

**Modifizierung der Struktur von Bakteriencellulose
durch die Zusammenstellung des Nährmediums
bei der Kultivierung von *Acetobacter xylinum***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplomchemikerin

Marit Seifert

geboren am 1. Mai 1972
in Zwickau

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. Klemm
2. Dr. habil. D. Weiß
3. Prof. Dr. Ritter

Tag der öffentlichen Verteidigung: 23. 6. 2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 <i>Acetobacter xylinum</i> und bakteriell synthetisierte Cellulose	1
1.2 Synthesestrategien zur Herstellung von Bakteriencellulose	3
1.3 Konzept und Aufgabenstellung	6
2 Aufbau der Bakteriencellulose-Vliese	8
2.1 Zusammenstellung des Nährmediums und Kultivierungsbedingungen	8
2.1.1 Variation der C-Quellen-Zusammensetzung	9
2.1.2 Gegenwart von Additiven	10
2.2 Einfluß der Zusammenstellung des Nährmediums auf die Ausbeute der Vliese	11
2.3 Stammpflege	16
3 Einlagerung von Additiven in die Bakteriencellulose	17
3.1 Ergebnisse der Festkörper-NMR-Spektroskopie	17
3.2 Schlußfolgerungen aus der IR-Spektroskopie	22
3.3 HPLC der Hydrolysate der Bakteriencellulose-Proben	26
4 Steigerung des Polymerisationsgrades der Bakteriencellulose	31
4.1 Einfluß von Glycerin als C-Quelle auf die Molmassenverteilung	32
4.2 Kettenverlängerung durch CMC	34
4.3 Kettenverlängerung durch MC	35
5 Modifizierung der Porenstruktur der Bakteriencellulose	37
5.1 Visualisierte Differenzen im Cellulose-Netzwerk (REM)	37
5.1.1 Beschreibung und Ursache der Struktur von Standard-Bakteriencellulose	37
5.1.2 Auswirkungen der Variation der C-Quelle auf die Struktur	40
5.1.2.1 Größere Unordnung in der Struktur durch Glycerin	40
5.1.2.2 Größere Ordnung in der Struktur durch D-Glucuronsäure Na-Salz	42
5.1.3 Porenvergrößerung durch Additive	43
5.1.4 Faser- und Schichtgrößen im Überblick	45
5.2 Erfassung der inneren Oberfläche mittels Physisorption	46
5.2.1 Der Effekt der Vakuumtrocknung von Bakteriencellulose	47
5.2.2 Kleinere spezifische Oberfläche durch Variation der C-Quelle	49
5.2.3 Minimale spezifische Oberfläche durch Additive und Struktur-Kollaps beim Vakuumtrocknen	51

6	Verbesserung von charakteristischen Eigenschaften der Bakteriencellulose	56
6.1	Steigerung des Wassergehaltes	56
6.2	Erhöhung der Zugfestigkeit	64
7	Zusammenfassung der Ergebnisse	67
8	Experimenteller Teil	72
8.1	Material, Geräte und Analysenmethoden	72
8.2	Herstellung der Bakteriencellulose-Vliese	74
8.2.1	Allgemeine Herstellungsvorschriften und Kultivierungsbedingungen	74
8.2.2	Spezielle Herstellungsvorschriften und Produkt-Charakterisierung	76
9	Literaturverzeichnis	84
10	Anhang	
	Abkürzungsverzeichnis	
	Abbildungsverzeichnis	
	Tabellenverzeichnis	
	Danksagung	
	Tabellarischer Lebenslauf	
	Selbständigkeitserklärung	

1 Einleitung

1.1 *Acetobacter xylinum* und bakteriell synthetisierte Cellulose

Neben den Pflanzen als bedeutendster Cellulose-Quelle liefert auch das Bakterium *Acetobacter xylinum* (AX) ein β -(1 \rightarrow 4)-Glucan, die Bakteriencellulose (BC).

Bezüglich der Taxonomie gehört ***Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*** (nach aktueller Nomenklatur: *Gluconacetobacter xylinus* subsp. *xylinus*) zur Art *Gluconacetobacter xylinus*. Diese zählt zur Gattung *Gluconacetobacter* aus der Familie der Acetobacteraceae [http://sn2000.taxonomy.nl]. Nach der Zellwand-Beschaffenheit zählen sie zu den gramnegativen Bakterien. Generell stellen Bakterien das Reich der prokaryotischen Einzeller dar, d.h., sie besitzen noch keinen echten, also einen von einer Membran umgebenen, Zellkern. Sie vermehren sich durch Zweiteilung. [Rehm, 1974]

Pflanzliche, zuckerhaltige Substanz, wie z.B. reifes Obst, aber auch stehende Gewässer stellen den natürlichen Lebensraum für *Acetobacter xylinum* dar. Der Mikroorganismus lebt aerob, chemoorganotroph und hinsichtlich seines Temperatur-Optimums mesophil. AX bevorzugt pH-Werte zwischen 4 und 6 und gehört zu den Suboxidanten, die Kohlendioxid nur langsam bilden und eher unvollständig oxidierte Zwischenprodukte (wie Acetat oder Gluconat) abgeben. Die Zellen sind ellipsoidal bis stäbchenförmig und 1 - 4 μ m lang bzw. 0,6 - 0,8 μ m im Durchmesser. [Pilz, 2001]

Die in flüssigem Medium gebildete Cellulose-Schicht dient in erster Linie als Flotationshilfe, wobei ausgeschiedene CO₂ - Gasblasen das Aufschwimmen erleichtern. So können die AX-Bakterienzellen an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Atmosphäre einerseits Zugang zu ihren Nährstoffen und andererseits die Aufnahme von Sauerstoff gewährleisten. In enger Symbiose werden in diesem Cellulose-Geflecht oft auch Hefen mit eingeschlossen, ein bekanntes Beispiel ist der aus Rußland bekannte Kefirpilz. Andererseits können fremde Nahrungskonkurrenten ferngehalten werden. Eine weitere Funktion der Bakteriencellulose ist wahrscheinlich der Schutz der Zellen vor UV-Licht. [Pilz, 2001]

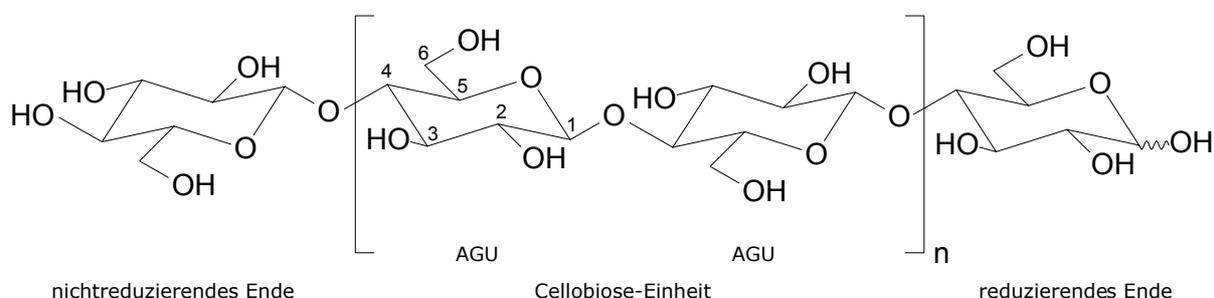


Abb. 1: Strukturformel von Cellulose

Acetobacter xylinum ist der wichtigste Mikroorganismus für Untersuchungen von bakterieller Cellulose-Biosynthese und -Kristallisation unter Laborbedingungen [Haigler, 1991; Kuga und Brown, 1991; Ross et al., 1991; Vandamme et al., 1998]. Lebensgrundlage für die Kultivierung von AX bildet ein komplexes Nährmedium; als Standard gilt das Hestrin-Schramm-Medium (HS-Medium), in dem als C-Quelle Glucose gegeben wird [Hestrin und Schramm, 1954]. Die eingesetzte Glucose wird bis zu 40% maximaler Ausbeute in Cellulose-Produkt umgewandelt [Klemm et al., 2001].

