

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung

Mikrobielle Synthese von Biopolymeren aus der nachwachsenden Rohstoffquelle Weizenstroh

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum naturarum
(Dr. rer nat)

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

Esther Gasser

Geb. am 17.03.1982 in Mainz

Mainz, August 2014

Die experimentellen Arbeiten wurden von August 2010 bis Dezember 2013 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung:

23.09.2014



Teile der Arbeit wurden in folgenden Posterpräsentationen und Publikationen veröffentlicht:

Gasser, E., Ballmann, P., Dröge, S., Pfeiffer, P. & König, H. (2012) Mikrobielle Synthese von Biopolymeren aus nachwachsenden Rohstoffen. Poster P16.15 Chemie Ingenieur Technik 8/2012. ISSN 0009-286 X, S. 1312. ProceccNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 10. – 13. September 2012, Karlsruhe.

Gasser, E., Ballmann, P., Dröge, S., Pfeiffer, P. & König, H. (2013) Microbial Synthesis of Biopolymers from Renewable Resources. Poster IBP007 BIOspektrum Tagungsband der VAAM-Jahrestagung 2013. Sonderausgabe 2013, ISSN 0947-0867, S. 152-153. Jahrestagung der VAAM 2013 zusammen mit der KNVM, 10. – 13. März 2013, Bremen.

Ballmann, P., Müller, M., Gasser, E., Dröge, S. & König H. (2013) Improved pretreatment process of wheat straw with direct steam injection. Proceedings of the 21st. European Biomass Conference and Exhibition, Copenhagen 2013, pp.1003–1009, Doi: 10.5071/21stEUBCE2013-2DV.2.6. ETA-Florence Renewable Energies, Florence, Italy.

Gasser, E., Ballmann, P., Dröge, S., Bohn, J. & König, H. (2014) Microbial production of biopolymers from the renewable resource wheat straw. Journal of Applied Microbiology, doi:10.1111/jam.12581. Accepted 16 June 2014.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kunststoffe.....	1
1.1.1	Kunststoffe und ihre Bedeutung für die Gesellschaft.....	1
1.1.2	Konventionelle Herstellung von Kunststoffen	2
1.2	Plastikmüll.....	3
1.3	Bioplastik – eine umweltfreundliche Alternative.....	4
1.3.1	Definition und Einteilung.....	4
1.3.2	Biokunststofftypen	4
1.3.3	Polyhydroxyalkanoate (PHA).....	5
1.4	Poly- β -Hydroxybuttersäure (PHB).....	6
1.4.1	Eigenschaften von PHB.....	6
1.4.2	Mikrobielle Synthese von PHB	7
1.4.3	PHB-bildende Bakteriengattungen und verwendete Substrate	9
1.4.4	Anwendungsgebiete von PHAs	11
1.5	Poly lactid (PLA).....	12
1.5.1	Anwendungsgebiete von Polylactiden.....	13
1.5.2	Lactat – der Grundbaustein der Polylactidsynthese	13
1.6	Weizenstroh als Rohstoff zur Bioplastik-Produktion.....	14
1.6.1	Weizen.....	14
1.6.2	Zusammensetzung von Weizenstroh	14
1.6.2.1	Cellulose	15
1.6.2.2	Hemicellulose	16
1.6.2.3	Lignin	16
1.6.2.4	Akzessorische Inhaltsstoffe der Lignocellulose	17
1.6.3	Die Nutzung von Weizenstroh als nachwachsender Rohstoff.....	17
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Bakterienstämme	20
2.2	Nährmedien und Puffer.....	25
2.3	Chemikalien	30
2.4	Enzyme und Kits.....	32
2.5	Geräte und Hilfsmittel	32
2.6	Verbrauchsmaterialien	34

2.7	Screening nach Poly- β -Hydroxybuttersäure (PHB) bildenden Bakterien in der Stammsammlung des IMW	34
2.7.1	Kultivierung ausgewählter Organismen	36
2.7.2	Wachstumskontrolle durch Bestimmung der optischen Dichte	36
2.7.3	Probenaufarbeitung für die Zuckerbestimmung	36
2.8	Bestimmung von Zuckerkonzentrationen nach der Methode von Pfeiffer und Radler (1985)36	
2.8.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	36
2.9	Analytische Methoden zur PHB-Bestimmung	38
2.9.1	Untersuchung auf PHB-Bildung.....	38
2.9.2	Gaschromatographie (GC).....	38
2.9.3	Nachweis von Poly- β -Hydroxybuttersäure in Zellmaterial nach der Methode von Braunegg <i>et al.</i> (1978) mittels GC/FID	39
2.9.3.1	Derivate und Analyse reiner Substanzen	39
2.9.3.2	Derivatisierung der Poly- β -Hydroxybuttersäure aus Zellsuspensionen.....	41
2.9.3.3	GC/FID-System und Temperaturprogramm	41
2.9.4	Nachweis von Poly- β -Hydroxybuttersäure in Zellmaterial nach der Methode von Riis und Mai (1988) mittels GC/MS	41
2.9.4.1	Derivate und Analyse reiner Substanzen	42
2.9.4.2	Derivatisierung der Poly- β -Hydroxybuttersäure aus Zelltrockenmasse	43
2.9.4.3	GC/MS-System und Temperaturprogramm	43
2.9.4.4	Bestimmung der PHB-Konzentration	44
2.10	Umsetzung der Xylose des hemicellulosischen Hydrolysats zu PHB	44
2.10.1	Herstellung des hemicellulosischen Hydrolysats	45
2.10.2	Enttoxifizierung des hemicellulosischen Hydrolysats	46
2.10.3	Direkte PHB-Produktion mit der Xylose des hemicellulosischen Hydrolysats... 46	
2.11	Überprüfung der Identität der PHB-bildenden Isolate	48
2.11.1	DNA-Isolierung	48
2.11.2	Analyse ribosomaler Gensequenzen.....	49
2.11.3	Amplifizierung der 16S rDNA.....	49
2.11.4	Agarose-Gelelektrophorese	50
2.11.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	50
2.11.6	Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	50
2.11.7	Bestimmung der <i>Bacillus</i> -Arten mit Hilfe physiologischer Tests	51
2.12	Alternative Umsetzung der Xylose des hemicellulosischen Hydrolysats zu Lactat51	
2.13	PHB-Produktion aus der cellulosischen Reststroh-Fraktion	54

2.13.1	Aufarbeitung der cellulosischen-Fraktion	54
2.13.2	Hydrolyse der cellulosischen Fraktion durch Organismen.....	54
2.13.3	Enzymatische Hydrolyse der cellulosischen Fraktion	55
2.13.3.1	Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration.....	55
2.13.3.2	Bestimmung der optimalen Substratkonzentration.....	56
2.13.4	Vorbehandlung des cellulosischen Stroh-Hydrolysats.....	57
2.13.5	PHB-Bildung aus cellulosischem Stroh-Hydrolysat	57
2.14	Lösungsmittelfreie Abtrennversuche der PHB	57
2.14.1	Herstellung der Arbeitslösung der <i>Streptomyces</i> -Stämme.....	58
2.14.2	Kultivierung der <i>Streptomyces</i> -Stämme in Fernbachkolben	58
2.14.3	Herstellung von zellfreiem <i>Streptomyces</i> -Kulturfiltrat	58
2.14.4	Aufkonzentrierung und Dialyse der lytischen Exoenzyme mittels Vivaspin	59
2.14.5	Nachweis der lytischen Aktivität der Exoenzyme	59
2.14.6	Lyseaktivität gegen <i>Micrococcus luteus</i>	59
2.14.7	Lyseaktivität gegen PHB-Produzenten	59
2.14.8	Bestimmung des pH-Optimums der lytischen Exoenzyme	60
2.14.9	Bestimmung des Temperaturoptimums der lytischen Exoenzyme	60
2.14.10	Vorhergehende Schädigung der Zellwand von <i>Cupriavidus necator</i>	60
2.14.11	Schädigung der Zellwand durch Detergenzien bzw. Komplexbildner.....	60
2.14.12	Schädigung der Zellwand durch Ultraschallbehandlung.....	61
2.14.13	Aufreinigung der Exoenzyme von <i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40233 mittels Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC).....	61
2.14.14	Bestimmung freier 3-Hydroxybuttersäure mittels HPLC.....	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Methodenvergleich zur quantitativen Bestimmung von PHB in Zellmaterial.....	63
3.2	PHB-Bildung mit dem Substrat Xylose.....	67
3.3	PHB-Bildung mit dem Substrat Glucose	69
3.4	Produktion von PHB aus hemicellulosischem Stroh-Hydrolysat.....	73
3.4.1	Zusammensetzung des hemicellulosischen Hydrolysats nach Enttoxifizierung	73
3.5	Charakterisierung der PHB-Bildner aus der Stammsammlung des IMW	76
3.5.1	Ergebnisse des Alignements der 16S rDNA-Sequenz.....	76
3.5.2	Ergebnisse der physiologischen Tests.....	76
3.6	Direkte PHB-Produktion mit der Xylose des hemicellulosischen Hydrolysats	77
3.6.1	PHB-Bildung durch <i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165.....	77

3.6.2	PHB-Bildung durch <i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> DSM 1034	81
3.6.3	PHB-Bildung durch <i>Bacillus licheniformis</i> KHC 3	84
3.6.4	PHB-Produktion durch <i>Bacillus megaterium</i> KNaC 2	89
3.7	Direkte Produktion von Lactat aus hemicellulosischem Hydrolysat	93
3.8	Produktion von PHB aus der cellulosischen Reststroh-Fraktion	106
3.8.1	Reststrohydrolyse durch Mikroorganismen.....	106
3.8.2	Enzymatische Hydrolyse der cellulosischen Reststroh-Fraktion.....	107
3.8.3	Optimale Volumina der eingesetzten Enzymlösungen	110
3.8.4	Optimale Substratkonzentration zur PHB-Bildung aus Glucose	110
3.8.5	PHB-Bildung aus cellulosischem Reststroh-Hydrolysat.....	111
3.9	Lösungsmittelfreie Abtrennung der PHB.....	114
3.9.1	Optimale Parameter zur Zellyse	114
3.9.2	Lyseaktivität gegen PHB-Produzenten	114
3.9.3	Zellyse von <i>Cupriavidus necator</i> DSM 428 durch das lytische Kulturkonzentrat von <i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40233 nach vorhergehender Schädigung der Zellwand	115
3.9.4	Zellyse durch gereinigte Enzymlösung von <i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40233	116
4	Diskussion	120
4.1	Optimale Quantifizierungs-Methode von PHB in Zellmaterial.....	120
4.2	Mikrobielles Spektrum zur PHB-Produktion aus den Einfachzuckern Xylose und Glucose	122
4.3	Identifizierung der hauseigenen <i>Bacillus</i> -Stämme	123
4.4	PHB aus der hemicellulosischen Strohfraktion	124
4.5	Alternative Umsetzung der hemicellulosischen Fraktion zu Lactat	129
4.6	PHB aus der cellulosischen Reststroh-Fraktion	129
4.7	Abtrennung von Poly- β -Hydroxybuttersäure durch zellytische Enzyme aus <i>Streptomyceten</i>	135
5	Zusammenfassung.....	137
6	Ausblick.....	138
7	Literaturverzeichnis	139
8	Abkürzungsverzeichnis	153

1 Einleitung

1.1 Kunststoffe

1.1.1 Kunststoffe und ihre Bedeutung für die Gesellschaft

Kunststoffe werden auch Plaste oder Polymerwerkstoffe genannt. Es sind Werkstoffe, deren Hauptbestandteile synthetische oder durch Umwandlung von Naturstoffen hergestellte, meist organische Polymere sind. Synthetische Polymere lassen sich durch Polymerisation, Polykondensation oder Polyaddition aus einfachen Molekülen wie Ethylen, Propylen, Styrol, Vinylchlorid, Caprolactam oder Isocyanaten aufbauen. Die molaren Massen liegen im Allgemeinen zwischen 10.000 und 1 Mio. g/mol. Je nachdem, ob die bei der Polyreaktion entstehenden Makromoleküle aus gleichartigen oder unterschiedlichen Struktureinheiten aufgebaut sind, spricht man von Homopolymeren oder Copolymeren (Brockhaus 1990).

Die ersten „Kunststoffe“ waren natürliche Produkte wie Bernstein, Schildplatt oder Horn. Diese Materialien verhielten sich ähnlich wie die produzierten Kunststoffe und wurden oftmals zu ähnlichen Zwecken verwendet. So wurde Horn, welches durch Erhitzen durchsichtig und hellgelb wird, in der Mitte des 18. Jahrhunderts als Glasersatz verwendet. Billardkugeln bestanden damals aus Elfenbein. Um den Bedarf zu decken wurden gegen Ende des 19. Jahrhunderts jährlich 12 000 Elefanten getötet. Gerade diese Tatsache veranlasste die Hersteller von Billardkugeln nach einer Alternative zu suchen. Mit Hilfe eines Preisausschreibens wurde demjenigen eine hohe Belohnung versprochen der einen Ersatz für Elfenbein erfand. 1868 war John Wesley Hyatt erfolgreich. Er erfand ein Verfahren zur Herstellung einer Nitrocellulosekomposition. So wurde Zelluloid erfunden und im Jahre 1870 patentiert. Elfenbein wurde nicht nur im Billardspiel ersetzt, auch Schmuck und Spielzeug wurden nun aus dem neuen Werkstoff produziert. Später wurde Zelluloid jedoch das Trägermaterial für eine kulturelle Revolution. „Auf Zelluloid gebannt“ exportierten die Traumfabriken in Berlin oder Hollywood die neue Form der Unterhaltung, den Film, in alle Welt. Damit war schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt bewiesen, dass Kunststoffe weit mehr können, als nur andere Stoffe zu ersetzen oder nachzuahmen.

Kunststoffe spielen in vielen Bereichen des täglichen Lebens eine bedeutende Rolle. Im Bauwesen (Fensterprofile, Dachbeschichtungen, Abwasserrohre, Wärme- und Schallsisolierungen), auf dem Verpackungssektor (Folien, Flaschen, Kanister), in der Elektroindustrie (Kabelisolierungen, Leiterplatten), Fahrzeugindustrie (Stoßfänger, Armaturenbretter, Batteriekästen), in der chemischen Industrie (Rohrleitungen, Apparate) sowie bei Konsumwaren (Möbel, Büroartikel, Haushaltsgeräte), in der Medizin (Einwegspritzen, Implantate) und nicht zu vergessen, die moderne Unterhaltungselektronik

(Smartphones, Tablets, Note- und Netbooks, TV, PC, usw...). Kunststoffe zeigen in all diesen Bereichen bessere Eigenschaften als konkurrierende Produkte. Sie sind nassfester als Papier, unzerbrechlicher als Glas und nichtrostend im Vergleich zu Stahl. Sie können mit einem geringeren Energieaufwand hergestellt werden (Brockhaus 1990).

Im Jahr 2012 wurden in Europa in der Kunststoff herstellenden Industrie 86,7 Milliarden Euro umgesetzt. Die Anzahl der Angestellten betrug allein in der Produktion 138600 (www.eurostat.com). Die europäische Plastikproduktion lag im Jahr 2010 bei 57 Mio. t, die weltweite bei 288 Mio. t (www.plasticeurope.de). In der weltweiten Produktion liegt Europa mit 20,4 % auf Platz zwei nach China mit 23,9 %. In Europa sind Verpackungsanwendungen das größte Anwendungsgebiet für die Kunststoffindustrie und repräsentieren 39,4% der gesamten Kunststoffnachfrage. Danach folgen andere Sektoren wie Verbraucher- und Haushalt (Haushaltsgeräte, Möbel, Sport, Gesundheit und Sicherheit) mit 22,4 %, Gebäude- und Bausektor (20,3 %), Automobilindustrie (8,2 %), Elektroindustrie (5,5 %) und Landwirtschaft (4,2 %).

1.1.2 Konventionelle Herstellung von Kunststoffen

Kunststoffe werden durch petrochemische Verfahren hergestellt. Die Petrochemie ist hierbei das Bindeglied zwischen der Erdölverarbeitung und der chemischen Industrie. Primärprodukte der Petrochemie sind vor allem Ethylen, Propylen. Eines der Hauptsekundärprodukte sind die durch Polymerisation gewonnenen Kunststoffe wie Polyethylen oder Polypropylen.

Die Kunststoffherstellung beginnt mit der Destillation von Erdöl. Hierbei wird das Erdöl durch Verdampfung und Kondensation in verschiedenen Fraktionen mit unterschiedlichen Siedepunkten unterteilt. Eine dieser Fraktionen ist Naphta, ein wichtiges Ausgangsprodukt zur Kunststoffherstellung. Durch ein Hitzespaltungsverfahren - genannt „Cracking“- wird Naphta in kleinere Kohlenwasserstoffe wie Ethen, Propen oder Buten zerlegt. Kohlenwasserstoffmoleküle wie Ethen und Propen sind Basisbausteine der Kunststoffproduktion. Während der Polymerisation verbinden sich eine große Anzahl individueller Moleküle zu Polymerketten. Verschiedene Kunststoffe haben verschiedene Polymerkettenstrukturen, die ihre physikalischen Eigenschaften bestimmen. Es gibt zwei große Polymerfamilien: Thermoplaste und Duroplaste. Zur weiteren Verarbeitung der Kunststoffe werden Additive zugefügt. Additive bezeichnen chemische Wirkstoffe, die in geringster Beimengung die Eigenschaften eines Grundproduktes verändern und verbessern. Hierdurch werden die Materialeigenschaften auf die jeweiligen Anwendungen eingestellt und genau an chemische, elektrische oder mechanische Anforderungen angepasst (www.plasticeurope.de).

1.2 Plastikmüll

Von den 57 Mio. t Plastik, die 2012 in der EU produziert wurden endeten 25,2 Mio. t als Plastikmüll. Hiervon wurden 38,1 % als Müll deponiert, 61,9 % gelangten in die Wiederverwertung. Von den 61,9 % wurden 26,3 %, also 6,6 Mio. t, wiederverwertet, 35,6 %, also 8,9 Mio. t, wurden zur Energierückgewinnung verbrannt (www.plasticseurope.de).

Die zahlreichen Vorteile welche uns eine großtechnische Kunststoffproduktion auch bringt sind immer mit Nachteilen verbunden. Die großtechnische Massenproduktion von Kunststoffen begann vor weniger als 60 Jahren. Heute sind fast alle Artikel des täglichen Gebrauchs teilweise oder komplett aus diesen kostengünstigen und beständigen Materialien gefertigt. Kunststoffe werden hergestellt, um lange zu halten. Genau diese Eigenschaft macht sie zu einem enormen Problem für die Umwelt und ihre Bewohner. Plastikmüll hat die Oberfläche unseres Planeten verändert. Sogar weit entfernt von menschlichen Populationen sind Plastikfragmente jeder Größe zu finden. Sie sind allgegenwärtig in Böden, in Seebetten, an antarktischen Inselufern bis hin zu tropischen Meeresböden. Kunststoffe tauchen in Nestern von Seevögeln auf, werden von Einsiedlerkrebse anstatt einer Muschel getragen oder sind in den Mägen von Schildkröten zu finden. Der „Great Pacific Ocean Garbage Patch“ (GPOGP) ist ein riesiger Abfallstrudel mit sehr hohen Konzentrationen an treibendem Plastik, Chemieschlamm und anderem Schutt. In dem Strudel wurden durchschnittlich 334.721 Plastikteile pro km² gefunden, was einer Masse von 5114 g Plastikmüll pro km² entspricht (Moore *et al.* 2001). Diese Plastikpartikel werden von Meeresbewohnern aufgenommen. So füttern Meeresvögel ihren Nachwuchs mit Plastikmüll. In einem toten Albatros Küken wurden ca. 100 Plastikteile gefunden, mit denen es von seinen Eltern gefüttert worden war. Meeressäuretiere, Schildkröten und eine Reihe anderer Organismen nehmen große Plastikteile auf, inklusive Tüten und Flaschen (Laist 1997, Derraik 2002). Kleinere Partikel können von Vögeln, Fischen und Invertebraten aufgenommen werden (Thompson *et al.* 2004, van Franeker *et al.* 2005). Größere Partikel führen zu Verdauungsstörungen oder Darmverschlüssen der Meeresbewohner (Laist 1997, Derraik 2002). Mikroskopisch kleine Fragmente werden über den Darm ins Gewebe aufgenommen (Browne *et al.* 2008). Die in den Kunststoffen enthaltenen Additive werden von den Organismen absorbiert (Oehlmann *et al.* 2009, Talsness *et al.* 2009, Koch und Calafat 2009). Weichmacher wie Phthalat und bromierte Flammschutzmittel können kanzerogen wirken oder zu Störungen des Hormonhaushalts führen (Teuten *et al.* 2009).

Obwohl nur ca. 10 % des Gesamtmülls aus Plastikteilen besteht, ist Plastikmüll die dominierende Müllart in den Weltmeeren (Barnes *et al.* 2009). Sein Gehalt am Gesamtmüll beträgt zwischen 40 % und 80 % (Derraik 2002, Barnes 2005). Das meiste davon sind Verpackungsmaterialien, Tragetaschen, Schuhwerk, Feuerzeuge und andere Haushaltsartikel. Die Quellen hierfür sind zahlreich. So wurde

allein 1975 durch die weltweite Fischereiflotte 135400 t Fischereibedarf aus Plastik und 23600 t Verpackungsmaterial im Meer entsorgt (Cawthorn 1989, DOC 1990). Abfall wird über Flüsse oder Abwassersysteme ins Meer transportiert oder wird einfach am Strand entsorgt (Coe und Rogers 1997). Dieser Kunststoffmüll wird durch UV-Licht, Oxidation und mechanische Kräfte langsam zu Kleinstpartikeln abgebaut (Andrady 2003), welche von Meeresorganismen aufgenommen werden.

1.3 Bioplastik – eine umweltfreundliche Alternative

1.3.1 Definition und Einteilung

Eine umweltfreundliche Alternative zur konventionellen Kunststoffherstellung bieten die Biokunststoffe. Biokunststoffe sind kunststoffanaloge Werkstoffe, die vollständig oder zu überwiegenden Anteilen aus Biopolymeren erzeugt und unter Anwendung der für Kunststoffe üblichen Verfahren modifiziert werden. Hierbei muss unterschieden werden zwischen

- a) Biologisch abbaubaren bzw. kompostierbaren Kunststoffen und
- b) Kunststoffe auf der Basis erneuerbarer Ressourcen oder von Biomasse

Kunststoffe auf Biomasse-Basis sind nicht immer auch biologisch abbaubar, und biologisch abbaubare Kunststoffe müssen nicht auf Biomasse basieren. Beide Konzepte existieren nebeneinander. Sie sollten daher separat betrachtet werden (www.brockhaus.de).

1.3.2 Biokunststofftypen

Folgende Biokunststofftypen dienen als Ausgangsprodukte für die Herstellung biologisch abbaubarer Kunststoffe:

1. Stärke und Stärkeblends

Thermoplastische Stärke (TPS) ist mit 74 % aktuell der meist verwendete Rohstoff zur Herstellung von Bioplastik. Sie besteht neben Stärke aus natürlichen Weichmachern und Plastifizierungsmitteln wie Glycerin und Sorbitol. Die wichtigsten Pflanzen, die zur Gewinnung von Stärke genutzt werden, sind aktuell Mais, Weizen und Kartoffeln. Produkte aus thermoplastischer Stärke sind kurzlebig, biologisch abbau- und kompostierbar. Moderne Biokunststoffe auf Stärkebasis sind meist Mischungen aus Stärke und biologisch abbaubaren Polymeren wie Polyester, Polyesteramiden, Polyurethan oder Polyvinylalkohol.

2. Celluloseacetat

Cellulose ist das nachwachsende Biopolymer schlechthin. Für seine Verwendung als Biokunststoff wird die Cellulose beispielsweise mit Essigsäure zu Celluloseacetat (CA) verestert. Celluloseacetat wird zu den thermoplastischen Kunststoffen gezählt und ist somit

ein entsprechend modifizierter Naturstoff, der nicht biologisch abbaubar und auch nicht kompostierbar ist. Die Produkte sind witterungsbeständig, transparent und zähelastisch.

3. Polylactid (Polymilchsäure, PLA)

Poly lactide werden biotechnologisch durch Polymerisation von Milchsäure hergestellt. Die Milchsäure wird durch Milchsäurebakterien fermentativ aus Zucker oder Stärke produziert. Sie sind langlebig und je nach Zusammensetzung schnell bis kaum biologisch abbaubar sowie eingeschränkt kompostierbar. Je nach den gewünschten Eigenschaften des Zielprodukts werden die Isomere der Milchsäure, die D- oder L- Form, eingesetzt. Polylactid gleicht den herkömmlichen thermoplastischen Massenkunststoffen nicht nur in seinen Eigenschaften, sondern lässt sich auch auf den für thermoplastische Kunststoffe entwickelten Anlagen ohne weiteres verarbeiten.

4. Polyhydroxyalkanoate → Polyhydroxybuttersäure (PHB)

Das Biopolymer Polyhydroxybuttersäure ist ein fermentativ herstellbarer Polyester mit ähnlichen Eigenschaften wie der petrochemisch hergestellte Kunststoff Polypropylen. PHB ist der einzige Bioplastik, welcher vollständig durch Mikroorganismen produziert wird. PHB kann aus einer Reihe von Substraten hergestellt werden. Vor allem aus Zuckern wie Glucose und Fructose, aus Stärke, Glycerin oder Pflanzenölen. Polyhydroxyalkanoate bilden klare Filme, haben gute mechanische Eigenschaften. Sie sind biologisch abbaubar und eingeschränkt kompostierbar (FNR 2007, FNR 2006).

1.3.3 Polyhydroxyalkanoate (PHA)

Polyhydroxyalkanoate gehören zur Familie der Biopolyester. Sie sind die einzig vollständig biologisch produzierten Biokunststoffe. Über 30 % der Bodenbakterien sind zur PHA-Bildung befähigt (Wu *et al.* 2000), aber auch Bakterien aus Belebtschlamm oder extremen Habitaten wie der Tiefsee können PHAs bilden. PHAs haben je nach Art der Struktur unterschiedliche Eigenschaften. Je nach Bakterienart und Wachstumsbedingungen können Homo- oder Copolymere hergestellt werden. Es gibt über 150 verschiedene PHA Monomere, wobei sich solche mit flexiblen thermischen und mechanischen Fähigkeiten durchgesetzt haben (He *et al.* 1999). Diese Vielfalt führte zu einer Reihe von Anwendungen wie umweltfreundliche, biologisch abbaubare Kunststoffe für die Verpackungsindustrie, Implantate oder Medikamentenkapselhüllen (Chen 2009).

1.4 Poly-β-Hydroxybuttersäure (PHB)

1.4.1 Eigenschaften von PHB

Poly-β-hydroxybuttersäure gehört zur Stoffgruppe der Polyhydroxyalkanoate. Es ist somit ein thermoplastischer Polyester. Erstmals entdeckt wurde PHB von dem französischen Mikrobiologen Maurice Lemoigne im Jahr 1925 am Pasteur-Institut, während er an *Bacillus megaterium* forschte (Lemoigne 1925, Lemoigne 1926). In Abbildung 1.1 ist die allgemeine Strukturformel von PHB dargestellt.

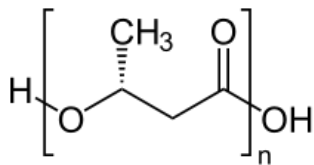


Abbildung 1.1: Allgemeine Strukturformel von Poly-β-Hydroxybuttersäure (PHB) (Neurotiker 2008).

PHB dient den Mikroorganismen als Kohlenstoffreserve bei Nährstoffmangel. PHB liegt in Zellen als Granula mit einem Durchmesser von 0,2-0,5 µm vor. Diese bestehen zu 97-98 % aus PHB, 2 % Protein und ca. 0,5 % Lipide. In den Zellen liegen die Granula amorph vor, werden sie isoliert, ändert sich ihr Zustand zu kristallin. PHB hat folgende Eigenschaften:

- a) thermoplastischer Polyester
- b) biologisch abbaubar
- c) biokompatibel, nicht toxisch
- d) unlöslich in Wasser
- e) kristallin
- f) piezoelektrisch
- g) hergestellt aus erneuerbaren Ressourcen

In Tabelle 1.1 sind die Eigenschaften von Poly-β-Hydroxybuttersäure und von Polypropylen (PP) gegenübergestellt (Thomas *et al.* 2012). PHB und PP haben einen ähnlichen Schmelzpunkt und Kristallinität. Die Zugfestigkeit ist gleich. PHB ist im Gegensatz zu PP UV-beständig, jedoch kann es durch Lösungsmittel depolymerisiert werden. Der große Vorteil von PHB im Gegensatz zu PP ist seine biologische Abbaubarkeit.

Tabelle 1.1: Physikalische Eigenschaften von Poly- β -Hydroxybuttersäure im Vergleich zu Polypropylen.

Parameter	Poly- β -Hydroxybuttersäure	Polypropylen
Schmelzpunkt T_m [°C]	171-182	171-186
Kristallinität [%]	65-80	65-70
Dichte [g/cm ³]	1,23-1,25	0,91-0,94
Molekulargewicht MW ($\times 10^{-5}$)	1-8	2,2-7
Zugfestigkeit [MPa]	40	39
UV Beständigkeit	Gut	Schlecht
Lösungsmittelbeständigkeit	Wenig	Gut
Biologische Abbaubarkeit	gut	nicht vorhanden

1.4.2 Mikrobielle Synthese von PHB

Die bakterielle PHB-Bildung im Cytoplasma erfolgt aufgrund von Mangel bestimmter Nährstoffe wie Phosphor, Stickstoff, Kalium oder Eisen, sowie bei Sauerstoffmangel. Sayyed and Chincholkar (2004) beobachteten eine maximale PHB-Bildung von *Alcaligenes faecalis* unter leichtem Stickstoffmangel. Ähnliche Ergebnisse wurden bei *Pseudomonas* sp. beobachtet (Sayyed und Gangurde 2010). Für eine effektive PHB-Synthese ist ein Überschuss einer Kohlenstoffquelle (C-Quelle) essentiell (Lee 1996). Lee (1996) und Haywood *et al.* (1990) konnten eine PHB-Bildung bei *Pseudomonas olovarans* feststellen, wenn C-Quellen mit 6-14 C-Atomen verfüttert wurden. Des Weiteren wurde PHB-Bildung mit organischen Säuren wie Lactat oder Acetat beschrieben (Bitar und Underhill 1990). Eine maximale PHB-Produktion findet im neutralen pH-Bereich statt (Byrom 1994).

Die PHB-Synthese erfolgt über die Umwandlung von Acetyl-CoA zu PHB zur Speicherung von Kohlenstoff. Die Biosynthese umfasst einen Reaktionsweg bestehend aus drei Enzymreaktionen. Sie werden katalysiert durch drei verschiedenen Enzyme: β -Ketothiolase, Acetoacetyl-CoA Reduktase und PHB-Synthase. Ausgangspunkt der PHB-Synthese ist das Acetyl-CoA, dessen Konzentration unter bestimmten Mangelbedingungen ansteigt. Der Citratcyclus (TCA) ist unter diesen Umständen herunter reguliert. Die β -Ketothiolase kondensiert zwei Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA. Unter Normalbedingungen wird die β -Ketothiolase von freiem CoA gehemmt. Bei herunter reguliertem TCA sinkt die Konzentration an freiem CoA und Acetoacetyl-CoA wird gebildet. Die Acetoacetyl-CoA Reduktase katalysiert den zweiten Schritt der Synthese. Das Acetoacetyl-CoA wird in einer stereospezifischen Reaktion mittels einer NAD(P)H-abhängigen Acetoacetyl-CoA Reduktase zu R-3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert. Die letzte Reaktion ist die Polymerbildung durch die PHB-Synthase. Diese verestert das 3-Hydroxybutyryl mit einem bestehenden Polyester und synthetisiert somit PHB. In Abbildung 1.2 sind diese Reaktionsschritte graphisch zusammengefasst.

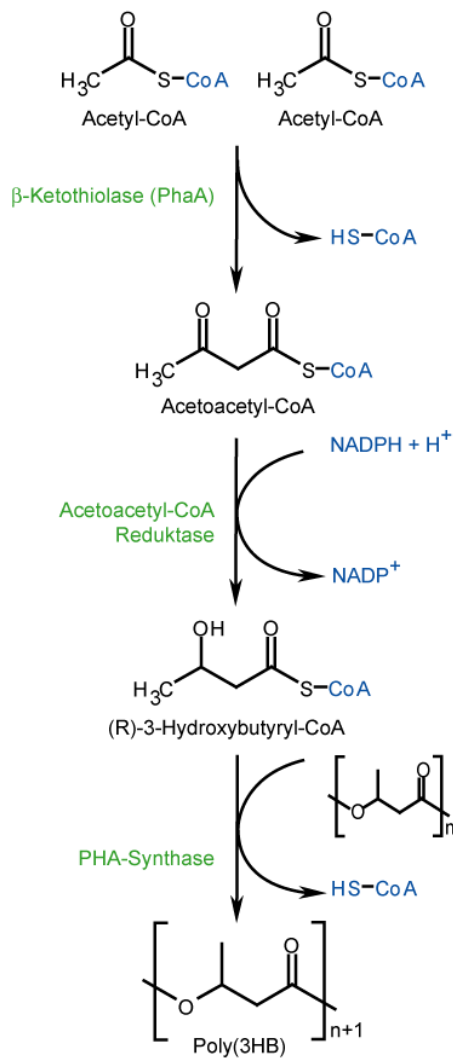


Abbildung 1.2: PHB-Syntheseweg (Reinecke 2005).

Die Gene für die Enzyme sind in dem phbCAB-Operon zusammengefasst. In Abbildung 1.3 ist der schematische Aufbau des Operons dargestellt.

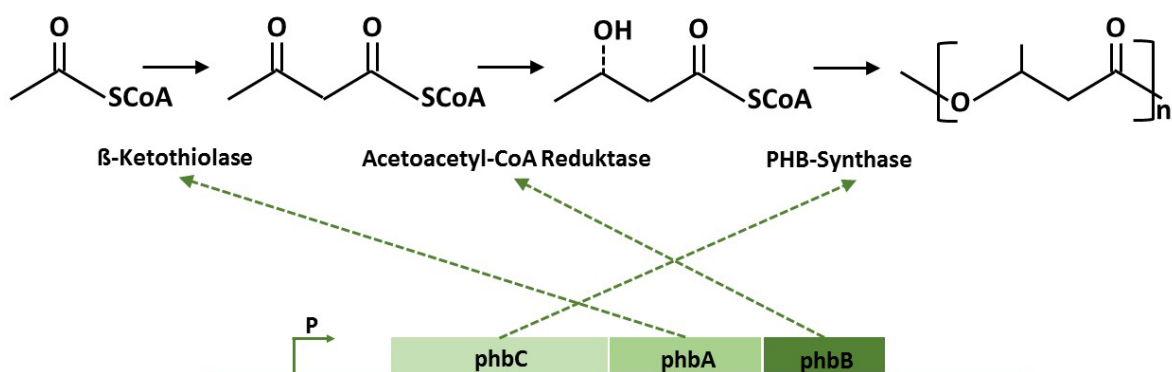


Abbildung 1.3: Enzyme der PHB-Synthese mit dem dazugehörigen phbCAB Operon. (verändert nach Madison und Huisman 1999).

1.4.3 PHB-bildende Bakteriengattungen und verwendete Substrate

Zur PHB-Bildung können Species von verschiedensten Bakteriengattungen und C-Quellen unterschiedlichster Art eingesetzt werden. Tabelle 1.2 zeigt C-Quellen, mit denen erfolgreich PHB produziert werden konnte. Des Weiteren sind die Bakteriengattungen aufgeführt, bei denen mit den entsprechenden Substraten, eine PHB-Bildung nachgewiesen wurde. Die prominentesten PHB-bildenden Organismen sind *Cupriavidus necator* (früher *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*) und *Azohydromonas lata* (früher *Alcaligenes latus*). Diese Organismen können mit zahlreichen Substraten PHB bilden und werden für die industrielle PHB-Bildung verwendet (Madison und Huisman 1999). Neben den natürlichen PHB-Produzenten kommen auch rekombinante *Escherichia coli* Stämme zum Einsatz. Diese Stämme weisen ebenfalls ein breites Substratspektrum auf und können auch aus Abfallprodukten der Nahrungsmittelindustrie, wie Molke oder Melasse, PHB produzieren (Ahn *et al.* 2000, Liu *et al.* 2009, Zhang *et al.* 1994). Diesen nicht-natürlichen PHB-Produzenten fehlen die Gene zum PHB-Abbau und die Abtrennung des Zielprodukts vereinfacht sich durch die standardisierte Lysierbarkeit der Organismen. Probleme bei der PHB-Produktion mit rekombinanten Stämmen entstehen durch den Verlust der übertragenen Gene während der Fermentation (Madison und Huisman 1999).

Substrate wie die Einfachzucker Glucose und Fructose, sowie der Mehrfachzucker Saccharose werden häufig zur PHB-Bildung verwendet. Zucker wie Maltose und Xylose können nur von einigen wenigen Organismen zu PHB umgewandelt werden. Die Verwendung von Zuckern aus Lebensmittelpflanzen wie Mais steht in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion. Der Einsatz von Kohlenhydraten aus landwirtschaftlichen Abfallprodukten, Nebenerzeugnissen der Molkerei oder industriellen Abfallprodukten kann hier Abhilfe schaffen. So wurde das Copolymer Poly(hydroxybutyrate-co-valerate) aus dem kohlenstoffreichen Mahua Baum (Butterbaum, *Madhuca* sp.) gewonnen (Anil-Kumar *et al.* 2007). Andere Beispiele für die PHB-Produktion aus erneuerbaren Ressourcen ist die Verwendung von Zuckerrohrbagasse (Silva *et al.* 2004) oder Melasse (Gouda *et al.* 2001) als Nebenprodukt der Zuckerherstellung. In diesem Zusammenhang tritt Weizenstroh als landwirtschaftliches Nebenprodukt in das Zentrum des Interesses (Koutinas *et al.* 2007, Xu *et al.* 2010).

Tabelle 1.2: Bakteriengattungen und entsprechende Substrate zur PHB-Produktion.

Substrat	Bakteriengattungen	Referenz
Glucose	<i>Bacillus</i>	Valappil <i>et al.</i> (2007a+b)
	<i>Streptococcus</i>	Yuksekdag und Beyatli (2008)
	<i>Streptomyces</i>	Valappil <i>et al.</i> (2007a)
	<i>Azotobacter</i>	Page und Cornish (1993)
	<i>Comamonas</i>	Lee <i>et al.</i> (2004)
	<i>Escherichia</i> ^a	Nikel <i>et al.</i> (2006)

Substrat	Bakteriengattungen	Referenz
Glucose	<i>Methylobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Vibrio</i>	Ghatnekar <i>et al.</i> (2002) Bertrand <i>et al.</i> (1990) Nurbas und Kutsal (2004) Chien <i>et al.</i> (2007)
Fructose	<i>Bacillus</i> <i>Comamonas</i>	Kumar <i>et al.</i> (2009) Lee <i>et al.</i> (2004)
Saccharose	<i>Bacillus</i> <i>Burkholderia</i> <i>Streptococcus</i> <i>Comamonas</i> <i>Vibrio</i>	Kumar <i>et al.</i> (2009) Rodrigues <i>et al.</i> (1995) Yuksekdag und Beyatli (2008) Lee <i>et al.</i> (2004) Chien <i>et al.</i> (2007)
Lactose	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Comamonas</i> <i>Hydrogenophaga</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Paracoccus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Sinorhizobium</i>	Yuksekdag und Beyatli (2008) Yuksekdag und Beyatli (2008) Yuksekdag und Beyatli (2008) Lee <i>et al.</i> (2004) Povolo und Casella (2003) Yellore und Desai (1998) Povolo und Casella (2003) Young <i>et al.</i> (1994) Povolo und Casella (2003)
Fettsäuren	<i>Bacillus</i> <i>Comamonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Spirulina</i> <i>Vibrio</i>	Valappil <i>et al.</i> (2007) Lee <i>et al.</i> (2004) Ashby <i>et al.</i> (2002) Jau <i>et al.</i> (2005) Chien <i>et al.</i> (2007)
Maltose	<i>Comamonas</i> <i>Protomonas</i>	Lee <i>et al.</i> (2004) Suzuki <i>et al.</i> (1986)
Methanol	<i>Methylobacterium</i> <i>Pseudomonas</i>	Ghatnekar <i>et al.</i> (2002) Young <i>et al.</i> (1994)
Stärke	<i>Azotobacter</i> <i>Haloferax</i>	Kim und Chang (1998) Lillo und Rodriguez-Valera (1990)
Glycerin	<i>Escherichia</i> ^a <i>Methylobacterium</i> <i>Ralstonia</i> <i>Vibrio</i> <i>Zobellella</i>	Nikel <i>et al.</i> (2008) Bormann und Roth (1999) Bormann und Roth (1999) Chien <i>et al.</i> (2007) Ibrahim und Steinbüchel (2009)
Acetat	<i>Brachymonas</i>	Shi <i>et al.</i> (2007)
Xylose	<i>Burkholderia</i> <i>Bacillus</i>	Silva <i>et al.</i> (2004) Lopes <i>et al.</i> (2009)
Landwirtschaftliche Abfälle	<i>Bacillus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Azotobacter</i>	Kumar <i>et al.</i> (2009) Wang <i>et al.</i> (2007) Wang <i>et al.</i> (2007) Page und Cornish (1993)

Substrat	Bakteriengattungen	Referenz
	<i>Burkholderia</i> <i>Escherichia</i> ^a <i>Haloferax</i> <i>Klebsiella</i> <i>Ralstonia</i>	Silva <i>et al.</i> (2004) Liu <i>et al.</i> (1998) Huang <i>et al.</i> (2006) Zhang <i>et al.</i> (1994) Zhang <i>et al.</i> (2004)
Molkereiabfälle	<i>Escherichia</i> ^a <i>Hydrogenophaga</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Sinorhizobium</i>	Park <i>et al.</i> (2002) Povolo und Casella (2003) Yellore und Desai (1998) Jiang <i>et al.</i> (2008) Povolo und Casella (2003)
Ölhaltige Abfälle	<i>Ralstonia</i>	Kahar <i>et al.</i> (2004)
Industrieabfälle	<i>Actinobacillus</i> <i>Bacillus</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Azotobacter</i> <i>Burkholderia</i> <i>Pseudomonas</i>	Son <i>et al.</i> (2004) Vijayendra <i>et al.</i> (2007) Fuchtenbusch und Steinbüchel (1999) Cho <i>et al.</i> (1997) Alias und Tan (2005) Koller <i>et al.</i> (2008)

a: Rekombinante Stämme

1.4.4 Anwendungsgebiete von PHAs

PHAs dienen als Ersatz für die petrochemisch hergestellten Polyester vor allem in der Verpackungs- und Farbenindustrie. Zahlreiche Patente für die Endanwendung von Produkten aus PHAs unterstreichen dies. Vor allem für Verpackungen wie Flaschen, Kosmetikbehälter, Stifte und Golftees (Baptist 1963, U.S. Patent 3072538; Baptist 1963, U.S. Patent 3107172; Webb 1990, U.S. Patent 4900299). Die U.S. Patente 4826493 und 4880592 (Martini *et al.* 1989) beschreiben die Herstellung von Folien aus PHB und Poly-β-Hydroxybutyrat-co-Hydroxyvalerat (P(3HB-3HV)) zur Verwendung in Wegwerfwindeln. Des Weiteren können aus PHAs Fasern hergestellt werden, welche zur Herstellung von Vliesstoffen dienen (Steel und Norton-Berry 1986, U.S. Patent 4603070). Auch Anwendungen als Schmelzklebstoffe sind beschrieben (Kaufmann *et al.* 1992, U.S. Patent 5169899). Sie kommen sogar als ionenleitende Polymere zum Einsatz (Reusch und Reusch 1993, U.S. Patent 5266422; Reusch und Reusch 1996, U.S. Patent RE035257). PHAs können als Latex oder Papierbeschichtungen dienen, oder auch Anwendung als Milchzahnersatz finden, sowie als Aromaabgabemittel in Essen dienen (Marchessault *et al.* 1995, U.S. Patent 5451456; Yalpani 1993, U.S. Patent 5229158; Yalpani 1993, U.S. Patent 5225227).

Neben den oben erwähnten polymeren Eigenschaften der Polyhydroxyalkanoate ist die biologische Abbaubarkeit eines der wichtigsten Merkmale. In der Natur gibt es eine Reihe von Organismen, die befähigt sind, PHAs abzubauen. Dies geschieht durch Einsatz von mikrobiellen Enzymen wie PHA-

Hydrolasen und /oder PHA-Depolymerasen. Die Aktivität dieser abbauenden Enzyme hängt von der Zusammensetzung des Polymers, seiner Größe, seiner physikalischen Form (amorph oder kristallin) und natürlich von den herrschenden Umweltbedingungen ab. So beträgt die Abbaurrate von PHB typischerweise ein paar Monate in Klärschlamm bis hin zu Jahren in Meerwasser (Jendrossek *et al.* 1996, Mergaert *et al.* 1995).

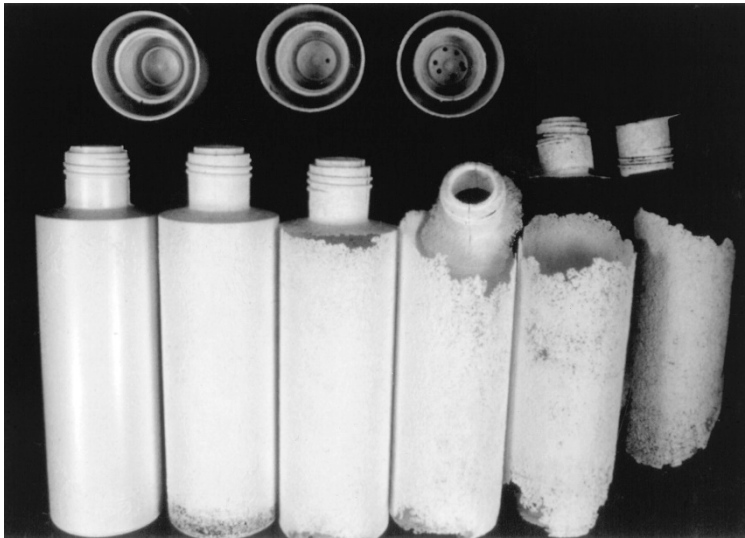


Abbildung 1.4: Mikrobieller Abbau von Poly- β -Hydroxybutyrat-co-Hydroxyvalerat in Klärschlamm. Die Inkubation erfolgte für 10 Wochen bei 20 °C in aeroben Klärschlamm. Abbauprozess der Flaschen mit der Inkubationszeit von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Wochen (von links nach rechts). (Quelle: Madison und Huisman 1999).

Genauso wichtig wie die biologische Abbaubarkeit der PHAs ist die Tatsache, dass sie aus erneuerbaren Rohstoffen hergestellt werden können. Dieser Aspekt gewinnt mit der Endlichkeit der fossilen Brennstoffreserven immer mehr an Bedeutung. PHAs können einen umweltfreundlichen Ersatz für viele petrochemisch hergestellte Produkte dienen.

1.5 Polylactid (PLA)

Polylactide sind polymerisierte Milchsäuremoleküle. Erstmals beschrieben wurden Polylactide 1845 von Théophile-Jules Pelouze (Pelouze 1845). Er versuchte Milchsäure durch Erhitzen und Entfernen von Wasser aufzureinigen. Hierbei beobachtete er eine Kondensation der Milchsäuremoleküle, sowie die Bildung von Oligomeren und Polymeren. Heute gibt es drei Methoden, um PLA herzustellen: 1) Direkte Polykondensation aus Milchsäure, 2) azeotrope-dehydrierende Kondensation, 3) ionische Polymerisation von Lactid (Auras *et al.* 2004). Letztere ist die aktuelle Methode, welche 1992 von Cargill Inc. patentiert wurde (Gruber *et al.* 1992, U.S. Patent 5142023). Die kostengünstigste Methode ist die direkte Polykondensation aus Milchsäure. Hier kommt es allerdings zu Entsorgungsproblemen der verwendeten Lösungsmittel. In Abbildung 1.5 sind die drei Synthesewege schematisch dargestellt.

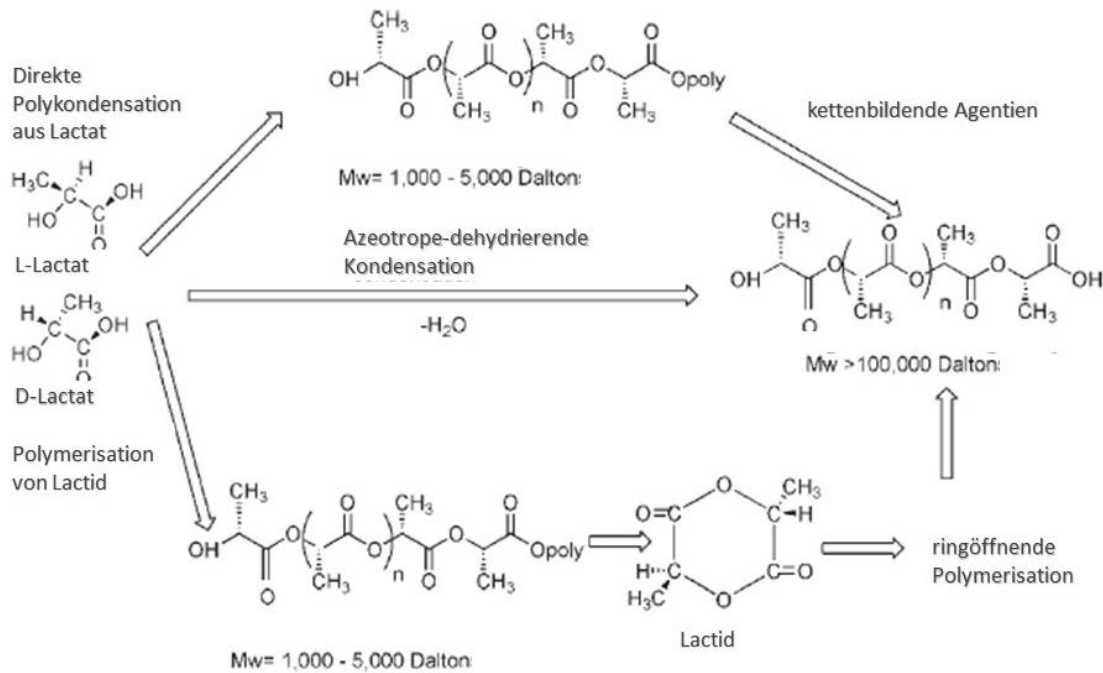


Abbildung 1.5: Synthesewege von PLA (verändert nach Hartmann 1998).

1.5.1 Anwendungsgebiete von Polylactiden

PLAs erfüllen viele Anforderungen als Verpackungsmaterialien. Da sie biologisch abbaubar sind, können sie als Kompostbeutel, Essensverpackungen oder als Einweggeschirr eingesetzt werden. In Form von Fasern oder Vlies können PLAs als Polstermaterial, Einmalkleidung, Sonnensegel, Hygieneprodukte für die Frau und auch für Windeln verwendet werden (Nampoorthiri *et al.* 2010). Des Weiteren finden PLAs Anwendung in der Biomedizin, wie bei selbstauflösenden Nähten oder Knochenfixierungen, Medikamentengabe oder Gewebe-technik (Zhao *et al.* 2004, Mehta *et al.* 2005).

1.5.2 Lactat – der Grundbaustein der Polylactidsynthese

Lactat, das Salz der Milchsäure und der Grundbaustein von Polylactid, ist die am häufigsten vorkommende Hydroxycarbonsäure. Sie findet zahlreiche Anwendung in Nahrungsmitteln, der Pharmazie, der Textil-, Leder- und chemischen Industrie. Lactat ist eine natürlich vorkommende Säure, die chemisch oder durch Fermentation hergestellt werden kann. Verglichen zur chemischen Herstellung bietet die biologische mehrere Vorteile wie niedrige Substratkosten, niedrige Produktionstemperatur und einen niedrigen Energieverbrauch (John *et al.* 2007). Die Kohlenstoffquellen zur Lactatproduktion können reine Zucker wie Glucose, Saccharose oder Lactose sein. Jedoch kann die Produktion durch den Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen kostengünstig und ohne Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion ablaufen. Hierzu können Zucker in Form von Molasse, Molke, Zuckerrohr-Bagasse, Maniok-Bagasse oder stärkehaltigen Materialien von Kartoffeln,

Tapioca, Weizen, Gerste und Karotten zum Einsatz kommen (John *et al.* 2006, Pandey *et al.* 2001, Anuradha *et al.* 1999).

1.6 Weizenstroh als Rohstoff zur Bioplastik-Produktion

1.6.1 Weizen

Weizen ist neben Reis und Mais eine der wichtigsten Kulturpflanzen weltweit. Mit 675 Mio. t pro Jahr ist es nach Mais (875 Mio. t/a) und Reis (718 Mio. t/a) das dritthäufigst angebaute Getreide weltweit. Die Anbaufläche für Weizen belief sich 2012 weltweit auf 216 Millionen Hektar. Die zwanzig größten Erzeugerländer produzierten ca. 86,2 % der Gesamternte. In Deutschland wurden im Jahr 2012 rund 22,4 Millionen Tonnen geerntet (FAO 2012). Weizen ist für Menschen in vielen Ländern ein Grundnahrungsmittel und spielt eine große Rolle bei der Tiermast. Weizen gehört zur Gattung *Triticum* in die Ordnung der Süßgräser (Poaceae). Es gibt etwa 20 verschiedene Arten. Es sind einjährige oder winterharte Ährengräser mit zwei- bis vierzeilig stehenden Ährchen. Die Getreidepflanzen werden von den Subtropen bis 60° nördliche Breite und 27°-40° südlicher Breite angebaut. Die Hauptanbauggebiete sind Eurasien und Nordamerika. Die ältesten Weizenarten waren seit der Jungsteinzeit in Kultur. Sie finden sich als Beigabe in ägyptischen Gräbern. Der Saatweizen entstand in Europa zu Beginn der Eisenzeit durch Kreuzung aus mehreren Wildarten. Seit dem Mittelalter haben seine Kultursorten die alten Weizen Arten allmählich verdrängt. Weizenkörner enthalten etwa 70 % Stärke, 10-12 % Eiweiß, ca. 2 % Fett und ca. 14 % Wasser. Sie werden als Brotgetreide, für Grieß, Graupen und Teigwaren sowie zur Bier- und Branntweinherstellung und als Viehfutter verwendet. Weizenstroh findet als Flechtmaterial für Matten, Korbwaren und Strohhüte Verwendung (Brockhaus 1994).

1.6.2 Zusammensetzung von Weizenstroh

Weizenstroh besteht, sowie 60 % der gesamten Pflanzenbiomasse, aus Lignocellulose. Sie ist der am häufigsten vorkommende nachwachsende Rohstoff auf unserem Planeten. Lignocellulose besteht aus Lignin (komplexe polyphenolische Struktur), Cellulose (β -D-1,4-Glucan) und Hemicellulose (D-Arabinose, D-Xylose, D-Mannose, D-Glucose, D-Galactose und Zuckeralkoholen). Der allgemeine Aufbau von Hemicellulose ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

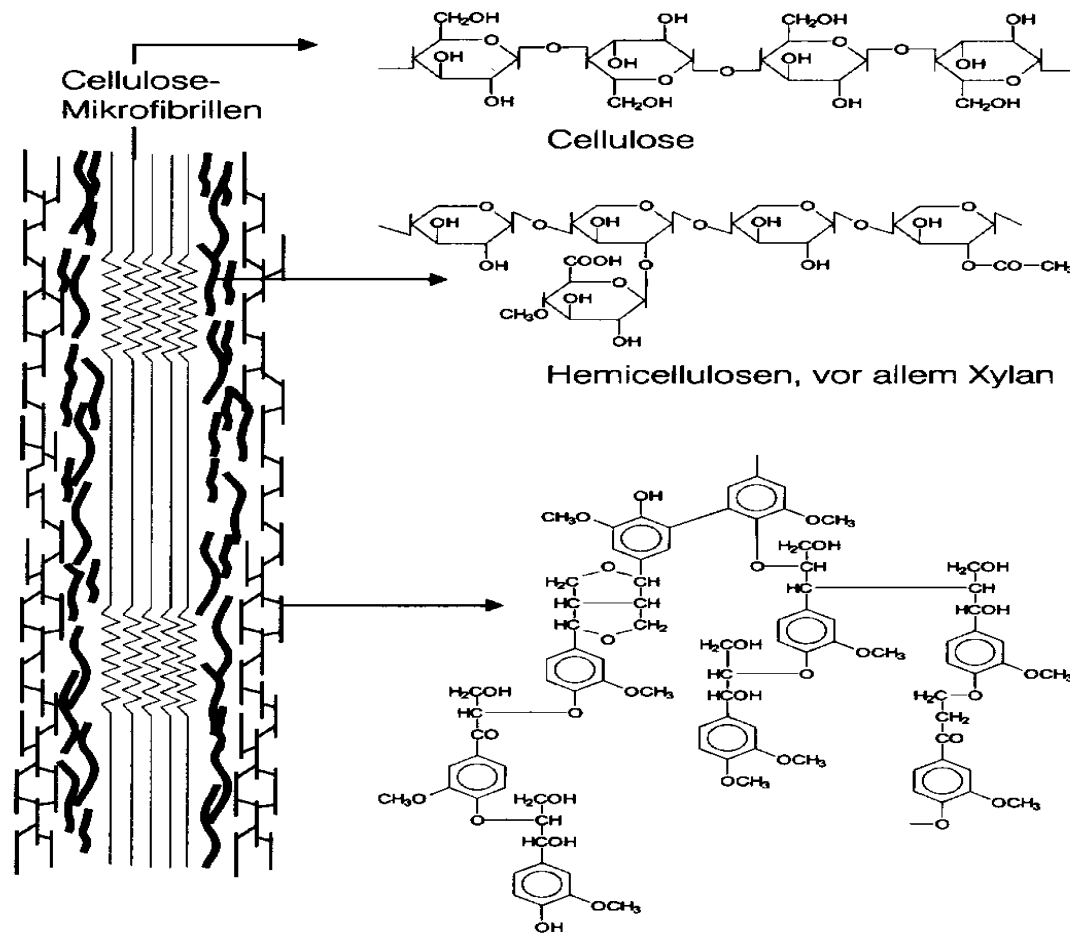


Abbildung 1.6: Darstellung der drei Hauptkomponenten von Lignocellulose: Lignin, Hemicellulose und Cellulose (verändert nach Fritsche 2002).

