

Abschlussbericht
an die
Willy-Hager-Stiftung
zum Projekt

**Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen Teil III -
Entwicklung von Strategien zur Steigerung des Feststoffgehaltes &
Ansätzen für eine kontinuierliche Produktion**

Laufzeit: 01.03. – 31.12.2025

Cora Laumeyer M.Sc.

Prof. Dr.-Ing. Heidrun Steinmetz

Rheinland-Pfälzisch Technische Universität Kaiserslautern-Landau

Fachgebiet Ressourceneffiziente Abwasserbehandlung

Mai 2026

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung.....	3
1.1 Hintergrund.....	3
1.2 Ziel des Projekts	5
2 Theoretischer Hintergrund	7
3 Material und Methoden	7
3.1 Substratherstellung.....	7
3.1.1 Versäuerung von Brauereiabwasser	7
3.1.2 Herstellung von synthetischem Substrat	8
3.1.3 Nährstoffzugabe	9
3.2 Selektion	9
3.2.1 Versuchsaufbau.....	10
3.2.2 Versuchsbeschreibung	13
3.3 Akkumulation.....	15
3.3.1 Versuchsaufbau.....	15
3.3.2 Versuchsbeschreibung	16
3.4 PHA-Extraktion mittels Natriumhypochlorit.....	17
3.5 Analytik	17
3.5.1 Probenvorbereitung zur Analyse gelöster Parameter	18
3.5.2 Gesamter- bzw. gelöster organischer Kohlenstoff.....	19
3.5.3 Kurzketttige Fettsäuren (VFA)	19
3.5.4 Bestimmung von $\text{NH}_4\text{-N}$ und $\text{PO}_4\text{-P}$ mittels Ionenchromatographie.....	19
3.5.5 Bestimmung des Biopolymergehaltes in Form von Polyhydroxyalkanoaten (PHA) ...	20
3.5.6 Untersuchung des thermischen Verhaltens verschiedener PHA-Proben mittels Differenzkalorimetrie (DSC).....	21
4 Ergebnisse und Diskussion.....	22
4.1 Substratzusammensetzung.....	22
4.2 Laborversuche zur Steigerung des Feststoffgehaltes	23
4.3 Entwicklung einer (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion im Labormaßstab	28
4.4 Upscaling des Verfahrens in den Pilotmaßstab	38

4.5	Ergebnisse des thermischen Verhaltens hergestellter PHA	45
5	Fazit.....	48
6	Danksagung	53
7	Literatur	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion, modifiziert nach (Uhrig 2023).	7
Abbildung 2: Links: Molare Zusammensetzung der versäuerten Brauereiabwässer (Laumeyer et al. 2023; Zimmer 2025); Rechts: die gemittelte VFA-Zusammensetzung der verschiedenen Batches (vers. Brau) und die daraus abgeleitete Zusammensetzung des synthetischen Substrates (synth.Sub), modifiziert nach La Cruz (2025).....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Selektionsreaktoren (Steinmetz et al. 2024).....	11
Abbildung 4: Versuchsaufbau der Selektion und Akkumulation für die (semi-)kontinuierliche PHA-Produktion im Labormaßstab. Oben: Beschreibung der Messtechnik und Armaturen; Unten: Schematisches Fließbild. In La Cruz (2025) nach Uhrig (2023).....	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung zweier 6 h Zyklen, im Wechsel ohne- und mit Sedimentation vor Abzug. Modifiziert nach Steinmetz et al. (2024).....	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur PHA-Produktion (Steinmetz et al. 2024).....	16
Abbildung 7: Stoffliche Zusammensetzung der verwendeten Substrate.....	23
Abbildung 8: Entwicklung des PHA-Gehalts an Akkumulationen an den Tagen 0, 7 und 14 des Selektionsprozesses unter Verwendung von Klärschlamm mit Zugabe von 1 g CaCO ₃ (WAS+CaCO ₃) oder ohne (WAS). Abbildung 8 A zeigt den prozentualen Anteil an PHA innerhalb der organischen Trockensubstanz (oTS) und Abbildung 8 B zeigt die auf die PHA-Konzentration in mg L ⁻¹ umgerechneten Ergebnisse. Modifiziert und erweitert von Laumeyer et al. (2025a).	24
Abbildung 9: Ergebnisse der Versuchsreihe mit einer Sedimentation pro Zyklus, die ein höheres Schlammalter bedingt sowie einer Entkopplung der Nährstoffzugabe. A: Entwicklung des Feststoffgehaltes über die Versuchsdauer von 14 Tagen in den Selektionsreaktoren, B: Verlauf der PHA-Konzentration in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion (die Biomasse stammte aus dem homogenisierten Selektionsreaktor).	26
Abbildung 10: Ergebnisse einer Entkopplung der Nährstoffzugabe bei einem Schlammalter von 4 d und realem Substrat aus versäuertem Brauereiabwasser. A: Entwicklung des Feststoffgehaltes über die Versuchsdauer von 28 Tagen in den Selektionsreaktoren, B: Verlauf der PHA-Konzentration in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion.	27
Abbildung 11: Vergleich der erzielten Raumausbeute in den Versuchsreihen mit einer Entkopplung der Substrat- und Nährstoffzugabe unter Nutzung eines Schlammalters von 4 bzw. > 4 Tagen.....	28
Abbildung 12: Darstellung des Verlaufs der Feststoffkonzentration in der Selektion über 28 Tage. A: 2 d Schlammalter (n=3), B: 4 d Schlammalter (n=2).	29
Abbildung 13: Verlauf der PHA-Konzentration in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion. A: Durchschnittlicher PHA-Gehalt bei 2 d Schlammalter (n=3), B: Durchschnittlicher PHA-Gehalt bei 4 d Schlammalter (n=2), C: Verlauf des PHA-Gehalts in den Reaktoren mit SRT= 2 d, D: Verlauf des PHA-Gehalts in den Reaktoren mit SRT= 4 d.	30
Abbildung 14: Vergleich der erzielten Raumausbeute in den Versuchsreihen mit synthetischem Substrat unter Nutzung eines Schlammalters von 2 bzw. 4 Tagen.....	31
Abbildung 15: Ergebnisse des (semi-)kontinuierlichen Betriebs mit Nutzung eines Schlammalters von 4 d und realem Substrat aus versäuertem Brauereiabwasser. A: Entwicklung des Feststoffgehaltes über	

die Versuchsdauer von 28 Tagen in den Selektionsreaktoren, B: Verlauf der PHA-Konzentration in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion.	33
Abbildung 16: Verlauf der erzielten Raumausbeute an verschiedenen Tagen der Selektion mit realem Substrat (n=2).	34
Abbildung 17: Verlauf der Feststoffkonzentration in der Selektion über 119 Tage unter veränderlichen Betriebsstrategien der verschiedenen Versuchsreihen (VR): VR I: SRT= 2 d, synth. Substrat; VR II: SRT= 4 d, synth. Substrat; VR III: SRT= 4 d, reales Substrat.	35
Abbildung 18: Verlauf der PHA-Konzentration in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion unter veränderlichen Betriebsstrategien der verschiedenen Versuchsreihen (VR): VR I: SRT= 2 d, synth. Substrat; VR II: SRT= 4 d, synth. Substrat; VR III: SRT= 4 d, reales Substrat.	37
Abbildung 19: Verlauf der PHA-Raumausbeute in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion unter veränderlichen Betriebsstrategien der verschiedenen Versuchsreihen (VR): VR I: SRT= 2 d, synth. Substrat; VR II: SRT= 4 d, synth. Substrat; VR III: SRT= 4 d, reales Substrat.	38
Abbildung 20: Entwicklung des Feststoffgehalts in der Selektion während der Versuchsreihen (VR) I und II im Pilotmaßstab. A: Verlauf des Feststoffgehalts in VR I; B: Verlauf des Feststoffgehalts in VR II.	40
Abbildung 21: Verlauf der PHA-Gehalte in Akkumulationen nach 8 h an verschiedenen Tagen der Versuchsreihen (VR) I und II. A: Ergebnisse der VR I; B: Ergebnisse der VR II.	41
Abbildung 22: Verlauf der Raumausbeute in Akkumulationen nach 8 h an verschiedenen Tagen der Versuchsreihen (VR) I und II im Vergleich.	42
Abbildung 23: Verlauf des PHA-Gehalts in der Akkumulation an Tag 28 über 24 h.	43
Abbildung 24: A: Ergebnisse der DSC-Analyse in der ersten Aufheizkurve. B: Ergebnisse der DSC-Analyse beim ersten Abkühlen. Schwarz: Probe 1, Grün: Probe 2, Blau: Probe 3, Rot: Probe 4. ©Leibniz Institut für Verbundwerkstoffe	46
Abbildung 25: Ergebnis der DSC-Analyse in der zweiten Aufheizkurve. Schwarz: Probe 1, Grün: Probe 2, Blau: Probe 3, Rot: Probe 4. ©Leibniz Institut für Verbundwerkstoffe	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen durchgeführten Versuchsblöcke zur Selektion in Verbindung mit den verwendeten Substraten und deren Zusammensetzung.	10
Tabelle 2: Tabellarische Übersicht der verwendeten Analysemethoden.	18
Tabelle 3: Übersicht der auf ihr thermisches Verhalten analysierten PHA-Proben. Bei Probe 1 und 2 handelt es sich um PHA-angereicherte Biomasse, während Probe 3 nach einer Stabilisierung mittels H_2SO_4 (pH < 2) mit NaClO (14 %) über 3 h extrahiert und Probe 4 ohne Stabilisierung mit NaClO (14 %) über 3 h extrahiert wurde.	45

Abkürzungsverzeichnis

NaClO	Natriumhypochlorit
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
RPTU	Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau
CSB _{gel}	Chemischer Sauerstoffbedarf der gelösten Phase (<0,45 µm)
CSB _{ges}	Gesamter chemischer Sauerstoffbedarf
CSB _{VFA}	Theoretisches CSB-Äquivalent der VFA
DO	Gelöster Sauerstoff (engl. <i>dissolved oxygen</i>)
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff (engl. <i>dissolved organic carbon</i>)
DSC	Differenzkalorimetrie
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
HAc	Essigsäure
HB	3-Hydroxybutyrat
HBu	Buttersäure
HCap	Capronsäure
HF _a	Ameisensäure
HH	3-Hydroxyhexanoat
Hiso-Bu	Iso-Buttersäure
Hiso-Va	Iso-Valeriansäure
HLac	Milchsäure
HPr	Propionsäure
HRT	Hydraulische Aufenthaltszeit (engl. <i>hydraulic retention time</i>)
HV	3-Hydroxyvalerat
HVa	Valeriansäure
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LF	Elektrische Leitfähigkeit
MMC	Mikrobielle Mischkultur (engl. <i>mixed microbial culture</i>)
NaOH	Natronlauge
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NH ₄ -N	Ammonium-Stickstoff
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PHBH	Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyhexanoat)
PHBV	Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat)
PHH	Poly(3-hydroxyhexanoat)
PHV	Poly(3-hydroxyvalerat)
PO ₄ -P	Ortho-Phosphat-Phosphor
SBR	Sequencing Batch Reactor

SCL	Kurzkettig (engl. <i>short-chain-length</i>)
SRT	Schlammalter (engl. <i>sludge retention time</i>)
synth.	synthetisch
TNb	Gesamter gebundener Stickstoff (engl. <i>total nitrogen bound</i>)
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoff (engl. <i>total organic carbon</i>)
TR	Trockenrückstand
TS	Trockensubstanz(gehalt)
UASB	Aufwärtsdurchströmter anaerober Schlammdecken Reaktor (engl. <i>upflow anaerobic sludge blanket reactor</i>)
ÜSS	Überschussschlamm
VFA	Leichtflüchtige Fettsäuren (engl. <i>volatile fatty acids</i>)
VR	Versuchsreihe

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Mit ihrer ubiquitären Verbreitung sind Kunststoffe aus dem täglichen Leben nicht mehr wegzudenken. Sie stellen ein wichtiges Material dar, das in vielen verschiedenen Bereichen Anwendung findet. Dabei verursacht eine der beliebten Eigenschaften – die lange Haltbarkeit – gleichzeitig eine Umweltkatastrophe. Mittlerweile sind Kunststoffe überall zu finden, auch in den entlegensten Gebieten wie der Tiefsee (Chiba et al. 2018; Tekman et al. 2017) und den Polarregionen (Cózar, A., Martí, E. et al. 2017; Isobe et al. 2017; Obbard et al. 2014). Darüber hinaus ist die Verwendung des fossilen Rohstoffs Erdöl nicht nachhaltig. Folglich bedarf es dringend einer Alternative zu diesem vielseitig eingesetzten Material. Eine solche Alternative stellen biologisch abbaubare Kunststoffe dar, welche aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden können (Khatami et al. 2021).

Die Definition von diesen „Biokunststoffen“ ist dabei weit gefasst, da sowohl Herstellungsart als auch Rohmaterial variieren können. Laut European Bioplastics e. V. muss Biokunststoff entweder zu einem Teil aus nachwachsenden Rohstoffen bestehen und/oder durch natürlich vorkommende Mikroorganismen zu natürlichen Substanzen wie Wasser, Kohlenstoffdioxid oder Biomasse abbaubar sein (European Bioplastics e.V. 2017). Die Herstellung erfolgt bisweilen mithilfe bakterieller Reinkulturen, die eine sterile Arbeitsweise benötigen, sodass diese Prozesse teuer und störanfällig sind (Nguyenhuynh et al. 2021; Sabapathy et al. 2020). Als Ausgangsmaterial dienen überwiegend pflanzliche Ausgangsstoffe wie bspw. Mais und Zuckerrohr, die in Konkurrenz zu landwirtschaftlichen Flächen zur Nahrungsmittelproduktion stehen. Eines der biobasierten und biologisch abbaubaren Biopolymere umfasst Polyhydroxyalkanoate (PHA). Diese können durch Biosynthese von über 300 Mikroorganismen als Energie- und Kohlenstoffspeicher synthetisiert werden (Steinbüchel 1991). Die Stoffeigenschaften dieser Polyester sind von der Kettenlänge und Zusammensetzung abhängig, sodass eine Unterscheidung in Homo- und Copolymere vorgenommen wird (Hahn et al. 2024). Die Anwendungsgebiete der PHA sind divers – von Verpackungen und Textilien bis zur Anwendung im medizinischen Bereich (Sharma et al. 1995; Uddin et al. 2024).

Gemäß European Bioplastics e.V. wurden im Jahr 2025 global 2,3 Mio. Tonnen Biokunststoff hergestellt, der Anteil von PHA lag hier bei 4,7 %, also ca. 108.100 t (European Bioplastics). Laut Schätzungen des Nova Instituts und des European Bioplastics werden die globalen Produktionskapazitäten für Biokunststoffe im Jahr 2030 bei 4,69 Mio. Tonnen liegen, mit einem Anteil von 16,8 % PHA (ca. 783.000 t) (European Bioplastics). Gemäß Khatami et al. (2021) beträgt der

Marktpreis von PHA aktuell noch das ca. 6-fache im Vergleich zu konventionellen Kunststoffen. Dies liegt an den bereits genannten Bedingungen der PHA-Herstellung mithilfe von Reinkulturen unter Zugabe aufgereinigter Kohlenstoffquellen (Kleerebezem et al. 2007; Park et al. 2024; Reis et al. 2011).

Um die Produktionskosten zu senken und eine Konkurrenz zwischen der PHA- und der Lebensmittelproduktion zu vermeiden, ist die Kombination von mikrobiellen Mischkulturen (MMC) und einem aus Abfallströmen stammenden Ausgangsmaterial ein vielversprechender Weg (Koller et al. 2017; Matos et al. 2021; Reis et al. 2011; Tamis et al. 2018; Werker et al. 2022). Einer der Hauptfaktoren für die hohen Kosten industriell hergestellten PHAs ist das Substrat, das fast 50 % der Gesamtkosten des Prozesses ausmacht (Kaur et al. 2015). Aus diesem Grund ist die Verwendung von Restströmen für die PHA-Produktion ein attraktiver Ansatz, der die Gesamtkosten des Prozesses deutlich senkt. Darüber hinaus werden durch die Verwendung von MMC ohne sterile Umgebung nicht nur die Kosten gesenkt, sondern in Kombination mit der Vielfalt in der Zusammensetzung des Ausgangsmaterials führt die Zusammensetzung des hergestellten PHA häufig zu Copolymeren, was den Anwendungsbereich in der Kunststoffindustrie erweitert (Kaur et al. 2015; Koller et al. 2017). Für die PHA-Produktion aus Reststoffen mittels MMC kann ein dreistufiger Prozess eingesetzt werden, der aus einer anfänglichen Substratproduktion, einer anschließenden Auswahl von Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion durch Anwendung eines Feast-Famine-Regimes und einem darauffolgenden PHA-Akkumulationsschritt besteht.

Wie in den vorangehenden Projektberichten dargelegt (vgl. Steinmetz et al. (2022), Uhrig et al. (2022), Laumeyer et al. (2023), Steinmetz et al. (2024)) können hierzu auch zahlreiche industrielle Abwässer und kommunale Klärschlämme als Substrate genutzt werden, da diese hohe Konzentrationen und Frachten organischer Verbindungen aufweisen. Bislang werden diese auf Kläranlagen unter hohem Energieeinsatz mineralisiert oder es findet eine energetische Verwertung durch die Erzeugung von Biogas statt. In der Forschung wird derzeit weiterhin daran gearbeitet, die stoffliche Verwertung dieser Verbindungen durch die Herstellung von Biopolymeren zu realisieren. Der Ansatz, die organischen Bestandteile verschiedener Abwässer zunächst durch eine anaerobe Fermentation in ein geeignetes Substrat umzuwandeln, welche dann in Verbindung mit Belebtschlamm zur Herstellung von Biopolymeren genutzt werden, konnte in eigenen Forschungsprojekten vielversprechend demonstriert werden, vgl. Steinmetz et al. (2022), Uhrig et al. (2023), Steinmetz et al. (2024), Laumeyer et al. (2025). Während die Selektion und Anreicherung der Mikroorganismen mit Biopolymeren funktioniert, so zeigen die Feststoffgehalte während des Versuchsbetriebs eine Abnahme, die eine höhere PHA-Ausbeute verhindert. Obwohl Chen et al. (2017) in ihrer Studie einen erneuten Anstieg der

Feststoffkonzentration nach einem Selektionsbetrieb von 70 Tagen bei der Nutzung fermentierten Zuckerrohrabwassers und einem Schlammalter von 5 bzw. 10 Tagen beschrieben, blieb ein solcher Anstieg auch während des Langzeitversuchs in dem von der Willy-Hager Stiftung geförderten Projektes „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen Teil II - Anpassung von Prozessbedingungen und Adaption der Biozönose zur Beeinflussung der Polymerzusammensetzung“ aus (Steinmetz et al. 2024).

Obwohl sich bereits einige Forschungsgruppen und auch eigene Untersuchungen mit der großtechnischen Implementierung des Verfahrens der PHA-Herstellung beschäftigen (Carvalho et al. 2018; Estévez-Alonso et al. 2021; Laumeyer et al. 2025b; Morgan-Sagastume et al. 2019; Pittmann et al. 2013a; Pittmann et al. 2013b, 2014; Pittmann et al. 2017; STOWA 2017), fehlen derzeit geeignete Konzepte für einen kontinuierlichen Betrieb, der trotz der schwankenden Zusammensetzungen der Substrate eine gleichbleibende Zusammensetzung des hergestellten PHA ermöglicht. Hierzu bedarf es vertiefter Kenntnisse zur Beeinflussbarkeit der PHA-Produktion anhand der Prozessschritte und eines stabilen Langzeitbetriebs zur Produktion eines Polymers konstanter Qualität und Zusammensetzung.

1.2 Ziel des Projekts

Dieses Projekt knüpft an die Erkenntnisse des vorangegangenen Projektes „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen Teil II - Anpassung von Prozessbedingungen und Adaption der Biozönose zur Beeinflussung der Polymerzusammensetzung“ (Laufzeit bis 06/2024) an. Hierdurch sollen die Erkenntnisse für die Weiterentwicklung der Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen genutzt werden, um die Herstellung von Biopolymeren als Alternative zu konventionellen fossilen Kunststoffen zu ermöglichen.

Ziel des Projektes ist es insbesondere die zuvor identifizierten bestehenden Engstellen der Biopolymerproduktion aus Brauereiabwasser zu untersuchen und durch gezielte Anpassung der Betriebsweise der einzelnen Stufen der Verfahrenskette eine Verbesserung der Ausbeute zu erzielen. Zu Beginn des Projektes liegt der Fokus auf dem bestehenden Feststoffverlust, welcher die Biopolymerausbeute deutlich mindert. Im Rahmen von Laborversuchen wurde getestet, inwiefern verschiedene Strategien wie etwa die Zugabe anorganischer Zuschlagsstoffe oder eine Veränderung des Prozessablaufes durch eine Trennung der Substrat- und Nährstoffzugabe, einem Feststoffverlust vorbeugen kann. Um während dieser Versuche die sonstigen Prozessbedingungen möglichst stabil zu halten, erfolgte die Durchführung mit einer konstanten VFA-Zusammensetzung, die in einem realen Substrat durch Zugabe synthetischer Säuren erreicht wurde. Darüber hinaus wurden Ansätze für eine

kontinuierliche Biopolymerproduktion entwickelt, welche ebenfalls im Labormaßstab untersucht wurde. Dabei wurde ausgehend von den Ergebnissen des ersten Versuchsblocks mit einer von der Substratzugabe entkoppelten Nährstoffzugabe gearbeitet und zunächst ein Vergleich zweier Schlammalter (2 d und 4 d) unter Nutzung synthetischen Substrats durchgeführt; anschließend erfolgte die Umsetzung mit realem Substrat. Parallel dazu erfolgte eine Beobachtung der Auswirkungen auf die Änderungen innerhalb eines laufenden Prozesses in einem Langzeitversuch, in dem die Änderung des Schlammalters (2 d zu 4 d) bzw. des verwendeten Substrats (synthetisch- zu realem Substrat) im laufenden Betrieb beobachtet wurden. Im Anschluss an diese Untersuchungen wurde der Gesamtprozess im größeren Maßstab in Pilotversuchen getestet, um wichtige Faktoren für ein erfolgreiches Upscaling zu identifizieren.

Dieser Bericht umfasst konkret die Ergebnisse und Diskussion der durchgeführten Versuche unter dem Aspekt der zugrundeliegenden Fragestellungen. Im Rahmen der geplanten Dissertationsschrift von Cora Laumeyer, welche in Zukunft auf dem KLUEDO-Dokumentenserver der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau zu finden sein wird, werden die im Projekt gewonnenen Daten darüber hinaus in einen erweiterten wissenschaftlichen Kontext eingeordnet. Hierzu erfolgt eine gemeinsame Auswertung mit Ergebnissen weiterer am Fachgebiet durchgeführter Forschungsprojekte (z.B. Wider Business Opportunities for Raw Materials from Wastewater – Capitalization Phase (EU-Interreg NWE, 2018- 2023, NWE619)), um übergreifende Zusammenhänge und Muster zu identifizieren. Die Ergebnisse werden anschließend in der Gesamtschau ausgewertet und im Kontext der Literatur diskutiert.

2 Theoretischer Hintergrund

Die Herstellung von Biopolymeren unter Verwendung einer Mischbiozönose umfasst wie in Abbildung 1 dargestellt zwei bzw. drei Schritte: der Substratherstellung aus dem Organik-reichen Stofffluss (1), der Selektion einer für die Biopolymerherstellung geeigneten Biozönose (2) und der gezielten PHA-Produktion, der sogenannten Akkumulation (3). In der Betriebsweise wird zwischen dem direkten Akkumulationsansatz und dem Selektions-Akkumulationsansatz unterschieden (Estévez-Alonso et al. 2021). Der gegenwärtige Kenntnisstand auf dem Gebiet der Biopolymerherstellung aus organischen Reststoffen ist dem Abschlussbericht von Steinmetz et al. (2024) zu entnehmen.

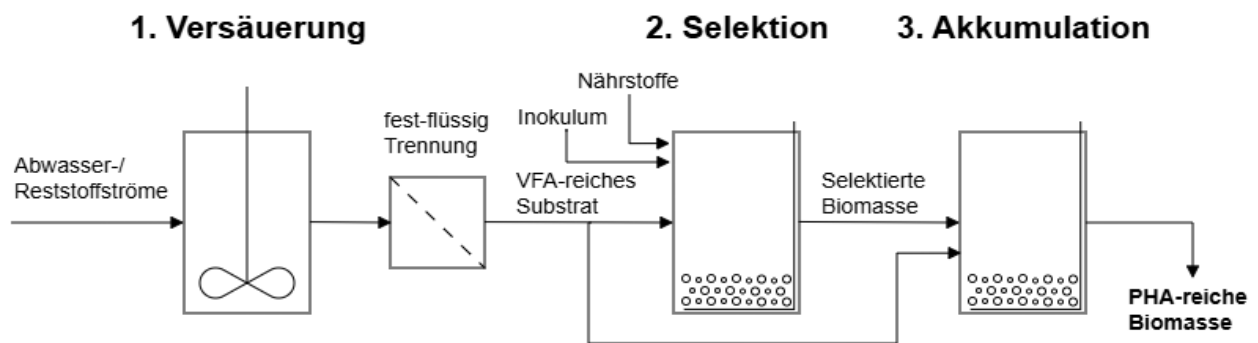


Abbildung 1: Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion, modifiziert nach (Uhrig 2023).

