpen" und "Zellinaktivierung, Zentrifugieren und Trocknung" etwa 14 % der Betriebskosten aus.





Für die Prozessenergie zur Lösemittelrückgewinnung wurde mit einer Reduktion der benötigten Lösemittel um 80% gegenüber dem Laborprozess und Faktor 5 für die Prozessenergie der Rückgewinnung gerechnet. Diese Annahmen befinden sich an der unteren Grenze der theoretisch möglichen Kosten. Um diese zu realisieren, ist zum einen die Prozessführung des DSP erheblich zu optimieren und zum anderen muss die noch reintheoretische Lösemittelrückgewinnung als höchst energieeffizienter Prozess entwickelt werden. Zudem übersteigt die Energie der Lösemittelrückgewinnung die Kosten für die Lösemittel des DSP. Dies ist auf die angenommene hohe Lösemittelrückgewinnung von 99% zurückzuführen, was angesichts des noch zu entwickelnden Recyclings ebenfalls die optimistischste Abschätzung darstellt. In der Realität werden diese Kosten wahrscheinlich steigen, da bei 95% der Aufwand für die Rückgewinnung und damit verbunden die Prozessenergie und -kosten erheblich sinken können. Hier gilt es, ein ökonomisches Optimum zwischen Rückgewinnungsrate und Energieeinsatz zu finden. Für die weiteren Salze und Chemikalien des Nährmediums ist das Ausmaß der "economy of scale" nicht abschließend abschätzbar. Die hier angenommene 50 % ige Kostenreduktion kann, ebenso wie die Kosten für das Rohglycerin, durch Faktoren wie lokale Rohstoffverfügbarkeit und Marktsituation sowohl höher als auch geringer ausfallen.

5.5.3.2 Einordnung der Marktrelevanz

Der Verkaufspreis von PHB weist eine hohe Spanne auf. Es finden sich Angaben für reines PHB von 12 \$ bis 60 \$ pro kg bei großen Abnahmemengen [78, 79]. Für den Vergleich wird hier der ungefähre Mittelwert von 30 €/kg herangezogen, der nach mündlicher Aussage eines PHB-Lieferanten als realistisch angesehen werden kann. Ein detaillierter Vergleich des Marktpreises mit den skalierten Betriebskosten ist nicht möglich, da das Ergebnis dieses Vergleichs mehr von der Abschätzung der Kosten für Granulierung, Verpackung, Lieferung, Lohn, Investitionen und Gewinnmarge abhängig wäre als von den ermittelten Betriebskosten.

Für das Szenario "Grundlegend" mit Betriebskosten von 17,89 €/kg ist ein Verkaufspreis von 30 €/kg unter Berücksichtigung aller weiteren Kosten vermutlich nur schwer realisierbar. Mit der hier angenommenen Produktionskapazität von 10.000 t pro Jahr würde die Anlage zu den größten der Welt zählen [80], weshalb der angestrebte Verkaufspreis deutlich unterhalb des durchschnittlichen Marktpreises liegen sollte.

Das Szenario "Optimistisch" hingegen bietet mit Betriebskosten von 5,72 €/kg eine gute Basis, um PHB zu einem attraktiven Preis auf dem Markt zu bringen.

5.5.3.3 Vergleich mit anderen Skalierungen der Literatur

Zur weiteren Einordnung sollen die ermittelten Kosten mit anderen Arbeiten zur Skalierung der PHB-Synthese verglichen werden. Vergleichbare Skalierungen der Literatur ergeben Preise inklusive Personal- und Investkosten und teilweise auch inklusive Gewinnmargen unterhalb der reinen Betriebskosten von 17,89 €/kg im Szenario "Grundlegend" [81–83]. Daher wird für diesen Vergleich nur das Szenario "Optimistisch" herangezogen. Kumar et al betrachtet eine PHB-Synthese nach dem Fed-Batch-Verfahren und einem Down-Stream-Processing mittels SDS und NaOH, ebenfalls basierend auf Rohglycerin als Kohlenstoffquelle. Durch die konventionelle Aufschlussmethode ist der kombinierte Lösemittelbedarf deutlich niedriger als bei der vorliegenden kontinuierlichen Synthese und beträgt nur 0,35 kg anstelle der im Szenario "Optimistisch" angenommenen 6,0 kg pro kg PHB. Aufgrund dieses geringen Verbrauchs reduzieren sich die Kosten für den Lösemitteleinkauf. Darüber hinaus entfällt bei Kumar et al. das Lösemittelrecycling, wodurch auch die Kosten hierfür wegfallen. So belaufen sich die Betriebskosten ohne Lohn jährlich auf $C_0 = 5,94$ Mio. \$, was bei der jährlichen Produktionsmenge von $S_0 =$ 331,7 t einen Preis von 17,90 \$/kg PHB bedeutet [82]. Zur Abschätzung der "economy of scale" wendet Kumar et al. das Potenzgesetz an. Für eine Produktionsmenge von S =10000 t pro Jahr und einem typischen Wert für den Skalierungsfaktor von n = 0.6 ergeben sich nach Formel 6 Gesamtkosten von C = 45.8 Mio. \$ und damit, unter Berücksichtigung eines Wechselkurses von 1,08 \$/€ (Durchschnitt 2024) Kosten von 4,24 €/kg [84-86]. Der Skalierungsfaktor kann je nachdem, wie stark die Kosten der Anlage von der "economy of scale" profitieren, von 0,5 für sehr gute Skalierung bis 1 zu keinem Skalierungseffekt variiert werden. Durch Variation des Skalierungsfaktors zu n = 0,7 errechnet sich ein Preis von 5,96 €/kg, wodurch dieser bereits über den 5,72 €/kg dieser Arbeit liegt.

$$C = C_0 \cdot \left(\frac{s}{s_0}\right)^n \tag{6}$$

Demnach kann hier keine Aussage getroffen werden, ob der kontinuierliche Prozess dieses Projektes bezüglich der Betriebskosten besser oder schlechter als der Vergleichsprozess abschneidet, jedoch, dass beide Skalierungen Betriebskosten in der gleichen Größenordnung ergeben.

6 Zusammenfassung

Im Folgenden werden die zentralen Ergebnisse der im Rahmen des Projekts durchgeführten Arbeiten zusammenfassend dargestellt. Die Projektarbeiten lassen sich dabei in fünf übergeordnete Teilbereiche gliedern.

Im Mittelpunkt stand die Modifikation und Optimierung des kontinuierlichen Biosyntheseprozesses von Polyhydroxybutyrat (PHB), beginnend mit der Fermentation bis hin zur nachgeschalteten Aufarbeitung (Downstream Processing) und der anschließenden Materialanalyse. Ziel war es, sowohl die Effizienz der Biosynthese zu steigern als auch gezielt die Materialeigenschaften, wie die mittlere Molmasse oder den PDI des synthetisierten PHB, zu beeinflussen.