Weizenstroh enthält in der Regel 35 – 45 % Cellulose, 20 – 30 % Hemicellulose und 8 – 15 % Lignin (Gould 1984, Sun *et al.* 2004, Kristensen *et al.* 2008).

1.6.2.1 Cellulose

Die Cellulose ist ein β -1,4-Glucan, d.h. ihre Makromoleküle sind aus D-Glucosemolekülen aufgebaut, die in β -1 \rightarrow 4-Bindung verknüpft vorliegen. Also bildet formal das Disaccharid Cellobiose den Grundbaustein. Bei allen höheren Pflanzen besteht das Zellwandgerüst aus Cellulose. 2000 bis 15000 β -D-Glucoseeinheiten bilden langgestreckte, unverzweigte Fadenmoleküle. Bei der Cellulose sind die benachbarten Glucoseeinheiten entlang der Molekülachse um 180° gegeneinander verdreht und in dieser Lage durch Wasserstoffbrücken beidseits der glykosidischen Bindung festgehalten. Diese Kettenmoleküle haben eine starke Assoziationstendenz und lagern sich unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken längs aneinander (Sitte *et al.* 2002). Bündel aus etwa 250 Cellulosemolekülen bilden so genannte Mikrofibrillen, welche im Elektronenmikroskop sichtbar sind. Die Zellwandstabilität wird durch ein Netzwerk von Cellulosemikrofibrillen erreicht (Nultsch 2001, Purves *et al.* 2006). In Abbildung 1.7 ist der Aufbau des Grundbausteins Cellobiose zu sehen.

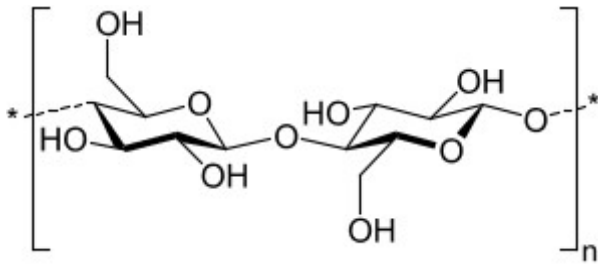


Abbildung 1.7: Aufbau von Cellobiose (Quelle: www.chemgapedia.de).

1.6.2.2 Hemicellulose

Unter der Bezeichnung Hemicellulose oder auch Cellulosane fasst man eine Reihe nichtcellulosischer Polysaccharide zusammen. Sie machen die Hauptmasse der Zellwand aus. Man unterscheidet hierbei die Pentosane, deren Makromoleküle aus Pentosen, z.B. D-Xylose und L-Arabinose, aufgebaut sind, und die Hexosen, deren Moleküle aus Hexosen, wie z.B. D-Glucose, D-Mannose und D-Galactose bestehen. Sie liegen meistens als Heteroglycane vor, z.B. als Xyloglucane, Arabinogalactane oder Glucomannane, deren Moleküle aus kleineren, sich periodisch wiederholenden Einheiten bestehen und unter Umständen auch verzweigt sein können (Nultsch 2001). Ein hoher Gehalt an funktionellen Gruppen (-OH, -CHO, -COOH) führt zu einer starken Quellbarkeit der Hemicellulosen. Sie liegen amorph und nicht kristallin vor. Sie bilden weniger Wasserstoffbrücken aus und sind besser löslich und weniger starr als die Cellulose (Pöhler Rotach 2000). Abbildung 1.8 verdeutlicht die mögliche Struktur eines Xylans.

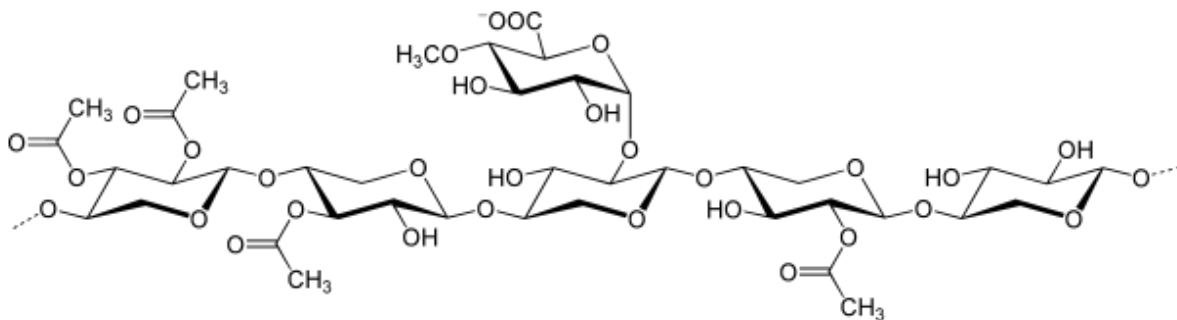


Abbildung 1.8: Mögliche Struktur von Xylan aus mehreren Xyloseeinheiten und verschiedenen Seitenketten (Quelle: Yikrazuul 2009).

1.6.2.3 Lignin

Lignin (lat. *Lignum* „Holz“) ist neben der Cellulose und der Hemicellulose der dritt wichtigste Bestandteil von Lignocellulose und neben der Cellulose das zweithäufigste pflanzliche Polymer überhaupt (Jahresproduktion ca. $2 \cdot 10^{10}$ t, gegenüber $2 \cdot 10^{11}$ t Cellulose) (Sitte *et al.* 2002). Lignine führen in Pflanzenzellen zur Verholzung. Chemisch gesehen sind Lignine Mischpolymere aus Phenylpropanen, z.B. Coniferyl-, Cumaryl- und Sinapylalkohol, welche sich zu einem dreidimensionalen Gitter vernetzen

und so die Zellwand durchdringen. Die Verholzung einer Pflanze führt zu einer erhöhten mechanischen Stabilität, insbesondere gegen Druckbelastung. Dies führt jedoch gleichzeitig zu einem gewissen Verlust der Elastizität. Die Bildung von Lignin in einer Pflanze hängt von dem Wachstum in der jeweiligen Klimazone ab, so wird die Ligninbildung durch Wärme gefördert. Niedere Pflanzen enthalten in der Regel kein Lignin, erst bei Farnen und den entwicklungs geschichtlich jüngeren Gymno- und Angiospermen ist Lignin regelmäßig anzutreffen. Lignin ist hydrophob und wasserunlöslich, es enthält viele aromatische Verbindungen, die leicht modifiziert werden können (Pöhler Rotach 2000). Abbildung 1.6 zeigt die Grundbausteine der Ligninsynthese bei Pflanzen.

1.6.2.4 Akzessorische Inhaltsstoffe der Lignocellulose

Neben den oben genannten Bestandteilen wie Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektin sind noch weitere Bestandteile in Weizenstroh zu finden. Hierbei handelt es sich um akzessorische Stoffe, die nicht zu den Strukturelementen der Zellwände gehören. Man kann diese in zwei Klassen unterteilen, zum einen die organischen Verbindungen – Extraktstoffe, zum anderen die anorganischen Bestandteile – Asche genannt. Extraktstoffe sind vor allem Terpene, Wachse, Fette, Harze und Tannine. Zur Asche gehören insbesondere Kalium-, Calcium- und Magnesiumverbindungen, aber auch Spurenelemente (z.B. Kationen des Eisens, Mangans, Bors etc.) (Pöhler Rotach 2000).

1.6.3 Die Nutzung von Weizenstroh als nachwachsender Rohstoff

Die Menge des jährlich anfallenden Strohs auf landwirtschaftlichen Flächen liegen zwischen 36 und 49 Mio. t (Fritsche *et al.* 2004, Kaltschmitt *et al.* 2003, Leible *et al.* 2003, Scheuermann *et al.* 2003). Trotz der großen Anbaumenge von Weizenstroh kann nicht das gesamte Aufkommen zur technischen Nutzung verwendet werden. Ein Großteil des Strohs wird für die Erhaltung des Nährstoffkreislaufs im Boden verwendet. Ein weiterer Teil dient als Einstreu bei der Tierhaltung oder als Gärtnereibedarf. Nur ca. 20 % des Gesamtstrohaufkommens können technisch weiter verarbeitet werden (Kaltschmitt *et al.* 2003). Dies geschieht im Moment vor allem durch energetische Nutzung des Strohs. Nach einer Studie von Kaltschmitt *et al.* aus dem Jahr 2001 sind europaweit 11 Heizkraftwerke, 78 Fernwärmewerke und ca. 13.000 dezentrale Kleinanlagen bekannt, welche auf Basis von Stroh betrieben werden (Kaltschmitt *et al.* 2001).

Ein anderer Weg, das anfallende Stroh zu nutzen, ist die direkte Vergärung in einer Biogasanlage. Für die Biogasproduktion sollte die verwendete Biomasse möglichst wenig verholzt sein, da sie sonst vorbehandelt werden muss oder die Umsetzung in Biogas langsamer erfolgt weil die Verweilzeit stark ansteigt.

Der Einsatz des anfallenden Strohs zur Herstellung von Bioethanol ist eine weitere interessante Möglichkeit, das Stroh als nachwachsenden Rohstoff zu nutzen. Zwei Prozesse sind für die Herstellung

von Bioethanol essentiell. Zum einen die Hydrolyse der Cellulose, zum anderen die Umwandlung der Zucker in Ethanol. Die Kosten für eine solche Ethanolproduktion hängen stark von der aktuellen Technologie und dem Ertrag sowie den Kosten für die Hydrolyse ab (Sun und Cheng 2002). Zurzeit wird Bioethanol zum Großteil auf der Basis von Maisstärke hergestellt. Da der Einsatz von Nahrungs- bzw. Futterpflanzen immer in Konkurrenz mit der Nahrungsmittel Produktion steht, sollte der Einsatz von Lignocellulose aus landwirtschaftlichen Abfällen steigen. Eine Marktstudie der FNR (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe) im Jahr 2008 ergab, dass die Produktionskosten von Bioethanol aus Mais bei 16 €/Giga Joule (GJ) lagen, die von Bioethanol aus Getreide bei 26 €/GJ (FNR 2008). Somit unterscheiden sich die Produktionskosten noch sehr stark, Bioethanol aus Getreide ist wesentlich teurer als aus Mais. Jedoch kann der Bioethanol aus Getreide mit einem Nettoenergieertrag von 45 GJ/ha mehr Energie liefern als Bioethanol aus Mais mit 40 GJ/ha (Schütte 2008). Der Einsatz nachhaltig erzeugter Biokraftstoffe gewinnt immer mehr an Bedeutung und somit auch die Verwendung von Getreidestroh zur Bioethanol Herstellung (Borrion *et al.* 2012).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine Alternative zur Produktion von petrochemisch hergestellten Kunststoffen zu entwickeln, wobei die Herstellung von Bioplastik nicht in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion stehen soll. Fossile Brennstoffe wie Erdöl, Kohle und Gas werden zurzeit als Energieträger und als Ausgangsstoffe für chemische Verbindungen genutzt. Jedoch sind ihre Reserven endlich und sie werden in ca. 50 Jahren aufgebraucht sein. Laut Murray und King wurde das Maximum der Erdölförderung (Peak Oil) schon 2005 erreicht (Murray und King 2012). Zusätzlich steigen durch den Einsatz fossiler Brennstoffe der CO₂-Ausstoß und die Klimaerwärmung (Soytas 2007). Eine Alternative könnte durch den Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen als Energieträger erreicht werden. Kraftstoffe auf der Basis von nachwachsenden Rohstoffen nehmen einen immer größeren Anteil auf dem Markt ein. Ebenso können die petrobasierten organischen Chemikalien durch Produkte aus nachwachsenden Rohstoffen ersetzt werden. In einem Szenario von Dornburg *et al.* könnten biobasierte Chemikalien im Jahr 2050 bis zu 38 % der organischen Chemikalien stellen (Dornburg *et al.* 2007). Die Produktion dieser biobasierten Produkte soll natürlich nicht in Konkurrenz zur Herstellung von Nahrungsmitteln stehen. Eine ideale Lösung dieser Aufgabe wäre die Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen, welche während der Nahrungsmittelproduktion anfallen. Im Falle von Weizenstroh wären all diese Bedingungen erfüllt. Weizen ist, wie oben erwähnt, das dritthäufigste angebaute Getreide weltweit. Weizenstroh fällt während des Weizenanbaus als landwirtschaftliches Abfallprodukt an und besteht aus der energetisch bedeutsamen Lignocellulose. Somit ist Weizenstroh ein perfektes Ausgangsprodukt zur Herstellung von Bioplastik. Der herzustellende Bioplastik müsste seinerseits ebenfalls einige Bedingungen erfüllen. Seine Produktion sollte ökologisch und ökonomisch

sinnvoll sein. Die Herstellung sollte idealerweise durch Mikroorganismen der Gefahrenstufe S1 erfolgen. Die Aufzucht der Mikroorganismen sollte einfach und anspruchslos sein. Des Weiteren sollten sich die PHB-Produzenten für eine großtechnische Produktion eignen. Der gesamte Prozess von Produktion und Abtrennung des Zielprodukts sollte sich umweltfreundlich gestalten. Im Hinblick auf den Gesamtprozess sollte dieser ökologisch und ökonomisch günstiger sein als die Herstellung von Kunststoff aus fossilen Brennstoffen.

In dieser Arbeit sollte anfallendes Stroh als Abfallprodukt der Nahrungsmittelproduktion zur Herstellung von PHB und wirtschaftlich bedeutenden Intermediärprodukten genutzt werden. Die im Weizenstroh enthaltenen Zucker sollten durch eine Kombination aus Thermodruckhydrolyse (TDH) und enzymatischer Hydrolyse aus der Lignocellulose gelöst werden. Die durch die TDH entstandenen Fraktionen bestanden zum einen aus einer hemicellulosischen Fraktion, welche zum Großteil den Zucker Xylose enthielt, zum anderen aus einer cellulosischen Fraktion, in welcher die Glucose in Form von Cellulose gespeichert war. Die Zucker der hemicellulosischen Fraktion (vor allem Xylose, aber auch Arabinose und Glucose) sollten durch geeignete Mikroorganismen aus der Stammsammlung des IMW, sowie durch Standardorganismen in PHB überführt werden. Ein alternativer Weg zur Verwertung der gelösten Zucker dieser Fraktion war die Umwandlung in wirtschaftlich wichtige Ausgangsprodukte wie Lactat oder Acetat. Eine mögliche Bildung von Lactat könnte zur Produktion eines weiteren Bioplastiks, dem Polylactid, führen. Hierzu wurden ebenfalls hauseigene Stämme aus der Stammsammlung getestet. Die cellulosische Fraktion, bestehend aus der polymerisierten Glucose (aber auch Xylose und Arabinose), sollte mit Hilfe von cellulosisch wirkenden Enzymen in Zuckermonomere zerlegt werden. Die freien Zuckermonomere sollten ebenfalls durch mikrobielle Aktivität in PHB fermentiert werden. Auch hierzu wurden geeignete Organismen gesucht. Als letzter Punkt sollte die Abtrennung der PHB aus den produzierenden Zellen untersucht werden. Die gängige Methode, PHB und deren Copolymere aus den Zellen zu gewinnen ist die Extraktion durch Lösungsmittel wie Chloroform oder Dichlorethan. Im Hinblick auf eine umweltfreundliche Bioplastik-Produktion ist diese Methode ungeeignet. Somit sollte die Isolierung der PHB durch Zellwand-lytische Enzyme erfolgen. Nach Aufbrechen der Zelle sollte das Zielprodukt durch Zentrifugation oder Filtration von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Die in Tabelle 2.1 aufgeführten Bakterienstämmen aus der Stammsammlungen des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW) und des Leibnitz-Instituts DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Tabelle 2.1: Untersuchte Bakterienstämme.

Nr.	Organismus	Stammnummer/ Sammlungsnummer	Herkunft	Anzucht bei
1	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMC 8	IMW, Mainz	30 °C
2	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMC 14	IMW, Mainz	30 °C
3	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMX 4	IMW, Mainz	30 °C
4	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMX 5	IMW, Mainz	30 °C
5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KMB 1-1	IMW, Mainz	30 °C
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KMB 1-2	IMW, Mainz	30 °C
7	<i>Alcaligenes faecalis</i>	11 KD 10	IMW, Mainz	30 °C
8	<i>Alcaligenes faecalis</i>	13 KD 10	IMW, Mainz	30 °C
9	<i>Azotobacter chroococcum</i>	B 571	IMW, Mainz	28 °C
10	<i>Bacillus brevis</i>	CZ 207	IMW, Mainz	30 °C
11	<i>Bacillus cereus</i>	KD 12	IMW, Mainz	30 °C
12	<i>Bacillus cereus</i>	NA 1	IMW, Mainz	30 °C
13	<i>Bacillus cereus</i>	NX 2-1	IMW, Mainz	30 °C
14	<i>Bacillus cereus</i>	RA 1	IMW, Mainz	30 °C
15	<i>Bacillus cereus</i>	Rt 11a	IMW, Mainz	30 °C
16	<i>Bacillus circulans</i>	CZ 172	IMW, Mainz	30 °C
17	<i>Bacillus circulans</i>	DSM 596	DSMZ, Braunschweig	30 °C
18	<i>Bacillus circulans</i>	KHC 3	IMW, Mainz	30 °C
19	<i>Bacillus circulans</i>	KMX 7	IMW, Mainz	30 °C
20	<i>Bacillus coagulans</i>	KMC 12	IMW, Mainz	30-37 °C
21	<i>Bacillus firmus</i>	KD 5	IMW, Mainz	30 °C
22	<i>Bacillus licheniformis</i>	KB 1	IMW, Mainz	28-37 °C

Fortsetzung Tabelle 2.1

23	<i>Bacillus licheniformis</i>	KBf 2	IMW, Mainz	28-37 °C
24	<i>Bacillus licheniformis</i>	Rt 6b	IMW, Mainz	28-37 °C
25	<i>Bacillus megaterium</i>	CZ 59b	IMW, Mainz	30 °C
26	<i>Bacillus megaterium</i>	CZ 268c	IMW, Mainz	30 °C
27	<i>Bacillus megaterium</i>	CZ 357a	IMW, Mainz	30 °C
28	<i>Bacillus oleronius</i>	Rt 10	IMW, Mainz	30 °C
29	<i>Bacillus sphaericus</i>	KD 1	IMW, Mainz	30 °C
30	<i>Bacillus sphaericus</i>	KD 2	IMW, Mainz	30 °C
31	<i>Bacillus sphaericus</i>	KD 6	IMW, Mainz	30 °C
32	<i>Bacillus sphaericus</i>	KD 7	IMW, Mainz	30 °C
33	<i>Bacillus sphaericus</i>	KD 11	IMW, Mainz	30 °C
34	<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8-1	IMW, Mainz	30 °C
35	<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8-2	IMW, Mainz	30 °C
36	<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8-3	IMW, Mainz	30 °C
37	<i>Bacillus subtilis</i>	KNaC 2	IMW, Mainz	30 °C
38	<i>Bacillus subtilis</i>	KNC 1	IMW, Mainz	30 °C
39	<i>Bacillus subtilis</i>	KScC 4	IMW, Mainz	30 °C
40	<i>Burkholderia cepacia</i>	KF 12	IMW, Mainz	30 °C
41	<i>Burkholderia cepacia</i>	Khi 2	IMW, Mainz	30 °C
42	Cellulosisches Bakterium	KScC 3-1	IMW, Mainz	28 °C
43	Cellulosisches Bakterium	KScC 3-2	IMW, Mainz	28 °C
44	<i>Cellulomonas cellulans</i>	DSM 43879	DSMZ, Braunschweig	30 °C
45	<i>Cellulomonas sp.</i>	KHC 1	IMW, Mainz	30 °C
46	<i>Cellulomonas sp.</i>	KHC 4	IMW, Mainz	30 °C
47	<i>Cellulomonas sp.</i>	KMaC 1	IMW, Mainz	30 °C
48	<i>Cellulomonas sp.</i>	KMaC 2	IMW, Mainz	30 °C
49	<i>Cellulomonas sp.</i>	KMaC 3	IMW, Mainz	30 °C
50	<i>Cellulomonas sp.</i>	KMaC 4	IMW, Mainz	30 °C
51	<i>Cellulomonas sp.</i>	KMaC 5	IMW, Mainz	30 °C
52	<i>Cellulomonas sp.</i>	KNeC 1	IMW, Mainz	30 °C
53	<i>Cellulomonas sp.</i>	KScC 2	IMW, Mainz	30 °C

Fortsetzung Tabelle 2.1

54	<i>Cellulomonas sp.</i>	KScC 6	IMW, Mainz	30 °C
55	<i>Cellulomonas sp.</i>	NA 2	IMW, Mainz	30 °C
56	<i>Cellulomonas sp.</i>	ZC 1	IMW, Mainz	30 °C
57	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	E 3	IMW, Mainz	30 °C
58	<i>Citrobacter koseri</i>	KNC 1	IMW, Mainz	30 °C
59	<i>Comamonas acidovorans</i>	KNB 3	IMW, Mainz	30 °C
60	Isolat aus Rinderpannen	A 1	IMW, Mainz	30 °C
61	Isolat aus Rinderpannen	A 2	IMW, Mainz	30 °C
62	Isolat aus Rinderpannen	A 3	IMW, Mainz	30 °C
63	Isolat aus Rinderpannen	B 1	IMW, Mainz	30 °C
64	Isolat aus Rinderpannen	B 2	IMW, Mainz	30 °C
65	Isolat aus Rinderpannen	B 3	IMW, Mainz	30 °C
66	Isolat aus Rinderpannen	B 4	IMW, Mainz	30 °C
67	Isolat aus Rinderpannen	B 5	IMW, Mainz	30 °C
68	Isolat aus Rinderpannen	C 1	IMW, Mainz	30 °C
69	Isolat aus Rinderpannen	C 2	IMW, Mainz	30 °C
70	Isolat aus Rinderpannen	C 3	IMW, Mainz	30 °C
71	Isolat aus TNT-Boden	M 2	IMW, Mainz	30 °C
72	Isolat aus TNT-Boden	M 3	IMW, Mainz	30 °C
73	<i>Isoptericola variabilis</i>	MX 5	IMW, Mainz	30 °C
74	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CK 79	IMW, Mainz	30 °C
75	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KAE 14	IMW, Mainz	30 °C
76	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MX 4	IMW, Mainz	26-37 °C
77	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KMC 7.1	IMW, Mainz	26-37 °C
78	<i>Klebsiella terrigena</i>	HB	IMW, Mainz	30 °C
79	<i>Kocuria varians</i>	CZ 66	IMW, Mainz	30 °C
80	Kokkenförmiges Bakterium	E 2	IMW, Mainz	30 °C
81	Kokkenförmiges Isolat	WX-1	IMW, Mainz	30 °C
82	<i>Lactobacillus brevis</i>	B 737, DSM 20054 ^T	IMW, Mainz DSMZ, Braunschweig	20 °C

Fortsetzung Tabelle 2.1

83	<i>Lactobacillus brevis</i>	B 18	IMW, Mainz DSMZ, Braunschweig	20 °C
84	<i>Lactobacillus buchneri</i>	B 729, DSM 20057 ^T	IMW, Mainz DSMZ, Braunschweig	20 °C
85	<i>Lactobacillus buchneri</i>	B 736, DSM 5987	IMW, Mainz DSMZ, Braunschweig	20 °C
86	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	B 724, DSM 14421 ^T	IMW, Mainz DSMZ, Braunschweig	20 °C
87	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	B 21	IMW, Mainz	20 °C
88	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	B 17	IMW, Mainz	20 °C
89	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	B 271	IMW, Mainz	20 °C
90	<i>Lactobacillus plantarum</i>	B 102, DSM 20205	IMW, Mainz DSMZ, Braunschweig	20 °C
91	<i>Lactobacillus plantarum</i>	B 727, DSM20174 ^T	IMW, Mainz DSMZ, Braunschweig	20 °C
92	<i>Lactococcus lactis</i>	B 162	IMW, Mainz	20 °C
93	<i>Lactococcus lactis</i>	B 238	IMW, Mainz	20 °C
94	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSM 20343 ^{T6}	DSMZ, Braunschweig	20 °C
95	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSM 20484	DSMZ, Braunschweig	20 °C
96	<i>Microbacterium sp.</i>	KF 1	IMW, Mainz	30 °C
97	<i>Micrococcus luteus</i>		IMW, Mainz	30 °C
98	<i>Micromonospora aurantica</i>	CK 2	IMW, Mainz	30 °C
99	<i>Methylobacterium extorquens</i>	C 81	IMW, Mainz	20 °C
100	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	NX 3	IMW, Mainz	25 °C
101	<i>Oenococcus oeni</i>	B 217	IMW, Mainz	20 °C
102	<i>Oenococcus oeni</i>	B 144	IMW, Mainz	20 °C
103	<i>Paenibacillus macerans</i>	WX	IMW, Mainz	30 °C
104	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	CZ 104d	IMW, Mainz	30 °C
105	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	CZ 177d	IMW, Mainz	30 °C
106	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	CZ 178	IMW, Mainz	30 °C
107	<i>Paenibacillus sp.</i>	CZ 181a	IMW, Mainz	30 °C

Fortsetzung Tabelle 2.1

108	<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSM 20284 ^T	DSMZ, Braunschweig	20 °C
109	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CK 40	IMW, Mainz	30-37 °C
110	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KMC 2	IMW, Mainz	30-37 °C
111	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KMC 13	IMW, Mainz	30-37 °C
112	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KP 1	IMW, Mainz	30-37 °C
113	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	KMA 4	IMW, Mainz	30 °C
114	<i>Pseudomonas putida</i>	M 4	IMW, Mainz	26-30 °C
115	<i>Pseudomonas putida</i>	pS P3	IMW, Mainz	26-30 °C
116	<i>Pseudomonas sp.</i>	DSM 6708	DSMZ, Braunschweig	30 °C
117	<i>Rhizobium etli</i>	CZ 58	IMW, Mainz	28 °C
118	<i>Rhizobium sp.</i>	CZ 63	IMW, Mainz	28 °C
119	<i>Rhizobium sp.</i>	CZ 67	IMW, Mainz	28 °C
120	<i>Rhizobium sp.</i>	CZ 68	IMW, Mainz	28 °C
121	<i>Rhizobium sp.</i>	CZ 69	IMW, Mainz	28 °C
122	<i>Rhizobium sp.</i>	CZ 71	IMW, Mainz	28 °C
123	<i>Serratia sp.</i>	M 1	IMW, Mainz	30 °C
124	<i>Sphingomonas sp.</i>	KZC	IMW, Mainz	30 °C
125	<i>Sphingomonas sp.</i>	CZ 326a	IMW, Mainz	30 °C
126	<i>Sphingomonas sp.</i>	CZ 195	IMW, Mainz	30 °C
127	<i>Staphylococcus spec.</i>	KMC 9	IMW, Mainz	37 °C
128	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	DSM 40233	DSMZ, Braunschweig	30 °C
129	<i>Streptomyces albus</i>	B578	IMW, Mainz	30 °C
130	<i>Streptomyces fragilis</i>	DSM 40044	DSMZ, Braunschweig	30 °C
132	<i>Streptomyces globisporus subsp. caucasicus</i>	DSM 40814	DSMZ, Braunschweig	30 °C
133	Unidentifiziertes Isolat	NX 2-2	IMW, Mainz	30 °C

Weiterhin wurden folgende Referenzorganismen zur PHB-Produktion vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) und der National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB, Aberdeen, Scotland) bezogen (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Referenzorganismen zur PHB-Produktion.

Nr.	Organismus	Stammnummer	Herkunft	Anzucht bei
134	<i>Azohydromonas lata</i>	DSM 1122	DSMZ, Braunschweig	30 °C
135	<i>Burkholderia sacchari</i>	DSM 17165	DSMZ, Braunschweig	30 °C
136	<i>Cupriavidus necator</i>	DSM 428	DSMZ, Braunschweig	30 °C
137	<i>Cupriavidus necator</i>	DSM 545	DSMZ, Braunschweig	30 °C
138	<i>Cupriavidus necator</i>	NCIMB 11599	NCIMB, Aberdeen	30 °C
139	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	DSM 1034	DSMZ, Braunschweig	30 °C

2.2 Nährmedien und Puffer

Folgende Nährmedien wurden in der vorliegenden Arbeit zur Anzucht und Stammhaltung, sowie zur PHB-Produktion verwendet. Soweit nicht anders angegeben beziehen sich alle Angaben auf 1 l Gesamtvolumen. Bei festen Nährmedien wurden 15,00 g/l Agar zugefügt. Alle Medien wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert.

Tabelle 2.3: DSMZ Medium 1: Nährstoff Agar

DSMZ Medium 1: Nährstoff Agar

Pepton	5,00 g
Malzextrakt	3,00 g

→ pH 7,0 mit 1 N NaOH eingestellt

Tabelle 2.4: DSMZ Medium 65: GYM-Schrägagar

DSMZ Medium 65: GYM-Schrägagar

Glucose	4,00 g
Hefeextrakt	4,00 g
Malzextrakt	10,00 g
CaCO ₃	2,00 g
Agar	15,00 g

→ pH 7,2 mit 1 N NaOH eingestellt

→ der Agar wurde zu je 7 ml in Reagenzgläser gefüllt und schräg gelegt

Tabelle 2.5: DSMZ Medium 81: Mineral Medium für chemolithotrohes Wachstum (H-3)**DSMZ Medium 81: Mineral Medium für chemolithotrohes Wachstum (H-3)**

KH ₂ PO ₄	2,30 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	2,90 g
NH ₄ Cl	1,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g
NaHCO ₃	0,50 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g
Fe(NH ₄)citrat	0,05 g
Spurenelementlösung SL-6	5,00 ml

→ pH 6,8 mit 1 N NaOH eingestellt

→ Eisencitrat und Spurenelementlösung wurden getrennt autoklaviert und dem abgekühlten Medium steril zugeführt

Tabelle 2.6: Spurenelementlösung SL-6**Spurenelementlösung SL-6**

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,30 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,20 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,03 g

Tabelle 2.7: Mineral Medium (verändert nach Ramsay *et al.* 1990)**Mineral Medium (verändert nach Ramsay *et al.* 1990)**

KH ₂ PO ₄	1,50 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	2,90 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,20 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g
Fe(NH ₄)citrat	0,06 g
Spurenelementlösung SL-6	1,00 ml

→ pH 6,8 mit 1 N NaOH eingestellt

→ Eisencitrat und Spurenelementlösung wurden getrennt autoklaviert und dem abgekühlten Medium steril zugeführt

Die Mineral Medien wurden je nach Versuchsbedingungen mit Xylose oder Glucose versetzt. In der Regel lag die Konzentration dieser Kohlenhydrate bei 10 g/l.

Tabelle 2.8: Tomatensaftmedium**Tomatensaftmedium**

Pepton aus Fleisch	5,00 g
Trypton	20,00 g
Hefeextrakt	5,00g
Xylose	10,00 g
Citronensäure	3,00 g
Tween 80	1,00 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,50 g
Tomatensaft	250,00 ml
eH ₂ O	ad 1000 ml

→ pH 6,0 mit 4 N NaOH eingestellt

Der Tomatensaft wurde durch Zentrifugation von Trubstoffen befreit. Hierzu wurde 1 l Saft in Zentrifugen-Becher überführt und bei 11.300 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Das normale Tomatensaftmedium enthielt 25 % Tomatensaft. Für spätere Versuche wurde die Konzentration an Tomatensaft variiert. So entstanden Medien mit 25 %, 15 % und 5 % Tomatensaft (siehe Abschnitt 2.12).

Tabelle 2.9: Milchsäurebakterien-Minimal-Medium (MMSB)**Milchsäurebakterien-Minimal-Medium (MMSB)**

Pepton aus Fleisch	2,50 g
Trypton	10,00 g
Xylose	10,00 g
Citronensäure	1,50 g
Tween 80	0,50 g
MnSO ₄ x H ₂ O	1,90 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25 g
Cystein	1,50 g
Hydrolysat	ad 1000 ml

→ pH 6,0 mit 1 N NaOH eingestellt

Tabelle 2.10: Cystein-Mangan-Mix (CM-Mix)**Cystein-Mangan-Mix (CM-Mix)**

Cystein	1,50 g
MnSO ₄ x H ₂ O	1,90 g
Hydrolysat	ad 1000 ml

→ pH 6,0 mit 1 N NaOH eingestellt

Tabelle 2.11: NMMP-Medium (Hopwood *et al.* 1985)**NMMP-Medium (Hopwood *et al.* 1985)**

Glycerin	40,00 g
Casaminosäuren	6,25 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,50 g
MgSO ₄	0,75 g
Spurenelementlösung	1,25 ml
Na/K-Phosphatpuffer	18,75 ml

→ pH 6,8 mit 4 N NaOH eingestellt

Tabelle 2.12: Spurenelementlösung**Spurenelementlösung**

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00 g
MnCl ₂ x 7 H ₂ O	1,00 g
CaCl ₂	1,00 g

Tabelle 2.13: Phosphatpuffer (100 mM)**Phosphatpuffer (100 mM)**

KH ₂ PO ₄	12,25 g
NaHPO ₄	1,58 g

→ pH 5,9

→ für 10 mM Phosphatpuffer 1:10 verdünnt

Tabelle 2.14: Phosphatpuffer (20 mM)**Phosphatpuffer (20 mM)**

KH ₂ PO ₄	2,45 g
NaHPO ₄	0,32 g
MgCl ₂ (1,5 mM)	0,38 g

→ pH 7,0 mit 2 N NaOH eingestellt

→ für 10 mM Phosphatpuffer 1:10 verdünnt

Tabelle 2.15: Lyse-Testsuspension**Lyse-Testsuspension**

Phosphatpuffer (10 mM) (s. Tab. 2.15)	100 ml
Lyophilisierte Zellen	ca. 0,3 g

- Zellen wurden dem Puffer zugegeben bis eine OD von zwischen 0,8 und 1,0 erreicht wurde
- Durch Kurzzeiterhitzen auf ca. 80 °C wurden eventuell vegetative Zellen zerstört
- Nach Abkühlung wurde die Suspension bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt

Tabelle 2.16: Universalpuffer**Universalpuffer**

Tris	13,00 g
Malat	11,60 g
Citrat	14,00 g
Borsäure	6,28 g

- pH ~2,0-3,0
- 20 ml der Stammlösung wurden mit 2 N NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und mit eH₂O auf 100 ml aufgefüllt
- So konnten Puffer der Werte pH 7,0-9,0 hergestellt werden

Tabelle 2.17: Acetatpuffer (20 mM)**Acetatpuffer (20 mM)**

Essigsäure	1,20 g
MgCl ₂	0,30 g

- pH 6,0 mit 2 N NaOH eingestellt

Tabelle 2.18: Acetatpuffer für FPLC (20 mM)**Acetatpuffer für FPLC (20 mM)**

Essigsäure	1,20 g
MgCl ₂	0,30 g
NaCl	58,44 g

- pH 6,0 mit 2 N NaOH eingestellt

Tabelle 2.19: Ringerlösung

Ringerlösung	
NaCl	9,00 g
KCl	0,20 g
CaCl ₂	0,20 g
NaHCO ₃	0,10 g

→ Die Lösung wurde zu je 3 ml in Reagenzgläser gefüllt

2.3 Chemikalien

Tabelle 2.20: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Hersteller, Sitz
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agar	Marcor, New Jersey, USA
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumeisen-III-citrat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Benzoessäure	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform (Trichlormethan)	Roth, Karlsruhe
Cobaltchlorid-Hexahydrat	Sigma Aldrich, Steinheim
Dichlorethan (DCE)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Dinatriummolybdat	Merck, Darmstadt
Eisen(II)-Sulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Seva,
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Furfural	Merck, Darmstadt
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
3-Hydroxybuttersäure	Sigma Aldrich, Steinheim
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde	Alfa Aesar, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe

Fortsetzung Tabelle 2.20

Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Malzextrakt	Merck, Darmstadt
Manganchlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylbenzoat (Benzoessäuremethylester)	Sigma Aldrich, Steinheim
Methylhexanoat (Capronsäuremethylester)	SAFC, Missouri, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nickelchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Pepton aus Fleisch	Roth, Karlsruhe
Poly-[(R)-3-Hydroxybuttersäure]	Sigma Aldrich, Steinheim
Propanol	Roth, Karlsruhe
Propylbenzoat	Sigma Aldrich, Steinheim
Propylbutyrat	Sigma Aldrich, Steinheim
(R)-(-)-3-Hydroxy-n-Buttersäuremethylester	ABCR, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
Tomatensaft	Eckes-Granini, Nieder-Olm
Tween 80	Merck, Darmstadt
Xylose	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt

2.4 Enzyme und Kits

Tabelle 2.21: Verwendete Enzymlösungen und Kits.

Enzyme und Kits	Hersteller, Sitz
Cellulase-Komplex NS 22086	Novozymes, Dänemark
DNA-Längenstandard Gene Ruler DNA Ladder Mix 100-10000 bp	Thermo Scientific, Schwerte
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Ladepuffer 6 x DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Schwerte
Microgen® BACILLUS ID	Microgen Bioproducts Ltd, Camberley, UK
QIAquick® PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
Xylanase NS 22083	Novozymes, Dänemark

2.5 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2.22: Verwendete Geräte und Hilfsmittel.

Geräte und Hilfsmittel	Hersteller, Sitz
Aktivkohlekartusche T.G.W.	Kuraray Chemical Company, Hattersheim
Autoklav CertoClav	Traun, Österreich
Autoklav Systec VE-40	Systec GmbH, Wettengel
Brutschrank Exella Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Brutschrank Heraeus ST 5050	Heraeus, Hanau
Einkanalpipetten (10 µl, 100 µl und 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
FPLC-Anlage	GE Healthcare, München
Gaschromatograph mit FID GC-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Gaschromatograph mit Massenspektrometer GCMS-QP 2010 S	Shimadzu, Kyoto, Japan
GC-Säule ZB-5-MS (30 m x 0.25 µm ID x 0.25 µm)	Phenomenex, Aschaffenburg
GC-Säule Zebron ZB-Wax (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm)	Phenomenex, Aschaffenburg
Gefriertrocknungsanlage LYOVAC GT 2	LD Didactic GmbH, Hürth
Geldokumentationseinheit BIOVision CN 3000	Vilber-Lourmat, Eberhardzell
Hamilton-Spritzen	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
HPLC Autoinjektor SIL-10AD	Shimadzu, Kyoto, Japan
HPLC Pumpe LC-10AD	Shimadzu, Kyoto, Japan

Fortsetzung Tabelle 2.22

HPLC Organic Acid Column Aminex® HPX-87H Ion Exclusion Column (300 mm x 7,8 mm)	Biorad, München
Integrator C-R8A Chromatopac	Shimadzu, Kyoto, Japan
Integrator C-R6A Chromatopac	Shimadzu, Kyoto, Japan
Kaffeemühle KSW 3306	Clatronic, Kempten
Kationenaustauschersäule Mono S™ HR 5/5	GE Healthcare, München
Leitfähigkeitsmessgerät 6010 Multimeter	Hung Chang Co. Ltd., Seoul, Südkorea
Magnetrührer IKAMAG® RCT	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Mehrkanalpipette (200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Laborlux 11	Leitz, Wetzlar
Nutsche D1	Schott, Mainz
pH-Meter CG 840	Schott, Mainz
Photometer UV-120	Shimadzu, Kyoto, Japan
Photometer UV-VIS Recording Spectrophotometer UV-160A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Refraktometer 156 refractive index detector	Beckman Instruments, Krefeld
Reinstwasseranlage Milli-RO Plus und Milli-Q plus 185	Millipore, Eschborn
Schallgerät Branson Sonifer	Branson Ultrasonics, Danbury
Schüttelgerät Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Säulenthermostat STH 585	Gynkotek, Germering
Spülmaschine Miele Professional G 7883	Miele, Gütersloh
Thermocycler Techgene	Techne, Staffordshire, UK
Titertek Multiskan® MKII	Labs Systems, Lappeenranta, Finnland
Ultraschallbad Sonorex RK 106	Bandelin Electronics, Berlin
Vakuumpumpe CVC 2	Vakuubrand, Wertheim
Vibrogen Zelmühle	Edmund Bühler, Hechingen
Waage	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 2-16 K	Sigma, Osterode
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge J2-MC	Beckmann Coulter, Krefeld

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.23: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Sitz
Centrifugal Filter Modified PES 3 K	VWR, Darmstadt
Eppendorf-Gefäße, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Falcon-Gefäße, 15 ml und 50 ml	VWR, Darmstadt
Filterpapier, Filter Disks Grade 3 hw, dia 90 mm	Sartorius, Göttingen
HPLC-Gefäße N8 (flach, label, klar)	Macherey-Nagel, Düren
Kulturröhrchen mit Schraubdeckelverschluss	Schott, Mainz
Kulturschalen 94 x 16 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pasteurpipetten 320 mm	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg
Reagenzgläser Boro 5.1, mit Rand	VWR, Darmstadt
Rundkolben 500 ml	Schott, Mainz
Schikanekolben	Schott, Mainz
Spritzenfilter CHROMAFIL Xtra RC-20/25 0,2 µm	Macherey-Nagel, Düren
Spritzenfilter 0,45 µm	VWR, Darmstadt
Tiefenfilterschichten BECO-KDS 12	Begerow, Langenlonsheim
Vivaspin 50	Sartorius, Göttingen

2.7 Screening nach Poly-β-Hydroxybuttersäure (PHB) bildenden Bakterien in der Stammsammlung des IMW

Die Stammsammlung des IMW enthält eine Vielzahl von verschiedenen Bakterienstämmen, isoliert aus den verschiedensten Habitaten wie z.B. Termitendarm, Wein und Erdboden. Aus dieser Sammlung sollte nach geeigneten Organismen zur PHB-Produktion gesucht werden. Die Organismen sollten mit Xylose oder Glucose als einziger C-Quelle wachsen können und optimaler Weise PHB in größeren Mengen (20-80 % der Zelltrockenmasse) bilden. Hierzu wurde eine Vorauswahl getroffen. Es wurden nur Gattungen ausgewählt die schon als PHB-Produzenten mit diesen Substraten beschrieben wurden. Das Screening fand im August 2010 statt. Stämme die durch frühere Identifizierungsmethoden als S2-Stämme beschrieben wurden, wurden in weiterführenden Versuchsteilen nicht weiter verwendet. Das in Abbildung 2.1 dargestellte Schema fasst die einzelnen Versuchsschritte während des Screenings zusammen und gibt eine Übersicht über die verwendeten Methoden.

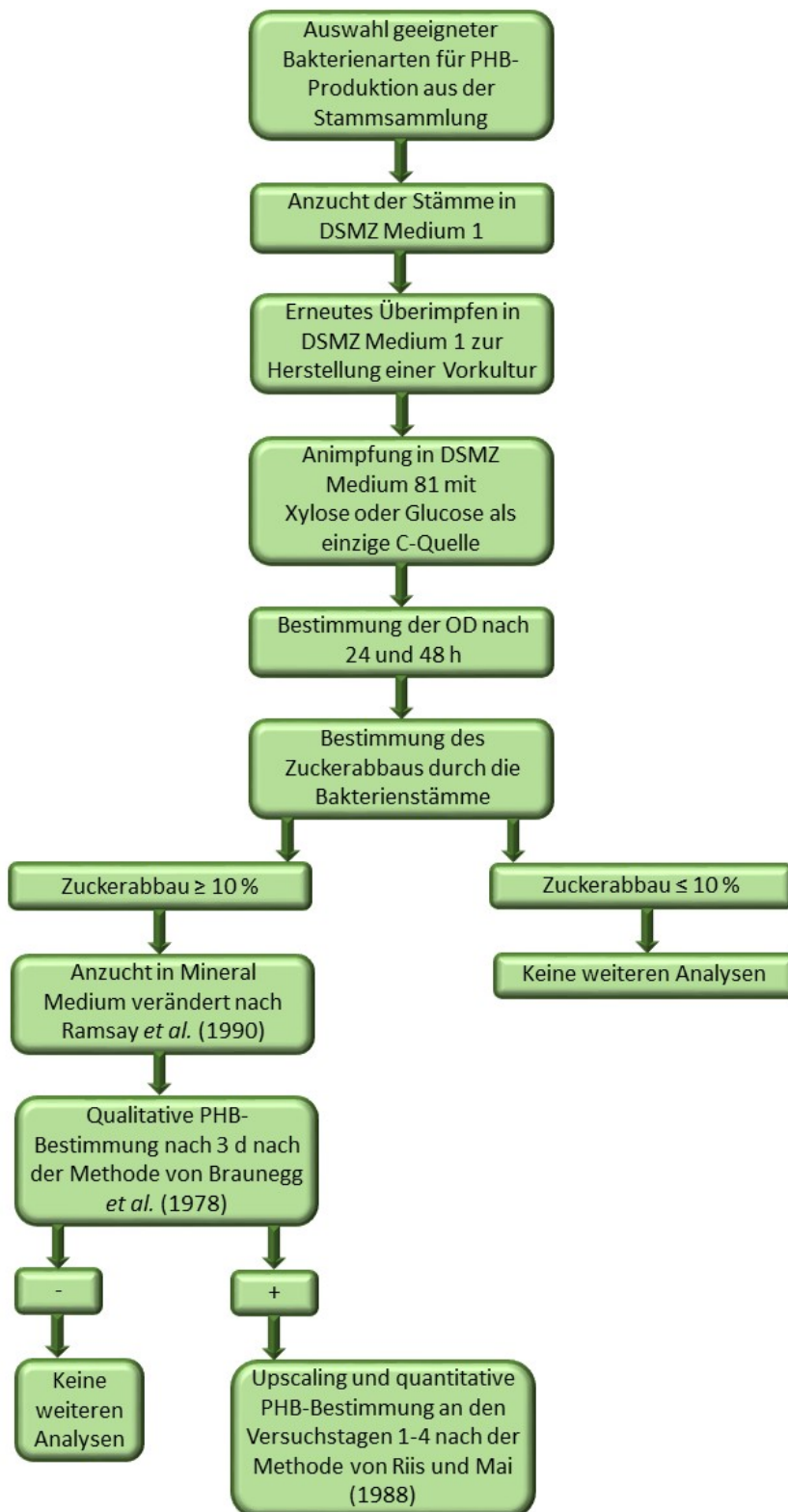


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des PHB-Screenings ausgewählter Bakterienstämme aus der Stammsammlung des IMW

2.7.1 Kultivierung ausgewählter Organismen

Die Organismen der Stammsammlung lagen als Cryo-Kultur, in Glaskapillaren bei -76 °C, vor (Hippe 1991) und wurden mittels einer sterilen Kanüle in 10 ml autoklaviertes DSMZ Medium 1 überführt und bei entsprechender Temperatur inkubiert. Nach erfolgreichem Wachstum wurden diese Ansätze ein weiteres Mal überimpft. Diese Vorkulturen dienten als Inokulum für das eigentliche Screening. Die Organismen wurden zunächst auf ihre Fähigkeit Xylose oder Glucose als einzige C-Quelle zu nutzen getestet. Hierzu wurden 10 ml des DSMZ Mediums 81 in sterile Reagenzgläser überführt und diese mit 1 % der Vorkultur der entsprechenden Organismen beimpft. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei optimaler Inkubations-Temperatur und 150 rpm.

2.7.2 Wachstumskontrolle durch Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung des Bakterienwachstums erfolgte über die optische Dichte mittels Reagenzglasphotometer (Shimadzu UV-120). Die Messungen wurden nach 24 und nach 48 h vorgenommen und erfolgten bei 600 nm. Es wurden Extinktionen zwischen 0 und 2 gemessen.

2.7.3 Probenaufarbeitung für die Zuckerbestimmung

Die Probenahme erfolgte nach 48 h Inkubation. Hierzu wurde je 1 ml der zu untersuchenden Bakteriensuspension steril entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 10 min bei 9167 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Spritze abgenommen und über einen 0,2 µm-Cellulose-Filter gegeben (Macherey-Nagel, Düren) und so von übrigen Zellen befreit. Die so gereinigte Probe wurde in HPLC-Vials gefüllt und mittels HPLC untersucht (s. Abschnitt 2.8).

2.8 Bestimmung von Zuckerkonzentrationen nach der Methode von Pfeiffer und Radler (1985)

2.8.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC ist ein schnelles Trennverfahren zur Auftrennung, Identifizierung und Konzentrationsbestimmung von Substanzen. Das zu analysierende Substanzgemisch wird mit Hilfe eines Eluenten (Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch = mobile Phase) auf eine Trennsäule (stationäre Phase) gebracht. Die Säule besteht aus rostfreiem Stahl und ist meist mit Kieselgel gefüllt. An der Oberfläche des Kieselgels sind funktionelle Gruppen gebunden. An diesen Gruppen verharren bestimmte Substanzen länger als andere. Je nach Art der Probe können unterschiedliche Trennmechanismen Anwendung finden: Adsorption durch Van der Waals-Kräfte, Ionenaustausch, Komplexbildung usw. Die Probensubstanzen werden unterschiedlich lang am Säulenmaterial festgehalten und verlassen die Säule nach unterschiedlichen Zeiten. Die Trennung kann durch den Einsatz verschiedener stationärer Phasen, Lösungsmittelgemische sowie Temperatur beeinflusst werden. Die einzelnen

Probekomponenten werden anschließend vom Detektor registriert. Dieser gibt die Information an die Auswerteeinheit weiter, das Ergebnis ist ein Chromatogramm. Die Anzahl der Peaks entspricht im Optimalfall der Anzahl der aufgetrennten Probekomponenten, die Fläche ist deren Menge proportional.

Alle anfallenden Bestimmungen von Zuckern und organischen Säuren in dieser Arbeit wurden durch Ermittlung der Konzentration über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) vorgenommen. Ein Probevolumen von 5 µl wurde in ein HPLC-System injiziert. Die HPLC-Anlage war ausgestattet mit einer Pumpe (Model LC-10AD, Shimadzu, Kyoto, Japan), einem Autoinjektor (Model SIL-10AD, Shimadzu, Kyoto, Japan) und einer Ionenaustauschersäule (HPLC Organic Acid Column Aminex® HPX-87H Ion Exclusion Column 300 mm x 7,8 mm, Biorad, München). Die Detektion erfolgte über ein Refraktometer (Refractive index detector 156, Beckmann Instruments, Krefeld). Die Auftrennung der Zucker geschah bei 65 °C mit eH₂O (MilliQ Systems, Waters-Millipore, Eschborn) versetzt mit H₂SO₄ (0,013 N) bei einer Flussrate von 0,6 ml/min. Die anfallenden Daten wurden mittels Integrator (Model C-R8A, Shimadzu, Kyoto, Japan) aufgezeichnet. Eine Eichung des Systems erfolgte mit Standardlösungen bekannter Konzentration (Tabelle 2.24). Die Standards der Zucker Glucose, Xylose und Arabinose wurden aufgrund ähnlicher Retentionszeiten getrennt von den anderen Substanzen und einzeln eingespritzt, nur so konnte eine genaue Bestimmung der Flächenpeaks erfolgen. Lactat, Acetat, Ethanol, HMF und Furfural wurden zusammen aufgegeben und konnten Basis-Linien getrennt bestimmt werden.

Tabelle 2.24: Zusammensetzung eines HPLC-Standards.

Substanz	Retentionszeit [min]	Konzentration [g/l]	Konzentration [mmol/l]	Fläche [Relative Einheiten]	Response-Faktor [Konzentration/Fläche]
Glucose	9,25	10,02	55,62	1397434	7,17028E-6
Xylose	9,95	10,18	67,81	1493030	6,81835E-6
Arabinose	10,84	10,21	68,01	1562717	6,53349E-6
Lactat	13,00	9,92	110,12	1032040	9,61494E-6
Acetat	15,36	10,50	174,85	837421	1,25385E-5
Ethanol	22,68	7,90	171,48	504164	1,56695E-5
HMF	29,47	10,08	79,93	1811472	5,56454E-6
Furfural	43,25	12,10	125,94	2026177	5,97184E-6

2.9 Analytische Methoden zur PHB-Bestimmung

2.9.1 Untersuchung auf PHB-Bildung

Organismen mit einem Zuckerverbrauch von über 10 % wurden auf Bildung von PHB untersucht. Hierzu wurden neue Vorkulturen der betreffenden Organismen hergestellt (s. oben). Die Hauptkultur bestand aus Mineral Medium (nach Ramsay *et al.* 1990) mit Xylose oder Glucose als einziger C-Quelle (10,00 g/l). 100 ml des Mediums wurden steril in 300 ml Schikanekolben überführt und mit 1 % der Vorkultur angeimpft. Der Ansatz wurde für 3 d bei 150 rpm und entsprechender Temperatur bebrütet. Nach 3 tägiger Inkubationszeit wurden die Versuche beendet und Proben der jeweiligen Ansätze für die qualitative PHB-Messung nach Braunegg *et al.* (1978) vorbereitet (siehe 2.9.3). PHB-positive Proben wurden weiter untersucht. Hierzu wurden die Kulturansätze verdoppelt. 200 ml Mineral Medium wurden steril in 500 ml Schikanekolben überführt und mit 1 % der entsprechenden Vorkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 150 rpm. Eine unbeimpfte Kontrolle wurde entnommen und bei -20 °C für die spätere Zuckerbestimmung aufbewahrt. Die Probenahme erfolgte täglich bis Versuchstag 3 oder 4 (je nach Wachstum). Für die Bestimmung der optischen Dichte, sowie des Zuckerabbaus wurde insgesamt 1 ml Kulturflüssigkeit entnommen. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte im Titertek Photometer (Titertek Multiskan® MKII) bei 620 nm und mit Hilfe einer 1:10-Verdünnung der Kulturflüssigkeit. Die Probenvorbereitung für die Zuckerbestimmung erfolgte wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben. Zur PHB-Bestimmung wurden 40 ml Zellkultur steril entnommen und in ein Falcon-Gefäß bestimmten Gewichts überführt. Die Kultur wurde bei 7320 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit eH₂O gewaschen um Medienbestandteile zu entfernen. Die Trocknung der Zellpellets fand in der Gefriertrocknungsanlage für 1-2 d statt. Nach vollständiger Trocknung wurde das Gewicht der Pellets gravimetrisch bestimmt. Der quantitative PHB-Gehalt der Proben wurde nach der Methode von Riis und Mai (1988) bestimmt (siehe 2.9.4).