AX produziert extrazellulär Cellulose (Abb. 1). Die Cellulosesynthase-Enzymkomplexe sind an der Cytoplasma-Membran der Zelle lokalisiert, sie nehmen aus dem Zellinneren die Substrate auf und geben nach außen Cellulosestränge ab. Die Polymerisation der Cellulose erfolgt unidirektional, aus diesem Grund bildet AX normalerweise die polymorphe Form Cellulose I, die durch parallel angeordnete Ketten gekennzeichnet ist. Dabei werden die naszierenden Moleküle eines Enzymkomplexes zu Mikrofibrillen zusammengefaßt. Mehrere gleichzeitig ausgeschiedene Mikrofibrillen verschiedener Enzymkomplexe einer Zelle vereinigen sich bei Rotation und Translation der Zelle zu Cellulosefasern mit einer Breite von ca. 40 bis 60 nm. [Haigler und Benziman, 1982]

Die Cellulosesynthase-Enzyme werden interessanterweise noch vor der Zellteilung dupliziert, wodurch jede Tochterzelle sofort mit dem vollständigen Zubehör zur Cellulose-Produktion ausgestattet ist [Brown et al., 1976]. Es werden mehrere verschiedene Wege für die Cellulose-Biosynthese diskutiert, letztendlich ist das Substrat für die Cellulosesynthase aber UDP-Glucose, in welche die zur Verfügung stehende C-Quelle zunächst umgewandelt werden muß [Ross et al., 1987].

Die Kristallisation der Cellulosefasern erfolgt nach der Polymerisation außerhalb der Zelle. Innerhalb der Fasern sind die Moleküle über Wasserstoff-Brückenbindungen miteinander vernetzt, wodurch die inneren hydrophilen Gruppen maskiert sind und das Polysaccharid wasserunlöslich ist. [Pilz, 2001] Bei Entstehung in wäßrigem Medium sind die Fasern außen jedoch von Wasserschichten umhüllt. Dieses Wasser kann sogar außerordentlich gut zurückgehalten werden [Klemm et al., 2003]. Erst bei Trocknung kommt es zur irreversiblen Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Fasern [Colvin und Leppard, 1977].

Da sich die aktiven Bakterien in einer flüssigen Standkultur immer in Sauerstoffnähe und damit an der Oberfläche der Flüssigkeit aufhalten, wird das Cellulose-Vlies schichtweise hergestellt, und zwar so, daß die oberste, horizontale Cellulose-Schicht die jüngste, aktuellste ist. Mittels Rasterelektronenmikroskopie läßt sich diese planare Orientierung ausgezeichnet erkennen. Die Schichten sind mehr oder weniger stark miteinander vernetzt. In einer solchen Schicht-Ebene wird ein ultrafeines Netzwerk errichtet, wobei eine Zelle eine Cellulosefaser mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 nm pro Minute produziert. Die Faserlänge liegt bei etwa 10 µm. [Yamanaka und Watanabe, 1994] Die Verdopplungszeit einer AX-Zelle in statischer Kultur wird mit 8 - 10 h angegeben

[Cannon und Anderson, 1991]. Der Polymerisationsgrad (DP) variiert in der Literatur von 2000 - 12700 [Salmon und Hudson, 1997; Yamanaka und Watanabe, 1994].

Im Gegensatz zur Pflanzencellulose ist Bakteriencellulose ausgezeichnet durch ihre hohe Kristallinität und Reinheit (frei von anderen biogenen Begleitprodukten wie Hemicellulosen und Lignin), eine hohe mechanische Belastbarkeit in nassem Zustand und ein großes Wasserrückhaltevermögen [White und Brown, 1989; Brown, 1992]. Aufgrund der sehr guten Biokompatibilität eignet sich das Material bspw. hervorragend als Schutzauflage bei der Wundheilung (BioFill) [Fontana et al., 1990]. Formt man BC während der Kultivierung zu Hohlkörpern, läßt sich BACTERIAL SYNTHESIZED CELLULOSE (BASYS) als Blutgefäß-Ersatz verwenden. Die geringe innere Oberflächenrauigkeit dieser Implantate sowie die komplette Vitalisierung von BASYS in Experimenten an Ratten demonstrieren das hohe Potential der BC als Biomaterial für medizinische Anwendungen. [Klemm et al., 2001]

Besonders die guten akustischen Eigenschaften von getrockneter BC dienen der Anwendung als Audiokopfhörer-Diaphragma für SONY. So läßt sich ein qualitativ besserer Sound reproduzieren als mit konventionellen Kopfhörermembranen. [Yamanaka und Watanabe, 1994] Auf der Grundlage von BC wurden Filter entwickelt, die sich nicht nur zur Ultrafiltration, sondern auch für Membranseparationstechniken eignen, z.B. für die Trennung von wäßrigen Ethanol-Lösungen durch Verdunstung [Takai et al., 1991] oder zur Klärung von Fruchtsäften [Krystynowicz et al., 2000]. Auch als diätischer Zusatzstoff in der Lebensmittelindustrie ist Bakteriencellulose im Gebrauch, wie als Nata auf den Philippinen [White und Brown, 1989].

1.2 Synthesestrategien zur Herstellung von Bakteriencellulose

Während sich die Gestaltungsmöglichkeiten einer einfachen chemischen Synthesereaktion auf die Wahl der Ausgangsstoffe, ihres Stoffmengenverhältnisses, des Lösungsmittels, eines Katalysators, der Temperatur und der Reaktionsdauer beschränken (Abb. 2a), finden sich bei der Durchführung einer Biosynthese zahlreiche Variationsmöglichkeiten, selbst wenn nur ein einziges Produkt (BC) erhalten werden soll und die Bakterienspezies (AX) vorgegeben ist (Abb. 2b).

Das Nährmedium stellt die Lebensgrundlage für die Bakterien dar, hier sollten alle lebensnotwendigen Bestandteile sowie der Ausgangsstoff zur Cellulose-Produktion enthalten sein. Innerhalb dieses Rahmens bestehen aber eine ganze Reihe von Zusammensetzungsmöglichkeiten, damit verbunden auch pH- und Konzentrations-Spielräume. Neben Glucose als C-Quelle werden z.B. auch Fructose, Mannitol, Galactose, Glycerin, Saccharose oder Cellobiose zur Cellulose-Bildung verwendet [Hibbert und Barsha, 1931; Barsha und Hibbert, 1934; Shirk und Greathouse, 1952]. Das Produkt bleibt immer Cellulose, chemisch (molekulare Struktur) völlig identisch mit der

Pflanzencellulose, aber die verschiedenen Ausgangsstoffe führen allein schon zu großen Schwankungen in der BC-Ausbeute [Jonas und Farah, 1998]. Offen bleibt allerdings die Frage nach dem Einfluß auf die supramolekulare Struktur des Cellulosenetzwerkes.

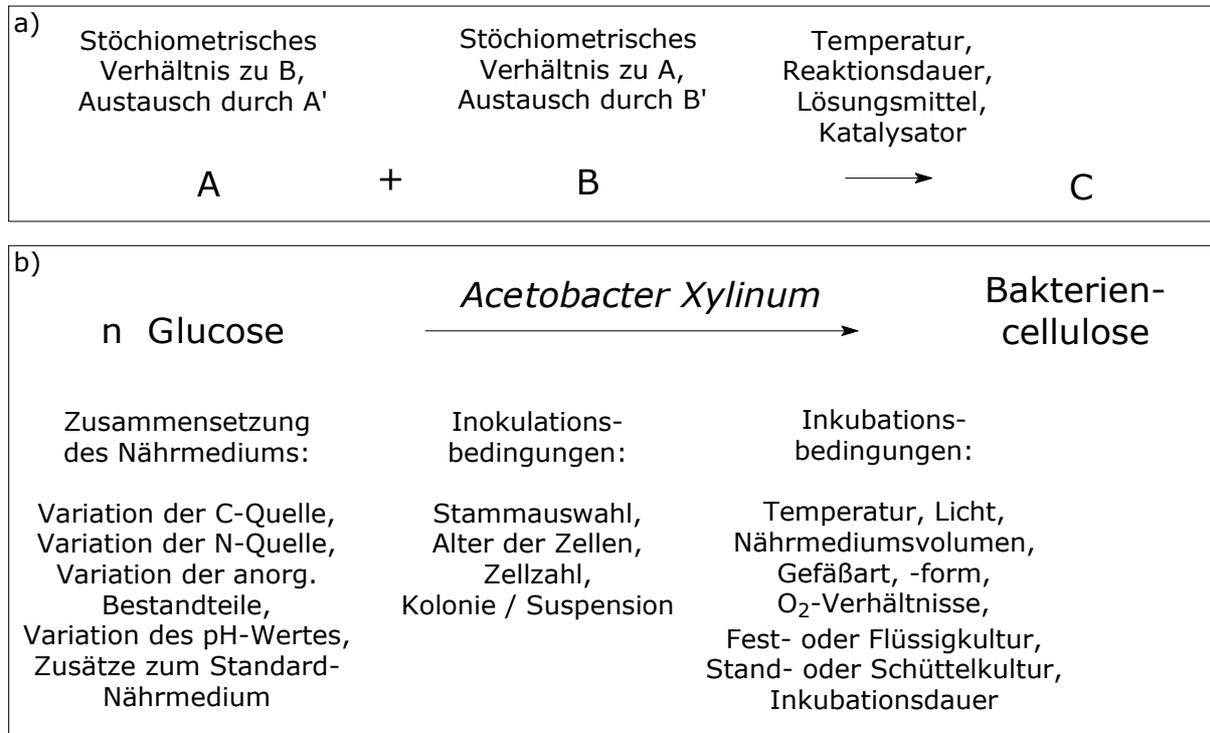


Abb. 2: Schema für Synthesestrategien und Gestaltungsmöglichkeiten von
 a) einer einfachen modellhaften chemischen Reaktion bzw.
 b) einer Biosynthese von Bakteriencellulose