3 Material und Methoden

In Anlehnung an das vorangegangene Projekt, wurden die bereits installierten Labor- und Pilotanlagen genutzt und geringfügig modifiziert, um die genannten Forschungsziele zu erreichen. Dabei orientiert sich auch die Methodik in weiten Teilen an den in den vorhergehenden Projekten eingesetzten Methoden (Laumeyer et al. 2025b; Steinmetz et al. 2022; Steinmetz et al. 2024).

3.1 Substratherstellung

3.1.1 Versäuerung von Brauereiabwasser

Wie bereits in dem vorhergehenden Projekt diente Abwasser einer Brauerei als Rohstoff für die Substratherstellung (Steinmetz et al. 2024). Um die Randbedingungen der Versuche zur Biopolymerproduktion möglichst stabil zu halten, wurde vor Versuchsbeginn eine größere Menge Substrat hergestellt. Hierzu wurde ein IBC-Container mit einem Reaktionsvolumen von 1.000 L mit 900 L Brauereiabwasser und 100 L anaeroben Schlamm aus dem UASB-Reaktor der Brauereikläranlage beschickt. Anschließend wurde der pH-Wert gemessen und mit 25 %-iger Salzsäure (> 99 %, Carl Roth®)

auf einen pH-Wert von 5 eingestellt, um die Aktivität methanotropher Bakterien, und somit die Methanbildung, zu unterdrücken. Über einen Heizmantel (Sonderanfertigung, PiT GmbH) mit daran angeschlossenen Temperaturfühler (RT ES11H+, PiT GmbH) wurde der Reaktor auf eine Temperatur von 35 ± 5 °C geregelt und über die gesamte Versuchsdauer von 6 Tagen konstant mithilfe zwei gegenüberliegend angeordneter Aquariumpumpen (Turbelle® Nanostream® 6045, Tunze®) durchmischt. Zur Gewinnung des Substrates erfolgte eine Fest-Flüssig-Trennung durch eine Korbzentrifuge (ZS21 EUR, 3,5 L 2070 g, Eurotec Innovation), die mithilfe einer Tauchpumpe beschickt wurde. Das so gewonnene Substrat wurde in einem gereinigten IBC (V=1.000 L) aufgefangen und bis zur Auswertung der VFA-Analyse gelagert. Sobald das Ergebnis der VFA-Analyse vorlag, wurde das Substrat mithilfe synthetischer Säuren äquivalent zu dem erzielten VFA-Profil gespiked und erneut analysiert. Im Anschluss wurde das Substrat nochmals mithilfe einer Tauchpumpe homogenisiert und in 30 L, bzw. 10 L Kanister abgefüllt und bei -18 °C bzw. 4 °C bis zur weiteren Nutzung gelagert.

3.1.2 Herstellung von synthetischem Substrat

In den ersten Versuchsreihen zur (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion wurde ein synthetisches Substrat eingesetzt, welches sich in der Zusammensetzung an den in der Vergangenheit erzielten VFA-Zusammensetzungen versäuerten Brauereiabwassers orientiert (Laumeyer et al. 2023; Zimmer 2025). Das synthetische Substrat stellt eine vereinfachte Zusammensetzung dar und besteht ausschließlich aus Essig-, Propion- und Buttersäure, welche die mengenmäßig dominanten VFAs darstellen (La Cruz 2025). In Abbildung 2 sind die molare Zusammensetzung der für die Ermittlung des VFA-Profiles genutzten versäuerten Brauereiabwasser-Batches dargestellt sowie das resultierende Stoffmengenverhältnis des vereinfachten Substrates von 53,5:20,1:26,3 (HAc:HPr:HBu) (La Cruz 2025).

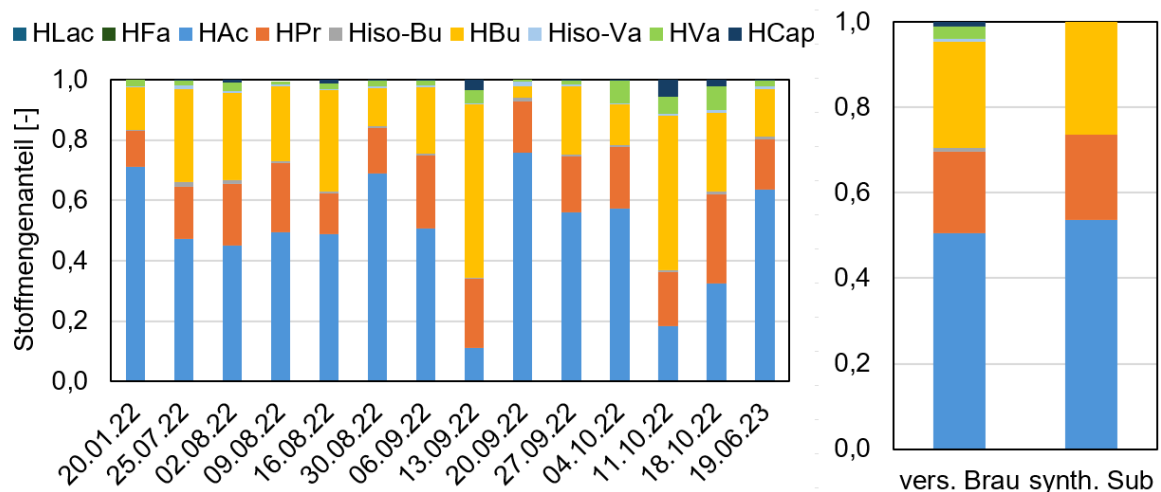


Abbildung 2: Links: Molare Zusammensetzung der versäuerten Brauereiabwässer (Laumeyer et al. 2023; Zimmer 2025); Rechts: die gemittelte VFA-Zusammensetzung der verschiedenen Batches (vers. Brau) und die daraus abgeleitete Zusammensetzung des synthetischen Substrates (synth.Sub), modifiziert nach La Cruz (2025).

3.1.3 Nährstoffzugabe

Aufgrund der künstlichen Anhebung des Anteils der organischen Säuren durch Zugabe synthetischer VFA, wiesen die verwendeten Substrate einen Nährstoffmangel auf. Folglich wurden die Nährstoffe Stickstoff und Phosphor in Form von Ammoniumchlorid (NH_4Cl , >99%, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™) und Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , 99%, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™) in der Selektion zugegeben. Das gewählte Nährstoffverhältnis wurde auf 100:5:1 (Pittmann et al. 2017) $\text{CSB}_{\text{VFA}}:\text{NH}_4\text{-N}:\text{PO}_4\text{-P}$ eingestellt, um ein optimales Wachstum während der Selektion zu gewährleisten. Zusätzlich wurde wie in den vorangehenden Projekten 2 mL pro Liter Substrat einer Mikronährstofflösung mit den folgenden Bestandteilen pro Liter: 1,5 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g H_3BO_3 , 0,03 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,018 g KI, 0,12 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 10 g EDTA (Smolders et al. 1994) zugegeben. Die Zugabe der Nährstoffe Stickstoff und Phosphor sowie der Mikronährstofflösung erfolgte zunächst direkt in den Vorlagebehälter des Substrates; im späteren Verlauf der Experimente erfolgte eine von der Substratzugabe entkoppelte Zugabe der Nähr- und Mikronährstoffe. Hierzu wurden die Nährstoffe über Peristaltikpumpen zwei Stunden nach Dosierung des VFA-reichen Substrates mit Verdünnungswasser dosiert.

3.2 Selektion

Im Rahmen des Projektes wurden die Forschungsfragen in verschiedenen Versuchsblöcken im Detail untersucht, wie in Tabelle 1 aufgeführt. Abgesehen von prozesstechnischen Veränderungen bzgl. der

Dosierung von Zuschlagsstoffen oder Nährstoffen, unterscheiden sich auch die dabei verwendeten Substrate, wie anhand der prozentualen Zusammensetzung organischer Säuren mit gerader (C_{gerade}) bzw. ungerader (C_{ungerade}) Anzahl Kohlenstoffatomen ersichtlich. Während das folgende Kapitel 3.2.1 den Aufbau der Versuchsanlage beschreibt, gibt die Versuchsbeschreibung in Kapitel 3.2.2 eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen Versuchsblöcke.

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen durchgeführten Versuchsblöcke zur Selektion in Verbindung mit den verwendeten Substraten und deren Zusammensetzung.

Versuchsblock	Versuch	Substrat	Schlammalter [d]	Zusammensetzung C_{gerade} zu C_{ungerade} [%]
Feststoffgehalt	CaCO ₃ -Zugabe	Brauereiabwasser Batch 1.1	4	41,1:58,9
	Entkopplung der Substrat- und Nährstoffzugabe	• Brauereiabwasser Batch 1.2	>4	75,6:24,4
		• Brauereiabwasser Batch 1.3	4	80,9:19,1
(semi-)kontinuierliche PHA-Produktion	2 d Schlammalter	Synth. Brauereiabwasser	2	77,1:22,9
	4 d Schlammalter	Synth. Brauereiabwasser	4	77,1:22,9
	4 d Schlammalter	• Brauereiabwasser Batch 1.2	4	75,6:24,4
	Kontinuierlicher Betrieb	• Synth. Brauereiabwasser	Tag 0-28: 2 Tag 29 – 119: 4	77,1:22,9
		• Brauereiabwasser Batch 1.2		75,6:24,4
Upscaling Pilotmaßstab	Versuch 1	Brauereiabwasser Batch 1.2	4	75,6:24,4
	Versuch 2	Brauereiabwasser Batch 1.3	4	80,9:19,1

3.2.1 Versuchsaufbau

Für die Versuche zur Erhöhung des Feststoffgehaltes (**Arbeitsschritt 1**) wurden für die Selektion drei Reaktoren mit einem Reaktionsvolumen von jeweils 10 L genutzt, wie in Abbildung 3 dargestellt. Die Sauerstoffversorgung wurde mittels Druckluftleitung des Labors mit einem Druck von 0,1 bar sichergestellt, die durch Edelstahl-Belüftersteine an vier Stellen von unten in die Reaktoren eingebracht wurde und einen Sauerstoffgehalt von ca. 8 mg/L erzielte. Eine konstante Durchmischung wurde durch Überkopfrührer (RZR 1, Heidolph) sichergestellt und eine Temperaturregelung auf ca. 21-23 °C erfolgte mithilfe von Heizstäben (Nano Heater Compact IPX8, Dennerle). Ein LabView-basiertes Programm ermöglichte über Drucksonden (AquaBar (II) Drucksonden, Nivus) die Dosierung der

Substrate und des Biomasseabzugs via Peristaltikpumpen. Darüber hinaus wurden der Sauerstoffgehalt und der pH-Wert kontinuierlich erfasst (MF39VP und SL 82-120 pHT, Xylem), jedoch nicht kontrolliert. Die Substratvorlage der Selektion wurde über eine Aquarienpumpe (Turbelle® Nanostream® 6045, Tunze®) kontinuierlich durchmischt, um ein Absetzen von Schwebstoffen zu verhindern.

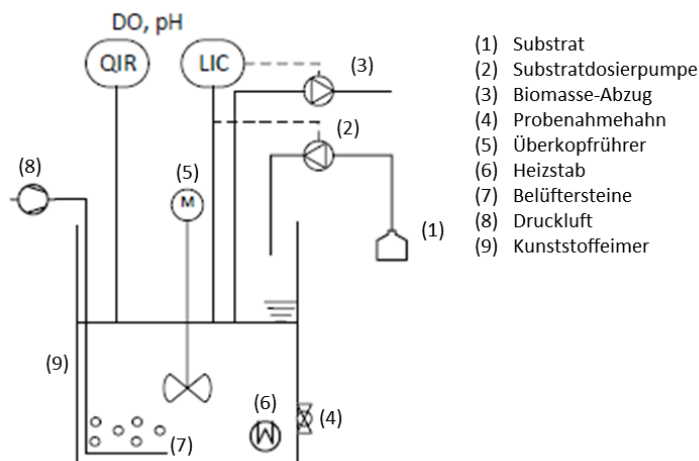


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Selektionsreaktoren (Steinmetz et al. 2024).

Für die Entwicklung der (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion (**Arbeitsschritt 2**) erfolgte die Selektion ebenfalls in drei Reaktoren mit einem Reaktionsvolumen von 10 L, wie in Abbildung 4 dargestellt. Allerdings wurden in diesem Fall zwei Reaktoren als technische Replikate betrieben, während der dritte Reaktor den kontinuierlichen Prozessverlauf unter unterschiedlichen Betriebsweisen abbildete. Die Sauerstoffversorgung wurde über je einen Aquarienbelüfter (Air400, EHEIM) und daran angeschlossene Belüftersteine realisiert, die eine Sauerstoffkonzentration von ca. 8 mg/L erzielten. Um eine vollständige Durchmischung in den Reaktoren sicherzustellen, wurden zusätzlich Überkopfrührer genutzt (MICRO-ST 30 C S000, IKA bzw. RZR1, Heidolph) und mithilfe von Heizstäben erfolgte eine Temperaturregelung (Nano Heater Compact IPX8, Dennerle). Sowohl der pH-Wert als auch die Sauerstoffkonzentration wurden über Sonden kontinuierlich erfasst (EasyFerm Bio HB Arc 225 bzw. Visiform DO ECS 225, Hamilton) und die Messdaten über das Programm ArcAir 3.11 der Firma Hamilton aufgezeichnet. Die Substrat- und Nährstoffzugabe erfolgte pro Selektionsreaktor über zwei Peristaltikpumpen (G928, Grothen), die über Zeitschaltuhren (SET10A-GR, M.R.S) angesteuert wurden. Ebenso wurde der Abzug über eine intervallgesteuerte Peristaltikpumpe (UIP WIFI, Kamoer) realisiert, welche eine Einstellung der Dosier- und Pausenzeiten ermöglichte. Die

Substratvorlage der Selektion wurde über eine Aquarienpumpe (Turbelle® Nanostream® 6045, Tunze®) kontinuierlich durchmischt, um ein Absetzen von Schwebstoffen zu verhindern.

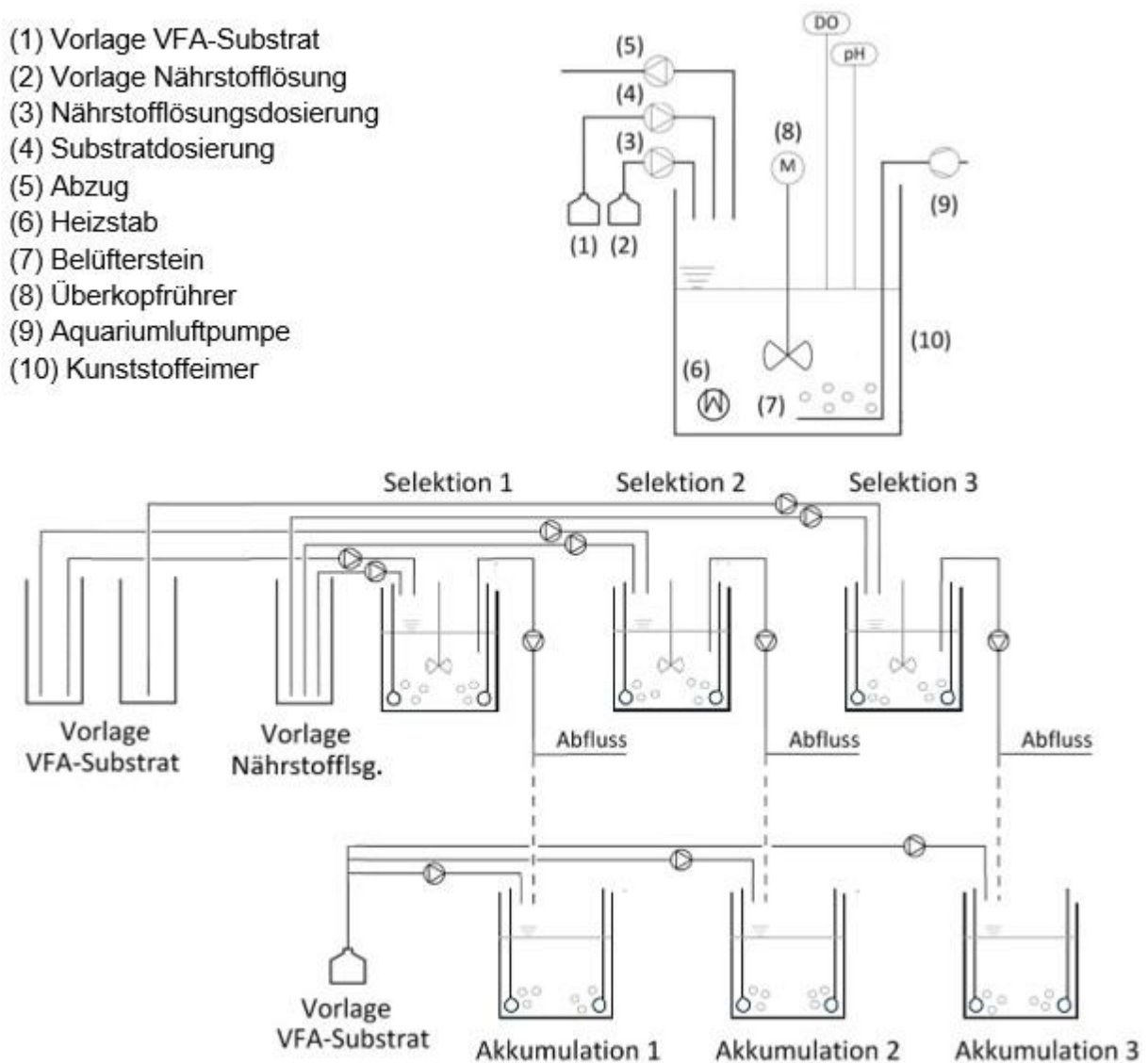


Abbildung 4: Versuchsaufbau der Selektion und Akkumulation für die (semi-)kontinuierliche PHA-Produktion im Labormaßstab. Oben: Beschreibung der Messtechnik und Armaturen; Unten: Schematisches Fließbild. In La Cruz (2025) nach Uhrig (2023).

Für das Upscaling in den Pilotmaßstab (**Arbeitsschritt 3**) erfolgte die Selektion in einem Reaktor mit einem Reaktionsvolumen von 200 L, mit einer Initialen-Zugabe von 175 L Belebtschlamm der Brauereikläranlage mit einem auf ca. 5 g/L eingestellten Feststoffgehalt (TS-Gehalt). Eine feinblasige Belüftung des Selektionsreaktors erfolgte mit einem Kompressor (LA-120A, Nitto Kohki) und einem Membranplatten-Diffusor (OXYFLEX®, Suprateg). Der hohe Luftstrom von bis zu 120 L Min⁻¹ verhinderte einerseits eine Sauerstofflimitierung während des Versuchsbetriebs und gewährleistete

andererseits eine vollständige Durchmischung. Im Vergleich zu den Laborreaktoren erfolgte im Pilotmaßstab keine Temperaturregelung, sodass die Reaktortemperatur im Tagesverlauf schwankte. Sowohl die Sauerstoffkonzentration (MF39VP, Xylem), als auch der pH-Wert (SL 81-120 pHT VP, Xylem) wurden kontinuierlich von der via LabView programmierten Steuerungseinheit der Pilotanlage erfasst, jedoch nicht geregelt. Wie in den Laborreaktoren, ermöglichte die LabView-basierte Steuerung die Dosierung des Substrats (Verderflex Rapide R8, Verder), nährstoffangereicherten Verdünnungswassers (Oxylift 2, Jung Pumpen) und des Biomasseabzugs (Oxylift 2, Jung Pumpen) über Drucksonden (AquaBar (II) Drucksonden, Nivus).

3.2.2 Versuchsbeschreibung

Arbeitsschritt 1 – Erhöhung des Feststoffgehaltes

Zugabe von CaCO_3 als Zuschlagsstoff

Die Selektionsreaktoren zur Anreicherung der PHA-akkumulierenden Mikroorganismen erfolgte im Sequencing Batch Verfahren. Aufbauend auf den Erkenntnissen des vorhergehenden Projektes, wurde ein Schlammalter von 4 Tagen sowie eine Zyklusdauer von 6 Stunden eingestellt ($\text{SRT} = 4 \text{ d}$, $\text{Zyklusdauer} = 6 \text{ h}$) (Steinmetz et al. 2024). Hierzu wurden alle 6 Stunden 1,25 L des Reaktorvolumens abgezogen. Um ein Schlammalter von 4 d einzustellen, wurde abwechselnd das homogenisierte Reaktorvolumen bzw. lediglich der Überstand abgezogen, sodass in jedem zweiten Zyklus eine 45-minütige Sedimentation vor dem Abzug durchgeführt wurde, um ein Absetzen der Biomasse zu ermöglichen. Hierzu wurden die Überkopfrührer und die Belüftung für die Dauer der Sedimentation über eine Zeitschaltuhr deaktiviert. Nach jedem Abzug erfolgte die Zugabe von 1,25 L VFA-reichen Substrates resultierend in einer Raumbelastung von $1 \text{ g CSB}_{\text{VFA}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; zusätzlich erfolgte unter der Woche eine manuelle Zugabe von 1 g CaCO_3 pro Selektionsreaktor nach Substratzugabe. Der Ablauf von zwei Zyklen ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Versuchsdauer betrug 14 Tage, in denen sowohl zu Beginn des Versuchs (Tag 0) mit der unselektierten Biomasse, als auch an Tag 7 und 14 Akkumulationsversuche mit der selektierten Biomasse über eine Dauer von 24 h durchgeführt wurden, um das PHA-Akkumulationspotential zu untersuchen.

Entkopplung der Substrat- und Nährstoffzugabe

Im zweiten Versuchsblock wurde eine Entkopplung der Substrat- und Nährstoffzugabe vorgenommen. Bei einem Schlammalter von 4 Tagen, einer gleichbleibenden Zyklusdauer von 6 Stunden und einer Raumbelastung von $1 \text{ g CSB}_{\text{VFA}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, erfolgte die Zugabe eines höher konzentrierten Substrates zu Beginn der Feast-Phase und in einem Abstand von 2 Stunden die Zugabe von 0,25 L

Verdünnungswasser. Dieses Verdünnungswasser beinhaltete sowohl die Nährstoffe Stickstoff und Phosphor als auch die Mikronährstofflösung. Diese Versuche liefen über einen Zeitraum von 28 Tagen. Wie zuvor wurden auch hier PHA-Akkumulationsversuche mit der initialen und selektierten Biomasse im Wochenrhythmus über 6 h bzw. 24 h durchgeführt.

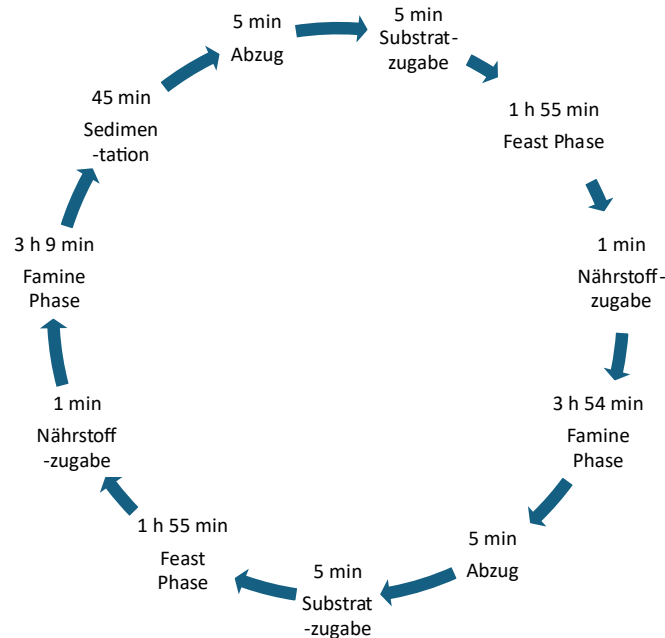


Abbildung 5: Schematische Darstellung zweier 6 h Zyklen, im Wechsel ohne- und mit Sedimentation vor Abzug. Modifiziert nach Steinmetz et al. (2024).