Der daraus entwickelte kontinuierliche Syntheseprozess wurde anschließend im Rahmen einer techno-ökonomischen Analyse sowie einer ökobilanziellen Bewertung untersucht. Diese Analysen dienten der Abschätzung der Skalierbarkeit des Verfahrens und der ökonomischen Tragfähigkeit bei einer Produktionskapazität von 10.000 Tonnen pro Jahr.

Abschließend wurden Blends aus PHB und Polyvinylacetat (PVAc) hergestellt, um die daraus resultierenden Veränderungen der Materialeigenschaften zu quantifizieren. Ziel dieser Arbeiten war es, das Eigenschaftsspektrum von PHB gezielt zu erweitern.

6.1 Kontinuierliche Fermentation und Biosynthese des PHB

In mehreren kontinuierlich betriebenen Fermentationen konnten *steady-state* Bedingungen in der zweistufigen Bioreaktorkaskade umgesetzt werden. Insgesamt war der technische Aufwand jedoch deutlich höher als zunächst angenommen. Herausforderungen ergaben sich durch Besonderheiten des Dauerbetriebs wie Verschleiß am Rührerantrieb, Ausfall der Messtechnik sowie Aufzeichnungslücken durch Softwareprobleme. Biologisch bedingte Herausforderungen waren vermehrte Schaumbildung sowie Kontamination durch Fremdkeime. Der Prozess erwies sich jedoch auch unter diesen Gesichtspunkten als unerwartet robust und stabil. Die maximale Laufzeit betrug 1126 h.

Eine als Optimierung des Mediums zur Steigerung der Biomasse in Reaktor 1 umgesetzte Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration führte vermutlich zu einer Inhibierung der PHB-Einlagerung durch eine zu hohe Sulfatkonzentration in der darauffolgenden Reaktorstufe. Aufgrund der aufgeführten Schwierigkeiten konnten nicht in allen kontinuierlichen Fermentationen PHB in ausreichender Menge für Analytik und Folgeversuche gewonnen werden. Die mittleren Molmassen lagen im Bereich von 29.289 Da bis 416.830 Da, der PDI lag bei ca. 2 (+/- 13 %). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Fermentations- und/oder Extraktionsbedingungen ist aufgrund der geringen vollständig analysierbaren Probenanzahl nicht eindeutig erkennbar. Die zielgerichtete Steuerung der Molmassen konnte aufgrund der genannten technischen und biologischen Herausforderungen nicht wie beabsichtigt untersucht werden.

Die Entwicklung der auf dem *green solvent* DMC basierenden Extraktion konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Die mit DMC und Ethanol extrahierten Proben wiesen alle eine hohe Reinheiten von über 99 % auf und waren im Gegensatz zu den mit NaClO extrahierten Proben durchweg sehr gut analysierbar.

6.2 Direktextrusion von PHB und PVAc

Mittels Direktextrusion wurde das Blendverhalten zwischen PHB und PVAc untersucht und der Einfluss des Anteils an PVAc auf die Materialeigenschaften wie Viskosität, Zugfestigkeit, Schlagzähigkeit untersucht. Mittels Direktextrusion konnten erfolgreich compoundiert und direkt Bänder extrudiert werden, aus denen Probekörper entnommen wurden. Die Schmelzeviskositätsbestimmung zeigte eine lineare Abnahme der Viskosität mit zunehmender Konzentration an PVAc und die Bruchdehnung konnte im Vergleich zu reinem PHA bis zum 30fachen von (10% auf 297 %) gesteigert werden bei einem bei einem Anteil von 60 % PHB und 40 % PVAc. Zudem wurden die Schlageigenschaften der Polymer Blends bei Raumtemperatur und -30 °C untersucht. Die Kerbschlagzähigkeit der PHB/PVAc-Blends zeigt bei Raumtemperatur zunächst einen Anstieg um ca. 42 % bei niedrigen PVAc-Anteilen von 10 und 20 %, bedingt durch die weichmachende Wirkung von PVAc. Bei höheren Anteilen von 30 und 40 % sinkt die Zähigkeit jedoch auf etwa 46 % des Ursprungswertes, vermutlich aufgrund zunehmender Phasenseparation und damit einhergehender Rissbildung. Bei -30 °C bleibt die Kerbschlagzähigkeit generell niedrig, steigt aber leicht (ca. 33 %) mit zunehmendem PVAc-Anteil. Dies wird auf mögliche Veränderungen in der Phasenmorphologie zurückgeführt, wobei das spröde Verhalten insgesamt bestehen bleibt, da beide Komponenten unterhalb ihrer Glasübergangstemperatur liegen. Die Untersuchungen verdeutlichen eine signifikante Veränderung der Materialeigenschaften in Abhängigkeit vom PVAc-Anteil, wobei insbesondere die Reißdehnung eine ausgeprägte Abhängigkeit von der PVAc-Konzentration aufweist.

6.3 Analysemethoden zur Beurteilung der Materialqualität

Ein zentraler Aspekt zur Beurteilung der Qualität der im Rahmen des Projekts synthetisierten PHB-Proben – und damit auch zur Bewertung der Effizienz der kontinuierlichen Biosynthese – war die umfassende Analyse der hergestellten Materialien. Zu diesem Zweck wurden auf Basis eines kommerziell verfügbaren PHB geeignete Verfahren zur Bestimmung der mechanischen, chemischen und thermischen Eigenschaften entwickelt und angepasst.

Obwohl mit dem kommerziellen Referenzmaterial eine solide methodische Grundlage geschaffen werden konnte, stellte die geringe Menge an im Projekt gewonnenem PHB eine erhebliche Einschränkung für die Analytik dar. Aus diesem Grund konnten nur Verfahren angewendet werden, die mit sehr kleinen Probenmengen auskommen. Dazu zählten thermogravimetrische Analysen (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Gelpermeationschromatographie (GPC) sowie rheologische Messungen einzelner ausgewählter Proben mittels Platte-Platte-Rheologie zur Bestimmung der Viskosität.

Während TGA- und DSC-Messungen für sämtliche Proben erfolgreich durchgeführt werden konnten, erwies sich insbesondere die GPC-Analyse zur Bestimmung der mittleren Molmassen als herausfordernd. Für eine zuverlässige Quantifizierung mittels GPC ist eine vollständige Lösung der Probe im verwendeten Lösemittel zwingend erforderlich. Dies gelang bei Proben, die mittels Dimethylcarbonat (DMC) extrahiert wurden und eine entsprechend hohe Reinheit aufwiesen. Demgegenüber zeigten Proben, die durch Extraktion mit Natriumhypochlorit (NaClO) gewonnen wurden, häufig Verunreinigungen und Rückstände aus dem Biosyntheseprozess. Diese beeinträchtigten die Löslichkeit maßgeblich und verhinderten in vielen Fällen eine GPC-Analyse vollständig.