Zudem kann man der Nährlösung auch Additive zusetzen. So wirken sich Carboxymethylcellulose (CMC) oder Methylcellulose (MC) offensichtlich auf die Aggregation und die Kristallisation der Cellulosefibrillen aus [Ben-Hayyim und Ohad, 1965; Yamamoto und Horii, 1994; Yamamoto et al., 1996]. Diese wasserlöslichen Polymere CMC bzw. MC werden in das BC-Gerüst bis zu 30% (m/m) mit eingelagert [Takai et al., 1991], und die Produkte haben eine erhöhte Wasseradsorptionsfähigkeit [Brown, 1990]. Solche BC-CMC-Komposite besitzen eine größere spezifische Adsorptionskapazität für Blei-Ionen, verglichen mit reiner BC bzw. CMC [Sakairi et al., 1998; Tokura et al., 1998]. Während BC-CMC komplett durch Cellulasen abbaubar ist, wird BC-MC nur zu 20-40% biologisch abgebaut [Tajima et al., 1995]. Setzt man dem Nährmedium das wasserlösliche Polymer Polyvinylalkohol (PVA) zu, kann man in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad des PVA Vliese mit unterschiedlicher Morphologie erhalten, wobei aber der Grund noch ungeklärt ist [Kai und Kobayashi, 1992]. Da unterschiedliche *Acetobacter*-Stämme auf abgeänderte Nährmedien ganz verschieden in

ihrer Produktbildung reagieren [Bonusfield et al., 1947; Masaoka et al., 1993; Tanaka et al., 1998], ist es von großer Wichtigkeit, detailliert zu untersuchen, wie sich der AX-Stamm des Institutes für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie (IOMC) der Universität Jena AX5 in Gegenwart solcher Zusätze verhält bzw. welche strukturellen Eigenschaften dann sein Cellulose-Geflecht besitzt. Gerade vor dem Hintergrund der BASYC-Röhrchen wäre es von großem Vorteil, die Material-Struktur gezielt modifizieren zu können.

Neben der Zusammensetzung des Nährmediums sind die Inokulationsbedingungen von Bedeutung. Damit sind die Auswahl eines AX-Stammes, die Art des Inokulums (Zell-Kolonie von einer Agar-Platte oder Zell-Suspension aus einer Vorkulturlösung), die Zellzahl sowie das Alter der Zellen gemeint. Auch hier ergeben sich etliche Kombinationsmöglichkeiten, die einen Einfluß auf Cellulose-Ausbeute, Vliesdicke und Netzwerkstruktur ausüben.

Eine weitere Stellschraube sind die Inkubationsbedingungen. Dazu zählen alle äußeren Einflüsse auf eine Bakterienkultur während der Kultivierung, d.h. während der Cellulose-Biosynthese. Temperatur-, Licht- und Sauerstoff-Verhältnisse, Inkubationsdauer, Nährmediumsvolumen und -zustand (fest oder flüssig) sind ganz entscheidende Faktoren. Ebenso haben das Material und die Form des Kulturgefäßes sowie eine mögliche Bewegung (statische, geschüttelte oder rotierte Kultur) und Bewegungsgrad einen enormen Einfluß auf die Morphologie der gebildeten Cellulose.

Die genannten Variationsmöglichkeiten der Rahmenbedingungen bei der Kultivierung von AX zur Biosynthese von Cellulose (Abb. 2b) haben jeweils Konsequenzen für den Phänotyp des Mikroorganismus und damit für die Produkt-Synthese. Aber die einzelnen Elemente beeinflussen sich in ihrer Wirkung auch gegenseitig. Um den Effekt eines Faktors zu untersuchen, müssen die anderen Faktoren unbedingt konstant gehalten werden. Hierin liegen die Herausforderungen beim Arbeiten mit biologischem Material: Organisation, Arbeitshygiene, Präzision. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nachzuweisen, sollten immer Standard-Kultivierungen mitgeführt und auf Analogie kontrolliert werden. So können Veränderungen einer ganzen Probencharge, die nicht auf den Einfluß des zu untersuchenden Faktors zurückzuführen sind, erkannt und die fehlerbehaftete Serie gegebenenfalls ausgemustert werden.

In der vorliegenden Arbeit soll die Steuerbarkeit der BC-Struktur über die Komposition des Nährmediums untersucht werden. Bis auf die variable Nährlösung müssen alle anderen Kultivierungsbedingungen, gerade auch in zeitlich versetzten Chargen, gleich bleiben und Arbeitsprozesse standardisiert und routiniert ablaufen.

Ganz ähnlich wie in der klassischen Synthesechemie, bei der man z.B. einen speziellen Farbstoff, einen Katalysator oder ein Medikament sucht, sind die Motive für diese Arbeit, differenzierte Bakterienzellulosen zu entwickeln für neuartige oder bestehende

Anwendungen. Aufgrund der positiven Resonanz der Medizin und der Industrie auf dieses Material ist es von großer Bedeutung, die Struktur der BC methodisch modifizieren zu können, um sie den Anforderungen an einen bestimmten Einsatz bestmöglich anzupassen.

Im Falle einer modellhaften chemischen Reaktion erhält man ein Molekül, dessen Struktur sich mit 2 - 3 Analysenmethoden nachweisen läßt. Daraufhin kann man es geeigneten Tests für seine Zwecktauglichkeit unterziehen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der bakteriell synthetisierten Cellulose um ein komplexes, kompaktes Material. Um ein ganzheitliches Bild der Struktur zu erhalten, sind sehr viele Analysenmethoden notwendig (Abb. 3).

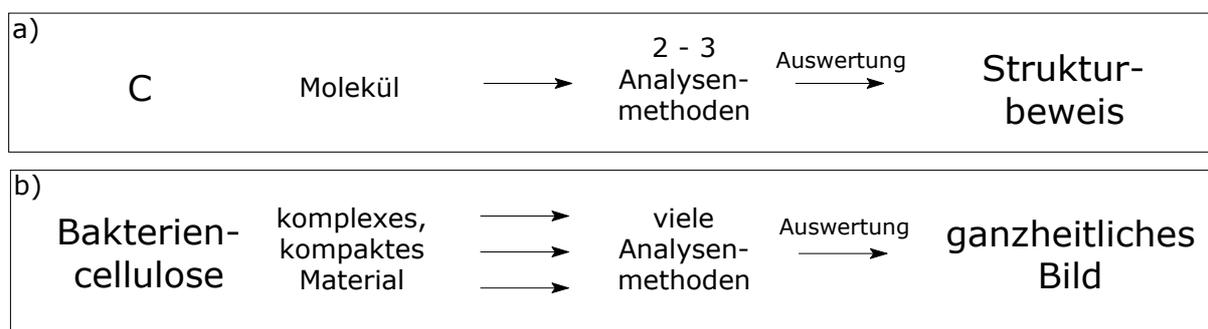


Abb. 3: Darstellung der prinzipiellen Unterschiede nach der Isolierung und Reinigung von
a) einem Produkt C einer chemischen Reaktion bzw.
b) Bakteriencellulose

Erst mit Kenntnis der Unterschiede eines modifizierten Produkts gegenüber einer Standard-BC läßt sich der konkrete Einfluß eines bestimmten veränderlichen Faktors bei ansonsten konstanten Kultivierungsbedingungen feststellen.