2.9.2 Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie ist ähnlich wie die HPLC ein chromatographisches Trennverfahren beruhend auf Verteilung und/oder Adsorption. Voraussetzung ist, dass die zu untersuchenden Substanzen gasförmig vorliegen oder sich durch Verdampfen möglichst unzersetzt in den gasförmigen Zustand überführen lassen. Anders als bei der HPLC ist die mobile Phase hier ein Trägergas. Typische Trägergase für die Gaschromatographie sind Helium, Stickstoff und Wasserstoff. Die Wahl der Trägergase richtet sich nach dem Detektor, der Trennleistung und den Kosten. Die stationäre Phase ist wie bei der HPLC eine Trennsäule mit Trägermaterial. Die Säulen der GC unterscheiden sich allerdings in Beschaffenheit und Länge. Die stationäre Phase kann entweder eine so genannte gepackte Säule sein (Glasrohr oder Stahlrohr gefüllt mit Säulenmaterial) oder eine Kapillarsäule. Diese Kapillarsäulen bestehen aus Quarz

(fused silica) und einer Ummantelung (Polyimid). Sie können unterschiedliche Trennmateriale enthalten. Moderne Kapillarsäulen sind innen häufig mit einem hoch vernetzten Film unterschiedlicher Dicke beschichtet. Die Säulen befinden sich in einem Säulenofen und können je nach Art auf Temperaturen bis zu ca. 450°C beheizt werden. Um eine Probe auf die Trennsäule zu bringen, muss die Substanz, falls sie nicht schon gasförmig vorliegt, im Injektor verdampft werden. Bei den Injektoren für Kapillarsäulen wird wegen der geringen Belastbarkeit dieses Säulentyps meist eine Probenaufgabe unter Stromteilung (splitting) eingesetzt, die so genannte Splitaufgabetechnik. Das Splitverhältnis ist definiert als Quotient des Trägergasstromes durch die Säule und dem Trägergasfluss durch das Splitventil. Substanzen werden also mit dem Trägergasstrom (=mobile Phase) durch eine Trennsäule (= stationäre Phase) transportiert. Sie verweilen, ähnlich wie bei der HPLC-Technik, unterschiedlich lang in der Säule und werden dann am Ende der Trennsäule von einem Detektor registriert, er gibt diese Informationen an die Auswerteeinheit weiter, das Ergebnis ist ein Chromatogramm. Die Anzahl der Peaks entspricht der Anzahl der aufgetrennten Probekomponenten, die Fläche ist deren Menge oder Masse proportional.

In der vorliegenden Arbeit fanden zwei verschiedene GC-Systeme Anwendung. Diese unterschieden sich vor allem in der Art der Detektion. Zum einen wurde ein GC/FID-System verwendet. Der Flammenionisationsdetektor (FID) ist heutzutage der am häufigsten verwendete Detektor. Er verbrennt und ionisiert organische Kohlenwasserstoffe in einer Flamme. Die Erhöhung des Stromflusses beim Ankommen der organischen Verbindungen wird registriert und weitergeleitet. Zum anderen fand ein GC/MS-System Anwendung. Hier werden die Substanzen in einem Ionisationsraum mit Elektronen beschossen. Sie zerfallen auf eine für jede Substanz typische Weise (Massenspektrum). Die entstandenen Fragmente werden in einem Analysatorraum nach dem Verhältnis Masse/Ladung sortiert und durch einen Sekundärelektronenvervielfacher gezählt.

2.9.3 Nachweis von Poly- β -Hydroxybuttersäure in Zellmaterial nach der Methode von Braunegg *et al.* (1978) mittels GC/FID

Ein weit verbreiteter Nachweis der Poly- β -hydroxybuttersäure wurde 1978 von Braunegg *et al.* entwickelt. Hierbei wurde nasse Bakterienzellmasse analysiert. Nach Zentrifugation wurde der wässrige Überstand verworfen. Die PHB im verbleibenden Zellpellet wurde hydrolysiert und methyliert. Eine leicht abgewandelte Methode wurde hier wie folgt angewandt.

2.9.3.1 Derivate und Analyse reiner Substanzen

Zusammensetzung des externen Standards

Die Kalibrierung des Systems erfolgte mit einem externen Standard, der sich aus 25 μ l (R)-(-)-3-Hydroxy-n-Buttersäuremethylester (HBME), 100 μ l Benzoesäuremethylester (BZME) und 25 μ l

Capronsäuremethylester (CSME) zusammensetzte und mit Chloroform auf 10 ml aufgefüllt wurde. Somit kam es zu folgenden Konzentrationsverhältnissen in der Kalibrierungslösung: 2,5 µl HBME/ml, 10 µl BZME/ml und 2,5 ml CSME/ml. Von der Lösung wurden 0,5 µl in das System injiziert. Nach Ermittlung der Flächengrößen für jede Substanz konnte aus dem Verhältnis von Peak-Fläche und Konzentration der jeweiligen Substanz der Response-Faktor ermittelt werden (Tabelle 2.25). Mithilfe dieses Faktors konnten dann die unbekanntenen Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Tabelle 2.25: Zusammensetzung eines externen GC-Standards.

Substanz	Retentionszeit [min]	Fläche [Relative Einheiten]	Konzentration [g/l]	Response-Faktor [Konzentration/Fläche]
CSME	11,34	54248	2,12	3,91E-5
HBME	17,37	35511	2,70	7,60E-5
BZME	20,16	302246	10,00	3,31E-5

Zusammensetzung des internen Standards (IS)

Ein interner Standard wurde zur Erkennung von Probenverlusten während des Analyseverfahrens mitgeführt. Der interne Standard befand sich im Folgenden in der zu messenden Probe und wurde daher gleich der Probe behandelt. Er setzte sich aus Chloroform mit 1 % (v/v) Benzoessäuremethylester und 0,25 % (v/v) Capronsäuremethylester zusammen.

3-Hydroxybuttersäure

Die reine Substanz 3-Hydroxybuttersäure (95%, Sigma-Aldrich) wurde in 2 ml angesäuertem Methanol (3% H₂SO₄) gelöst. Dazu wurde 1 ml Chloroform (das Chloroform enthält die internen Standards in den oben angegebenen Konzentrationen) zugefügt und bei 100 °C für 1 h inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 1 ml H₂O. Es folgte eine Schüttelphase von 10 min. Danach kam es zu einer Phasentrennung, der 3-Hydroxybuttersäuremethylester liegt in der organischen Phase vor. Von dieser Phase wurden 0,5 µl in das GC-System gespritzt. Der Peak des 3-Hydroxybuttersäuremethylesters erscheint bei 17 min.

Poly-β-Hydroxybuttersäure (PHB)

Das Polymer Poly-[(R)-3-Hydroxybuttersäure] (natürlichen Ursprungs, Sigma-Aldrich) wurde in 2 ml angesäuertem Methanol und 2 ml Chloroform gelöst (das Chloroform enthält die internen Standards in den oben angegebenen Konzentrationen). Die Inkubation erfolgte bei 100 °C für 4 h. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 1 ml H₂O. Dieser Ansatz wurde für 10 min geschüttelt. Nach der Trennung der zwei Phasen wurden 0,5 µl der organischen Phase zur GC-Analyse

eingespritzt. Auch hier betrug die Retentionszeit 13,3 min. Somit handelte es sich auch hierbei um den Nachweis des 3-Hydroxybuttersäuremethylesters. Das Polymer konnte zerlegt werden und durch saure Methanolyse verestert werden.

2.9.3.2 Derivatisierung der Poly- β -Hydroxybuttersäure aus Zellsuspensionen

Von den unter Abschnitt 2.9.1 aufgeführten Proben wurden je 10 ml entnommen und bei 3823 x g für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml angesäuertem Methanol (3 % H₂SO₄) resuspendiert und 0,5 ml des internen Standards zugegeben. Die Derivatisierung erfolgte in Kulturröhrchen mit Schraubdeckelverschluss (Schott, Mainz) bei 100 °C für 3,5 h. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur folgte die Zugabe von 0,5 ml H₂O. Die Probe wurde für 10 min geschüttelt. Es folgte die Phasentrennung, wobei sich Zellreste zwischen den beiden Phasen ansammelten. Die organische Phase enthielt den zu untersuchenden 3-Hydroxybuttersäuremethylester. Von dieser Phase wurden 0,5 ml in das GC/FID-System injiziert.

2.9.3.3 GC/FID-System und Temperaturprogramm

Das GC/FID-System bestand aus einem Shimadzu Gaschromatograph GC-14A mit FID (Shimadzu, Kyoto, Japan) und der Kapillarsäule Zebron ZB-Wax (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μ m, Phenomenex, Aschaffenburg). Zur Datenerfassung diente der Integrator C-R6A Chromatopac von Shimadzu. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 0,6 ml/min verwendet. Helium eignet sich für Messungen in höheren Temperaturbereichen, da es nicht so viskos ist. Des Weiteren ist Helium im Vergleich zu Wasserstoff ungefährlich, bei einem Gasleck besteht keine Explosionsgefahr.

Die Messung der Substanzen erfolgte innerhalb eines Temperaturgradienten. Das GC-programm startete mit einer Anfangstemperatur 40 °C für 1 min. Danach folgte ein Temperaturanstieg von 8 °C/min. Das Programm endete mit einer Temperatur von 230 °C die für 10 min gehalten wurde.

2.9.4 Nachweis von Poly- β -Hydroxybuttersäure in Zellmaterial nach der Methode von Riis und Mai (1988) mittels GC/MS

Riis und Mai entwickelten 1988 eine neue Methode basierend auf der Derivatisierung der 3-Hydroxybuttersäure in einen Propylester welcher sich durch Verteilung in einer organischen Phase ansammelt. Der Propylester ist lipophil und somit komplett in der organischen Phase wieder zu finden. Hierbei wurde Bakterientrockenmasse hydrolysiert und methyliert. Eine abgewandelte Methode wurde in dieser Arbeit verwendet.

2.9.4.1 Derivate und Analyse reiner Substanzen

Zusammensetzung des externen Standards

Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurde das Polymer Polyhydroxybuttersäure hydrolysiert und derivatisiert und in verschiedenen Konzentrationen in das GC/MS-System injiziert. Die Kalibrierungslösungen wurden wie folgt hergestellt: Von der PHB-Stammlösung bestehend aus 200 mg Poly-[(R)-3-hydroxybuttersäure] gelöst in 10 ml Dichlorethan (DCE), also 20,02 g/l, wurden je 200 µl, 400 µl, 600 µl und 800 µl entnommen und wie in Tabelle 2.26 aufgeführt verteilt.

Tabelle 2.26: Zusammensetzung der Kalibrierungslösungen für die Eichung des GC/MS-Systems. IS interner Standard, DCE Dichlorethan.

PHB-Stammlsg. [µl]	IS [µl]	DCE [ml]	Propanol +HCl [ml]	H ₂ O [ml]	Volumen ges. [ml]
200	200	1,6	1,0	2,0	5,0
400	200	1,4	1,0	2,0	5,0
600	200	1,2	1,0	2,0	5,0
800	200	1,0	1,0	2,0	5,0

Somit ergaben sich Konzentrationen von 4, 8, 12 und 16 mg PHB pro ml. Mit Berücksichtigung auf das Volumen der organischen Phase (2,32 ml), in welcher das PHB gelöst war ergaben sich folgende Konzentrationen an PHB:

- In 200 µL → 4,004 mg/2,32 mL = 1,73 mg/mL
- In 400 µL → 8,008 mg/2,32 mL = 3,45 mg/mL
- In 600 µL → 12,012 mg/2,32 mL = 5,18 mg/mL
- In 800 µL → 16,016 mg/2,32 mL = 6,90 mg/mL

Mit diesen Werten wurde eine Kalibrierungsgerade aufgezeichnet. Mit Hilfe dieser Geraden konnten die Konzentrationen an PHB aller gemessenen Proben bestimmt werden.

Volumen der organischen Phase

Die Methode von Riis und Mai (1988) beruht auf der Verteilung des Propylesters in die organische Phase. Alle Proben wurden in 2 ml DCE gelöst, mit 1 ml angesäuertem Propanol (Propanol : HCl = 4:1) aufgefüllt und mit 2 ml Wasser versetzt. Nach dem Ausfällen der Substanzen durch Schütteln ergab sich ein Volumen von 2,32 ml für die organische Phase. Dies gründet darauf, dass sich Propanol sowohl

in organischem Lösungsmittel als auch in Wasser löslich ist und dies auch nicht zu gleichen Teilen. Das Volumen der organischen Phase wurde nach der Probenaufarbeitung mittels Hamilton Spritze bestimmt.

Zusammensetzung des internen Standards (IS)

Es wurde ein interner Standard mitgeführt. Dabei handelte sich hierbei um Benzoesäure, welche während der Hydrolyse und Propanolyse in jeder Probe enthalten war und somit als Benzoesäurepropylester nachgewiesen werden konnte. 2 g Benzoesäure wurden in angesäuertem Propanol (Propanol : HCL = 4:1) vollständig gelöst und in einem Messkolben auf 50 ml aufgefüllt. Von der so hergestellten Standardlösung wurden den Proben jeweils 200 µl zugesetzt. Das bedeutet, dass in 200 µL 8,03 mg Benzoesäure gelöst waren. Geteilt durch das Volumen der organischen Phase (2,32 ml) ergab sich eine Konzentration des internen Standards von 3,46 g/L.

Poly-β-Hydroxybuttersäure (PHB)

Die reine Poly-[(R)-3-Hydroxybuttersäure] (natürlichen Ursprungs, Sigma-Aldrich) diente als Referenzsubstanz für das in den Zellproben gemessene PHB. Es wurden ca. 10 mg PHB eingewogen und mit 1,8 ml DCE, 0,2 ml IS und 1 ml angesäuertem Propanol versetzt. Die Hydrolyse erfolgte im Ofen bei 100 °C für 2 h. Während der Inkubation wurde die Probe alle 30 min mittels Schüttelgerät durchmischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit und Abkühlung der Probe auf Raumtemperatur wurden 2,0 ml H₂O zugegeben und die Probe für 10 min geschüttelt. Zum Abschluss wurde die Probe 20 s auf dem Schüttelgerät gemischt. Es folgte die Trennung der zwei Phasen, von denen die obere Phase verworfen wurde. In der unteren, der organischen Phase, befand sich der 3-Hydroxybuttersäure-Propylester. 0,5 µl der organischen Phase wurden in das GC/MS-System injiziert und analysiert.

2.9.4.2 Derivatisierung der Poly-β-Hydroxybuttersäure aus Zelltrockenmasse

Von den unter Abschnitt 2.9.1 aufgeführten Proben wurden jeweils ca. 20 mg Zelltrockenmasse in ein Kulturröhrchen mit Schraubdeckelverschluss überführt. Die Hydrolyse und Propanolyse erfolgte wie bei der reinen PHB (siehe oben).

2.9.4.3 GC/MS-System und Temperaturprogramm

Die GC-Anlage bestand aus dem Shimadzu Gaschromatographen mit Massenspektrometer GCMA-QP 2010 ausgestattet mit einer ZB-5-MS Kapillarsäule (30 m x 0,25 µm ID x 0,25 µm). Die Flussrate des Trägergases (Helium) betrug 0,8 ml/min. Der Temperaturgradient begann bei 40 °C und stieg mit einer Rate von 10 auf 160 °C. Die Endtemperatur von 230 °C wurde mit einer Rate von 40 erreicht und für 5 min gehalten. Die Temperatur der Ionenquelle lag bei 200 °C, die Interfacetemperatur bei 230 °C.

2.9.4.4 Bestimmung der PHB-Konzentration

Die PHB-Konzentration in den Zellen wurde nach Erhalt des Messwertes der GC/MS mit folgenden Formeln berechnet (bei den Zahlenwerten handelt es sich um Beispiele):

Zunächst wurde die Zellkonzentration in g/l ermittelt. Die eingesetzte Zellmasse wurde durch das Volumen der organischen Phase dividiert.

$$\text{Zellkonzentration} \left[\frac{g}{l} \right] = \frac{\text{Zellmasse}}{\text{Volumen organische Phase}} = \frac{26,0 \text{ mg}}{2,3 \text{ ml}} = 11,30 \text{ g/l}$$

Zur Berechnung des PHB-Gehalts pro eingesetzte Zellmasse wurde der Messwert laut GC durch die Zellkonzentration geteilt und mit 100 % multipliziert. Man erhielt nun den PHB-Gehalt in %.

$$\text{PHB} [\%] = \frac{\text{PHB Gehalt GC}}{\text{Zellkonzentration}} = \frac{4,93 \text{ g/l}}{11,30 \text{ g/l}} * 100\% = 43,63\%$$

Nun galt es das eingesetzte Zelltrockengewicht zu bestimmen. Hierzu wurde das Gesamtgewicht des getrockneten Zellpellets durch das Volumen der entnommen Zellkultur dividiert.

$$\text{Zelltrockengewicht} \left[\frac{g}{l} \right] = \frac{\text{Trockengewicht}}{0,04 \text{ l}} = \frac{0,08 \text{ g}}{0,04 \text{ l}} = 2,00 \text{ g/l}$$

Mit Hilfe des Zelltrockengewichts konnte nun der Absolutwert an PHB in g/l bestimmt werden. Hierzu wurde das Zelltrockengewicht durch die Zellkonzentration geteilt und mit dem PHB Messwert laut GC multipliziert. Man erhielt den PHB-Gehalt in g/l.

$$\text{PHB} \left[\frac{g}{l} \right] = \frac{\text{Zelltrockengewicht}}{\text{Zellkonzentration}} * \text{PHB Gehalt GC} = \frac{2,00 \text{ g/l}}{11,30 \text{ g/l}} * 4,93 \text{ g/l} = 0,87 \text{ g/l}$$

2.10 Umsetzung der Xylose des hemicellulosischen Hydrolysats zu PHB

Das Weizenstroh wurde durch folgende, in Abbildung 2.2 dargestellten Arbeitsschritte, zu PHB und anderen wichtigen Grundchemikalien wie Lactat oder Acetat fermentiert werden. Hierzu wurden die nach der Thermodruckhydrolyse entstehenden Fraktionen wie abgebildet verarbeitet.

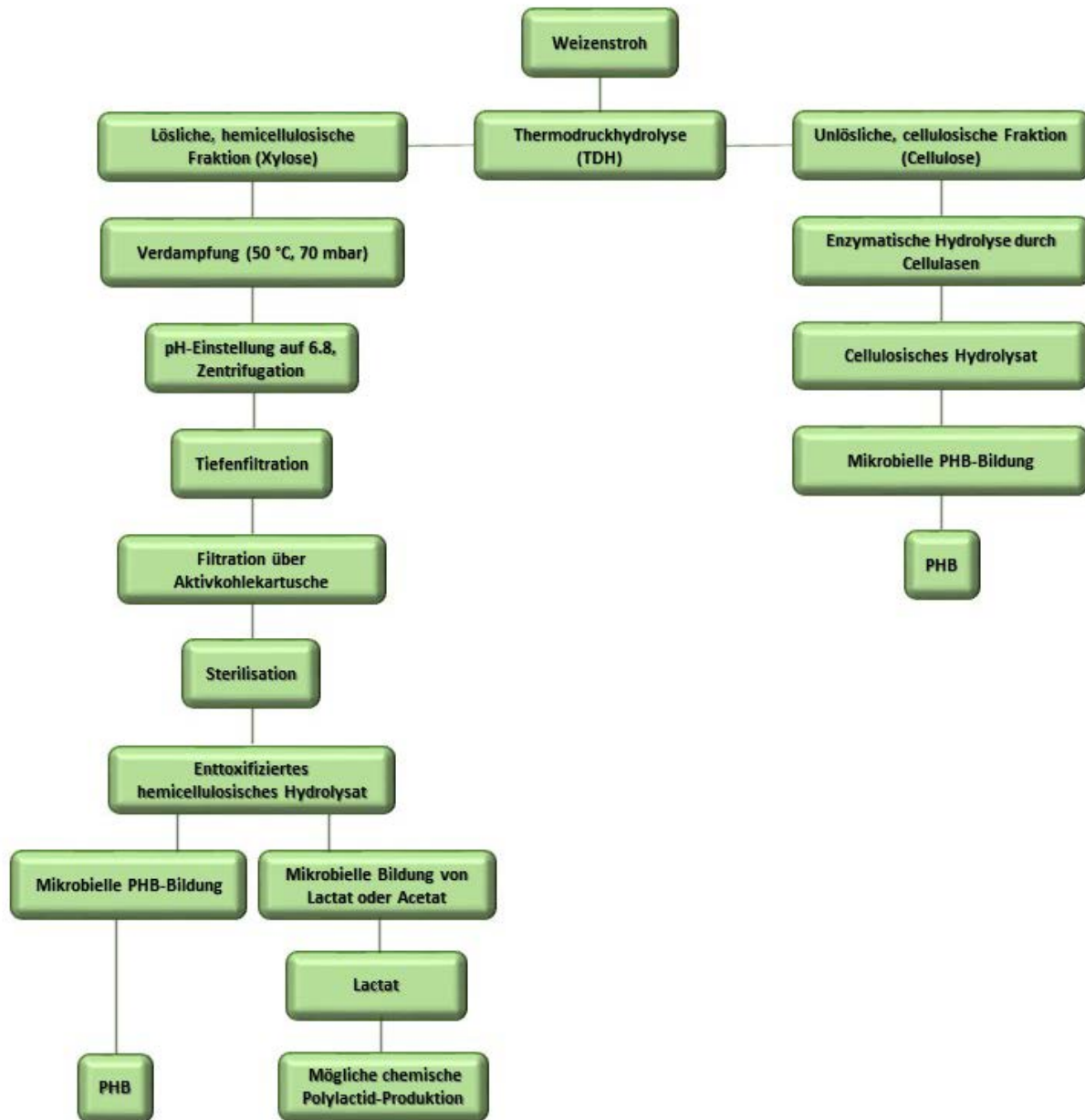


Abbildung 2.2: Übersichtsgrafik Behandlung von Weizenstroh zur Herstellung von Biopolymeren und wichtigen Grundchemikalien.

2.10.1 Herstellung des hemicellulosischen Hydrolysats

Das verwendete Weizenstroh wurde von einem Bauern in der Nähe von Bad Kreuznach bezogen. Die Zusammensetzung des Strohs wurde durch das PFI mit der Methode nach Sluiter *et al.* (2008) bestimmt. Es enthielt 39,6 % Cellulose, 31,1 % Hemicellulose und 17,3 % Lignin. Die Thermo-Druck-Hydrolyse (TDH) des Strohs wurde in einem 125 l Reaktor aus rostfreiem Stahl (Schmitt Company, Weselberg) am PFI durchgeführt. Als Katalysator diente Salpetersäure, der Feststoffanteil betrug 15 % (w/v). Das unbehandelte Stroh wurde in verdünnter Salpetersäure (0,32 % v/v) aufgeschlämmt und bei 150°C für 60 min inkubiert (Ballmann *et al.* 2013). Durch die TDH entstanden zwei Fraktionen. Zum

einen die hemicellulosische Fraktion bestehend aus Zuckermonomeren und Nebenprodukten, zum anderen die cellulose Fraktion bestehend aus dem unlöslichen Strohanteil (Cellulose, Lignin, geringe Mengen Hemicellulose). Die hemicellulosische Fraktion enthielt den Zucker Xylose in großen Mengen, sowie kleinere Mengen an Arabinose und Glucose. Ebenso enthielt sie die Nebenprodukte Furfural, 5-Hydroxymethyl-Furfural (5-HMF) und Essigsäure.

2.10.2 Enttoxifizierung des hemicellulosischen Hydrolysats

Die Herstellung des hemicellulosischen Hydrolysats lieferte eine Reihe zelltoxischer bzw. wachstumshemmender Substanzen wie z.B. Furfural, 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) und phenolische Verbindungen. Diese mussten vor dem Einsatz des Hydrolysats als C-Quelle im Nährmedium entfernt werden. Im Labormaßstab geschah dies durch folgende Arbeitsschritte:

1. Bestimmung der Zuckerkonzentration des hemicellulosischen Hydrolysats mittels HPLC
2. Einengen des Hydrolysats im Rotationsverdampfer bei 50 °C und 70 mbar
3. Einstellen des pH-Wertes auf 6,8 mit 4 N NaOH
4. Zentrifugation der dadurch entstandenen Trubstoffe
5. Tiefenfiltration über einen Tiefenfilter (BECO-KDS 12) mit Überdruck
6. Aktivkohlefiltration über Aktivkohlekartusche (T.G.W.)
7. Abschließende Sterilisation zur Vermeidung von Kontaminationen im Autoklav bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min

Das so enttoxifizierte Hydrolysat konnte nun in den folgenden Tests eingesetzt werden.

2.10.3 Direkte PHB-Produktion mit der Xylose des hemicellulosischen Hydrolysats

Der Einsatz des hemicellulosischen Hydrolysats als C-Quelle für PHB-Produzenten wurde im Folgenden untersucht. Ziel war es, das Hydrolysat als alleinige C-Quelle einzusetzen um, käufliche, reine Zucker wie Xylose und Glucose weitestgehend zu ersetzen. Zwei Organismen der Stammsammlung erwiesen sich als gute PHB-Produzenten mit den zwei Substraten Xylose und Glucose. *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2. In Vorversuchen konnten diese Organismen sowohl mit Xylose als auch mit Glucose hohe Mengen an PHB bilden (Bohn 2012). Des Weiteren wurden auch bekannte PHB-Produzenten der DSMZ untersucht. Diese Organismen waren in der Literatur beschrieben als PHB-Bildner mit dem Substrat Xylose und/oder mit Bagasse-Hydrolysat (Silva *et al.* 2004). Bagasse-Hydrolysat wird aus Zuckerrohr hergestellt und weist somit ähnliche Bestandteile wie das

hemicellulosische Hydrolysat auf. Bei den Organismen handelte es sich um *Hydrogenophaha pseudoflava* DSM 1034 und *Burkholderia sacchari* DSM 17165.

Von den oben beschriebenen Organismen wurde zunächst eine Vorkultur in DSMZ Medium 1 hergestellt. Da die Verträglichkeit auf das Hydrolysat nicht bekannt war, wurde das Mineral Medium (nach Ramsay *et al.* 1990) stufenweise mit Hydrolysat versetzt (Tabelle 2.27 + 2.28). Es wurden jeweils 200 ml Medium in einem 500 ml Schikanekolben angesetzt. So ergaben sich Medien mit Hydrolysatkonzentrationen von 20 %, 40 %, 60 % und 80 %. Für das 100 %ige Hydrolysat-Medium wurde das reine hemicellulosische Hydrolysat verwendet und mit den Bestandteilen des Mineral Mediums versetzt. Die Ansätze wurden mit 1 % der Vorkultur beimpft und bei 30 °C und 150 rpm bebrütet. Eine unbeimpfte Kontrolle wurde entnommen und bei -20 °C für die spätere Zuckerbestimmung aufbewahrt. Die Probenahme erfolgte täglich je nach Wachstum bis Versuchstag 3 oder 4. Hierzu wurden jeweils 40 ml der Kultur steril entnommen, bei 7320 x g zentrifugiert und zweimal mit eH₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde mittels Gefriertrocknungsanlage vollständig getrocknet und die Trockenzellmasse gravimetrisch bestimmt. Ca. 20 mg der so enthaltenen gefriergetrockneten Zellen wurden wie in Abschnitt 2.9.4 beschrieben behandelt und der PHB-Gehalt bestimmt. Auch hier wurde die optische Dichte der Zellkultur im Titertek Photometer bestimmt. Dies erfolgte bei einer Wellenlänge von 620 nm und in einer 1:10 Verdünnung. Die Zuckerkonzentrationen wurden wie unter Abschnitt 2.8 beschrieben ermittelt.

Tabelle 2.27: Medienbestandteile der Mineral Medien unterschiedlicher Prozentigkeit.

Substanz	0 %	20 %	40 %	60 %	80 %	100 %
KH ₂ PO ₄ [g/l]	1,50	1,80	2,10	2,40	2,70	1,50
Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O [g/l]	2,90	3,48	4,06	4,64	5,22	2,90
(NH ₄) ₂ SO ₄ [g/l]	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	1,00
MgSO ₄ x7H ₂ O[g/l]	0,20	0,24	0,28	0,32	0,36	0,20
Fe(NH ₄)citrate [g/l]	0,06	0,072	0,084	0,096	0,108	0,06
CaCl ₂ x2H ₂ O [g/l]	0,01	0,012	0,014	0,016	0,018	0,01
Spurenelementlsg. [ml/l]	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	1,00
Xylose [g/l]	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	0,00

Tabelle 2.28: Pipettierschema für Mineral-Medien (Tab. 2.28) mit hemicellulosischem Hydrolysat.

Hydrolysatkonzentration im Medium [%]	Mineralmedium [ml]	Hydrolysat [ml]
0 %	200 (0 % MM)	0
20 %	160 (20 % MM)	40
40 %	120 (40 % MM)	80
60 %	80 (60 % MM)	120
80 %	40 (80 % MM)	160
100 % ^a	0	200 + 100 % Substanzen

a: Das 100 %ige Medium setzte sich aus hemicellulosischem Hydrolysat versetzt mit Bestandteilen des Mineral Mediums (Tab. 2.28) zusammen.

2.11 Überprüfung der Identität der PHB-bildenden Isolate

Die beiden Bacillus-Stämme der Stammsammlung des IMW *Bacillus circulans* KHC 3 und *Bacillus subtilis* KNaC 2 wurden ursprünglich von Kuhnigk (1996) aus Termitendärmen isoliert. Die Isolate KHC 3 aus *Heterotermes indicola* und KNaC 2 aus *Nasutitermes nigriceps* wurden mit Hilfe von physiologischen Tests durch die Api-Systeme Api 20E und Api CH50 identifiziert (bioMérieux, Mürtingen). Für das PHB-Screening wurden diese Organismen aus einer Cryo-Kultur (Hippe 1991) in DSMZ Medium 1 angeimpft und kultiviert. Nun galt es zu überprüfen, ob es sich bei den neu angezogenen Organismen immer noch um die ursprünglich bestimmten Bacillen handelte.

2.11.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der genomischen DNA aus den beiden Bacillus-Stämmen *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2 wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll für Gram-positive Bakterien wie im Handbuch des Herstellers beschrieben. Als Ausgangsmaterial diente 1 ml Flüssigkultur einer einen Tag alten Vorkultur mit ca. 10^8 - 10^9 Zellen. Die Zellen wurden für 10 min bei 9167 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 180 µl Lyse-Puffer (mit Lysozym) resuspendiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Aufreinigung genomischer DNA erfolgte über eine Silica-Gel-Membran aus dem Kit. Durch Zentrifugation wurde die DNA selektiv an die Membran der DNeasy®-Säule gebunden. Proteine und zweiwertige Kationen wurden in zwei darauffolgenden Waschschrritten mit ethanolhaltigen Puffern von der Säule entfernt. Anschließend wurde die DNA mit 200 µl Puffer (10 mM TRIS, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) nach 5 minütiger Inkubation bei RT von der Säule eluiert. Die DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.11.2 Analyse ribosomaler Gensequenzen

Zur Gattungs- bzw. Artidentifizierung von Prokaryoten werden häufig ribosomale Gensequenzen bzw. die dazwischenliegende Internal Transcribed Spacer (IST)-Region untersucht. Es wird vor allem die small subunit (SSU) der ribosomalen Gensequenz (16S rDNA) zur Identifizierung unbekannter Organismen verwendet. Hier befinden sich hoch konservierte Bereiche am 5'- und 3'-Ende der ribosomalen Gene. Durch Amplifizierung der ribosomalen Gene, deren Sequenzierung und Alignment mit hinterlegten Sequenzen in Datenbanken kann die Gattungs- und Artzugehörigkeit ermittelt werden.

2.11.3 Amplifizierung der 16S rDNA

Die Amplifizierung des 16S rDNA Gens zur Art-Identifizierung der *Bacillien* erfolgte mit den konservierten Primern Eubak 5 und Eubak 3 (Tabelle 2.29). Die Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes ist in Tabelle 2.30 angegeben.

Tabelle 2.29: Verwendete Primer zur Sequenzierung der 16S rDNA. (R) Reverse, (F) Forward, T_m mittlere Schmelztemperatur laut Angaben des Herstellers.

Primer	Sequenz (5'→3')	bp	T_m (°C)
Eubak 3 (R)	5'-AGA AAG GAG GTG ATC C	16	51,4
Eubak 5 (F)	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CT	17	58,8

Tabelle 2.30: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung der 16S rDNA.

Substanz (Stammlösung)	Volumen [µl]	Bezogen auf 50 µl
Forward-Primer: Eubak 5 (10 µM)	1	0,2 µM
Reverse-Primer: Eubak 3 (10 µM)	1	0,2 µM
dNTP-Mix (40 mM)	1	800 µM
MgCl ₂ (25 mM)	2	1 mM ^a
PCR-Puffer (10 x) (enthält 20 mM MgCl ₂)	5	1 x
Enhancer Solution P (5 x)	5	0,5 x
eH ₂ O	32,8	-
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2	2 u
Template-DNA (20 ng/µl)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

a: Die Gesamtkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz betrug 3 mM.

Die Amplifizierung erfolgte unter den in Tabelle 2.31 angegebenen Reaktionsbedingungen in einem Thermocycler.

Tabelle 2.31: PCR-Programm des Thermocyclers.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	56	1
4	Elongation	72	1,5
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Elongation	72	10

2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein Checking-Gel aus 1 % Agarose in TBE-Puffer aufgetragen und gelelektrophoretisch auf ihre Reinheit untersucht. Hierzu wurde die Agarose in 1 x TBE-Puffer gelöst und aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde die Gellösung in einen Gelträger eingegossen. Am Ende des Trägers wurde ein Kamm eingesetzt. Nach Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer, gefüllt mit 1 x TBE-Puffer, eingesetzt. Je 5 ml PCR-Produkt wurden mit 1 µl Ladepuffer (6 x) vermischt und in die geformten Geltaschen pipettiert. Um die Länge der Fragmente nach der Auftrennung bestimmen zu können, wurden 6 µl eines DNA-Längenstandards mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 60 min bei 100 V. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 mg/l) für 15 min inkubiert. Das ungebundene Ethidiumbromid zu entfernen wurde das Gel anschließend für 10 min in eH₂O gewaschen. Das gefärbte Gel wurde in einer Geldokumentationseinheit photographisch dokumentiert.

2.11.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Vor der Sequenzierung mussten die PCR-Produkte aufgereinigt werden um freie Primer, Nukleotide und Taq-Polymerase zu entfernen, welche die Sequenzierung stören könnten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick® PCR Purifikation Kit nach den Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde in 30 µl Elutionspuffer (10 mM TRIS, pH 8,5) aufgenommen.

2.11.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte wurde von der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) als Auftragsarbeit durchgeführt. Die DNA-Sequenzen wurden mit hinterlegten Sequenzen aus der NCBI Datenbank „GenBank“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen (BLAST-Suche).

2.11.7 Bestimmung der *Bacillus*-Arten mit Hilfe physiologischer Tests

Zusätzlich zur molekularbiologischen Bestimmung der Bacillen mittels 16 S rDNA wurden physiologische Tests zur Identifizierung der Arten durchgeführt. Dies geschah mit Hilfe eines *Bacillus*-spezifischen Testkits Microgen® BACILLUS ID (Microgen Bioproducts Ltd, Camberley, UK). Hierzu wurde eine Flüssigkultur mittels Impföse auf einer Platte mit DSMZ Medium 1 ausgestrichen und für 18-24 h bei 30 °C bebrütet. Von der Platte wurden mehrere koloniebildende-Einheiten mit Hilfe einer Impföse in eine isotonische Lösung überführt. Die Lösung wurde sorgfältig durchmischt, bis eine Bakteriensuspension entstand, die äquivalent zu einem McFarland 2.0 Standard war. Dies entsprach einer Bakterienanzahl von 10^6 pro ml. Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette wurden die Vertiefungen der Teststreifen mit 125 µl Bakteriensuspension befüllt. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 30 °C. Nach 24 h wurden die Reaktionen zum ersten Mal bewertet. Nach 48 h erfolgte die finale Auswertung. Hierzu wurden die Reagenzien der biochemischen Reaktionen (siehe Handbuch Hersteller) zugefügt und nach entsprechender Inkubation ausgewertet. Die Ergebnisse wurden auf einem Report-Blatt festgehalten. Die Summe der positiven Reaktionen in einem Triplet bildete eine Zahl eines digitalen Codes. Der Code wurde dann in die Auswertungssoftware (MID-60) eingegeben. Die Software errechnete einen prozentualen Wahrscheinlichkeitswert, um welche *Bacillus*-Art es sich handelte.

2.12 Alternative Umsetzung der Xylose des hemicellulosischen Hydrolysats zu Lactat

Aufgrund des geringen Spektrums an Mikroorganismen, welche Xylose zur PHB-Produktion nutzen, (siehe Ergebnisteil) wurde ein alternativer Weg zur Umsetzung der Xylose des hemicellulosischen Hydrolysats in Betracht gezogen. Hierzu wurden heterofermentative Milchsäurebakterien aus der Stammsammlung des IMW ausgewählt. Ein Großteil dieser Stämme wurde aus Wein isoliert oder sind Typstämme der DSMZ. Die Isolate stammten aus den Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* und *Oenococcus*. Insgesamt wurden 17 Stämme ausgewählt. Auch hier wurde die Verträglichkeit der Organismen mit dem Hydrolysat getestet. Die ausgewählten Stämme der Stammsammlung wurden in Tomatensaftmedium (TM) angezogen und dienten als Vorkultur. Die weiteren Kulturmedien bestanden aus TM und Hydrolysat (Tab. 2.33). Die Menge des zugesetzten Hydrolysats betrug 0-100 % in 10er Schritten. Die Vorkulturen bestanden aus der jeweils niedrigeren Prozentigkeit, somit war die Kultur mit 10 % Hydrolysat die Vorkultur der 20 %igen Kultur usw.. Die Menge der enthaltenen Substanzen im TM wurde entsprechend der Prozentigkeit erhöht (Tabelle 2.32). Das Gesamtvolumen der Kultur betrug 10 ml.

Tabelle 2.32: Medienbestandteile der Tomatensaftmedien (TM) unterschiedlicher Prozentigkeit.

Substanz	0 %	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
Pepton aus Fleisch [g/l]	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	5,0
Trypton [g/l]	20,0	22,0	24,0	26,0	28,0	30,0	32,0	34,0	36,0	38,0	20,0
Hefeextrakt [g/l]	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	5,0
Citronensäure [g/l]	3,0	3,3	3,6	3,9	4,2	4,5	4,8	5,1	5,4	5,7	3,0
Tween 80 [ml/l]	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	1,0
MgSO₄x7H₂O [g/l]	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	0,5
Tomatensaft [ml/l]	250	275	300	325	350	375	400	425	450	475	250
Xylose [g/l]	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	0,0

Tabelle 2.33: Pipettierschema zur Herstellung von TM mit unterschiedlicher Hydrolysat-Konzentration.

Hydrolysatkonzentration im Medium [ml]	Tomatensaftmedium [ml]	Hydrolysat [ml]
0 %	10 (0 % TM)	0
10 %	9 (10 % TM)	1
20 %	8 (20 % TM)	2
30 %	7 (30 % TM)	3
40 %	6 (40 % TM)	4
50 %	5 (50 % TM)	5
60 %	4 (60 % TM)	6
70 %	3 (70 % TM)	7
80 %	2 (80 % TM)	8
90 %	1 (90 % TM)	9
100 %^a	0	10 + 100 % Substanzen

a: Das 100 %ige Medium setzte sich aus hemicelluloseischem Hydrolysat versetzt mit Bestandteilen des Tomatensaftmediums (Tab. 2.33) zusammen.

Die Inkubation der heterofermentativen Milchsäurebakterien erfolgte für 12 d bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben gründlich durchmischt und jeweils 1 ml zur weiteren Untersuchung entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Bestimmung des Wachstums wurde die optische Dichte gemessen. Hierzu wurden die Proben 1:10 verdünnt und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt. Gemessen wurde die Extinktion bei 620 nm mittels des Titertek-Photometers (Labs Systems, Lappeenranta, Finnland). Zur Bestimmung des in den Medien abgebauten

Zuckers, sowie des gebildeten Lactats wurden die Proben bei 9167 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Spritze entnommen und über einen 0,2 µm-Cellulose-Filter gegeben, um Zellrückstände vollständig zu entfernen. Von dem gewonnenen zellfreien Kulturüberstand wurden 0,5 µl mittels HPLC analysiert (Abschnitt 2.8).

Um die ökologische Bilanz der PHB-Bildung zu verbessern, sollten die Organismen vorzugsweise in reinem Hydrolysat wachsen. Deshalb wurde das Wachstum in verschiedenen Kulturmedien mit weniger Bestandteilen getestet. Vor allem der in hohen Mengen zugegebene Tomatensaft sollte entsprechend reduziert werden. Die diversen Medien sind in Tabelle 2.34 aufgeführt.

Tabelle 2.34: Medien für Milchsäurebakterien. Tomatensaftmedium (TM) mit 25 %, 15 % oder 5 % Tomatensaft (Tab. 2.8), Minimal-Milchsäurebakterien-Medium (MMSB, Tab. 2.9), Cystein-Mangan-Mix (CM-Mix, Tab. 2.10).

Substanz	TM 25%	TM 15%	TM 5%	MMSB	CM-Mix
Pepton aus Fleisch [g/l]	5,0	5,0	5,0	2,5	-
Trypton [g/l]	20,0	20,0	20,0	10,0	-
Hefeextrakt [g/l]	5,0	5,0	5,0	-	-
Xylose [g/l]	3,0	3,0	3,0	-	-
Citronensäure [g/l]	1,0	1,0	1,0	1,5	-
Tween 80 [ml/l]	0,5	0,5	0,5	0,5	-
MnSO ₄ xH ₂ O [g/l]	-	-	-	1,9	-
MgSO ₄ x7H ₂ O [g/l]	-	-	-	0,25	1,9
Cystein [g]	-	-	-	1,5	1,5
Tomatensaft [ml/l]	250,0	150,0	50,0	-	-
TDH-Hydrolysat [ml/l]	715,5	815,5	915,5	982,9	996,6

Alle 17 MSB wurden in den verschiedenen Medien für 5 d bei Raumtemperatur angezogen. Danach folgte die Bestimmung der optischen Dichte und somit eine Wachstumsbeurteilung. Durch Messungen mittels HPLC erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der angebotenen Edukte, sowie der entstandenen Produkte.

2.13 PHB-Produktion aus der cellulosischen Reststroh-Fraktion

2.13.1 Aufarbeitung der cellulosischen-Fraktion

Die unlösliche cellulosische Reststroh-Fraktion war durch die Thermo-Druck-Hydrolyse (TDH) bräunlich verfärbt und feucht. Um die Stroh-Chargen länger haltbar zu machen, wurden diese zunächst getrocknet. Zwei Waschschrte mit eH₂O entfernten mögliche Säurereste der TDH. Das gewaschene Stroh wurde über ein grobmaschiges Sieb (2 mm) gegeben und von dem Waschwasser befreit, in Rundkolben überführt und mittels Gefriertrocknungsanlage für 24 h lyophilisiert. Um die Zugänglichkeit für die Organismen/Enzyme an das Stroh zu erhöhen, erfolgte eine mechanische Zerkleinerung des trockenen Strohs. Das Stroh wurde mittels Schere zerkleinert und mit Hilfe einer Kaffeemühle (KSW 3306, Clatronic, Kempten) zu einem feinen Staub gemahlen. Das so behandelte Stroh wurde für weitere Versuche in einem trockenen Gefäß bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.13.2 Hydrolyse der cellulosischen Fraktion durch Organismen

Nach der TDH verblieb neben der flüssigen Xylose-Fraktion eine zweite, feste Fraktion bestehend aus der cellulosischen Reststroh-Fraktion. Dieses enthält zum Großteil Cellulose und Lignin. Der in Form von Glucose gespeicherte Kohlenstoff der Cellulose sollte für die Mikroorganismen zugänglich gemacht und in PHB verstoffwechselt werden. Die PHB-Bildung aus der Reststroh-Fraktion sollte zunächst durch Cellulose-abbauende Mikroorganismen aus der Stammsammlung des IMW gestartet geleitet werden. Die aus Termitendärmen von Kuhnigk (1996) und Wenzel (2001) isolierten Organismen sollten die Cellulose der Reststroh-Fraktion in ihre Glucose-Bausteine zerlegen. Eine Umsetzung der so freigesetzten Glucose in PHB sollte untersucht werden. Es wurden Organismen ausgewählt, bei denen der Abbau von Cellulose beschrieben wurde (Tabelle 2.35), da diese aus Lignocellulose-verwertenden Organismen stammten. Um das Wachstum der Organismen mit der Reststroh-Fraktion als alleiniger C-Quelle zu testen, wurden sowohl Platten als auch Flüssigmedium aus Mineral Medium DSMZ 81 (Tab. 2.5) und Reststroh hergestellt. Für die Herstellung der Platten wurde Mineral-Medium mit 0,3 g/l lyophilisiertem Stroh und 15 g/l Agar versetzt und zu ca. 10 ml in Kulturschalen gegossen. Die erkalteten Platten wurden durch Plattengußverfahren mit den entsprechenden Mikroorganismen beimpft und bei 30 °C bebrütet. Die Flüssigmedien bestanden aus 10 ml Mineral Medium DSMZ 81 im Reagenzglas mit jeweils einem 2 cm langen Stück Stroh dieser Fraktion. Hier wurde zunächst auf den Einsatz von zerkleinertem Stroh verzichtet, um eine bessere optische Beurteilung von Zellwachstum zu ermöglichen, sowie einen eventuellen Abbau des Strohs durch die Organismen zu beobachten. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 130 rpm. Nach 3 Tagen Bebrütung wurde das Wachstum der beiden Ansätze visuell bzw. mikroskopisch beurteilt. Das Wachstum wurde mit – für kein Wachstum, mit + für Wachstum und mit ++ für starkes Wachstum beurteilt.

Tabelle 2.35: Verwendete Cellulose-abbauende Mikroorganismen aus der Stammsammlung des IMW.

Stammsammlungsnummer	Organismus
KMC 7.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KScC 3-1	Cellulosisches Bakterium
KD 12	<i>Bacillus cereus</i>
KD 8-3	<i>Bacillus subtilis</i>
KD 8-1	<i>Bacillus subtilis</i>
KD 8-2	<i>Bacillus subtilis</i>
KMC 12	<i>Bacillus coagulans</i>
KB 1	<i>Bacillus licheniformis</i>
CK 40	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CZ 177d	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
E 3	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
KScC 3-2	Cellulosisches Bakterium

Die Stämme, welche in den Reagenzglasversuchen mit ++, für starkes Wachstum bewertet wurden, wurden weiter untersucht. Hierfür wurde 1 ml der bewachsenen Kultur zentrifugiert und über einen 0,2 µ-Filter filtriert. Von dem so aufgereinigten Überstand wurden 5 µl in das HPLC-System eingebracht und analysiert.

2.13.3 Enzymatische Hydrolyse der cellulosischen Fraktion

2.13.3.1 Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration

Um eine effektive Hydrolyse der im Reststroh enthaltenen Cellulose zu gewährleisten, wurde auf käufliche Cellulasen zurückgegriffen. Diese werden großtechnisch produziert und sind sehr effektiv. Zwei Enzymlösungen der Firma Novozymes erwiesen sich als besonders geeignet: NS 22086, ein Cellulase-Komplex und NS 22083 eine Xylanase. Die im Rahmen dieses Forschungsprojektes angefertigte Diplomarbeit (Bohn 2012) widmete sich der Untersuchung der Eigenschaften dieser Enzyme. Es wurden die optimalen Parameter (pH-Wert, Temperatur) sowie Enzymkonzentration zum Einsatz der beiden Enzyme bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden verwendet, um die Reststroh-Fraktion bestmöglich zu hydrolysieren. Die Enzym-Präparate sollten in Kombination die Glucose aus der Cellulose freisetzen. Im Folgenden wurde getestet in welchen Konzentrationen die Enzyme eine maximale Glucosefreisetzung zeigten. Die restliche Hemicellulose aus dieser Fraktion sollte durch die Xylanase ebenfalls gelöst werden. Des Weiteren wurde untersucht ob bei einem für die Organismen optimalen pH eine ausreichende Menge an Zucker frei wird. Hierzu wurden Testansätze von 100 ml

Medium und je 1 g gefriergetrockneten Reststroh hergestellt. Das eingesetzte Volumen der Enzymlösung des Cellulase-Komplexes NS 22086 lag bei 2,0 ml/l, 3,0 ml/l und 3,5 ml/l. Das der Xylanase bei 1,5 ml/l, 2,5 ml/l und 3,0 ml/l (Tabelle 2.36).

Tabelle 2.36: Verwendete Volumina der Enzymlösungen für die Bestimmung der optimalen Parameter.

Ansatz	Konzentration NS 22086 [ml/l]	Konzentration NS 22083 [ml/l]
1	2,0	1,5
2	3,0	2,5
3	3,5	3,0
4	0,0	0,0

Dieser Ansatz wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Zum einen bei pH 6,8, dies entsprach dem optimalen pH-Wert für das Wachstum der PHB-Produzenten. Zum anderen bei dem gemittelten optimalen pH-Wert der beiden Enzyme (pH 5,25). Die Inkubationsdauer lag bei 5-7 d bei einer Temperatur von 45 °C unter sterilen Bedingungen. Nach 5 d erfolgte die erste Probenahme, nach 7 d die Letzte. Es wurde jeweils 1 ml Probe steril entnommen und die festen Bestandteile des Strohs bei 9167 x g für 10 min ab zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal über einen Zentrifugalfilter (Centrifugal Filter Modified PES 3 K, VWR, Darmstadt) mit einer Ausschlussgröße von 3 K für 45 min bei 9167 x g filtriert. Dies geschah um die Enzyme im Überstand vor der HPLC-Messung zu entfernen. Die durch die enzymatische Hydrolyse gelösten Zucker wurden durch HPLC bestimmt und deren Konzentration wurde gemessen.

2.13.3.2 Bestimmung der optimalen Substratkonzentration

Die PHB-Bildung durch Mikroorganismen erfordert unter anderem einen Überschuss einer C-Quelle (≥ 10 g/l). Deshalb wurde die Konzentration des eingesetzten Reststrohs variiert, um so die optimale Strohkonzentration zu ermitteln. Hierzu wurde die eingesetzte Strohmenge von 10 g/l auf 20 g/l und 30 g/l erhöht. Die verschiedenen Substratmengen wurden in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und mit dem entsprechenden Volumen an Mineral Medium nach Ramsay *et al.* (1990) aufgefüllt. Die Enzyme wurden in folgenden Konzentration zugegeben: 3,0 ml/l NS 22086 und 2,5 ml/l NS 22083. Der pH-Wert betrug 5,25, die Inkubationsdauer lag bei 5-6 d und die Temperatur betrug 45 °C. Die Probenahme und die Bestimmung der Zuckerkonzentration erfolgten wie unter Punkt 2.8 beschrieben.

2.13.4 Vorbehandlung des cellulosischen Stroh-Hydrolysats

Das durch die zwei Enzympräparate produzierte cellulosische Stroh-Hydrolysat sollte als Substrat für die PHB-Bildung durch Mikroorganismen dienen. Das cellulosische Hydrolysat entstanden aus 20 g Stroh/l und einer Enzymkonzentration von 3,0 ml/l (NS 22086) und 2,5 ml/l (NS 22083) (siehe Tabelle 2.36, Ansatz 2) wurde wie folgt vorbehandelt:

- Nach 6 d wurde eine Probe zur Zuckerbestimmung entnommen (siehe oben)
- Filtration über grobmaschiges Sieb (1 mm)
- Filtration über engmaschiges Sieb (0,25 mm)
- Vakuumfiltration über Cellulose-Filter (3 hw)
- Einstellen des pH-Werts auf 6,8
- Dampfsterilisation bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min
- Vakuumfiltration zum Entfernen der durch Sterilisation ausgefällten Proteine
- Zugabe der Mineralsalze (MM nach Ramsay *et al.* 1990, s. Tab. 2.7)
- Dampfsterilisation bei 100 °C für 15 min
- Probe zur Zuckerbestimmung entnommen
- Aufbewahrung bei 4 °C bis zum Gebrauch

2.13.5 PHB-Bildung aus cellulosischem Stroh-Hydrolysat

Das nach enzymatischer Hydrolyse der Reststroh-Fraktion entstandene cellulosische Stroh-Hydrolysat mit den Mineralsalzen wurde zu 200 ml steril in 500 ml Schikanekolben überführt und mit jeweils 1 % der Vorkultur von *Cupriavidus necator* DSM 545, *Cupriavidus necator* NCIMB 11599, *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 150 rpm für 4 d. Nach jedem Versuchstag wurde ein Volumen von 40 ml für die PHB-Bestimmung entnommen. Die Proben wurden abzentrifugiert und das Pellet zwei Mal mit eH₂O gewaschen. Nach der Gefriertrocknung der Zellpellets erfolgte die Bestimmung der PHB-Gehalte nach Riis und Mai (1988, siehe Abschnitt 2.9.4). Die Bestimmung des Zuckergehalts erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie unter 2.8 beschrieben. Die optische Dichte der Zellkultur wurde im Titertek Photometer bestimmt.

2.14 Lösungsmittelfreie Abtrennversuche der PHB

Die Gewinnung der PHB aus den Zielzellen verlief bisher größtenteils mittels Lösungsmittlextraktion. Da Lösungsmittel wie Chloroform oder Methanol zu einer erheblichen Verschlechterung der ökologischen Bilanz des Zielproduktes führen, wurde an einer Alternative zur Abtrennung der PHB aus den Zielzellen geforscht. Hierzu wurden bakteriolytische Enzyme, die durch das IMW erstmalig aus

Streptomyceten isoliert wurden (Blättel *et al.* 2009), untersucht. Von dem Organismus *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 konnte eine Metalloprotease isoliert werden welche hohe lytische Aktivität gegen den Standard-Testorganismus *Micrococcus luteus* aufwies. Aus *Streptomyces albus* konnte eine hoch lytische Subtilisin-ähnliche Protease gewonnen werden (Gasser 2010). Ein ebenso wirksames Lyseenzym wurde bei *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814 beschrieben (Wirth 2007). Da diese Enzyme bei diversen Mikroorganismen eine Lyse der Zellwand bewirkten, sollten auch die PHB-bildenden Zellen von diesen angegriffen werden. Die im Rahmen des Projektes angefertigte Bachelorarbeit untersuchte die Zellyse von dialysiertem Kulturkonzentrat von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 und *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814 auf einige PHB-Produzenten (Kißling 2013).

2.14.1 Herstellung der Arbeitslösung der *Streptomyces*-Stämme

Die entsprechende *Streptomyces*-Stammkultur wurde mittels Impföse auf 5 GYM-Schrägagarröhrchen (DSMZ-Medium 65) überführt und bei 30 °C eine Woche bis zur Entstehung des weißen Luftmycels kultiviert. Aus diesen 5 Röhrchen wurde dann eine Arbeitslösung hergestellt, indem 3 ml Ringerlösung in ein GYM-Röhrchen überführt und mittels Schüttelgerät durchmischt wurden. Es wurde darauf geachtet, dass eine möglichst große Menge des Luftmycels aufgeschwemmt wurde. Die Suspension wurde in das nächste GYM-Röhrchen überführt und genauso verfahren. Das letzte Röhrchen enthielt dann hochkonzentriertes Luftmycel. Dieses wurde in einen Homogenisator aus Glas überführt und mit dessen Hilfe homogenisiert. Die so entstandene Arbeitslösung wurde in ein 15 ml Falcon-Gefäß gefüllt und im Kühlschrank bei 4 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

2.14.2 Kultivierung der *Streptomyces*-Stämme in Fernbachkolben

Streptomyces albidoflavus DSM 40233 und *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814 wurden in Fernbachkolben kultiviert. Diese boten optimale Belüftung der Organismen und das Wachstum eines Luftmycels wurde dadurch gefördert. Die Fernbachkolben wurden zuerst mit heißem Wasser ausgespült und mit eH₂O gefüllt autoklaviert. Die so behandelten Kolben wurden jeweils mit 100 ml NMMP-Medium gefüllt und nochmals autoklaviert. Nach Abkühlung des Mediums wurden die Kolben unter sterilen Bedingungen mit 100 µl der Arbeitslösung beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 60 rpm für 5-6 d.

2.14.3 Herstellung von zellfreiem *Streptomyces*-Kulturfiltrat

Die Kulturmedien von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 und *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814 wurden mit Hilfe einer Vakuumpumpe über ein Filterpapier (Filter Disks Grade 3 hw, dia 90 mm) und eine Nutsche filtriert. Um restliche Zellrückstände zu entfernen, wurde das Filtrat

bei 7855 x g für 30 min bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Spritzenfilter filtriert.

2.14.4 Aufkonzentrierung und Dialyse der lytischen Exoenzyme mittels Vivaspin

Der oben gewonnene zellfreie Kulturüberstand enthielt sämtliche Exoenzyme, welche von den *Streptomyces* in das Kulturmedium abgegeben wurden. Um kleinere Enzyme zu entfernen und den Kulturüberstand aufzukonzentrieren, wurden die Ultrafiltrationsgefäße Vivaspin 50 (Satorius, Göttingen) verwendet. Diese zeichnen sich durch eine nominale Ausschlussgrenze von 5 kDa aus. Der Überstand wurde portionsweise in die Gefäße überführt und bei 8000 x g und 4 °C in der Zentrifuge eingengt. Danach erfolgten die Dialyse mit 20 mM Phosphatpuffer (Tab. 2.16) und eine 10-fache Aufkonzentrierung in den Vivaspins. Der so gebildete Überstand bestand aus einer hochkonzentrierten Enzymlösung welche die lytischen Exoenzyme enthielt.

2.14.5 Nachweis der lytischen Aktivität der Exoenzyme

Die lytische Aktivität der durch *Streptomyces* gebildeten Exoenzyme wurde photometrisch als Abnahme der optischen Dichte der Zielzellen bei 600 nm bestimmt.