Arbeitsschritt 2 – Entwicklung einer (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion

Entwicklung der (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion im Labormaßstab

Für die Entwicklung der (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion wurde die in Kapitel 3.2.1 beschriebene zusätzliche Laboranlage genutzt. Basierend auf den erzielten Ergebnissen erfolgte die Betriebsweise wie zuvor beschrieben mit einer Entkopplung der Substrat- und Nährstoffzugabe, mit einer Zyklusdauer von 6 Stunden und einer Raumbelastung von $1 \text{ g CSB}_{\text{VFA}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. In den ersten beiden Versuchsblöcken erfolgte die Zugabe von synthetischem Brauereiabwasser (beschrieben in Kapitel 3.1.2) unter Variation des Schlammalters, dabei wurde zwischen einem Schlammalter von 2 d (keine Sedimentation) und 4 d (jeder zweite Zyklus mit Sedimentation vor Abzug) unterschieden. Bei der nächsten Versuchsreihe erfolgte die Nutzung realen Substrates mit einem Schlammalter von 4 Tagen. Wie zuvor beschrieben, wurden diese Versuche mit zwei Reaktoren als technischen Replikaten durchgeführt, während der dritte Reaktor den kontinuierlichen Prozessverlauf unter unterschiedlicher

Betriebsweisen abbildete; folglich wurde die Biomasse zunächst ebenfalls mit synthetischem Substrat und einem veränderlichen Schlammalter (Tag 0 – 28: 2 d, Tag 29 – 90: 4 d) betrieben, bevor reales Substrat genutzt wurde (Tag 91 – 119).

Die Zugabe der Nährstoffe Stickstoff und Phosphor, sowie der Mikronährstofflösung erfolgte im Abstand von 2 Stunden nach Substratzugabe, um sicherzustellen, dass die Feast-Phase bereits abgeschlossen war. Die (semi-)kontinuierliche PHA-Produktion erfolgte über einen Zeitraum von 28 bzw. 119 Tagen. Wie zuvor wurden auch hier PHA-Akkumulationsversuche mit der initialen und selektierten Biomasse im Wochenrhythmus über 6 h durchgeführt.

Arbeitsschritt 3 – Upscaling in den Pilotmaßstab

Im dritten Arbeitsschritt erfolgte die Betriebsweise aus Arbeitsschritt 2 der (semi-)kontinuierlichen Betriebsweise zur PHA-Produktion mit entkoppelter Substrat- und Nährstoffzugabe im Pilotmaßstab. Während die Betriebsweise bei einem 6 h Zyklus und die Raumbelastung von $1 \text{ g CSB}_{\text{VFA}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ beibehalten wurden, erfolgte zusätzlich die Beobachtung der Konzentrationsverläufe der PHA-Konzentration, sowie der Nährstoffe Ammonium und Ortho-Phosphat-Phosphor und der VFA-Konzentration über den Verlauf eines Selektionszyklus. Hierzu wurde die Selektion mit 2 automatischen gekühlten Probennehmern (ASP-Station D2, Endress+Hauser; SPS5 S Maxx Mess- und Probenahmetechnik GmbH) ausgestattet, welche im 30-Minuten-Abstand Proben im laufenden Prozess nahmen. In einem der beiden Probennehmer wurde in den gläsernen Probenahmegefäßen 0,5 mL 96 %iger Schwefelsäure vorgelegt, um den pH-Wert < 2 einzustellen und somit eine Stabilisierung der PHA-Konzentration bis zur weiteren Probenverarbeitung zu gewährleisten. Die Versuche im Pilotmaßstab wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt. Wie zuvor wurden auch hier PHA-Akkumulationsversuche mit der initialen und selektierten Biomasse während des Prozesses über einen Zeitraum von 8 h durchgeführt.

3.3 Akkumulation

3.3.1 Versuchsaufbau

Für die im Labormaßstab durchgeführten Akkumulationen dienten in **Arbeitsschritt 1** drei Reaktoren mit einem Volumen von 5 L, welche mit identischer Ausstattung versehen waren, wie die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Selektionsreaktoren, mit Ausnahme des Biomasseabzugs, da der Betrieb im Batch erfolgte (Abbildung 6). Statt einer Steuerung über Füllstandsonden erfolgte die Substratzugabe über

zeitgesteuerte Peristaltikpumpen, auf eine Nährstoffzugabe wurde in der Akkumulation verzichtet, um die PHA-Synthese anzuregen.

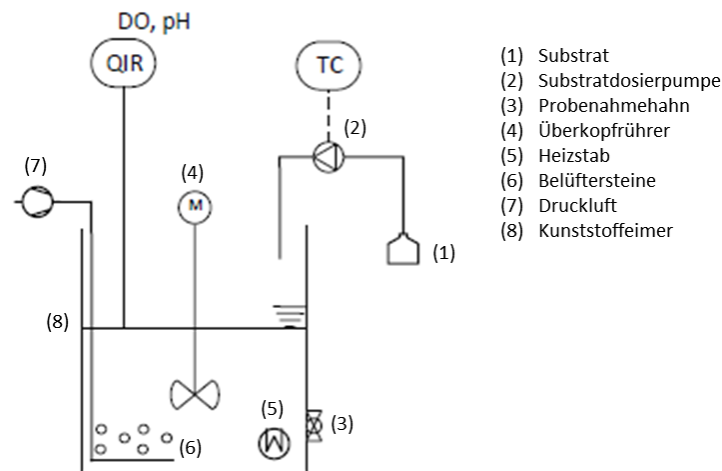


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur PHA-Produktion (Steinmetz et al. 2024).

In **Arbeitsschritt 2** erfolgte die Akkumulation in drei Reaktoren mit einem Volumen von 2 L, die ebenfalls identisch zu den in diesem Arbeitsschritt genutzten Selektionsreaktoren ausgestattet waren. Allerdings erfolgte hier weder ein Abzug von Biomasse aufgrund des Batchbetriebes noch eine Nährstoffzugabe, um die PHA-Produktion anzuregen.

In **Arbeitsschritt 3** erfolgte die Akkumulation in einem Reaktor mit einem Volumen von 550 L, der wie die Selektion mit Sauerstoffversorgung, sowie der Messung des pH-Wertes und Sauerstoffgehaltes ausgestattet war. Die Substratdosierung erfolgte im Gegensatz zu den Laborversuchen nicht zeitgesteuert, sondern bedarfsorientiert; hierfür wurde die Steigung des Sauerstoffgehaltes über die Zeit ausgewertet und bei Überschreitung eines definierten Schwellenwertes eine erneute Substratdosierung vorgenommen (Feed on Demand, FoD).

3.3.2 Versuchsbeschreibung

Um die Entwicklung des PHA-Akkumulationspotenzials der Biozönose über den Zeitraum der durchgeführten Versuche zu untersuchen, wurden sowohl mit der initialen Biomasse (Inokulum, Tag 0), als auch mit der zyklisch abgezogenen Biomasse mindestens wöchentliche Akkumulationsversuche durchgeführt. Diese Versuche wurden in Form von Batch-Akkumulationen durchgeführt, in denen über eine Dauer von 24 h (Arbeitsschritt 1) bzw. 6 h (Arbeitsschritt 2) eine regelmäßige Substratzugabe von $100 \text{ mg CSB}_{\text{VFA}} \text{ L}^{-1}$ Startvolumen alle 30 Minuten erfolgte. In Arbeitsschritt 3 erfolgte die Zugabe über

einen Zeitraum von 8 h in Form von Feed on Demand mit einer Substratzugabe von 100 mg CSB_{VFA} L⁻¹ Startvolumen. Zur Umsetzung der bedarfsgerechten VFA-Zufuhr diente der Anstieg der gelösten Sauerstoffkonzentration als Steuerparameter, hierfür wurde ein Schwellenwert der Sauerstoffanstiegsrate von >0,02 mg L⁻¹min⁻¹ zugrunde gelegt. Um die PHA-Synthese zu begünstigen, wurden der Akkumulation keine Nährstoffe zugeführt. Die für die Akkumulationsversuche genutzten VFA-Substrate entsprachen denen der Selektion und sind in Tabelle 1 dargestellt. Für die Akkumulationen im Labormaßstab wurde jeweils 0,5 L der abgezogenen Biomasse als Startvolumen genutzt; in der Pilotanlage wurden 25 L der abgezogenen Biomasse als Startvolumen genutzt, die mit 25 L Leitungswasser verdünnt werden mussten, um einen ausreichenden Füllstand innerhalb des Reaktors zu gewährleisten.

3.4 PHA-Extraktion mittels Natriumhypochlorit

In Anlehnung an Villano et al. (2014) erfolgte eine Extraktion des gebildeten Biopolymers über einen Zeitraum von drei Stunden mittels 14 %-igem Natriumhypochlorit (NaClO). Hierfür wurde zunächst eine Stabilisierung der PHA-Konzentration durch Absenken des pH-Wertes < 2 mit H₂SO₄ (96 %) vorgenommen, ehe die Proben bei 4.500 g für 10 Minuten zentrifugiert wurden (Sorvall LYNX 6000; Thermo Fischer). Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Probe mit NaClO resuspendiert und in einen Erlenmeyerkolben gegeben, welcher nach Zugabe eines Magnetrührfischs mit Parafilm verschlossen wurde. Die Extraktion wurde über einen Zeitraum von 3 h unter ständigem Rühren mittels Magnetrührplatte bei 500 rpm durchgeführt. Nach Ablauf der Extraktionszeit wurde die Probe erneut in zentrifugengeeigneten Behältnissen zentrifugiert (4.500 g, 10 min., Sorvall LYNX 6000; Thermo Fischer) und der Überstand zur fachgerechten Entsorgung aufgefangen und das Pellet mit destilliertem Wasser resuspendiert, um Reste des Natriumhypochlorits auszuwaschen, bevor die Probe erneut zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt und nach Abgießen des letzten Probenüberstandes wurde das Pellet bei -20°C eingefroren. Das extrahierte PHA wurde abschließend gefriergetrocknet (VaCo 5; ZIRBUS technology GmbH).

3.5 Analytik

Eine Übersicht der Analytik verschiedener Parameter aus Selektion und Akkumulation entnommener Proben, ist in Tabelle 2 dargestellt und wird im Folgenden kurz beschrieben. Die Bestimmung der prozessspezifischen Parameter wie Leitfähigkeit, Temperatur und pH-Wert erfolgte zeitnah nach Probennahme, ebenso die Bestimmung mittels Küvettenschnelltests und des Trockensubstanzgehaltes

sowie Glühverlusts. Die weiteren Proben wurden wie unten beschrieben für eine spätere Analyse konserviert.

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht der verwendeten Analysemethoden.

Parameter	Bestimmungsmethode	Anmerkungen
pH-Wert	pH-Meter; online Messung	pH 3110, WTW
Leitfähigkeit	Leitfähigkeitsmeter	Cond 3110, WTW
Temperatur	pH-Meter Leitfähigkeitsmeter Online-Messung	pH 3110, WTW Cond 3110, WTW
Trockensubstanzgehalt (TS) Glühverlust (GV)	DIN 38 409-H 2-2	50 mL Probe; Schwarzbandfilter; 589/1, Ø = 100 mm, Whatman
Gesamter Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB _{hom})	Schnelltest + photometrische Bestimmung	Hach Schnelltestküvetten; LCK 515
Gelöster Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB _{gel})	Schnelltest + photometrische Bestimmung	Hach Schnelltestküvetten; LCK 515
Gesamter organischer Kohlenstoff (<i>Total Organic Carbon</i> , TOC)	DIN EN 1484	Homogenisierte Probe; Vario TOC Cube, Elementar, s. Kapitel 3.5.2
Gelöster organischer Kohlenstoff (<i>Dissolved Organic Carbon</i> , DOC)	DIN EN 1484	Filtrierte Probe (0,45 µm); Vario TOC Cube, Elementar, s. Kapitel 3.5.2
Kurzkettige Fettsäuren (<i>Volatile Fatty Acids</i> , VFA)	Ionenchromatograph mit Leitfähigkeitsdetektor + Kationenaustauschersäule	930 Compact IC Flex; Metrohm; Metrosep Organic Acids – 250/7.8; Methrom s. Kapitel 3.5.3
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N)	Schnelltest + photometrische Bestimmung (Arbeitsschritt 1+2)	Hach Schnelltestküvetten; LCK 303 bzw. 304
	Ionenchromatograph DIN EN ISO 14911 (Arbeitsschritt 3)	s. Kapitel 3.5.4
Ortho-Phosphat-Phosphor (PO ₄ -P)	Schnelltest + photometrische Bestimmung (Arbeitsschritt 1+2)	Hach Schnelltestküvetten; LCK 349 bzw. 350
	Ionenchromatographie, DIN EN ISO 10304-1 (Arbeitsschritt 3)	s. Kapitel 3.5.4
Polyhydroxyalkanoate (PHA)		s. Kapitel 3.5.5

3.5.1 Probenvorbereitung zur Analyse gelöster Parameter

Zur Analyse der gelösten Parameter (CSB_{gel}, DOC, VFA, NH₄-N, PO₄-P) wurden die Proben zunächst durch eine Feststoffabtrennung vorbereitet. Hierzu erfolgte eine Zentrifugation bei 4.500 g für

10 Minuten (Sorvall LYNX 6000; Thermo Fischer), bevor der Überstand der Proben über einen Faltenfilter (595 ½, Ø = 185 mm; Whatman) vorfiltriert wurde. Anschließend erfolgte eine weitere Filtration über einen Spritzenvorsatzfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm (Minisart, regenerierte Cellulose, Ø = 2 mm; Sartorius).

3.5.2 Gesamter- bzw. gelöster organischer Kohlenstoff

Da diese Proben nicht unmittelbar nach Probenahme analysiert werden konnten, wurden diese nach Homogenisierung der Probe (TOC) bzw. nach Feststoffabtrennung (DOC, vgl. Kapitel 3.5.1) mit Salzsäure (37 % HCl) auf einen pH-Wert < 2 angesäuert und anschließend bei -20°C bis zur Analyse konserviert. Der vorhandene anorganische Kohlenstoff wird durch das Ansäuern entfernt; allerdings kann hierbei ein geringer Anteil des leicht ausblasbaren organischen Kohlenstoffs verloren gehen. Die Bestimmung des organischen Kohlenstoffs erfolgte nach DIN EN 1484 (vario TOC Cube; Elementar). Hierbei erfolgt eine Umwandlung des in der Probe enthaltenen organischen Kohlenstoffs bei 850°C über einen Platin-Katalysator in Kohlenstoffdioxid (CO₂) mit Sauerstoff als Oxidationsmittel. Das dabei gebildete CO₂ wird mittels nicht dispersiver Infrarotdetektion quantitativ erfasst.

3.5.3 Kurzkettige Fettsäuren (VFA)

Zur Probenkonservierung wurden die VFA-Proben nach Filtration (Kapitel 3.5.1) mit Schwefelsäure (96 % H₂SO₄) auf einen pH-Wert < 2 angesäuert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der VFA-Zusammensetzung erfolgte mittels Ionenchromatographie (930 Compact IC Flex mit Kationenaustauschersäule Metrosep Organic Acids - 250/7.8; Metrohm), die eine Messung von Milch-, Ameisen-, Essig-, Propion-, iso-Butter-, n-Butter-, iso-Valerian-, n-Valerian- und Capronsäure ermöglicht. Zur Berechnung des CSB der organischen Säuren (CSB_{VFA}) wurde der Faktor zur Berechnung des CSB der einzelnen organischen Säuren aus der Reaktionsgleichung zur vollständigen Oxidation genutzt.

3.5.4 Bestimmung von NH₄-N und PO₄-P mittels Ionenchromatographie

Während die Bestimmung der NH₄-N- und PO₄-P-Konzentration in den Arbeitsschritten 1 und 2 mittels Schnelltest und photometrischer Bestimmung erfolgte (s. Tabelle 2), wurde in Arbeitsschritt 3 eine Messung mittels Anionen- und Kationenchromatographie (930 Compact IC Flex; Metrohm) durchgeführt. Hierfür wurden die Proben zunächst nach der Feststoffabtrennung mittels verschiedener Säuren konserviert – die Anionenproben wurden mit Schwefelsäure (H₂SO₄) auf einen pH-Wert zwischen 3 - 3,5 eingestellt, während die Kationenproben mittels 1 M Salpetersäure (HNO₃)

auf einen pH-Wert von 2,5 - 5,5 eingestellt wurden. Anschließend erfolgte eine Lagerung bei -20°C bis zur Analyse.

3.5.5 Bestimmung des Biopolymergehaltes in Form von Polyhydroxyalkanoaten (PHA)

Zur Beurteilung des Akkumulationspotenzials, wurden Proben für die PHA-Bestimmung jeweils zu Beginn und Ende der Akkumulation genommen. Dies dient einerseits der Überprüfung, ob am Ende der famine-Phase der Selektion noch PHA in der Biomasse vorhanden ist und ermöglicht eine Quantifizierung dessen, sodass durch Subtraktion das tatsächliche PHA-Akkumulationspotenzial des Prozesses bewertet werden kann. Nach Probenahme erfolgt durch Zugabe von Schwefelsäure (96 % H_2SO_4) ein Absenken des pH-Wertes auf < 2 , um einem möglichen Abbau des akkumulierten PHAs zu verhindern. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 4.500 g zentrifugiert (Sorvall LYNX 6000; Thermo Fischer), um eine fest-flüssig Trennung zu erzielen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit destilliertem Wasser resuspendiert, um Reste der Schwefelsäure auszuwaschen, bevor die Probe erneut zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt und nach Abgießen des letzten Probenüberstandes wurde das Pellet bei -20°C eingefroren. Vor der Aufbereitung zur Analyse wurden die PHA-Proben gefriergetrocknet (VaCo 5; ZIRBUS technology GmbH) und $5 \pm 0,5$ mg Probe in ein Zentrifugenglas eingewogen. Die Bestimmung des PHA-Gehalts erfolgt in Anlehnung an die Methode nach Braunegg et al. (1978) in einer Doppelbestimmung. Nach Einwaage der Probe werden die folgenden Chemikalien nacheinander hinzu pipettiert: 1 mL Methanol-Lösung mit 5 % Schwefelsäure, 0,8 mL Chloroform sowie 0,2 mL Benzoesäure gelöst in Chloroform (5 mg/mL) als interner Standard. Anschließend werden die Proben für 6 Stunden in einem Thermoschüttler (MHR 23; Hettich) bei 100°C unter kontinuierlichem Schütteln bei 450 rpm aufgeschlossen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird zur Unterstützung der Phasenseparation 1 mL einer 1 %-igen NaCl-Lösung zugegeben, in einem Vortexschüttler geschüttelt (RS-VF10; Phoenix) und für 5 Minuten bei 4.500 g zentrifugiert (Sorvall LYNX 600 380/400 V; Thermo Fisher Scientific™, bzw. Z 206 A; Hermle). Die untere Lösemittelphase wird mithilfe einer 1 mL-Spritze mit anschließender Filtration über einen Spritzenvorsatzfilter (Xtra PTFE-45/13; 0,45 μm , $\varnothing = 13$ mm; Chromafil) in GC-Vials transferiert. Die Analyse erfolgt in einem Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID, Agilent 8860 Design; Agilent Technologies) mit einer HP 5-Säule (30 m x 0,32 mm, 0,25 μm). Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibrierung mittels PHBV-Standards (Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat), 8 % PHV-Gehalt, Sigma-Aldrich Co.), PHBH-Standard (Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyhexanoat), 15,2 % PHH-Gehalt, Sigma-Aldrich Co.) und dem beschriebenen internen Benzoesäurestandard (s.o.).

3.5.6 Untersuchung des thermischen Verhaltens verschiedener PHA-Proben mittels Differenzkalorimetrie (DSC)

Im Rahmen des Projektes wurden vier der hergestellten PHA-Proben durch das Leibniz-Institut für Verbundwerkstoffe in Kaiserslautern auf ihr thermisches Verhalten mittels Differenzkalorimetrie (DSC) untersucht. Ziel der Untersuchung war ein besseres Verständnis des Schmelz- und Kristallisationsverhaltens der PHA. Dazu wurden die Proben in einem Aluminium-Tiegel ($V = 40 \mu\text{L}$) unter Stickstoffatmosphäre (30 mL min^{-1}) von -50°C bis 200°C mit einer Rate von 10 K min^{-1} aufgeheizt und anschließend mit 10 K min^{-1} auf die Ausgangstemperatur abgekühlt. Um eine Vergleichbarkeit der PHA-Proben untereinander zu ermöglichen, wurden zwei Zyklen pro Messung durchgeführt. Der Wärmestrom wurde währenddessen aufgenommen und anschließend grafisch ausgewertet. Entsprechende Effekte (Schmelze, Kristallisation, Glasübergang) wurden quantitativ ausgewertet, sofern diese eindeutig erkennbar waren.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Substratzusammensetzung

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben wurde, erfolgte die Substratherstellung für die meisten Arbeitsschritte durch eine Versäuerung von Brauereiabwasser, mit Ausnahme der ersten zwei Versuchsblöcke in **Arbeitsschritt 2**, in denen synthetisches Substrat in Anlehnung an die Zusammensetzung versäuerten Brauereiabwassers genutzt wurde (vgl. Abbildung 2). Im Folgenden sind die Eigenschaften der in den Batches produzierten Substrate dargestellt.

In Abbildung 7 wird deutlich, dass sich die Zusammensetzung der Substrate der drei Versäuerungs-Batches teilweise stark unterscheidet; während die Zusammensetzung der zwei Batches „Brauereiabwasser 1.2“ und „Brauereiabwasser 1.3“ sehr ähnlich ist, ist die Zusammensetzung des Batches „Brauereiabwasser 1.1“ deutlich anders; die Zusammensetzung des synthetischen Abwassers wurde bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Während Batch 1.1 hauptsächlich Propion-, Iso-Butter- und Iso-Valeriansäure aufweist (0,25:0,23:0,31), weisen Batch 1.2 und 1.3 v.a. Essigsäure sowie geringere Anteile von Propion- und Buttersäure auf (1.2:0,57:0,16:0,13 bzw. 1.3:0,67:0,14:0,08). Die Anteile an C_{gerade} und $C_{ungerade}$ im produzierten Substrat 1 lagen bei 41,1 % und 58,9 %, bei 75,6 % und 24,4 % in Substrat 2 und bei 80,9 % und 19,1 % in Substrat 3 (Tabelle 1). Das synthetische Substrat besteht aus Essig-, Propion- und Buttersäure (0,45:0,22:0,33) und weist einen Anteil von 77,1 % C_{gerade} zu 22,9 % $C_{ungerade}$ auf (vgl. Tabelle 1).

Im Fall der Versuche mit dem Substrat 1 ist folglich ein geringerer Anteil an PHB im Vergleich zu PHV im produzierten Copolymer zu erwarten. Im Gegensatz dazu, ist in den Versuchen mit Substrat 2 und 3, sowie dem synthetischen Substrat mit einem prozentual höheren Anteil PHB im Vergleich zu PHV in dem während des Prozesses synthetisierten Copolymers zu rechnen. Der Anteil an Capronsäure, welche bei höheren Konzentrationen in vorhergehenden Versuchen zu einem messbaren Anteil des Monomers 3-Hydroxyhexanoat (HH) im hergestellten PHA geführt hat (vgl. Laumeyer et al. 2025b), wurde aufgrund der Substratzusammensetzung lediglich in den mit realem Substrat hergestellten Polymeren erwartet. Dabei unterschied sich der Anteil der Capronsäure zwischen den einzelnen Substratbatches deutlich und betrug in Batch 1.1 10 % und in den Batches 1.2 und 1.3 jeweils 5 %.

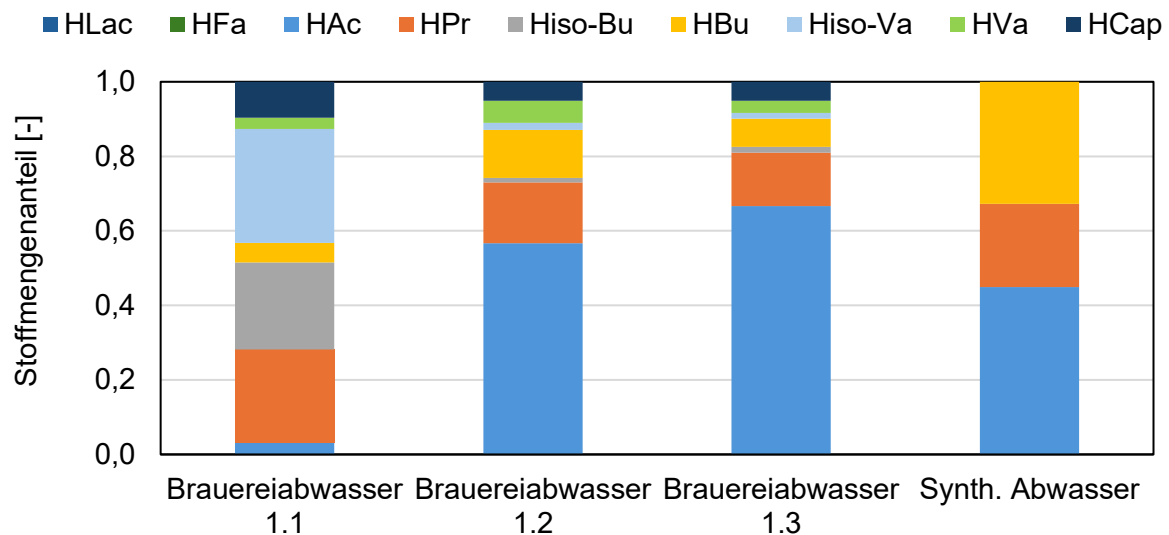


Abbildung 7: Stoffliche Zusammensetzung der verwendeten Substrate.