1.3 Konzept und Aufgabenstellung

Aufgrund der Vielzahl der Variationsmöglichkeiten in den Kultivierungsbedingungen bei der bakteriellen Synthese von Cellulose mittels *Acetobacter xylinum*, ist es sinnvoll, ein Konzept vorzulegen, mit dem man die Struktur und andere Merkmale der Bakteriencellulose (BC) des Stammes AX5 des IOMC der Universität Jena gezielt modifizieren kann. Gesucht ist eine Übersicht von Ursache und Wirkung, um Zusammenhänge zwischen den zahllosen Kultivierungsparametern und Produkt-Eigenschaften zu verstehen, zu definieren und zu reproduzieren.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit soll dabei der Einfluß der Zusammenstellung des Nährmediums auf die BC-Charakteristik stehen. Als Vergleichsstandard wird die BC, die im herkömmlichen Hestrin-Schramm-Medium synthetisiert wird, festgelegt.

Die Veränderung der Komposition des Nährmediums wird in zwei Bereiche gegliedert:

- Variation der C-Quellen-Zusammensetzung im HS-Medium.
D-Glucose wird sukzessive gegen Glycerin bzw. D-Glucuronsäure (als Na-Salz und als freie Säure) ausgetauscht. Glycerin wurde als ein in der Fachliteratur erwähnter Vertreter der alternativen C-Quellen für AX gewählt. Die Verwertung von D-Glucuronsäure durch AX ist dagegen noch nicht genannt worden.
- Addition von wasserlöslichen Polymeren zum HS-Medium.
Dem HS-Medium werden CMC, MC bzw. PVA in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Diese Additive wurden bei der Kultivierung anderer AX-Stämme schon erfolgreich eingesetzt und sind in der Fachliteratur bekannt.

Auf der Grundlage dieser beiden Herstellungsprinzipien soll der AX5-Stamm des IOMC der Universität Jena in statischer Flüssigkultur bei 28°C bebrütet werden. Die BC-Vliese werden nach Ablauf der Kultivierungsdauer geerntet, gewaschen und nach geeigneter Probenvorbereitung verschiedenen Analysenmethoden zugeführt. Hier muß besonders die Aufmerksamkeit auf strukturelle oder andere charakteristische Unterschiede der neuen Produkte gegenüber Standard-BC gerichtet werden.

Es kommen folgende Untersuchungen zur Anwendung:

- Ausbeute der Produkte,
- Elementaranalyse,
- Festkörper-¹³C-NMR-Spektroskopie,
- IR-Spektroskopie,
- HPLC-Chromatographie,
- GPC,
- REM,
- Physisorption,
- Wasserkapazität,
- Zug- und Reißfestigkeit.

Differenzen in den Produkt-Merkmalen, die sich in Abhängigkeit von der Zusammenstellung des Nährmediums ergeben, sollen klar formuliert werden, um die entsprechenden Kultivierungsbedingungen bestimmten BC-Kriterien zuordnen zu können. So ist ein Katalog von Herstellungsvorschriften für ein reproduzierbares Design von BC-Strukturen zu erstellen. Außerdem sollen die Auswirkungen der Komposition der Nährlösung auf die Struktur der Bakterienzellulose im Zusammenspiel mit den übrigen Eigenschaften gesehen werden, um die kausalen Zusammenhänge besser verstehen zu können.

2 Aufbau der Bakteriencellulose-Vliese

2.1 Zusammenstellung des Nährmediums und Kultivierungsbedingungen

Als Standard-Kultivierungsbedingungen für alle Proben gelten folgende Parameter:

- Inkubation bei 28°C,
- in Weithals-Erlenmeyerkolben (Größe: 100 ml, Bodendurchmesser: 6 cm, Borosilikatglas),
- wässrige Flüssigkultur,
- mit reißfester Aluminium-Folie abgeschlossene Standkultur,
- Stamm AX5 der Stammsammlung des Institutes für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Universität Jena, erhalten aus der Stammsammlung des Institutes für Biotechnologie Leipzig (Prof. Dr. H.-P. Schmauder),
- Inokulum als Zellsuspension aus einer flüssigen Vorkulturlösung.

Das HS-Standard-Nährmedium besteht aus folgenden Komponenten:

- 20 g/l D-Glucose (anhydrous),
- 3,4 g/l Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H₂O,
- 1,15 g/l Zitronensäure · H₂O,
- 5 g/l Hefeextrakt,
- 5 g/l Bactopepton.

Ebenfalls einheitlich für alle Proben sind die nachstehenden Arbeitsschritte:

Die vorbereiteten Nährlösungen in den Erlenmeyer-Kolben werden sterilisiert, um Fremdkeime auszuschließen. An einem Reinraumarbeitsplatz werden unter sterilen Bedingungen die Nährlösungen mit einer Zellsuspension aus einer Vorkulturlösung (s. 2.3) beimpft und dicht verschlossen. Damit alle Ansätze einer Reihe mit der gleichen Zellkonzentration inokuliert werden, wird das BC-Vlies auf der Vorkulturlösung ausgedrückt, um die Zellen in die Lösung zu bringen, und anschließend aus dem Gefäß entfernt. Anschließend werden die Kulturen in einem Inkubationsschrank bzw. unter einer Inkubationshaube bebrütet. Nach Ablauf der Inkubationsdauer werden die BC-Proben sterilisiert, wobei die AX-Bakterien abgetötet werden. Die Vliese werden nach einer standardisierten Wasch-Prozedur von den Zellen und restlichen Nährlösungsbestandteilen befreit. Daraufhin können sie für ihre spezielle Analyse vorbereitet werden.

Die Gesamtheit der BC-Proben, die entwickelt wurden, lassen sich nach dem Herstellungsprinzip in zwei Gruppen einteilen. Einerseits läßt sich die Struktur-Modifizierung durch eine Variation der C-Quelle im Standard-Medium steuern, andererseits über den Zusatz von Additiven zum Standard-Medium.

2.1.1 Variation der C-Quellen-Zusammensetzung

Die molare Konzentration an D-Glucose im Standard-Medium ist 0,111 mol/l. Da ein Glucose-Molekül 6 C-Atome besitzt, liegen 0,666 mol/l C-Atome an C-Quelle vor. Diese C-Atom-Konzentration wird als 100% festgelegt. Nun wurden Reihen angefertigt, in denen die C-Quelle variiert wird, d.h. Glucose wird sukzessive gegen eine andere C-Quelle unter Berücksichtigung der C-Atom-Äquivalenz ausgewechselt. Es liegt in jedem Variationsversuch eine Gesamt-C-Atom-Konzentration der C-Quelle von 0,666 mol/l vor. Aus Abb. 4 sind der generelle Aufbau einer Reihe aus maximal 5 unterschiedlichen Ansätzen (fettgedruckt), die eingesetzten alternativen C-Quellen, die sich daraus ergebenen Proben und deren Bezeichnungen zu entnehmen.

D-Glucose	100%	75%	50%	25%	0%
alternative C-Quelle	0%	25%	50%	75%	100%
Glycerin	St(a)	12	13	14	15
D-Glucuronsäure Na-Salz	St(a)	22	23		
D-Glucuronsäure	St(a)	32	33		

Abb. 4: C-Quellen-Zusammensetzung des Nährmediums (fettgedruckt), alternative C-Quelle sowie Probenbezeichnungen

Für alle Ansätze, die durch Variation der C-Quelle entstanden sind, gelten zu den generellen Kultivierungsstandards (s. 2.1) uneingeschränkt die folgenden Bedingungen:

- Nährlösungsvolumen: 25 ml,
- Standard-Medium mit Variation der C-Quelle (s. Abb.4),
- Inokulum: 0,5 ml Zellsuspension aus Vorkulturlösung,
- Vorkulturlösung:
250 ml Weithals-Erlenmeyerkolben, 80 ml Nährlösung, 10 Tage inkubiert,
- Inkubationsdauer: 3 Wochen (504 ± 3 h),
- Ernte der Vliese und Sterilisation in entionisiertem Wasser.

Alle Arbeitsschritte der Probenvorbereitung und -waschung entsprechen den in Abschnitt 2.1 angeführten (bzw. 8.2).

Von allen Proben wurden Elementaranalysen und IR-Spektren angefertigt. Dabei konnte das Material in jedem Fall als Cellulose identifiziert werden. Gelegentlich hafteten den Vliesen geringe Gehalte an Stickstoff an, die auf Reste der Nährlösung bzw. Zellbestandteile zurückzuführen sind, die bei der für das Standard-Produkt optimierten Waschprozedur nicht entfernt worden sind.