2.14.6 Lyseaktivität gegen *Micrococcus luteus*

Die Lyseaktivität gegen *Micrococcus luteus* diente als Positivkontrolle. 1950 µl einer Lyse-Testsuspension aus gefriergetrockneten *M. luteus* Zellen wurde mit 50 µl Enzymlösung versetzt. Die optische Dichte wurde zum Zeitpunkt t_0 sowie zum Zeitpunkt t_1 nach 24 h Inkubation gemessen. Die Extinktionsabnahme wurde prozentual gegen den Ausgangswert bestimmt.

2.14.7 Lyseaktivität gegen PHB-Produzenten

Die Lyseaktivität gegen drei ausgewählte PHB-produzierende Stämme wurde ermittelt: *Cupriavidus necator* DSM 428, *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2. Die Stämme wurden unter optimalen Bedingungen zur PHB-Bildung angezogen. Also in Mineral-Medium nach Ramsay *et al.* (1990, Tab. 2.7) mit Glucose als C-Quelle für *Cupriavidus necator* DSM 428 und mit Xylose als C-Quelle für die beiden *Bacillus*-Stämme. Nach drei Tagen Anzucht von jeweils 1 l Kultur bei 30 °C und 150 rpm wurden diese in Zentrifugenbechern bei 11300 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet wurde zwei Mal mit eH₂O gewaschen. Die Zellen der Pellets wurden in einer geringen Menge eH₂O resuspendiert und in einen Rundkolben überführt. Die Trocknung der Zellen durch Lyophilisation erfolgte für 2 Tage an der Gefriertrocknungsanlage (LYOVAC GT 2, LD Didactic GmbH, Hürth). Die getrockneten Zellen wurden bis zum Gebrauch in einem Gefäß bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Herstellung der Lyse-Testsuspension wurden die Zellen in 10 mM Phosphatpuffer (Tab. 2.15) bis zu einer optischen Dichte von 0,8-1,0 suspendiert. Von dieser

Testsuspension wurden 1950 µl mit 50 µl Enzymlösung versetzt. Die optische Dichte wurde an den Zeitpunkten t_0 und t_1 nach 24 h gemessen.

2.14.8 Bestimmung des pH-Optimums der lytischen Exoenzyme

Es galt herauszufinden, bei welchem pH-Wert die Enzyme die Zellen optimal lysieren. Die pH-Werte 4,0; 5,0 und 6,0 wurden wie gewohnt mit einer Testlösung aus 10 mm Phosphatpuffer (Tab. 2.15) bestimmt. Für die pH-Werte 7,0; 8,0 und 9,0 wurde eine Testlösung mit Universalpuffer (Tab. 2.18) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 30 °C.

2.14.9 Bestimmung des Temperaturoptimums der lytischen Exoenzyme

Nachdem der optimale pH-Wert für die Zellyse der einzelnen PHB-bildenden Stämme fest stand, wurde das Temperaturoptimum ermittelt. Dazu wurden die Lyse-Testlösungen mit dem jeweiligen pH-Optimum weiterverwendet. Nach Zugabe von 50 µl dialysiertem Enzym-Konzentrat wurden die Ansätze für 24 Stunden bei 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C und 60 °C inkubiert.

2.14.10 Vorhergehende Schädigung der Zellwand von *Cupriavidus necator*

Da es sich bei dem PHB-Produzenten *Cupriavidus necator* DSM 428 um ein Gram-negatives Bakterium handelte, ist es durch seine äußere Membran gegen Lyseenzyme geschützt. Um den Lyseenzymen einen Angriffspunkt zu geben, wurde versucht, die Zellwand des Organismus zu schädigen. Dies geschah entweder durch die Verwendung von Detergenzien, Komplexbildner oder durch mechanische Schädigung mittels Ultraschall.

2.14.11 Schädigung der Zellwand durch Detergenzien bzw. Komplexbildner

Getestet wurden verschiedene Detergenzien bzw. Komplexbildner in folgenden Konzentrationen:

- 0,5 % SDS
- 2,5 mM EDTA
- 0,5 % Tween
- 0,5 % Triton

Dazu wurde jeweils das entsprechende Volumen der Lyse-Testsuspension pH 6,0 durch Detergenzienlösungen ersetzt (Tabelle 2.37). Die so präparierten Ansätze wurden eine Stunde bei 30 °C inkubiert und dann für weitere 20 min bei 9167 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Puffer resuspendiert. Den Ansätzen wurden 50 µl dialysiertes Konzentrat zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei optimaler Temperatur.

Tabelle 2.37: Pipettierschema zum Einsatz der Detergenzien bzw. Komplexbildner zur Schädigung der Zellwand von *Cupriavidus necator* DSM 428.

Endkonzentration des Detergens	Volumen der Lyse-Test suspension [µl]	Volumen der Detergens-Stammlösung [µl]
2,5 mM EDTA	1900	50 µl 0,1 M EDTA-Lösung
0,5 % SDS	1850	100 µl 10 %ige SDS-Lösung
0,5 % Triton	1850	100 µl 10 %ige Triton-Lösung
0,5 % Tween	1850	100 µl 10 %ige Tween-Lösung

2.14.12 Schädigung der Zellwand durch Ultraschallbehandlung

Als zusatzfreie Alternative zur Detergenzienbehandlung wurde Ultraschall getestet. Die Lyse-Test suspension von *Cupriavidus necator* DSM 428 wurde vor Enzymzugabe mit verschiedenen Ultraschallgeräten (Schallgerät Branson Sonifer, Branson Ultrasonics, Danbury; Ultraschallbad Sonorex RK 106, Bandelin Electronics, Berlin) unterschiedlichen Behandlungsdauern ausgesetzt. Im Ultraschallbad für 5 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min. Im Schallgerät mit Ultraschallrüssel für 5 min, 10 min und 15 min. Nach der Behandlung wurden die Testansätze autoklaviert und anschließend mit 50 µl der dialysierten Konzentrate von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 und *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814 versetzt und für 24 h bei optimaler Temperatur (40 °C) inkubiert.

2.14.13 Aufreinigung der Exoenzyme von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 mittels Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)

Die Fast Protein Liquid Chromatographie ist eine Form der Flüssigkeitschromatographie (2.8.1). Sie findet Anwendung in der Trennung und Aufreinigung von Proteinen in komplexen Gemischen. Die FPLC-Anlage (GE Healthcare, München) ist für diverse Reinigungs- und Trennungsmethoden geeignet. Abhängig von der gewählten Methode werden verschiedenen Säulen verwendet z.B. Kationen- bzw. Anionenaustauschersäulen oder Gelfiltrationssäulen. Die hier verwendete Kationenaustauschersäule Mono S™ HR 5/5 (GE Healthcare, München) enthielt Mono S Kügelchen mit einer Partikelgröße von 10 µm als stationäre Phase. Die geladene Gruppe bestand aus -CH₂-SO₃⁻-Gruppen. Die mobile hydrophile Phase war ein Puffer (Tab. 2.19). Je positiver eine Substanz in der zu trennenden Probe war, desto länger war sie an der Säule gebunden und wurde von dieser zurückgehalten. Die von der Säule eluierten Bestandteile des zu trennenden Proteingemischs wurden mit einem UV-Detektor bei 280 nm gemessen und durch einen Recorder visuell dargestellt. Die verwendete FPLC-Anlage (GE Healthcare, München) bestand aus folgenden Elementen:

- High precision pump P-500 (2x)
- Gradient programmer GP-250
- Single Path Monitor UV-1 (Control Unit)
- Single Path Monitor UV-1 (Optical Unit)
- Fraction Collector FRAC-100
- Recorder REC-481

Der Säule wurde ein 50 ml Superloop vorgeschaltet, um ein größeres Volumen des Proteingemischs aufzutrennen und eine ausreichende Menge an aktiven Enzym zu erhalten. Als mobile Phase bei der Auftrennung des Kulturkonzentrats von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 diente ein Acetatpuffer (Tab. 2.18, 20 mM, pH 6,0) ohne und mit 1 M NaCl. Durch den linear steigenden Salzgradienten während eines Laufs wurden die gebundenen Kationen immer mehr verdrängt und ausgewaschen. Es wurden eine Flussrate von 1 ml/min und ein Papiervorschub des Schreibers von 0,5 cm/ml gewählt. Das Volumen der aufgefangenen Fraktionen betrug 1 ml. Die lytisch aktiven Fraktionen wurden im photometrischen Test ermittelt (siehe 2.14.6).

2.14.14 Bestimmung freier 3-Hydroxybuttersäure mittels HPLC

Um eine Depolymerisation der PHB durch Esterasen und Lipasen in der teilgereinigten Enzymlösung auszuschließen, wurde mittels HPLC untersucht, ob sich freie 3-Hydroxybuttersäure (3-HB) im Lyseüberstand befand. Hierzu wurde das HPLC-System (s. 2.8) mit reiner 3-Hydroxybuttersäure in Acetatpuffer kalibriert. Die Konzentration der 3-HB betrug 13,6 g/l. Die Detektion der selbigen erfolgte nach 14,15 min. Gemessen wurden die Überstände der Kontrollen (Zellen ohne Enzymzugabe) sowie die Überstände von den drei PHB-Produzenten und der Negativkontrolle *Micrococcus luteus* nach 5 tägiger Inkubation mit dem teilgereinigtem Enzym nach Kationenaustauschchromatographie.

3 Ergebnisse

Der Nachweis von PHB sollte möglichst einfach, schnell und praktikabel von statten gehen. Zusätzlich sollte der Nachweis möglichst präzise sein. Während der Versuchsphase fanden zwei verschiedene Methoden zum Nachweis von PHB in Zellmaterial Anwendung. Der Vergleich dieser Methoden ist in Kapitel 3.1 dargestellt.

3.1 Methodenvergleich zur quantitativen Bestimmung von PHB in Zellmaterial

Die Quantifizierung der PHB sollte zunächst durch die Methode nach Braunegg *et al.* (1978) stattfinden. Diese Methode beruht auf einer sauren Methanolyse und fand Anwendung in zahlreichen Arbeitsgruppen und deren Publikationen (Lageveen *et al.* 1988, Brandl *et al.* 1988, Gross *et al.* 1989, Timm und Steinbüchel 1990, Huijberts *et al.* 1994, Jan *et al.* 1995 und Kato *et al.* 1996). Während der Bestimmung des PHB-Gehalts nach Braunegg *et al.* (1978) stellte sich allerdings heraus, dass die Methode zwar reproduzierbar war, jedoch nicht die gesamte Menge an PHB wiedergefunden werden konnte. Es wurde festgestellt, dass die Nachweissubstanz der PHB nach saurer Methanolyse – der 3-Hydroxybuttersäuremethylester - sowohl in der organischen als auch in der wässrigen Phase nachzuweisen war. Es wurde vermutet, dass dies auf einen schlechten Verteilungskoeffizient des 3-HBME nach der Phasentrennung zurückzuführen war. Eine Überprüfung fand statt, indem Versuche zur Wiederfindungsrate von 3-HBME in den beiden Phasen durchgeführt wurden. Hierbei erfolgte die Berechnung über die Fläche der 3-HBME-Peaks, unter der Annahme, dass die Flächen von wässriger und organischer Phase gemeinsam 100 % entsprachen. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Wiederfindungsraten der PHB-Nachweissubstanz 3-HBME nach der Methode nach Braunegg *et al.* (1978).

Probe	Einwaage PHB [g/ml]	Phase	Ermittelte Flächen des PHB-Peaks	Wiederfindung 3-HBME [g/l]	Anteil PHB [%]
1	0,202	wässrig	72725	0,070	35
		organisch	136927	0,132	65
2	0,202	wässrig	85103	0,082	41
		organisch	125615	0,120	59

Somit wurde durch die in Tabelle 3.1 angegebenen Daten eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von ca. 62 % dokumentiert. In der wässrigen Phase wurden noch ca. 38 % der PHB-Nachweissubstanz wiedergefunden.

Aufgrund der unvollständigen Wiederfindung der PHB Nachweissubstanz 3-HBME wurde die Methode nach Riis und Mai (1988) zur Quantifizierung der durch die Organismen gebildeten PHB verwendet. Auch hier wurde die Wiederfindungsrate der PHB Nachweissubstanz kontrolliert. Hierbei handelte es sich um den 3-Hydroxybuttersäurepropylester. Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Wiederfindungsrate der PHB-Nachweissubstanz 3-HBPE in der organischen Phase bei der Anwendung der Methode nach Riis und Mai (1988).

Probe	Einwaage an PHB	Ermittelte PHB-Konzentration nach GC/MS- Analyse		Abweichung
	[g/l]	[g/l]	[%]	[%]
1	4,478	4,324	96,56	3,44
2	4,478	4,339	96,90	3,10
3	4,478	4,364	97,45	2,55
4	2,348	2,408	102,56	2,56
5	2,348	2,423	103,19	3,19
6	2,348	2,357	100,38	0,38
Mittlere Abweichung				2,5

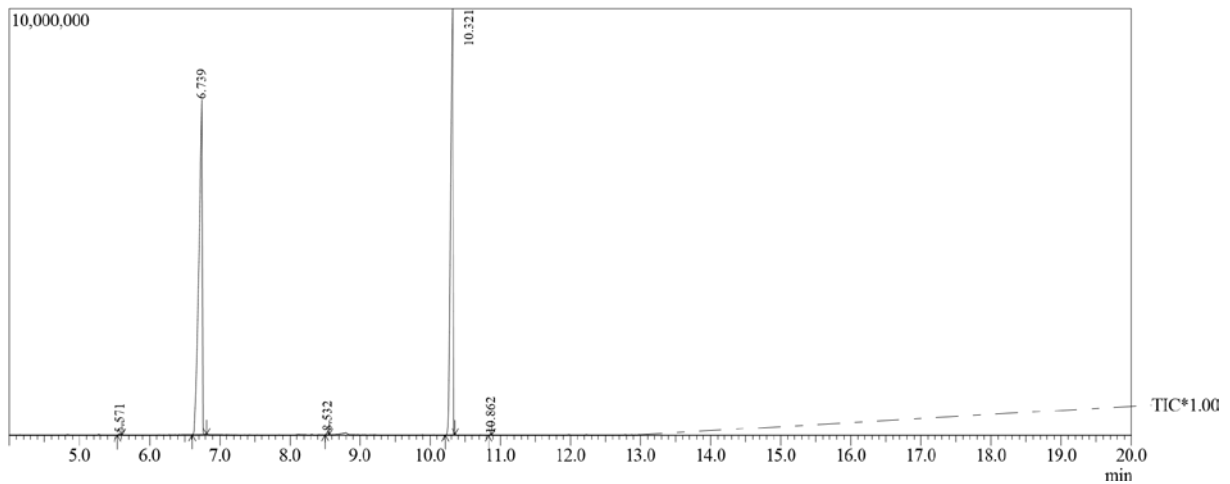
Die Abweichungen zwischen den eingewogenen Konzentrationen und den durch die GC/MS ermittelten Konzentrationen betragen maximal 3,4 % (Tabelle 3.2). Nach der Messung von sechs Kontrollen konnte eine mittlere Abweichung von ca. 2,5 % ermittelt werden. Somit war dies die Methode der Wahl zur quantitativen Bestimmung von PHB in Zellmaterial.

Die Quantifizierung der PHB durch die Methode von Braunegg *et al.* (1978) war ungeeignet, sie wurde nur noch für die Screening-Tests angewandt. Die genaue Bestimmung der gebildeten PHB wurde nun nach der Methode von Riis und Mai (1988) durchgeführt, welche auf einer sauren Propanolyse beruht. Zum Vergleich sind die beiden Methoden in Tabelle 3.3 gegenübergestellt.

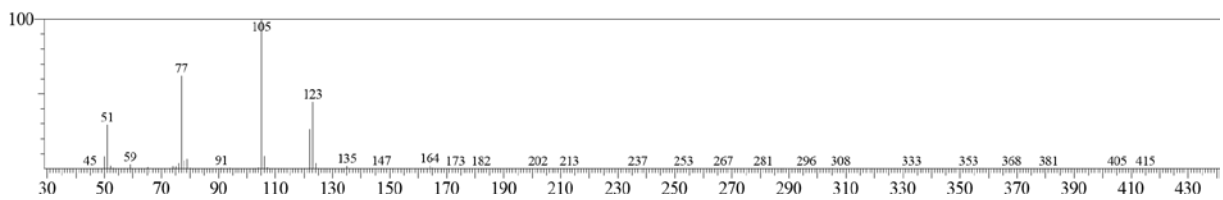
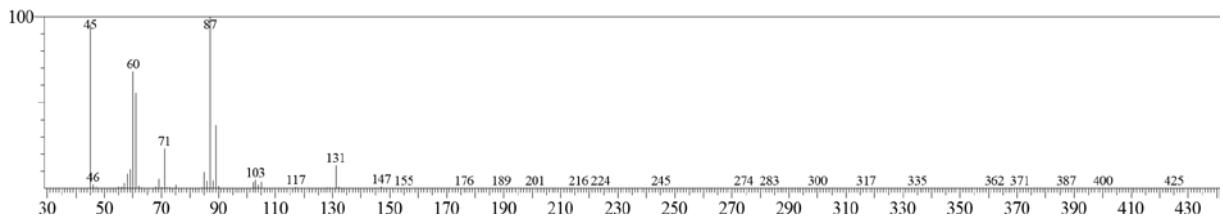
Tabelle 3.3: Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung von PHB in Zellmaterial.

Methoden	Braunegg <i>et al.</i> (1978)	Riis und Mai (1988)
Nachweis-Reaktion	Saure Methanolyse	Saure Propanolyse
Zellmaterial	nass	getrocknet
Reagenzien	→ Methanol mit 3 % v/v H ₂ SO ₄ → eH ₂ O	→ 1,2-Dichlorethan (DCE) → 1-Propanol mit 20 % v/v HCl → eH ₂ O
Interner Standard	Chloroform → 1 % (v/v) Benzoessäuremethylester → 0,25 % (v/v) Capronsäuremethylester	1-Propanol → 1 % (v/v) Benzoessäure
PHB-Nachweissubstanz	3-Hydroxybuttersäuremethylester (3-HBME)	3-Hydroxybuttersäurepropylester (3-HBPE)
Wiederfindungsrate	59-65 %	97-103 %

Abbildung 3.1 zeigt ein typisches GC/MS-Chromatogramm. Es bildet den Hydroxybuttersäure-Propylester (HBPE) sowie den internen Standard, Benzoessäurepropylester (BZPE), ab. HBPE hatte eine Retentionszeit von 6,7 min und Fragmente mit den Hauptmassenzahlen 45, 60, 71 und 87 entstanden. BZPE erschien nach 10,3 min und hatte Fragmente der Massenzahlen 51, 77, 105 und 123.



①



②

Abbildung 3.1: Nachweis von PHB mittels GC/MS nach Riis und Mai (1988).
 ① Chromatogramm mit Hydroxybuttersäure-Propylester (HBPE)- und Benzoessäurepropylester (BZPE)-Peak, ② Massenspektrum der beiden Substanzen mit Massenzahlen der entstehenden Fragmente.

3.2 PHB-Bildung mit dem Substrat Xylose

Die Verwertung von Xylose und eine PHB-Produktion in Mineral Medium (nach Ramsay *et al.* 1990) wurden für die in Tabelle 3.4 aufgeführten Bakterien untersucht. Der qualitative PHB-Nachweis erfolgte nach Braunegg *et al.* (1978).

Tabelle 3.4: Screening der Stammsammlung des IMW nach Mikroorganismen, welche mit Xylose als einziger C-Quelle PHB bilden. Messung der optische Dichte nach 24 und 48 h, Xylose-Abbau in %, PHB-Bildung qualitativ.

Organismus	Stamm-Nr.	OD $t_{24\text{ h}}$	OD $t_{48\text{ h}}$	Xylose-Abbau [%]	PHB-Bildung $t_{72\text{ h}}$
<i>Alcaligenes faecalis</i>	11 KD 10	>2	>2	100,00	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MX 4	>2	>2	95,26	-
Isolat aus Rinderpansen	B 1	2,00	>2	92,78	-
Isolat aus Rinderpansen	B 4	>2	>2	81,44	-
Isolat aus Rinderpansen	B 5	1,96	2,53	80,20	-
<i>Bacillus oleronius</i>	Rt 10	1,74	>2	76,25	-
<i>Bacillus coagulans</i>	KMC 12	>2	>2	73,07	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KAE 14	>2	>2	67,67	-
Kokkenförmiges Isolat	E 2	>2	>2	64,33	-
Cellulosisches Bakterium	KScC 3-1	>2	>2	61,14	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	KMB 1-1	>2	>2	59,20	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KMaC 1	1,04	>2	56,24	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KP 1	1,72	>2	55,89	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	CZ 177d	1,89	>2	55,45	-
Isolat aus Rinderpansen	C 3	>2	>2	55,01	-
<i>Bacillus cereus</i>	Rt 11a	1,81	>2	54,50	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KHC 1	1,86	>2	53,72	-
<i>Pseudomonas putida</i>	M 4	>2	>2	50,32	-
Isolat aus Rinderpansen	C 2	>2	>2	49,94	-
Isolat aus Rinderpansen	B 3	>2	>2	46,59	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KNaC 2	1,93	>2	46,07	+

Fortsetzung Tabelle 3.4

<i>Bacillus circulans</i>	KHC 3	>2	>2	45,97	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KMC 7.1	0,58	0,76	44,55	-
Celluluooytisches Bakterium	KScC 3-2	0,19	0,65	41,75	-
Isolat aus Rinderpanen	A 1	>2	>2	41,66	-
Isolat aus Rinderpanen	A 2	>2	>2	41,63	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8b	1,11	1,61	36,81	-
<i>Rhizobium spec.</i>	CZ 71	0,00	0,70	36,59	+
Isolat aus Rinderpanen	A 3	>2	>2	36,42	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	KF 12	0,34	>2	36,39	+
<i>Citrobacter koseri</i>	KNC 1	1,57	1,63	35,12	-
<i>Bacillus cereus</i>	KD 12	0,24	0,26	33,46	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	KMB 1-2	0,41	0,33	33,30	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KNC 1	1,43	1,38	32,94	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	NX 3	0,59	0,82	32,35	-
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	E 3	0,80	1,24	32,15	+
<i>Klebsiella terrigena</i>	HB	1,35	1,70	30,56	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8a	0,34	0,35	29,36	+
Isolat aus TNT-Boden	M 2	1,12	1,94	28,36	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8c	0,70	1,62	28,42	+
<i>Bacillus licheniformis</i>	KB 1	0,37	0,84	28,05	-
<i>Serratia spec.</i>	M 1	1,43	>2	26,67	-
<i>Micromonospora aurantica</i>	CK 2	1,22	1,63	26,18	-
Isolat aus Rinderpanen	B 2	1,43	>2	25,33	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KMaC 5	0,81	1,08	24,68	-
Kokkenförmiges Isolat	WX-1	0,37	0,33	23,72	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KMaC 3	0,78	2,00	23,42	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KScC 2	1,06	1,82	23,28	+
Isolat aus TNT-Boden	M 3	1,21	1,75	23,11	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KHC 4	1,23	>2	23,04	-

Fortsetzung Tabelle 3.4

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CK 40	0,26	0,34	20,97	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	NA 2	1,22	1,75	20,53	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KMaC 2	0,62	1,70	20,28	+
<i>Cellulomonas cellulans</i>	DSM 43879	1,06	1,76	19,52	+
<i>Cellulomonas spec.</i>	ZC 1	0,31	1,72	19,09	+
<i>Isoptericola variabilis</i>	MX 5	1,14	1,76	18,93	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	13 KD 10	0,28	0,22	18,79	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KNeC 1	0,88	1,81	18,32	+
<i>Cellulomonas spec.</i>	KMaC 4	0,23	1,75	18,11	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KScC 6	1,22	0,62	16,19	-
Isolat aus <i>B. cereus</i>	NX 2	0,21	0,25	15,65	-
<i>Bacillus circulans</i>	DSM 596	0,04	1,02	15,62	-
<i>Sphingomonas spec.</i>	CZ 326a	0,44	1,18	14,23	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMX 4	0,00	0,31	12,22	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMC 14	0,20	0,50	12,11	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMC 5	0,19	0,44	11,28	-

Insgesamt wurden 118 Mikroorganismen auf Wachstum mit Xylose überprüft. Von den 118 untersuchten Organismen zeigten 67 eine Xylose-Verwertung von über 10% (Tab. 3.4). Von diesen 67 Organismen waren lediglich 13 zur PHB-Bildung befähigt. Somit konnten ca. 10 % der untersuchten Mikroorganismen (MO) aus der Stammsammlung des IMW konnten PHB aus Xylose bilden (Abb. 3.2).

3.3 PHB-Bildung mit dem Substrat Glucose

Des Weiteren wurde die Stammsammlung des IMW auf geeignete Organismen zur Glucose Umsetzung im Mineral Medium geprüft. Diese sollten später, die aus dem Reststroh gelöste Glucose in PHB, umsetzen. Getestet wurde in Mineral Medium (Tab. 2.7) mit Glucose als einziger C-Quelle. Wurde hier reges Wachstum nachgewiesen, folgte die Überprüfung auf PHB-Produktion. Die untersuchten Organismen mit einem Glucose-Abbau von über 10% sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Screening der Stammsammlung des IMW nach Mikroorganismen, welche mit Glucose als einziger C-Quelle PHB bilden. Messung der optische Dichte nach 24 und 48 h, Xylose-Abbau in %, PHB-Bildung qualitativ.

Organismus	Stamm-Nr.	OD t ₂₄	OD t ₄₈	Glucose-Abbau [%]	PHB-Bildung
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MX 4	1,97	>2	100,00	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	11 KD 10	>2	>2	100,00	-
<i>Bacillus cereus</i>	Rt 11a	>2	>2	100,00	-
<i>Bacillus oleronius</i>	Rt 10	1,96	>2	100,00	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KAE 14	1,78	>2	100,00	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KP 1	1,92	>2	100,00	-
Isolat aus Rinderpansen	B 3	1,14	>2	100,00	-
Isolat aus Rinderpansen	B 4	1,80	>2	100,00	-
Isolat aus Rinderpansen	B 5	1,90	>2	100,00	-
Isolat aus Rinderpansen	C 2	>2	>2	100,00	-
Isolat aus Rinderpansen	C 3	>2	>2	100,00	-
<i>Klebsiella terrigena</i>	HB	>2	>2	100,00	-
Isolat aus TNT-Boden	M3	1,80	>2	99,04	-
<i>Serratia spec.</i>	M1	1,48	1,91	98,55	-
Isolat aus TNT-Boden	M2	1,35	1,90	92,86	-
Isolat aus Rinderpansen	A 2	0,85	1,09	84,07	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	KBf 2	1,03	1,76	80,94	-
Isolat aus Rinderpansen	A 3	1,13	1,16	74,90	-
Isolat aus Hydrolysat	E1	>2	>2	72,64	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KScC 4	0,79	1,54	68,77	-
<i>Bacillus circulans</i>	KHC 3	>2	>2	66,04	+
<i>Bacillus licheniformis</i>	KB 1	1,78	>2	65,30	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8c	>2	>2	62,81	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	Rt 6b	0,44	1,50	62,43	-
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	KMA 4	>2	>2	61,64	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8b	>2	>2	58,24	-

Fortsetzung Tabelle 3.5

<i>Burkholderia cepacia</i>	KF 12	1,39	1,79	57,73	+
<i>Cellulomonas spec.</i>	KMaC 5	1,01	>2	57,11	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KMC 13	1,35	>2	56,17	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KScC 2	1,65	>2	53,31	+
<i>Bacillus subtilis</i>	KNC 1	1,21	1,20	52,58	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	ZC 1	1,69	>2	52,12	+
<i>Cellulomonas spec.</i>	KMaC 4	1,24	>2	51,71	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CK 40	>2	>2	50,08	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMX 5	0,58	>2	45,98	+
<i>Cellulomonas spec.</i>	KNeC 1	1,02	>2	45,85	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KMC 2	0,98	1,82	45,65	-
<i>Bacillus cereus</i>	KD 12	>2	>2	45,23	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMC 14	0,73	>2	44,78	+
<i>Cellulomonas spec.</i>	NA 2	1,74	>2	42,47	+
<i>Citrobacter koseri</i>	KNC 1	1,23	1,23	42,46	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KMaC 3	1,48	>2	42,05	+
<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8a	>2	>2	41,46	-
<i>Comamonas acidovorans</i>	KNB 3	0,28	>2	41,55	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KScC 6	1,92	>2	41,28	+
<i>Cellulomonas spec.</i>	KMaC 2	1,02	1,97	38,56	+
<i>Cellulomonas cellulans</i>	DSM 43879	1,91	>2	37,92	+
<i>Isoptericola variabilis</i>	MX 5	0,99	1,93	29,37	-
<i>Micromonospora aurantica</i>	CK 2	1,11	1,57	29,03	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KNaC 2	0,81	1,72	28,53	+
<i>Bacillus circulans</i>	KMX 7	1,22	1,66	27,90	+
<i>Bacillus firmus</i>	KD 5	0,69	1,39	25,18	+
<i>Bacillus licheniformis</i>	KB 1	0,18	1,4	24,88	-
<i>Cellulomonas spec.</i>	KHC 4	1,42	1,83	24,85	+
<i>Bacillus circulans</i>	DSM 596	0,84	1,00	22,58	+

Fortsetzung Tabelle 3.5

<i>Bacillus cereus</i>	RA 1	0,58	1,38	21,76	+
<i>Sphingomonas spec.</i>	CZ 326a	0,39	1,16	20,73	-
<i>Rhizobium spec.</i>	CZ 69	0,00	0,49	18,50	-
<i>Bacillus megaterium</i>	CZ 59b	0,61	1,98	17,43	+
Isolat aus <i>B. cereus</i>	NX2	0,3	0,96	17,32	+
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMC 8	0,54	2,00	16,71	+
<i>Bacillus sphaericus</i>	KD 11	0,64	0,94	15,89	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KMC 7.1	0,91	1,11	15,53	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	CZ 177d	0,2	0,84	15,21	-
<i>Paenibacillus spec.</i>	CZ 181a	0,44	0,41	14,53	+
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	KMX 4	0,42	0,98	14,04	-
<i>Bacillus coagulans</i>	KMC 12	0,16	0,35	12,26	-
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	DSM 40233	0,02	0,13	11,90	+
<i>Azotobacter chroococcum</i>	B 571	0,85	1,66	11,88	-
<i>Rhizobium spec.</i>	CZ 71	0,00	0,49	10,91	+
<i>Kocuria varians</i>	CZ 66	0,12	0,56	10,80	-
<i>Bacillus cereus</i>	NX 2	0,53	0,93	10,75	+
<i>Bacillus megaterium</i>	CZ 268c	0,40	0,40	10,15	-

Das Screening von 118 Mikroorganismen der Stammsammlung ergab, dass 77 Bakterien einen Glucoseabbau von über 10% aufweisen (Tab 3.5). Von diesen 77 MO konnten 27 aus Glucose das Speicherpolymer PHB bilden (Abbildung 3.2). Mit Glucose konnten ca. 20% der untersuchten Organismen PHB produzieren. Dies stellte noch einmal deutlich heraus, dass Glucose das weitaus bessere Substrat zur PHB-Produktion war als Xylose, da doppelt so viele der getesteten Organismen diese als C-Quelle nutzten.

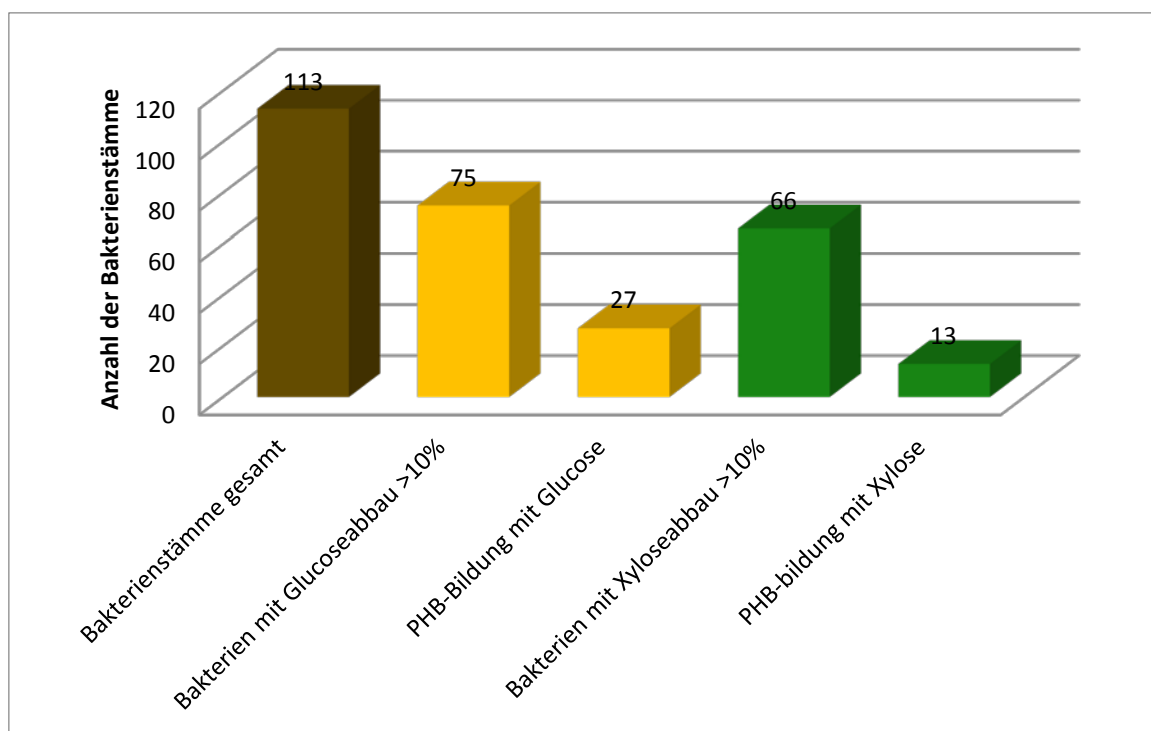


Abbildung 3.2: Zusammenfassung des PHB-Screenings mit Xylose oder Glucose als einzige C-Quelle.

3.4 Produktion von PHB aus hemicellulosischem Stroh-Hydrolysat

3.4.1 Zusammensetzung des hemicellulosischen Hydrolysats nach Enttoxifizierung

Das vom PFI hergestellte hemicellulosische Hydrolysat wurde von zelltoxischen und wachstumshemmenden Stoffen wie Phenolen, Furfural und 5-HMF befreit (siehe Abschnitt 2.10). Danach enthielt das Hydrolysat hohe Mengen an Xylose, durchschnittlich etwa 10 g/l. Zwei weitere Zucker, Glucose und Arabinose kamen in geringeren Mengen vor. Ihre Konzentrationen lagen ungefähr bei 2,0 -3,0 g/l und 1,0-2,0 g/l. Je nach Art der thermischen Vorbehandlung des Strohs konnten auch die Furane Furfural und 5-HMF im Hydrolysat nachgewiesen werden. Das mengenmäßig bedeutendste Nebenprodukt war Acetat. Seine Konzentration betrug je nach Hydrolysat-Charge 0,7-1,0 g/l. Die Menge des eingesetzten Hydrolysats veränderte sich während der enttoxifizierenden Behandlung. Zunächst verringerte sich das Volumen durch das Einengen im Rotationsverdampfer. Die Zugabe von 4 N NaOH zur Neutralisierung des pHs erhöhte sich die Menge wieder leicht. Die zwei Filtrationschritte führten zu einem Verlust an Hydrolysat. Am Beispiel der Aufreinigung in Abbildung 3.3 kann man sehen dass sich das Ausgangsvolumen des Hydrolysats um ca. 10 % verringert hat.

Die Konzentration der enthaltenen Zucker änderte sich während der Behandlung ebenfalls (Abb. 3.3). Die Menge von Glucose und Xylose verringerte sich von Schritt ① bis Schritt ⑥ um ca. 0,4 g/l. Die Arabinose-Konzentration blieb fast unverändert. Ebenso schwankte auch der Gehalt an Acetat nur leicht. Gut zu erkennen war, dass die Konzentration an zelltoxischem Furfural deutlich abnahm. Vor

allem nach der Behandlung über den Aktivkohlefilter war die Menge im Vergleich zum Ausgangswert um fast 80 % gesunken. Die Aktivkohle erwies sich hier als sehr guter Absorber. In anderen Chargen (nicht abgebildet) konnte nach Schritt ② eine geringe Menge an 5-HMF nachgewiesen werden. Nach Behandlung über den Aktivkohlefilter wurde diese jedoch wieder entfernt und lag dann unter der Detektionsgrenze des verwendeten HPLC-Systems.

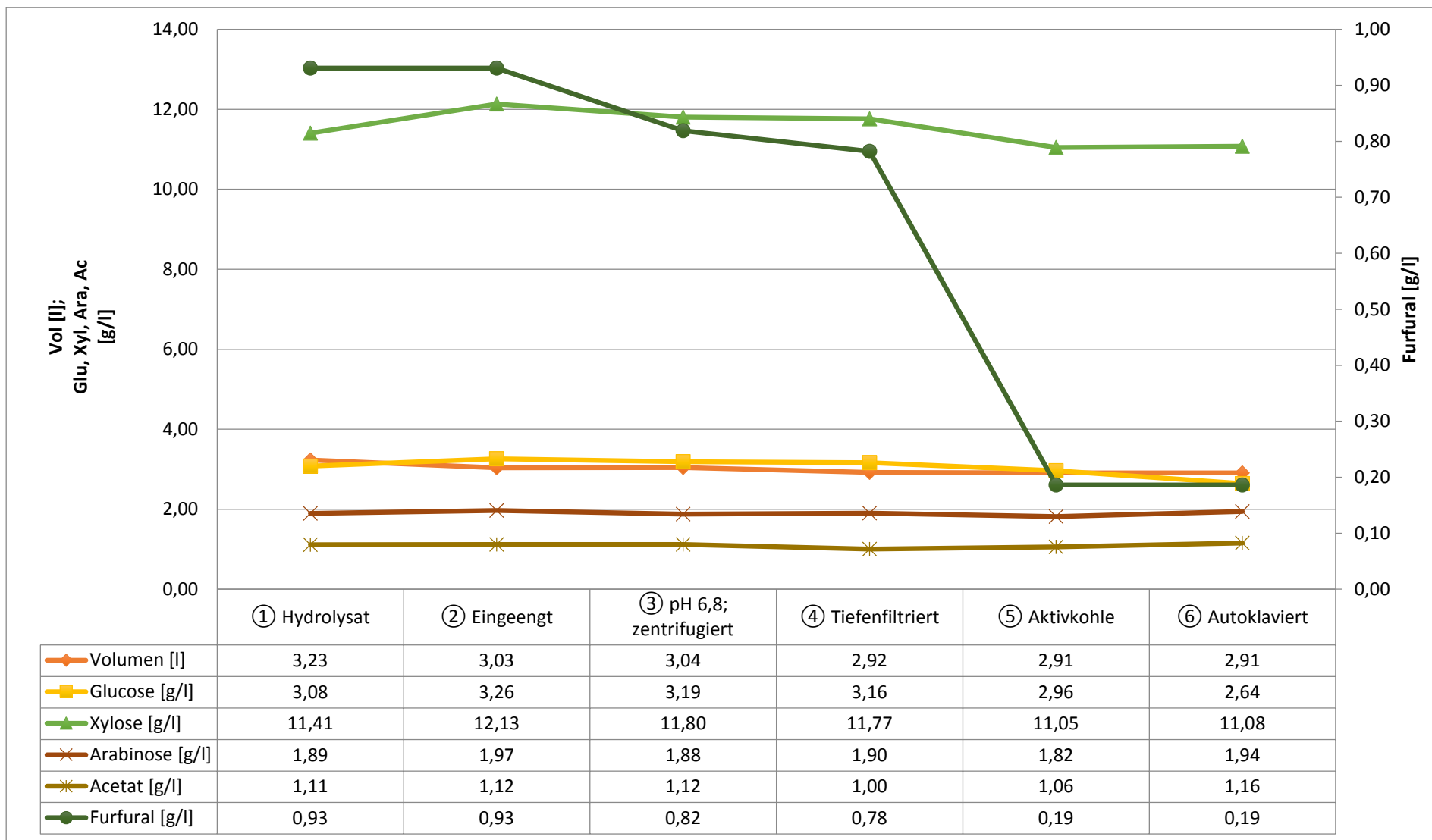


Abbildung 3.3: Bestandteile einer Charge des hemicellulosischen Hydrolysats nach verschiedenen Behandlungsschritten (siehe Abschnitt 2.10).
 ① Hydrolysat, ② Eingeengt, ③ pH 6,8; Zentrifugation, ④ Tiefenfiltration, ⑤ Aktivkohlefiltration, ⑥ Autoklaviert.

3.5 Charakterisierung der PHB-Bildner aus der Stammsammlung des IMW

Die beiden produktivsten Stämme zur PHB-Produktion *Bacillus circulans* KHC 3 und *Bacillus subtilis* KNaC 2 wurden ursprünglich von Kuhnigk (1996) aus Termitendärmen isoliert. Das Isolat KHC 3 aus *Heterotermes indicola* und KNaC 2 aus *Nasutitermes nigriceps*. Ihre Identität wurde zur Kontrolle erneut überprüft. Dies geschah zum einen durch molekularbiologische Methoden, zum anderen durch physiologische Tests.

3.5.1 Ergebnisse des Alignements der 16S rDNA-Sequenz

Durch die Sequenzierung der 16S rDNA und das Alignment mit bekannten Sequenzen konnten die beiden PHB-bildenden Stämme KHC 3 und KNaC 2 eindeutig der Gattung *Bacillus* zugeordnet werden. Eine Bestimmung der Art konnte mit Hilfe dieser Methode nicht erfolgen. Das Alignment ergab eine Reihe von Treffern mit 100 % Übereinstimmungen in den verglichenen Sequenzen.

3.5.2 Ergebnisse der physiologischen Tests

Mit Hilfe des Testsystems „Microgen® Bacillus ID“ konnten die beiden Isolate KHC 3 und KNaC 2 genauer bestimmt werden. Für den Organismus KHC 3 ergab sich die Art *Bacillus licheniformis*, für KNaC 2 wurde ermittelt dass es sich um *Bacillus megaterium* handelt. Die Ergebnisse der physiologischen Tests sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Physiologische Tests zur Bestimmung der Art von den *Bacillus*-Stämmen KHC 3 und KNaC 2. + positive Reaktion – negative Reaktion.

Test	KHC 3	KNaC 2
Arabinose	+	+
Cellobiose	+	-
Inositol	+	-
Mannitol	+	+
Mannose	+	-
Raffinose	+	+
Rhamnose	+	-
Salicin	+	-
Sorbitol	+	+
Saccharose	+	+
Trehalose	+	+
Xylose	+	+

Fortsetzung Tabelle 3.6

Adonitol	-	-
Galactose	+	+
Methyl-D-Mannosid	-	-
Methyl-D-Glucosid	+	-
Inulin	-	-
Melizitose	+	+
Indol	+	-
ONPG	+	-
Aginin	+	-
Citrat	+	-
VP ^a	+	-
Nitrat ^b	+	-

a: Voges-Proskauer Test, b: Test auf Nitrat-Atmung

3.6 Direkte PHB-Produktion mit der Xylose des hemicellulosischen Hydrolysats

Eine direkte Produktion von PHB aus dem hemicellulosischem Hydrolysat wurde für die folgenden vier Organismen untersucht: *Bacillus licheniformis* KHC 3, *Bacillus megaterium* KNaC 2, *Hydrogenophaha pseudoflava* DSM 1034 und *Burkholderia sacchari* DSM 17165 (siehe Abschnitt 2.10.3). Es wurden Messreihen der Organismen in Mineral Medium (Tab. 2.27 + 2.28) mit unterschiedlichen Hydrolysat-Konzentrationen (0-100 %) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.4 – 3.27 dargestellt.

3.6.1 PHB-Bildung durch *Burkholderia sacchari* DSM 17165

Abbildung 3.4 zeigt die PHB-Bildung, die optische Dichte, sowie den Xyloseabbau durch den Organismus *Burkholderia sacchari* DSM 17165 in Mineral Medium. Dieses Bakterium zeigte eine gute PHB-Bildung unter den gewählten Bedingungen. Die Produktion startete an Tag 2 und vergrößerte sich bis hin zu Versuchstag 4. Hier betrug der PHB-Gehalt an der Zelltrockenmasse (ZTM) ca. 44 %. Einhergehend mit der PHB-Bildung stieg die optische Dichte und somit die Zellmasse. Die vorhandene Xylose im Medium wurde ausgehend von 10,86 g/l auf 2,02 g/l abgebaut. Somit standen 8,84 g Xyl zum Zellwachstum und zur PHB-Synthese zur Verfügung. Davon gingen 1,66 g Xyl in die PHB-Synthese, 2,15 g in das Zellwachstum. Die Menge von 2,88 g Xyl wurde nicht verwertet. Bei einer Zugabe von 20 % des TDH-Hydrolysats wurde die PHB-Produktion stark vermindert (Abb. 3.5). Es wurden maximal 5,6 % PHB bezogen auf die Zelltrockenmasse an Tag 1 gebildet. Das Polymer wurde während der Versuchstage 2-4 abgebaut. Das Polymer wurde wahrscheinlich zum Zellwachstum verwendet, weil

einhergehend mit dem Abbau die optische Dichte zunahm. Eine maximale Zelldichte wurde an Tag zwei gemessen. Die vorhandene Xylose wurde von 11,03 g/l auf 4,95 g/l abgebaut. Somit war noch ausreichend Restzucker im Medium vorhanden, welcher nicht in PHB-Granula umgewandelt wurde. Mit 40 % Hydrolysat konnte die Bildung des Speicherpolymers wieder gesteigert werden (Abb. 3.6). An Tag 3 wurde die höchste Bildung von 15,0 % PHB/ZTM gemessen. Der Kurvenverlauf der PHB-Bildung (gelb) glich dem der optischen Dichte (blau). Die Xylose war an Tag 3 komplett verstoffwechselt.

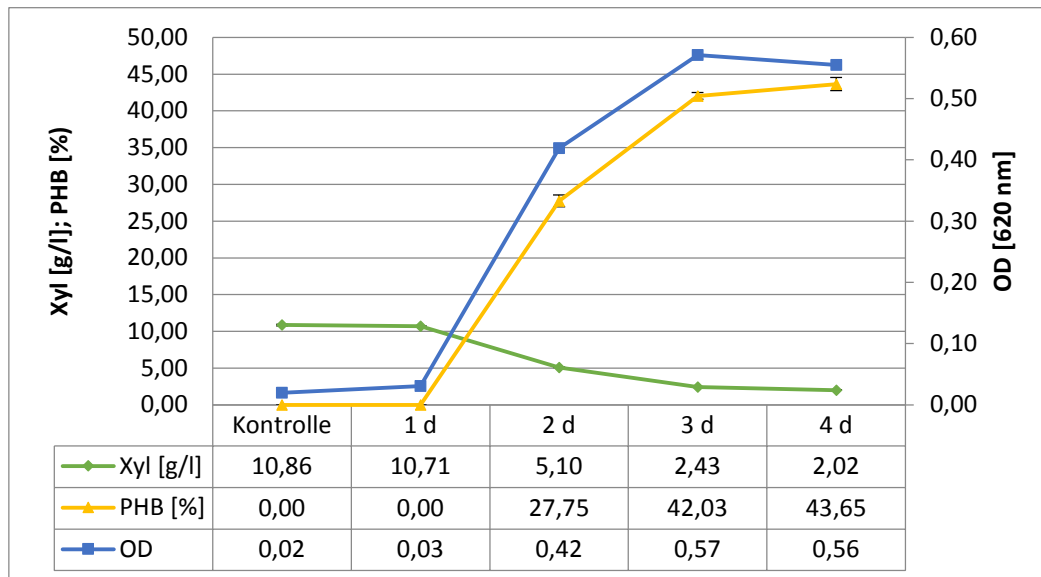


Abbildung 3.4: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Burkholderia sacchari* DSM 17165 in Mineral-Medium mit 0 % hemicellulosischem Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

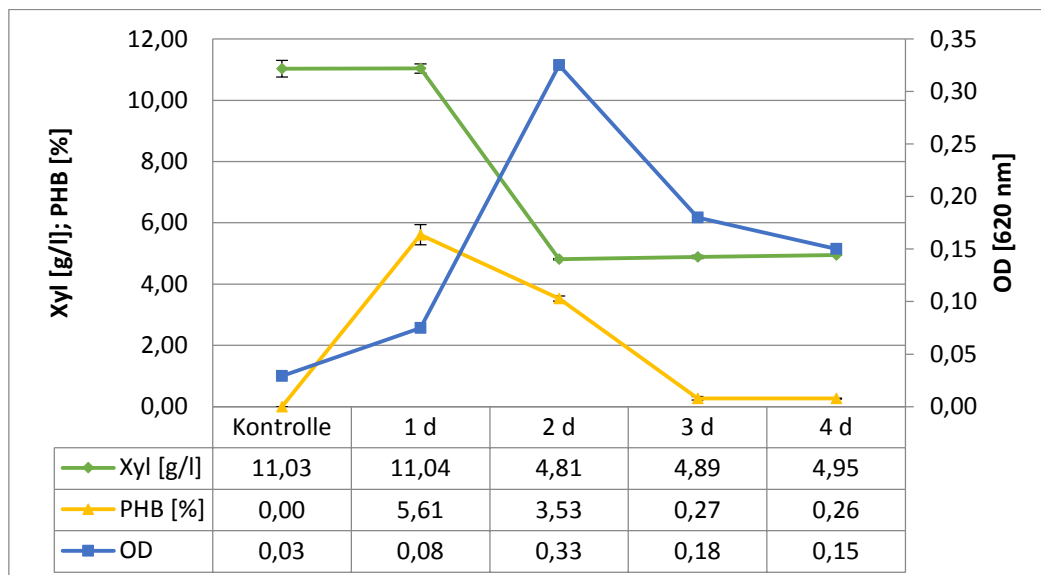


Abbildung 3.5: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Burkholderia sacchari* DSM 17165 in Mineral-Medium versetzt mit 20 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

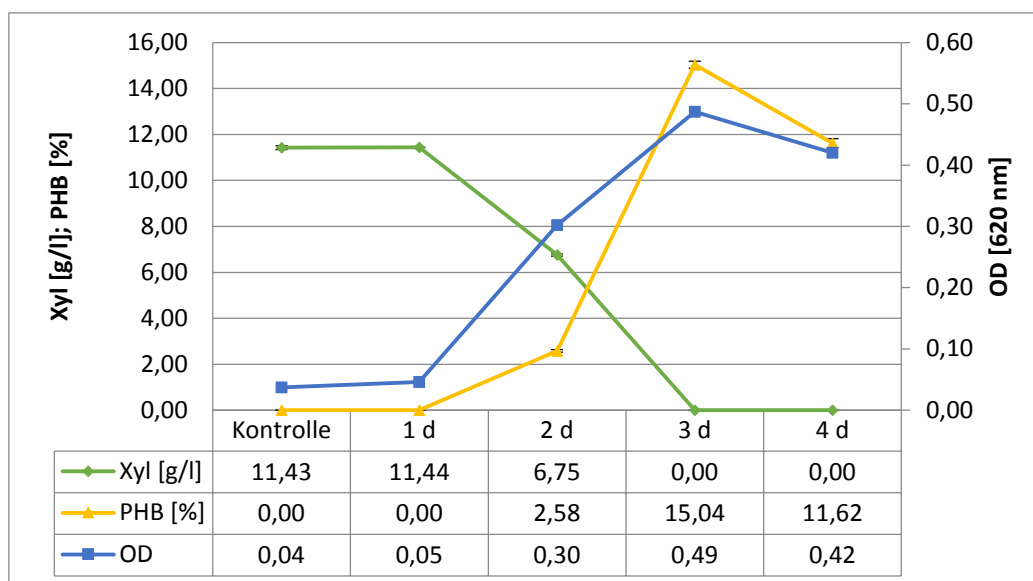


Abbildung 3.6: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Burkholderia sacchari* DSM 17165 in Mineral-Medium versetzt mit 40 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

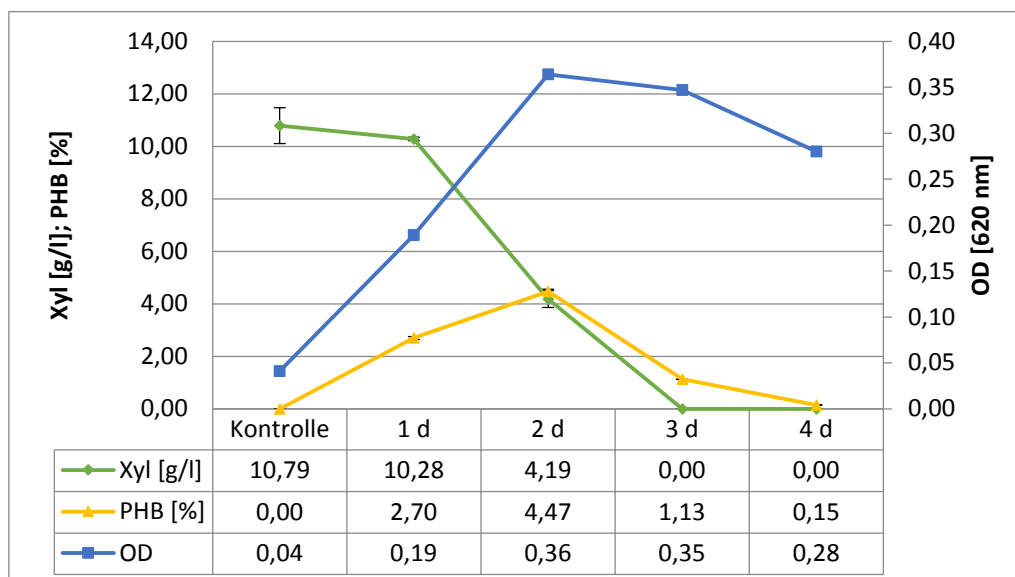


Abbildung 3.7: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Burkholderia sacchari* DSM 17165 in Mineral-Medium versetzt mit 60 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

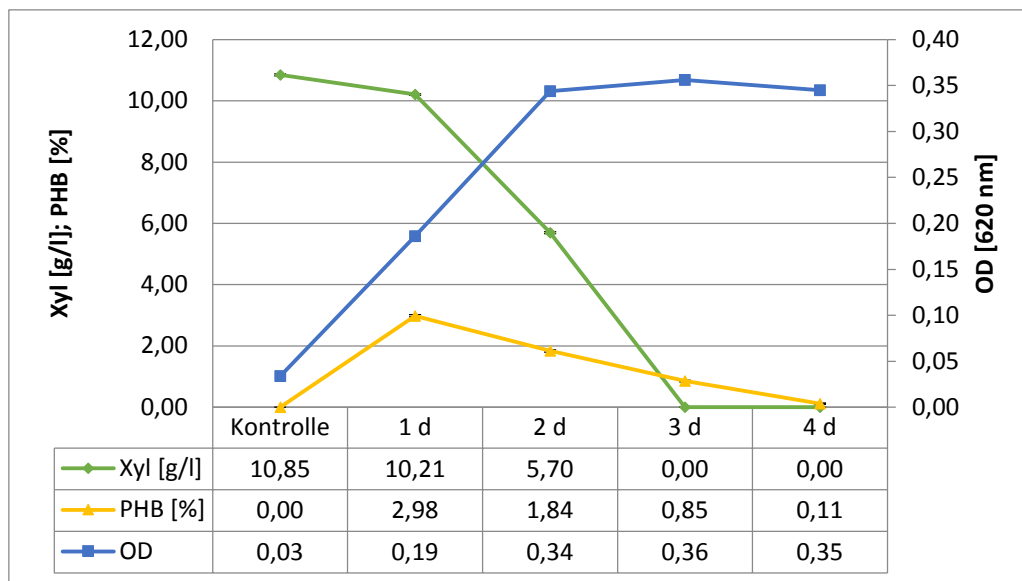


Abbildung 3.8: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Burkholderia sacchari* DSM 17165 in Mineral-Medium versetzt mit 80 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

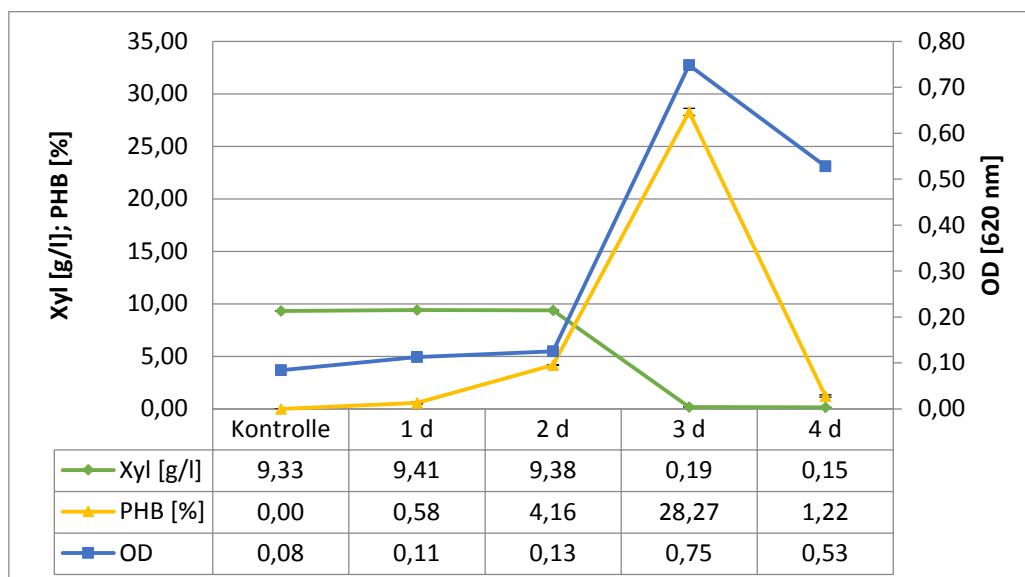


Abbildung 3.9: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Burkholderia sacchari* DSM 17165 in Mineral-Medium versetzt mit 100 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

Mit einer weiteren Erhöhung der Hydrolysat-Konzentration konnten nur 4,5 % PHB (gemessen an der Zelltrockenmasse) an Tag 2 gebildet werden (Abb. 3.7). Auch korreliert die PHB-Bildung mit der gemessenen Zelldichte. Bei Zugabe von 80 % des TDH-Hydrolysats konnten nur ca. 3,0 % PHB/ZTM produziert werden (Abb. 3.8). Obwohl das Zellwachstum gut war und die Xylose vollständig abgebaut wurde, konnte leider keine Steigerung der PHB erreicht werden. Anders verhielt es sich bei reinem Hydrolysat mit Zugabe der Mineralsalze (Abb. 3.9). Hier konnte nach längerer lag-Phase an Tag 3 ein PHB-Gehalt von 28,3 % bezogen auf die ZTM verzeichnet werden. Dieser Höchstwert korrelierte mit

dem Maximalwert der optischen Zelldichte. Mit Beginn der Absterbephase wurde das Polymer wieder abgebaut. Von der zu Beginn enthaltenen Xylose konnte am letzten Versuchstag nur noch 0,15 g gefunden werden. Von 9,81 g verwerteter Xylose gingen 1,63 g in die PHB-Synthese, 7,28 g in das Zellwachstum.