4.2 Laborversuche zur Steigerung des Feststoffgehaltes

Der erste Versuchsblock widmete sich der Untersuchung verschiedener Strategien zur Steigerung des Feststoffgehaltes in der Selektion im Labormaßstab. Hierzu wurden zum einen mehrere Selektionsversuche mithilfe des anorganischen Zuschlagstoffes Calcium-Carbonat (CaCO_3) über 14 Tage und zum anderen mit einer Änderung der Prozessführung zu einer entkoppelten Substrat- und Nährstoffzugabe über eine Dauer von bis zu 28 Tagen betrieben.

Zugabe von CaCO_3 als Zuschlagsstoff

In den Versuchen, in denen CaCO_3 als Zuschlagsstoff in der Selektion zugegeben wurde, fielen die Ergebnisse unterschiedlich aus, wie in Abbildung 8 ersichtlich. Im Rahmen von drei Experimenten wurden jeweils über einen Zeitraum von 14 Tagen Selektionen mit Belebtschlamm der Brauereikläranlage durchgeführt, bei denen entweder 1 g CaCO_3 an Werktagen zugegeben wurde ($\text{WAS} + \text{CaCO}_3$, $n=6$) oder nicht (WAS , $n=3$). Die Ergebnisse der Anreicherung unter Zugabe von CaCO_3 sind in Abbildung 8 im Vergleich zu den ohne CaCO_3 erzielten Ergebnissen dargestellt. Während Abbildung 8 A den prozentualen Anteil an PHA in Bezug auf die Konzentration organischer Trockensubstanz (% oTS) zeigt, ist in Abbildung 8 B die PHA-Konzentration in mg L^{-1} dargestellt. Auffällig ist, dass der PHA-Anteil in beiden Prozessen an Tag 7 mit $36,5 \pm 7,2$ % PHA in den Proben mit CaCO_3 -Zugabe und $35,9 \pm 3,8$ % PHA in den Proben ohne CaCO_3 -Zugabe sehr ähnlich ist, sich die PHA-Konzentration mit ca. $219 \text{ mg PHA L}^{-1}$ in den Proben mit CaCO_3 -Zugabe von den Proben ohne CaCO_3 -Zugabe mit einer Konzentration von 155 mg L^{-1} dennoch deutlich unterscheidet. Dies ist auf eine höhere Feststoffkonzentration in den Reaktoren mit CaCO_3 zurückzuführen, welche die Ergebnisse von

Estévez-Alonso et al. (2022) widerspiegelt, die in ihren Versuchen mit synthetischem Substrat bei einer Calcium-Zugabe in Form von Calciumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) eine Steigerung der PHA-Produktionsrate und der Biomasseproduktion beobachtet haben. Der zugrundeliegende Mechanismus ist dabei eine Komplexbildung von Calcium mit dem verwendeten Acetat, welches dadurch einfacher bzw. schneller von den Mikroorganismen aufgenommen werden kann. Dadurch erhalten die PHA-speichernden Mikroorganismen einen Selektionsvorteil und der Anteil der PHA-produzierenden Mikroorganismen steigt aufgrund des geringeren Energiebedarfs. (Estévez-Alonso et al. 2021) An Tag 14 erzielten die ohne CaCO_3 -Zugabe selektierten Biozönosen mit $38,1 \pm 3,6$ % PHA im Mittel höhere PHA-Gehalte als die mit CaCO_3 selektierten Mikroorganismen ($27,9 \pm 10,2$ % PHA). Dies führte trotz eines höheren Feststoffgehaltes von $0,59 \pm 0,23 \text{ g L}^{-1}$ in den Reaktoren mit CaCO_3 im Vergleich zu $0,44 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$ in den Reaktoren ohne Zugabe zu einer vergleichbaren PHA-Konzentration von $165 \text{ mg PHA L}^{-1}$ bzw. $168 \text{ mg PHA L}^{-1}$.

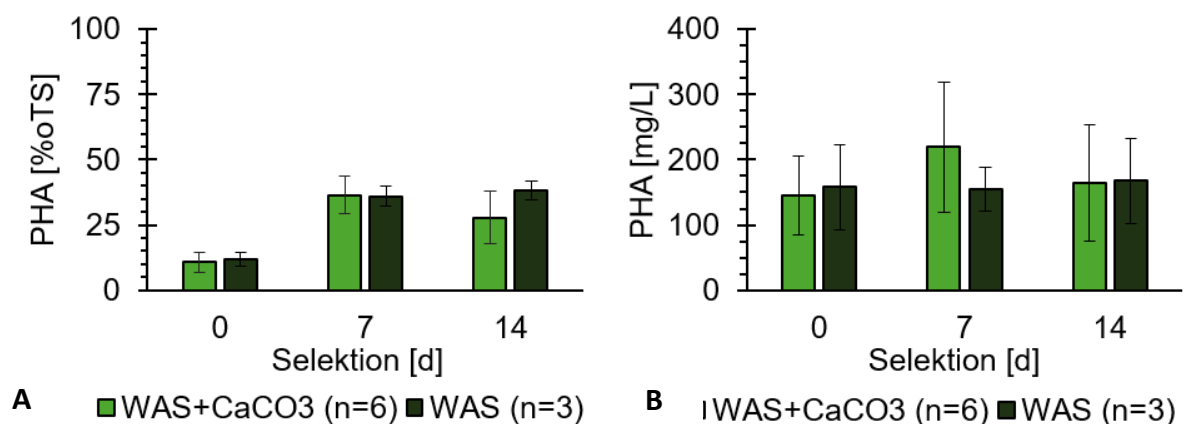


Abbildung 8: Entwicklung des PHA-Gehalts an Akkumulationen an den Tagen 0, 7 und 14 des Selektionsprozesses unter Verwendung von Klärschlamm mit Zugabe von 1 g CaCO_3 (WAS+ CaCO_3) oder ohne (WAS). Abbildung 8 A zeigt den prozentualen Anteil an PHA innerhalb der organischen Trockensubstanz (oTS) und Abbildung 8 B zeigt die auf die PHA-Konzentration in mg L^{-1} umgerechneten Ergebnisse. Modifiziert und erweitert von Laumeyer et al. (2025a).

Entkopplung der Substrat- und Nährstoffzugabe

In dem nächsten Versuch wurde die Entkopplung der Substrat- und Nährstoffzugabe untersucht, da die Literatur Hinweise auf eine Stabilisierung des Feststoffgehalts der PHA-bildenden Mikroorganismen gibt (Lorini et al. 2020; Oliveira et al. 2017). In einem ersten Versuch wurde dieser Ansatz mit einer Änderung der Prozesseinstellungen durchgeführt, bei dem vor jedem Abzug innerhalb des 6 h-Zyklus eine 45-minütige Sedimentation durchgeführt wurde. Lediglich der Abzug für die Versuche zur Bewertung des Akkumulationspotenzials erfolgte aus dem volldurchmischten Reaktor. Daraus ergibt sich ein Schlammalter, welches deutlich größer als das im vorherigen Versuch mit CaCO_3 -

Zugabe genutzten Schlammalters von 4 d ist, da bei erfolgreicher Sedimentation nur geringe Mengen an Feststoff entfernt werden und sich somit eine längere Verweilzeit des Schlammes im Reaktor ergibt. In Abbildung 9 A ist der Verlauf der Feststoffkonzentration in der Selektion über die Versuchsdauer aufgetragen und es zeigt sich, dass nach einer anfänglichen Abnahme innerhalb der ersten Woche eine relativ stabile TS-Konzentration vorliegt. So sinkt der TS-Gehalt von $4,79 \pm 0,04 \text{ g TS L}^{-1}$ an Tag 0 auf $2,13 \pm 0,19 \text{ g TS L}^{-1}$ an Tag 7 und ist auch an Tag 14 weiterhin bei $2,20 \pm 0,17 \text{ g TS L}^{-1}$. Folglich scheint der Verlauf der Feststoffkonzentration innerhalb dieses Zeitraums stabil zu sein. Allerdings steigt der Anteil der organischen Trockensubstanz (oTS) deutlich langsamer an (Tag 0: 56 %; Tag 7: 76 %; Tag 14: 86 %), was im Vergleich zu den späteren Versuchen mit einem Schlammalter von 4 d auf eine längere Selektionsphase hindeutet. Dies liegt in den regelmäßigen Sedimentationen vor dem Abzug des Überstands begründet, welcher eine Auswaschung der anorganischen Trockensubstanz aus der Schlammphase verzögert.

In Abbildung 9 B sind die Ergebnisse der Akkumulationsversuche an verschiedenen Tagen des Versuchs dargestellt. Auffällig ist dabei das hohe Akkumulationspotenzial an Tag 0, welches bereits einen PHA-Gehalt von $23,2 \pm 1,66 \text{ % oTS}$ aufweist. Trotz des geringeren Schlammaustrages zeigt sich im weiteren Verlauf eine deutliche Zunahme des Akkumulationspotenzials und somit eine erfolgreiche Selektion, mit einem PHA-Gehalt von $46,0 \pm 2,75 \text{ % oTS}$ an Tag 7. Dieser Wert bleibt auch an Tag 14 weiterhin in vergleichbarer Größenordnung, wenngleich er höhere Schwankungen aufweist ($42,13 \pm 9,14 \text{ % oTS}$) - während der PHA-Gehalt in zwei der drei Reaktoren bei ca. 48 % oTS liegt, sind im dritten Reaktor lediglich 29 % oTS messbar; hierfür liegt kein klar ersichtlicher Grund vor. Die Zusammensetzung der gebildeten Copolymere liegt mit 67,3-74,9 % HB:25,1-32,7 % HV nah an der theoretischen Zusammensetzung von 75,6 % HB:24,4 % HV.

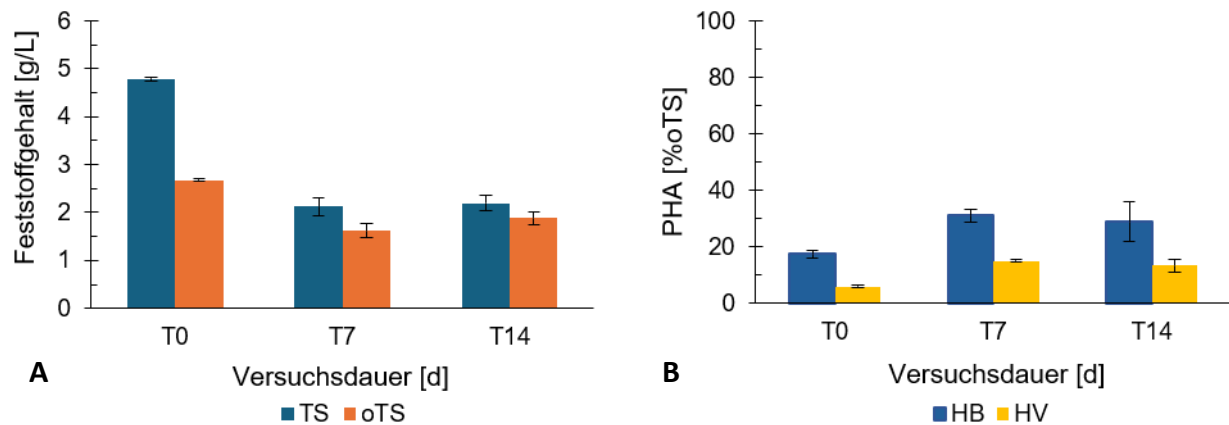


Abbildung 9: Ergebnisse der Versuchsreihe mit einer Sedimentation pro Zyklus, die ein höheres Schlammalter bedingt sowie einer Entkopplung der Nährstoffzugabe. A: Entwicklung des Feststoffgehaltes über die Versuchsdauer von 14 Tagen in den Selektionsreaktoren, B: Verlauf der PHA-Konzentration in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion (die Biomasse stammte aus dem homogenisierten Selektionsreaktor).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde vor jedem zweiten Abzug eine Sedimentation durchgeführt, sodass sich ein Schlammalter von 4 d ergab. Die Zyklusdauer blieb weiterhin bei 6 h und die Raumbelastung bei $1 \text{ g CSB}_{\text{VFA}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. In Abbildung 10 A ist der Verlauf der Feststoffkonzentration in der Selektion über den Versuchszeitraum von 28 Tagen aufgetragen. In diesem Versuch sinkt der TS-Gehalt über den gesamten Zeitraum von 28 Tagen kontinuierlich, die größte Änderung findet dabei innerhalb der ersten Woche statt. In dieser sinkt der TS-Gehalt von $5,06 \pm 0,03 \text{ g TS L}^{-1}$ an Tag 0 auf $1,87 \pm 0,22 \text{ g TS L}^{-1}$ an Tag 7. Der Anteil des oTS steigt in diesem Zeitraum von 55 % auf 78 % und nimmt bis Tag 14 auf 90 % zu. Dies zeigt, dass die anorganischen Feststoffe an Tag 14 größtenteils aus dem System ausgetragen wurden und der Feststoffgehalt größtenteils aus Biomasse besteht. Während der oTS-Anteil im weiteren Verlauf auf 92-93 % steigt, nimmt der TS-Gehalt bis zum Ende des Experiments auf $0,69 \pm 0,24 \text{ g TS L}^{-1}$ ab.

Abbildung 10 B zeigt den PHA-Gehalt in Akkumulationsversuchen an verschiedenen Tagen der Selektion. Das initiale PHA-Akkumulationspotenzial liegt bei $11,6 \pm 1,5 \text{ % oTS}$ und nimmt innerhalb der ersten Woche deutlich zu, sodass es an Tag 7 einen PHA-Gehalt von $41,0 \pm 10,2 \text{ % oTS}$ erreicht. Dieser Wert steigt über die folgenden Versuchstage kontinuierlich an und erreicht ein Maximum von $56,5 \pm 8,3 \text{ % oTS}$ an Tag 28. Das synthetisierte Copolymer besteht mit 67,2-72,3 % HB:27,7-32,8 % HV größtenteils aus HB und orientiert sich an der theoretischen Zusammensetzung von 80,9 % HB:19,1 % HV.

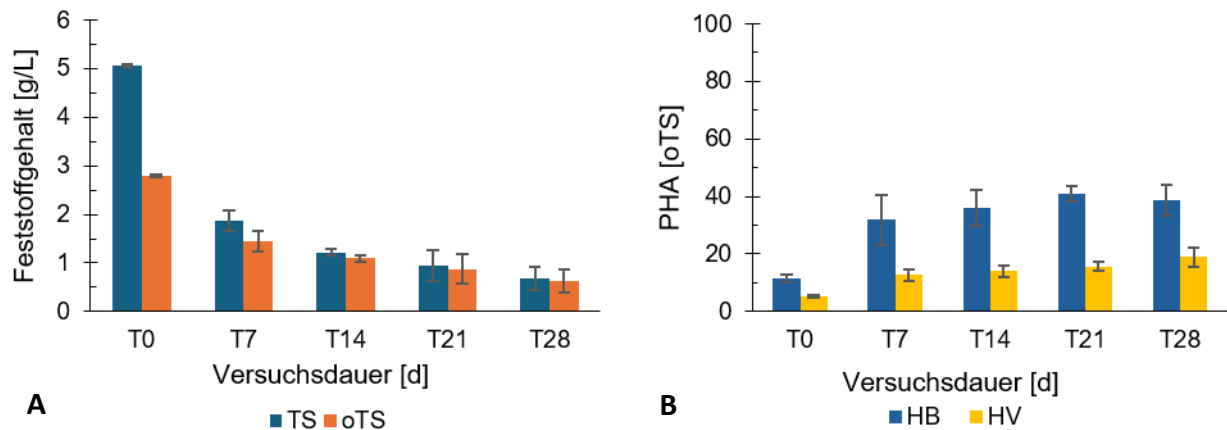


Abbildung 10: Ergebnisse einer Entkopplung der Nährstoffzugabe bei einem Schlammalter von 4 d und realem Substrat aus versäuertem Brauereiabwasser. A: Entwicklung des Feststoffgehaltes über die Versuchsdauer von 28 Tagen in den Selektionsreaktoren, B: Verlauf der PHA-Konzentration in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion.

Insgesamt zeigt sich die von Substrat entkoppelte Nährstoffzugabe als eine geeignete Selektionsstrategie, die in beiden Versuchsreihen zuverlässig PHA-Gehalte >40 % oTS erzielt hat. Außerdem zeigte sich eine weitere signifikante Zunahme des PHA-Gehalts bei längerem Betrieb der Selektion, was jedoch auch mit einer Veränderung der Schlammbelastung aufgrund des abnehmenden Feststoffgehalts begründet werden kann. Ein Vergleich der Raumausbeuten der Versuchsreihen mit einem Schlammalter von > 4 d bzw. 4 d ist in Abbildung 11 dargestellt. Darin wird deutlich, dass die erzielten Raumausbeuten der Versuchsreihen vergleichbar sind, da diese sich aus der Konzentration an organischer Trockensubstanz und dem darin enthaltenen PHA errechnen. Dies zeigt, dass trotz des höheren TS-Gehalts in dem ersten Versuch (SRT= > 4 d) keine höhere Raumausbeute erzielt werden konnte, da der darin enthaltene PHA-Gehalt im Vergleich mit dem zweiten Versuch (SRT= 4 d) geringer war. Die Darstellung der Raumausbeute über den zeitlichen Verlauf des Versuchs zeigt für beide Versuche die höchste Raumausbeute an Tag 7 mit $571,7 \pm 36,8 \text{ mg PHA L}^{-1}$ (SRT= > 4 d) bzw. $593,9 \pm 170,9 \text{ mg PHA L}^{-1}$ (SRT= 4 d). An Tag 14 ist diese mit $532,2 \pm 118,0 \text{ mg PHA L}^{-1}$, respektive $537,8 \pm 92,4 \text{ mg PHA L}^{-1}$ etwas geringer und fällt dann aufgrund des sinkenden organischen Feststoffgehalts bis zum Ende des Versuchs auf $356,3 \pm 139,4 \text{ mg PHA L}^{-1}$ ab.

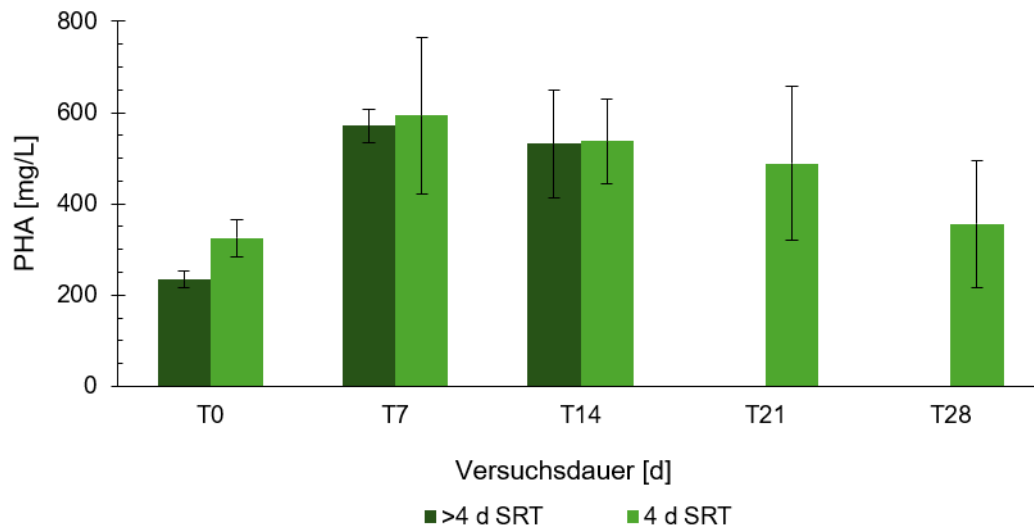


Abbildung 11: Vergleich der erzielten Raumausbeute in den Versuchsreihen mit einer Entkopplung der Substrat- und Nährstoffzugabe unter Nutzung eines Schlammalters von 4 bzw. > 4 Tagen.

Trotz der vergleichbaren Raumausbeuten der verschiedenen Schlammalter an Tag 7 und 14 begünstigt ein Schlammalter von 4 d die prozesstechnische Umsetzung eines (semi-)kontinuierlichen Betriebs der Selektion. In diesem Fall ist ermöglicht der regelmäßige Abzug aus dem volldurchmischten Reaktor eine direkte Nutzung für die PHA-Produktion. Hierzu soll im nächsten Schritt getestet werden, ob eine kürzere PHA-Akkumulation ähnlich hohe PHA-Gehalte erzielt, da in diesem Fall lediglich ein PHA-Produktionsreaktor notwendig ist, der parallel zur Selektion betrieben wird.

4.3 Entwicklung einer (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion im Labormaßstab

Im Rahmen des Projektes sollte der Prozess der PHA-Produktion zu einem (semi-) kontinuierlichen Betrieb entwickelt werden. Aufbauend auf den Erkenntnissen vorangehender Versuche, wurde deshalb ein Prozessverfahren entworfen, in dem die Akkumulation statt über einen Zeitraum von 24 h lediglich 6 h lang durchgeführt wird. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei einer nach Bedarf geregelten Substratzugabe (Feed on demand, FoD), hohe PHA-Gehalte bereits nach 6 h innerhalb der Akkumulation erreicht wurden (vgl. Laumeyer et al. 2025b). Mit einer Zyklusdauer innerhalb der Selektion von 6 h und Batch-Akkumulationen von jeweils 6 h könnte in jedem zweiten Zyklus – bei dem aus dem volldurchmischten Selektionsreaktor abgezogen wird – eine Akkumulation mit dieser Biomasse erfolgen. In beiden Fällen erfolgt die Zugabe der Nährstoffe ($\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ und Mikronährstofflösung) mit einem Abstand von ca. 2 h nach Substratzugabe.

Versuche zum Vergleich verschiedener Schlammalter mit synthetischem Substrat

Im Rahmen eines Vergleichsversuchs sollte zunächst getestet werden, ob sich für die Umsetzung ein Schlammalter von 2 d ebenso gut eignet, bei welchem eine Akkumulation bei jedem Abzug erfolgen könnte. In Abbildung 12 ist der Verlauf der Feststoffkonzentration innerhalb der Selektionsreaktoren über einen Zeitraum von 28 Tagen dargestellt. Sowohl in den Versuchen mit einem Schlammalter von 2 d (Abbildung 12 A), als auch in den Versuchen mit einem Schlammalter von 4 d (Abbildung 12 B) ist eine starke Abnahme des Feststoffgehalts ersichtlich. Während die Feststoffkonzentration in dem Versuch mit einem Schlammalter von 2 d an Tag 7 mit $0,50 \pm 0,13 \text{ g TS L}^{-1}$ den niedrigsten Wert erreicht und fast ausschließlich aus organischer Trockensubstanz besteht, ist dieser in dem Versuch mit einem Schlammalter von 4 d mit $1,43 \pm 0,08 \text{ g TS L}^{-1}$ über doppelt so hoch. Während der Feststoffgehalt in den Reaktoren mit einem Schlammalter von 2 d sich bei $0,5 - 0,6 \text{ g TS L}^{-1}$ einpendelt, nimmt dieser in den Versuchen mit einem Schlammalter von 4 d bis Tag 21 kontinuierlich ab und pendelt sich dann ebenfalls bei $0,55 - 0,6 \text{ g TS L}^{-1}$ ein. Die schnellere Übereinstimmung von oTS und TS zeigt eine stärkere Auswaschung anorganischen Materials, welche bei einem Schlammalter von 2 d bereits nach etwa 14 Tagen Versuchsdauer gegenüber ca. 21 Tagen bei einem Schlammalter von 4 d abgeschlossen ist.