Interessanterweise lässt sich das Löslichkeitsverhalten der Proben daher nicht nur als analytische Herausforderung, sondern auch als erster qualitativer Indikator für den Erfolg der Biosynthese sowie die Effektivität des anschließenden Reinigungsprozesses interpretieren.

6.4 Ökobilanzielle Betrachtung

Die ökobilanzielle Betrachtung umfasst eine cradle-to-gate Betrachtung des Laborprozesses im Hinblick auf die für biobasierte Materialien besonders relevanten Indikatoren Treibhausgas-, Eutrophierungs-, Landnutzungs- und Wassernutzungspotential. Die deklarierte Einheit wurde auf 1 kg trockenes PHB gesetzt und der Laborprozess ohne Einbeziehung eines Effizienzfaktors auf 1 kg skaliert. Die Herstellung des PHB wurde in drei Prozessschritte aufgeteilt: Der kontinuierliche Prozess (CONTI), der Downstream Prozess (DSP) und die Entsorgung / Recycling der Lösemittelabfälle aus dem Downstream Prozess (SW). Da es sich beim vorliegenden Prozess um einen Labormaßstab handelt, während im optimierten, industriellen Prozess davon auszugehen ist, dass weniger Material und Lösemittel eingesetzt werden, wurde ein closed-loop Recycling des EtOH und des DMC in Szenarien berücksichtigt. Die Teilprozesse des DSP sowie des SW tragen beide etwa gleichermaßen zum Treibhausgaspotential bei. Der CONTI Prozess spielt beim betrachteten Laborprozess nur eine untergeordnete Rolle. Innerhalb des CONTI-Prozesses tragen hauptsächlich der Energieverbrauch (ca. 80 %) und das verwendete Glycerin (ca. 20 %) zum Treibhausgaspotential bei. Das Treibhausgaspotential des Down-Stream Prozesses wird dominiert vom Einsatz der Lösemittel. Ein Recycling der Lösemittel von 50 % bzw. 80 % verringert demnach das Treibhausgaspotential. Bei der Lösemittelverwertung hat die Verbrennung der Lösemittel den dominanten Einfluss. Die Energie, die zur Auftrennung angenommen wird, spielt hier nur eine untergeordnete Rolle, sodass ebenfalls ein Lösemittelrecycling von 50 % bzw. 80 % eine Verringerung des Treibhausgaspotentials um 50 % bzw. 80 % zur Folge hat. Das Eutrophierungspotential wird dominiert vom Down-Stream-Processing, die Landnutzung vom kontinuierlichen Prozess und das Wassernutzungspotential vom Lösemittelrecycling. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Treibhausgaspotential und das Wassernutzungspotential durch eine Optimierung des Lösemittelbedarfs unter industrieller Durchführung des Prozesses reduziert würden und nur so mit konventionellen Kunststoffen vergleichbare Umwelteinwirkungen erlangen.

6.5 Technoökonomische Analyse

Die technoökonomische Bewertung und Skalierung des kontinuierlichen Prozesses auf eine Jahresproduktion von 10.000 Tonnen PHB untersuchte drei Szenarien hinsichtlich ihrer Betriebskosten. Diese fokussieren sich auf Kosten für Rohstoff, Chemikalien und den Energieeinsatz und enthalten keine Angaben zu Lohn, Investition oder Versicherung. Im Szenario "Ungünstig" führten die hohen Kosten im DSP infolge des sehr hohen Lösemitteleinsatzes zu einem wirtschaftlich nicht tragfähigen Ergebnis von weit über 50 €/kg. Auch das Szenario "Grundlegend" mit Betriebskosten von 17,89 €/kg liegt deutlich über einem wettbewerbsfähigen Niveau, da der Marktpreis von PHB bei etwa 30 €/kg liegt und zusätzlich Kosten für Aufbereitung, Transport und Gewinnmargen sowie die nicht betrachteten Lohn- und Investitionskosten berücksichtigt werden müssen. Das Szenario "Optimistisch" zeigt mit 5,72 €/kg die wirtschaftlichste Kostenstruktur. In allen Szenarien entstehen die höchsten Kosten im DSP durch die Extraktion mit den Lösemitteln DMC und Ethanol, deren Kosten ohne Rückgewinnung prohibitiv wären. Durch Annahme einer 99% igen Rückgewinnung mittels energieeffizienter Trennung konnten die Kosten auf 0,81 €/kg PHB für Lösemittel und 1,91 €/kg für die Energie ihrer Rückgewinnung gesenkt werden. Weitere Kosten im DSP entstehen durch Zellinaktivierung, Zentrifugation und Trocknung, die jedoch in Summe mit 0,35 €/kg PHB moderat ausfallen. Der größte Anteil entfällt auf die Energie zur Lösemittelrückgewinnung (33,5 %), gefolgt von den Chemikalien und Salzen des Nährmediums (21,9 %), der Kohlenstoffquelle Glycerin (16,5 %) und den Kosten der Lösemittel EtOH und DMC für das DSP (14,2 %). Die restlichen Energiekosten machen etwa 14 % aus. Andere technoökonomische Skalierungen der Literatur erzielen oft Preise und Kosten unterhalb des durchschnittlichen Marktpreises. Im direkten Vergleich mit diesen zeigen sich die Betriebskosten im optimistischen Szenario konkurrenzfähig.

6.6 Weiterer Forschungsbedarf

Nach Abschluss des Projekts wird der weitere Forschungsbedarf wie folgt bewertet. Die Weiterentwicklung der kontinuierlichen Biosynthese von PHB ist prinzipiell vielversprechend. Hier sollte jedoch der Fokus auf die Medienoptimierung spezifisch für den kontinuierlichen Betrieb gelegt werden. Im Gegensatz zu Batch- oder Fed-Batch-Kultivierungen, in denen anfänglich zu hohen inhibierenden Konzentrationen durch einen Stoffwechsel gedingten Verbrauch über die Prozesszeit abgebaut werden, sind die Zellen bei kontinuierlichen Prozessen dauerhaft den Umgebungsbedingungen wie Nährstoffkonzentrationen etc. ausgesetzt. Inhibitionen und Limitierungen können somit den Prozess über die gesamte Prozesszeit negativ beeinflussen.