3.6.2 PHB-Bildung durch *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034

Ein weiterer Referenzorganismus wurde unter den zu vorigen Bedingungen gemessen. *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 zeigte schon in anderen Versuchen PHB-Bildung mit Xylose (Silva *et al.* 2004). Dieser Organismus bildete in reinem Mineral-Medium bis zu 20 % PHB/ZTM (Abbildung 3.10). Das Wachstum wurde über 4 Tage verfolgt. Wobei die Organismen an Tag 3 in eine Absterbephase eintraten. Die Kurve der PHB-Bildung ist nicht typisch. Zwar wurde nach Tag 1 das Speicherpolymer stark abgebaut, jedoch stieg die Konzentration von 2,9 % an Tag 2 auf 5,6 % an Tag 3, bevor sie an Tag 4 auf 4,0 % fällt. Vorhandene Xylose wurde nicht vollständig abgebaut, eine Restzuckerkonzentration von 6,19 g/l wurde gemessen.

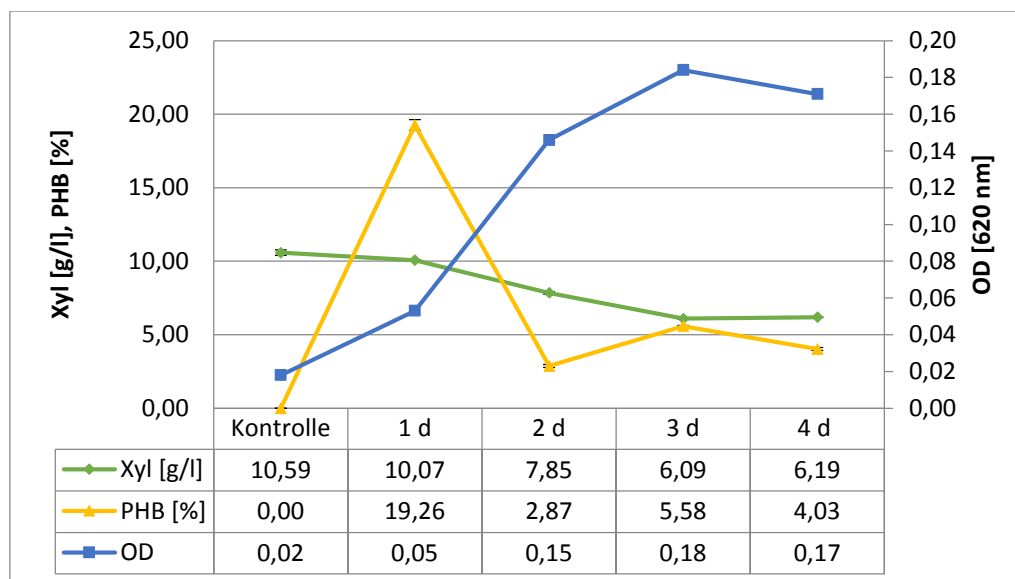


Abbildung 3.10: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 in Mineral-Medium mit 0% hemicellulosischem Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

Die Abbildungen 3.11 – 3.15 befassen sich mit der PHB-Bildung von *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 in Mineralsalz-Medium mit Zusatz von 20 % - 100 % Hydrolysat. Das Diagramm mit 20 % Hydrolysat (Abb. 3.11) ähnelt stark dem ohne Zusatz. Jedoch wurde hier mehr Zucker verbraucht und auch mehr PHB gebildet (23,8 %). Ähnliche Ergebnisse wurden mit 40 % Hydrolysat erzielt. So konnte an Tag 1 ein maximaler PHB-Wert von 32,4 % dokumentiert werden. Auch war der Tag der maximalen Zelldichte genau einen Tag nach der höchsten PHB-Konzentration zu messen. Wurde die Hydrolysat-Konzentration auf 60 % erhöht, so erhöhte sich auch die gemessene PHB-Konzentration auf 42,9 % an

Tag 1. Die höchste Zelldichte wurde an Tag 3 gemessen. Die Xylose im Medium konnte am letzten Versuchstag mit 0,04 g/l kaum noch nachgewiesen werden. Mit Einsatz von 80 % des TDH-Hydrolysats kam es zu einer leichten Verzögerung des Wachstums. Hier wurde erst an Tag 2 signifikantes Wachstum verzeichnet, was an Tag 3 mit einer optischen Dichte von 0,88 seinen Höhepunkt erlangte. Die höchste PHB-Bildung konnte an Tag 2 gemessen werden. Sie betrug 29,3 % PHB/ZTM. Der eingesetzte Zucker wurde nicht komplett abgebaut. Die Konzentration lag an Tag 4 bei 0,22 g/l. Das Bakterium *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 konnte auch bei Anzucht in reinem Hydrolysat wachsen und PHB produzieren (Abb. 3.15). Auch wenn es hier, wie schon bei dem Versuch mit 80 % Hydrolysat, zu einer kleinen lag-Phase im Wachstum kam, konnten sich die Zellen bis hin zu Tag 3 vermehren. Danach traten diese in die Absterbephase ein. Eine maximale PHB-Produktion wurde an Tag 2 verzeichnet. Sie betrug 22,5 %. Die Xylose wurde fast vollständig abgebaut.

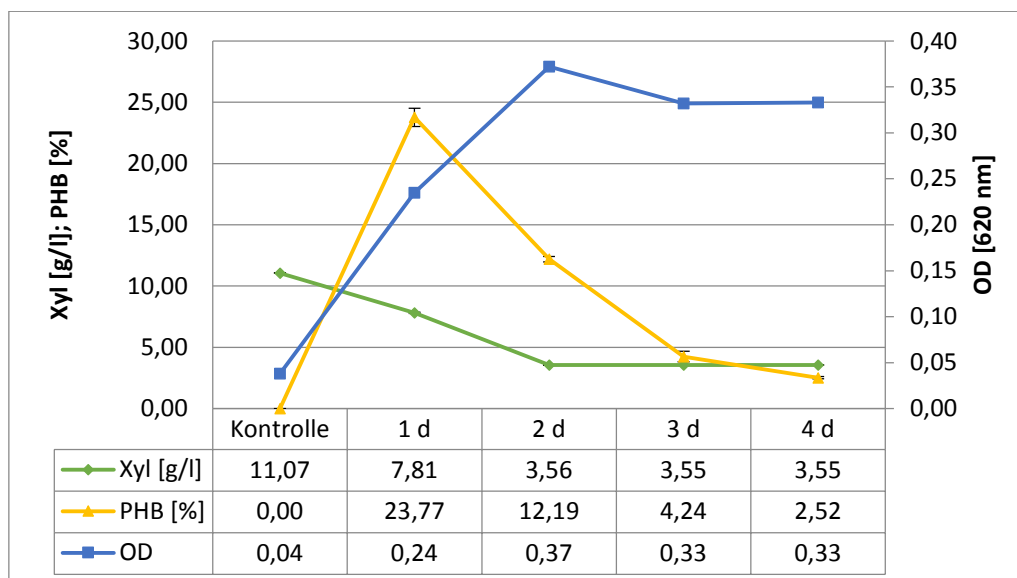


Abbildung 3.11: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 in Mineral-Medium versetzt mit 20 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

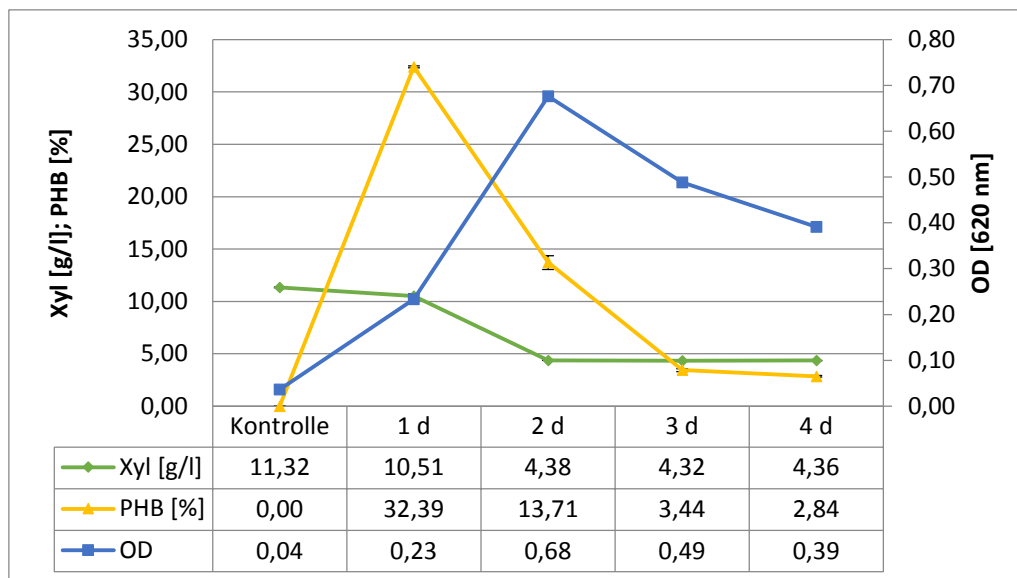


Abbildung 3.12: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 in Mineral-Medium versetzt mit 40 % hemicellulosechem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

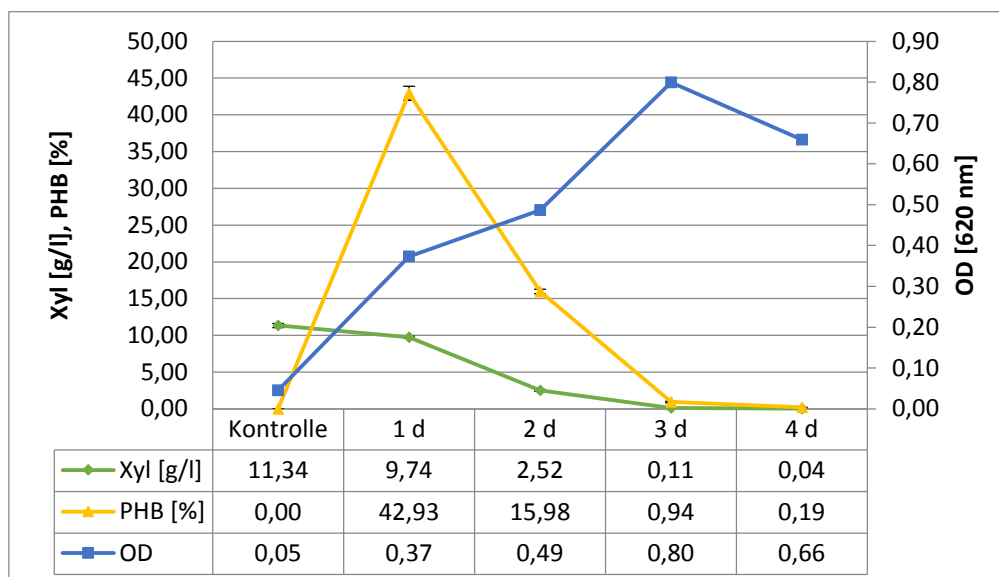


Abbildung 3.13: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 in Mineral-Medium versetzt mit 60 % hemicellulosechem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

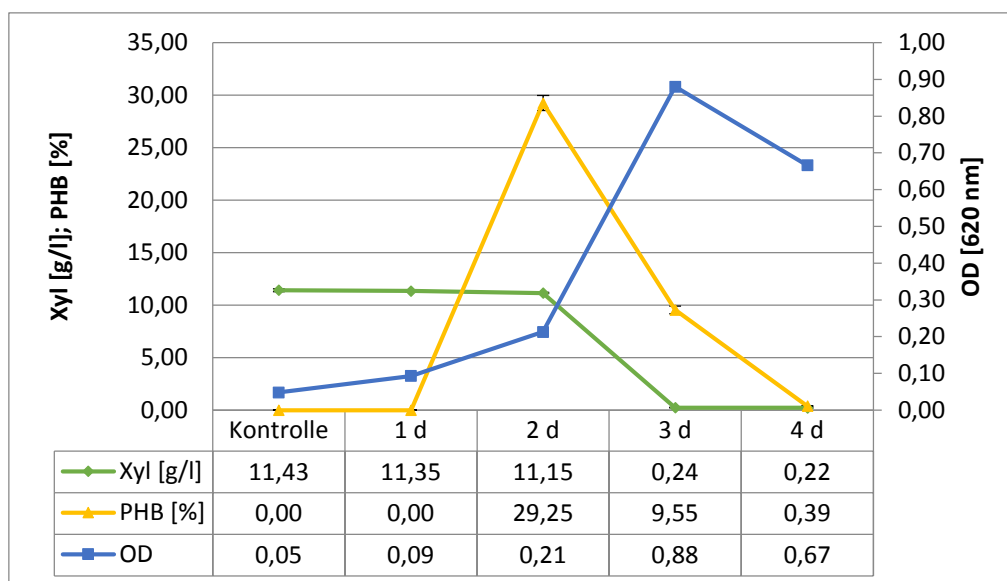


Abbildung 3.14: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 in Mineral-Medium versetzt mit 80 % hemicellulosem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

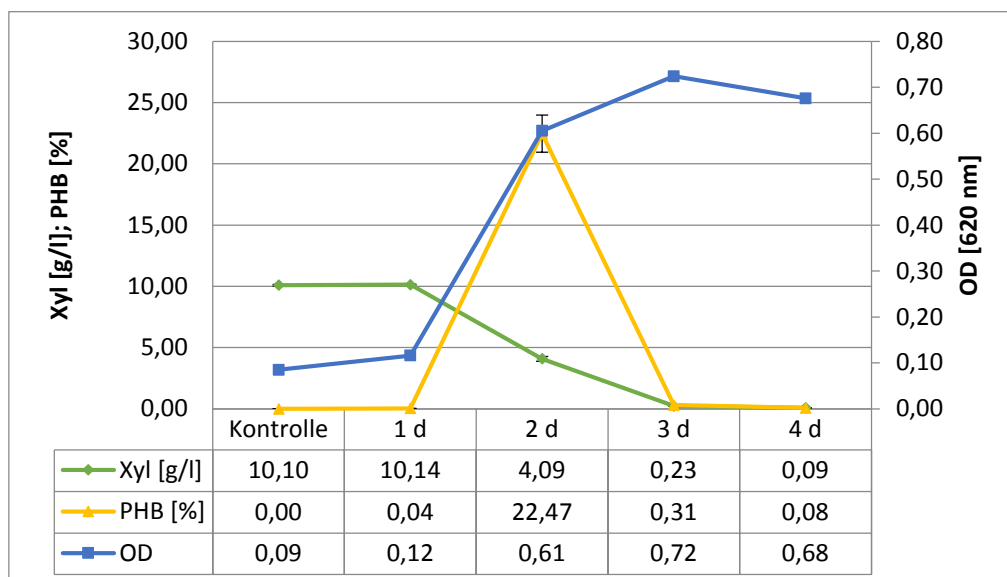


Abbildung 3.15: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 in Mineral-Medium versetzt mit 100 % hemicellulosem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

3.6.3 PHB-Bildung durch *Bacillus licheniformis* KHC 3

Von den 13 institutseigenen Isolaten, welche positiv auf PHB-Bildung getestet wurden, konnte bei zweien eine besonders gute Produktion mit Xylose nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um die Bacillen *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2 (Kuhnigk 1996). Auch diese Organismen wurden im Folgenden genauer auf eine PHB-Bildung mit TDH-Hydrolysat untersucht. *Bacillus licheniformis* KHC 3 wuchs in Mineral Medium an und erreichte an Tag 2 die maximale Zelldichte von 0,34, danach befanden sich die Zellen in der Absterbephase (Abb. 3.16). Parallel zum

Zellwachstum fand ein Abbau der Xylose statt. An Versuchstag zwei war die Xylose bereits um die Hälfte reduziert worden. Die PHB-Bildung war an Tag 1 am größten. Ca. 38 % der Zellmasse waren PHB-Einschlüsse. Die Bildung war also in der exponentiellen Phase des Zellwachstums maximal. Danach fand ein rascher Abbau der Zelleinschlüsse statt. Ausgehend von 5,63 g verwerteter Xylose wurden 1,18 g Xyl in die Zellmasse investiert, 0,73 g Xyl wurden zu pHB fermentiert. Die restlichen 2,54 g Xyl wurden nicht umgesetzt. In den Abbildungen 3.18 – 3.22 wurden 20 % - 100 % hemicellulosisches Hydrolysat zugefügt. Versetzte man das normale Mineral Medium mit 20 % des hemicellulosischen Hydrolysats, konnte man ebenfalls gutes Wachstum der Zellen feststellen (Abb. 3.17). Auch hier war die höchste Zelldichte (OD_{600nm}) an Tag 2 zu messen. Sie lag bei 0,5 und war somit wesentlich höher als in reinem Medium. Dies deutet darauf hin, dass das Hydrolysat zumindest in geringen Konzentrationen das Wachstum der Zellen förderte. Der Zucker wurde rasch abgebaut und war an Tag 3 vollständig verstoffwechselt. Auch die PHB-Bildung war höher als in reinem Medium, sie betrug maximal 40 % an Tag 1. Am 2. Tag konnten immerhin noch 25 % nachgewiesen werden. Am 3. Tag war das Speicherpolymer fast vollständig abgebaut. Auch mit 40 % des Hydrolysats konnten die Bakterien gut wachsen (Abb. 3.18). Hier konnte sogar noch eine Steigerung der optischen Dichte festgestellt werden. Am 2. Tag lag diese bei 0,7. Eine maximale PHB-Ausbeute von 38 % war hier an Tag 2 festzustellen. Die Xylose wurde während der Versuchsdauer komplett abgebaut. Da die Startkonzentration des Zuckers (14,46 g/l) noch höher als bei den anderen Ansätzen war, könnte dies auch der Grund für das bessere Wachstum in diesem Ansatz sein.

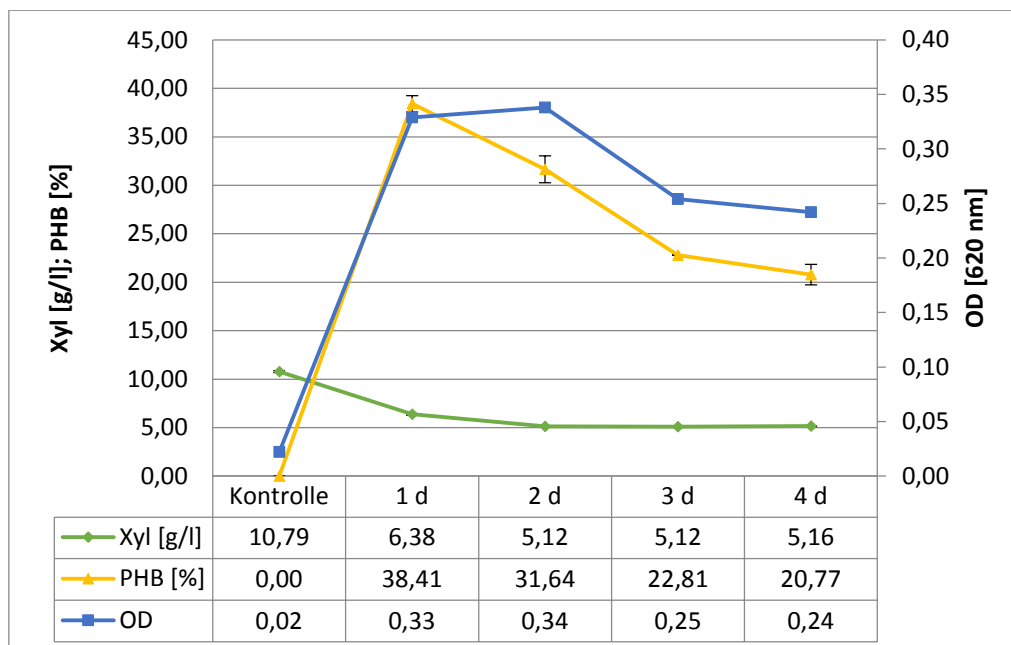


Abbildung 3.16: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus licheniformis* KHC 3 in Mineral-Medium mit 0 % hemicellulosischem Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

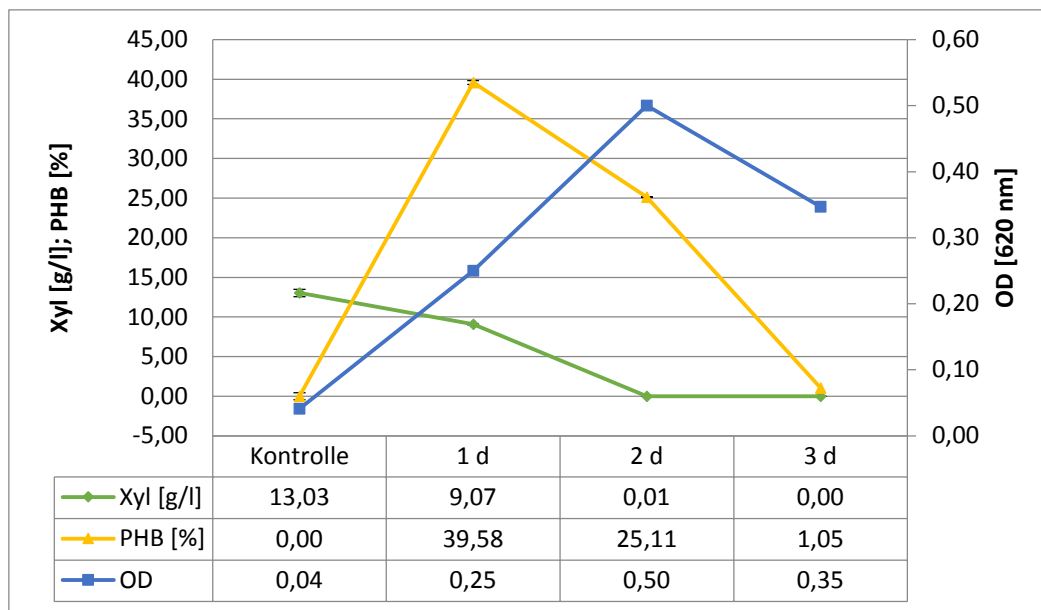


Abbildung 3.17: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus licheniformis* KHC 3 in Mineral-Medium versetzt mit 20 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 3 Tage.

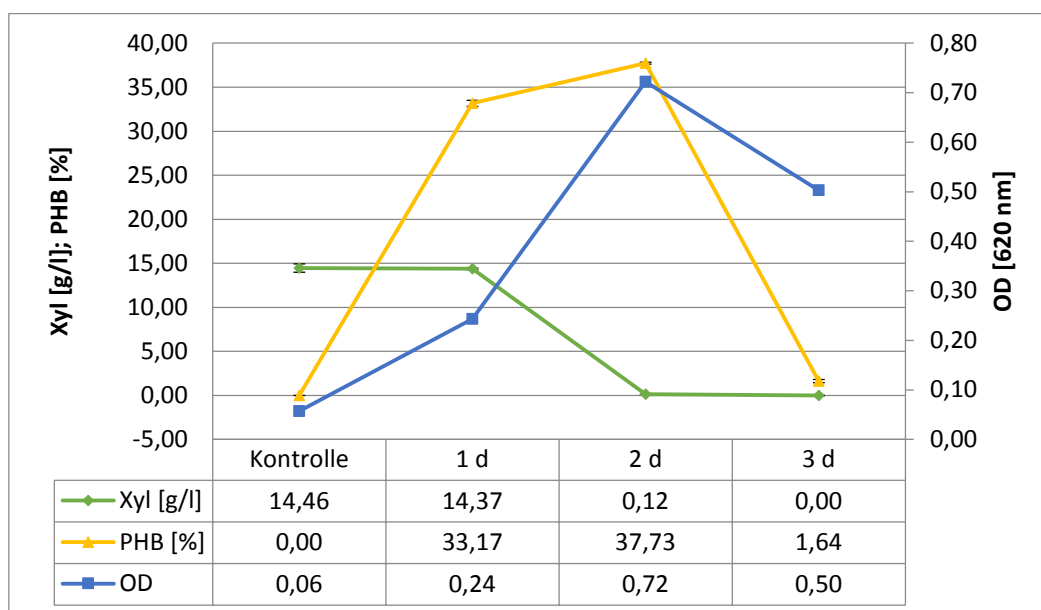


Abbildung 3.18: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus licheniformis* KHC 3 in Mineral-Medium versetzt mit 40 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 3 Tage.

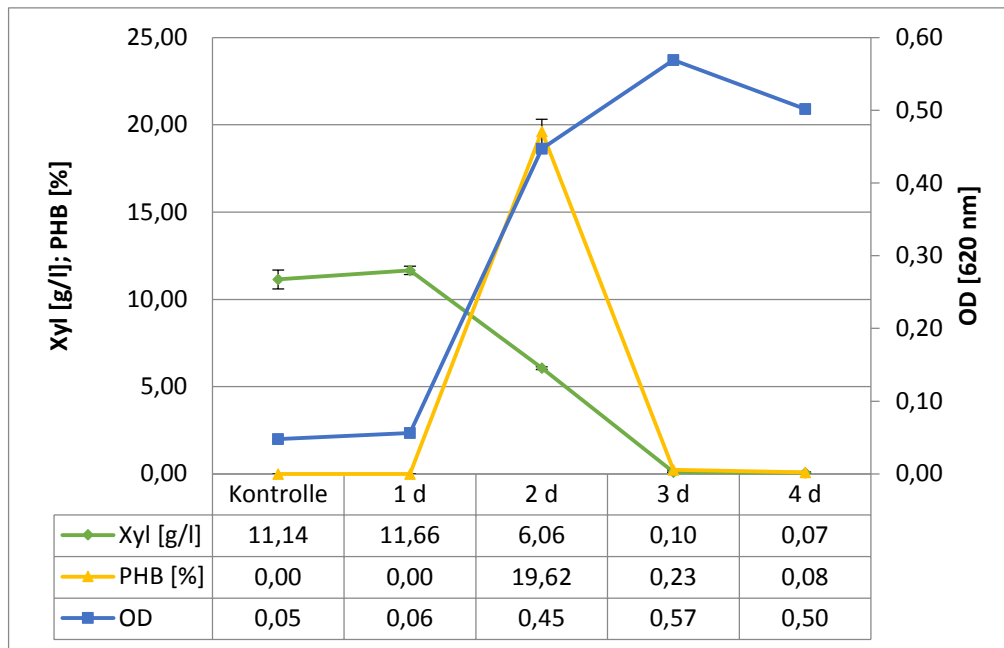


Abbildung 3.19: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus licheniformis* KHC 3 in Mineral-Medium versetzt mit 60 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

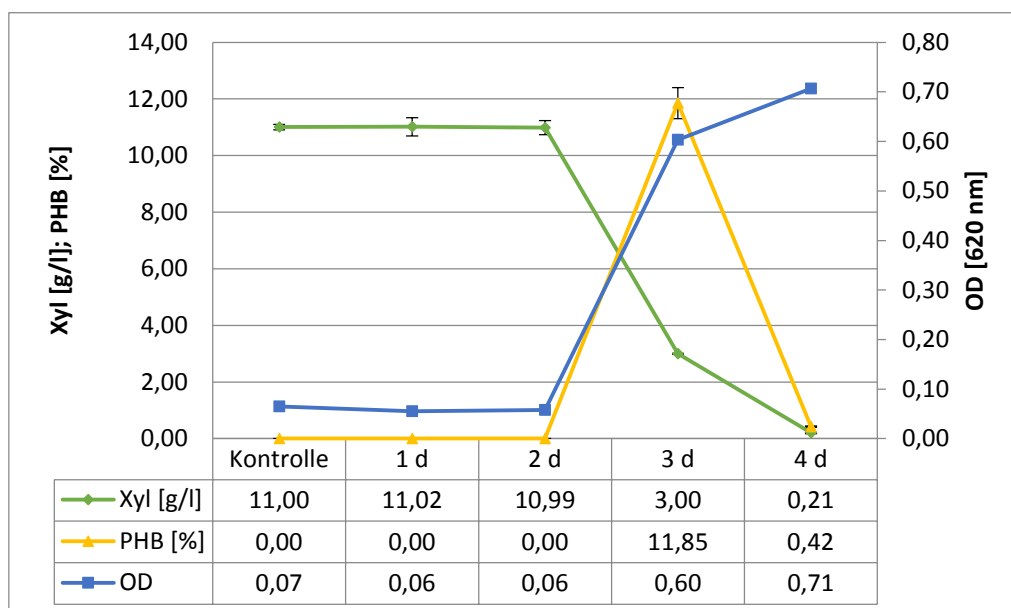


Abbildung 3.20: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus licheniformis* KHC 3 in Mineral-Medium versetzt mit 80 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

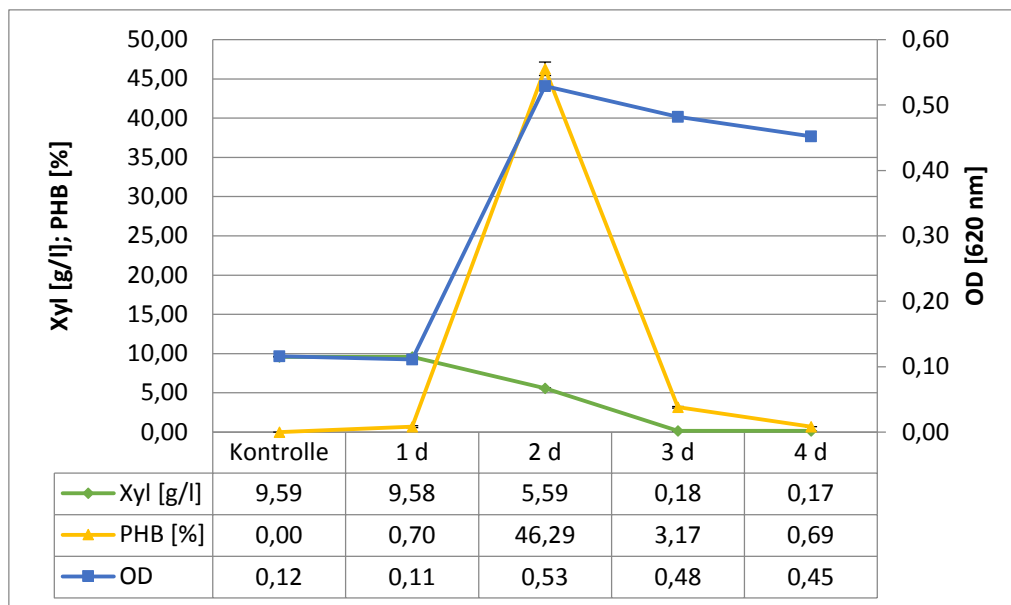


Abbildung 3.21: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus licheniformis* KHC 3 in Mineral-Medium versetzt mit 100 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

Bei Zugabe von 60 % des Hydrolysats konnte eine verlängerte lag-Phase beobachtet werden (Abb. 3.19). Signifikantes Wachstum konnte hier erst an Tag 2 festgestellt werden. Der Höhepunkt des Wachstums trat an Tag 3 ein, bevor es am 4. Tag zu einer Absterbephase kam. Einhergehend mit der Zellteilung wurde auch die PHB-Produktion erst am 2. Tag festgestellt. Neben der späteren Bildung der PHB konnte auch ein rascher Abbau des Polymers dokumentiert werden. Dies geschah bevor die Bacillen ihre maximale Zelldichte erreicht hatten. Mit ca. 20 % des Zelltrockengewichts wurde ungefähr die Hälfte an PHB im Vergleich zum 40 %-Ansatz gebildet. Ähnliche Ergebnisse konnten bei 80 % Hydrolysat-Zugabe erreicht werden (Abb 3.20). Die lag-Phase schloss hier Tag 2 mit ein. Am 3. Und 4. Tag kam es erst zu deutlichem Wachstum. Ebenso setzte die PHB-Bildung erst an Tag 3 ein (11,9 %). Danach kam es zum schnellen Abbau, so dass an Tag 4 nur ca. 0,4 % der Zelltrockenmasse aus PHB bestand. Aufgrund der verlängerten lag-Phase bei höheren Hydrolysat-Konzentrationen wurde die Vorkultur für den 100 %-Hydrolysat-Ansatz nicht in DSM Medium 1 angezogen, sondern in Mineral-Medium mit 50 % Hydrolysat. Dies ermöglichte den Organismen eine Adaption an das Hydrolysat. Die Vorkultur (30 °C, 1 d) wurde zu 1% (v/v) dem Hydrolysat mit Mineral-Salzen zugegeben. Die Probenahmen erfolgten an den Tagen 1-4. Die lag-Phase konnte erfolgreich verkürzt werden, signifikantes Wachstum konnte bereits am 2. Tag dokumentiert werden. Danach traten die Organismen langsam in die Absterbephase ein. Die angebotene Xylose wurde während des Versuchs fast komplett abgebaut. Die PHB-Bildung erreichte ihren Höhepunkt am 2. Tag. Danach kam es zu einem raschen Abbau. Am 3. Tag betrug der prozentuale Anteil von PHB an der Zelltrockenmasse nur noch 3 %. Es konnte allerdings ein Maximalwert von ca. 46 % PHB erreicht werden (Abb. 3.21). Dieser

Wert war wesentlich höher als bei den Ansätzen mit 60 und 80 % Hydrolysat. Die Adaption der Organismen in der Vorkultur dürfte hierfür der Grund sein. Der erreichte Wert von fast 50 % lag in einem sehr guten Bereich. Die Anwendung des Bakteriums *Bacillus licheniformis* KHC 3 wäre für eine großtechnische PHB-Produktion aus TDH-Hydrolysat mehr als geeignet.

3.6.4 PHB-Produktion durch *Bacillus megaterium* KNaC 2

Auch bei dem zweiten Organismus der Stammsammlung des IMW, *Bacillus megaterium* KNaC 2, welcher in den Vorversuchen eine gute PHB-Bildung mit Xylose zeigte, konnte in Mineral Medium gutes Wachstum festgestellt werden (Abb. 3.22). Die maximale Zelldichte war an Tag 1 bei 0,2. Die maximale PHB-Produktion wurde am 2. Tag mit 43,16 % pro ZTM gemessen. Die Xylose wurde um die Hälfte reduziert. Bei 20 % Hydrolysat-Zugabe erhöhte sich die optische Dichte auf ca. 0,5. Der prozentuale Anteil des Speicherpolymers verringert sich um ca. 10 % auf 29 %. Die erhöhte Xylose-Konzentration von 13,03 g/l war bereits an Versuchstag 3 fast komplett aufgebraucht (Abb 3.23). Durch Zugabe von 40 % des TDH-Hydrolyсата konnte eine Xylose-Konzentration von 14,99 g/l erreicht werden. Dies führte zu einem guten Wachstum und einer optischen Dichte von 0,7 an Tag 2. Der Anteil an PHB in der Zelle konnte auf fast 44 % erhöht werden (Abb. 3.24). Auch hier wurde die Kohlenstoffquelle während der Versuchsdauer vollständig verstoffwechselt. Bei einer weiteren Erhöhung der Hydrolysat-Konzentration auf 60 % konnte auch hier eine lag-Phase dokumentiert werden. Erst ab dem 2. Tag kam es zu nennenswertem Zellwachstum, was sich am 3. Tag noch erhöhte. Die größte PHB-Bildung von ca. 15% konnte auch an Tag 2 gemessen werden. Danach wurde das Polymer schnell abgebaut (Abb. 3.25). Das Substrat wurde auch hier annähernd aufgebraucht. Zu einer Verlängerung der lag-Phase führte die Zugabe von 80 % Hydrolysat zum Mineralsalzmedium. Somit wurde auch die Bildung des PHBs auf den 3. Tag verzögert. Hier konnten 22% des Polymers nachgewiesen werden (Abb. 3.26). In 100 % Hydrolysat wurde die maximale PHB-Bildung an Tag 2 dokumentiert. Sie betrug 46 %. Auch hier fällt dieser Wert mit der maximalen optischen Dichte zusammen, welche am zweiten Tag 0,6 betrug. Danach nahm die Zelldichte ab und das Speicherpolymer wurde wieder abgebaut (Abb. 3.27).

Es konnte festgestellt werden, dass die Organismen bei höheren Substratkonzentrationen eine verlängerte lag-Phase hatten. Sie mussten sich erst an das Medium adaptieren, bevor es zu einem nennenswerten Zuckerabbau und einer Zunahme der Zelldichte kam. War dieser Punkt erreicht, konnten die Bacillen PHB bilden. Insgesamt wurden mit höheren Hydrolysat-Konzentrationen nicht so viel PHB gebildet wie in den 0-40 % TDH-Hydrolysat-Ansätzen. Ebenso konnte festgestellt werden, dass es nicht zu einer längeren Speicherung des Reservemoleküls kam. Es wurde innerhalb eines Tages wieder abgebaut. Die Herstellung der Vorkultur in Mineral-Medium mit Hydrolysat (1:1) erwies sich

auch hier als verkürzend auf die lag-Phase. Es würde sich empfehlen, die Vorkultur langsam an das TDH-Hydrolysat zu adaptieren. Eine Anzucht in einer kontinuierlichen Kultur wäre ratsam.

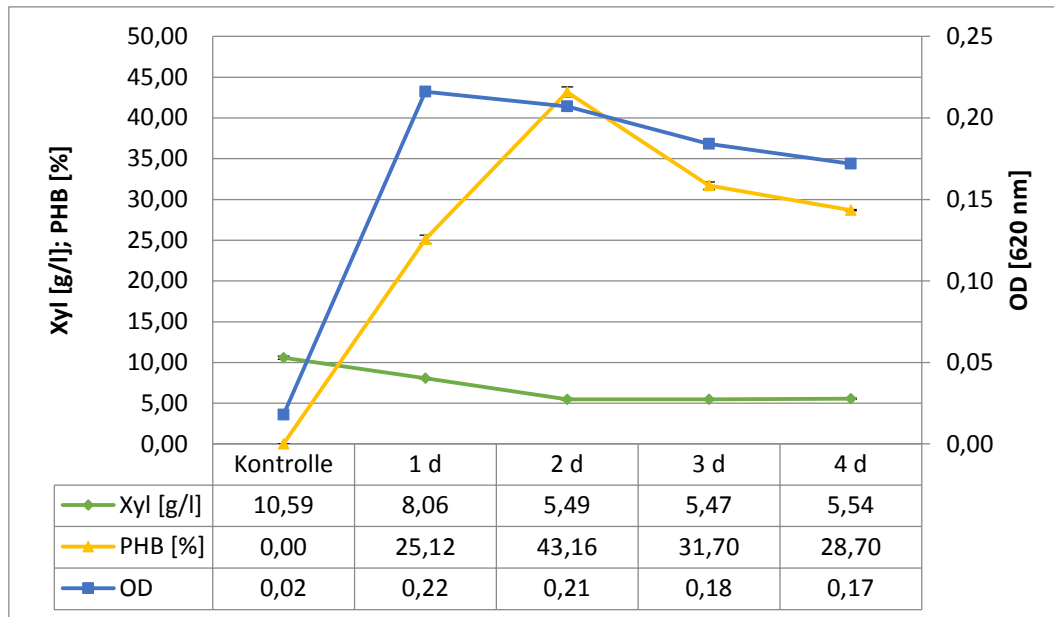


Abbildung 3.22: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus megaterium* KNaC 2 in Mineral-Medium mit 0 % hemicellulosischem Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

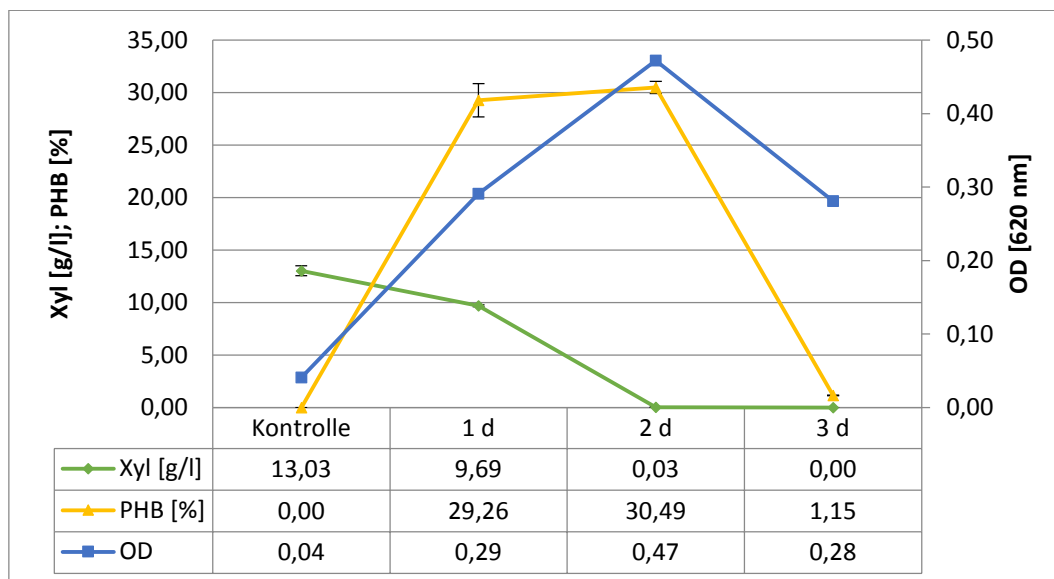


Abbildung 3.23: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus megaterium* KNaC 2 in Mineral-Medium versetzt mit 20 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 3 Tage.

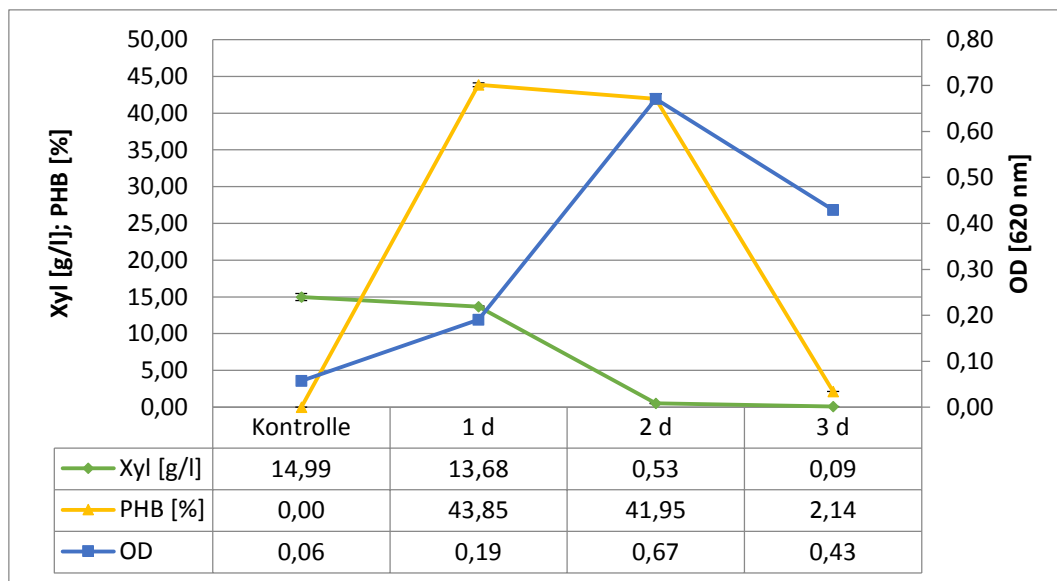


Abbildung 3.24: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus megaterium* KNaC 2 in Mineral-Medium versetzt mit 40 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 3 Tage.

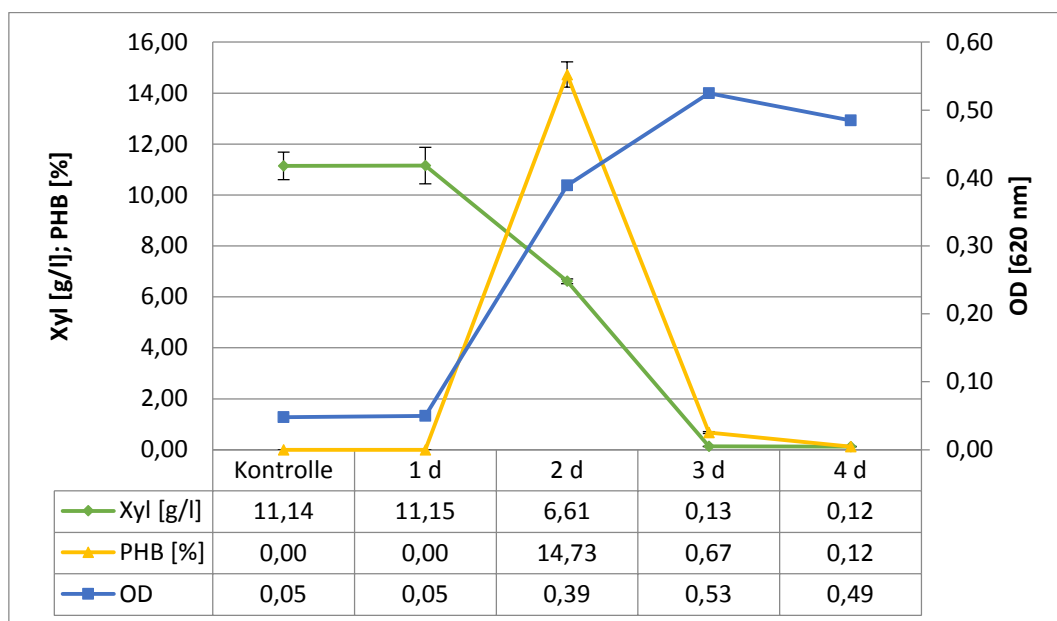


Abbildung 3.25: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus megaterium* KNaC 2 in Mineral-Medium versetzt mit 60 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

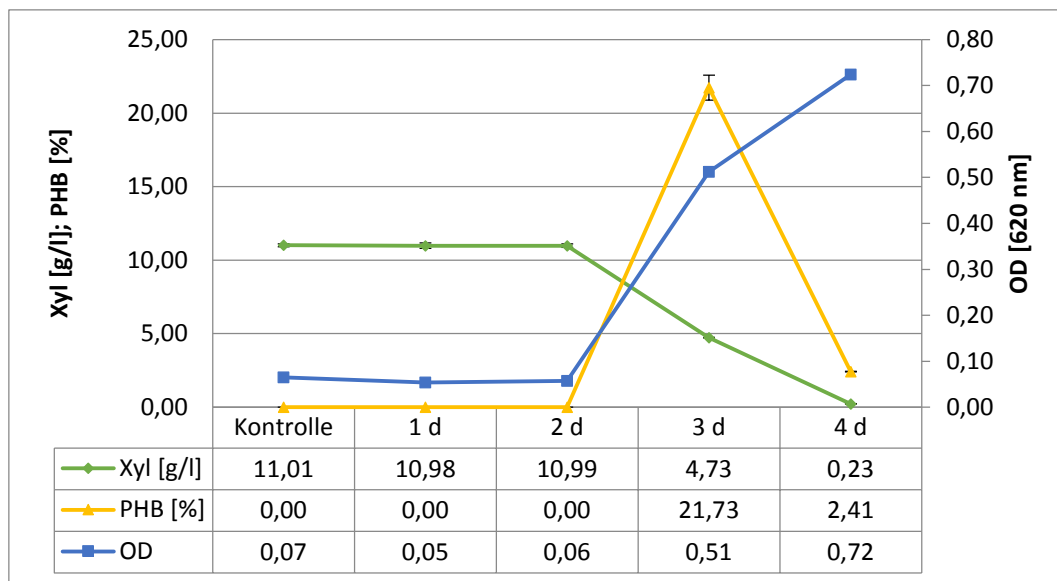


Abbildung 3.26 Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus megaterium* KNaC 2 in Mineral-Medium versetzt mit 80 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

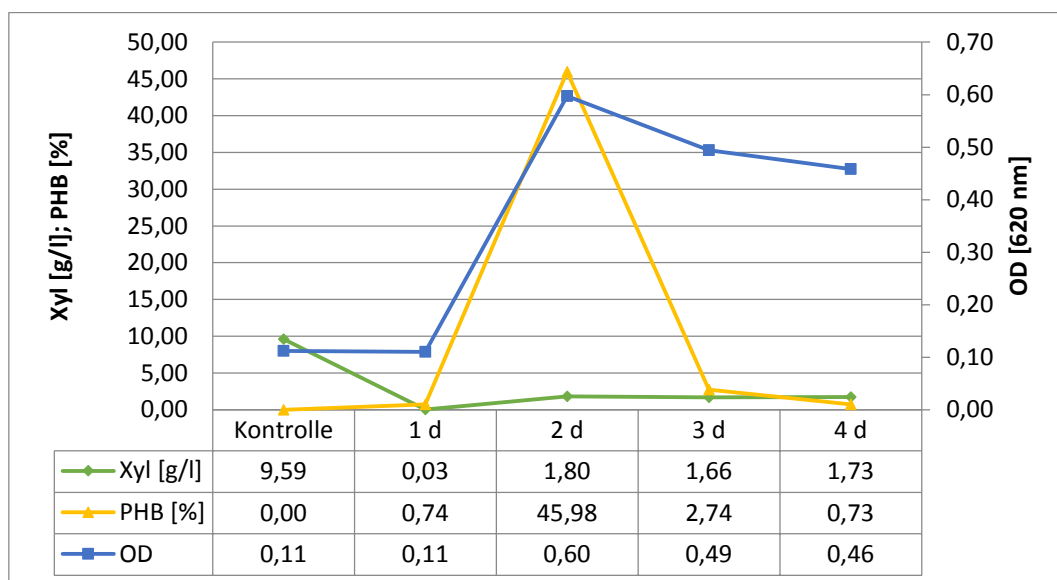


Abbildung 3.27: Xyloseabbau [g/l], PHB-Bildung [%/ZTM] und Wachstum [OD 620 nm] von *Bacillus megaterium* KNaC 2 in Mineral-Medium versetzt mit 100 % hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Inkubation in Schikanekolben bei 30 °C und 150 rpm für 4 Tage.

3.7 Direkte Produktion von Lactat aus hemicellulosischem Hydrolysat

Alternativ zur PHB-Produktion aus dem hemicellulosischen Stroh-Hydrolysat wurde die Bildung wichtiger Grundchemikalien wie z.B. Lactat oder Acetat in Betracht gezogen. Die heterofermentativen Milchsäurebakterien aus Stammsammlung des IMW wurden ebenfalls auf Verträglichkeit mit dem hemicellulosischen Hydrolysat geprüft. Des Weiteren wurde untersucht, ob sie aus den Zuckern Xylose, Glucose und Arabinose wichtige Produkte wie Lactat oder Acetat bilden und wenn ja, in welchen Mengen. Die 17 getesteten Organismen wiesen Wachstum in allen angesetzten Medien auf. In den Abbildungen 3.28 und 3.29 sind das Zellwachstum sowie die Lactatproduktion der Messreihen nach 12 d Inkubation aufgeführt. Die optische Dichte lag zwischen 0,05 bei *Oenococcus oeni* B 217 und 0,80 bei *Lactobacillus diolivorans* B 724. Bei fast allen MSB konnte auch bei Inkubation in 100 % Hydrolysat gleiches oder besseres Wachstum wie in den Ansätzen mit nur 10 % Hydrolysat-Zusatz beobachtet werden. Vor allem die Stämme *Lb. plantarum* B 102, *Lb. diolivorans* B 724 und *Lac. lactis* B 162 konnten sehr gut mit Hydrolysat in allen Konzentrationen wachsen. Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass u.a. Lactat produziert wurde. Die beiden *Lb. plantarum* Stämme B 102 und B 727, sowie *Lb. brevis* B 18 konnten mit 100 % TDH-Hydrolysat mehr als 10 g/l Lactat bilden. *Lac. lactis* B 162 bildete in fast allen Verdünnungsstufen hohe Mengen an Lactat (bis zu 12,3 g/l).

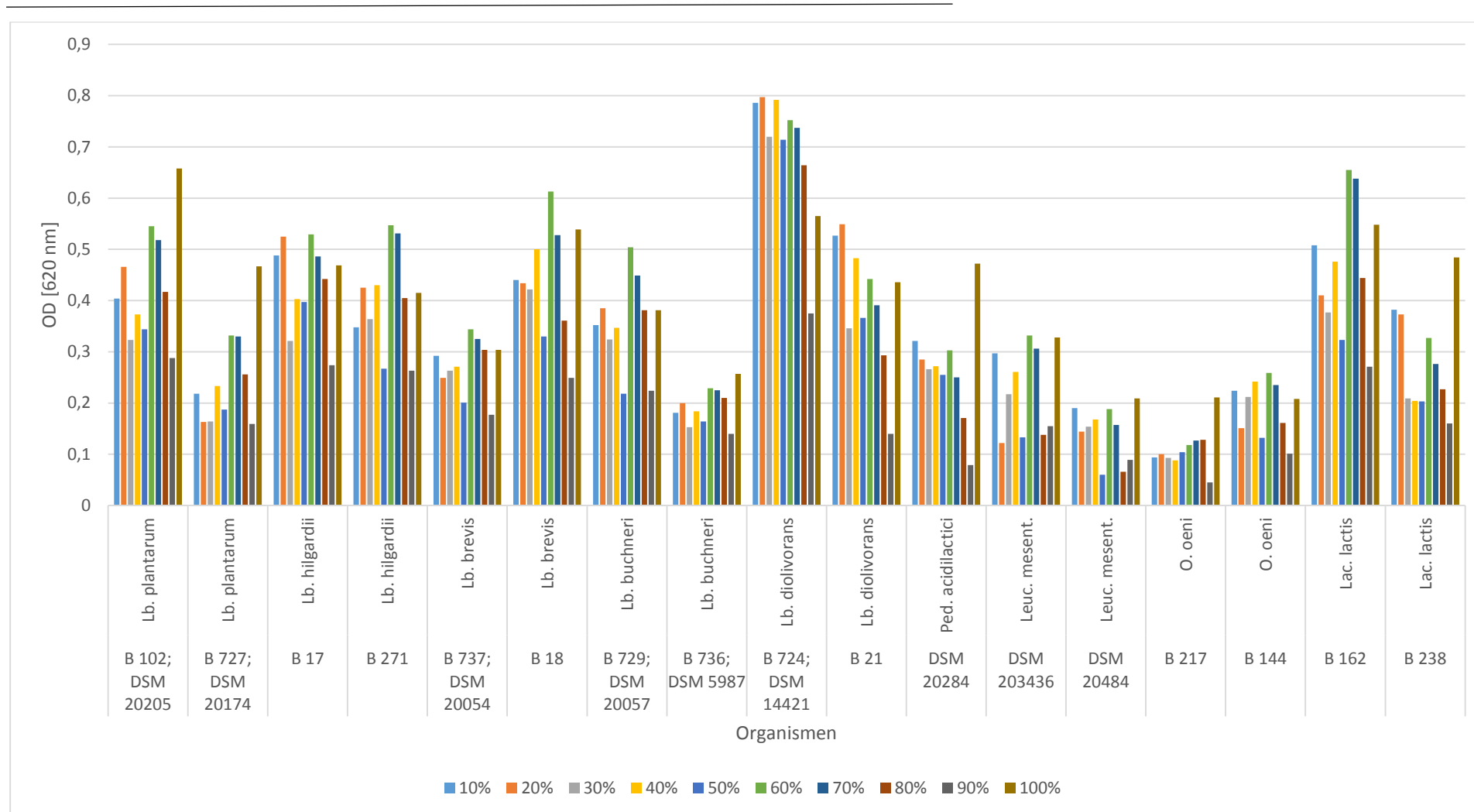


Abbildung 3.28: Wachstum der Milchsäurebakterien (Stammbezeichnung IMW und/oder Sammlungsnummer DSMZ) in Tomatensaftmedium mit 10-100 % (Tab. 2.32 + 2.33) hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Bestimmung der optischen Dichte mittels Zweistrahlphotometer (Photometer UV-VIS Recording Spectrophotometer UV-160A, Shimadzu, Kyoto, Japan).