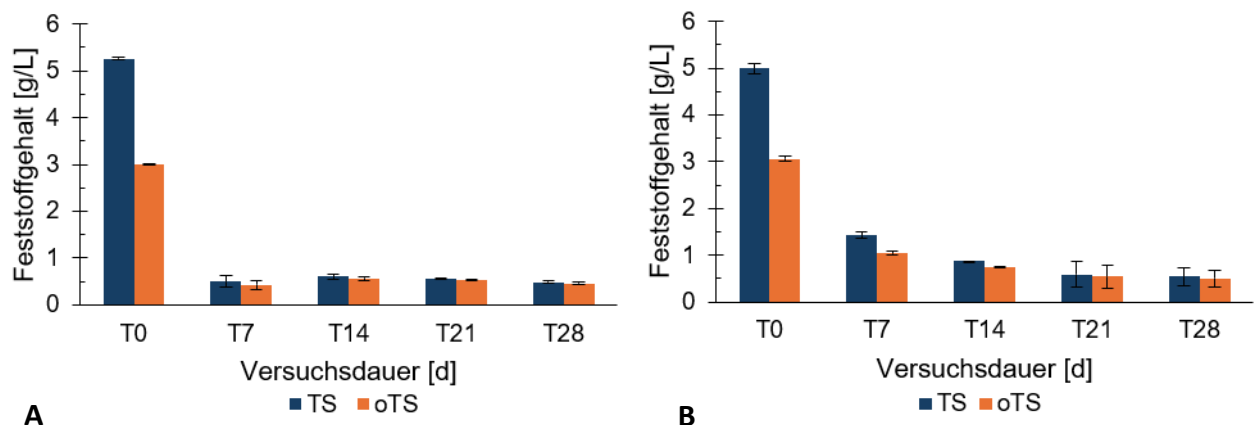


Abbildung 12: Darstellung des Verlaufs der Feststoffkonzentration in der Selektion über 28 Tage. A: 2 d Schlammalter ($n=3$), B: 4 d Schlammalter ($n=2$).

Der Verlauf des PHA-Gehalts und dessen Zusammensetzung bezogen auf die organische Trockensubstanz ist in Abbildung 13 dargestellt, in Abbildung 13 A ist dieser für ein Schlammalter von 2 d und in Abbildung 13 B für ein Schlammalter von 4 d abgebildet. In beiden Versuchen zeigt sich an Tag 0 mit einem Wert von $9,8 \pm 0,5 \% \text{ oTS}$ (SRT= 2 d), bzw. $7,5 \pm 0,1 \% \text{ oTS}$ (SRT= 4 d) das geringste Akkumulationspotenzial innerhalb der 28-tägigen Versuchsreihe. Während die Versuchsreihe mit einem Schlammalter von 2 d den höchsten PHA-Gehalt mit $45,0 \pm 0,1 \% \text{ oTS}$ an Tag 7 erreicht, liegt

dieser in der Versuchsreihe mit einem Schlammalter von 4 d bei $32,8 \pm 14,6$ % oTS an Tag 28 und bleibt damit deutlich unter dem in dem Versuch mit 2 Tagen erzielten Wert. In beiden Versuchsreihen zeigt sich außerdem ein deutlicher Unterschied beim PHA-Akkumulationspotenzial innerhalb der jeweiligen parallel betriebenen Selektionsreaktoren, wie in Abbildung 13 C und D erkennbar. Auffällig ist dabei, dass der Akkumulationsreaktor A2 mit beiden verglichenen Schlammaltern einen höheren PHA-Gehalt mit 57 % oTS (SRT=2 d, Tag 7), bzw. 47,4 % oTS (SRT=4 d, Tag 28) erzielt, was vermutlich mit einem im Vergleich geringeren oTS-Gehalt innerhalb des Reaktors und einer dementsprechend höheren Schlammbelastung zusammenhängt. In beiden Fällen ist das in den Akkumulationsversuchen synthetisierte PHA ein Copolymer aus PHBV, welches ein Verhältnis von ca. 75 % HB zu 25 % HV aufweist und somit sehr nah an dem erwarteten Verhältnis von 77,1 HB:22,9 HV liegt.

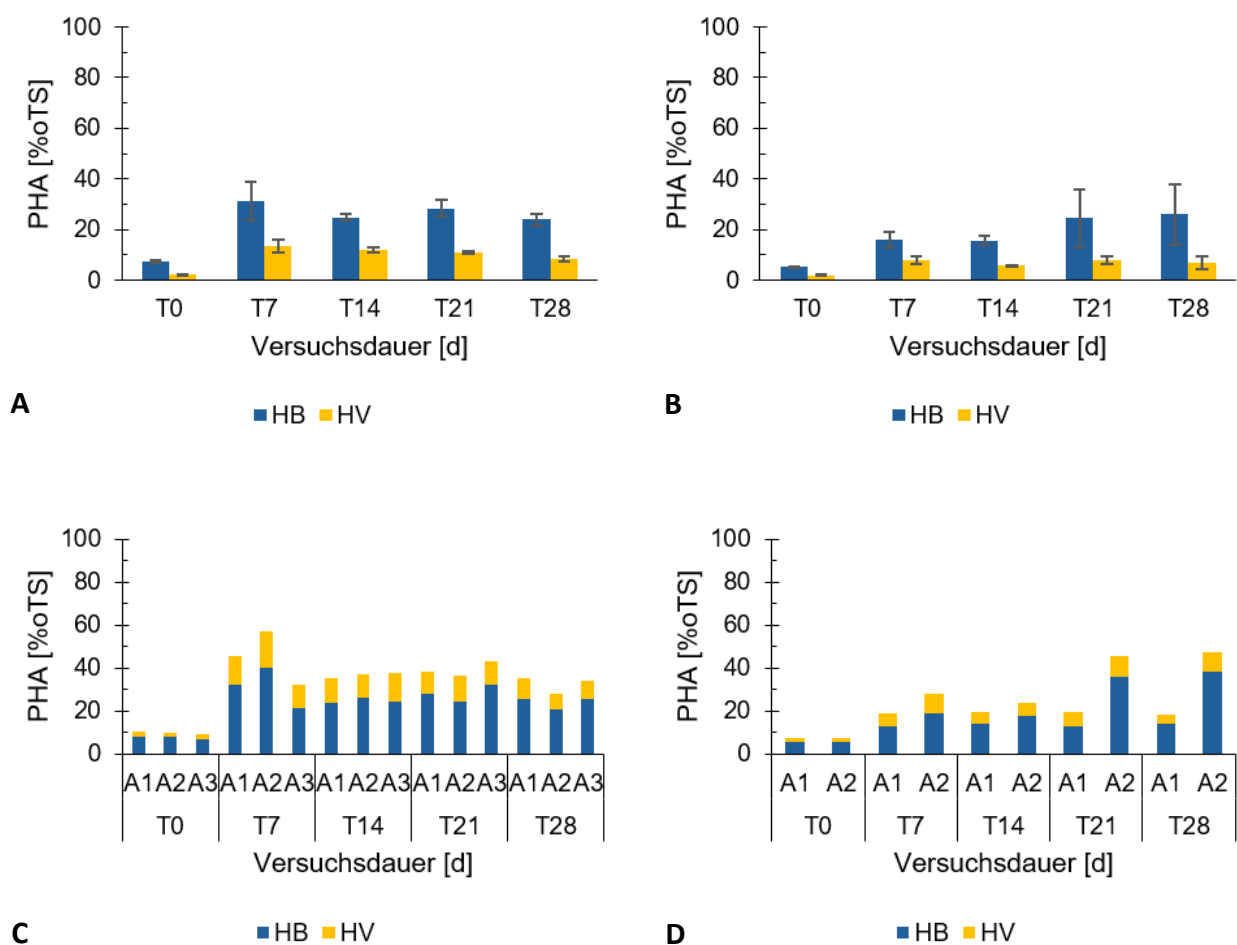


Abbildung 13: Verlauf der PHA-Konzentration in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion. A: Durchschnittlicher PHA-Gehalt bei 2 d Schlammalter (n=3), B: Durchschnittlicher PHA-Gehalt bei 4 d Schlammalter (n=2), C: Verlauf des PHA-Gehalts in den Reaktoren mit SRT= 2 d, D: Verlauf des PHA-Gehalts in den Reaktoren mit SRT= 4 d.

In Abbildung 14 sind die über den Verlauf der Versuche erzielten Raumaussbeuten im Vergleich dargestellt. Hier wird zunächst deutlich, dass in der Versuchsreihe mit einem Schlammalter von 2 d tendenziell höhere Raumaussbeuten erzielt werden als in dem Versuch mit einem Schlammalter von 4 d. Allerdings liegen in der Versuchsreihe 2 (SRT=4 d) höhere Schwankungen der Raumaussbeute vor, obwohl die Ergebnisse aus Duplikaten (n=2) statt aus Triplikaten (n=3) stammen. Im Vergleich mit den zuvor diskutierten Raumaussbeuten von $571,7 \pm 36,8 \text{ mg PHA L}^{-1}$ bzw. $593,9 \pm 170,9 \text{ mg PHA L}^{-1}$ (Tag 7, vgl. Abbildung 11) mit realem Substrat und einer entkoppelten Nährstoffzugabe zeigt sich außerdem in beiden Fällen eine deutlich geringere Raumaussbeute von maximal $148,9 \pm 29,7 \text{ mg PHA L}^{-1}$ (Tag 21, SRT=2 d) bzw. $116,6 \pm 24,2 \text{ mg PHA L}^{-1}$ (Tag 7, SRT=4 d). Obwohl die Versuchsreihe mit einem Schlammalter von 2 d ein höheres spezifisches Speicherpotenzial aufweist, werden die weiteren Versuche auf Grundlage dieser im Vergleich niedrigeren Ergebnisse mit einem Schlammalter von 4 d durchgeführt.

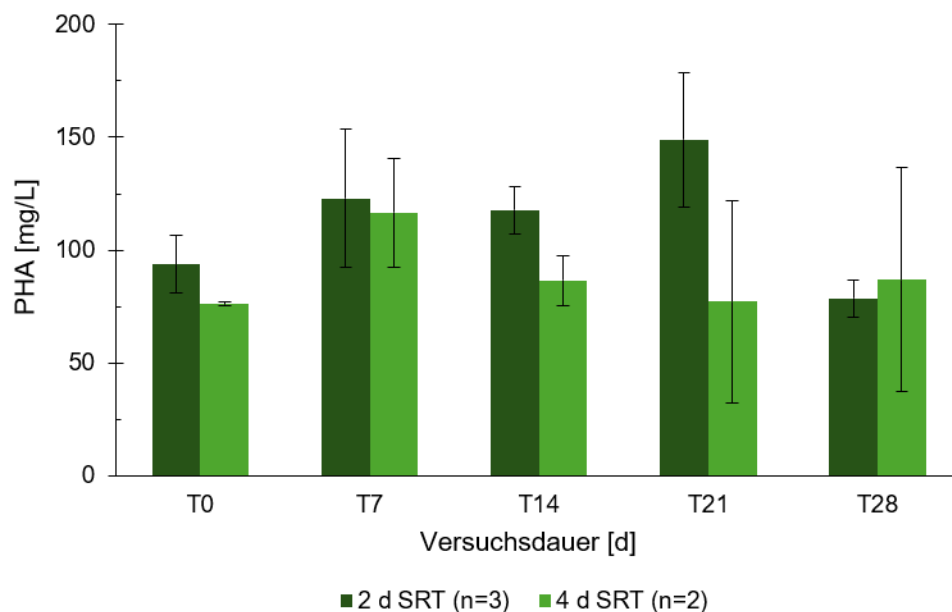


Abbildung 14: Vergleich der erzielten Raumaussbeute in den Versuchsreihen mit synthetischem Substrat unter Nutzung eines Schlammalters von 2 bzw. 4 Tagen.

Nutzung eines Schlammalters von 4 d und realem Substrat

Basierend auf den Ergebnissen des vorangehenden Versuchs mit synthetischem Substrat, erfolgte ein Proof of Concept mit realem Substrat (Brauereiabwasser Batch 1.2). In dieser Versuchsreihe ist ebenfalls eine deutliche Abnahme des Feststoffgehalts über die Dauer des Versuchs zu beobachten, vgl. Abbildung 15 A. Auffällig ist hierbei, dass der Feststoffgehalt zunächst mit $1,74 \pm 0,003 \text{ g L}^{-1}$ bis Tag

7 weniger stark fällt im Vergleich zu den Versuchen mit synthetischem Substrat und einem Schlammalter von 4 d ($1,43 \pm 0,08 \text{ g TS L}^{-1}$). Von Tag 7 auf Tag 14 fällt dieser deutlich ab ($0,69 \pm 0,02 \text{ g TS L}^{-1}$), steigt dann jedoch wieder an und erreicht an Tag 21 einen Feststoffgehalt von $1,32 \pm 0,09 \text{ g TS L}^{-1}$. Mit einem TS-Gehalt von $1,05 \pm 0,24 \text{ g TS L}^{-1}$ an Tag 28 liegt dieser am Ende des Versuchs fast doppelt so hoch im Vergleich zu der TS-Konzentration im Versuch mit synthetischem Substrat ($0,54 \pm 0,18 \text{ g TS L}^{-1}$). Ein Grund für die höheren TS-Gehalte in dem Versuch mit realem Substrat könnten die im Substrat enthaltenen Schwebstoffe sein, welche einerseits für einen regelmäßigen TS-Eintrag sorgen und andererseits von den Mikroorganismen ebenfalls als Nährstoffe genutzt werden könnten. Anhand des hohen Anteils organischen Feststoffs an der TS-Konzentration (Tag 21 und Tag 28: ca. 92 %) lässt sich auch in diesen Versuchen eine Auswaschung des anorganischen Anteils und eine deutliche Verschiebung zu einer aus Biomasse bestehenden Mischkultur erkennen.

Die Entwicklung des PHA-Gehaltes über den Versuchszeitraum zeigt eine deutliche Zunahme des PHA-Akkumulationspotenzials von Tag 0 auf Tag 7 mit einem PHA-Gehalt von 60,9 % oTS¹, welcher auch an Tag 14 mit $58,9 \pm 1,3 \text{ % oTS}$ auf einem gleich hohen Niveau liegt. Damit erzielen die Akkumulationsversuche mit realem Substrat einen höheren PHA-Gehalt als jene mit synthetischem Substrat. Aufgrund einer Steigerung der gemessenen $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration, kommt es an den Tagen 21 und 28 zu geringeren PHA-Gehalten, da die Stickstofflimitierung abgeschwächt wird. Dies erklärt auch die TS-Zunahme, da ein größerer Anteil des Substrates für Wachstumsprozesse genutzt werden kann. Hinsichtlich der PHA-Zusammensetzung zeigt sich bereits an Tag 7 ein geringer Anteil des Monomers 3-Hydroxyhexanoat (HH), welcher im Verlauf des Versuches zwischen 0,75 – 1,44 % oTS schwankt. Dies zeigt, dass die komplexere Zusammensetzung des realen Substrates die Synthetisierung komplexerer Copolymere bedingt, wie auch in anderen Studien beschrieben, vgl. Kourmentza et al. (2017), Valentino et al. (2019).

Theoretisch ergibt sich eine PHA-Zusammensetzung von 75,6 % HB: 24,4 % HV, unter Vernachlässigung des HH-Anteils, zeigen die Ergebnisse eine Abweichung von dieser theoretischen Zusammensetzung mit 63-67 % HB:30-37 % HV. Schließlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die

¹ Aufgrund eines Probenverlusts erfolgte die PHA-Bestimmung an Tag 7 dieser Versuchsreihe lediglich für den Akkumulationsreaktor A2.

Umsetzung des Konzepts mit realem Substrat zu den höchsten spezifischen PHA-Gehalten führt und gleichzeitig Copolymere mit einem höheren HV-Anteil erzeugt. Grund hierfür könnte der zusätzlich durch die Schwebstoffe eingetragene CSB sein, welcher zu einer tatsächlich höheren CSB-Raubelastung im Vergleich zu der berechneten OLR von $1,0 \text{ g CSB}_{\text{VFA}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ führt. Außerdem ist es möglich, dass die Biozönose einen höheren PHA-Gehalt mit dem realen Substrat erzielt, da diese bereits an die Zusammensetzung des Brauereiabwassers angepasst ist, welches im Vergleich zum synthetischen Substrat nicht der Fall ist. Dies ist ebenfalls vergleichbar mit den Ergebnissen von Steinmetz et al. (2024), die in Akkumulationsversuchen mit einem Substrat, welches sich von dem in der Selektion verwendeten unterschied, geringere PHA-Ausbeuten erzielten.

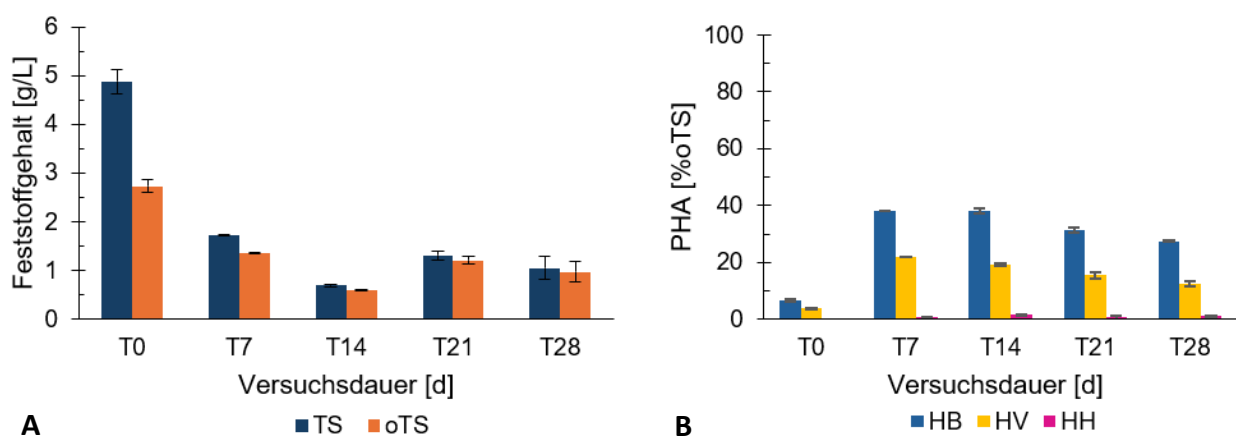


Abbildung 15: Ergebnisse des (semi-)kontinuierlichen Betriebs mit Nutzung eines Schlammalters von 4 d und realem Substrat aus versäuertem Brauereiabwasser. A: Entwicklung des Feststoffgehaltes über die Versuchsdauer von 28 Tagen in den Selektionsreaktoren, B: Verlauf der PHA-Konzentration in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion.

Die Entwicklung der Raumausbeute unter Nutzung realen Substrats ist in Abbildung 16 dargestellt. Zunächst fällt auf, dass in dieser Versuchsreihe deutlich höhere Raumausbeuten erzielt werden als in den Versuchen mit synthetischem Substrat (vgl. Abbildung 14), welche mit einem Maximum von $487,9 \pm 7,1 \text{ mg PHA L}^{-1}$ näher an die Raumausbeuten der 24 h-Akkumulationen kommen (vgl. Abbildung 11), obwohl diese in einem deutlich kürzeren Zeitraum von 6 h erzielt wurden. Allerdings fällt die Raumausbeute von Tag 7 auf Tag 14 zunächst auf $291,5 \pm 34,9 \text{ mg PHA L}^{-1}$ ab, bevor diese an Tag 21 wieder auf $367,4 \pm 23,3 \text{ mg PHA L}^{-1}$ ansteigt. Aufgrund des geringen oTS an Tag 28 und dem zurückgegangenen PHA-Gehalt, beträgt die Raumausbeute lediglich $172,6 \pm 45,2 \text{ mg PHA L}^{-1}$ und liegt damit noch etwa doppelt so hoch, wie an Tag 0.

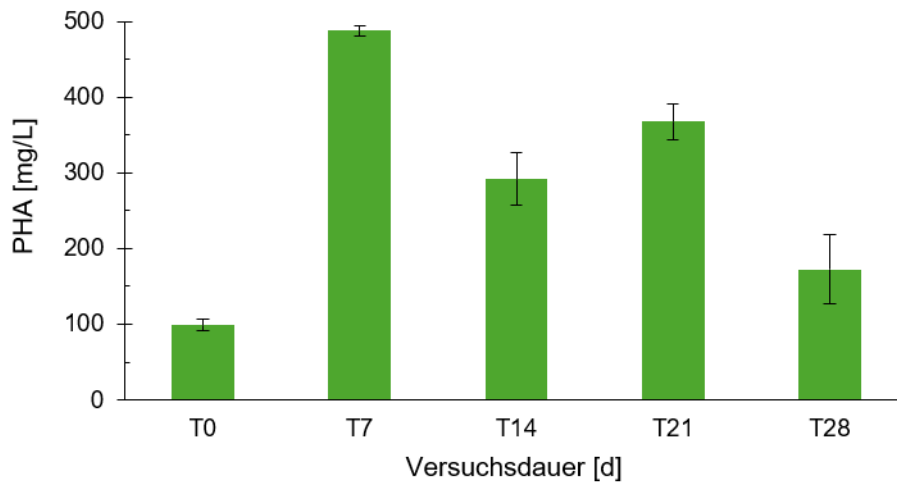


Abbildung 16: Verlauf der erzielten Raumausbeute an verschiedenen Tagen der Selektion mit realem Substrat (n=2).

Kontinuierlicher Betrieb unter wechselnden Bedingungen

Wie in Kapitel 3.2.2 Arbeitsschritt 2 beschrieben, wurde einer der Reaktoren über den Zeitraum der drei Versuchsreihen (Versuchsreihe (VR) I: SRT= 2 d, synth. Substrat; VR II: SRT= 4 d, synth. Substrat; VR III: SRT= 4 d, reales Substrat) durchgehend über 119 Tage betrieben. Folglich ermöglicht dieser Reaktor eine Beobachtung der Biozönose unter wechselnden Bedingungen (Schlammalter, Substratzusammensetzung) und somit eine Bewertung der Prozessrobustheit unter realistischen Betriebsbedingungen. Obwohl es im Verlauf des Langzeitversuchs zu Störungen der Prozessdynamik durch Algenbewuchs, Schimmelbildung im Substratvorlagebehälter und technische Störungen der Pumpen und Zeitschaltuhren kam, waren diese Einflüsse überwiegend reversibel.

Der Verlauf des Feststoffgehalts in dem Reaktor des Langzeitversuchs ist in Abbildung 17 dargestellt. Wie in den vorhergehenden Versuchen sinkt die Feststoffkonzentration innerhalb der ersten Woche stark (Tag 7: $0,67 \pm 0,01 \text{ g TS L}^{-1}$) und bleibt während der gesamten VR I niedrig, besteht jedoch ab Tag 14 bereits zu 93 % aus oTS. Dieser starke Rückgang der Feststoffkonzentration ist mit dem Schlammalter von 2 d zu erklären, bei dem innerhalb des Prozesses keine Sedimentation vorgenommen wird; folglich wurde immer aus dem vollaufgemischten Reaktor abgezogen, sodass bei jedem Abzug auch Biomasse entfernt wurde. Mit einem Wechsel der Betriebsstrategie auf ein Schlammalter von 4 d (VR II) erhöht sich der TS-Gehalt von $0,51 \pm 0,02 \text{ g TS L}^{-1}$ (Tag 28) auf $0,88 \pm 0,01 \text{ g TS L}^{-1}$ (Tag 35). Im weiteren Verlauf der VR II schwanken die TS-Konzentration zwischen $0,61\text{-}0,97 \text{ g L}^{-1}$, ab Tag 68 schwankt diese stärker, was mit einer Algenbildung begründet werden kann. Es wurde eine deutliche Veränderung der Flockenstruktur beobachtet und auch die Viskosität der

Biomasse nimmt zu. Dies lässt auf die Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) schließen (schleimigere Konsistenz), welche auf eine veränderte Biomassematrix hinweist. An Tag 84 kommt es zu einer Erhöhung des anorganischen Feststoffgehalts durch das Zerschlagen eines der Belüftersteine, sodass der TS-Gehalt steigt, der Anteil des oTS sich jedoch auf ca. 67 % verringert. Zu Beginn der VR III scheint der Effekt des defekten Belüftersteins aufgrund einer weitgehenden Entfernung der eingetragenen Partikel nachgelassen zu haben, sodass der Anteil des oTS wieder bei etwa 85 % liegt. Im weiteren Verlauf der VR III schwankt der TS-Gehalt zwischen 0,41-0,80 g L⁻¹, mit einem hohen Anteil an oTS (92-95 %). Insgesamt liegt die Feststoffkonzentration in dem Langzeitversuch unter der in dem vorherigen Versuch beschriebenen Feststoffkonzentration des Versuchs mit realem Substrat und einem Schlammalter von 4 d. Dies liegt vermutlich in den zuvor benannten Prozessstörungen begründet, durch welche teilweise auch eine schlechtere Nährstoffaufnahme bedingt wurde, wie etwa die Schimmelbildung im Substratvorlagebehälter.