2.1.2 Gegenwart von Additiven

Um eine zweite Möglichkeit zur Modifizierung der Struktur der Bakteriencellulose zu untersuchen, wurde AX im Standard-Medium (100% D-Glucose) in Gegenwart von Zusätzen kultiviert. Diese Additive sind die wasserlöslichen Polymere (WSP) CMC, MC bzw. PVA. In Abb. 5 sind die allgemeine Aufstellung einer Reihe, bestehend aus 4 unterschiedlichen Ansätzen (fettgedruckt), die eingesetzten Additive, die so synthetisierten BC-Proben und ihre Bezeichnungen dargestellt.

D-Glucose	100%	100%	100%	100%
Additiv (m/V)	+ 0%	+ 0,5%	+ 1,0%	+ 2,0%

CMC	St(b)	42	43	44
MC	St(b)	52	53	54
PVA	St(b)	62	63	64

Abb. 5: Anteil der Additive zum Standard-Medium (fettgedruckt), verwendete Additive und Probenbezeichnungen

Für sämtliche Proben, die in Gegenwart von Additiven hergestellt worden sind, gelten außer den generellen Kultivierungsbedingungen (s. 2.1) die folgenden Parameter:

- Nährlösungsvolumen: 30 ml,
- Standard-Medium plus Additiv (s. Abb.5),
- Inokulum: 1 ml Zellsuspension aus Vorkulturlösung,
- Vorkulturlösung:
100 ml Weithals-Erlenmeyerkolben, 30 ml Nährlösung, 7 Tage inkubiert,
- Inkubationsdauer: 2 Wochen (336 ± 3 h),
- Sterilisation in Kulturlösung, dann Überführung der Vliese in entionisiertes Wasser.

Alle übrigen Arbeitsprozeduren für die Herstellung der Vliese in Anwesenheit von Additiven sind identisch mit denen durch Variation der C-Quelle (s. 2.1 bzw. 8.2).

Von sämtlichen Proben wurden Elementaranalysen und IR-Spektren gemacht. Dabei konnte gesichert werden, daß es sich bei jedem Produkt um Cellulose handelt. Für das Standard-Vlies St(b) konnte kein Stickstoff durch die Elementaranalyse detektiert werden. Das bedeutet, daß das angewendete Reinigungsverfahren Proteinreste aus der Nährlösung und den AX-Zellen komplett (oberhalb der Nachweisgrenze) entfernt. Alle Proben der CMC-, MC- und PVA-Serien enthielten Stickstoff zwischen 0,11 und 0,55%. Das deutet darauf hin, daß die WSP-Additive ein Zurückhalten der Proteinreste während der standardisierten Waschung bewirken.

2.2 Einfluß der Zusammenstellung des Nährmediums auf die Ausbeute der Vliese

Die produzierte St(a)-Masse von 165,3 mg entspricht einer Molmenge von 1,020 mmol AGU (Anhydro Glucose Unit – Monomer der Cellulose). Das bedeutet für die Kontrollprobe St(a), daß im HS-Standard-Medium und unter den Kultivierungsbedingungen von 2.1.1 36,76% der angebotenen Glucose zur Biosynthese von Bakteriencellulose genutzt werden. Das stimmt in etwa mit den Literatur-Angaben überein, die bei Kultivierung in optimaler Nährlösung (HS-Medium) von einer maximalen Glucose-Ausbeute von ca. 40% ausgehen [Klemm et al., 2001]. Die restliche Glucose wird verstoffwechselt und z.B. zur Energie-Gewinnung genutzt, sie ist nach ca. 10 Tagen nicht mehr in nennenswerten Mengen in der Nährlösung nachzuweisen.

Aus Tab. 1 sind die Massen der Bakteriencellulose-Vliese in Abhängigkeit der C-Quellen-Zusammensetzung der Nährlösung zu entnehmen. Der angegebene Mittelwert \bar{m} für die Kontrollprobe St(a) wurde von 10 getrockneten Vliesen (n=10) aus verschiedenen Chargen gemittelt. Die übrigen Mittelwerte errechnen sich aus jeweils 4 Vliesen (n=4) unterschiedlicher Chargen. Der Berechnung der Standardabweichung s liegt folgende Formel zugrunde:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (m_i - \bar{m})^2}{n-1}} .$$

Die Relative Standardabweichung RSA gibt das Verhältnis von s zum Mittelwert der Masse \bar{m} an. Außerdem wurde die Ausbeute bestimmt, indem die durchschnittliche Masse der Vliese einer Probensorte zum Standard-Vlies St(a) in Beziehung gesetzt worden ist.

Tab.1: Ausbeute-Unterschiede der BC-Vliese durch Variation der C-Quelle

Probenbezeichnung	St(a)	12	13	14	15	22	23	32	33
Mittelwert der Masse \bar{m} [mg]	165,3	165,3	178,8	191	182,5	134,8	90,5	119,5	12,75
Standardabweichung s [mg]	9,74	6,65	7,18	12,00	16,22	5,12	3,51	6,66	1,26
Relative Standardabweichung RSA [%]	5,89	4,02	4,02	6,28	8,89	3,8	3,88	5,57	9,88
Ausbeute in Bezug auf St(a) [%]	100	100	108	116	110	82	55	72	8
Empirischer Wert \hat{t}		0,009	2,479	4,196	2,484	5,854	14,665	8,534	(30,47)
Vergleich von \hat{t} mit t = 3,05		$\hat{t} < t$	$\hat{t} < t$	$\hat{t} > t$	$\hat{t} < t$	$\hat{t} > t$	$\hat{t} > t$	$\hat{t} > t$	$(\hat{t} > t)$

Mit einem t-Test für unabhängige Stichproben [<http://www.emp.tsak.net>] wurde der Unterschied zwischen den jeweiligen Probenmassen \bar{m}_{Pr} und der Standardmasse $\bar{m}_{St(a)}$ auf Signifikanz getestet. Geprüft wird die Alternativhypothese

$$\bar{m}_{Pr} \neq \bar{m}_{St(a)} .$$

Dazu wurde die Differenz der Mittelwerte zur Streuung der Werte in den beiden zu vergleichenden Reihen in Relation gesetzt:

$$\hat{t} = \frac{|\bar{m}_{St(a)} - \bar{m}_{Pr}|}{\sigma} .$$

Ein Maß für die Streuung beider Reihen ist der Standardfehler der Differenzen der Mittelwerte σ :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{St(a)}=10} (m_{i,St(a)} - \bar{m}_{St(a)})^2 + \sum_{i=1}^{n_{Pr}=4} (m_{i,Pr} - \bar{m}_{Pr})^2}{(n_{St(a)} - 1) + (n_{Pr} - 1)} \left(\frac{1}{n_{St(a)}} + \frac{1}{n_{Pr}} \right)} .$$

Anschließend wird der empirische Wert \hat{t} mit dem kritischen Wert t verglichen (Tab.1). Bei einer Wahrscheinlichkeit von 0,99 und einer zweiseitigen Fragestellung (\bar{m}_{Pr} kann größer oder kleiner als $\bar{m}_{St(a)}$ sein) gilt für 12 Freiheitsgrade ($n_{St(a)} + n_{Pr} - 2$):

$$t(0,99; 12) = 3,05.$$

Die Alternativhypothese ist bewiesen, wenn $\hat{t} > t$, sie ist abzulehnen, falls $\hat{t} < t$.

Eine andere Methode zum Vergleich zweier Mittelwerte auf signifikanten Unterschied ist der Welch-Test, der insbesondere angewendet wird, wenn sich die Standardabweichungen $s_{St(a)}$ und s_{Pr} signifikant unterscheiden. Dieser Fall liegt für die Probe 33 vor, wie aus dem F-Test hervorgeht [Krause und Metzler, 1984]. Für den Welch-Test errechnet sich die Testgröße TG folgendermaßen:

$$TG = \frac{|\bar{m}_{St(a)} - \bar{m}_{Pr}|}{\sigma^*} , \text{ wobei}$$

$$\sigma^* = \sqrt{\frac{s_{St(a)}^2}{n_{St(a)}} + \frac{s_{Pr}^2}{n_{Pr}}} .$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade FG für den Tabellenwert $T(0,99; FG)$ berechnet sich nach

$$FG = \frac{\left(\frac{s^2_{St(a)}}{n_{St(a)}} + \frac{s^2_{Pr}}{n_{Pr}} \right)^2}{\frac{\left(s^2_{St(a)} / n_{St(a)} \right)^2}{n_{St(a)} - 1} + \frac{\left(s^2_{Pr} / n_{Pr} \right)^2}{n_{Pr} - 1}}$$

Für die Probe 33 ergibt sich σ^* zu 3,144 und damit TG zu 48,521. Mit $FG = 9,72 \approx 10$ Freiheitsgraden, zweiseitiger Fragestellung und einer Wahrscheinlichkeit von 0,99 beträgt $T = 3,17$. Da $TG > T$, gilt die Alternativhypothese auch für die Probe 33 als bestätigt.