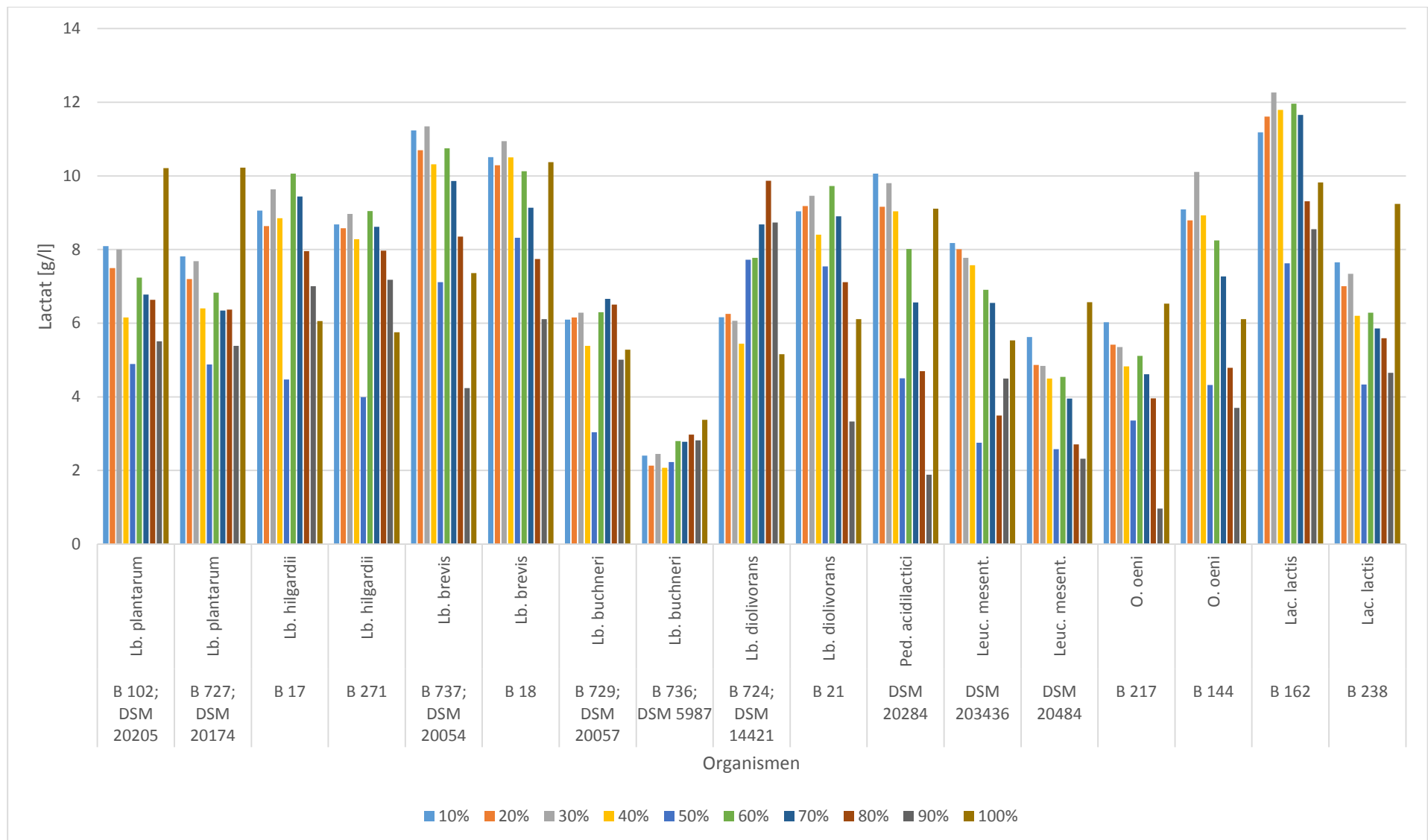


Abbildung 3.29: Lactatbildung der Milchsäurebakterien (Stammbezeichnung IMW und/oder Sammlungsnummer DSMZ) in Tomatensaftmedium mit 10-100 % (Tab. 2.32 + 2.33) hemicellulosischem TDH-Hydrolysat. Lactatbestimmung mittels HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan, siehe Abschnitt 2.8).

Die Bildung von Lactat durch die MSB in Medien mit Hydrolysat und reduziertem Gehalt an Tomatensaft (siehe Tabelle 2.34) wurde mittels HPLC bestimmt. Es erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der angebotenen Edukte, sowie der entstandenen Produkte. In Tabelle 3.7 ist Bilanz der Edukte und Produkte mit 25 % Tomatensaft dargestellt. Es ist deutlich zusehen, dass ausgehend von der Edukt-Konzentration (4,5 g Glc/l, 10 g Xyl/l) eine hohe Menge an Lactat (10 - 12 g Lactat/l) produziert werden konnte. Zwei weitere produzierte Substanzen waren Acetat und Ethanol. Acetat wurde in Mengen von 2,6 - 4,6 g/l gebildet. Ethanol wurde nur von dem Stamm *Lactococcus lactis* B 238 gebildet (0,2 g EtOH/l). Das Medium mit 15 % Tomatensaft enthielt ursprünglich eine geringere Konzentration an Glucose und Xylose (3,95 g Glc/l, 9,40 g Xyl/l), jedoch waren hier zusätzlich 1,04 g/l Arabinose enthalten. Die Abweichungen in der Ausgangskonzentration der Zucker entstanden durch die geringere Menge an Tomatensaft, welcher Zucker enthielt, und durch Verwendung unterschiedlicher Hydrolysat-Chargen. Ausgehend von diesen Konzentrationen wurden bei diesem Versuchsansatz 8,6 - 10,1 g/l Lactat gebildet. Das entstandene Acetat war hier erhöht und belegte Werte von 3,0 - 5,2 g/l. Auch hier wurde Ethanol nur durch den Organismus *Lactococcus lactis* B 238 produziert. Die Konzentration lag bei 0,1 g/l. Eine weitere Reduktion des eingesetzten Tomatensafts (5 %) führte zu einer Minderung der Zucker auf 2,7 g/l Glucose, 6,2 g/l Xylose und 1,1 g/l Arabinose (Tab. 3.8). Mit 5 % Tomatensaft im Medium konnten deshalb nur 7,1 - 8,2 g/l Lactat gebildet werden. Acetat wurde in den Mengen von 3,5 - 5,7 g/l an das Medium abgegeben. Bei diesem Versuch wurde durch keinen der dargestellten Organismen Ethanol gebildet (Tab. 3.9). Die gewonnenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.30 und 3.31 zusammengefasst.

Weiterhin wurde die Lactatbildung in einem Milchsäurebakterien-Minimal-Medium (MMSB) und in einem Cystein-Mangan-Mix (CM-Mix) untersucht (siehe Tabelle 2.36). Diese Medien enthielten wesentlich weniger Bestandteile als die ursprünglichen Tomatensaftmedien. Der verwendete CM-Mix bestand nur aus Cystein, Mangan und Hydrolysat. Das MMSB eignete sich nicht für die Anzucht und die Umsetzung in Lactat. Hier wurde kaum Lactat, sondern vor allem Acetat gebildet. Auch das Hydrolysat + CM-Mix erwies sich nicht optimal für die Lactatbildung. Die angebotene C-Quelle wurde kaum verstoffwechselt und die Acetat-Bildung überstieg die Lactat-Bildung (Abbildung 3.32 und 3.33).

Tabelle 3.7: Auflistung der optischen Dichte sowie der Edukte und Produkte ausgewählter MSB in Tomatensaftmedium mit 25% Tomatensaft (Tab. 2.34). Bestimmung der OD im Titertek-Photometer nach 12 d (Titertek Multiskan® MKII, Labs Systems, Lappeenranta, Finnland).

	OD	Glc	Glc	Xyl	Xyl	Ara	Ara	Lac	Lac	Ac	Ac	EtOH	EtOH
	[620 nm]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]
Unbeimpfte Kontrolle	0,08	4,47	24,80	10,04	66,90	0,00	0,00	0,21	2,30	0,90	15,00	0,00	0,00
<i>Lactobacillus hilgardii</i> B 17	0,22	0,00	0,00	1,02	6,80	0,00	0,00	10,89	120,90	4,43	73,7	0,00	0,00
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DSM 20343	0,22	0,11	0,60	1,78	11,90	0,00	0,00	11,24	124,80	4,33	72,1	0,00	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> B 162	0,23	0,04	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	12,01	133,30	4,63	77,1	0,00	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> B 238	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,26	113,90	2,62	43,5	0,22	4,70

Tabelle 3.8: Auflistung der optischen Dichte sowie der Edukte und Produkte ausgewählter MSB in Tomatensaftmedium mit 15% Tomatesaft (Tab. 2.34). Bestimmung der OD im Titertek-Photometer nach 12 d (Titertek Multiskan® MKII, Labs Systems, Lappeenranta, Finnland).

	OD [620 nm]	Glc [g/l]	Glc [mmol/l]	Xyl [g/l]	Xyl [mmol/l]	Ara [g/l]	Ara [mol/l]	Lac [g/l]	Lac [mmol/l]	Ac [g/l]	Ac [mmol/l]	EtOH [g/l]	EtOH [mmol/l]
Unbeimpfte Kontrolle	0,09	3,95	21,90	7,42	9,40	1,04	6,90	0,00	0,00	1,08	18,00	0,00	0,00
<i>Lactobacillus hilgardii</i> B17	0,29	0,00	0,00	0,13	0,90	0,00	0,00	9,50	105,5	5,19	86,50	0,00	0,00
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DSM 20343	0,20	0,00	0,00	0,14	0,90	0,00	0,00	9,79	108,6	5,08	84,60	0,00	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> B 162	0,19	0,00	0,00	0,13	0,90	0,00	0,00	10,13	112,5	5,00	83,30	0,00	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> B 238	0,16	0,04	0,20	0,13	0,90	0,00	0,00	8,60	95,5	2,95	49,10	0,13	2,90

Tabelle 3.9: Auflistung der optischen Dichte sowie der Edukte und Produkte ausgewählter MSB in Tomatensaftmedium mit 5% Tomatensaft (Tab. 2.34). Bestimmung der OD im Titertek-Photometer nach 12 d (Titertek Multiskan® MKII, Labs Systems, Lappeenranta, Finnland).

	OD [620 nm]	Glc [g/l]	Glc [mmol/l]	Xyl [g/l]	Xyl [mmol/l]	Ara [g/l]	Ara [mmol/l]	Lac [g/l]	Lac [mmol/l]	Ac [g/l]	Ac [mmol/l]	EtOH [g/l]	EtOH [mol/l]
Unbeimpfte Kontrolle	0,09	2,66	14,80	6,23	41,50	1,11	7,40	0,00	0,00	1,17	19,50	0,00	0,00
<i>Lactobacillus hilgardii</i> B17	0,37	0,00	0,00	0,09	0,60	0,00	0,00	7,52	83,50	5,68	94,50	0,00	0,00
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DSM 20343	0,31	0,00	0,00	0,10	0,70	0,00	0,00	7,82	86,8	5,61	93,40	0,00	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> B 162	0,27	0,00	0,00	0,08	0,50	0,00	0,00	8,18	90,8	5,36	89,30	0,00	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> B 238	0,27	0,05	0,30	0,11	0,70	0,86	5,70	7,14	79,2	3,53	58,70	0,00	0,00

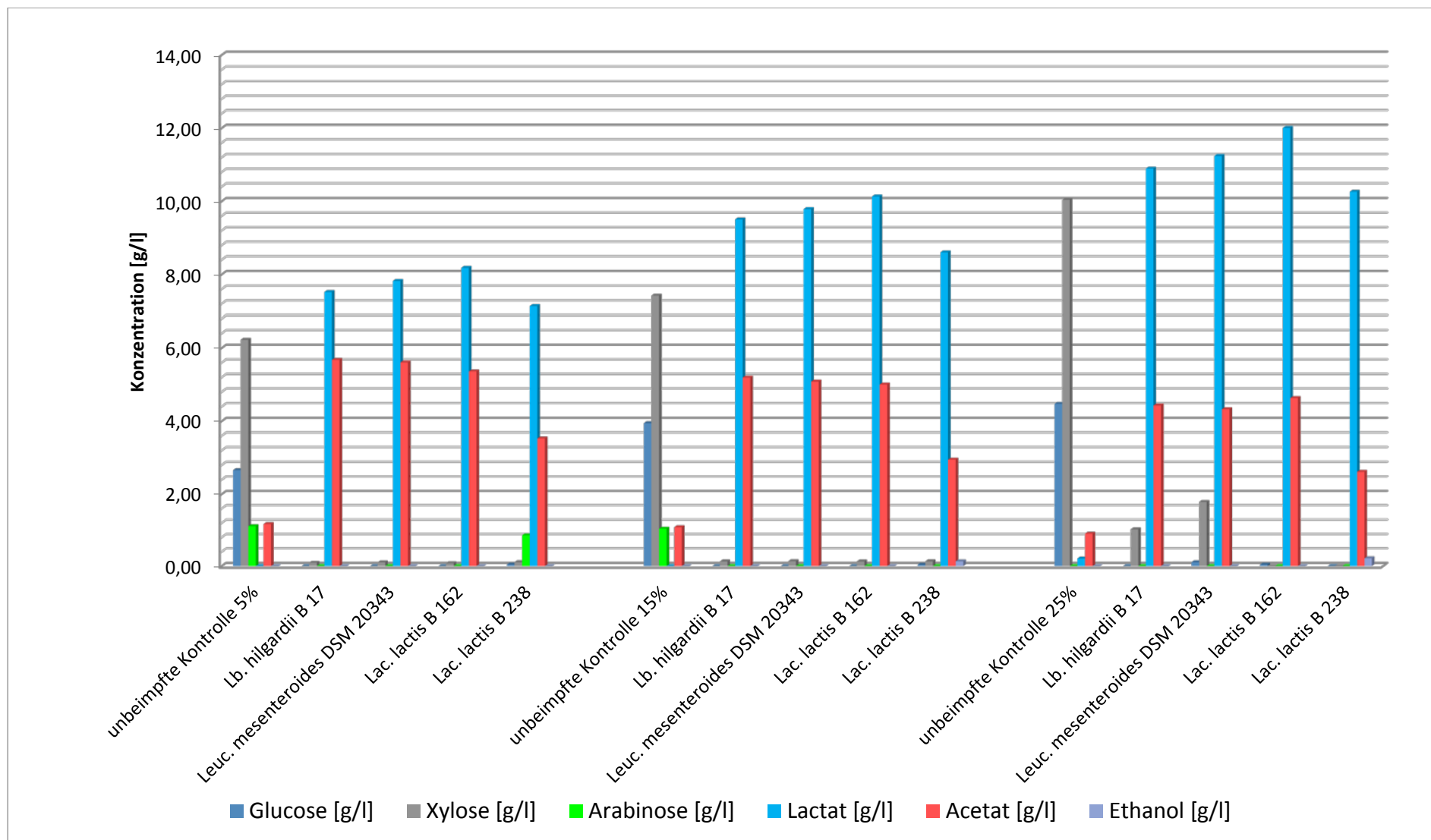


Abbildung 3.30: Bildung von Lactat, Acetat und Ethanol durch *Lb. hilgardii* B 17, *Leuc. mesenteroides* DSM 20343, *Lac. lactis* B 162 und *Lac. lactis* B 238 in Tomatensaftmedium mit 5-25% Tomatensaft (Tab. 2.34). Konzentrationsangabe in g/l (siehe Tabellen 3.7 – 3.9).

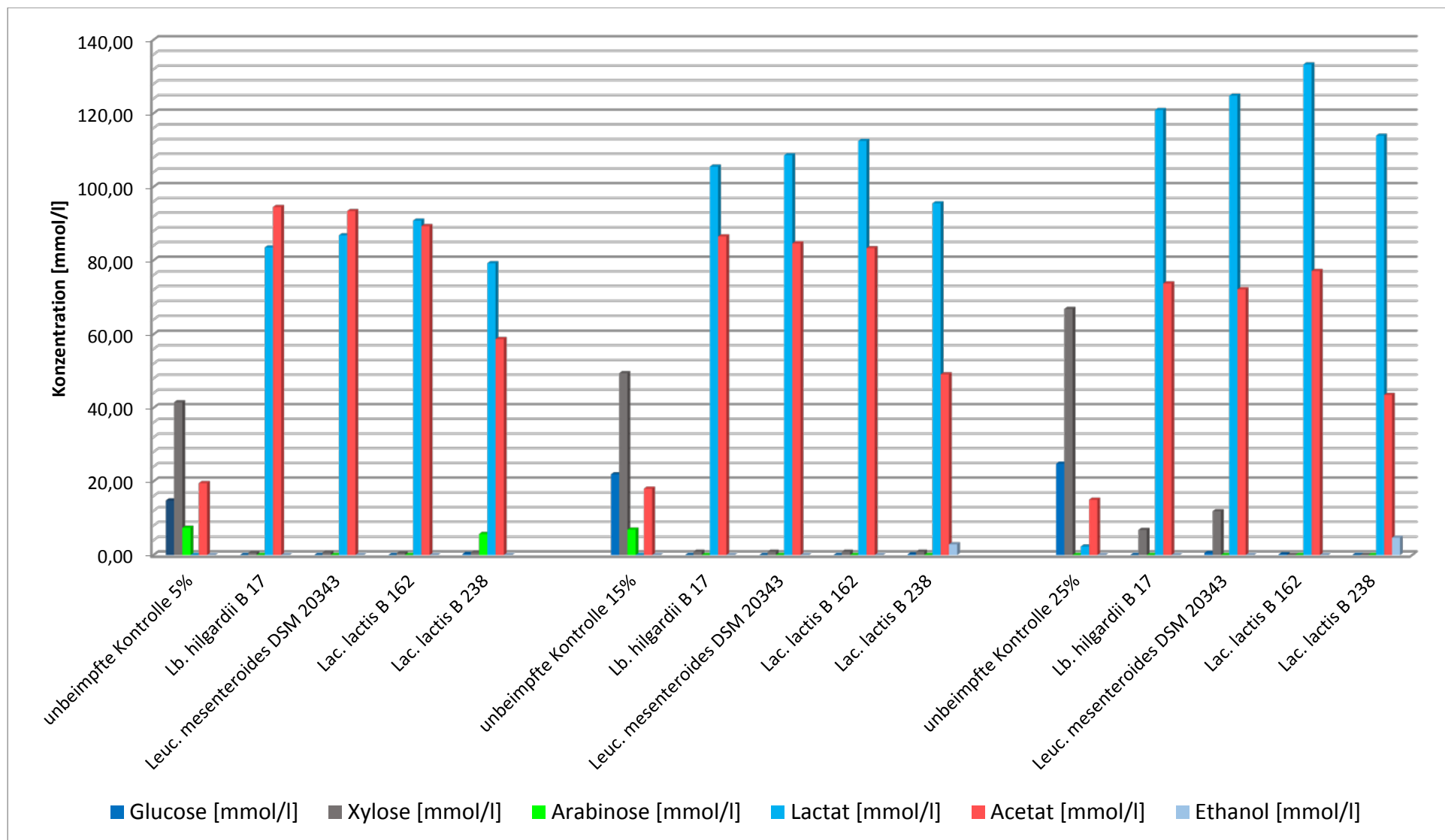


Abbildung 3.31: Bildung von Lactat, Acetat und Ethanol durch *Lb. hilgardii* B 17, *Leuc. mesenteroides* DSM 20343, *Lac. lactis* B 162 und *Lac. lactis* B 238 in Tomatensaftmedium mit 5-25% Tomatensaft (Tab. 2.34). Konzentrationsangabe in mmol/l (siehe Tabellen 3.7 – 3.9).

Tabelle 3.10: Auflistung der optischen Dichte sowie der Edukte und Produkte ausgewählter MSB in Milchsäurebakterien-Minimal-Medium (Tab. 2.34). Bestimmung der OD im Titertek-Photometer nach 12 d (Titertek Multiskan® MKII, Labs Systems, Lappeenranta, Finnland).

	OD [620 nm]	Glc [g/l]	Glc [mmol/l]	Xyl [g/l]	Xyl [mmol/l]	Ara [g/l]	Ara [mmol/l]	Lac [g/l]	Lac [mmol/l]	Ac [g/l]	Ac [mmol/l]	EtOH [g/l]	EtOH [mmol/l]
Unbeimpfte Kontrolle	0,09	2,37	13,20	9,39	62,60	1,87	12,40	0,00	0,00	0,91	15,20	0,00	0,00
<i>Lactobacillus hilgardii</i> B17	0,22	0,14	0,80	0,66	4,40	0,38	2,50	0,16	1,80	5,81	96,70	0,00	0,00
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DSM 20343	0,20	0,14	0,80	0,71	4,70	0,37	2,50	0,21	2,30	5,53	92,20	0,00	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> B 162	0,22	0,13	0,70	0,00	0,00	0,33	2,20	0,18	2,00	5,63	93,80	0,00	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> B 238	0,24	1,47	8,20	0,00	0,00	1,38	9,20	0,17	1,80	4,52	75,20	0,00	0,00

Tabelle 3.11: Auflistung der optischen Dichte sowie der Edukte und Produkte ausgewählter MSB in Hydrolysat + CM-Mix (Tab. 2.34). Bestimmung der OD im Reagenzglasphotometer (Photometer UV-120, Shimadzu, Kyoto, Japan) nach 12 d.

	OD [620 nm]	Glc [g/l]	Glc [mmol/l]	Xyl [g/l]	Xyl [mmol/l]	Ara [g/l]	Ara [mmol/l]	Lac [g/l]	Lac [mmol/l]	Ac [g/l]	Ac [mmol/l]	EtOH [g/l]	EtOH [mmol/l]
Unbeimpfte Kontrolle		0,59	3,30	2,72	18,10	0,47	3,10	0,00	0,00	0,54	9,00	0,00	0,00
<i>Lactobacillus hilgardii</i> B17	0,43	0,21	1,20	2,14	14,20	0,00	0,00	0,70	7,80	0,95	15,70	0,00	0,00
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DSM 20343	0,73	0,04	0,20	1,96	13,00	0,00	0,00	1,18	7,80	1,17	19,50	0,00	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> B 162	0,73	0,05	0,30	1,49	9,90	0,41	2,80	1,53	17,00	1,08	18,00	0,00	0,00
<i>Lactococcus lactis</i> B 238	0,49	0,04	0,20	2,58	17,20	0,40	2,70	0,92	10,20	0,65	10,70	0,00	0,00

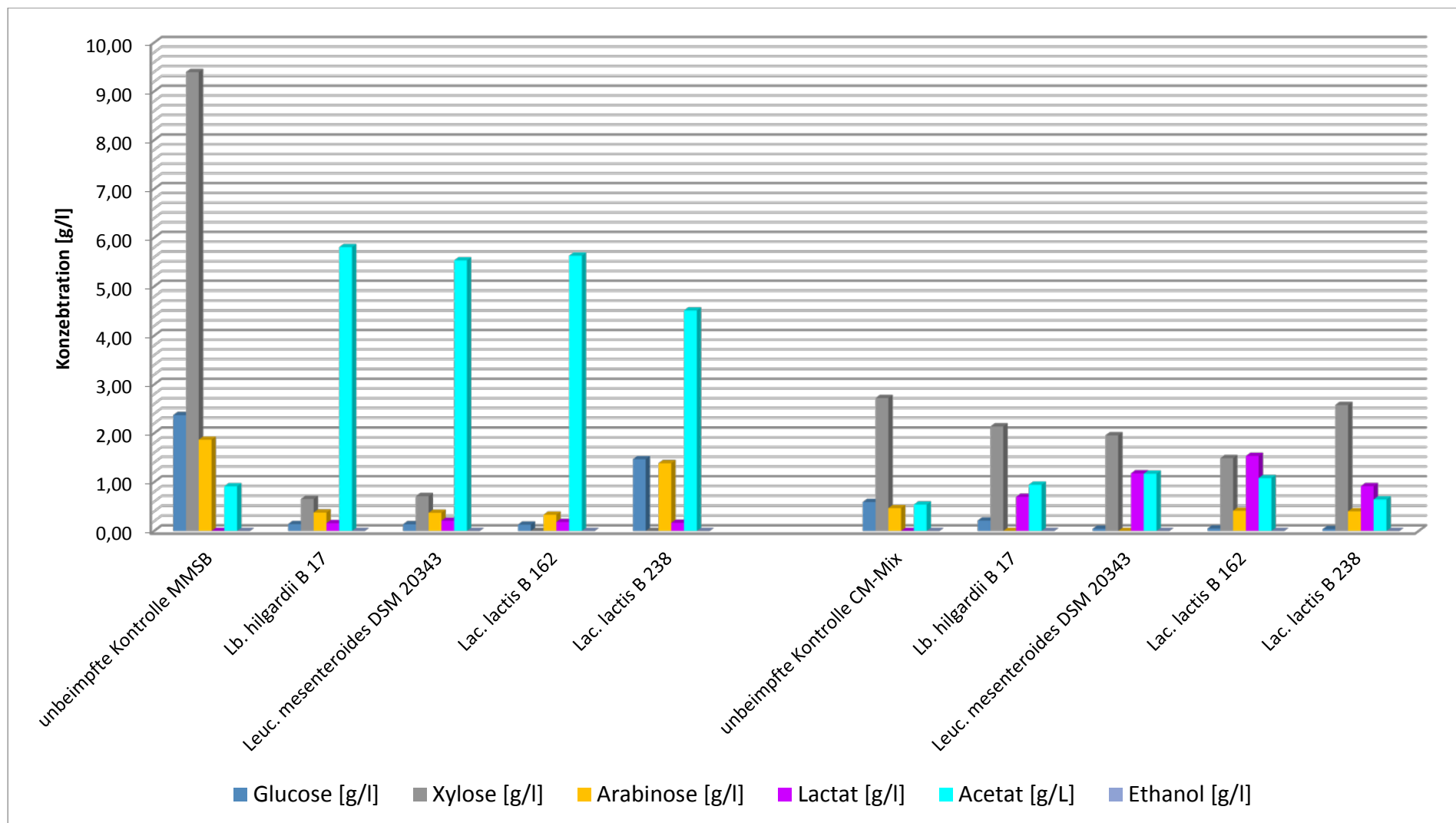


Abbildung 3.32: Bildung von Lactat, Acetat und Ethanol durch *Lb. hilgardii* B 17, *Leuc. mesenteroides* DSM 20343, *Lac. lactis* B 162 und *Lac. lactis* B 238 in Minimal-Milchsäurebakterien-Medium (MMSB) und Cystein-Mangan-Mix (CM-Mix) (Tab. 2.34). Konzentrationsangabe in g/l (siehe Tabelle 3.10 und 3.11).

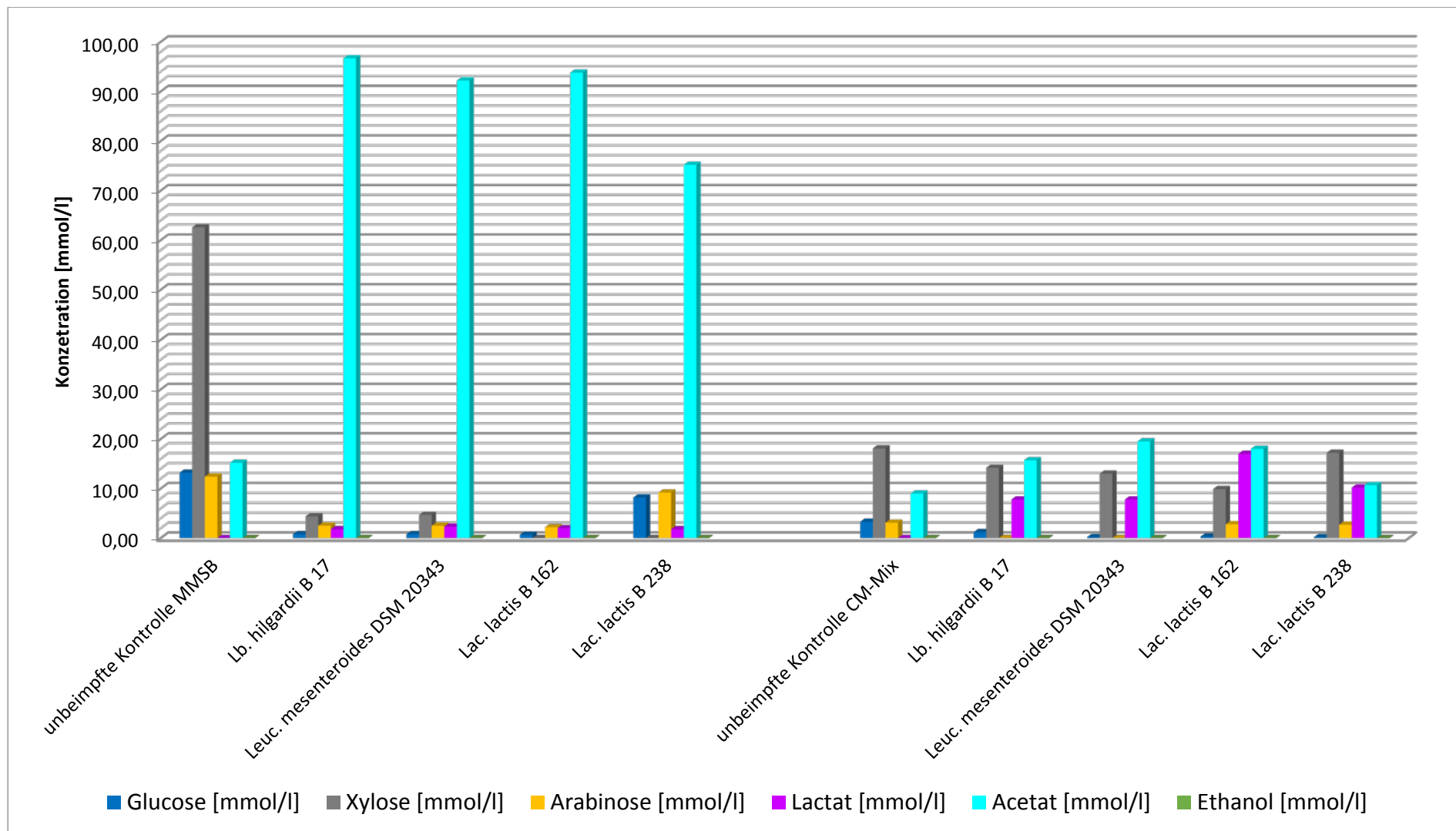


Abbildung 3.33: Bildung von Lactat, Acetat und Ethanol durch *Lb. hilgardii* B 17, *Leuc. mesenteroides* DSM 20343, *Lac. lactis* B 162 und *Lac. lactis* B 238 in Minimal-Milchsäurebakterien-Medium (MMSB) und Cystein-Mangan-Mix (CM-Mix) (Tab. 2.34). Konzentrationsangabe in mmol/l (siehe Tabelle 3.10 und 3.11).

3.8 Produktion von PHB aus der cellulosischen Reststroh-Fraktion

3.8.1 Reststrohydrolyse durch Mikroorganismen

Die unlösliche cellulosische Fraktion des Weizenstrohs nach der TDH enthielt Glucose gespeichert in Form von Cellulose (51,2 %), ein Rest an Hemicellulose (13,7 %) und Lignin (26,7 %). Die Cellulose der cellulosischen Fraktion sollte mit Hilfe von Organismen, isoliert aus Termitendärmen (Wenzel 2001, 2002), in ihre Glucose-Monomere zerlegt werden. Das Wachstum der Termitenisolate mit cellulosischen Reststroh-Fraktion als einziger C-Quelle in festem und flüssigem Mineralmedium wurde überprüft. Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind in Tabelle 3.12 dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass alle getesteten Organismen unter diesen Bedingungen wachsen. Bei den Versuchen auf festen Medium zeigten vor allem die *Bacillus*-Arten gutes Wachstum auf den Platten. Hier waren große koloniebildende Einheiten zu erkennen. Ebenso bei *Pseudomonas aeruginosa* CK 40. Geringes Wachstum, erkennbar an sehr kleinen koloniebildenden Einheiten, zeigte sich bei *Klebsiella pneumoniae* KMC 7.1, den cellulosischen Bakterienstämmen KScC3-1 und KScC 3-2, sowie bei *Cellulosimicrobium cellulans* E 3 und *Paenibacillus polymyxa* CZ 177d. Diese Beobachtungen stimmten zum Großteil mit denen in Flüssigkultur gewonnenen Ergebnissen überein, wobei *Bacillus coagulans* KMC 12 und *Bacillus licheniformis* KB 1, sowie das cellulolytische Bakterium KScC 3-2 in flüssigen Kulturbedingungen schlechteres Wachstum aufwiesen.

Tabelle 3.12: Cellulolytische Bakterienisolate aus der Stammsammlung des IMW. Anzucht auf Platten und in Reagenzgläsern (RG) mit Mineralmedium (MM) versetzt mit Stroh (Abschnitt 2.13.2). Das Wachstum wurde mit ++ für starkes Wachstum, + für Wachstum, (+) für geringes Wachstum und (-) für kein Wachstum definiert.

Organismus	Stamm-Nr.	Platte MM+Stroh	5 mL RG MM+Stroh
Cellulosisches Bakterium	KScC 3-1	(+)	(+)
<i>Bacillus cereus</i>	KD 12	+	++
<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8-3	(+)	(+)
<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8-1	+	++
<i>Bacillus subtilis</i>	KD 8-2	(+)	(+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KMC 7.1	(+)	(+)
<i>Bacillus coagulans</i>	KMC 12	+	(+)
<i>Bacillus licheniformis</i>	KB 1	+	(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CK 40	+	+
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	CZ 177d	(+)	+
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	E 3	(+)	++
Cellulosisches Bakterium	KScC 3-2	+	(+)

Somit wurde die Cellulose des Reststrohs durch die Organismen abgebaut und Zellwachstum ermöglicht. Ob die Cellulose durch die Mikroorganismen auch in größeren Mengen abgebaut wurde, sollte durch Bestimmung freier Glucose im Überstand der Flüssigmedien untersucht werden. Die Flüssigkeitschromatographie der Überstände der untersuchten Organismen *Bacillus cereus* KD 12, *Bacillus subtilis* KD 8-1 und *Cellulosimicrobium cellulans* E 3 ergaben, dass sich keine freie Glucose im Medium befand. Lediglich die unbeimpfte Kontrolle wies Spuren von freier Glucose auf. Die Konzentration lag hier bei 0,28 g/l. Die geringe Konzentration an freier Glucose im Medium ermöglichte es den Bakterien, sich an das Medium zu adaptieren und sich zu vermehren. Um weiter wachsen zu können, mussten die Organismen ihre Cellulose-abbauenden Enzyme induzieren. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sie ausgewählten Organismen zwar befähigt waren unter diesen Bedingungen zu wachsen und wahrscheinlich auch Glucose aus der Cellulose frei setzten. Dies geschieht entweder in sehr kleinem Maßstab oder die freigesetzte Glucose wird direkt in das Zellwachstum investiert. Folglich war die frei gesetzte Glucose weder nachzuweisen, noch stand sie für eine etwaige PHB-Produktion in großen Mengen zur Verfügung.

3.8.2 Enzymatische Hydrolyse der cellulosischen Reststroh-Fraktion

Durch käufliche Cellulasen konnte das Reststroh sehr gut hydrolysiert werden. Es wurde der optimale pH-Wert sowie die optimale Temperatur der beiden Enzyme NS 22086 und NS 22083 (Novozymes, Dänemark) zur Lyse der Cellulose aus der Reststrohfraktion bestimmt. In Bezug auf den pH-Wert konnte für den Cellulase-Komplex NS 22086 ein Optimum von 5,0, für die Xylansase NS 22083 ein Wert von 5,5 bestimmt werden. Das Präparat NS 22086 war für die Glucosefreisetzung verantwortlich, die Enzymlösung NS 22083 wurde eingesetzt um die restliche Hemicellulose zu hydrolysieren. Bei Bestimmung der optimalen Temperatur zur Freisetzung von Glucose wurde für das Enzympräparat NS 22086 ein Optimum von 40 °C ermittelt, für das Präparat NS 22083 eine Temperatur von 50 °C (Bohn 2012). Beide Enzyme sollten in Kombination eine effektive Glucose- und Xylosetzfreisetzung bewirken, hierzu wurden rechnerisch die Mittelwerte der beiden Optima gebildet (Tabelle 3.13).

Tabelle 3.13: pH- und Temperaturoptimum der beiden Enzympräparate NS 22086 und NS 22083, sowie die gemittelten Optimal-Werte der beiden Präparate.

Parameter	NS 22086	NS 22083	Mittelwert
pH- Optimum	5,0	5,5	5,25
Temperatur- Optimum [°C]	40	50	45

Die gemittelten Werte dienten als neue Parameter bei einer Kombination der beiden Enzyme. Nun folgte die Ermittlung der optimalen Enzymkonzentration sowie der optimalen Inkubationszeit. Die Ansatzgröße betrug hierbei 0,15 g Reststroh in 8,0 ml Medium (18,75 g/l). Die Versuche fanden unter

sterilen Bedingungen statt. Tabelle 3.14 fasst die Versuchsp Parameter und die Ergebnisse zusammen. Es wird deutlich, dass bei Zunahme der Inkubationszeit von 48 h über 120 h bis hin zu 168 h Stunden die Glucose- und Xylosetreisetzung zunahm. Eine Zunahme der freigesetzten Zuckermengen kann ebenfalls bei Steigerung der eingesetzten Enzymkonzentrationen beobachtet werden. Vergleicht man die drei verschiedenen Enzymansätze NS 22086, NS 22083 und NS 22086+NS 22083 kombiniert fiel auf, dass durch die Kombination beider Enzympräparate die höchste Ausbeute an Glucose und Xylose erreicht werden konnte. Hierbei konnte bei Einsatz von 3,5 µl/ml von NS 22086 und 3,0 µl/ml von NS 22083 ein maximaler Glucoseanteil von 68,44 % aus dem Reststroh freigesetzt werden. Wie sich bereits bei den Versuchen zum pH- und Temperatur-Optimum abzeichnete (Bohn 2012), wird zudem deutlich, dass durch das Enzympräparat NS 22086 bei gleicher Enzymkonzentration nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden stets höhere Zuckermengen freigesetzt wurden als bei Enzym NS 22083. Mit Zunahme der Inkubationszeit zeigte hingegen das Enzympräparat NS 22083 ab 168 Stunden und einer Enzymkonzentration von 2,0 µl/ml eine leicht höhere Glucose-Ausbeute als dem Enzympräparat NS 22086. Bei den Enzymansätzen NS 22086 und NS 22086+NS 22083 kombiniert wird bereits nach 120 Stunden eine Glucose-Konzentration von über 10 g/l bei einigen Proben erreicht (Bohn, 2012). Diese Mengen eignen sich für eine Umsetzung der Glucose in das Speicherpolymer Poly-β-hydroxybuttersäure.

Tabelle 3.14: Ermittlung der optimalen Enzymkonzentration und der optimalen Inkubationsdauer (Bohn 2012).

Versuchsdauer			48 h			120 h			168 h		
Enzympräparat	Volumen	Einwaage	Glc-Konz.	Xyl-Konz.	Glc- Anteil	Glc-Konz.	Xyl-Konz.	Glc- Anteil	Glc-Konz.	Xyl-Konz.	Glc- Anteil
pH Wert	Enzymlsg.	Reststroh	[g/l]	[g/l]	am	[g/l]	[g/l]	am	[g/l]	[g/l]	am
	[µl/ml]	[g/l]			Reststroh			Reststroh			Reststroh
					[%]			[%]			[%]
NS 22086 pH 5,0	0,5	18,75	5,18	0,65	27,61	7,24	0,83	38,63	8,12	0,91	43,30
	1,0	18,75	6,77	0,73	36,09	8,68	0,93	46,29	9,42	1,01	50,24
	1,5	18,75	7,43	0,75	39,62	9,57	0,93	51,01	10,40	1,05	55,46
	2,0	18,75	8,03	0,92	42,81	10,05	1,11	53,61	10,77	1,23	57,43
	2,5	18,75	8,21	0,96	43,77	10,20	1,14	54,39	10,97	1,20	58,53
	3,0	18,75	8,43	0,95	44,98	10,50	1,11	56,00	10,99	1,19	58,61
NS 22083 pH 5,5	0,5	18,75	2,18	0,00	11,64	5,00	0,06	26,66	6,07	0,07	32,39
	1,0	18,75	4,60	0,00	24,54	7,48	0,07	39,91	8,82	0,06	47,03
	1,5	18,75	6,52	0,00	34,76	9,42	0,11	50,26	11,14	0,12	59,42
	2,0	18,75	7,37	0,00	39,29	9,34	0,59	49,83	11,12	0,18	59,32
	2,5	18,75	7,44	0,00	39,68	10,73	0,13	57,25	11,35	0,18	60,54
NS 22086 + NS 22083 pH 5,25	0,5/1,0	18,75	6,46	0,71	34,45	8,75	0,90	46,64	10,43	1,04	55,64
	1,0/0,5	18,75	7,79	0,81	41,56	9,80	1,00	52,27	11,03	1,21	58,85
	2,0/1,5	18,75	8,35	0,88	44,53	11,23	1,05	59,89	11,66	1,11	62,16
	3,0/2,5	18,75	9,34	0,90	49,82	11,22	1,14	59,86	11,92	1,18	63,59
	3,5/3,0	18,75	9,98	0,94	53,21	12,03	1,20	64,17	12,83	1,28	68,44

3.8.3 Optimale Volumina der eingesetzten Enzymlösungen

Im Folgenden wurde im Upscaling getestet, in welchen Volumina die Enzympräparate eine maximale Glucosefreisetzung für die PHB-Bildung aus Glucose zeigten. Des Weiteren wurde überprüft ob bei einem für die PHB-Produzenten optimalen pH-Wert eine ausreichende Menge an Zucker frei wurde. Abbildung 3.34 stellt die erhaltenen Ergebnisse dar. Es konnte festgestellt werden, dass eine Hydrolyse im pH-Optimum der PHB-Produzenten nicht effektiv war. Bei pH 6,8 war die Freisetzung der Glucose wesentlich geringer und überschritt eine Konzentration von 5,0 g/l nur in der höchsten eingesetzten Enzym-Mengen. Bei dem gemittelten optimalen Enzym-pH von 5,25 (Tabelle 3.13) konnten höhere Konzentrationen an Zucker erreicht werden. Die Konzentration von 5 g/l an freier Glucose wurde bereits in der niedrigsten Enzymkonzentration überschritten. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass bei Einsatz von 3,0 ml/l NS 22086 und 2,5 ml/l NS 22083 die maximale Glucose-Freisetzung erreicht werden konnte. Deshalb wurde in den weiteren Versuchen mit einem pH-Wert von 5,25 und einem Volumen der Enzympräparate von 3,0 ml/l bzw. 2,5 ml/l gearbeitet.

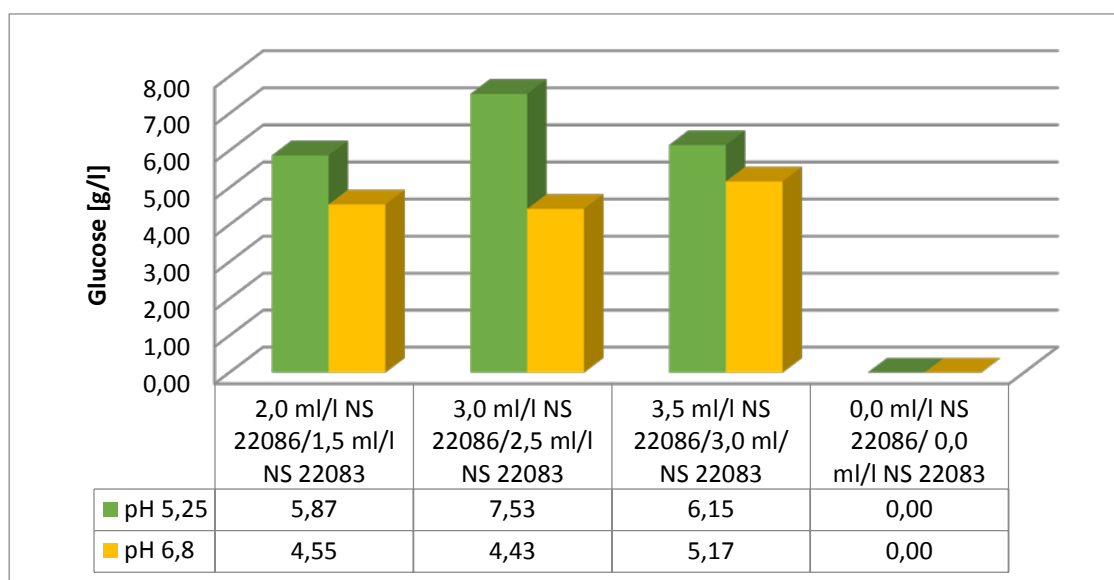


Abbildung 3.34: Vergleich von zwei pH-Parametern zur optimalen Hydrolyse von Glucose aus Reststroh mit der Kombination aus den Enzympräparaten NS 22086+NS 22083.

3.8.4 Optimale Substratkonzentration zur PHB-Bildung aus Glucose

Um die Zuckerkonzentration für eine folgende PHB-Produktion auf mindestens 10 g/l zu erhöhen, wurde die optimale Substratkonzentration ermittelt. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen der cellulosischen Reststroh-Fraktion eingesetzt (10 g/l auf 20 g/l und 30 g/l). Die Konzentration der entstandenen Glucose Monomere wurden nach der enzymatischen Hydrolyse bestimmt und graphisch aufgetragen. Abbildung 3.35 zeigt, dass sich mit Erhöhung der Substratkonzentration ebenfalls die Menge an der freigesetzten Glucose erhöhte. Schon mit Verdopplung der Ausgangsmenge an Stroh konnte ein Wert von 12 g Glc/l erzielt werden. Eine Erhöhung auf 3 g Substrat lieferte nach 6 d Inkubation eine Konzentration von 19 g Glc/l. Es ist deutlich zu erkennen, dass es bei den Enzymen

noch nicht zu einer Substratsättigung kam, sondern die Ausbeute konnte durch Substraterhöhung gesteigert werden. Da sich in den vorherigen Versuchen eine Zuckerkonzentration für eine PHB-Bildung von ca. 10 g/l bewährte, wurde mit dem mittleren Ansatz weitergearbeitet (20 g Reststroh/l → 12,07 g Glc/l).

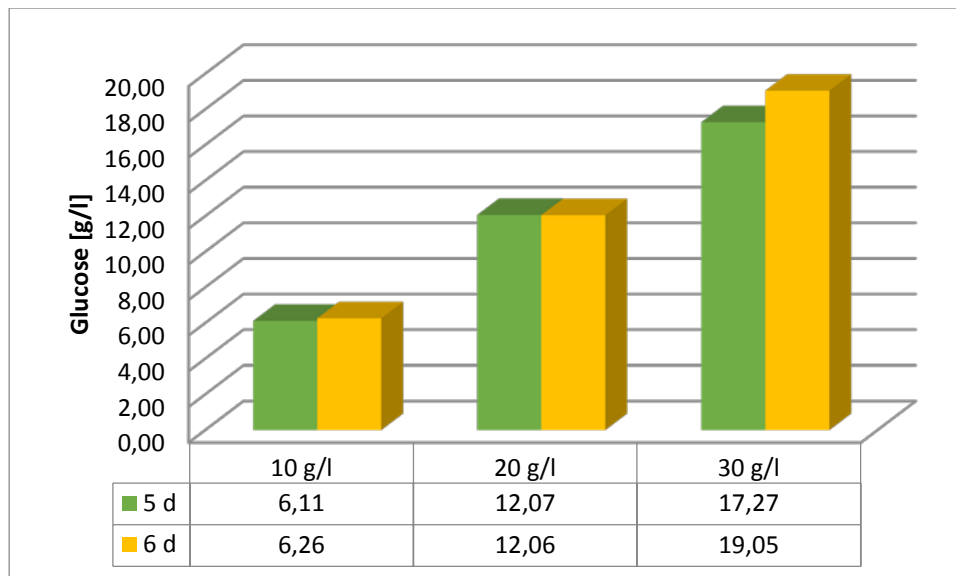


Abbildung 3.35: Ermittlung der optimalen Substratkonzentration zur Erlangungen einer geeigneten Glucose-Konzentration. Eingesetzt wurde cellulosische Reststroh-Fraktion (gefriergetrocknet) in den Konzentrationen 10 g/l, 20 g/l und 30 g/l. Das Volumen der Enzympräparate betrug 3,0 ml/l bei NS 22086 und 2,5 ml/l bei NS 22083.

3.8.5 PHB-Bildung aus cellulosischem Reststroh-Hydrolysat

Durch den Einsatz der beiden käuflichen Enzympräparate von Novozymes konnte eine ausreichende Menge an Glucose (>10 g/l) aus dem Reststroh gelöst werden. Die frei gewordene Glucose sollte durch die Referenzorganismen *Cupriavidus necator* DSM 545 und *Cupriavidus necator* NCIMB 11599, sowie die hauseigenen Stämme *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2 in PHB überführt werden. Die Ergebnisse der Versuchstage für die Stämme *Cupriavidus necator* DSM 545 und *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 sind in den Abbildungen 3.36 – 3.39 graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass *Cupriavidus necator* DSM 545 gutes Wachstum in dem enzymatischen Cellulose-Fraktion aufwies, eine maximale optische Dichte von 0,40 wurde an Versuchstag 2 gemessen. Die Glucose konnte während der Versuchsdauer um mehr als die Hälfte verstoffwechselt werden. Der höchste Anteil an PHB wurde am 2. Tag festgestellt. Er betrug ca. 31% des Zelltrockengewichts. Hier fiel auf, dass es nur langsam zu einem Abbau des Polymers kam. Die Messwerte am 3. und 4. Tag lagen nur geringfügig unter dem Maximalwert von 31%. Ähnlich verhielt es sich bei *Cupriavidus necator* NCIMB 11599. Auch hier konnte die größte Zelldichte am 2. Tag gemessen werden. Allerdings fiel hier die maximale PHB-Bildung auf Tag 4. Fast die Hälfte der Zelltrockenmasse bestand zu diesem Zeitpunkt

aus PHB. Zusammenfassend für die beiden Referenzstämme kann man festhalten, dass sie eine verlängerte stationäre Phase aufwiesen und es innerhalb von 24 h nicht zu einem Abbau der PHB kam.

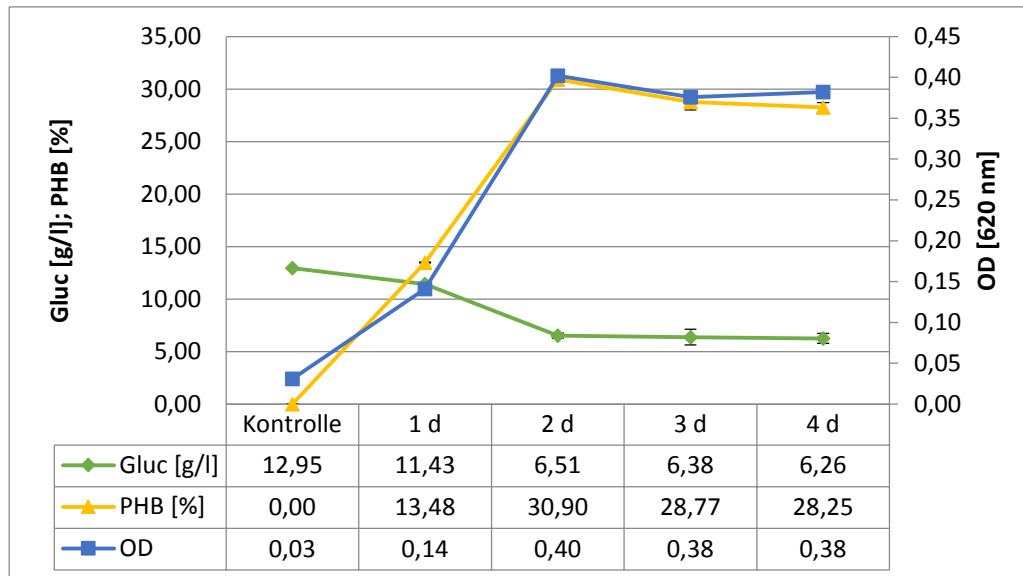


Abbildung 3.36: PHB-Bildung [%/ZTM], Glucoseabbau [g/l] und optische Dichte [OD 620 nm] von *Cupriavidus necator* DSM 545 in cellulosischem Reststroh-Hydrolysat. Probenahme jeweils an Tag 1, 2, 3 und 4.

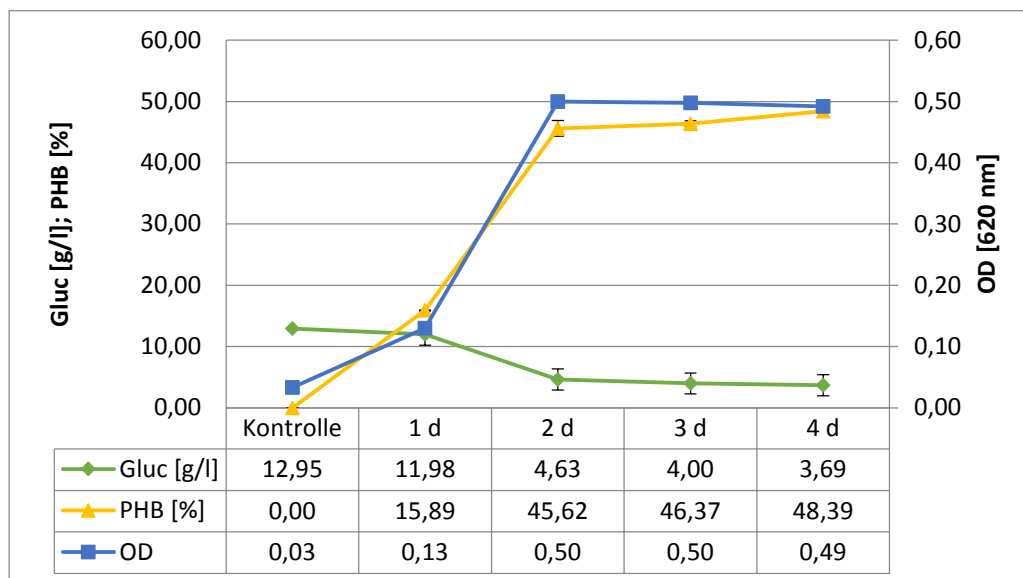


Abbildung 3.37: PHB-Bildung [%/ZTM], Glucoseabbau [g/l] und optische Dichte [OD 620 nm] von *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 in cellulosischem Reststroh-Hydrolysat. Probenahme jeweils an Tag 1, 2, 3 und 4.

Anders verhielt es sich bei den beiden institutseigenen Isolaten. Bei beiden konnte eine PHB-Bildung von über 50% an Versuchstag 1 nachgewiesen werden. Bei *Bacillus licheniformis* KHC 3 wurde der Zucker bis auf 2,3 g abgebaut. Die größte Zellmasse konnte an Tag 2 gemessen werden. Auch hier kam es nicht zu einem Abbau des Polymers innerhalb von 24 h. An Tag 4 konnten immer noch fast 43 % der Zelltrockenmasse als PHB identifiziert werden. Eine maximale Ausbeute von über 55 % zeigte sich bei *Bacillus megaterium* KNaC 2. Hier kam es außerdem zu einem Einbruch der Messwerte am 3. Tag auf

35,56 %, während am 4. Tag der PHB-Gehalt wieder 48,72 % betrug. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um einen Messfehler am 3. Tag.