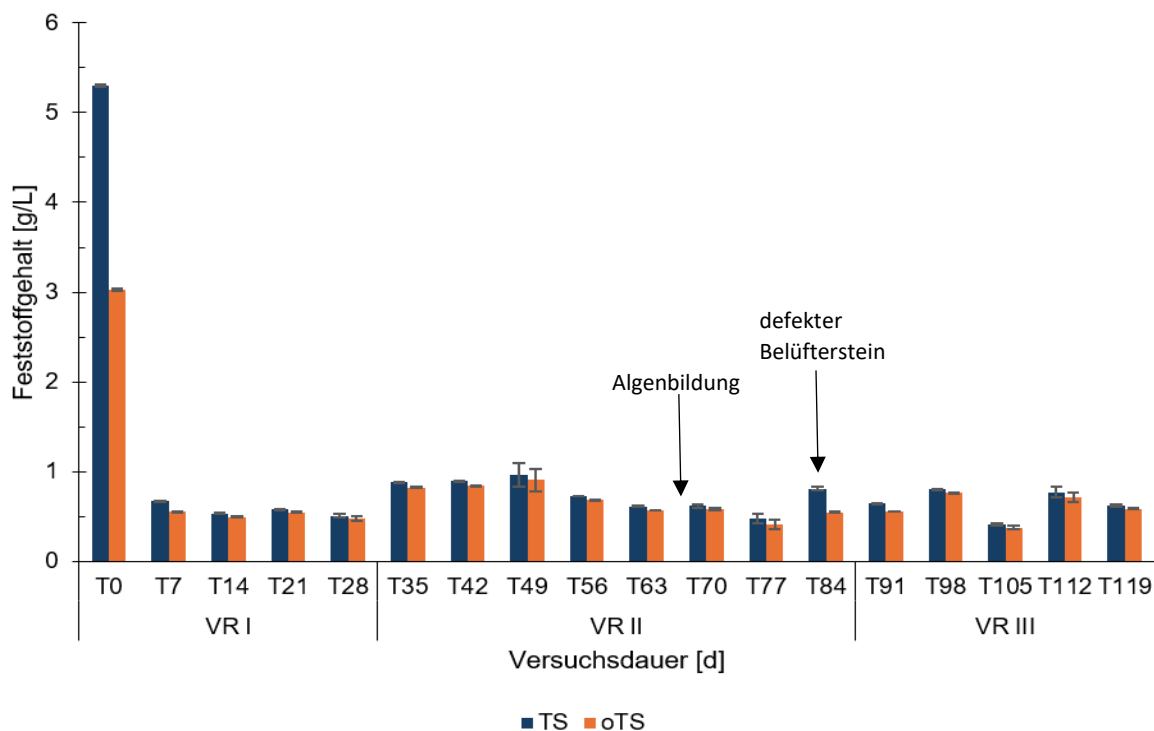


Abbildung 17: Verlauf der Feststoffkonzentration in der Selektion über 119 Tage unter veränderlichen Betriebsstrategien der verschiedenen Versuchsreihen (VR): VR I: SRT= 2 d, synth. Substrat; VR II: SRT= 4 d, synth. Substrat; VR III: SRT= 4 d, reales Substrat.

Der Verlauf des PHA-Gehalts über die Versuchsdauer des Langzeitversuchs zeigt die Entwicklung der speicheraktiven Mikroorganismen unter verschiedenen Prozessbedingungen, vgl. Abbildung 18. Die PHA-Gehalte steigen im Verlauf der ersten Versuchsreihe (VR I, Tag 0-28) bis Tag 21 kontinuierlich an

und erreichen bei dieser Betriebsstrategie ein Maximum von 43,4 % oTS, bevor dieser auf einen Wert von 30,4 % oTS an Tag 28 abfällt. Bei der Änderung auf ein Schlammalter von 4 d (VR II, Tag 29-84) zeigen sich weitgehend konstante PHA-Gehalte von ca. 30 % oTS bis einschließlich Tag 63, bevor dieser auf ein Maximum von 44,4 % oTS an Tag 70 steigt und dann wieder auf 41,8 % oTS (Tag 77) bzw. 35,8 % oTS (Tag 84) sinkt. Analog zu den Ergebnissen des Versuchs mit realem Substrat und einem Schlammalter von 4 d, zeigen die Ergebnisse des Langzeitversuchs die höchsten spezifischen PHA-Gehalte bei Verwendung realen Substrats (VR III, Tag 91-119), mit einem Maximum von 64,2 % oTS an Tag 98. In der folgenden Woche bleibt der PHA-Gehalt vergleichbar hoch (58,6 % oTS, Tag 105), bevor dieser an Tag 112 mit 37,5 % oTS deutlich sinkt. Am letzten Tag der Selektion ist ein erneuter Anstieg des PHA-Gehalts mit 44,4 % oTS erzielt worden.

Während in VR I und VR II PHBV-Copolymere synthetisiert wurden, kann in VR III aufgrund der komplexeren Substratzusammensetzung auch ein geringer HH-Anteil nachgewiesen werden (0,7-2,8 % HH), auch der HV-Anteil ist im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen erhöht und übertrifft – wie auch in den Versuchen mit neuselektierter Biomasse und 4 d SRT – den theoretischen Anteil mit 29,0-35,9 % HV. Auffällig ist, dass die Schwankungen in der Zusammensetzung in VR III im Vergleich zu VR I und VR II stärker ausfallen.

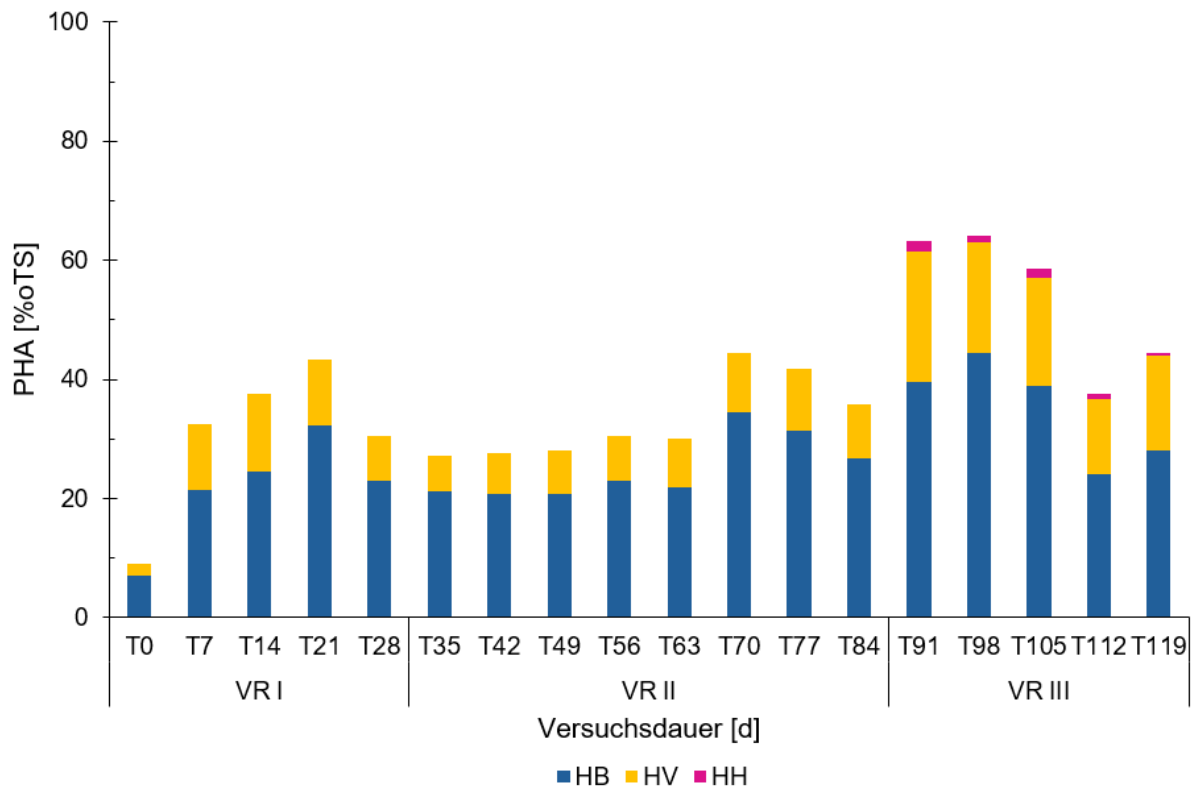


Abbildung 18: Verlauf der PHA-Konzentration in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion unter veränderlichen Betriebsstrategien der verschiedenen Versuchsreihen (VR): VR I: SRT= 2 d, synth. Substrat; VR II: SRT= 4 d, synth. Substrat; VR III: SRT= 4 d, reales Substrat.

Der Verlauf der Raumaussbeute über die Versuchsdauer des Langzeitversuchs ist in Abbildung 19 dargestellt. Analog zum höchsten PHA-Gehalt (bezogen auf die oTS), wird die höchste Raumaussbeute in der ersten Versuchsreihe an Tag 21 mit $182,3 \pm 7,1 \text{ mg PHA L}^{-1}$ erzielt, bevor diese zum Ende der Versuchsreihe wieder abfällt. Die Erhöhung des Schlammalters auf 4 d in Versuchsreihe II erzielt eine weitestgehend kontinuierlich steigende Zunahme der Raumaussbeute bis zu einem Maximum an Tag 70 mit $146,5 \pm 6,3 \text{ mg PHA L}^{-1}$. Aufgrund eines geringen oTS-Gehalts von $0,15 \pm 0,1 \text{ mg oTS L}^{-1}$ fällt die Raumaussbeute an Tag 77 mit $62,6 \pm 3,4 \text{ mg PHA L}^{-1}$ deutlich ab, obwohl der PHA-Gehalt im Vergleich zu Tag 77 lediglich geringfügig abnimmt (vgl. Abbildung 18). Mit Beginn der Verwendung realen Substrats in VR III ist eine Verdopplung der Raumaussbeute auf $271,7 \pm 24,4 \text{ mg PHA L}^{-1}$ zu beobachten, was auf die Zunahme des PHA-Gehalts sowie des oTS zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 18). Analog mit dem höchsten PHA-Gehalt, wird auch die höchste Raumaussbeute mit $359,4 \pm 9,1 \text{ mg PHA L}^{-1}$ an Tag 98 erzielt. Obwohl der PHA-Gehalt in der folgenden Woche vergleichbar hoch bleibt, nimmt die Raumaussbeute auf $214,9 \pm 7,3 \text{ mg PHA L}^{-1}$ deutlich ab.

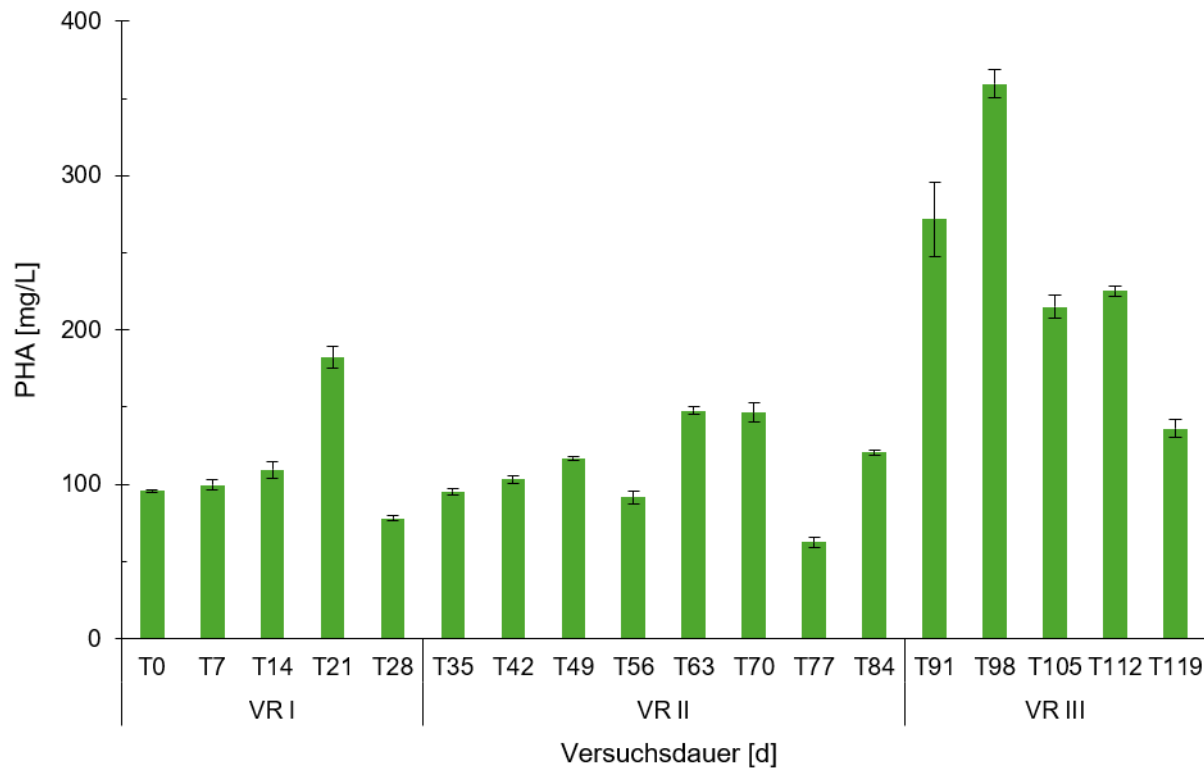


Abbildung 19: Verlauf der PHA-Raumausbeute in Akkumulationsversuchen durchgeführt an verschiedenen Tagen der Selektion unter veränderlichen Betriebsstrategien der verschiedenen Versuchsreihen (VR): VR I: SRT= 2 d, synth. Substrat; VR II: SRT= 4 d, synth. Substrat; VR III: SRT= 4 d, reales Substrat.

Der Langzeitversuch verdeutlicht insgesamt, dass das System trotz unterschiedlicher Störeinflüsse in der Lage ist, erneut ein funktionales Feast-Famine-Regime mit hoher PHA-Speicherfähigkeit zu etablieren. In La Cruz (2025) ist außerdem diskutiert, dass innerhalb des Versuchs eine hohe Sensitivität der Biozönose gegenüber geringfügigen Veränderungen der Biofilm- bzw. Flockenbildung sowie gegenüber Substratschwankungen auftritt. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Literaturberichten, die selbst bei identischen Betriebsparametern reaktorabhängige Unterschiede beschreiben (Steinmetz et al. 2024; Uhrig 2023).

4.4 Upscaling des Verfahrens in den Pilotmaßstab

Nachdem die Strategie für einen (semi-)kontinuierlichen Betrieb zur PHA-Produktion im Labormaßstab entwickelt wurde, sollte diese im Pilotmaßstab Anwendung finden. Hierzu wurden zwei Versuchsreihen mit unterschiedlichen realen Substraten aus versäuertem Brauereiabwasser (vgl. Kapitel 4.1) durchgeführt. Die Selektion wurde analog zu den Laborversuchen mit einem Schlammalter von 4 d und eine Zyklusdauer von 6 h betrieben. Außerdem wurde vor jedem zweiten Abzug eine 45-minütige Sedimentation implementiert und die Nährstoffzugabe ($\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ und

Mikronährstofflösung) erfolgte mit einem Abstand von ca. 2 h nach Substratzugabe. Im Gegensatz zu den im Labormaßstab durchgeführten Akkumulationen über 6 h, wurden diese im Pilotbetrieb über einen Zeitraum von mindestens 8 h betrieben, um diese Ergebnisse mit vorhergehenden Versuchen im Pilotmaßstab vergleichen zu können (vgl. Laumeyer et al. (2025a)). Darüber hinaus erfolgte die Substratdosierung in der Akkumulation nicht wie in den Laborversuchen zeitgesteuert, sondern anhand einer bedarfsgerechten Dosierung (s. 3.3.2), welche im Labormaßstab aufgrund der fehlenden Implementierung nicht möglich war.

Die zwei durchgeführten Versuchsreihen (VR I & VR II) unterschieden sich lediglich durch die Verwendung verschiedener Substrate (s. Tabelle 1), sowie des Inokulums, welches jeweils aus frischem Belebtschlamm der Brauereikläranlage bestand. Der Verlauf des Feststoffgehalts ist in Abbildung 20 dargestellt. Analog zu den Laborversuchen findet eine starke Abnahme der Feststoffkonzentration innerhalb der ersten Woche statt (VR I, Tag 7: $1,3 \text{ g TS L}^{-1}$; VR II: $0,88 \text{ g TS L}^{-1}$) und fällt in beiden Versuchsreihen über den gesamten Zeitraum weiterhin ab. Während in VR I an Tag 28 ein TS-Gehalt von $0,52 \text{ g TS L}^{-1}$ vorliegt, beträgt dieser in VR II lediglich $0,1 \text{ g TS L}^{-1}$. Diese Werte sind deutlich niedriger als die in den Laborversuchen gemessenen TS-Gehalte. Im Rahmen der VR II konnte auch eine starke Biofilmbildung am Rand des Selektionsreaktors beobachtet werden, welche bei Außerbetriebnahme erst vollständig erfasst werden konnte – sowohl an den Innenwänden des Reaktors als auch an jeglichen prozesstechnischen Elementen hatte sich ein Biofilm mit einer Dicke von ca. 2-3 mm gebildet. Aufgrund der prozesstechnischen Umsetzung kann jedoch ausschließlich suspendierte Biomasse für den außerhalb des Selektionsreaktors durchgeführten Akkumulationsversuch genutzt werden. Im Gegensatz zu den Laborversuchen im Langzeitbetrieb konnte allerdings keine deutliche Veränderung der Flockenstruktur beobachtet werden, allerdings ließen sich die Proben schlechter filtrieren und auch die fest-flüssig-Trennung zur Ernte der PHA-reichen Biomasse schien beeinträchtigt, was erneut auf die Bildung von EPS hindeutet.

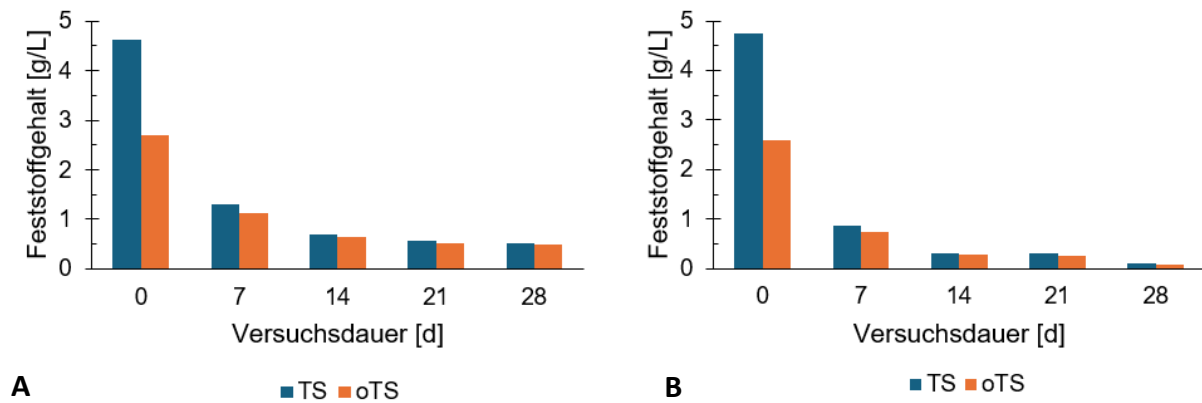


Abbildung 20: Entwicklung des Feststoffgehalts in der Selektion während der Versuchsreihen (VR) I und II im Pilotmaßstab. A: Verlauf des Feststoffgehalts in VR I; B: Verlauf des Feststoffgehalts in VR II.

Der Verlauf des PHA-Gehalts nach den 8-stündigen Akkumulationen an den verschiedenen Tagen des Selektionsbetriebs ist für beide Versuchsreihen (VR I & VR II) in Abbildung 21 dargestellt. In beiden Versuchsreihen zeigt sich ein starker Anstieg des PHA-Gehalts von Tag 0 bis Tag 7 – in VR I beträgt dieser $45,1 \pm 0,18$ % oTS und in VR II $53,6 \pm 0,39$ % oTS. Die PHA-Gehalte bleiben in VR I relativ konstant und schwanken ab Tag 14 zwischen 44,3-51,4 % oTS und liegen somit niedriger im Vergleich zu den in VR II erreichten PHA-Gehalten von 51,6-62,5 % oTS. Die durchgehende höheren Werte in VR II können mit den zuvor diskutierten niedrigeren Feststoffgehalten erläutert werden, da die gleiche Menge Substrat für weniger Biomasse zur Verfügung steht und diese somit eine höhere Schlammbelastung erfahren, obwohl die Raumbelastung identisch ist. In der Zusammensetzung zeigen beide Versuchsreihen einen deutlich höheren Anteil an HB-Monomeren in den gebildeten Copolymeren im Vergleich zum enthaltenen HV. Lediglich an Tag 7 von VR II wird ein geringer Anteil von 0,5 % HH-Monomeren gemessen. Während die Zusammensetzung in VR I zwischen 63,7-75,0 % HB und 25,0-36,3 % HV schwankt, schwankt diese für VR II zwischen 66,6-77,9 % HB und 22,1-33,4 % HV. In beiden Fällen weicht die tatsächliche Zusammensetzung somit nur geringfügig von der theoretischen Zusammensetzung von 75,6:24,4 (VR I) bzw. 80,9:19,1 (VR II) ab.

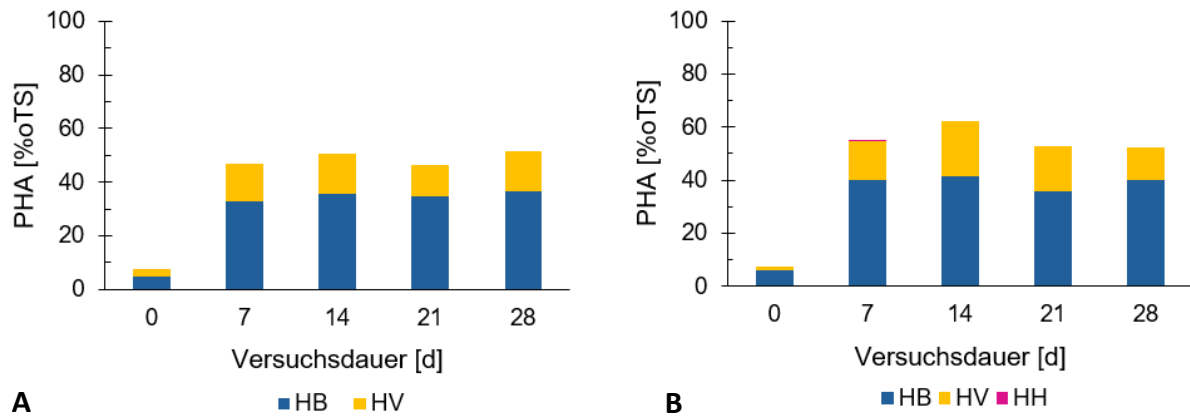


Abbildung 21: Verlauf der PHA-Gehalte in Akkumulationen nach 8 h an verschiedenen Tagen der Versuchsreihen (VR) I und II. A: Ergebnisse der VR I; B: Ergebnisse der VR II.

Der Verlauf der Raumaussbeute in den Akkumulationen ist über den Zeitraum der beiden Versuchsreihen in Abbildung 22 dargestellt. In dieser Gegenüberstellung wird deutlich, dass beide Versuche an Tag 0 eine sehr ähnliche Raumaussbeute von $89,7 \pm 3,8 \text{ mg PHA L}^{-1}$ (VR I) bzw. $88,3 \pm 3,3 \text{ mg PHA L}^{-1}$ aufweisen, welche in beiden Fällen innerhalb der ersten Woche der Selektion stark zunimmt. In beiden Versuchsreihen wird die maximale PHA-Raumaussbeute von $393,1 \pm 6,2 \text{ mg PHA L}^{-1}$ (VR I) bzw. $325,1 \pm 34,2 \text{ mg PHA L}^{-1}$ an Tag 7 erreicht, wie auch zuvor im Labormaßstab (vgl. Abbildung 16). Allerdings sind die dabei erzielten Raumaussbeuten geringer als die für die Laborreaktoren berechneten Raumaussbeuten (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 16), abgesehen der Ergebnisse des Langzeitversuchs (vgl. Abbildung 19). Wie anhand des kontinuierlich sinkenden oTS zu erwarten (vgl. Abbildung 20), nimmt auch die Raumaussbeute über die Versuchsdauer deutlich ab. Während die Raumaussbeuten in VR I eher stetig bis Tag 28 auf $271,0 \pm 18,6 \text{ mg PHA L}^{-1}$ sinken, ist in VR II ein sprunghafter Abfall von Tag 7 auf Tag 14 ($173,2 \pm 14,0 \text{ mg PHA L}^{-1}$) sowie von Tag 21 ($165,3 \pm 7,7 \text{ mg PHA L}^{-1}$) auf Tag 28 ($34,2 \pm 9,8 \text{ mg PHA L}^{-1}$) zu beobachten. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, wie wichtig die Feststoffkontrolle innerhalb des PHA-Produktionsprozesses ist - trotz der hohen PHA-Gehalte an Tag 28 in VR II wird eine geringere PHA-Ausbeute erzielt als mit der unselektierten Mischbiozönose an Tag 0.