Um auch größere Mengen PHB im Zuge eines Upscaling gewinnen zu können, müssen neben Reaktor auch geeignete Downstream-Anlagen verwendet werden. Die Abtrennung der Zellen aus der Fermentationsbrühe ist beispielsweise unter den Aspekten Arbeitszeit und Personaleinsatz nur mit einem Tellerseparator effizient möglich. Die Extraktion mittels DMC ist auch für den größeren Maßstab technisch geeignet. Hier sollte jedoch berücksichtigt werden, dass der Lösemittelverbrauch auch unter der ambitionierten Annahme einer Lösemittelrückgewinnung von 99 % ein Kostentreiber hinsichtlich der Herstellungskosten ist.

Ein erheblicher weiterer Forschungsbedarf besteht insbesondere im Bereich der Polymerblends auf Basis von Polyhydroxybutyrat (PHB). Die zuvor dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass sich die Materialeigenschaften von PHB durch geeignete Blendstrategien in einem breiten Spektrum modifizieren lassen. Dies eröffnet neue Perspektiven für den Einsatz von PHB in technischen Anwendungen, die bisher aufgrund begrenzter Eigenschaften nicht realisierbar waren – ein Aspekt, der insbesondere für den Automobilbau von hoher Relevanz ist.

Mit dem zunehmenden Marktdurchbruch von Elektrofahrzeugen – ein Trend, der sich gemäß aktuellen Prognosen (laut IAE sollen bis 2030 weltweit ca. 50 % aller Neuwagen Elektrofahrzeuge sein) in den kommenden Jahren weiter verstärken wird – verändern sich auch die Anforderungsprofile an Kunststoffe grundlegend. So sind beispielsweise Kunststoffkomponenten im Motorraum von Elektrofahrzeugen aufgrund der deutlich geringeren thermischen Belastung weniger stark beansprucht als bei konventionellen Verbrennungsmotoren. Dies eröffnet Spielräume für den Einsatz neuer, bislang nicht etablierter Werkstoffe – allerdings müssen dafür Herstellungsprozesse noch so optimiert werden, dass die Nachhaltigkeit durch Energie- und Medieneinsatz positiv bleibt und Kosten wettbewerbsfähig zu konventionellen Kunststoffen sind.

Parallel dazu ist ein zunehmender Trend in der Automobilindustrie hin zu nachhaltigen Materialien zu beobachten. Hersteller setzen verstärkt auf biobasierte oder recycelte Kunststoffe, um ökologische Zielvorgaben und regulatorische Anforderungen zu erfüllen. Vor diesem Hintergrund erscheinen PHB und darauf basierende Blends als vielversprechende Werkstoffoptionen mit großem Entwicklungspotenzial. Allerdings bedarf es hierzu noch intensiver Forschung, insbesondere im Hinblick auf Langzeitstabilität, Verarbeitbarkeit und Performance unter realen Einsatzbedingungen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 PHB in der Bakterienzelle und als Kunststoffprodukt. Links: Einige Bakterienarten lagern bis zu 90 % ihres Zellgewichts in Form von PHB-Granulat ein, die hier im Bild als weiße Körner zu sehen sind. Rechts: PHB kann zu vielen Kunststoffprodukten des Alltags verarbeitet werden, z. B. Shampoo-Flaschen aus PHBV; ebenfalls ist der biologische Abbau der Flaschen zu sehen [14]. 11 Abbildung 2 Schematische Darstellung des an der THN entwickelten zweistufigen Fermentationsprozesses; Abkürzungen: PN = Probenahme; O₂ = Begasung; pH = pH-3 Fließschema der geplanten Arbeitspakete für das beantragte Abbildung Abbildung 4 Zweistufige Bioreaktorkaskade zur PHB-Herstellung an der TH Nürnberg; A: Versuchsaufbau mit Bioreaktoren vom Typ Minifors1 mit einem Arbeitsvolumen von Abbildung 5 Abbildung 6 Übersicht zu den Extraktionsschritten mit Natriumhypochlorit. A: Abbildung 7 Gefälltes PHB in DMC-Ethanol-Lösung......24 Abbildung 8. Übersicht zu den untersuchten Methoden der Hitzeinaktivierung [41]....25 Abbildung 9 Mahlgut des über Messkneter hergestellten und stabilisierten ENMAT Y3000P. 27 Abbildung 10 Scherviskositätsfunktion des Materials ENMAT Y3000P bei 185 °C. Abbildung 11 28 Abbildung 12 Abbildung 13 des Testmaterials ENMAT Y3000P Abbildung 14 Molmassenverteilung in 33 Chloroform. Abbildung 15 Abbildung 16 Abbildung 17 DSC-Thermogramm des Testmaterials ENMAT Y3000P (grün erste Abbildung 18 Abbildung 19 DSC-Kurve einer in einem Kolbenversuch synthetisierten Probe (Probe 1) mit lediglich einem Schmelzpeak in der zweiten Aufheizung (rot erste Aufheizung, DSC-Kurve einer im Fed-Batch-Prozess synthetisierten Probe (Probe Abbildung 20 47) mit zwei Schmelzpeaks in der zweiten Aufheizung (violet erste Aufheizung, blau 1.
Abbildung 21 pv	T-Diagramm des Testmaterials ENMAT Y3000P38
Abbildung 22 Vi	skositätsfunktion des Testmaterials ENMAT Y3000P bei 180 °C in
einem Schergeschw	indigkeitsbereich zwischen 0,01 und 100 s ⁻¹
Abbildung 23 Übe ENMAT Y3000P	er eine Plattenpresse hergestellte Prüfkörper aus pulverförmigem
Abbildung 24 Me	esskneter der Firma Brabender42
Abbildung 25 Tl	hermo Haake MiniLab43
Abbildung 26 Üb	ber Thermo Haake MiniLab hergestellte Zugstäbe des Testmaterials
ENMAT Y3000P	
Abbildung 27D(links).44	virektextrusionsanlage Dr. Collin ZK 25 T (rechts) mit Glättwerk
Abbildung 28 Ex	xtrusionsdüse (Fa. Dr. Collin)45
Abbildung 29 Gl	ättwerk (Fa. Dr. Collin)45
Abbildung 30 Sc	hneckenplan für die Direktextrusion45
Abbildung 31PrVerfahren.49	rozessschema für die Herstellung von 1 kg PHB im kontinuierlichen
Abbildung 32 Du deutlich reduziert w	urch die Zugabe des Antischaummittels kann die Schaummittel verden
die Schlauchpumpe Versuchsaufbau Ver der Regelung über d Abbildung 34. Deta Anzahl der Pumpen [45].	en zeigte ein über die Zeit dynamisches Verhalten. A: Im erwendete 6-fache Schlauchpumpe, B: Schwankende Flussraten bei die Schlauchpumpe aufgrund der Schlauchaufweitung
Abbildung 35 Valie Verdünnungsrate D Ergebnisse die Stu Ergebnisse der Stu aufgetretene Problem und Zwischenfälle Prozess als robust un Zustand ein	dierungslaufs mit über 1100 h kontinuierlichen Betrieb mit einer = 0,1 h ⁻¹ (BTM = Biotrockenmasse). Im oberen Graph (A) sind die ufe 1 (Biomasse-Generierung), im unteren Graphen (B) sind die ufe 2 (PHB-Einlagerung) gezeigt. Die Textfelder beschreiben me und technische Ausfälle. Trotz zahlreicher technischer Defekte sowie einer Kontamination durch einen Luftkeim erwies sich der nd pendelte sich ab t = 600 h zumindest bei Stufe 1 auf einen stabilen
Abbildung 36 A Hitzeeinwirkung bei bis V4). Proteinko Hitzebehandlung fü Hitzeinaktivierung e im Vergleich zu Ko hinweist. Die Zellly	Autgrund der im Funktionsprinzip Rohrreaktor umgesetzte i 80 Grad freigesetzte Proteinkonzentrationen bei vier Versuchen (V1 onzentrationen würden mittels Biuret-Nachweis bestimmt. Die ührte zu einem Anstieg gelöster Proteine am Ablauf der zur eingesetzten Schlauchreaktors (Ablauf HI) auf das nahezu Dreifache onzentration im Reaktor 2 (RefR2), was auf Hitze bedingte Zelllyse vse scheint im Sammelbehälter weiterhin stattzufinden [41]61