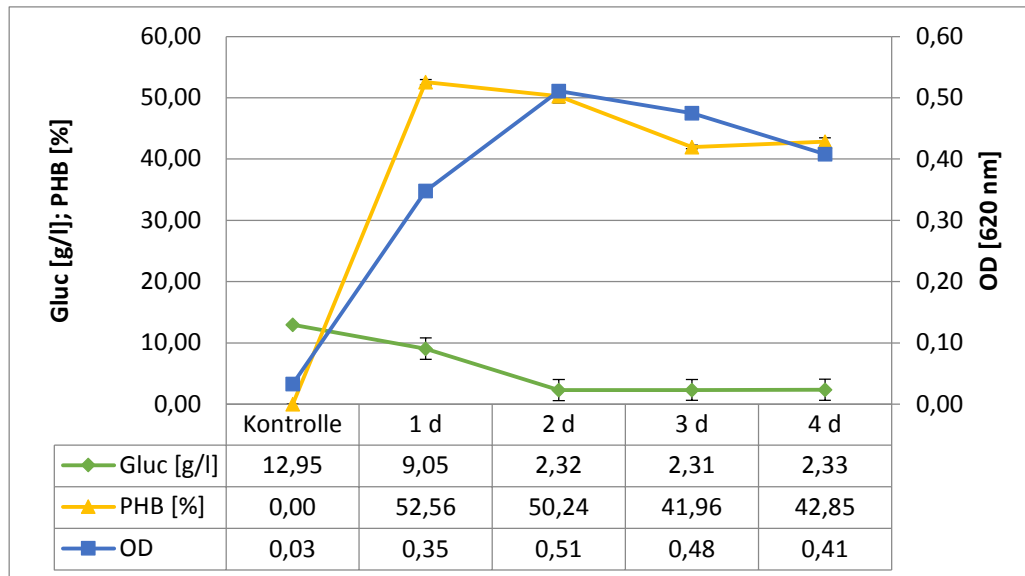


Abbildung 3.38: PHB-Bildung [%/ZTM], Glucoseabbau [g/l] und optische Dichte [OD 620 nm] von *Bacillus licheniformis* KHC 3 in cellulosischem Reststroh-Hydrolysat. Probenahme jeweils an Tag 1, 2, 3 und 4.

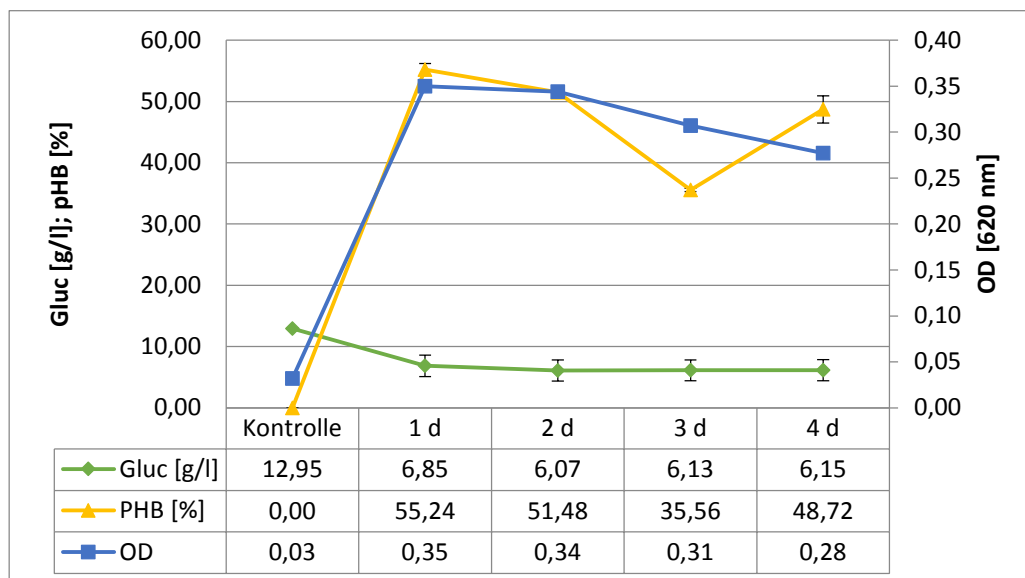


Abbildung 3.39: PHB-Bildung [%/ZTM], Glucoseabbau [g/l] und optische Dichte [OD 620 nm] von *Bacillus megaterium* KNaC 2 in cellulosischem Reststroh-Hydrolysat. Probenahme jeweils an Tag 1, 2, 3 und 4.

3.9 Lösungsmittelfreie Abtrennung der PHB

Die Abtrennung des Zielprodukts PHB von den produzierenden Zellen sollte möglichst umweltfreundlich und ohne Einsatz von schädlichen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Hierzu wurden enzymatische Methoden zur Lyse der Zellwände getestet. Der Einsatz von zellwandlytischen Exoenzymen von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 und *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814 wurde im Folgenden näher untersucht.

3.9.1 Optimale Parameter zur Zellyse

Der optimale pH-Wert zur Zellyse des Testorganismus *Cupriavidus necator* DSM 428 betrug pH 6,0. Die beiden *Bacillus*-Stämme wurden maximal bei pH 8,0 lysiert. Dies galt sowohl für das Enzymkonzentrat von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 als auch für das Konzentrat von *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814. Bei optimalem pH konnte das Konzentrat von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 bessere Lyseergebnisse als das Konzentrat von *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814 erzielen.

Die optimale Temperatur zur Lyse der Zielzellen lag bei beiden Enzymkonzentraten bei 40 °C. Jedoch konnte auch um diesen Temperaturbereich, bei 30 °C und 50 °C eine ähnlich hohe Lyse der Zielzellen erreicht werden. Daher muss man eher von einem Optimum-Plateau sprechen.

3.9.2 Lyseaktivität gegen PHB-Produzenten

Die Lyseaktivität der Kulturkonzentrate der beiden *Streptomyces* Stämme (*Streptomyces albidoflavus* DSM 40233, *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814) gegen die PHB-Produzenten *Cupriavidus necator* DSM 428, *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2 ist in Abbildung 3.40 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die institutseigenen Stämme *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2 eine sehr gute Lyse zeigen. *Bacillus licheniformis* KHC 3 konnte von beiden Enzymkonzentraten fast vollständig lysiert werden (99,7 % und 98,0 %). Ebenso wurde *Bacillus megaterium* KNaC 2 mit 84,0 % und 81,0 % nahezu vollständig lysiert. Da der Zellwandaufbau der Gram-positiven Bacillen dem des Standard-Testorganismus *Micrococcus luteus* gleicht (fehlende äußere Membran), konnten hier auch ähnliche hohe Lyseaktivitäten nachgewiesen werden. Anders verhielt es sich bei dem Gram-negativen Referenzorganismus für die PHB-Bildung *Cupriavidus necator* DSM 428. Dieser konnte durch die beiden Enzymmischungen nur bis zu ca. 40 % lysiert werden, da das Bakterium durch seine äußere Membran vor Angriff durch Muramidasen geschützt ist.

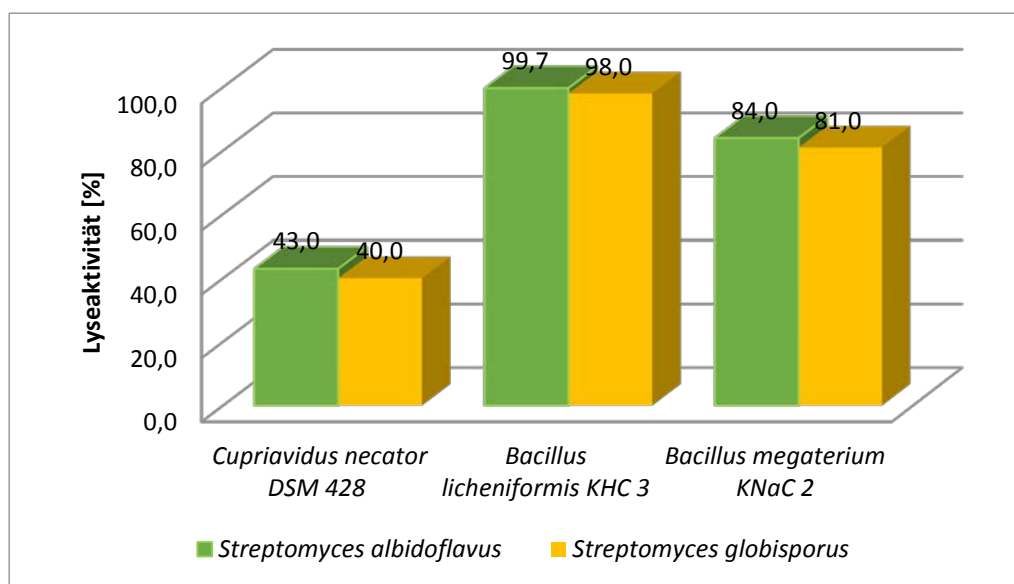


Abbildung 3.40: Lyseaktivität [%] des dialysierten Enzymkonzentrats von *Streptomyces albidoflavus* und *Streptomyces globisporus* nach 24 h Inkubation bei optimalem pH (pH 6,0 bei *C. necator*; pH 8,0 bei den *Bacillus*-Stämmen) und optimaler Temperatur (40 °C) (verändert nach Kißling 2012).

3.9.3 Zelllyse von *Cupriavidus necator* DSM 428 durch das lytische Kulturkonzentrat von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 nach vorhergehender Schädigung der Zellwand

Die äußere Membran von Gram-negativen Mikroorganismen stellt einen zusätzlichen Schutz dar. Um die äußere Membran zu destabilisieren und somit die Zelllyse zu verbessern, wurden Versuche mit Zugabe von Detergenzien oder der Einwirkung von Ultraschall durchgeführt. Als Detergenzien wurden folgende Substanzen mit entsprechenden Konzentrationen gewählt: SDS 0,5 %, Tween 0,5 % und Triton 0,5 %. Der Komplexbildner EDTA (2,5 mM) wurde ebenfalls getestet. *Cupriavidus necator* DSM 428 wurde in diesem Versuch ohne Vorbehandlung durch diese Substanzen zu 42,5 % durch das lytische Kulturkonzentrat von *Streptomyces albidoflavus* und zu 40,0 % durch das Konzentrat von *Streptomyces globisporus* lysiert. Die Zugabe von SDS erhöhte die Lyseaktivität um 2 bzw. 1,5 %. Der Einsatz der anderen Substanzen wirkte sich negativ auf die Lyseaktivität der Enzyme aus. Sie lag nur noch zwischen 25 und 35 % und brachte somit eine Verschlechterung.

Ein weiterer Versuch, die Lyse zu verbessern, sollte durch den Einsatz von Ultraschallwellen erfolgen. Hierbei zeigte sich, dass die Vorbehandlung im Ultraschallbad (Sonorex RK 106, Bandelin Electronics, Berlin) zu keiner Verbesserung der Zelllyse führte. Jedoch konnten mit Einsatz eines Schallgeräts mit Ultraschallrüssel (Schallgerät Branson Sonifer, Branson Ultrasonics, Danbury) die Aktivität gesteigert werden. Eine zehn minütige Behandlung des Testgemisches führte zu einer Aktivitätssteigerung um vier Prozentpunkte von 38 auf 42 %. Eine 15 minütige Behandlung steigerte die Lyseaktivität sogar auf 74,5 %. Die Methode des Ultraschallgeräts würde sich also eignen, um die Zellwände Gram-negativer Zellen zu schädigen und die Wirkung der Enzyme erheblich zu verstärken (Kißling 2012).

3.9.4 Zelllyse durch gereinigte Enzymlyse von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233

Eine Zelllyse der PHB-bildenden Mikroorganismen konnte also durch den Kulturüberstand der Streptomyceten realisiert werden. Dieser Überstand enthielt eine Mischung aus verschiedenen Enzymklassen. So konnten neben Proteasen auch Esterasen und Lipasen nachgewiesen werden. Studien haben gezeigt, dass verschiedene Enzymklassen, vor allem Esterasen, in der Lage sind, die Esterbindungen zwischen den 3-HB-Einheiten zu spalten (Mukai *et al.* 1993). Um auszuschließen, dass es neben der Zelllyse auch zu einem Abbau des Polymers kommt, wurden weitere Lyseversuche unternommen. Die von Gasser (2010) isolierte Metalloprotease aus *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 wurde auf ihre lytischen Eigenschaften gegen die Zielorganismen überprüft. Diese Protease wurde ebenfalls aus dialysiertem Kulturkonzentrat gewonnen. Jedoch wurde hier noch ein weiterer Aufreinigungsschritt durchgeführt. Dies geschah durch Auftrennung des Kulturkonzentrats mittels Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC, GE Healthcare, München) genauer über Kationenaustauschchromatographie (Kationenaustauschersäule Mono STM HR 5/5). Somit konnten andere, für die Lyse nicht notwendigen Enzyme entfernt werden. Das FPLC-Elutionsprofil ist in Abbildung 3.41 dargestellt. Hier ist die Signalstärke der eluierten Fraktionen in blau graphisch aufgeführt. Die stärkste Lyse zeigten die Fraktionen 6-13 (grüne Kurve). Diese Fraktionen wurden für die weiteren Lyseversuche vereint und gegen die Zielzellen eingesetzt. Die so hergestellte Enzymlyse enthielt die für die Lyse wichtige Metalloprotease. Diese lag nun getrennt von vielen anderen Enzymen vor. In einem neu angesetzten Lysetest wurden 1950 µl Lysetestlösung mit der entsprechenden Zellsuspension mit 50 µl Enzymlyse versetzt. Zur Aktivitätskontrolle wurde stets der Standard-Testorganismus *Micrococcus luteus* mitgeführt. Es konnte gezeigt werden (Abbildung 3.42), dass dieser Organismus mit der in den Fraktionen enthaltenen Metalloprotease bereits nach Tag 1 bis zu 70 % lysiert wurde, nach 5 Tagen erhöhte sich dieser Wert auf ca. 73 %. Somit war das aufgereinigte Enzym voll funktionsfähig. Bei den PHB-bildenden Organismen wurde nach Tag 1 zwar nur eine Lyse von ca. 10 % bei *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Cupriavidus necator* DSM 428 dokumentiert. Diese Werte konnten aber nach 5 Tagen auf 43 % und 18 % erhöht werden. Bei *Bacillus megaterium* KNaC 2 konnte nach 5 Inkubationstagen eine Lyse der Zellen von 22 % gemessen werden.

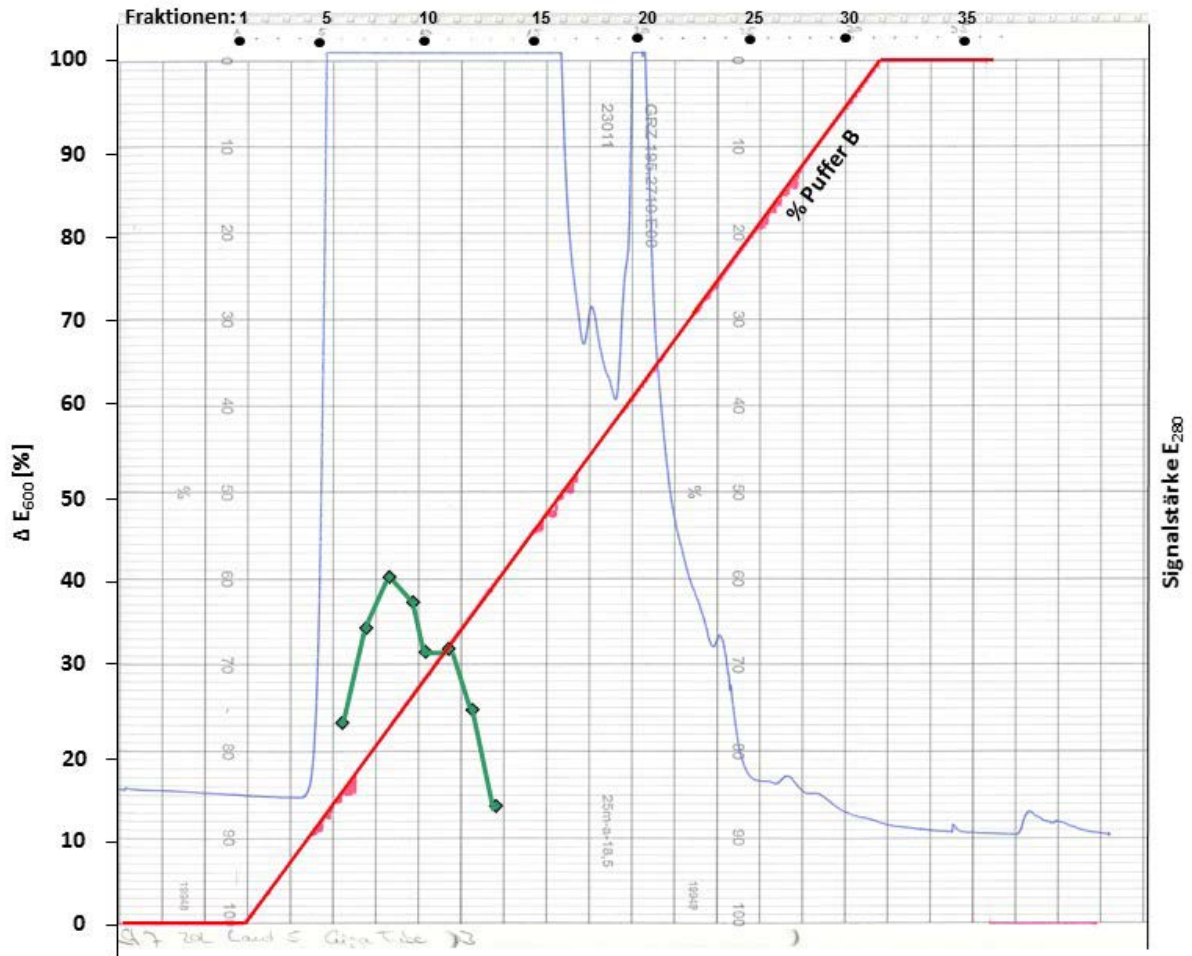


Abbildung 3.41: FPLC-Elutionsprofil des Kulturüberstandes von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233. Bei pH 6,0 eluierte Fraktionen. Signalstärke E_{280} in blau, lytische Aktivität der eluierten Fraktionen gegen *M. luteus* ΔE_{600} [%] in grün, Pufferstärke [% Puffer B] in rot.

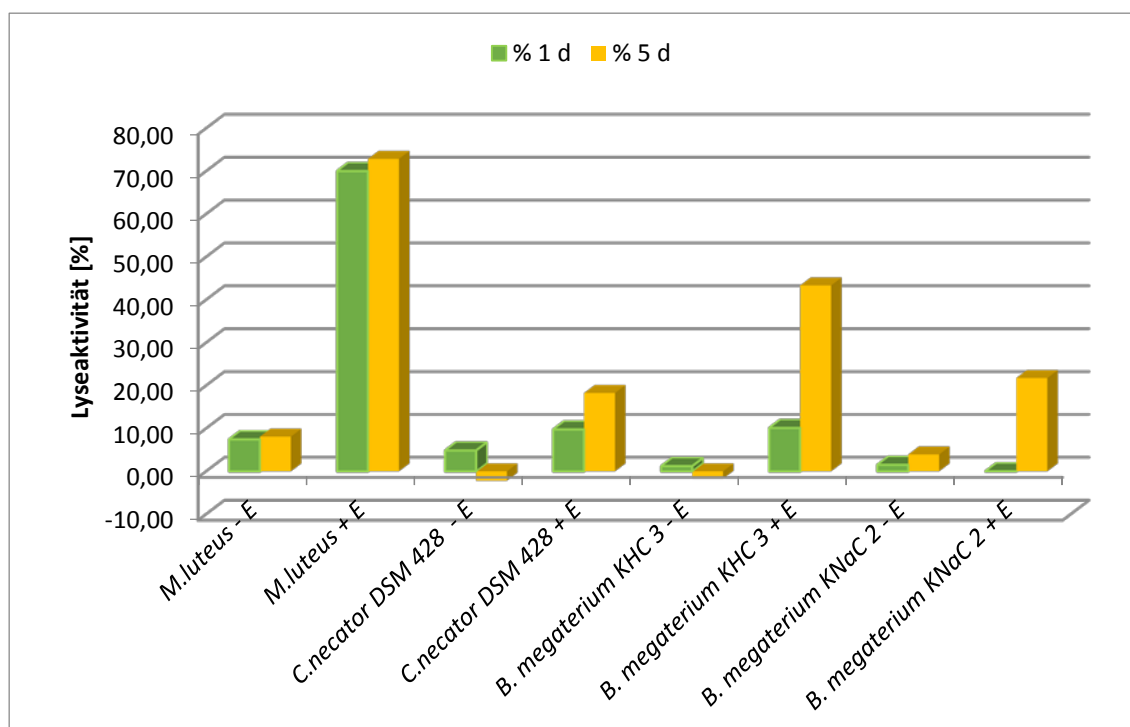


Abbildung 3.42: Lyseaktivität [%] der vereinten Fraktionen (6-13, siehe Abschnitt 3.10.4) des eluierten Konzentrats von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233. Messung der Lyseaktivität nach 1 Tag und 5 Tagen. -E ohne Enzymlösung, +E mit Enzymlösung.

Somit ist das aufgereinigte Enzym von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 für eine Zellyse der PHB-Produzenten geeignet. Da hier die unerwünschten Begleitproteine wie Lipasen und Esterasen weitestgehend entfernt wurden, sollte es zu keiner Depolymerisation des Speicherpolymers kommen. Dies wurde durch eine HPLC-Vermessung des Überstandes nach 5 tägiger Inkubation überprüft. Gemessen wurden die Überstände der Kontrollen (Zellen ohne Enzymzugabe) sowie die Überstände von den drei PHB-Produzenten und der Negativkontrolle *Micrococcus luteus*. Die Chromatogramme der HPLC-Messung ergaben Peaks mit der Retentionszeit 13,93 min für die Stämme DSM 428, KHC 3 und KNaC 2 sowie für die PHB-freie Kontrolle *M. luteus*. Die reine 3-Hydroxybuttersäure im Standard wurde nach 14,15 min detektiert. Eine Co-Chromatographie ergab einen Peak mit einer mittleren Retentionszeit von 14,03 min. Es konnten keine Monomere von 3-Hydroxybuttersäure detektiert werden.

Nach erfolgreicher Lyse der Zielzellen sollte nun die PHB neben Zellbruchstücken im Lysetestansatz vorliegen. Um dies zu überprüfen wurden die Ansätze zentrifugiert (30 min, 8300xg) und das entstehende Zellpellet nach Gefriertrocknung auf seinen PHB-Gehalt überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.43 dargestellt. Im Pellet der teils lysierten Zellen konnte PHB nachgewiesen werden. Die lysierten Pellets enthielten 87,5 % und 80 % der Ausgangskonzentration an PHB. Somit konnte das Polymer auch nach enzymatischer Zellyse im Pellet nachgewiesen werden.

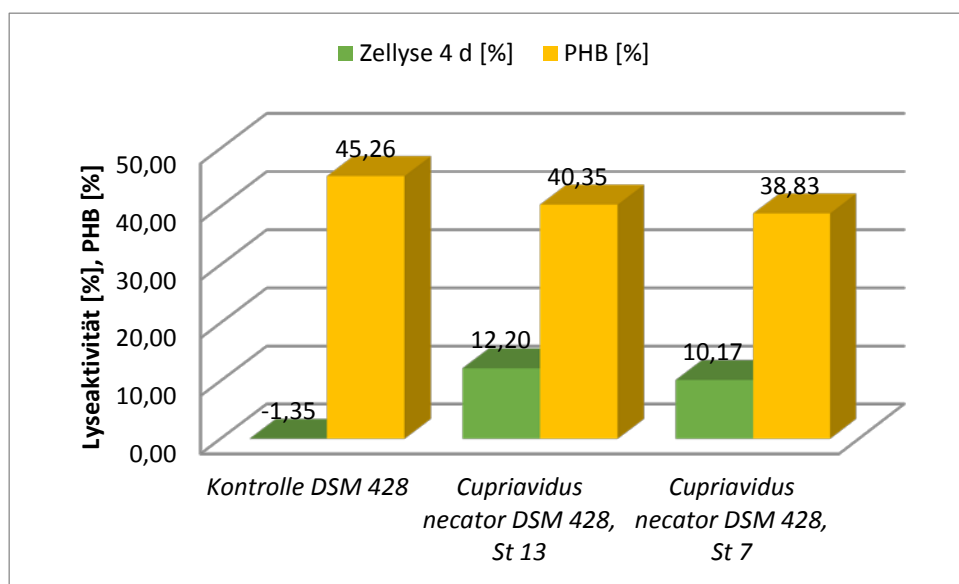


Abbildung 3.43: Zellyse [%] von *Cupriavidus necator* DSM 428 ohne Enzym und mit Kulturüberstand von *Streptomyces globisporus* (St 13) und *Streptomyces albidoflavus* (St 7). PHB-Gehalt der Zellpellets bezogen auf die ZTM [%].

4 Diskussion

4.1 Optimale Quantifizierungs-Methode von PHB in Zellmaterial

Seit der Entdeckung von PHB im Jahr 1926 durch Lemoigne (Lemoigne 1926) wurden diverse analytische Methoden zur Bestimmung von PHB beschrieben. Lemoigne selbst entwickelte die erste dieser Methoden. Nach Extraktion mit Alkohol und Reinigung mit Chloroform und Diethylether, wurde das Polymer verseift. Die resultierende Mischung wurde destilliert. So entstanden eine flüchtige Phase und ein nicht-flüchtiger Rest. Die flüchtige Phase wurde gesammelt, kristallisiert und gewogen. Sie enthielt das dehydrierte Produkt von 3-Hydroxybuttersäure: α -Crotonsäure (trans-2-Butensäure). Die nicht-flüchtige Phase wurde ebenfalls gewogen, sie enthielt die 3-Hydroxybuttersäure. Durch das Gewicht beider Fraktion konnte die Gesamtmenge im Zellmaterial von *Bacillus* „M“ bestimmt werden. Diese Methode erwies sich zwar als sehr genau, jedoch benötigte sie viel Zeit und große Mengen an Biomasse. Um diese Probleme zu umgehen entwickelten Willimason und Wilkins (1958) eine spektrophotometrische Methode, welche bedeutend schneller war. Sie behandelten *Bacillus*-Zellen mit Natriumhypochlorit, was in einer trüben Lösung resultierte, die spektrophotometrisch gemessen wurde. Diese Methode musste für jedes neue Bakterium fein abgestimmt werden, des Weiteren konnten Fetteinschlüsse Interferenzen verursachen. Eine spezifischere Methode wurde von Slepecky und Law (1960) und Law und Slepecky (1961) entwickelt. Sie behandelten extrahiertes Polymer aus *Bacillus megaterium* mit konzentrierter Schwefelsäure, um es so quantitativ in Crotonsäure zu überführen. Durch die ungesättigte Doppelbindung hat Crotonsäure ein Absorptionsmaximum von 235 nm, welches im ultravioletten Bereich nachgewiesen wurde. Mit Hilfe dieser Methode konnten Gehalte von 5 μg bestimmt werden. Jedoch war sie durch die Extraktion und Waschschrte sehr zeitaufwändig. Um Zeit zu sparen, wurde von Ward und Dawes (1973) ein Plattentest entwickelt. Eine weitere Verbesserung wurde durch die Methode von Karr *et al.* (1983) erreicht. Hier wurde PHB in Crotonsäure überführt und mittels HPLC und UV-Detektion bestimmt. Diese Methode wurde später von Hesselmann (1999) weiter entwickelt. Trotz des Fortschritts der durch die Entwicklung immer schnellerer und spezifischerer Methoden gemacht wurde, waren diese doch immer noch relativ ungenau und zeitaufwändig. Die GC-Methode, entwickelt von Braunegg *et al.* (1978) brachte in dieser Hinsicht den großen Fortschritt. Die milde, saure Hydrolyse resultierte in nur einem Methylester im Gegensatz zur alkalischen Hydrolyse von Wallen und Rohwedder (1974), welche zwangsläufig zu einer Mischung aus 3-Hydroxybuttersäuremethylester und 2-Alkenbuttersäuremethylester führte (Capon *et al.* 1983). Des Weiteren konnten Extraktion, Hydrolyse und Derivatisierung in nur einem Gefäß ablaufen. Die Auftrennung der Methylester mittels GC ermöglichte eine sehr genaue Bestimmung und die Verwendung eines internen Standards verbesserte die Quantifizierung. Die Methode von Braunegg *et al.* (1978) wurde von vielen Autoren verwendet und adaptiert (Lageveen *et al.* 1988, Brandl *et al.*

1988, Gross *et al.* 1989, Timm und Steinbüchel 1990, Huijberts *et al.* 1994, Jan *et al.* 1995 und Kato *et al.* 1996). Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Quantifizierung von PHB war die Einführung von NMR-Spektroskopie. Hier konnten vor allem Doi *et al.* (1986, 1995), Kamija *et al.* (1990), Doi und Abe (1990) und Abe *et al.* (1995) das volle Potential der Methode ausschöpfen.

Die schnelle und reproduzierbare Methode nach Braunegg *et al.* (1978) stellte somit die Methode der Wahl und wurde von zahlreichen Forschungsgruppen angewendet (s. oben). Jedoch wurde diese durch Riis und Mai (1988) in Frage gestellt. Sie stellten fest, dass die Wiederfindungsrate der 3-Hydroxybuttersäure von PHB nicht vollständig war. Die Ergebnisse von Huijberts *et al.* (1994) bestätigten dies. Es wurde festgestellt, dass die unvollständige Wiederfindung durch einen unvorteilhaften Verteilungskoeffizienten des 3-Hydroxybuttersäuremethylesters nach der Phasentrennung verursacht wurde. Um dieses Problem zu verhindern entwickelten Riis und Mai (1988) eine neue Methode basierend auf der Derivatisierung von 3-Hydroxybuttersäure in einen Propylester. Der Propylester war wesentlich lipophiler als der Methylester und somit vollständig in der organischen Phase löslich. Mit dieser Methode konnten 99,5 +/- 2,1 % der 3-Hydroxybuttersäure wiedergefunden werden, Mengen von weniger als 20 ng konnten detektiert werden.

Der in dieser Arbeit vorgenommene experimentelle Vergleich der zwei Methoden zur PHB-Bestimmung bestätigte, dass die Methode nach Riis und Mai (1988) die geeignetere für die Quantifizierung der PHB war. Die experimentell ermittelte Abweichung betrug hier +/- 2,5 %. Bei der Quantifizierung nach Braunegg *et al.* (1978) konnten dagegen nur 59-65 % der eingesetzten PHB wiedergefunden werden. Dennoch wurde zum Screening der Bakterien die Methode von Braunegg *et al.* (1978) verwendet. Dadurch, dass hier die Extraktion des Polymers direkt mit nasser Zellmasse möglich war bot dies einen zeitlichen Vorteil während des Screenings. Die Untersuchung der Bakteriensuspensionen konnte ohne einen längeren Lyophilisierungsschritt stattfinden. Bei 118 untersuchten Organismen bedeutete dies eine erhebliche Verkürzung der Versuchsdauer. Ein weiterer Vorteil dieser Methode waren die verwendeten Lösungsmittel. Methanol und Chloroform sind im Vergleich zu Dichlorethan wesentlich ungiftiger. Die Maximale-Arbeitsplatz-Konzentration (MAK) von Methanol liegt bei 200 ml/m³, die von Chloroform bei 0,5 ml/m³. Für Dichlorethan wurde die MAK aufgehoben, da es kanzerogen wirkt. Zusätzlich führt Dichlorethan zu Organschäden und Vergiftungen bei Verschlucken. Somit war die Methode nach Braunegg *et al.* (1978) die Methode der Wahl für die Fragestellung welche der ausgewählten Bakterien PHB bilden. Die unter diesen Bedingungen positiv getesteten Organismen wurden dann weiter mit der Methode nach Riis und Mai (1988) untersucht und deren Gehalt an PHB in den Zellen quantitativ bestimmt. Des Weiteren wurde mit dieser Methode der PHB-Gehalt einer Zellkultur über mehrere Tage genau bestimmt werden. Durch die hohe Wiederfindungsrate und die Verwendung eines Massenspektrometers als Detektionseinheit konnte somit der 3-HBPE präzise nachgewiesen werden.

4.2 Mikrobielles Spektrum zur PHB-Produktion aus den Einfachzuckern Xylose und Glucose

Xylose ist eine Hauptkomponente von Lignocellulose und somit der zweithäufigste Zucker in der Natur. Im Experiment zeigten ca. 57 % der untersuchten Organismen signifikantes Wachstum in MM mit Xylose innerhalb von 48 h. Von diesen insgesamt 67 Organismen akkumulierten ca. 20 % PHB aus Xylose nach 72 h. Lopes *et al.* (2009) konnten bei ihren Untersuchungen ähnliche Ergebnisse erzielen. Hier wurden 22 % der untersuchten Organismen als Xylose-positiv nach 24 h beschrieben. Von diesen Xylose-positiven Bakterien waren 24 % zur Bildung von PHAs innerhalb von 72 h befähigt. Die Unterschiede bei der Anzahl Xylose-positiver Stämme könnte an der unterschiedliche Kultivierung liegen. Hier wurden die Screening-Tests in Flüssigmedium durchgeführt, bei Lopes *et al.* (2009) geschah dies auf festem MM. Die Bakterienarten welche mit Xylose PHB bilden stimmen mit denen in der Literatur beschrieben überein. So wurden durch Silva *et al.* (2004) *Burkholderia*-Stämme als PHB-positiv mit Xylose beschrieben. Ebenso wurden diverse *Bacillus*-Stämme als PHB-Produzenten mit Xylose identifiziert (Lopes *et al.* 2009). Bei den in dieser Arbeit als positiv getesteten Bakterien handelt es sich vor allem um *Bacillus*-Arten, aber auch *Burkholderia cepacia* und Bakterien der Gattung *Cellulomonas* konnten Xylose zur PHB-Bildung verwenden.

Der Einfachzucker Glucose stellt bei weitem das beliebtere Substrat zur PHB-Bildung dar. So konnte mit Hilfe von Glucose, wie in Tabelle 1.2, beschrieben bei einer Reihe von Bakteriengattungen PHB nachgewiesen werden, z.B. bei *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Azotobacter*, *Comamonas*, *Escherichia*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus* und *Vibrio* (Valappil *et al.* 2007 a+b, Yuksekdog and Beyatli 2008, Page und Cornish 1993, Lee *et al.* 2004, Nikel *et al.* 2006, Ghatnekar *et al.* 2002, Bertrand *et al.* 1990, Nurbas und Kutsal 2004, Chien *et al.* 2007). Die hier ermittelten Ergebnisse lieferten einen ähnlichen Sachverhalt. Das Screening mit Glucose als einziger C-Quelle ergab, dass 65 % der untersuchten Organismen einen signifikanten Abbau der Glucose innerhalb von 48 h zeigten. Von diesen Glucose-positiven Organismen konnten 35 % die Glucose zur PHB-Bildung verwenden. Das sind elf Prozentpunkte mehr als mit Xylose. Auch hier waren die PHB-positiven Bakterien vor allem den Gattungen *Bacillus* und *Cellulomonas* zuzuteilen, aber auch *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia* und *Paenibacillus spec.* konnten Glucose zur PHB-Bildung nutzen.

Die Suche nach PHB-Produzenten in der Stammsammlung des IMW war somit erfolgreich. Es konnten mehrere Organismen gefunden werden, welche mit Xylose oder Glucose als einzige C-Quelle das Zielprodukt produzierten. Zwei Organismen fielen während des Screenings besonders auf. Dies waren die Stämme *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC2 (früher *Bacillus circulans* KHC 3 und *Bacillus subtilis* KNaC 2, Tabelle 4.3). Sie konnten beide sowohl Xylose als auch Glucose zur PHB-Bildung verwenden. Im Hinblick auf die Nutzung von Stroh als C-Quelle ist dieser Sachverhalt von

großem Vorteil, so könnten beide Fraktionen der TDH (hemicellulosische und cellulose) von ein und demselben Organismus verwertet werden. Für eine großtechnische Produktion wäre dies sinnvoll. Ebenso ist die Kultivierung und Stammhaltung der beiden Organismen relativ einfach und anspruchslos.

4.3 Identifizierung der hauseigenen *Bacillus*-Stämme

Die Artbestimmung von Bacillen gestaltet sich oft schwer aufgrund ihrer hohen morphologischen und biochemischen Ähnlichkeit (Priest *et al.* 1988, Ash *et al.* 1991, Harrel *et al.* 1995). Eine Identifizierung der *Bacillus*-Arten aufgrund von rDNA-Sequenzierung scheiterte an der hohen Ähnlichkeit ihrer rDNA Gene. Hier wurden beim Alignment zahlreiche Übereinstimmungen mit hinterlegten Sequenzen von 100 % gefunden. Somit war eine Identifizierung der Isolate mittels molekularbiologischen Methoden nicht möglich, es war lediglich eine Bestimmung der Gattung gewährleistet.

Alternativ zur rDNA-Sequenzierung wurde auf ein biochemisches Identifikationssystem zurückgegriffen. Dabei handelte es sich um das System „Microgen® *Bacillus* ID“ welches von Microgen Bioproducts zur Identifikation von *Bacillus*-Spezies entwickelt wurde. Das System beruht auf 24 Substrattests mit denen sowohl *Bacillus*-Spezies als auch verwandte Gattungen wie *Paenibacillus* ssp. und *Brevibacillus* ssp. identifiziert werden können. Zur Auswertung der Substrattests kann die speziell entwickelte „Microgen® Identification System Software“ verwendet werden. Mugg *et al.* (2006) verglichen die Testsysteme von Microgen „*Bacillus* ID“ mit denen der Firma BioMerieux „Api 50CHB und Api 20E“. Die zwei Teststreifen von BioMerieux konnten von Microgen auf einen reduziert werden. Ebenso wurden die 70 Substrattests bei Api auf 24 bei *Bacillus* ID verringert. Der Vergleich beider Systeme ergab, dass alle 49 von Mugg *et al.* (2006) getesteten Isolate von „*Bacillus* ID“ identifiziert werden konnten. Die Kombination der beiden Api-Systeme „Api 50CHB und Api 20E“ ermöglichte es 95,9 % der Organismen zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das System „Microgen® *Bacillus* ID“ verwendet. Die Auswertung durch die Software ergab für das *Bacillus*-Isolat KHC 3 eine 99,99 %ige Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um *Bacillus licheniformis* handelte. Der Stamm KNaC 2 wurde mit 99,88 % der Art *Bacillus megaterium* zugeordnet. Dies widerspricht den Ergebnissen von Kuhnigk (1996). Damals wurde das beschriebene Api-System verwendet. Der Stamm KHC 3 wurde der Art *Bacillus circulans* zugeordnet, KNaC 2 wurde als *Bacillus subtilis* identifiziert. Die Verwendung des Systems von Microgen ermöglichte es also den *Bacillus*-Isolaten eine Art zuzuweisen. Es ist einfach anzuwenden, standardisiert und bietet eine genaue Identifizierung der Zielorganismen. Die verwendete Datenbank ist umfangreich und verwendet die neuste Taxonomie.

4.4 PHB aus der hemicellulosischen Strohfraktion

Für alle durchgeführten Versuche mit dem hemicellulosischem Stroh-Hydrolysat wurde dieses wie beschrieben enttoxifiziert. Die Maßnahmen hierzu waren erfolgreich. Die Verwendung einer einfachen Aktivkohlekartusche stellte den essentiellen Reinigungsschritt dar. Die im Hydrolysat enthaltenen, zelltoxischen Substanzen Furfural und 5-HMF wurden durch die Aktivkohle je nach Charge vollständig oder teilweise entfernt. Der Einsatz von Aktivkohle zur Reinigung von Zuckerrohr Bagasse wurde durch Silva *et al.* (2004) beschrieben. Auch hier konnten die cytotoxischen Verbindungen reduziert werden. Jedoch musste durch die Verwendung von loser Aktivkohle ein weiterer Filtrationsschritt nach der Inkubation durchgeführt werden.

Der Einsatz einer Aktivkohlekartusche ist ein einfach durchzuführender Arbeitsschritt mit geringen Kosten. Das Hydrolysat kann mit langsamer Flussrate über die Kartusche fließen und so enttoxifiziert werden. Die Kartuschen, welche zur Wasseraufbereitung dienen, können kostengünstig angeschafft werden und haben ein hohes Durchsatzvolumen (für H₂O 5676 l laut Herstellerangaben). Die getesteten Bakterien konnten nach diesem Arbeitsschritt mit dem hemicellulosischen Substrat wachsen. Der geringe Verlust bei den Zuckerkonzentrationen kann aufgrund der hohen Ausgangskonzentration in Kauf genommen werden.

Die Produktion des Zielprodukts mit Hilfe der Xylose der hemicellulosischen Fraktion wurde durch zwei hauseigene Stämme und durch zwei Referenzorganismen der DSMZ verwirklicht. *Burkholderia sacchari* DSM 17165 erreichte Werte von 44 % PHB pro Zelltrockenmasse in MM mit Xylose. Durch eine stufenweise Zugabe von hemicellulosischem Hydrolysat wurde der PHB-Gehalt zunächst gesenkt. Mit 20 % des Hydrolysats konnten maximal 5,61 % PHB/ZTM gebildet werden, mit 40 % stieg der Maximalwert auf 15,04 %. Mit 60 % des Hydrolysats konnten 4,47 % PHB, mit 80 % nur ca. 2,98 % des Polymers gebildet werden. Dies änderte sich bei einer Anzucht in 100 % hemicellulosischem Hydrolysat. Hier konnten maximal 28,27 % PHB pro ZTM gebildet werden. Die Verwendung eines Vorkulturmediums mit Hydrolysat erwies sich hier als sinnvoll. Die Organismen konnten sich an das Milieu im Hydrolysat bereits adaptieren. Verglichen dazu konnten Silva *et al.* (2004) bei *Burkholderia sacchari* IPT 101 mit einer Kombination von Xylose und Glucose im Medium Werte von 58 % PHB pro ZTM erzielen. Dieser Stamm wurde aus dem Boden einer Zuckerrohrplantage isoliert und bildet Polyhydroxyalkanoate mit den verschiedensten C-Quellen (Brämer *et al.* 2001). Silva *et al.* (2004) erreichten mit *Burkholderia sacchari* IPT 101 im Bagasse-Hydrolysat Maximalwerte von 62 % PHB pro ZTM.

Die Verwendung von *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 führte zu einer PHB-Bildung von ca. 20 % PHB pro ZTM in MM mit Xylose. Der untypische Kurvenverlauf der PHB-Bildung ist wahrscheinlich auf einen Messfehler an Tag 2 zurückzuführen. Hier fiel der PHB-Gehalt von 19,26 % an Tag 1 auf 2,87

% an Tag 2, jedoch konnte am dritten Versuchstag ein Polymergehalt von 5,58 % bestimmt werden, welcher dann an Tag 4 auf 4,03 % abfiel. Für einen Messfehler sprechen, dass sowohl das Wachstum als auch der Zuckerabbau normal verlaufen. Die Wachstumskurve steigt stetig an bis zu Tag 3, erst danach gelangen die Zellen in die Absterbephase. Ebenso werden zwischen Tag 2 und Tag 3 noch mehr als 1,7 g/l Xylose abgebaut. Der tatsächliche PHB-Gehalt für diesen Versuchstag war wahrscheinlich höher. Auch hier kann man einen Vergleich mit den von Silva *et al.* (2004) errungenen Erkenntnissen ziehen. Es wurden damals bei dem Organismus *Hydrogenophaga pseudoflava* ATCC 33668 (früher *Pseudomonas pseudoflava*) ca. 28 % PHB pro ZTM gebildet. Es handelt sich hierbei um denselben Organismus aus einer anderen Kollektion (DSM 1034 = ATCC 33668). Im Gegensatz zu Silva *et al.* (2004) wurde hier allerdings noch die PHB-Bildung mit hemicellulosischem Hydrolysat untersucht. So wie auch schon *Burkholderia sacchari* DSM 17165 konnte *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 mit der Xylose des Hydrolysats PHB produzieren. Ein Maximum von 43 % PHB pro ZTM konnten mit Zugabe von 60 % des Hydrolysats erreicht werden. Die Kultivierung in reinem Hydrolysat brachte einen Gehalt von 22,5 % PHB pro ZTM.

Nun galt es zu untersuchen, ob sich die *Bacillus*-Stämme ebenfalls zur PHB-Bildung aus dem hemicellulosischen Hydrolysat eigneten. Bei *Bacillus licheniformis* KHC 3 konnte man eine PHB-Bildung sowohl mit reiner Xylose als auch mit allen Verdünnungen des hemicellulosischen Hydrolysats feststellen. Der Gehalt von 38,4 % PHB pro ZTM überstieg sogar den PHB-Gehalt von *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 bei Inkubation mit reiner Xylose. Die stufenweise Zugabe des Hydrolysats führte zu einer Verringerung der Produktion. Dies konnte durch die Verwendung einer hydrolysathaltigen Vorkultur bei 100 % Hydrolysat verhindert werden. Mit einem PHB-Gehalt von 46,3 % PHB konnte sogar das bisher ertragreichste Ergebnis gewonnen werden. Fast die Hälfte der Zellmasse wurde durch die PHB-Granula eingenommen. Ähnlich verhielt es sich mit dem Organismus *Bacillus megaterium* KNaC 2. Auch hier wurden die höchsten PHB-Gehalte entweder in MM mit Xylose (43,16 % pro ZTM) oder in 100 % Hydrolysat (45,98 % pro ZTM) erreicht werden. Auch hier erwies sich die Verwendung einer hydrolysathaltigen Vorkultur als sinnvoll. Bei beiden Organismen konnte festgestellt werden, dass der Zeitpunkt des maximalen PHB-Gehalts sehr kurz war. Es kam bei beiden Stämmen zu einem sehr schnellen Abbau des Polymers innerhalb eines Tages, nachdem die Kultur die log-Phase verlassen hatte. Somit ist bei einer potentiellen industriellen Produktion auf den genauen Erntezeitpunkt zu achten.

In der Gattung *Bacillus* gibt es eine Reihe von Beispielen für PHB-Produzenten mit den unterschiedlichsten Substraten. Den ersten beschrieb der Entdecker der PHB selbst als er 1925 an *Bacillus megaterium* forschte (Lemoigne 1925). Chen *et al.* (1991) untersuchten zahlreiche *Bacillus*-Gattungen auf PHB-Bildung. Hierunter *B. amyloliquefaciens* DSM 7, *B. cereus* DSM 31, *B. megaterium* DSM 90, *B. subtilis* DSM 10 und *B. licheniformis* DSM 394. Diese Arten konnten sowohl mit dem

Substrat Glucose, als auch mit den organischen Säuren Propionsäure, Valeriansäure und Heptansäure PHB und deren Co-Polymere bilden. Yilmaz *et al.* (2005) beschrieben 31 *Bacillus*-Arten als PHB-positiv. Hierzu gehörten die Arten *B. brevis*, *B. spaericus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* und *B. coagulans*. Es handelte sich dabei um Bodenbakterien deren PHB-Gehalte zwischen 1,06 und 41,67 % lagen. Für die PHB-Bildung mit dem Substrat Xylose konnten Lopes *et al.* (2009) die besten Ergebnisse mit dem Isolat *Bacillus* sp. Ma3.3 erzielen. Dabei handelte es sich um ein Mangroven-Isolat welches mit 15 g Xylose/l 54,84 % PHB pro ZTM bilden konnte. Das Copolymer Poly(hydroxybutyrate-co-valerate) konnte aus dem kohlenstoffreichen Mahua Baum (Butterbaum, *Madhuca* sp.) durch *Bacillus* sp. 256 gewonnen werden (Anil Kumar *et al.* 2006). Es kann also festgehalten werden, dass durch die Gattung *Bacillus* aus den unterschiedlichsten Substraten PHB gebildet werden kann. Der Einsatz von kostengünstigen Substraten wie Xylose und Pflanzenextrakte ermöglicht die wirtschaftliche Nachhaltigkeit der industriellen PHB-Produktion. Dies gilt auch für das hier verwendete hemicellulose Hydrolysat aus Weizenstroh, welches sich hervorragend für die Fermentation zu PHB durch *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2 eignet. Die Gram-positive Eigenschaft der Bacillen bietet einen weiteren Vorteil bei der praktischen Anwendung. Eine Zellyse zur Abtrennung des Zielprodukts gestaltet sich durch den spezifischen Zellwandaufbau wesentlich einfacher als bei Gram-negativen Organismen. Auch im medizinischen Bereich ist dies von Vorteil. Diese Bakterien bilden keine Lipopolysaccharide (LPS), welche eine starke Immunreaktion hervorrufen kann (Chen und Wu 2005). Des Weiteren sind diese Bacillen einfach zu kultivieren, sie leben aerob und haben die Risikogruppe 1.

Der Hauptunterschied zwischen der Kultivierung in MM mit 0 und 100% Hydrolysat lag in dem Zusammenhang von Zellwachstum und Produkt-Bildung. In MM ohne Hydrolysat begann die Bildung des Polymers mit Anfang log-Phase, während der Abbau langsam mit der beginnenden Absterbephase einsetzte. In 100% Hydrolysat begannen das Zellwachstum und die Produktbildung erst nach einer Lag-Phase. Der Abbau des Polymers trat sofort bei Beginn der Absterbephase ein. Mit der schrittweisen Zugabe des Hydrolysats erhöhte sich die lag-Phase, die Zellen mussten sich der zunehmenden Substratkonzentration anpassen. Die Verzögerungsphase konnte durch den Einsatz der Vorkultur in 100 % Hydrolysat verkürzt werden. Die vier Organismen unterschieden sich in der Produkt-Bildung. *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034 zeigte eine PHB-Produktion am Anfang der log-Phase und einen frühen Abbau vor Erreichen der stationären Phase. Der Organismus *Burkholderia sacchari* DSM 17165 zeigte einen engen Zusammenhang zwischen Zellwachstum und Produkt-Bildung. Die zwei *Bacillus*-Stämme verhielten sich ähnlich zueinander. Dies verdeutlichte sich durch den schnellen Abbau des Polymers in 100 % Hydrolysat auf nahezu 0,5% PHB der ZTM innerhalb eines Tages. Diese Tatsache deutet auf ein von Slepecky und Law (1961) beschriebenen Zusammenhang zwischen PHB-Synthese und Abbau und der Sporulation hin. Bei Anzucht von *Bacillus megaterium* unter unvorteilhaften PHB-

Produktions-Bedingungen kam es zu einer geringeren Bildung von PHB. Die Synthese fand während der log-phase statt. Danach kam es zu einem sehr schnellen Abbau der PHB während der Sporulation. Dieser Zusammenhang konnte von Kominek und Halvorson (1965) bei *Bacillus cereus* bestätigt werden. Das hemicellulosische Hydrolysat könnte sich somit positiv auf die Sporenbildung und negativ auf die PHB-Synthese auswirken. Dennoch ist die Verwendung des hemicellulosischen Hydrolyсата rentabel für die PHB-Produktion mit den getesteten Organismen, wenn der genaue Erntezeitpunkt beachtet wird, weil es zu einem schnellen Abbau des Polymers innerhalb eines Tages kommt (Abbildung 3.21 + 3.25). Die Xylose der hemicellulosischen Fraktion wurde in PHB fermentiert. Die PHB-Gehalte lagen hierbei zwischen 2,98 % und 46,29 % pro ZTM (Tabelle 4.1). Am besten geeignet für eine industrielle Produktion von PHB aus dieser Fraktion waren die zwei institutseigenen *Bacillus*-Stämme, mit ihnen konnten die höchsten PHB-Gehalte erzielt werden. Durchschnittlich wurden 27,65 % PHB pro ZTM gebildet.

Tabelle 4.1: Auswirkung verschiedener Konzentrationen an hemicelluloseischem Hydrolysat im MM auf die PHB-Bildung der vier Test-Organismen.

Stamm	Anteil hemicell. Hyd. [%]	Anfangs-Xyl-Konz. [g/l]	End-Xyl-Konz. [g/l]	Verwertete Xyl-Konz. [g/l]	ZTM [g/l]	Bio-masse [g/l]	PHB _{max} [g/l]	PHB _{max} [%]	Y _{PHB/S} [g/g]	Y _{Biomasse/S} [g/g]	Q _{PHB} [g/lh]
<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	0	10,86 ± 0,11	2,02	8,84	3,81	2,15	1,66	43,65 ± 0,88	0,19	0,24	0,02
	20	11,03 ± 0,27	4,95	6,08	0,41	0,39	0,02	5,61 ± 0,33	0,00	0,06	0,00
	40	11,43 ± 0,08	0,00	11,43	3,79	3,22	0,57	15,04 ± 0,15	0,05	0,28	0,01
	60	10,79 ± 0,68	0,00	10,79	3,42	3,27	0,15	4,47 ± 0,08	0,01	0,30	0,00
	80	10,85 ± 0,68	0,00	10,85	0,70	0,68	0,02	2,98 ± 0,04	0,00	0,06	0,00
	100	9,33 ± 0,01	0,15	9,18	8,91	7,28	1,63	28,27 ± 0,34	0,18	0,79	0,02
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> DSM 1034	0	10,59 ± 0,20	6,19	4,40	0,17	0,14	0,03	19,26 ± 0,37	0,01	0,03	0,00
	20	11,07 ± 0,01	3,55	7,52	1,63	1,24	0,39	23,77 ± 0,75	0,05	0,16	0,02
	40	11,32 ± 0,03	4,36	6,96	1,18	0,80	0,38	32,39 ± 0,09	0,05	0,11	0,02
	60	11,34 ± 0,28	0,04	11,30	2,03	1,16	0,87	42,93 ± 0,94	0,08	0,10	0,04
	80	11,43 ± 0,13	0,22	11,21	0,67	0,47	0,20	29,25 ± 0,73	0,02	0,04	0,00
	100	10,10 ± 0,06	0,09	10,01	4,51	3,50	1,01	22,47 ± 1,51	0,10	0,35	0,02
<i>Bacillus licheniformis</i> KHC 3	0	10,79 ± 0,10	5,16	5,63	1,91	1,18	0,73	38,41 ± 0,85	0,13	0,21	0,03
	20	13,03 ± 0,46	0,00	13,03	1,90	1,16	0,74	39,58 ± 0,43	0,06	0,09	0,03
	40	14,46 ± 0,48	0,00	14,46	6,58	4,10	2,48	37,73 ± 0,12	0,17	0,28	0,05
	60	11,14 ± 0,54	0,07	11,07	3,75	3,01	0,74	19,62 ± 0,70	0,07	0,27	0,02
	80	11,00 ± 0,10	0,21	10,79	5,07	4,47	0,60	11,86 ± 0,55	0,06	0,41	0,01
	100	9,59 ± 0,03	0,17	9,42	3,53	1,90	1,63	46,29 ± 0,86	0,17	0,20	0,03
<i>Bacillus megaterium</i> KNaC 2	0	10,59 ± 0,20	5,54	5,05	1,36	0,77	0,59	43,16 ± 0,63	0,12	0,15	0,01
	20	13,03 ± 0,46	0,00	13,03	4,77	3,32	1,45	30,49 ± 0,57	0,11	0,25	0,03
	40	14,99 ± 0,48	0,09	14,90	1,43	0,80	0,63	43,85 ± 0,25	0,04	0,05	0,03
	60	11,14 ± 0,54	0,12	11,02	3,44	2,93	0,51	14,73 ± 0,50	0,05	0,27	0,01
	80	11,01 ± 0,10	0,23	10,78	4,79	3,75	1,04	21,73 ± 0,84	0,10	0,35	0,01
	100	9,59 ± 0,03	1,73	7,86	4,15	2,24	1,91	45,98 ± 0,79	0,24	0,28	0,04

ZTM [g/l] Zelltrockenmasse, Y_{PHB/S} [g/g] Polymer-Ausbeute vom Substrat, Y_{Biomasse/S} [g/g] Biomasse-Ausbeute vom Substrat, Q_{PHB} [g/l*h] Polymer-Produktivität, ± mittlere Standardabweichung.

4.5 Alternative Umsetzung der hemicellulosischen Fraktion zu Lactat

Aufgrund des geringen Spektrums von Mikroorganismen, welche Xylose zur PHB-Produktion verwenden (s. oben) wurde ein alternativer Weg zur Umsetzung der hemicellulosischen Fraktion in Betracht gezogen. Durch den Einsatz von heterofermentativen MSB sollten die im Hydrolysat vorhandenen Zucker (Xylose, Glucose, Arabinose) in die organischen Säuren Lactat und Acetat umgewandelt werden. Lactat ist die am häufigsten vorkommende Hydrocarbonsäure und findet Anwendung in zahlreichen Bereichen (s. oben). Es dient als Grundbaustein zur Herstellung des Biokunststoffs Polylactid. Acetat ist ebenfalls eine natürlich vorkommende Säure welche vor allem im Lebensmittelsektor, aber auch bei der Polymerherstellung eine große Rolle spielt. So wird bei der Herstellung des thermoplastischen Kunststoffes Celluloseacetat die Cellulose mit Essigsäure verestert. Somit könnten neben PHB auch andere wichtige Biokunststofftypen aus dem hemicellulosischen Hydrolysat gewonnen werden.