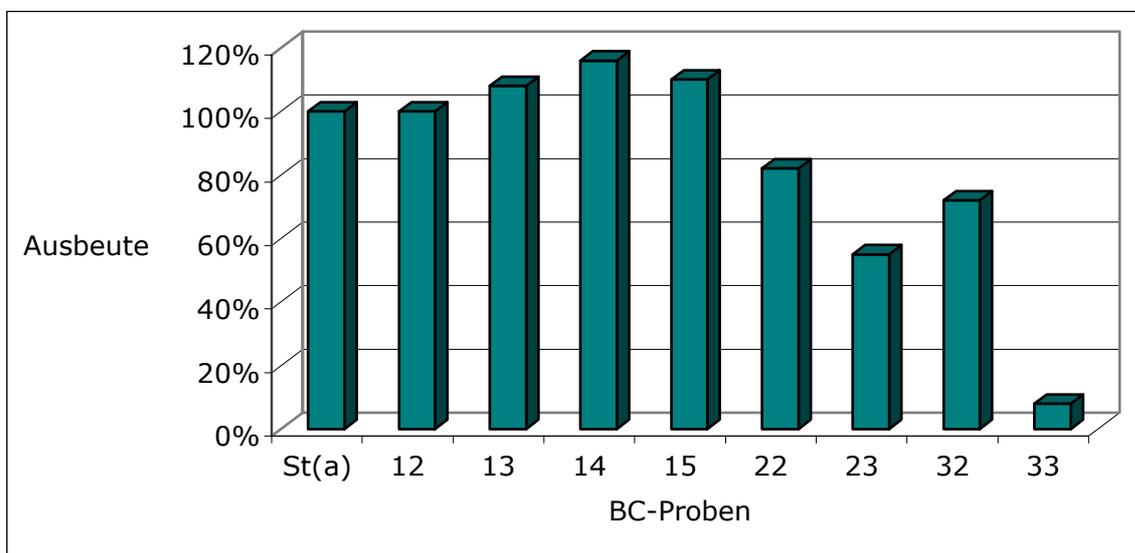


Abb. 6: Einfluß der C-Quellen-Zusammensetzung auf die Ausbeute im Vergleich zu St(a)

In Abb. 6 wurde die durchschnittliche Probenmasse in Relation zur Masse des Standardvlieses (wobei $\bar{m}_{St(a)} = 100\%$) aufgetragen, um den Einfluß der C-Quellen-Zusammensetzung auf die Ausbeute graphisch darzustellen. Es ist ersichtlich, daß der Ersatz von mindestens 50% D-Glucose durch Glycerin im Nährmedium die Produktausbeute prinzipiell steigert. Mit einer statistischen Sicherheit von 99% wird eine signifikant höhere BC-Masse bei einer C-Quellen-Zusammensetzung von 25% D-Glucose und 75% Glycerin (Probe 14) erreicht.

Aus Ansatz 15 (100% Glycerin als C-Quelle) werden im Vergleich zu St(a) 110% BC synthetisiert. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß der AX-Stamm des Institutes für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Universität Jena in der Lage ist, Glycerin sowohl zur Energie-Gewinnung zu verwerten als auch in UDP-Glucose

umzuwandeln und Cellulose zu produzieren. Die BC-Bildung erfolgt erstaunlicherweise in höherer Quantität als aus der Literatur bekannt ist; hier sind nur 93% im Vergleich zur BC-Ausbeute aus Glucose angegeben [Masaoka et al., 1993].

Bei sukzessivem Austausch von D-Glucose durch D-Glucuronsäure als Na-Salz oder als freie Säure nimmt die BC-Ausbeute generell ab. Mit einer statistischen Sicherheit von 99% sind die Unterschiede der Probenmassen von 22, 23, 32 bzw. 33 im Vergleich zur Standardmasse von St(a) signifikant.

Bezieht man die Produktmenge auf die eingesetzte Menge an D-Glucose im Medium (Tab. 2), läßt sich feststellen, ob wenigstens die angebotene Glucose zu ca. 40% zur BC-Produktion verwertet wird. Hierbei wird deutlich, daß eine Anwesenheit von 50% D-Glucuronsäure (Probe 33) die Cellulose-Biosynthese beträchtlich hemmt.

Tab. 2: Berechnung der Ausbeute an BC, bezogen auf die Glucose-Anfangskonzentration

Probenbezeichnung	22	23	32	33
Menge an D-Glucose in 25 ml Nährlösung [mmol]	2,081	1,388	2,081	1,388
Mittelwert der BC-Masse \bar{m} [mg]	134,75	90,5	119,5	12,75
Menge an AGU im Produkt [mmol]	0,832	0,559	0,738	0,079
Verhältnis von AGU zu eingesetzter D-Glucose [%]	39,98	40,27	35,46	5,69

Während der pH-Wert durch kompletten Austausch von Glucose durch Glycerin im Nährmedium (Probe 15) auf pH = 6 steigt, sinkt er durch Austausch von 50% Glucose durch Glucuronsäure Na-Salz oder freie Säure (Proben 23 bzw. 33) auf pH = 4. Beide Werte liegen im pH-Toleranzbereich von AX.

In Tab. 3 sind die konkreten Unterschiede in den Herstellungsbedingungen der Standard-Vliese St(a) und St(b) gegenübergestellt. Auch für die Angaben von St(b) wurden 10 Vliese aus zeitlich versetzt hergestellten Chargen herangezogen, um gleichzeitig die Reproduzierbarkeit zu kontrollieren. So sind aus Tab. 3 der Mittelwert der Masse \bar{m} , die Standardabweichung s , die Relative Standardabweichung RSA sowie der prozentuale Verbrauch der zur Verfügung stehenden Glucose für Cellulose zu entnehmen.

Ob beide Standardabweichungen $s_{St(a)}$ und $s_{St(b)}$ der gleichen Grundgesamtheit angehören, wurde durch einen F-Test geprüft. Dafür wird \hat{F} mit F verglichen, wobei

$$\hat{F} = \frac{s_{St(b)}^2}{s_{St(a)}^2},$$

und $F(0,99; 9;9) = 5,35$. Da $\hat{F} < F$, ist diese Voraussetzung erfüllt, und der Unterschied der Massen kann mittels t-Test auf Signifikanz untersucht werden. Bei $\hat{t} = 13,9$ und $t(0,99; 18) = 2,88$ ist $\hat{t} > t$.

Bei ansonsten gleichen Voraussetzungen ergibt sich durch die genannten Abweichungen in der Herstellung für St(b) gegenüber St(a) eine signifikante Steigerung in der produzierten BC-Masse und trotz kürzerer Kultivierungszeit eine bessere Ausbeute der angebotenen Glucose (Tab. 3).

Tab. 3: Herstellungs- und daraus folgende Ausbeute-Unterschiede für St(a) und St(b)

Probe	St(a)	St(b)
Herstellung	25 ml HS-Nährlösung + 0,5 ml Zellsuspension Vorkultur: 80 ml Nährlösung, 10 Tage alt Inkubationsdauer: 504 h	30 ml HS-Nährlösung + 1,0 ml Zellsuspension Vorkultur: 30 ml Nährlösung, 7 Tage alt Inkubationsdauer: 336 h
Masse \bar{m} s und RSA	165,3 mg 9,74 mg (5,89%)	235,6 mg 12,66 mg (5,37%)
Verhältnis von AGU zu eingesetzter Glucose	36,76%	43,62%

Bei den BC-Produkten, die im HS-Nährmedium mit 100% D-Glucose in Gegenwart von Additiven entwickelt wurden, läßt sich ebenfalls die Masse in Relation zum Standard-Vlies St(b) angeben. Für die Berechnung wurden jeweils 4 Vliese einer Probensorte unterschiedlicher Chargen herangezogen.