Abbildung 37 Thermogramm eines einer im kontinuierlichen Syntheseprozess hergestellten und mittels DMC extrahierten PHB-Probe (Probe 42) hoher Reinheit. 64 Abbildung 38 Thermogramm eines einer im kontinuierlichen Syntheseprozess hergestellten und mittels DMC extrahierten PHB-Probe (Probe 39) niedriger Reinheit. 65

Abbildung 42Molmassenverteilung einer synthetisierten Probe einer synthetisiertenProbe mit vermutetem geringem thermischem Abbau aufgrund von Reststoffen aus derSynthese aufgrund von Reststoffen aus der Synthese in Chloroform (grün UV-Signal, rotRI-Signal).68

Abbildung 44 Graphische Darstellung der MFR-Messwerte der PHB/PVAc Blends. 74

Abbildung 45Spannungs-Dehnungs-DiagrammederhergestelltenPHB/PVAcBlends.75

Abbildung 48 Abhängigkeit der Schlagzähigkeit vom Mischverhältnis PHB/PVAc

-30 °C. 78

Abbildung 50 Zuordnung der Flüsse zu den Prozessen CONTI, DSP und SW. 79

Abbildung 52Einfluss der Prozessschritte auf den GWP 100 (oben links), das EPfreshwater (oben rechts), Land Use (unten links) und Water Use (unten rechts) derTeilprozesse für die drei Szenarien.82Abbildung 53Kostenzusammensetzung der kontinuierlichen Fermentationsschritteskaliert auf 10.000 t pro Jahr.88

Abbildung 54	Kostenzusammensetzung des Down-Stream-Processing für die	drei
verschiedenen	Szenarien mit den jeweils zugrundeliegenden Annahmen	92
Abbildung 55	Kostenanteile des skalierten Gesamtprozesses zum PHB-Preis	von
5,72 €/kg im S	zenario "Optimistisch"	93

8 Literaturverzeichnis

- IfBB Institute for Bioplastics and Biocomposites (ed.), "Biopolymers Facts and statistics 2024," 2025. Zugriff am: 15. Mai 2025. [Online]. Verfügbar unter: https:// www.ifbb-hannover.de/files/IfBB/downloads/faltblaetter_broschueren/f+s/IfBB-Biopolymers-FactsAndStatistics-2024.pdf
- [2] F. M. Lamberti, L. A. Román-Ramírez und J. Wood, "Recycling of Bioplastics: Routes and Benefits," *J Polym Environ*, Jg. 28, Nr. 10, S. 2551–2571, 2020, doi: 10.1007/s10924-020-01795-8.
- [3] M. D. Goldberg, "A review of the biodegradability and utility of poly(caprolactone)," *J Environ Polym Degr*, Jg. 3, Nr. 2, S. 61–67, 1995, doi: 10.1007/BF02067481.
- [4] A. J. Anderson und E. A. Dawes, "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates," *Microbiological Reviews*, Jg. 54, Nr. 4, S. 450–472, 1990, doi: 10.1128/MMBR.54.4.450-472.1990.
- [5] G.-Y. Tan *et al.*, "Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review," *Polymers*, Jg. 6, Nr. 3, S. 706–754, 2014, doi: 10.3390/polym6030706.
- [6] M. Koller, A. Salerno und G. Braunegg, "Polyhydroxyalkanoates: Basics, Production and Applications of Microbial Biopolyesters," in *Bio-Based Plastics*, S. Kabasci, Hg., Wiley, 2013, S. 137–170.
- [7] P. Skoczinski *et al.*, "Bio-based Building Blocks and Polymers Global Capacities, Production and Trends 2024–2029," 2025, doi: 10.52548/UMTR4695.
- [8] M. Koller und G. Braunegg, "Potential and Prospects of Continuous Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production," *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, Early Access. doi: 10.3390/bioengineering2020094.
- [9] D. Tan, Y. Wang, Y. Tong und G.-Q. Chen, "Grand Challenges for Industrializing Polyhydroxyalkanoates (PHAs)," *Trends in biotechnology*, Early Access. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.11.010.
- [10] K. Sudesh, H. Abe und Y. Doi, "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters," *Progress in Polymer Science*, Jg. 25, Nr. 10, S. 1503–1555, 2000, doi: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6.
- [11] M. Koller und A. Mukherjee, "A New Wave of Industrialization of PHA Biopolyesters," *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, Early Access. doi: 10.3390/bioengineering9020074.