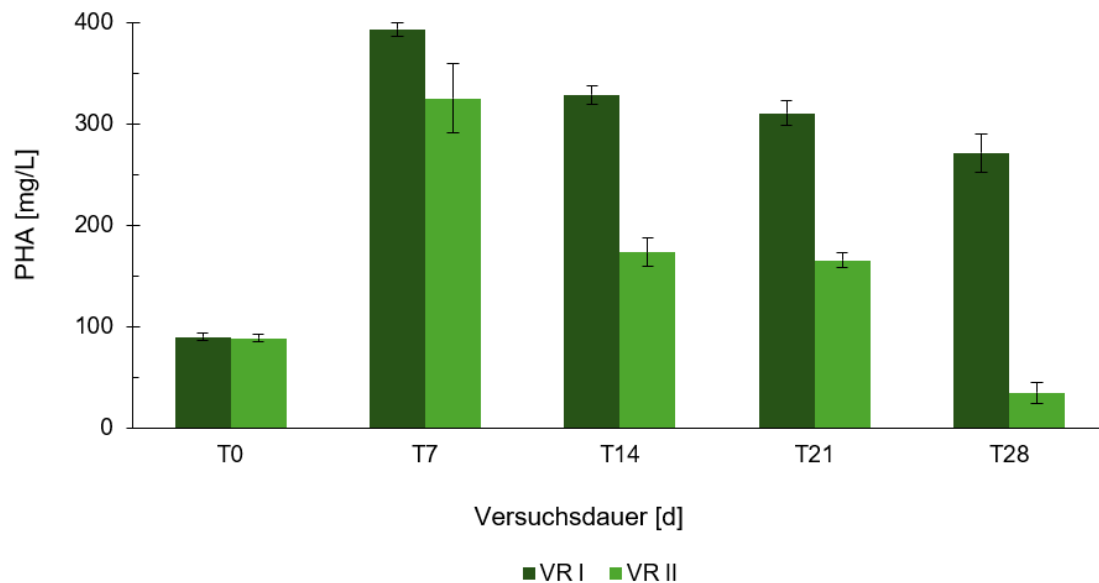


Abbildung 22: Verlauf der Raumausbeute in Akkumulationen nach 8 h an verschiedenen Tagen der Versuchsreihen (VR) I und II im Vergleich.

Am letzten Tag der VR II wurde der Akkumulationsversuch über 24 h durchgeführt und mithilfe eines Probenehmers erfolgten regelmäßige Probenahme, wie in Abbildung 23 dargestellt. Zunächst wird deutlich, dass zu Beginn der Akkumulation bereits ein PHA-Gehalt von 10,4 % oTS vorliegt, sodass in der famine-Phase der Selektion kein vollständiger Abbau des gebildeten PHAs erfolgt. Dies ist wahrscheinlich damit zu begründen, dass die in der homogenisierten Phase quantifizierbare Feststoffkonzentration in der Selektion mit $0,10 \text{ g TS L}^{-1}$ einen sehr geringen Wert aufweist und die zugegebene Substratmenge konstant geblieben ist, sodass sich eine erhöhte Schlammbelastung ergibt. Die erhöhte Schlammbelastung konnte auch in der Nährstoffdosierung beobachtet werden, da sich über den Zeitraum des Versuchs Konzentrationen von bis zu $40 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1}$ im Selektionsreaktor akkumuliert haben. Während der Akkumulationsversuche erfolgte somit keine ausschließliche PHA-Synthese, sondern auch Bakterienwachstum. So betrug der TS-Gehalt zu Beginn der Akkumulation aufgrund der vorgenommenen Verdünnung $0,04 \text{ g TS L}^{-1}$, nach 8 h lag dieser mit $0,08 \text{ g TS L}^{-1}$ bereits doppelt so hoch und nach 24 h lag dieser bei $0,11 \text{ g TS L}^{-1}$. Parallel dazu sank der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Gehalt von einer anfänglichen Konzentration von $20,85 \text{ mg L}^{-1}$ nach 8 h auf $1,62 \text{ mg L}^{-1}$, was einerseits auf das Zellwachstum und andererseits auf Verdünnungseffekte durch die Dosierung des nährstoffarmen Substrats in der Akkumulation schließen lässt.

Nach einem Zeitraum von 1 h hat sich der PHA-Gehalt bereits auf 28,8 % oTS erhöht und steigt bis 5 h nach Beginn der Akkumulation auf 49,7 % oTS an. Die Probenahme nach 6 h ergibt einen geringfügig

niedrigeren Wert von 47,6 % oTS, bevor der PHA-Gehalt wieder zunimmt und nach 8 h einen Wert von 52,4 % oTS aufweist. Zu diesem Zeitpunkt wäre die Akkumulation im Normalfall beendet worden und es wurden insgesamt 18 Feeds in diesem Zeitraum zugegeben, was einer Zugabe von $2,25 \text{ Feeds h}^{-1}$ entspricht. Im weiteren Verlauf steigt der PHA-Wert mit geringen Schwankungen kontinuierlich an bis er einen Maximalgehalt von 76,6 % oTS nach 24 h erreicht. Ein ähnlich hoher PHA-Gehalt wird bereits nach 16 h gemessen, dieser bleibt jedoch nicht konstant, sondern sinkt zum nächsten Probenahmezeitpunkt auf 64,3 % oTS (18 h) deutlich ab. Die längere Akkumulationszeit führt folglich zu einer Zunahme des PHA-Gehalts um 46 % und um eine Verdopplung der Raumausbeute von $34,2 \pm 9,8 \text{ mg PHA L}^{-1}$ auf $73,7 \pm 11,3 \text{ mg PHA L}^{-1}$. Allerdings wurde hierfür eine vielfache Menge an Substrat dosiert, da bis zum Ende der Akkumulation nach 24 h 62 Feeds erfolgt sind. Dies entspricht einer rechnerischen Substratzugabe von $2,58 \text{ Feeds h}^{-1}$ und liegt somit signifikant höher als die erfolgte Substratzugaberate über 8 h ($2,25 \text{ Feeds h}^{-1}$).

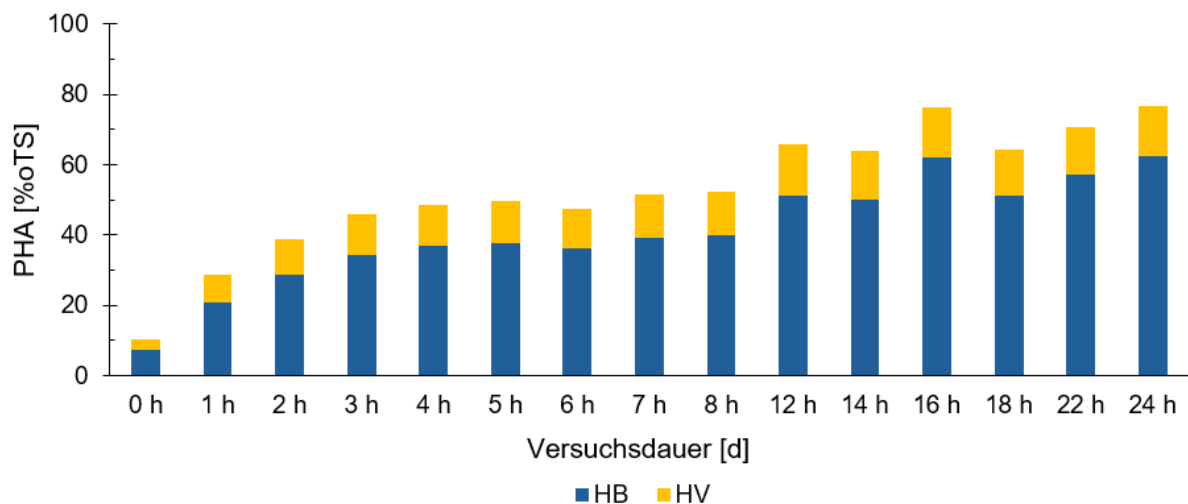


Abbildung 23: Verlauf des PHA-Gehalts in der Akkumulation an Tag 28 über 24 h.

Das Upscaling in den Pilotmaßstab zeigt, dass eine robuste Prozessgestaltung nicht ausschließlich von der Wahl eines geeigneten Schlammalters und einer angepassten Substratzugabe beruht. Obwohl hohe PHA-Gehalte in beiden Versuchsreihen im Pilotmaßstab erzielt werden, bleibt die Raumausbeute hinter den aus den Laborversuchen erwarteten Werten aufgrund eines geringeren Feststoffgehaltes zurück. In zukünftigen Versuchsreihen sollte aus diesem Grund ein Fokus auf eine Vermeidung der Bildung von Biofilm geachtet werden, welcher in VR II geringe Raumausbeuten bedingte. Außerdem sollte der Abzug aus dem Selektionsreaktor aus dem Überstand optimiert werden, da es hierbei aufgrund einer zu niedrigen Positionierung der Pumpe zu einem Feststoffaustrag kommen kann. Um den Prozess in Zukunft effizienter zu gestalten, würde eine Regelung der Substratzugabe in der

Selektion über eine TS-Messung Sinn ergeben, sodass eine konstante Schlammbelastung erzielt werden kann. Bei einer Beibehaltung der separaten Nährstoffdosierung in der Selektion sollte diese in Zukunft über eine präziser schaltbare Pumpe erfolgen, da dies zu einer Nährstoffüberdosierung und somit einer Anreicherung der Nährstoffe innerhalb des Selektionsreaktors führen kann. Eine weitere Möglichkeit wäre die Nährstoffdosierung über eine Messung der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration zu regeln. Außerdem sollte in Abstimmung mit dem Extraktionsverfahren eruiert werden, welche Strategie in der Akkumulation kosteneffizienter ist, da höhere PHA-Gehalte die Polymerextraktion verbessern, da der relative Anteil an nicht-PHA Biomasse sinkt und die Zellmatrix leichter aufgeschlossen werden kann (Pagliano et al. 2021; Samorì et al. 2015), hierfür jedoch ein deutlicher Mehrverbrauch an Substrat notwendig ist.

4.5 Ergebnisse des thermischen Verhaltens hergestellter PHA

Insgesamt wurden vier Proben (zwei Proben gefriergetrockneter PHA-reicher Biomasse (Probe 1 und 2) und zwei Proben extrahierten PHAs (Probe 3 und 4), siehe in Tabelle 3) zur Analyse des thermischen Verhaltens an das Leibniz-Institut für Verbundwerkstoffe übergeben. Die Probenvorbereitung von Probe 4 unterscheidet sich von den anderen drei, da in diesem Fall eine direkte Extraktion mit NaClO stattgefunden hat, ohne die Probe zunächst wie in Kapitel 3.4 beschrieben mit H₂SO₄ auf einen pH-Wert < 2 zu stabilisieren. Mit Fokus auf den PHA-Gehalt wird deutlich, dass die PHA-Extraktion mit vorheriger Stabilisierung mittels H₂SO₄ (Probe 3) mit 92,6 ± 0,3 % PHA TS⁻¹ einen höheren PHA-Gehalt im Extrakt aufweist als die direkte Extraktion mit NaClO (85,0 ± 1,3 % PHA TS⁻¹). In beiden Fällen erzielt die 3-stündige Extraktion eine Zunahme des PHA-Gehalts im Vergleich zur PHA-angereicherten Biomasse, die in Probe 2 75,5 ± 2,1 % PHA TS⁻¹ aufweist. Ebenso zeigt die Probe 4 mit einem Verhältnis von 78,3 % HB zu 21,7 % HV eine höhere Abweichung in der Zusammensetzung im Vergleich zu den Proben 2 und 3, in denen das Verhältnis 81,6 % HB zu 18,4 % HV (Probe 2) bzw. 80,9 % HB zu 19,1 % HV (Probe 3) beträgt.

Tabelle 3: Übersicht der auf ihr thermisches Verhalten analysierten PHA-Proben. Bei Probe 1 und 2 handelt es sich um PHA-angereicherte Biomasse, während Probe 3 nach einer Stabilisierung mittels H₂SO₄ (pH < 2) mit NaClO (14 %) über 3 h extrahiert und Probe 4 ohne Stabilisierung mit NaClO (14 %) über 3 h extrahiert wurde.

Bezeichnung	Probenname	PHA ± StD [%TS]	HB [%]	HV [%]	HH [%]
Probe 1	WH 13.09.25 CL Akku R1 T14	46,3 ± 0,4	67,3	32,7	0,0
Probe 2	WH 16.09.25 CL Akku T28 24h	75,5 ± 2,1	81,6	18,4	0,0
Probe 3	WH 17.09.25 CL Akku Extr. + H ₂ SO ₄ 3h T28 24h	92,6 ± 0,3	80,9	19,1	0,0
Probe 4	WH 17.09.25 CL Akku Extr. Direkt 3h T28 24h	85,0 ± 1,3	78,3	21,7	0,0

Die Ergebnisse der DSC-Messungen der vier Proben zeigen unterschiedliche Verhalten. Beim ersten Aufheizen scheinen in den Proben 1 und 2 Verdampfungen vorzuliegen, welche in den extrahierten PHA-Proben 3 und 4 nicht auftreten, vgl. Abbildung 24 A. Die Verdampfungen in den Proben 1 und 2 können auf verschiedene Verunreinigungen mit leichtflüchtigen Substanzen zurückzuführen sein, wie bspw. Wasser, Fettsäuren, Zucker oder auch kurzkettige Proteine. Während des ersten Abkühlens ist in keiner der vier gemessenen Proben eine eindeutige Kristallisation zu beobachten, wie in Abbildung 24 B erkennbar.

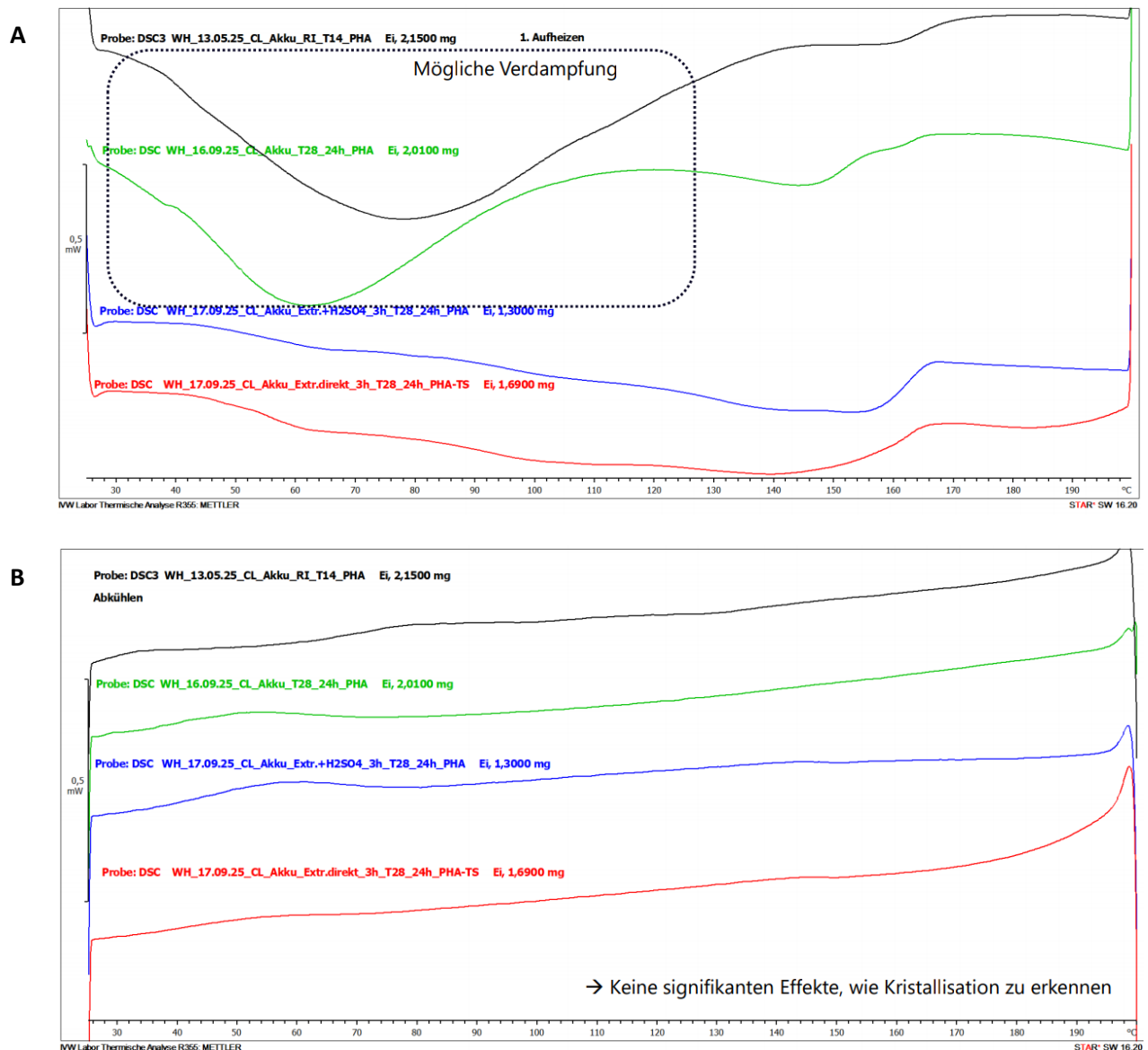


Abbildung 24: A: Ergebnisse der DSC-Analyse in der ersten Aufheizkurve. B: Ergebnisse der DSC-Analyse beim ersten Abkühlen. Schwarz: Probe 1, Grün: Probe 2, Blau: Probe 3, Rot: Probe 4. ©Leibniz Institut für Verbundwerkstoffe

Während des zweiten Aufheizens ist bei Probe 1 insgesamt kein ausgeprägtes und auswertbares Verhalten eines thermoplastischen Polymers erkennbar, was auf eine (teilweise) Degradation hinweisen könnte (s. Abbildung 25). Die Proben 2-4 zeigen ein für PHAs typisches Kristallisations- und Schmelzverhalten: eine Kaltkristallisation mit anschließender Schmelze, wie in Abbildung 25 erkennbar. Da diese Effekte ineinander übergehen, kann keine eindeutige Trennung dieser vorgenommen werden. Die Auswertung wurde folglich über die gesamte Fläche vorgenommen und die Werte heben sich gegenseitig auf, was bedeutet, dass der Anteil, der kristallisiert auch wieder schmilzt. Da in diesem Fall ein fließender Übergang zwischen der Kristallisation und Schmelze vorliegt,

ergibt sich für die Verarbeitung ein sehr kleines Prozessfenster, welches durch eine gezielte Additivierung verbessert werden kann.

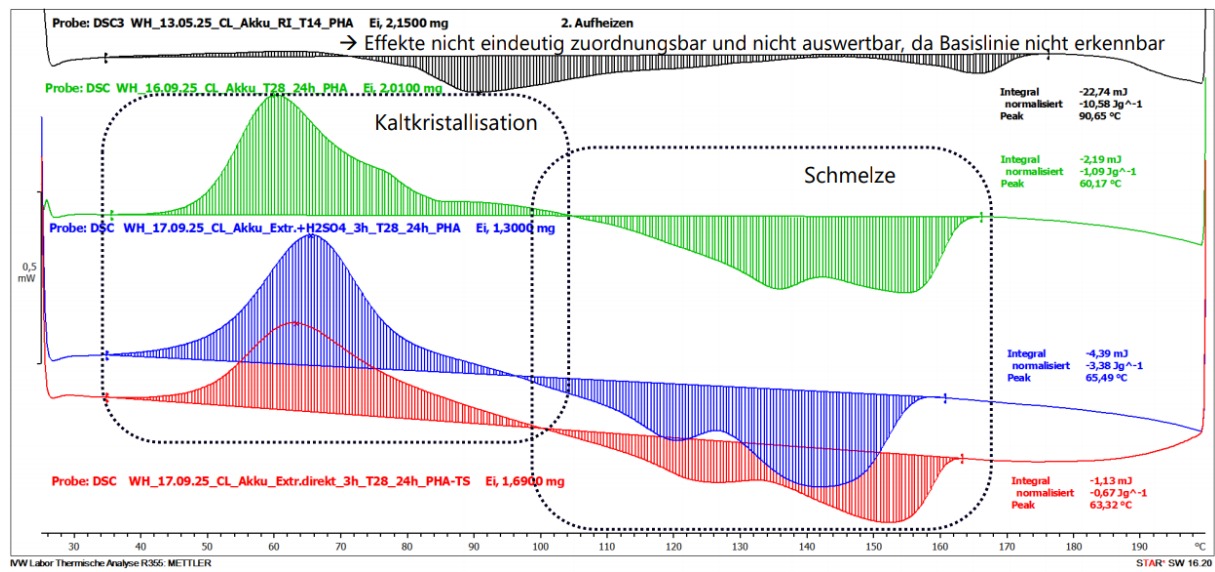


Abbildung 25: Ergebnis der DSC-Analyse in der zweiten Aufheizkurve. Schwarz: Probe 1, Grün: Probe 2, Blau: Probe 3, Rot: Probe 4. ©Leibniz Institut für Verbundwerkstoffe

5 Fazit

In diesem Projekt sollte der Prozess der PHA-Produktion mittels Mischbiozönose unter Nutzung von Brauereiabwasser in verschiedenen Aspekten tiefergehend untersucht werden. So erfolgte im ersten Arbeitsschritt die Untersuchung verschiedener Strategien zur Erhöhung des Feststoffgehalts innerhalb des Reaktors. Im zweiten Arbeitsschritt erfolgte die Entwicklung eines (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktionsprozesses, bevor im dritten Arbeitsschritt ein Upscaling des Prozesses in den Pilotmaßstab erfolgte. Darüber hinaus wurde das PHA aus ausgewählten Proben extrahiert und gemeinsam mit PHA-reicher Biomasse auf die thermischen Eigenschaften mittels DSC untersucht. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die gewonnenen Erkenntnisse.

Arbeitsschritt 1 – Erhöhung des Feststoffgehaltes

Im ersten Arbeitsschritt wurde eine Erhöhung des Feststoffgehalts mittels zwei verschiedener Strategien untersucht. Während in der ersten Strategie CaCO_3 als Zuschlagsstoff in der Selektion zugegeben wurde, untersuchte die zweite Strategie eine Entkopplung der Nährstoffzugabe vom Substrat.

Die Zugabe von CaCO_3 zeigte insgesamt uneinheitliche Ergebnisse. Nach sieben Tagen wiesen die Ansätze mit und ohne CaCO_3 vergleichbare PHA-Gehalte von etwa 36 % oTS auf, jedoch lagen die PHA-Konzentrationen in den Reaktoren mit CaCO_3 aufgrund höherer Feststoffkonzentrationen deutlich höher. Dies deutet darauf hin, dass die Calciumzugabe die Biomassebildung begünstigt. Nach 14 Tagen erzielten die Ansätze ohne CaCO_3 jedoch höhere PHA-Gehalte, sodass trotz weiterhin erhöhter Feststoffkonzentrationen keine höheren PHA-Konzentrationen mehr erreicht wurden. Insgesamt konnte durch die CaCO_3 -Zugabe daher keine eindeutige Verbesserung der PHA-Anreicherung nachgewiesen werden, wohl aber ein Beitrag zur Stabilisierung des Feststoffgehaltes.

Im zweiten Teil des Versuchsblocks wurde die Entkopplung der Substrat- und Nährstoffzugabe untersucht, um den Feststoffgehalt der PHA-bildenden Mikroorganismen zu stabilisieren. In einer ersten Versuchsreihe wurde vor jedem Abzug eine Sedimentationsphase durchgeführt, wodurch sich das Schlammalter erhöhte. Zwar sank der TS-Gehalt zunächst deutlich ab, stabilisierte sich anschließend jedoch bei etwa 2,2 g TS L⁻¹. Der Anteil organischer Trockensubstanz blieb jedoch mit 76 % an Tag 7 zunächst vergleichsweise niedrig, da anorganische Bestandteile aufgrund der Sedimentation und des damit verbundenen höheren Schlammalters langsamer ausgetragen wurden. Dennoch zeigte sich eine erfolgreiche Selektion mit einem Anstieg des PHA-Gehalts von 23 % oTS auf

etwa 46 % oTS innerhalb der ersten Woche. Auch nach 14 Tagen blieben hohe PHA-Gehalte erhalten, wenngleich stärkere Schwankungen zwischen den Reaktoren beobachtet wurden. In einer zweiten Versuchsreihe wurde nur vor jedem zweiten Abzug sedimentiert, sodass ein Schlammalter von 4 Tagen erreicht wurde. Dabei nahm der TS-Gehalt über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich ab, während der Anteil organischer Trockensubstanz bis auf >90 % anstieg. Parallel dazu erhöhte sich das PHA-Akkumulationspotenzial kontinuierlich von anfänglich ca. 12 % oTS auf maximal 56,5 % oTS nach 28 Tagen. Die Zusammensetzung der gebildeten Copolymere entsprach dabei weitgehend den theoretisch erwarteten Anteilen von HB und HV.