Unabhängig von der zugegebenen Menge wurden durch Zusatz von CMC zur Nährlösung BC-Ausbeuten um 109% und von MC um 123% im Vergleich zu St(b) (100%) erreicht. In der Literatur wird dagegen explizit CMC als produktionsförderndes WSP genannt [Tajima, 1999]. Abhängig vom AX-Stamm kann MC höchstens als vergleichbar mit CMC hinsichtlich der Ausbeute gelten [Tajima et al., 1995]. Dies kommt hauptsächlich durch eine Einlagerung der Zusätze in das BC-Vlies zustande. In Anwesenheit von PVA wird dagegen offensichtlich die BC-Produktion von AX behindert, da Ausbeuten <100% erhalten wurden.

2.3 Stammpflege

Um den Stamm AX5 des Institutes für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Universität Jena für den Aufbau der Bakteriencellulose-Vliese für diese Arbeit ständig einsatzbereit zur Verfügung zu haben, wurde im vierzehn-tägigen Rhythmus eine Stammhaltung durchgeführt. Diese beinhaltet die Stammpflege in flüssiger Standkultur (5 ml HS-Nährlösung in einem Reagenzglas) im Wechsel mit Kultivierung auf festem Nährboden (20 ml HS-Nährmedium, versetzt mit Agar, in einer Petrischale). Ein vergrößerter Ausschnitt einer solchen Festkultur von AX ist in Abb. 7 abgebildet. Aus jeweils einer einzelnen Zelle, die im Ausstrichverfahren auf das Kulturmedium gebracht wird, entsteht eine Zellkolonie.



Abb. 7: Zellkolonien von AX - Vergrößerter Ausschnitt einer Festkultur nach 14 Tagen

Wird Zellmaterial zur Inokulation von Proben-Ansätzen benötigt, bringt man eine saubere, vereinzelt Kolonie unter sterilen Bedingungen in eine flüssige Standkultur (20 ml HS-Nährlösung im Erlenmeyerkolben). Nach 14 Tagen kann eine Vorkulturlösung von 80 ml (bzw. 30 ml) mit 4 ml (bzw. 1 ml) dieser Zellsuspension beimpft werden.

3 Einlagerung der Additive in die Bakteriencellulose

3.1 Ergebnisse der Festkörper-NMR-Spektroskopie

In Abb. 8 sind die ^{13}C -NMR-Spektren der vakuumgetrockneten BC-Vliese gezeigt, die durch Addition der wasserlöslichen Polymere CMC, MC bzw. PVA zur Nährlösung entstanden sind. Die Proben wurden mittels Kreuzpolarisation (CP) vermessen, wobei die CP-Experimente kontinuierlich ausgeführt worden sind, ohne die Bedingungen zu ändern. Die Differenzspektren sind das Resultat des aktuellen Spektrums abzüglich des Standard-BC-Spektrums St(b), um einen eventuellen Gehalt an WSP in den Vliesen zu detektieren.

Die Proben der BC-CMC-Serie zeigen ein übliches NMR-Spektrum von BC. Erst die Differenzspektren indizieren, daß ein geringer Anteil an CMC dem BC-Material anhaften könnte, obwohl der CMC-Peak bei 176 ppm in keinem BC-CMC-Spektrum aufgelöst werden konnte. Möglicherweise wurden die Signale in den Differenzspektren durch leichte Veränderungen in den CP-Bedingungen verursacht, die mit der allmählichen Probenkopf-Erwärmung bei der Messung einhergehen können. In diesem Fall sind die Intensitäten schwer zu vergleichen.

Im Spektrum von 52 ist ein Gehalt an MC zu beobachten (Peaks bei 85 und 61 ppm). Diese Signale werden bei höherer WSP-Addition intensiver. Außerdem ändert sich das C1-Signal. Es stellt sich die Frage, ob das auf eine Veränderung im Verhältnis von α - und β -Modifikation der Cellulose I zurückzuführen ist [Yamamoto und Horii, 1994] oder eher ein Signal der eingelagerten MC darstellt.

Im Falle der BC-PVA-Reihe lassen sich nur im Differenzspektrum 64 – St(b) geringe Mengen von PVA entdecken, die in das Vlies eingeschlossen sind. In den Proben 62 und 63 ist kein PVA detektierbar.

Es läßt sich also zusammenfassend sagen, daß ein Einbau von CMC in das BC-Gerüst mittels NMR-Spektroskopie nur unter Vorbehalt erkennbar ist, die Einlagerung von MC mit Erhöhung der angebotenen Konzentration aber eindeutig zunimmt und PVA nur bei Zusatz von 2,0% (m/V) zum Nährmedium im BC-Produkt nachzuweisen ist. [Seifert et al., 2004]

Einlagerung der Additive in die Bakteriencellulose

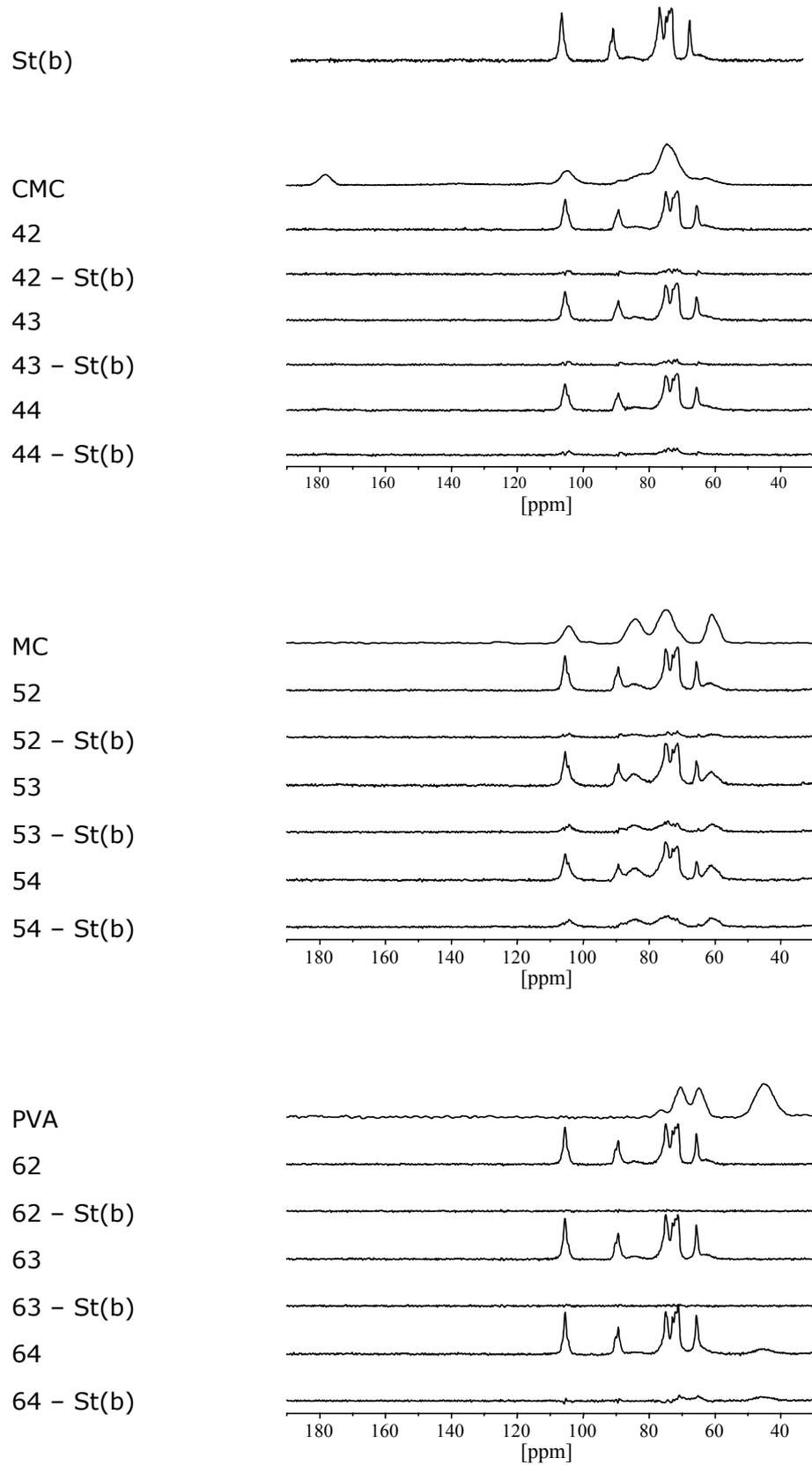


Abb. 8: Festkörper- ^{13}C -NMR-Spektren von vakuumgetrockneten BC-Vliesen, hergestellt in Gegenwart von Additiven, ihre Differenzspektren zur Standard-BC St(b) sowie Vergleichsspektren der Additive CMC, MC bzw. PVA