- [12] N. Koyama und Y. Doi, "Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3hyhroxyvalerate) byAlcaligenes eutrophus," *Biotechnol Lett*, Jg. 17, Nr. 3, S. 281– 284, 1995, doi: 10.1007/BF01190637.
- [13] A. J. Anderson und E. A. Dawes, "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates," *Microbiological Reviews*, Jg. 54, Nr. 4, S. 450–472, 1990, doi: 10.1128/mr.54.4.450-472.1990.
- [14] O. Türk, "Biogene Polyester," in *Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe*, O. Türk, Hg., Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden, 2014, S. 293–321.
- [15] M. Koller, "A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters," *Fermentation*, Jg. 4, Nr. 2, S. 30, 2018, doi: 10.3390/fermentation4020030.
- [16] T. Li, X. Chen, J. Chen, Q. Wu und G.-Q. Chen, "Open and continuous fermentation: products, conditions and bioprocess economy," *Biotechnology journal*, Jg. 9, Nr. 12, S. 1503–1511, 2014, doi: 10.1002/biot.201400084.
- [17] G. J. Leigh, "Haber-Bosch and Other Industrial Processes," in *Catalysts for Nitro-gen Fixation*, B. E. Smith, R. L. Richards und W. E. Newton, Hg., Dordrecht: Springer Netherlands, 2004, S. 33–54.
- [18] N. Tanadchangsaeng und J. Yu, "Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester," *Biotechnology and bioengineering*, Early Access. doi: 10.1002/bit.24546.
- [19] B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker und P. Lant, "The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates," *Progress in Polymer Science*, Jg. 38, 3-4, S. 536–583, 2013, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003.
- [20] E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri und V. Alvarez, "Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging," *Express Polym. Lett.*, Jg. 8, Nr. 11, S. 791–808, 2014, doi: 10.3144/expresspolymlett.2014.82.
- [21] A. Aramvash, F. Moazzeni Zavareh und N. Gholami Banadkuki, "Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from Cupriavidus necator," *Engineering in life sciences*, Early Access. doi: 10.1002/elsc.201700102.
- [22] G. Penloglou, A. Vasileiadou, C. Chatzidoukas und C. Kiparissides, "Model-based intensification of a fed-batch microbial process for the maximization of polyhydroxybutyrate (PHB) production rate," *Bioprocess and biosystems engineering*, Early Access. doi: 10.1007/s00449-017-1784-0.
- [23] C. Kourmentza und M. Kornaros, "Biotransformation of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates by employing mixed microbial consortia: The effect of pH and carbon source," *Bioresource technology*, Early Access. doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.014.
- [24] I. Vizcaino-Caston, C. A. Kelly, A. V. L. Fitzgerald, G. A. Leeke, M. Jenkins und T. W. Overton, "Development of a rapid method to isolate polyhydroxyalkanoates from bacteria for screening studies," *Journal of bioscience and bioengineering*, Early Access. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.021.

- [25] S. N. S. Anis, N. Md Iqbal, S. Kumar und A.-A. Amirul, "Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from Cupriavidus necator recombinant harboring the PHA synthase of Chromobacterium sp. USM2," *Separation and Purification Technology*, Jg. 102, S. 111–117, 2013, doi: 10.1016/j.seppur.2012.09.036.
- [26] E. D. Bluemink, A. F. van Nieuwenhuijzen, E. Wypkema und C. A. Uijterlinde, "Bio-plastic (poly-hydroxy-alkanoate) production from municipal sewage sludge in the Netherlands: a technology push or a demand driven process?," *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, Jg. 74, Nr. 2, S. 353–358, 2016, doi: 10.2166/wst.2016.191.
- [27] G. Mannina, D. Presti, G. Montiel-Jarillo und M. E. Suárez-Ojeda, "Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures," *Bioresource technology*, Early Access. doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.037.
- [28] C. Kourmentza *et al.*, "Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production," *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, Early Access. doi: 10.3390/bioengineering4020055.
- [29] R. Z. Sayyed, N. S. Gangurde und S. B. Chincholkar, "Hypochlorite digestion method for efficient recovery of PHB from Alcaligenes faecalis," *Indian journal of microbiology*, Early Access. doi: 10.1007/s12088-009-0036-7.
- [30] S. Righi *et al.*, "A life cycle assessment of poly-hydroxybutyrate extraction from microbial biomass using dimethyl carbonate," *Journal of Cleaner Production*, Jg. 168, S. 692–707, 2017, doi: 10.1016/j.jclepro.2017.08.227.
- [31] C. Samorì *et al.*, "Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass," *Green Chem.*, Jg. 17, Nr. 2, S. 1047–1056, 2015, doi: 10.1039/C4GC01821D.
- [32] M. Mohammadi, M. A. Hassan, L.-Y. Phang, H. Ariffin, Y. Shirai und Y. Ando, "Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant Cupriavidus necator using water and ethanol," *Biotechnol Lett*, Early Access. doi: 10.1007/s10529-011-0783-5.
- [33] A. F. Ramos, M. Muñoz, A. Espinosa, I. O. Cabeza und N. Moreno-Sarmiento, "Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate) solubility in non-halogenated solvents to achieve an environmentally friendly recovery process from Burkholderia cepacia B27 cells," *J of Chemical Tech & Biotech*, Jg. 95, Nr. 6, S. 1657–1665, 2020, doi: 10.1002/jctb.6357.
- [34] E. Berger, B. A. Ramsay, J. A. Ramsay, C. Chavarie und G. Braunegg, "PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass," *Biotechnol Tech*, Jg. 3, Nr. 4, S. 227–232, 1989, doi: 10.1007/BF01876053.
- [35] M. López-Abelairas, M. García-Torreiro, T. Lú-Chau, J. M. Lema und A. Steinbüchel, "Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from Cupriavidus necator H16 cultures," *Biochemical Engineering Journal*, Jg. 93, S. 250–259, 2015, doi: 10.1016/j.bej.2014.10.018.