Insgesamt erwies sich die entkoppelte Nährstoffzugabe als geeignete Selektionsstrategie, da in beiden Versuchsreihen zuverlässig PHA-Gehalte von über 40 % oTS und hohe Raumausbeuten zwischen 356-594 mg PHA L⁻¹ erreicht wurden. Zudem zeigte sich, dass längere Betriebszeiten zu höheren PHA-Gehalten führten, was jedoch auch an einer Zunahme der Schlammbelastung aufgrund des sinkenden Feststoffgehalts liegen kann. Für die praktische Umsetzung erscheint insbesondere die Betriebsweise mit einem Schlammalter von 4 Tagen geeignet, da hierbei ein regelmäßiger Schlammabzug aus dem voll durchmischten Reaktor erfolgt, der direkt für die PHA-Produktion genutzt werden kann.

Arbeitsschritt 2 – Entwicklung einer (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion

Im Rahmen des Projekts wurde ein Verfahren zur (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion im Labormaßstab entwickelt. Dabei sollte untersucht werden, wie sich die Verkürzung der Akkumulationszeit von 24 auf 6 Stunden auf die PHA-Produktion auswirkt. Eine erfolgreiche Umsetzung erlaubt eine PHA-Produktion mit der Biomasse aus jedem zweiten Zyklus, die zur Einhaltung des Schlammalters abgezogen wird.

Zur Bewertung geeigneter Betriebsbedingungen wurden Schlammalter von 2 und 4 Tagen mit synthetischem Substrat verglichen. In beiden Fällen nahm die Feststoffkonzentration zunächst deutlich ab. Beim Schlammalter von 2 Tagen erfolgte dies schneller, wodurch zwar höhere spezifische PHA-Gehalte erzielt wurden (bis 45 % oTS, maximal 57 % oTS in Reaktor A2), jedoch bei geringerer Biomassekonzentration und damit scheinbar geringerer volumetrischer Produktivität. Das Schlammalter von 4 Tagen zeigte geringere maximale PHA-Gehalte (bis 32,8 % oTS, maximal 47,4 % oTS in Reaktor A2), jedoch eine stabilere Biomasse und ein konstanteres Speicherverhalten. Im Vergleich erzielte die Versuchsreihe mit einem Schlammalter von 2 d höhere Raumausbeuten, mit einem Maximum von $148,9 \pm 29,7$ mg PHA L⁻¹ an Tag 21, welches dennoch deutlich hinter den zuvor

erzielten Raumaussbeuten mit realem Substrat liegt. Das gebildete PHA bestand in beiden Versuchsreihen aus dem Copolymer PHBV mit einem Verhältnis von etwa 75 % HB zu 25 % HV und entsprach damit weitgehend der theoretischen Zusammensetzung.

In Zusammenhang mit den zuvor erzielten Raumaussbeuten mit realem Substrat bei einem Schlammalter von 4 Tagen und der tendenziell stabileren Biomassekonzentration wurde dieses Schlammalter trotz geringerer spezifischer PHA-Gehalte für die weiteren Versuche zum semi-kontinuierlichen Betrieb gewählt

Ein Proof of Concept mit realem Brauereiabwasser zeigte insgesamt bessere Ergebnisse als mit synthetischem Substrat, was mit der Adaption der initialen Biozönose an das Brauereiabwasser begründet sein kann (Steinmetz et al. 2024). Der Feststoffgehalt nahm zwar zunächst ab, blieb jedoch am Versuchsende im Vergleich zu den mit synthetischem Substrat erzielten Ergebnissen deutlich höher, vermutlich durch eingetragene Schwebstoffe, die zusätzlich als Nährstoffquelle dienten und somit das Biomassewachstum steigerten. Gleichzeitig verschob sich die Zusammensetzung der Feststoffanteile zunehmend hin zu organischer Biomasse. Das PHA-Akkumulationspotenzial stieg stark an und erreichte mit bis zu ca. 61 % oTS höhere Werte als beim synthetischen Substrat. Später sanken die PHA-Gehalte aufgrund steigender Stickstoffkonzentrationen und verstärkter Biomassebildung. Die PHA-Raumaussbeute erreichte innerhalb des Versuchs ein Maximum von $487,9 \pm 7,1 \text{ mg PHA L}^{-1}$, was trotz einer kürzeren Akkumulationszeit von 6 h der zuvor erzielten Raumaussbeute bei entkoppelter Nährstoffzugabe und einer Akkumulationszeit von 24 h ($571\text{-}594 \text{ mg PHA L}^{-1}$) nahekommt. Zudem führte das reale Substrat zur Bildung komplexerer Copolymere mit erhöhtem HV-Anteil und geringem HH-Anteil. Insgesamt deutet dies darauf hin, dass reales Substrat aufgrund zusätzlicher organischer Belastung und der bestehenden Anpassung der Mikroorganismen besser für die PHA-Produktion geeignet sein kann.

In einem Langzeitversuch wurde einer der Reaktoren über den Zeitraum der drei Versuchsreihen (VR I: SRT= 2 d, synth. Substrat; VR II: SRT= 4 d, synth. Substrat; VR III: SRT= 4 d, reales Substrat) durchgehend betrieben. Der kontinuierlich betriebene Reaktor zeigte trotz wechselnder Betriebsbedingungen und verschiedener Störungen (u. a. Algenbewuchs, Schimmelbildung und technische Defekte) insgesamt eine hohe Prozessrobustheit. Die Feststoffkonzentration sank zu Beginn aufgrund des niedrigen Schlammalters stark ab, stabilisierte sich jedoch bei einer Erhöhung des Schlammalters teilweise wieder. Prozessstörungen beeinflussten zeitweise die Biomassezusammensetzung und führten zu Veränderungen der Flockenstruktur sowie vermutlich zur

Bildung extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS), langfristige Effekte auf die Raumausbeute konnten jedoch nicht beobachtet werden. Die höchsten PHA-Gehalte wurden bei Einsatz realen Substrats erreicht, mit einem Maximum von 64,2 % oTS und einer Raumausbeute von $359,4 \pm 9,1 \text{ mg PHA L}^{-1}$. Während in den ersten beiden Versuchsreihen überwiegend PHBV-Copolymere gebildet wurden, trat bei realem Substrat zusätzlich ein geringer HH-Anteil sowie ein erhöhter HV-Anteil auf. Insgesamt zeigte der Langzeitversuch, dass sich trotz Störungen erneut ein stabiles Feast-Famine-Regime mit hoher PHA-Speicherfähigkeit etablieren konnte. Gleichzeitig wurde eine hohe Sensitivität der Biozönose gegenüber Veränderungen der Biomasse- und Substratbedingungen deutlich.

Arbeitsschritt 3 – Upscaling in den Pilotmaßstab

Im Pilotmaßstab wurde die im Labor entwickelte Strategie zur (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion mit zwei realen Substraten aus versäuertem Brauereiabwasser getestet. Trotz ähnlicher Betriebsbedingungen wie im Labormaßstab kam es in beiden Versuchsreihen zu einem stärkeren Rückgang der Feststoffkonzentration, insbesondere durch Biofilmbildung und möglichen Feststoffaustrag, insbesondere bei Versuchsreihe II. Dennoch konnten hohe PHA-Gehalte erzielt werden: VR I erreichte stabile Werte von ca. 44–51 % oTS, VR II sogar 52–63 % oTS. Die höheren Werte in VR II sind wahrscheinlich in der geringeren Biomassekonzentration und der daraus resultierenden höheren Schlammbelastung begründet. Während Versuchsreihe I Raumausbeuten in einem vergleichbaren Bereich zu den im Labor erzielten Ergebnissen mit $271\text{--}393 \text{ mg PHA L}^{-1}$ erzielt, bricht die Produktivität in Versuchsreihe II nach einer maximalen Raumausbeute an Tag 7 mit $325,1 \pm 34,2 \text{ mg PHA L}^{-1}$ deutlich ein und erreicht an Tag 28 eine geringere Raumausbeute nach 8 h als die initiale Biomasse. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, wie wichtig die Feststoffkontrolle innerhalb des PHA-Produktionsprozesses ist - trotz der hohen PHA-Gehalte an Tag 28 in VR II wird eine geringere PHA-Ausbeute erzielt als mit der unselektierten Mischbiozönose an Tag 0. Insgesamt entsprach die Polymerzusammensetzung weitgehend den theoretisch erwarteten HB/HV-Verhältnissen.

Ein 24-stündiger Akkumulationsversuch am Ende der VR II zeigte, dass längere Akkumulationszeiten den PHA-Gehalt deutlich steigern können (bis 76,6 % oTS), allerdings nur durch einen erheblich höheren Substratverbrauch. Gleichzeitig trat neben der PHA-Synthese auch verstärkt Zellwachstum auf, bedingt durch Nährstoffüberschüsse.

Das Upscaling verdeutlicht, dass neben Schlammalter und Substratdosierung auch Faktoren wie Biofilmbildung, Feststoffrückhalt und präzise Nährstoffdosierung entscheidend für einen stabilen und wirtschaftlichen Prozess sind. Zukünftig sollten insbesondere eine Vermeidung der Biofilmbildung, eines Feststoffaustrags aus dem Selektionsreaktor sowie eine präzisere Nährstoffdosierung vorgenommen werden. Zudem sollte geprüft werden, welche Akkumulationsstrategie wirtschaftlicher ist, da höhere PHA-Gehalte zwar die Extraktion erleichtern (Pagliano et al. 2021; Samorì et al. 2015), jedoch einen deutlich höheren Substratverbrauch erfordern.

Thermische Eigenschaften der synthetisierten Copolymere

Insgesamt wurden vier Proben zur Untersuchung des thermischen Verhaltens analysiert: zwei Proben PHA-reicher Biomasse sowie zwei Proben extrahierter PHAs. Dabei unterschied sich Probe 4 von den übrigen Proben, da die Extraktion direkt mit NaClO erfolgte und keine vorherige Stabilisierung mit H_2SO_4 durchgeführt wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Extraktion mit vorheriger H_2SO_4 -Stabilisierung (Probe 3) den höchsten PHA-Gehalt erreichte (92,6 %), während die direkte NaClO-Extraktion (Probe 4) geringere Werte aufwies (85,0 %). Beide Extraktionsverfahren führten jedoch zu einer Erhöhung des PHA-Gehalts im Vergleich zur Ausgangsbiomasse. Zudem zeigte Probe 4 eine etwas stärkere Abweichung in der HB/HV-Zusammensetzung. Thermisch wiesen die Proben 2–4 ein typisches Verhalten von PHAs mit Kaltkristallisation und anschließender Schmelze auf, während Probe 1 kein eindeutiges thermoplastisches Verhalten zeigte, was auf eine mögliche teilweise Degradation hinweist. Während des ersten Abkühlens konnte bei keiner Probe eine klare Kristallisation beobachtet werden.

6 Danksagung

Das vorliegende Projekt wurde durch die Unterstützung verschiedener Personen und Institutionen ermöglicht. Ein besonderer Dank gilt der Willy-Hager-Stiftung für die Förderung und die damit verbundene Möglichkeit der Umsetzung dieses Projektes.

Darüber hinaus danken wir Patricia de la Cruz für die Unterstützung bei der Durchführung der Laborversuche im Rahmen ihrer Masterarbeit „Entwicklung einer (semi)kontinuierlichen PHA-Produktion aus Brauereiabwasser“. Außerdem bedanken wir uns bei der tatkräftigen Unterstützung bei der Probenvorbehandlung und Analytik bei unserem Laborpersonal Anna Schlegel, Jens Just sowie unseren Teilnehmenden am freiwilligen ökologischen Jahr Juliane Braun und Pauline Wagner. Ebenso danken wir unseren hilfswissenschaftlichen Mitarbeitenden, die das Laborpersonal tatkräftig unterstützt haben.

7 Literatur

- Braunegg, G.; Sonnleitner, B.; Lafferty, R. M. (1978): A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. In: *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6 (1), S. 29–37. <https://doi.org/10.1007/BF00500854>.
- Carvalho, G.; Pedras, I.; Karst, S. M.; Oliveira, C. S. S.; Duque, A. F.; Nielsen, P. H.; Reis, M. A. M. (2018): Functional redundancy ensures performance robustness in 3-stage PHA-producing mixed cultures under variable feed operation. In: *New biotechnology*, 40 (Pt B), S. 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.08.007>.
- Chen, Z.; Huang, L.; Wen, Q.; Zhang, H.; Guo, Z. (2017): Effects of sludge retention time, carbon and initial biomass concentrations on selection process: From activated sludge to polyhydroxyalkanoate accumulating cultures. In: *Journal of environmental sciences (China)*, 52, S. 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.03.014>.
- Chiba, S.; Saito, H.; Fletcher, R.; Yogi, T.; Kayo, M.; Miyagi, S.; Ogido, M.; Fujikura, K. (2018): Human footprint in the abyss: 30 year records of deep-sea plastic debris. In: *Marine Policy*, 96, S. 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2018.03.022>.
- Cózar, A.; Martí, E.; Duarte, C. M.; García-de-Lomas, J.; van Seville, E.; Ballatore, T. J.; Eguíluz, V. M.; González-Gordillo, J. I.; Pedrotti, M. L.; Echevarría, F.; Troublè R.; Irigoien, X. (2017): The Arctic Ocean as a dead end for floating plastics in the North Atlantic branch of the Thermohaline Circulation. In: *Sci. Adv.*, 3 (e1600582). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600582>.
- Estévez-Alonso, Á.; Arias-Buendía, M.; Pei, R.; van Veelen, H. P. J.; van Loosdrecht, M. C. M.; Kleerebezem, R.; Werker, A. (2022): Calcium enhances polyhydroxyalkanoate production and promotes selective growth of the polyhydroxyalkanoate-storing biomass in municipal activated sludge. In: *Water research*, 226, S. 119259. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119259>.
- Estévez-Alonso, Á.; Pei, R.; van Loosdrecht, M. C. M.; Kleerebezem, R.; Werker, A. (2021): Scaling-up microbial community-based polyhydroxyalkanoate production: status and challenges. In: *Bioresource technology*, 327, S. 124790. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124790>.
- European Bioplastics: *European Bioplastics Market Data Report 2025*, 2025, S. 1–3.
- European Bioplastics e.V. (2017): What are bioplastics? Online verfügbar unter <http://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>, zuletzt geprüft am 29.06.2017.
- Hahn, T.; Alzate, M. O.; Leonhardt, S.; Tamang, P.; Zibek, S. (2024): Current trends in medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: Microbial production, purification, and characterization. In: *Engineering in life sciences*, 24 (6), S. 2300211. <https://doi.org/10.1002/elsc.202300211>.
- Isobe, A.; Uchiyama-Matsumoto, K.; Uchida, K.; Tokai, T. (2017): Microplastics in the Southern Ocean. In: *Marine pollution bulletin*, 114 (1), S. 623–626. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.037>.

- Kaur, G.; Roy, I. (2015): Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates. In: Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 29 (2), S. 157–172.
<https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2255>.
- Khatami, K.; Perez-Zabaleta, M.; Owusu-Agyeman, I.; Cetecioglu, Z. (2021): Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? In: Waste management (New York, N.Y.), 119, S. 374–388. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.008>.
- Kleerebezem, R.; van Loosdrecht, M. (2007): Mixed culture biotechnology for bioenergy production. In: Current opinion in biotechnology, 18 (3), S. 207–212.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.05.001>.
- Koller, M.; Maršálek, L.; Sousa Dias, M. M. de; Braunegg, G. (2017): Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. In: New biotechnology, 37 (Pt A), S. 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>.
- Kourmentza, C.; Plácido, J.; Venetsaneas, N.; Burniol-Figols, A.; Varrone, C.; Gavala, H. N.; Reis, M. A. M. (2017): Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. In: Bioengineering (Basel, Switzerland), 4 (2).
<https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>.
- La Cruz, P. de (2025): Entwicklung einer (semi-)kontinuierlichen PHA-Produktion aus Brauereiabwasser. Masterarbeit. RPTU Kaiserslautern Landau.
- Laumeyer, C.; Andrade Leal, M.; Zimmer, J.; Best, J. de; Steinmetz, H. (2023): Technical report on pilot scale testing of PHA production and extraction from residual streams, project report, Wider business Opportunities for raw materials from Wastewater - Capitalisation, Interreg North-West-Europe.
- Laumeyer, C. M.; Steinmetz, H. (2025a): Producing Biopolymers from Brewery Wastewater – Enhancing the Yield by Addition of Calcium Carbonate: Proceedings of the 7th IWA International Conference on Ecotechnologies for Wastewater Treatment. 7th IWA International Conference on Ecotechnologies for Wastewater Treatment (ecoSTP2025). In: 7th IWA International Conference on Ecotechnologies for Wastewater Treatment (Hrsg.): Proceedings of the 7th IWA International Conference on Ecotechnologies for Wastewater Treatment. Sweden.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.17460573>.
- Laumeyer, C. M.; Zimmer, J.; Steinmetz, H. (2025b): From fruit juice wastewater to biopolymer – How the mixed microbial culture and PHA content develop over time. In: Chemical Engineering Journal, 503, S. 158314. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.158314>.
- Matos, M.; Cruz, R. A. P.; Cardoso, P.; Silva, F.; Freitas, E. B.; Carvalho, G.; Reis, M. A. M. (2021): Combined Strategies to Boost Polyhydroxyalkanoate Production from Fruit Waste in a Three-Stage Pilot Plant. In: ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 9 (24), S. 8270–8279.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c02432>.
- Morgan-Sagastume, F.; Valentino, F.; Hjort, M.; Zanaroli, G.; Majone, M.; Werker, A. (2019): Acclimation Process for Enhancing Polyhydroxyalkanoate Accumulation in Activated-Sludge Biomass. In: Waste and Biomass Valorization, 10 (4), S. 1065–1082.
<https://doi.org/10.1007/s12649-017-0122-8>.

- Nguyenhuynh, T.; Yoon, L. W.; Chow, Y. H.; Chua, A. S. M. (2021): An insight into enrichment strategies for mixed culture in polyhydroxyalkanoate production: feedstocks, operating conditions and inherent challenges. In: *Chemical Engineering Journal*, 420, S. 130488. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130488>.
- Obbard, R. W.; Sadri, S.; Wong, Y. Q.; Khitun, A. A.; Baker, I.; Thompson, R. C. (2014): Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. In: *Earth's Future*, 2 (6), S. 315–320. <https://doi.org/10.1002/2014EF000240>.
- Pagliano, G.; Galletti, P.; Samorì, C.; Zaghini, A.; Torri, C. (2021): Recovery of Polyhydroxyalkanoates From Single and Mixed Microbial Cultures: A Review. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, S. 624021. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.624021>.
- Park, H.; He, H.; Yan, X.; Liu, X.; Scrutton, N. S.; Chen, G.-Q. (2024): PHA is not just a bioplastic! In: *Biotechnology Advances*, 71, S. 108320. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108320>.
- Pittmann, T.; Steinmetz, H. (2013a): Influence of operating conditions for volatile fatty acids enrichment as a first step for polyhydroxyalkanoate production on a municipal waste water treatment plant. In: *Bioresource technology*, 148, S. 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.148>.
- Pittmann, T.; Steinmetz, H. (2013b): Produktion von Bioplastik auf kommunalen Kläranlagen. In: *Wasser und Abfall*, (05/13), S. 37–41.
- Pittmann, T.; Steinmetz, H. (2014): Polyhydroxyalkanoate production as a side stream process on a municipal waste water treatment plant. In: *Bioresource technology*, 167, S. 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.037>.
- Pittmann, T.; Steinmetz, H. (2017): Polyhydroxyalkanoate Production on Waste Water Treatment Plants: Process Scheme, Operating Conditions and Potential Analysis for German and European Municipal Waste Water Treatment Plants. In: *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 4 (2). <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020054>.
- Reis, M.; Albuquerque, M.; Villano, M.; Majone, M. (2011): 6.51 - Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoate Production from Agro-Industrial Surplus/Wastes as Feedstocks. In: Moo-Young, M. (Hrsg.): *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Burlington: Academic Press, S. 669–683. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00464-5>.
- Sabapathy, P. C.; Devaraj, S.; Meixner, K.; Anburajan, P.; Kathirvel, P.; Ravikumar, Y.; Zbed, H. M.; Qi, X. (2020): Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production - A review. In: *Bioresource technology*, 306, S. 123132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>.
- Samorì, C.; Abbondanzi, F.; Galletti, P.; Giorgini, L.; Mazzocchetti, L.; Torri, C.; Tagliavini, E. (2015): Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: Impact on polymer quality and recovery. In: *Bioresource technology*, 189, S. 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.062>.
- Sharma, R.; Ray, A. R. (1995): Polyhydroxybutyrate, Its Copolymers and Blends. In: *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 35 (2), S. 327–359. <https://doi.org/10.1080/15321799508009640>.

- Smolders, G. J.; van der Meij, J.; van Loosdrecht, M. C.; Heijnen, J. J. (1994): Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. In: *Biotechnology and bioengineering*, 43 (6), S. 461–470. <https://doi.org/10.1002/bit.260430605>.
- Steinbüchel, A. (1991): Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom, D. (Hrsg.): *Biomaterials*. London: Palgrave Macmillan UK, S. 123–213. https://doi.org/10.1007/978-1-349-11167-1_3.
- Steinmetz, H.; Uhrig, T.; Zimmer, J. (2022): Abschlussbericht an die Willy-Hager-Stiftung zum Projekt „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen - Einflussfaktoren auf Teilprozesse und Entwicklung von Mess-Steuer- und Regelungsstrategien zur Schließung der Verfahrenskette“. Technische Universität Kaiserslautern.
- Steinmetz, H.; Zimmer, J. (2024): Abschlussbericht an die Willy-Hager-Stiftung zum Projekt „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen Teil II - Anpassung von Prozessbedingungen und Adaption der Biozönose“,
- STOWA (2017): PHARIO. Stepping stone to a sustainable value chain for PHA bioplastic using municipal activated sludge. Amersfoort, Niederlande.
- Tamis, J.; Mulders, M.; Dijkman, H.; Rozendal, R.; van Loosdrecht, M. C. M., Kleerebezem, R. (2018): Pilot-Scale Polyhydroxyalkanoate Production from Paper Mill Wastewater: Process Characteristics and Identification of Bottlenecks for Full-Scale Implementation. In: *Journal of Environmental Engineering*, 144 (10), Artikel-Nr. 04018107. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001444](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001444).
- Tekman, M. B.; Krumpfen, T.; Bergmann, M. (2017): Marine litter on deep Arctic seafloor continues to increase and spreads to the North at the HAUSGARTEN observatory. In: *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 120, S. 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2016.12.011>.
- Uddin, M. K.; Novembre, L.; Greco, A.; Sannino, A. (2024): Polyhydroxyalkanoates, A prospective solution in the textile industry - A review. In: *Polymer Degradation and Stability*, 219, S. 110619. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2023.110619>.
- Uhrig, T. (2023): Eignung von kommunalen und industriellen Abwasserströmen für die PHA-Produktion und Ansätze zum Up-Scaling des Prozesses, Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau (Hrsg.).
- Uhrig, T.; Zimmer, J.; Bornemann, C.; Steinmetz, H. (2022): Report on optimised PHA production layout, project report, Wider business Opportunities for raw materials from Wastewater, Interreg North-West-Europe.
- Uhrig, T.; Zimmer, J.; Rankenhohn, F.; Steinmetz, H. (2023): Biopolymerproduktion aus Abwasserströmen für eine kreislaforientierte Siedlungswasserwirtschaft. In: Porth, M.; Schüttrumpf, H.; Ostermann, U. (Hrsg.): *Wasser, Energie und Umwelt. Aktuelle Beiträge aus der Zeitschrift Wasser und Abfall III*. Wiesbaden: Springer Vieweg, S. 317–326. Online verfügbar unter https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-658-42657-6_33.
- Valentino, F.; Moretto, G.; Lorini, L.; Bolzonella, D.; Pavan, P.; Majone, M. (2019): Pilot-Scale Polyhydroxyalkanoate Production from Combined Treatment of Organic Fraction of Municipal Solid Waste and Sewage Sludge. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58 (27), S. 12149–12158. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b01831>.

- Villano, M.; Valentino, F.; Barbetta, A.; Martino, L.; Scandola, M.; Majone, M. (2014): Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: from culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. In: *New biotechnology*, 31 (4), S. 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.08.001>.
- Werker, A.; Lorini, L.; Villano, M.; Valentino, F.; Majone, M. (2022): Modelling Mixed Microbial Culture Polyhydroxyalkanoate Accumulation Bioprocess towards Novel Methods for Polymer Production Using Dilute Volatile Fatty Acid Rich Feedstocks. In: *Bioengineering*, 9 (3), S. 125. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9030125>.
- Zimmer, J. (2025): Dynamik der mikrobiellen Mischbiozönose und der PHA-Produktion aus Restströmen unter variierenden Betriebsstrategien, Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau (Hrsg.).