Im Experiment zeigten alle untersuchten MSB Wachstum und Lactatbildung in Tomatensaftmedium mit unterschiedlichen Hydrolysat-Konzentrationen. Die Organismen konnten sich sehr gut an das Medium adaptieren und Lactat wurde gebildet. Zur näheren Untersuchung wurden vier MSB ausgewählt, welche mit hemicellulosischem Hydrolysat größere Mengen an Lactat (bis zu 12,0 g/l) bildeten. Dabei handelte es sich *Lactobacillus hilgardii* B 17, *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20343, *Lactococcus lactis* B 162 und *Lactococcus lactis* B 238. Es zeigte sich, dass sich eine Verringerung des zugesetzten Tomatensafts zur Senkung der Produktionskosten negativ auf die Produktbildung auswirkte. Der vollständige Ersatz des Tomatensafts durch ein CM-Mix führte dazu, dass die vorhandene Xylose kaum abgebaut wurde. Die Menge des entstehenden Lactats war schwindend gering. Die mikrobielle Lactatproduktion aus dem nachwachsenden Rohstoff Weizenstroh ist möglich, jedoch kann nicht vollständig auf den Einsatz von Tomatensaft verzichtet werden. Der Einsatz von Weizenstroh-Hydrolysat bietet somit eine weitere Alternative für die fermentative Lactatherstellung aus erneuerbaren Ressourcen. Weizenstroh kann ebenso wie Maniok- oder Zuckerrohrbagasse zur Produktion von Lactat verwendet werden (John *et al.* 2006, John *et. al.* 2007) und teure Substrate wie Stärke, Glucose, Weizenmehl-Hydrolysat oder Saccharose ersetzen.

4.6 PHB aus der cellulosischen Reststroh-Fraktion

Die Bildung von PHB aus der Cellulose der cellulosischen Fraktion des Strohs beruht auf der Zerlegung der Cellulose in ihre Grundbausteine Glucose, welche dann von geeigneten Organismen weiter zu PHB verstoffwechselt werden. Der Versuch, die Cellulose in großen Mengen durch cellulosische Organismen frei zu setzen, war nicht erfolgreich. Die eingesetzten Bakterien konnten zwar Glucose aus der Cellulose zum eigenen Wachstum nutzen, jedoch konnten keine Mengen an freiem Zucker im

Medium nachgewiesen werden. Für die PHB-Bildung sollten Glucose-Konzentrationen von ca. 10 g/l zur Verfügung stehen.

Um dies zu erreichen, wurden kommerzielle Cellulasen der Firma Novozymes eingesetzt. Durch die Ermittlung der Optimalbedingungen in Bezug auf Temperatur und pH-Bereich, sowie der Kombination der zwei Enzymlösungen NS 22086 (Cellulase-Komplex = Hydrolyse der Cellulose) und NS 22083 (Xylanase = Hydrolyse der restlichen Hemicellulose) konnten Glucosekonzentrationen von über 10 g/l erzielt werden. Der Einsatz der beiden Enzyme bei dem für die PHB-Produzenten optimalen pH-Wert zeigte, dass die Enzyme für diesen pH-Bereich nicht geeignet waren. Auch durch Einsatz von größeren Mengen Enzymlösung konnten keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Die Ermittlung der optimalen Enzymkonzentration zum hydrolytischen Abbau der Cellulose ergab ein Volumen der Enzympräparate von 3,0 ml/l bei NS 22086 und 2,5 ml/l bei NS 22083. Eine weitere Erhöhung der Enzymkonzentration führte zu geringeren Glucose-Ausbeuten. Bei der Ermittlung der optimalen Substratkonzentration konnten festgestellt werden, dass die Enzyme in dem getesteten Bereich keine Substrathemmung zeigten. Die Erhöhung des eingesetzten Substrats führte zu höheren Glucose-Ausbeuten und verlief annähernd linear, wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist. Cellulasen besitzen im Allgemeinen zwei Domänen, die katalytische Domäne und die „Cellulose-binding domain“. Es ist davon auszugehen, dass trotz Erhöhung der Substratkonzentration noch keine Substratsättigung erreicht wurde. Dies unterstreicht die Effektivität der eingesetzten Enzympräparate. Auf eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration wurde verzichtet, da der Einsatz von 20 g/l der cellulosischen Fraktion bereits zu einer ausreichenden Menge an freier Glucose für die PHB-Bildung führte (10 g Glc/l). Im Vergleich zum Celluloseabbau durch cellulosische Organismen ist die Hydrolyse durch die kommerziellen Enzympräparate wesentlich effektiver. Die Enzyme können in großen Mengen angeschafft werden und sind somit für eine großtechnische Anwendung geeignet. Es ist jedoch zu beachten dass die Verwendung dieser Enzyme den kostenintensivsten Schritt ausmacht.

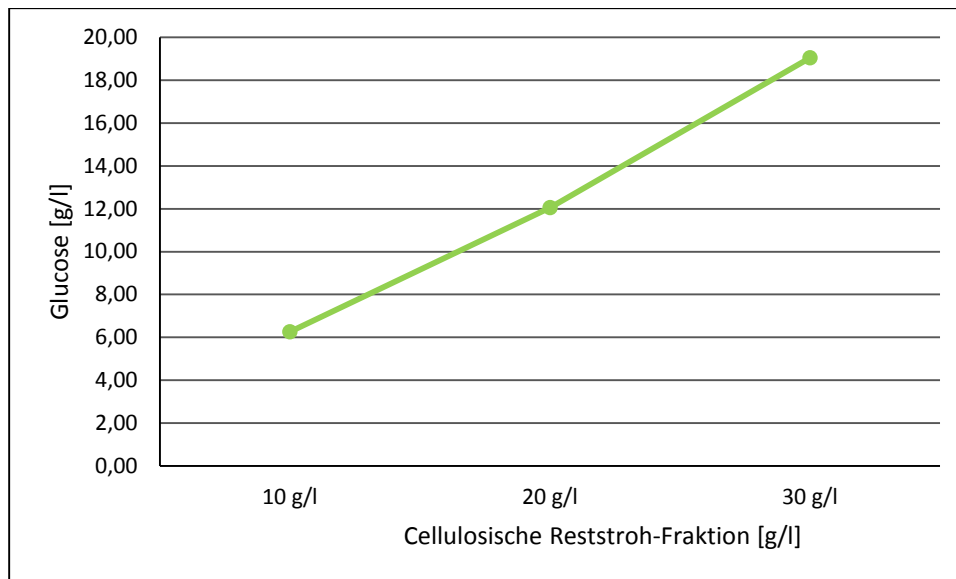


Abbildung 4.1: Abhängigkeit von Substratkonzentration und freigesetzter Glucose.

Die Bildung der PHB aus der cellulosischen Fraktion wurde durch vier ausgewählte Organismen verwirklicht. Die zwei Referenzorganismen *Cupriavidus necator* DSM 545 und NCIMB 11599 sind oft genutzte Bakterien zur fermentativen Herstellung von PHB aus Glucose und anderen Substraten. *Cupriavidus necator* (früher *Ralstonia eutropha*) war der Produktionsorganismus der Wahl für die Imperial Chemical Industries, Ltd. in den 1970er Jahren. Der Mikroorganismus wächst gut in Mineralmedium, bei einer nicht allzu hohen Temperatur von 30 °C, mit einer Reihe von C-Quellen (Ethanol, Glycerin, Fructose, Glucose, Saccharose) und er weist einen hohen Polymergehalt auf (Byrom 1987, Madison und Huisman 1999). Für die industrielle Produktion wurde eine Glucose-verwertende Mutante des Originalstamms H16 isoliert und eingesetzt, diese ist heute der Stamm 11599 der NCIMB (Byrom 1992). Auch für *Cupriavidus necator* DSM 545 konnte die Verwertung von Glucose zur PHB-Bildung beschrieben werden. Ramsay *et al.* (1990) beschrieben einen PHB-Gehalt von 43 % der ZTM bei der Anzucht mit Glucose. Durch die Zugabe von Propionsäure konnte hier ebenfalls das Co-Polymer P(3HB-3HV) gebildet werden. In den Versuchen zur Gewinnung von PHB aus der cellulosischen Fraktion konnten diese zwei Stämme von *Cupriavidus necator* ebenfalls überzeugen. Sie konnten die im enzymatischen Hydrolysat vorhandene Glucose abbauen und zur Synthese von PHB nutzen. Hierbei fiel auf, dass die PHB-Bildung sehr nahe mit dem Zellwachstum korreliert war. Die Organismen wiesen eine längere stationäre Phase auf, innerhalb der Versuchsdauer kam es nicht zum Eintritt in die Absterbephase. Das Polymer wurde ebenfalls innerhalb der Versuchsdauer nicht abgebaut. Der Stamm NCIMB 11599 eignet sich im Vergleich zu DSM 545 besser zur PHB-Bildung aus der cellulosischen Fraktion. Durch diesen konnten ca. 17 % mehr PHB produziert werden, des Weiteren wurde mehr Substrat verbraucht. Dies unterstreicht die Tatsache, dass es sich bei *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 um die Glucose-verwertende Mutante des industriell eingesetzten Originalstamms handelt. Zur PHB-

Bildung aus der cellulosischen Fraktion des Weizenstrohs eignen sich also beide getesteten Referenzstämme.

Nun wurde die Eignung der beiden hauseigenen *Bacillus*-Stämme zur PHB-Produktion aus dieser Fraktion untersucht. Mit dem Substrat Glucose wurden bereits einige PHB-bildende *Bacillus*-Stämme beschrieben (Chen *et al.* 1991), ebenso die Bildung von PHB durch Bacillen bei Anzucht in einem Komplexmedium (Yilmaz *et al.* 2005). Slepecky und Law (1961) klärten den Zusammenhang von Synthese und Abbau der PHB mit der Sporulation von *Bacillus megaterium*. Unter optimalen Produktionsbedingungen (Zugabe von Glucose, Acetat und Sauerstoff) fand eine gute Polymer-Produktion statt. Anschließend folgte die Sporulation verbunden mit einem langsamen Abbau des Polymers. Kominek und Halvorson (1965) stellten ebenfalls einen Abbau der PHB mit beginnender Sporulation bei *Bacillus cereus* fest. Bei der Untersuchung der hauseigenen *Bacillus*-Stämme konnten Mengen von über 50 % PHB der ZTM gebildet werden. *Bacillus licheniformis* KHC 3 bildete bereits vor Eintritt in die stationäre Phase 52,56 % PHB. Bei *Bacillus megaterium* KNaC 2 konnte mit Eintritt in die stationäre Phase ein PHB-Gehalt von 55,24 % gemessen werden. Eine maximale PHB-Bildung konnte somit bereits nach dem ersten Versuchstag verwirklicht werden. Wie auch bei den beiden Referenzstämmen kam es nicht (*B. licheniformis* KHC 3), oder nur gering (*B. megaterium* KNaC 2) zu einem Abbau des Polymers innerhalb der Versuchsdauer (Abbildung 3.38 + 3.39). Diese Tatsache könnte darauf hindeuten, dass es sich bei dem cellulosischen Hydrolysat um ein sehr gutes Produktionsmedium handelt. Die Zellen bilden große Mengen an Produkt. Eine beginnende Sporulation ist auszuschließen, da das Polymer innerhalb der Versuchsdauer kaum abgebaut wird. Die oben erwähnten Punkte könnten sich positiv auf einen großtechnischen Einsatz dieser beiden Stämme auswirken. Das Zielprodukt könnte innerhalb kürzester Zeit produziert werden und der Zeitpunkt der Ernte ist nicht eng gefasst wie es z.B. bei der Produktion im hemicellulosischen Hydrolysat der Fall war (s. Abschnitt 3.6.3 + 3.6.4). Die Verwendung von Bacillen bietet wie unter Abschnitt 4.4 erwähnt weitere Vorteile.

Zusammenfassend sind die PHB-bildenden Stämme sowie deren Substrate in Tabelle 4.3 aufgeführt. Dargestellt sind ebenfalls der jeweilige PHB-Gehalt in % und die Polymerausbeute vom Substrat, sowie die Polymerproduktivität.

Tabelle 4.2: PHB-Bildung aus enzymatisch hergestelltem cellulosischem Hydrolysat der Reststroh-Fraktion.

Stamm	Anfangs-Glc-Konz. [g/l]	End-Glc-Konz. [g/l]	Verwertete Glc-Konz. [g/l]	ZTM [g/l]	Biomasse [g/l]	PHB _{max.} [g/l]	PHB _{max.} [%]	Y _{PHB/S} [g/g]	Y _{Biomasse/S} [g/g]	Q _{PHB} [g/lh]
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	12,95 ± 0,04	6,26	6,69	3,07	2,12	0,95	30,90 ± 0,24	0,14	0,32	0,02
<i>Cupriavidus necator</i> NCIMB 11599	12,95 ± 0,04	3,69	9,26	3,64	1,88	1,76	48,39 ± 0,18	0,19	0,20	0,02
<i>Bacillus licheniformis</i> KHC 3	12,95 ± 0,04	2,33	10,62	2,11	1,00	1,11	52,56 ± 0,44	0,10	0,09	0,05
<i>Bacillus megaterium</i> KNaC 2	12,95 ± 0,04	6,15	6,80	2,24	1,01	1,23	55,24 ± 0,98	0,18	0,15	0,05

ZTM [g/l] Zelltrockenmasse, Y_{PHB/S} [g/g] Polymer-Ausbeute vom Substrat, Y_{Biomasse/S} [g/g] Biomasse-Ausbeute vom Substrat, Q_{PHB} [g/l*h] Polymer-Produktivität, ± mittlere Standardabweichung.

Tabelle 4.3: PHB-Bildung der verschiedenen Organismen in MM mit unterschiedlichen C-Quellen.

Stamm	C-Quelle	ZTM [g l ⁻¹]	PHB _{max} [%]	Y _{PHB/S} [g g ⁻¹]	Q _{PHB} [g l ⁻¹ h ⁻¹]
<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	Xylose	3,81	43,65 ± 0,88	0,15	0,02
	hemicellulosisches Hydrolysat	8,91	28,27 ± 0,34	0,17	0,02
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> DSM 1034	Xylose	0,17	19,26 ± 0,37	0,00	0,00
	hemicellulosisches Hydrolysat	4,51	22,47 ± 1,51	0,10	0,02
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Glucose	2,71	34,60 ± n.b.	0,09	0,01
	cellulosisches Hydrolysat	3,07	30,90 ± 0,24	0,07	0,02
<i>Cupriavidus necator</i> NCIMB 11599	Glucose	2,44	25,23 ± n.b.	0,06	0,01
	cellulosisches Hydrolysat	3,64	48,39 ± 0,18	0,14	0,02
<i>Bacillus licheniformis</i> IMW KHC 3	Xylose	1,91	38,41 ± 0,85	0,07	0,03
	Glucose	2,11	36,43 ± n.b.	0,08	0,02
	hemicellulosisches Hydrolysat	3,53	46,29 ± 0,86	0,17	0,03
	cellulosisches Hydrolysat	2,11	52,56 ± 0,44	0,09	0,05
<i>Bacillus megaterium</i> IMW KNaC 2	Xylose	1,36	43,16 ± 0,63	0,06	0,01
	Glucose	0,91	9,70 ± n.b.	0,01	0,00
	hemicellulosisches Hydrolysat	4,15	45,98 ± 0,79	0,20	0,04
	cellulosisches Hydrolysat	2,24	55,24 ± 0,98	0,10	0,05

ZTM [g/l] Zelltrockenmasse, Y_{PHB/S} [g/g] Polymer-Ausbeute vom Substrat, Q_{PHB} [g/l*h] Polymer-Produktivität, ± mittlere Standardabweichung, n.b. nicht bestimmt.

4.7 Abtrennung von Poly- β -Hydroxybuttersäure durch zelllytische Enzyme aus *Streptomyces*

Die konventionelle Abtrennung des Zielprodukts PHB beruht auf einer Extraktion in Lösungsmitteln. Der Einsatz von Chloroform, Methanol oder anderen Lösungsmitteln hat eine erhebliche Verschlechterung der ökologischen Bilanz der PHB-Produktion zur Folge. Der Einsatz von chlorierten Kohlenwasserstoffen oder Isoamylalkoholen führt zur Auflösung des Polymers (Berger *et al.* 1989, Ramsay *et al.* 1994). Eine weitere Möglichkeit zur Abtrennung der PHB beruht auf der Zerstörung der Zellen. Dies konnte durch den Einsatz von Natriumhypochlorid oder Natriumhydroxid erreicht werden (Ramsay *et al.* 1990, Lee *et al.* 1999). Mohammadi *et al.* (2012) entwickelten eine halogenfreie und umweltfreundlichere Methode zur Aufreinigung von PHB. Sie verwendeten Wasser und Ethanol. Eine komplett chemikalienfreie Alternative bietet die Lyse der Zellen durch den Einsatz von zellwandlytischen Enzymen. Die Vorteile einer enzymatischen Zelllyse liegen in ihrer Spezifität und in den milden Bedingungen unter denen sie stattfindet. Somit könnten hohe Reaktionsraten bei minimalen Produktschäden erreicht werden. Kapritchkoff *et al.* (2006) beschrieben die Lyse von *Cupriavidus necator* DSM 545 durch sechs verschiedene Enzyme. Es wurden die Lyseaktivität mit den Enzymkosten verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lyse einiger Produktionsorganismen durch lytische Enzyme aus *Streptomyces* untersucht. Es handelte sich hierbei um den Gram-negativen Referenzstamm *Cupriavidus necator* DSM 428 und die beiden hauseigenen Bacillus-Stämme *B. licheniformis* KHC 3 und *B. megaterium* KNaC 2. Die Lyse der Zellwand sollte durch lytische Enzyme aus *Streptomyces*, welche am IMW isoliert wurden, verwirklicht werden. Zunächst wurden die Kulturkonzentrate von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 und *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814 gegen die Zielorganismen eingesetzt. Nach Ermittlung der optimalen Lyseparameter (pH, Temperatur) konnte eine Lyse der Zielzellen verwirklicht werden. Die Zielzellen konnten zu hohen Prozentsätzen aufgebrochen werden. Vor allem die gram-positiven Bacillus Stämme wiesen eine hohe prozentuale Lyse von 99 % (*B. licheniformis* KHC 3) und 83 % (*B. megaterium* KNaC 2) auf. Die Zellwand des gram-negativen Organismus *Cupriavidus necator* DSM 428 konnte durch die Enzyme nicht vollständig aufgebrochen werden. Die prozentuale Lyse lag bei 40 %. Der Versuch zur Steigerung der Lyse von *Cupriavidus necator* DSM 428 durch eine vorherige Schädigung der Zellwand durch den Einsatz von Detergenzien führte zu keiner nennenswerten Verbesserung. Durch die Schädigung der Zellwand mittels Ultraschallbehandlung konnten die Lyseraten erhöht werden. Hier zeigte sich, dass eine 15 minütige Anwendung des Ultraschallrüssels die Lyseaktivität von 38 % auf 74,5 % gesteigert werden.

Eine solche Vorbehandlung unterstützte somit die enzymatische Lyse und würde sich für einen Einsatz bei gram-negativen Produktionsorganismen eignen.

Die durch Kationenaustauschchromatographie gereinigte Metalloprotease aus *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 konnte die Zielzellen lysieren. Der Aufreinigungsschritt mittels FPLC sollte die Metalloprotease im Kulturüberstand von anderen Enzymen des Gemisches trennen. Vor allem sollten hier Enzyme wie Lipasen und Esterasen entfernt werden, da bei diesen eine Depolymerisierung von Polyhydroxyalkanoaten nachgewiesen wurde (Mukai *et al.* 1993, Rodríguez-Contreras *et al.* 2012a, Rodríguez-Contreras *et al.* 2012b). Durch die Aufreinigung kam es zwar zu einem Verlust der Lyseaktivität, jedoch wurden auch hier die Zielzellen lysiert (*Bacillus licheniformis* KHC 3 43 %, *Cupriavidus necator* DSM 428 18%, *Bacillus megaterium* KNaC 2 22 %). Eine Depolymerisation des Speicherpolymers konnte durch HPLC-Messung des Überstandes ausgeschlossen werden. Es konnte keine freie 3-Hydroxybuttersäure nachgewiesen werden. Der anschließende Nachweis des Polymers wurde durch Analyse der Zellpellets nach erfolgter Lyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass 87,5 % der PHB nach Lyse mit dem Überstand von *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* DSM 40814 im Zellpellet wiederzufinden waren. Nach Zelllyse mittels Kulturextrakt von *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 konnten 80 % der anfänglichen PHB-Menge wiedergefunden werden. Somit kam es zu einem geringen Verlust der Gesamtmenge an PHB. Erste Schritte für eine lösungsmittelfreie Abtrennung des Zielprodukts waren nun vorhanden. Die von Streptomyceten gebildeten, extrazellulären Enzyme waren in der Lage sowohl gram-positive, als auch gram-negative PHB-Produzenten zu lysieren. Der mögliche Abbau des Polymers durch Lipasen und Esterasen konnte durch eine Reinigung des Enzyms mittels FPLC eliminiert werden.

5 Zusammenfassung

Weizenstroh als erneuerbare Ressource zur Produktion von Biopolymeren und wichtigen Grundchemikalien stellt eine ökologisch sinnvolle Alternative dar. Durch die vom PFI durchgeführte TDH konnte das Weizenstroh und die darin enthaltenen Zucker fast vollständig mobilisiert werden. Ein umfangreiches Screening nach Organismen, welche die Zucker des Weizenstrohs verwerten konnten, ergab, dass einige wenige Stämme zur PHB-Bildung aus Xylose befähigt waren (10 %). Zur PHB-Synthese aus Glucose waren indes ca. doppelt so viele Organismen in der Lage (20 %). Zwei der insgesamt 118 untersuchten Organismen zeigten besonders gute PHB-Bildung sowohl mit Xylose als auch mit Glucose als Substrat. Dabei handelte es sich um die hauseigenen Stämme *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2. Nach Enttoxifizierung der hemicellulosischen Fraktion konnte diese als C-Quelle im Mineral Medium eingesetzt werden. *Burkholderia sacchari* DSM 17165 und *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034, sowie die hauseigenen Isolate *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2 wurden für die Synthese von PHB aus der hemicellulosischen Fraktion verwendet. Die Zucker der hemicellulosischen Fraktion (Xylose, Glucose, Arabinose) konnten durch diese Organismen zur PHB-Synthese genutzt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass die beiden *Bacillus*-Stämme besser zur Produktion von PHB aus dem hemicellulosischen Hydrolysat geeignet waren als die Stämme der DSMZ. Die alternative Umsetzung der im hemicellulosischen Hydrolysat enthaltenen Zucker in die wichtigen Grundchemikalien Lactat und Acetat konnte durch die Verwendung von heterofermentativen Milchsäurebakterien verwirklicht werden. Die Bildung dieser wichtigen Grundchemikalien stellt eine interessante Alternative zur PHB-Synthese dar. Die Menge an teuren Zusätzen wie Tomatensaft, welcher für das Wachstum der MSB essentiell war, konnte reduziert werden. Die Glucose der zweiten Fraktion des Weizenstrohs, der cellulosischen Fraktion, konnte ebenfalls durch den Einsatz von Mikroorganismen in PHB umgewandelt werden. Kommerzielle Cellulasen der Firma Novozymes konnten große Mengen an Glucose (≥ 10 g/l) aus der cellulosischen Fraktion freisetzen. Diese freie Glucose wurde mit Hilfe von *Cupriavidus necator* DSM 545, *Cupriavidus necator* NCIMB 11599, *B. licheniformis* KHC 3 und *B. megaterium* KNaC 2 zu PHB fermentiert. Wie auch beim hemicellulosischen Hydrolysat konnten hier die beiden *Bacillus*-Stämme die besten Ergebnisse erzielen. Bei ihnen machte die PHB mehr als die Hälfte der Trockenmasse aus. Die Abtrennung des Zielprodukts ohne die Verwendung von umweltschädlichen Lösungsmitteln wurde durch die Lyse der Zielzellen durch eigens isolierte Enzyme aus *Streptomyces* verwirklicht. Die Zelllyse durch die Enzyme aus *Streptomyces globisporus* subsp. *caucasicus* DSM 40814 und *Streptomyces albidoflavus* DSM 40233 war erfolgreich und zeigte vor allem bei den Bacillen hohe Wirkung (83 % und 99 % Zelllyse). Bei dem Gram-negativen Organismus *C. necator* DSM 428 konnte die anfangs niedrige Zelllyse von 38 % durch Ultraschallbehandlung auf ca. 75 % erhöht werden.

6 **Ausblick**

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bacillen *Bacillus licheniformis* KHC 3 und *Bacillus megaterium* KNaC 2 eignen sich sehr gut für die Umwandlung von Zuckern des Weizenstrohs in PHB. Der Vorteil liegt hierbei in der Fähigkeit der Organismen beide Hauptzucker des Strohs, Xylose und Glucose, zur PHB-Synthese zu verwenden. Somit können beide Fraktionen nach der TDH und enzymatischer Hydrolyse direkt durch diese Organismen verwertet werden. Ein Organismus ist in zwei Produktionsschritten einsetzbar. Dies ist für eine industrielle Anwendung von enormer Bedeutung. Somit müssten die Organismen nur einmal angezogen werden und könnten dann als Stock für beide Umwandlungen dienen. Des Weiteren sind Bacillen anspruchslos, sie leben aerob und sind in die Risikogruppe 1 eingeteilt. Sie weisen im Vergleich zu den Referenzstämmen einen größeren PHB-Gehalt mit dem Substrat Weizenstrohydrolysat auf. Sie sind Gram-positiv, was eine enzymatische Abtrennung des Zielprodukts vereinfacht. Die Verwendung von Stroh als nachwachsende Ressource zur PHB-Produktion kann also umgesetzt werden. Dies dürfte zu einer nachhaltigeren und kostengünstigeren Produktion von biologisch abbaubaren Kunststoffen führen. Eine weitere Zunahme von Plastikmüll auf der Erde bzw. in den Weltmeeren kann so verhindert werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abe, H, Doi, Y., Aoki, H., Akehata, T., Hori, J. & Yamaguchi, A. (1990)** Physical properties and enzymatic degradability of copolymers of (R)-3-hydroxybutyric and 6-hydroxyhexanoic acids. *Macromolecules*, 28: 7630-7637.
- Ahn, W.S., Park, S.J. & Lee, S.Y. (2000)** Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3624-3627.
- Alias, Z. & Tan, K.P.I. (2005)** Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource Technology*, 96: 1229-1234.
- Andrady, A.L. (2003)** Plastics in the environment. In *Plastics in the Environment*. John Wiley & Sons, New Jersey, 762.
- Anil-Kumar, A.P.K., Shamala, T.R., Kshama, L., Prakash, M.H., Joshi, G.J., Chandrashekar, A., Latha Kumari, K.S., Divyashree, M.S. (2007)** Bacterial synthesis of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using carbohydrate-rich mahua (*Madhuca* sp.) flowers. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 204-209.
- Anuradha, R., Suresh, A.K. & Venkatesh, K.V. (1999)** Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process Biochemistry*, 35: 367-375.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Dorsch, M., Stackebrandt, E. & Collins, M.D. (1991)** Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16s rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 343-346.
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y. & Foglia, T.A. (2002)** The synthesis of short- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixture from glucose- or alkanolic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28: 147-153.
- Auras, R., Harte, B. & Selke, S. (2004)** An overview of polylactides as packaging material. *Macromolecular Bioscience*, 4: 835-864.
- Ballmann, P., Müller, M., Gasser, E, Dröge, S. & König H. (2013)** Improved pretreatment process of wheat straw with direct steam injection. *Proceedings of the 21st. European Biomass Conference and Exhibition, Copenhagen 2013*, pp.1003–1009, Doi: 10.5071/21 stEUBCE2013-2DV.2.6. ETA-Florence Renewable Energies, Florence, Italy.
- Baptist, J.N. (1963)** U.S. patent 3,072,538.
- Baptist (1963)** U.S. patent 3,107,172.
- Barnes, D.K.A. (2005)** Remote island reveal rapid rise of Southern Hemisphere sea debris. *Directions in Science The Scientific World Journal*, 5: 915-921.

- Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C. & Barlaz, M.** (2009) Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364: 1985-1998.
- Berger, E, Ramsay, B.A., Ramsay, J.A. & Chavarie, C.** (1989) PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnology Techniques*, 3: 227-232.
- Bertrand, J.L., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A. & Chavarie, C.** (1990) Biosynthesis of poly- β -hydroxyalkanoates from pentoses by *Pseudomonas pseudovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3133-3138.
- Bitar, A. & Underhill, S.** (1990) Effect of ammonium supplementation on production of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. *Biotechnology Letters*, 12: 563-568.
- Blättel, V., Wirth, K., Claus, H. Schlott, B, Pfeiffer, P. & König, H.** (2009) A lytic enzyme cocktail from *Streptomyces* spec. B578 for the control of lactic and acetic acid bacteria in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 839-848.
- Bohn, J.** (2012) Mikrobielle Polyhydroxybuttersäure (PHB)-Bildung mit Glucose und Xylose als Substrat. Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Bormann, E.J. & Roth, M.** (1999) The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. *Biotechnology Letters*, 21: 1059-1063.
- Borrion, A.L., McManus, M.C. & Hammond, G.P.** (2012) Environmental life cycle assessment of bioethanol production from wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, 47: 9-19.
- Brämer, C.O., Vandamme, P, Silva, L.F., Gomez, J.G.C. & Steinbüchel, A.** (2001) *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1709-1713.
- Brandl, A., Gross, R.A., Lenz, R.W. & Fuller, C.** (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1977-1982.
- Braunegg, G., Sonnleitner, B. & Lafferty, R.M.** (1978) A rapid gas-chromatographic method for determination of poly-beta-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6: 29-37.
- Brockhaus-Enzyklopädie** (1990) Bd.12 Kir-Lag. F.A. Brockhaus GmbH, Mannheim 1990.
- Brockhaus-Enzyklopädie** (1994) Bd.23 Us-Wej. F.A. Brockhaus GmbH, Mannheim 1990.
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M. & Thompson, R.C.** (2008) Indesgtd microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental Science & Technology*, 42: 5026-5031.
- Byrom, D.** (1987) Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *TIBTECH*, 5: 246-250.

- Byrom, D.** (1992) Production of poly- β -hydroxybutyrate: poly- β -hydroxyvalerate copolymers. *FEMS Microbiology Reviews*, 103: 247-250.
- Byrom, D.** (1994) Polyhydroxyalkanoate. In *Plastics from microbes: Microbial synthesis of polymers and polymer precursor*, ed. by Mobley DP, Hanser, München, pp. 5-33.
- Capon, R.J., Dunlop, R.W., Ghisalberti, E.L. & Jefferies, P.R.** (1983) Poly-3-hydroxyalkanoates from marine and freshwater cyanobacteria. *Phytochemistry*, 22: 1181-1184.
- Cawthorne, M.** (1989) Impacts of marine debris on wildlife in New Zealand coastal waters. In: *Proceedings of Marine Debris in New Zealand's Coastal Waters Workshop*, 9 March 1989, Wellington, New Zealand. Department of Conservation, Wellington, New Zealand, 5-6.
- Chen, G.Q., König, K.H. & Lafferty, R.M.** (1991) Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letters*, 84: 173-176.
- Chen, G.Q. & Wu, Q.** (2005) The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26: 6565-6578.
- Chen, G.Q.** (2009) A polyhydroxyalkanoates based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38: 2434-2446.
- Chien, C.C., Chen, C.C., Choi, M.H. Kung, S.S. & Wei, Y.H.C.** (2007) Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. Isolated from marine environment. *Journal of Biotechnology*, 132: 259-263.
- Cho, K.S., Ryu, H.W., Park, C.H. & Goodrich, P.R.** (1997) Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from swine waste liquor by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnology Letters*, 19: 7-10.
- Coe, J.M. & Rogers, D.B.** (1997) *Marine debris: sources, impacts, and solutions*. Springer-Verlag, New York
- Derraik, J.G.B.** (2002) The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 842-852.
- DOC – Department of conversation** (1990) *Marine Debris*. Wellington, New Zealand
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. & Soga, K.** (1986) Nuclear magnetic resonance studies on poly(β -hydroxybutyrate) and a copolyester of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16.
- Doi, Y. & Abe, C.** (1990) Biosynthesis and characterization of a new bacterial copolyester of 3-hydroxyalkanoates and 3-hydroxy- ω -chloroalkanoates. *Macromolecules*, 23: 3705-3707.
- Doi, Y., Kitamura, S. & Abe, H.** (1995) Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, 28: 4822-4828.

- Dornburg, V., Hermann, B.G. & Patel, M.K.** (2008) Scenario projections for future market potentials of biobased bulk chemicals. *Environmental Science & Technology*, 42: 2261-2267.
- FAO** (2012) *FAO Statistical Yearbook 2012*. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rom 2012.
- FNR** (2006) Biokraftstoff-Potential in Deutschland. Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe Gützow.
- FNR** (2006) Biokunststoffe. Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe Gützow.
- FNR** (2007) Marktanalyse Nachwachsende Rohstoffe Teil II. Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe Gützow.
- FNR** (2008) Biokraftstoffe im Vergleich: Ergebnisse der Marktstudie 2008. Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe Gützow.
- Fritsche, U., Dehoust, G., Jenseits, W. & Hünecke, K.** (2004) Stoffstromanalyse zur nachhaltigen energetischen Nutzung von Biomasse. Im Auftrag des BMU, Abschlussbericht des Öko-Institutes, Darmstadt.
- Fritsche, W.** (2002) *Mikrobiologie* Gustav Fischer. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 3. Auflage.
- Fuchtenbusch, B., & Steinbüchel, A.** (1999) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from low-rank coal liquefaction products by *Pseudomonas oleovorans* and *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 91-95.
- Gasser, E.** (2010) Isolierung und Charakterisierung lytischer Exoenzyme aus *Streptomyces coelicolor* DSM 40233 und *Streptomyces albus* B578 zur Lyse weinrelevanter Bakterien. Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Ghatnekar, M.S., Pai, J.S. & Ganesh, M.** (2002) Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp V49. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77: 444-448.
- Gouda, M.K., Swellam, A.E. & Omar, S.H.** (2001) Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbial Research*, 156: 201-207.
- Gould, J. M.** (1984) Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 46-52.
- Gregory, M.R. & Ryan, P.G.** (1997) Pelagic plastics and other seaborne persistent synthetic debris: a review of Southern Hemisphere perspectives. In: Coe, J.M., Rogers, D.B. (Eds.) *Marine Debris—Sources, Impacts and Solutions*. Springer-Verlag, New York: 49-66.
- Gross, R.A., DeMello, C. & Lenz, R.W.** (1989) Biosynthesis and characterization of Poly(β -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 22: 1106-1115.
- Gruber, P.R., Hall, E.S., Kolstad, J.H., Iwen, M.L., Benson, R.D. & Borchardt, R.L.** (1992) U.S. patent 5,142,023.

- Hartmann, M.H.** (1998) High molecular weight polylactic acid polymers. In *Biopolymers from Renewable Resources*, 1st edition, D-L- Kaplan, Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin 1998. P. 367-411.
- Harrel, I.J., Anderson, G.I. & Wilson, K.H.** (1995) Genetic Variability of *Bacillus anthracis* and related Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 1847-1850.
- Haywood, G.W., Anderson, A.J., Ewing, D.F. & Dawes, E.A.** (1990) Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3354-3359.
- He, W.N., Zhang, Z.M., Hu, P. & Chen, G.Q.** (1999) Microbial synthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by strain DG17 from glucose. *Acta Polymerica Sinica* 6: 709-714.
- Hesselmann, R.P.X., Fleischmann, T., Hany, R. & Zehnder, A.J.B.** (1999) Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods. *Journal of Microbiological Methods*, 35: 111-119.
- Hippe, H.** (1991) Maintenance of methanogenic bacteria. In: *Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods*. 2. Edition. Edited by B.E. Kirsop, A. Doyle. Academic Press, New York, pp. 101 – 113.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J, Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. & Schrepf, H.** (1985) *Genetic manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual*. The John Innes Foundation, Norwich.
- Hosman, P.V.** (1982) The amount of garbage from merchant ships. *Marine Pollution Bulletin*, 13: 167-169.
- Huang, T.Y., Duan, K.J., Huang, S.Y. & Chen, C.W.** (2006) Production of polyhydroxybutyrate from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33: 701-706.
- Hujberts, G.N.M., van der Wal, H., Wilkinson, C. & Eggink, G.** (1994) Gas-chromatographic analysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria. *Biotechnology Techniques*, 8: 187-192.
- Ibrahim, M.H.A. & Steinbüchel, A.** (2009) Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellia denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 6222-6231.
- Jan, S., Robolt, C., Goethals, G., Courtois, J., Courtois, B., Saucedo, J.E.N., Seguin, J.P. & Barbotin, J.N.** (1995) Study of parameters affecting poly(3-hydroxybutyrate) quantification by gas chromatography. *Analytical Biochemistry*, 225: 258-263.
- Jau, M.H., Yew, S.P., Toh, P.S., Chong, A.S., Chu, W.L., Phang, S.M., Najimudin, N. & Sudesh, K.** (2005) Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) P(3HB) by *Spirulina platensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36: 144-151.

- Jendrossek, D., Schirmer, A. & Schlegel, H.G.** (1996) Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46: 451-463.
- Jiang, Y., Song, X., Gong, L., Li, P., Dai, C. & Shao, W.** (2008) High poly(β -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 167-172.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. & Pandey, A.** (2006) Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41: 759-763.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. & Pandey, A.** (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 524-534.
- Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K. & Doi, Y.** (2004) High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strains. *Polymer Degradation and Stability*, 83: 79-86.
- Kaltschmitt M, Hartmann, H. & Hofbauer, H.** (2001). *Energie aus Biomasse - Grundlage, Techniken und Verfahren*. Springerverlag Berlin New York, 2. Auflage.
- Kaltschmitt, M., Merten, D., Fröhlich, N. & Nill, M.** (2003) *Energiegewinnung aus Biomasse. Externe Expertise für das WBGU-Hauptgutachten 2003 „Welt im Wandel: Energiewende zur Nachhaltigkeit“*. Springer Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Kamiya, N., Inoue, Y., Yamamoto, Y., Chujo, R. & Doi, Y.** (1990) Conformational analysis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in solution by ^1H NMR spectroscopy. *Macromolecules*, 23: 1313-1317.
- Kapritchkoff, F.M., Viotti, A.P., Alli, R.C.P., Zuccolo, M., Pradella, J.G.C., Maiorano, A.E., Miranda, E.A. & Bonomi, A.** (2006) Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, 122: 453-462.
- Karr, D.B., Waters, J.K. & Emerich, D.W.** (1983) Analysis of poly-3-hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV detection. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 1339-1344.
- Kato, M., Bao, H.J., Kang, C.K., Fukui, T. & Doi, Y.** (1996) Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45: 363-370.
- Kaufmann, T., Brady, F.X., Puletti, P.P. & Raykovitz, G.** (1992) U.S. patent 5,169,889.
- Kim, B.S. & Chang, H.N.** (1998) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. *Biotechnology Letters*, 20:109-112.
- Kißling, L.** (2013) *Zelllyse von Poly- β -hydroxybuttersäure produzierenden Bakterien*. Bachelorarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

- Koch, H.M. & Calafat, A.M.** (2009) Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364: 2063-2078.
- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E.R., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P. & Braunegg, G.** (2008) Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovara*. *Bioresource Technology*, 99: 4854-4863.
- Kominek, L.A. & Halvorson, H.O.** (1965) Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 90: 1251-1259.
- Koutinas, A.A., Xu, Y., Wang, R. & Webb, C.** (2007) Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1035-1044.
- Kristensen, J.B., Thygesen, L.G., Felby, C., Jorgensen, H. & Elder, T.** (2008) Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 1:5.
- Kumar, T., Singh, M., Purohit, H.J. & Kalia, V.C.** (2009) Potential of *Bacillus* sp. to produce polyhydroxybutyrate from biowaste. *Journal of Applied Microbiology*, 106:2017-2023.
- Kunigk, T.** (1996) Charakterisierung Lignocellulose abbauender und Sulfat reduzierender Bakterien aus dem Termitendarm. Dissertation in der Abteilung Angewandte Mikrobiologie und Mykologie der Universität Ulm.
- Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. & Witholt, B.** (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2924-2932.
- Laist, D.W.** (1997) Impacts of marine debris: entanglement of marine life in marine debris including a comprehensive list of species with entanglement and ingestion records. In *marine debris: sources, impacts, and solutions* (eds Coe, J.M. & Rogers, D.B.), Springer-Verlag, New York 99-140.
- Law, J.H. & Slepecky, R.A.** (1961) Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, 82: 33-36.
- Lee, S.Y.** (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 1-14.
- Lee, S.Y., Choi, J.L., Han, K. & Song, J.Y.** (1999) Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) from Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2762-2764.
- Lee, W.H., Azizan, M.N.M. & Sudesh, K.** (2004) Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polymer Degradation and Stability*, 84: 129-134.
- Leible, L, Arlt, A., Fürniß, B., Kälber, S., Kappler, G., Lange, S., Nieke, E., Rösch, Ch. & Wintzer, D.** (2003) Energie aus biogenen Rest- und Abfallstoffen. Bereitstellung und energetische Nutzung organischer Rest- und Abfallstoffe sowie Nebenprodukte als Einkommensalternative für die Land- und Forstwirtschaft – Möglichkeiten,

Chancen und Ziele. Forschungszentrum Karlsruhe in der Helmholtz-Gemeinschaft Wissenschaftliche Berichte, FZKA 6882.

Lemoigne, M. (1925). Études sur l'autolyse microbienne. Acidification par formation d'acide β -oxybutyrique. Annales de l'Institut Pasteur, 39: 144.

Lemoigne, M. (1926) Produits de dehydration et de polymerisation de l'acide β -oxobutyrique. Bulletin de la Société de Chimie Biologique, 8: 770-782.

Lillo, J.G. & Rodriguez-Valera, F. (1990) Effect of culture conditions on poly(β -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. Applied and Environmental Microbiology, 56: 2517-2521.

Liu, X.W., Wang, H.H., Chen, J.Y., Li, X.T. & Chen, G.Q. (2009) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli* harboring propionyl-CoA synthase gene (*prpE*) or propionate permease gene (*prpP*). Biochemical Engineering Journal, 43: 72-77.

Lopes, M.S.G., Rocha, R.C.S., Zanotto, S.P., Gomez, J.G.C. & Silva, L.F. (2009) Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 25: 1751-1756.

Madison, L. L. & Huisman, G.W. (1999). Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63: 21-53.

Marchessault, R.H., LePutre, P.F. & Wrist, P.E. (1995) U.S. patent 5,451,456.

Martini, F., Perazzo, L. & Vietto, P. (1989) U.S. patent 4,826,493.

Martini, F., Perazzo, L. & Vietto, P. (1989) U.S. patent 4,880,592.

Mehta, R., Kumar, V., Bhunia, H. & Upadhyay, S.N. (2005) Synthesis of poly (lactic acid): A review. Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews, 45: 325-349.

Mergaert, J., Wouters, A., Anderson, C. & Swings, J. (1995) In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters. Canadian Journal of Microbiology, 41: 154-159.

Mohammadi, M., Hassan, M.A., Phang, L.Y., Afriffin, H., Shirai, Y. & Ando, Y. (2012) Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant *Cupriavidus necator* using water and ethanol. Biotechnology Letters, 34: 253-259.

Moore, C., Moore, S., Leecaster, M. & Weisberg, S., (2001) A comparison of plastic and plankton in the North Pacific central gyre. Marine Pollution Bulletin, 42: 1297-1300.

Mugg, P., Seymour, S. & Clark, S. (2006) A new method for the identification of *Bacillus* spp. And related species involved in food poisoning and spoilage. Microgen Bioproducts.com.

- Mukai, K., Doi, Y., Sema, Y. & Tomita, K.** (1993) Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotechnology Letters*, 15: 601-604.
- Murray, J. & King, D.** (2012) Oil's tipping point has passed. *Nature*, 481: 433-435.
- Nampoothiri, K.M., Nair, N.R. & John, R.P.** (2010) An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*, 101: 8493-8501.
- Neurotiker** (2008). Structure of poly-(R)-3-hydroxybutyrate (P3HB). Poly-(R)-3-hydroxybutyrat.svg. Wikimedia.
- Nikel, P.I., Pettinari, M.J., Galvagno, M.A. & Méndez, B.S.** (2006) Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli* arcA mutants in microaerobiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2614-2620.
- Nultsch, W.** (2001) *Allgemeine Botanik*. Thieme Verlag New York, 11. Auflage.
- Nurbas, M. & Kutsal, T.** (2004) Production of PHB and P(HB-co-HV) biopolymers by using *Alcaligenes eutrophus*. *Iranian Polymer Journal*, 13: 45-51.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W. & Tyler, C.R.** (2009) A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364: 2047-2062.
- Page, W.J. & Cornish, A.** (1993) Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 4236-4244.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. & Nigam, P.** (2001) Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid-state fermentation process. In: *Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications*. New Dehli: Asiatech Puplichers, 2001, p. 8-27.
- Park, S.J., Park, J.P. & Lee, S.Y.** (2002) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter. *Biotechnology Letters*, 24: 185-189.
- Pelouze, J.** (1845) Über die Milchsäure. *Journal für Praktische Chemie*, 35: 128-137.
- Pfeiffer, P. & Radler, F.** (1985) Determination of organic-acids, sugars, glycerol and ethanol in wine by high-performance liquid-chromatography with a cation-exchange resin. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung*, 181: 24-27.
- Pöhler Rotach, E.** (2000) *Holzkunde Teil II - Holzchemie*. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.
- Povolo, S. & Casella, S.** (2003) Bacterial production of PHA from lactose and cheese whey permeate. *Macromolekular Symposia*, 197: 1-9.
- Priest, F., Goodfellow, M. & Todd, C.** (1988) A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, 134: 1847-1882.

- Pruter, A.T.** (1987) Sources, quantities and distribution of persistent plastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 18: 305-310.
- Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H. & Heller, H.C.** (2006) *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München, herausgegeben von Markl, J., 7. Auflage.
- Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dubé, B., Bataille, P. & Ramsay, J.A.** (1990) Production of poly-(β -hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2093-2098.
- Ramsay, J.A., Berger, E., Ramsay, B.A. & Chavarie, C.** (1990) Recovery of poly- β -hydroxybutyric acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. *Biotechnology Techniques*, 4: 221-226.
- Ramsay, J.A., Berger, E., Voyer, R., Chavarie, C. & Ramsay, B.A.** (1994) Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*, 8: 589-594.
- Reinecke, F.** (2005). Biosyntheseweg von Polyhydroxybuttersäure (PHB). PHB-Biosynthese.png, Frank Reinecke. Wikipedia.de.
- Reusch, R.N. & Reusch, W.H.** (1993) U.S. patent 5,266,422.
- Reusch, R.N. & Reusch, W.H.** (1993) U.S. patent RE035257.
- Riis, V. & Mai, W.** (1988) Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatographie A*, 445: 285–289.
- Rijk, T.C., Meer, P., Eggink, G. & Weusthuis, R.A.** (2002) In: Doi Y, Steinbüchel A, editors. *Biopolymers online*. Wiley Online Library, 2005. p. 1–12.
- Rodríguez, M.F.A., da Silva, L.F., Gomez, J.G.C., Valetin, H.E. & Steinbüchel, A.** (1995) Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyric acid co-3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by *Burkholderia* sp.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: 880-886.
- Rodríguez-Contreras, A., Calafell-Monfort, M. & Marqués-Calvo, M.S.** (2012a) Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by commercial lipases. *Polymer Degradation and Stability*, 97: 2473-2476.
- Rodríguez-Contreras, A., Calafell-Monfort, M. & Marqués-Calvo, M.S.** (2012b) Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by commercial lipases. *Polymer Degradation and Stability*, 97: 597-604.
- Sayyed, R.Z. & Chincholkar, S.B.** (2004) Production of poly- β -hydroxybutyrate from *Alcaligenes faecalis*. *Indian Journal of Microbiology*, 44: 269.
- Sayyed, R.Z. & Gangurde, N.S.** (2010) Poly-beta-hydroxybutyrate production by *Pseudomonas* sp RZS 1 under aerobic and semi-aerobic condition. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48: 942-947.

- Scheuermann, A., Thrän, D., Scholwin, F., Dilger, M., Falkenberg, D., Nill, M. & Witt, J.** (2003) Monitoring zur Wirkung der Biomasseverordnung auf Basis des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG). Institut für Energetik und Umwelt gemeinnützige GmbH. Endbericht Forschungs- und Entwicklungsvorhaben 20141132.
- Schütte, A.** (2008) Biokraftstoffe im Vergleich: Ergebnisse der Marktstudie 2008. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR).
- Shaw, D.G.** (1977) Pelagic tar and plastic in the Gulf of Alaska and Bering Sea: 1975. *Science of the Total Environment*, 8: 13-20.
- Shaw, D.G. & Mapes, G.A.** (1979) Surface circulation and the distribution of pelagic tar and plastic. *Marine Pollution bulletin*, 10: 160-162.
- Shi, H.P., Lee, C.M. & Ma, W.H.** (2007) Influence of electron acceptor, carbon, nitrogen, and phosphorus on polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Brachymonas* sp. P12. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 625-632.
- Silva, L.F., Taciro, M.K., Michelin Ramos, M.E., Carter, J.M., Pradella, J.G.C. & Gomez, J.G.C.** (2004) Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31: 245-254.
- Sitte, P, Weiler, E.W., Kadereit, J.W., Bresinski, A. & Körner, C.** (2002) Strasburger Lehrbuch der Botanik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 35. Auflage.
- Slepecky, R.A. & Law, J.H.** (1960) A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. *Analytical Chemistry*, 32: 1697-1699.
- Slepecky, R.A. & Law, J.H.** (1961) Synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, 81: 37-42.
- Sluiter, A., Hames B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. & Crocker, D.** (2008) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.
- Son, H., Park, G. & Lee, S.** (2004) Growth-associated production of poly- β -hydroxybutyrate from glucose or alcoholic distillery wastewater by *Actinobacillus* sp. EL-9. *Biotechnology Letters*, 18: 1229-1234.
- Soytas, U., Sari, R. & Ewing, B.T.** (2007) Energy consumption, income, and carbon emissions in the United States. *Ecological Economics* 62: 482-489.
- Steel, M. & Norton-Berry, P.** (1986) U.S. patent 4,603,070.
- Sun, Y. & Cheng, J.** (2002) Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83: 1-11.

- Sun, X., Sun, R., Fowler, P. & Baird, M.** (2004) Isolation and characterization of cellulose obtained by a two-stage treatment with organosolv and cyanamide activated hydrogen peroxide from wheat straw. *Carbohydrate polymers* 55: 379-391.
- Suzuki, T., Yamane, T. & Shimizu, S.** (1986) Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. *Applied microbiology and Biotechnology*, 24: 370-374.
- Talsness, C.E., Andrade, A.J.M., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A. & vom Saal, F.S.** (2009) Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364: 2079-2096.
- Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M. & Takada, H.** (2009) Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364: 2027-2045.
- Thomas, S., Ninan, N., Mohan, S. & Francis, E.** (2012) *Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends, and IPNs*. CRC Press.
- Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., McGonigle, D. & Russell, A.E.** (2004) Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, 304: 838.
- Timm, A. & Steinbüchel, A.** (1990) Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent Pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3360-3367.
- UNESCO** (1994) *Marine Debris: Solid Waste Management Action Plan for the Wider Caribbean*. IOC Technical Series, 41, Paris.
- van Franeker, J.A., Heubeck, M., Fairclough, K., Turner, D.M., Grantham, M., Stienen, E.W.M, Guse, N., Pedersen, J., Olsen, K.O., Anderson, P.J. & Olsen, B.** (2005) "Save the north sea" Fulmar study 2002-2004: a regional pilot project for the Fulmar-Litter-EcoQO in the OSPAR area. *Alterra-raport* 1162, ISSN 1566-7197.
- Valappil, S.P., Boccaccini, A.R., Bucke, C. & Roy, I.** (2007a) Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91: 1-17.
- Valappil, S.P., Misra, S.K., Boccaccini, A.R., Keshavarz, T., Bucke, C. & Roy, I.** (2007b) Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties from the newly characterized *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*, 132: 251-258.
- Vijayendra, S.V.N., Rastogi, N.K., Shamala, T.R., Anil-Kumar, P.K., Kshama, L. & Joshi, G.J.** (2007) Optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus* sp CFR 256 with corn steep liquor as a nitrogen source. *Indian Journal of Microbiology*, 47: 170-175.

Wallen, L.L. & Rohwedder, W.K. (1974) Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environmental Science and Technology*, 8: 576-579.

Wang, Y.J., Hua, F.L., Tseng, Y.F., Chan, S.Y., Sin, S.N., chua, H, Yu, P.H.F. & Ren, N.Q. (2007) Synthesis of PHAs from waste water under various C:N ratios. *Bioresource Technology*, 98: 1690-1693.

Ward, A.C. & Dawes, E.A. (1973) A disk assay for poly- β -hydroxybutyrate. *Analytical Biochemistry*, 52: 607-613.

Webb, A. (1990) U.S. patent 4,900,299

Wenzel, M. (2001) Symbiotische Mikroorganismen aus dem Termitendarm. Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Wenzel, M., Schönig, I., Berchtold, M., Kämpfer, P & König, H. (2002) Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 32-40.

Williams, A.T. & Simmons, S.L. (1997) Marine litter at the river/beach interface in the Bristol Channel, United Kingdom. *Journal of Coastal Research*, 13: 1159-1165.

Williamson, D.H. & Wilkinson, J.F. (1958) The isolation and estimation of the poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *Journal of General Microbiology*, 19: 198-209.

Wirth, K. (2007) Lyse von weinrelevanten Bakterien durch Exoenzyme von *Streptomyces albus* und *Streptomyces globisporus*. Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Wu, Q., Sun, S.Q., Yu, P.H.F., Chen, A.X.Z. & Chen, G.Q. (2000) Environmental dependence of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates. *Acta Polymerica Sinica*, 6: 751-756.

www.brockhaus.de

www.chemgapedia.de

www.eurostat.com

www.plasticseurope.de

Xu, Y., Wang, R.H., Koutinas, A.A. & Webb, C. (2010) Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry*, 45: 153-163.

Yalpani, M. (1993) U.S. patent 5,229,158.

Yalpani, M. (1993) U.S. patent 5,225,227.

Yellore, V. & Desai, A. (1998) Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 391-397.

Yikrazuul (2009). Xylan. Wikipedia.de.

Yilmaz, M., Soran, H. & Beyatli, Y. (2005) Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp.. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21: 565-566.

Young, F.K., Kastner, J.R. & May, S.W. (1994) Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid from D-xylose and lactose by *Pseudomonas cepacia*. Applied and Environmental Microbiology, 60: 4195-4198.

Yuksekdag, Z.N. & Beyatli, Y. (2008) Production of Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) in different media by *Streptococcus thermophilus* Ba21S strain. Journal of Applied Biological Sciences, 2: 7-10.

Zhang, H., Obias, V., Gonyer, K. & Dennis, D. (1994) Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. Applied and Environmental Microbiology, 60: 1198-1205.

Zhang, S., Norrlov, O., Wawrzynczyk, J. & Dey, E.S. (2004) Poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis in the biofilm of *Alcaligenes eutrophus*, using glucose enzymatically released from pulp fiber sludge. Applied and Environmental Microbiology, 70: 6776-6782.

Zhao, Y.M., Wang, Z.Y., Wang, J., Mai, H.Z., Yan, B. & Yang, F. (2004) Direct synthesis of poly (D,L-lactic acid) by melt polycondensation and its application in drug delivery. Journal of Applied Polymer Science, 91: 2143.

8 Abkürzungsverzeichnis

3-HB	3-Hydroxybuttersäure
3-HBME	3-Hydroxybuttersäuremethylester
3-HBPE	3-Hydroxybuttersäurepropylester
BZME	Benzoessäuremethylester = Methylbenzoat
BZPE	Benzoessäurepropylester
C	Kohlenhydrat
CSME	Capronsäuremethylester = Methylhexanoat
DCE	Dichlorethan
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eH ₂ O	entionisiertes Wasser
FAO	Food and Agricultural Organisation of the United Nations
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe
GC	Gaschromatograph
GJ	Giga Joule
5-HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMW	Institut für Mikrobiologie und Weinforschung
IS	Interner Standard
MAK	Maximale-Arbeitsplatz-Konzentration
MM	Mineral Medium
MO	Mikroorganismen
NCIMB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Scotland
OD	optische Dichte
PFI	Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens e.V.
PHB	Poly-β-Hydroxybuttersäure
P(3HB-3HV)	Poly-β-Hydroxybutyrat-co-Hydroxyvalerat

PP	Polypropylen
RT	Raumtemperatur
sp.	Spezies
TCA	Citratcyclus
TDH	Thermodruckhydrolyse
TM	Trockenmasse
ZTM	Zelltrockenmasse