- [36] S. N. S. Anis, N. M. Iqbal, S. Kumar und A. Al-Ashraf, "Increased recovery and improved purity of PHA from recombinant Cupriavidus necator," *Bioengineered*, Early Access. doi: 10.4161/bioe.22350.
- [37] M. H. Haddadi, R. Asadolahi und B. Negahdari, "The bioextraction of bioplastics with focus on polyhydroxybutyrate: a review," *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, Jg. 16, Nr. 7, S. 3935–3948, 2019, doi: 10.1007/s13762-019-02352-0.
- [38] Y. Elbahloul und A. Steinbüchel, "Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by Pseudomonas putida GPo1 and a simplified downstream process," *Applied and environmental microbiology*, Early Access. doi: 10.1128/AEM.01869-08.
- [39] M. Lopar, I. Vrana Špoljarić, A. Atlić, M. Koller, G. Braunegg und P. Horvat, "Five-step continuous production of PHB analyzed by elementary flux, modes, yield space analysis and high structured metabolic model," *Biochemical Engineering Journal*, Jg. 79, S. 57–70, 2013. doi: 10.1016/j.bej.2013.07.003. [Online]. Verfügbar unter: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/ S1369703X13002052
- [40] B. Mongili *et al.*, "Novel insights in dimethyl carbonate-based extraction of polyhydroxybutyrate (PHB)," *Biotechnol Biofuels*, Early Access. doi: 10.1186/s13068-020-01849-y.
- [41] F. Berner, "Untersuchung zur Hitze-Inaktivierung von PHB-haltiger Biomasse aus einem kontinuierlichen Fermentationsprozess," Masterarbeit, Bioverfahrenstechnik, Technische Hochschule Georg Simon Ohm, Nürnberg, 2024.
- [42] H. Chmiel, R. Takors und D. Weuster-Botz, Hg. *Bioprozesstechnik*, 4. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 2018.
- [43] J. S. Crater und J. C. Lievense, "Scale-up of industrial microbial processes," FEMS Microbiol Lett, Jg. 365, Nr. 13, 2018. doi: 10.1093/femsle/fny138. [Online]. Verfügbar unter: https://academic.oup.com/femsle/article/365/13/fny138/5026621?login=true
- [44] M. L. Shuler, F. Kargi und M. DeLisa, *Bioprocess engineering : basic concepts / Michael L. Shuler, Fikret Kargi, Matthew DeLisa* (Prentice Hall international series in the physical and chemical engineering sciences). Boston: Prentice Hall, 2017.
- [45] M. Obermeier, "Untersuchung des Einflusses verschiedener Prozessparameter auf die kontinuierliche Produktion von Polyhydroxibutyrat (PHB) durch Cupravidus necator"," Bachelorarbeit, Bioverfahrenstechnik, Technische Hochschule Georg Simon Ohm, Nürnberg, 2024.
- [46] J. Wang *et al.*, "Effects of different sodium salts and nitrogen sources on the production of 3-hydroxybutyrate and polyhydroxybutyrate by Burkholderia cepacia," *Bioresources and Bioprocessing*, Early Access. doi: 10.1186/s40643-021-00418-x.
- [47] S. K. Hahn, Y. K. Chang, B. S. Kim, K. M. Lee und H. N. Chang, "The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform," *Biotechnol Tech*, Jg. 7, Nr. 3, S. 209–212, 1993. doi:

10.1007/BF02566149. [Online]. Verfügbar unter: https://link.springer.com/article/ 10.1007/BF02566149

- [48] J. B. Guinée, G. Huppes und R. Heijungs, "Developing an LCA guide for decision support," *Environmental Management and Health*, Jg. 12, Nr. 3, S. 301–311, 2001. doi: 10.1108/09566160110392416. [Online]. Verfügbar unter: https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/09566160110392416/full/pdf
- [49] F. Schafranek, "Destillation eines ternären Gemisches aus Ethanol, Wasser und Dimerhylcarbonat (DMC)," Bachelorarbeit, Bioverfahrenstechnik, Technische Hochschule Georg Simon Ohm, Nürnberg, 2024.
- [50] T. Attarbachi, M. D. Kingsley und V. Spallina, "New trends on crude glycerol purification: A review," *Fuel*, Jg. 340, S. 127485, 2023. doi: 10.1016/j.fuel.2023.127485. [Online]. Verfügbar unter: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236123000984
- [51] B. Diwan und P. Gupta, "Broth recycling in high carbon demanding single cell oil fermentation increased the product to effluent generation ratio," *Process Biochemistry*, Jg. 75, S. 68–73, 2018. doi: 10.1016/j.procbio.2018.09.008. [Online]. Verfügbar unter: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511318309218
- [52] T.-Y. Hsiao und C. E. Glatz, "Water reuse in the L-lysine fermentation process," *Biotechnol. Bioeng.*, Jg. 49, Nr. 3, S. 341–347, 1996. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960205)49:3<341::AID-BIT13>3.0.CO;2-H. [Online]. Verfügbar unter: https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0290(19960205)49:3%3C341::AID-BIT13%3E3.0.CO;2-H
- [53] C. Zhang *et al.*, "Reduction wastewater discharge in second-generation acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation process by adsorptive removal of organic acids toward the broth recycling system," *Journal of Cleaner Production*, Jg. 337, S. 130573, 2022. doi: 10.1016/j.jclepro.2022.130573. [Online]. Verfügbar unter: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652622002141
- [54] Schaller WTI GmbH. "Kostenvergleich zur VE Wasser Herstellung |Schaller WTI." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://www.schallerwti.de/inhalt/kostenvergleich-Umkehrosmose-ionenaustauscher/
- [55] "Wasserpreisvergleich 2024." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://www.vea.de/newsroom/pressemitteilungen/pressemitteilung/wasserpreisvergleich-2024-in-keinem-einzugsgebiet-fielen-die-preise
- [56] M. W. Julia Vogt, "Kostbares Nass: Industriewasser billiger als Trinkwasser," MDR, 14. Juli 2023. Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https:// www.mdr.de/nachrichten/deutschland/panorama/wasser-kosten-sparen-trinkwasser-100.html
- [57] Chemieshop24. "Natronlauge 50% EN 896 im Container günstig kaufen chemieshop24." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://www.chemieshop24.de/natronlauge-50-en896-1300kg-container/1000408701012

- [58] Kaliumdihydrogenphosphat 2,5 kg. "Kaliumdihydrogenphosphat 2,5 kg." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://phygenera.de/Kaliumdihydrogenphosphat-25-kg
- [59] Chemieshop24. "Ammoniumsulfat tech. 1000kg Palette günstig online bestellen." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://www.chemieshop24.de/ ammoniumsulfat-tech.-1000kg-palette/1002241541002-1
- [60] "Ammoniumeisen(III)-citrat, 5 kg, CAS No. 1185-57-5, online bestellen⮞ carlroth.com." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https:// www.carlroth.com/de/de/von-a-bis-z/ammoniumeisen%28iii%29-citrat/p/cn77.5
- [61] "Merck | Germany." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https:// www.sigmaaldrich.com/DE/de
- [62] Chemieshop24. "Bittersalz günstig 1000kg Palette kaufen." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://www.chemieshop24.de/bittersalz-mg-sulfattechn.-1000kg-palette/1000323141010-1
- [63] Calciumchlorid Dihydrat 1 kg. "Calciumchlorid Dihydrat 1 kg." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://phygenera.de/Calciumchlorid-Dihydrat-1kg
- [64] Chemieshop24. "Schwefelsäure 96% DIN EN 899 1000 kg im Container günstig kaufen chemieshop24." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https:// www.chemieshop24.de/schwefelsaeure-96-en899-1300kg-container/ 1003222201001
- [65] "Silicone anti-foaming emulsion 30, 2.5 l, order online⮞ carlroth.com." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://www.carlroth.com/com/ en/a-to-z/silicone-anti-foaming-emulsion-30/p/0734.3
- [66] M. Kaiser. "Kostencheck: Was kostet Druckluft pro m³?" Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://info.atlascopco-kompressoren.de/blog/kostencheck-was-kostet-druckluft-pro-kubikmeter
- [67] Statista. "Industriestrompreise inkl. Stromsteuer in Deutschland 2025 | Statista." Zugriff am: 10. April 2025. [Online.] Verfügbar: https://de.statista.com/statistik/ daten/studie/252029/umfrage/industriestrompreise-inkl-stromsteuer-in-deutschland/
- [68] "Hygienic Rotomaxx II Low Speed Large Capacity Agitator Admix." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://admix.com/hygienic-sanitary-industrial-mixing-equipment/rotomaxx-ii-low-speed-large-capacity-agitator-low-shear? _gl=1*ut0xad*_up*MQ.*_gs*MQ.&gclid=EAIaIQobChMI9JepssKFjAMVmJGDBx1LUSwLEAAYASAAEgLOy_D_BwE
- [69] "Dynamisches Rührwerk DINAMIX SMX INOXPA Batch / für Flüssigkeiten / horizontal." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://www.directindustry.de/prod/inoxpa/product-66392-2504284.html
- [70] "ALP Niederdruck-Peristaltikpumpe | Albin Pump." Zugriff am: 24. März 2025.[Online.] Verfügbar: https://www.albinpump.com/de-de/products/alp-peristaltic-pump

- [71] "Broschüren, Prospekte & Downloads | Flottweg Industriezentrifuge." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://www.flottweg.com/de/downloads/unsere-produkte/
- [72] "LÄNDERLISTE COMMODITY." Zugriff am: 24. März 2025. [Online.] Verfügbar: https://de.tradingeconomics.com/commodities
- [73] G. Sahoo, A. M. Wani, S. L. Swamy und A. Sharma, "Environmental Impact and Economic Benefits of Biofuel Production," *Bio-Clean Energy Technologies: Volume 1*, S. 349–378, 2022. doi: 10.1007/978-981-16-8090-8_16. [Online]. Verfügbar unter: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-16-8090-8_16#citeas
- [74] "Grundlagen," in *Thermische Trennverfahren*, John Wiley & Sons, Ltd, 2017, S. 1–122.
- [75] J. D. Seader, E. J. Henley und D. K. Roper, Separation process principles with applications using process simulators. Hoboken, NJ: Wiley, 2016. [Online]. Verfügbar unter: https://permalink.obvsg.at/
- [76] "Andreas Jess and Peter Wasserscheid: Chemical Technology: From Principles to Products 2nd Edn," *Chromatographia*, Jg. 83, Nr. 11, S. 1437, 2020. doi: 10.1007/s10337-020-03964-2. [Online]. Verfügbar unter: https://link.springer.com/ article/10.1007/s10337-020-03964-2
- [77] Y. Chen, I.-N. Chou, Y.-H. Tsai und H.-S. Wu, "Thermal degradation of poly(3hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) in drying treatment," *J of Applied Polymer Sci*, Jg. 130, Nr. 5, S. 3659–3667, 2013. doi: 10.1002/app.39616. [Online]. Verfügbar unter: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/ 10.1002/app.39616
- [78] www.alibaba.com. "100% Virgin Biologisch Abbaubares Polyhydroxybutyratgranulat Pure Phb Poly Hydroxy Butyrat Online Kaufen - Buy Polyhydroxyalkanoate pha polyhydroxyalkanoate Pha polyhydroxybutyrate Granules polyhydroxybutyrate polyhydroxybutyrate Buy Online polyhydroxybutyrate Granule Product on Alibaba.com." Zugriff am: 6. Juni 2025. [Online.] Verfügbar: https://www.alibaba.com/product-detail/100-Virgin-Biodegradable-Polyhydroxybutyrate-Granule-PURE_1601235367239.html?spm=a2700.common-compass.0.d_title.ce78fGn7fGn7wU
- [79] www.alibaba.com. "Virgin Biologisch Abbaubares Phb-pulver In Srock Buy Phb Powder,Biodegradable Phb,Phb Granule Product on Alibaba.com." Zugriff am: 6. Juni 2025. [Online.] Verfügbar: https://www.alibaba.com/product-detail/Virgin-Biodegradable-PHB-Powder-in-Srock_1600518583423.html?spm=a2700.commoncompass.0.d_title.ce78fGn7fGn7wU
- [80] R. Carpine, G. Olivieri, K. J. Hellingwerf, A. Pollio und A. Marzocchella, "Industrial Production of Poly-β-hydroxybutyrate from CO2: Can Cyanobacteria Meet this Challenge?," *Processes*, Jg. 8, Nr. 3, S. 323, 2020. doi: 10.3390/pr8030323. [Online]. Verfügbar unter: https://www.mdpi.com/2227-9717/8/3/323

- [81] V. Kachrimanidou *et al.*, "Techno-economic evaluation and life-cycle assessment of poly(3-hydroxybutyrate) production within a biorefinery concept using sunflower-based biodiesel industry by-products," *Bioresource technology*, Early Access. doi: 10.1016/j.biortech.2021.124711.
- [82] L. R. Kumar, R. Kaur, R. D. Tyagi und P. Drogui, "Identifying economical route for crude glycerol valorization: Biodiesel versus polyhydroxy-butyrate (PHB)," *Bioresource technology*, Jg. 323, S. 124565, 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124565. [Online]. Verfügbar unter: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852420318393
- [83] S. Price, U. Kuzhiumparambil, M. Pernice und P. Ralph, "Techno-economic analysis of cyanobacterial PHB bioplastic production," *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Jg. 10, Nr. 3, S. 107502, 2022. doi: 10.1016/j.jece.2022.107502.
 [Online]. Verfügbar unter: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221334372200375X
- [84] M. S. Peters, K. D. Timmerhaus und R. E. West, *Plant design and economics for chemical engineers*, 5. Aufl. (McGraw-Hill chemical engineering series). Boston: McGraw-Hill, 2004. [Online]. Verfügbar unter: http://www.loc.gov/catdir/description/mh031/2002032568.html
- [85] J. Chen, R. D. Tyagi, J. Li, X. Zhang, P. Drogui und F. Sun, "Economic assessment of biodiesel production from wastewater sludge," *Bioresource technology*, Early Access. doi: 10.1016/j.biortech.2018.01.016.
- [86] D. Bundesbank, "Wechselkursstatistik," [Online]. Verfügbar unter: https:// www.bundesbank.de/resource/blob/804114/428c433ce3963bda391749a6449c3cf7/ 472B63F073F071307366337C94F8C870/ii-euro-referenzkurse-der-ezb-data.pdf