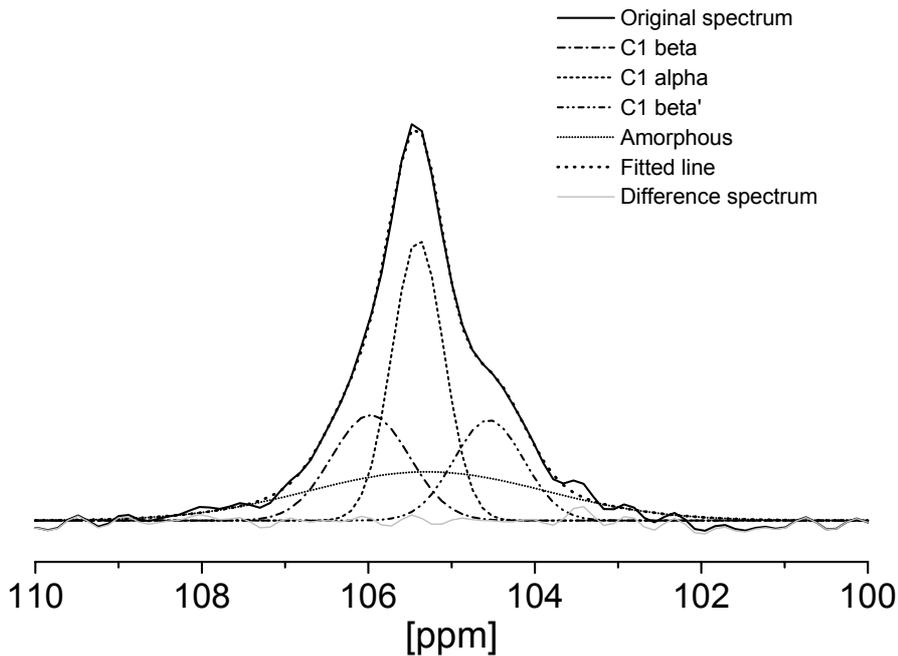


Abb. 9: Demonstration der C1-Resonanz-Zerlegung in Gauß-Linien für C1 α , C1 β , C1 β' und amorphe Teile

Cellulose kommt in den verschiedenen polymorphen Formen I, II, III und IV vor, wobei AX normalerweise Cellulose I produziert, die durch parallele, unidirektional angeordnete Ketten gekennzeichnet ist. Die reduzierenden Enden treten dabei zuerst aus der Zelle, der Cellulosesynthase-Enzymkomplex verknüpft jeweils das nichtreduzierende Ende eines Stranges mit einem weiteren freien Glucose-Molekül [Delmer, 1999]. Cellulose I läßt sich weiter in zwei allomorphe Formen aufteilen, nämlich in die trikline Kristallmodifikation I α und die monokline I β [Salmon und Hudson, 1997]. Die I α -Form dominiert bei den Cellulosen, die von Bakterien oder Algen gewonnen werden, wohingegen Pflanzen eher Cellulose I β bilden [Delmer, 1999]. Die kristallinen Anteile I α und I β innerhalb einer Probe können über die NMR-Spektroskopie ermittelt werden. Das C1-Signal bspw. ist ein Triplett aus einer I α -Zentrallinie und einem Dublett von zwei Seitenlinien mit annähernd gleicher Intensität entsprechend I β [Fink et al., 1997].

Um das Verhältnis I α / I β und den amorphen Anteil der Bakteriencellulosen zu ermitteln, wurden die C1- und C4-Positionen in verschiedene Gauß-Linien für C α (C α'), C β (C β') bzw. den amorphen Teil zerlegt (Abb. 9). Da die Experimente mittels Kreuzpolarisation ausgeführt worden sind, ohne die Bedingungen zu ändern, kann die CP-Stimulation von C α und C β als identisch angesehen werden. Der Grund ist ihre einheitliche ^1H -Umgebung, was eine Bestimmung der relativen Anteile von C α und C β mit einer hohen Wahrscheinlichkeit erlaubt. Die angepaßten Integralwerte wurden für jeden Anteil normiert, und die Ergebnisse für die CMC- und MC-Reihe sind in den Abb. 10 und 11 gezeigt.

Einlagerung der Additive in die Bakteriencellulose

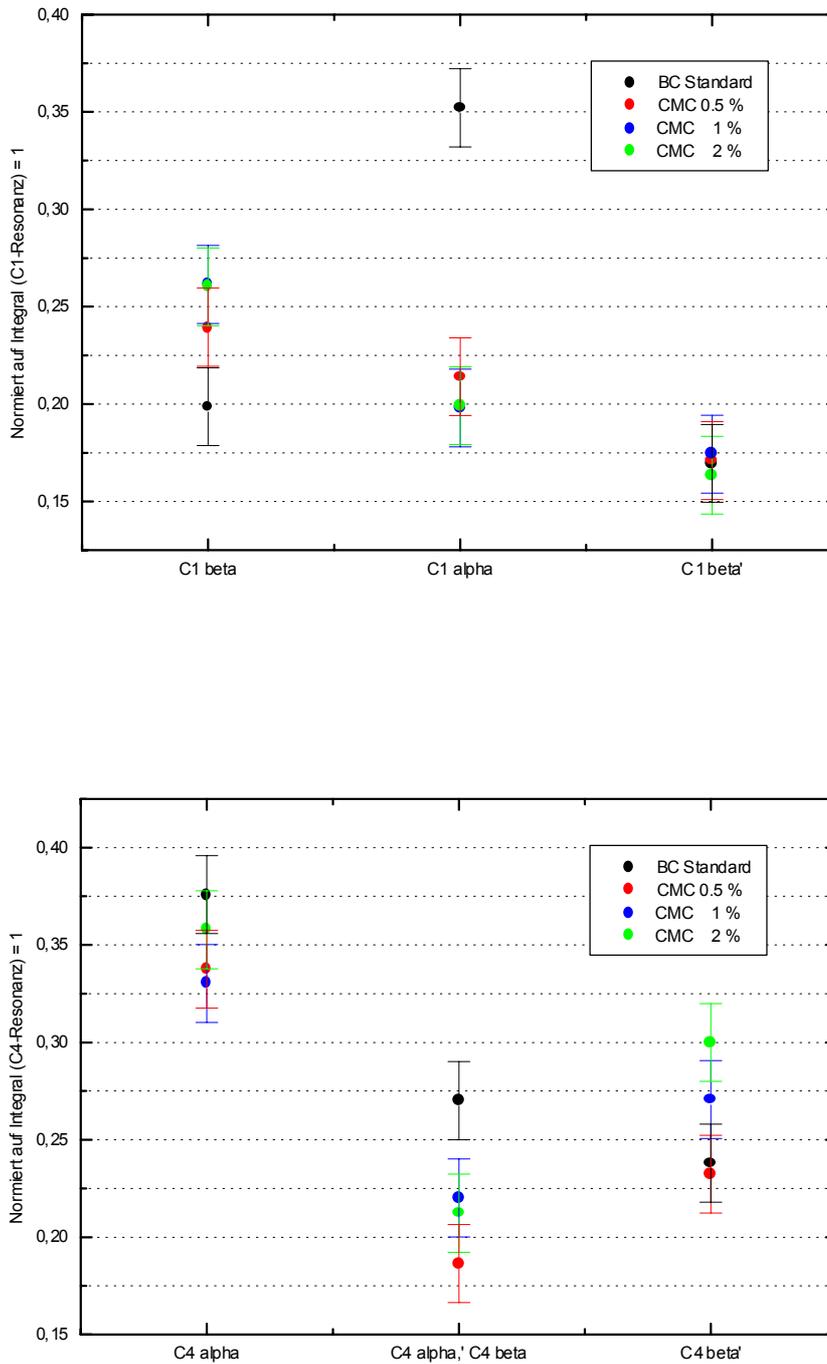


Abb. 10: Diagramm der normierten Integral-Werte für C1 α , C1 β und C1 β' (oben) sowie C4 α , C4 α' , C4 β und C4 β' (unten) der CMC-Reihe (Proben 42-44) im Vergleich zu St(b)

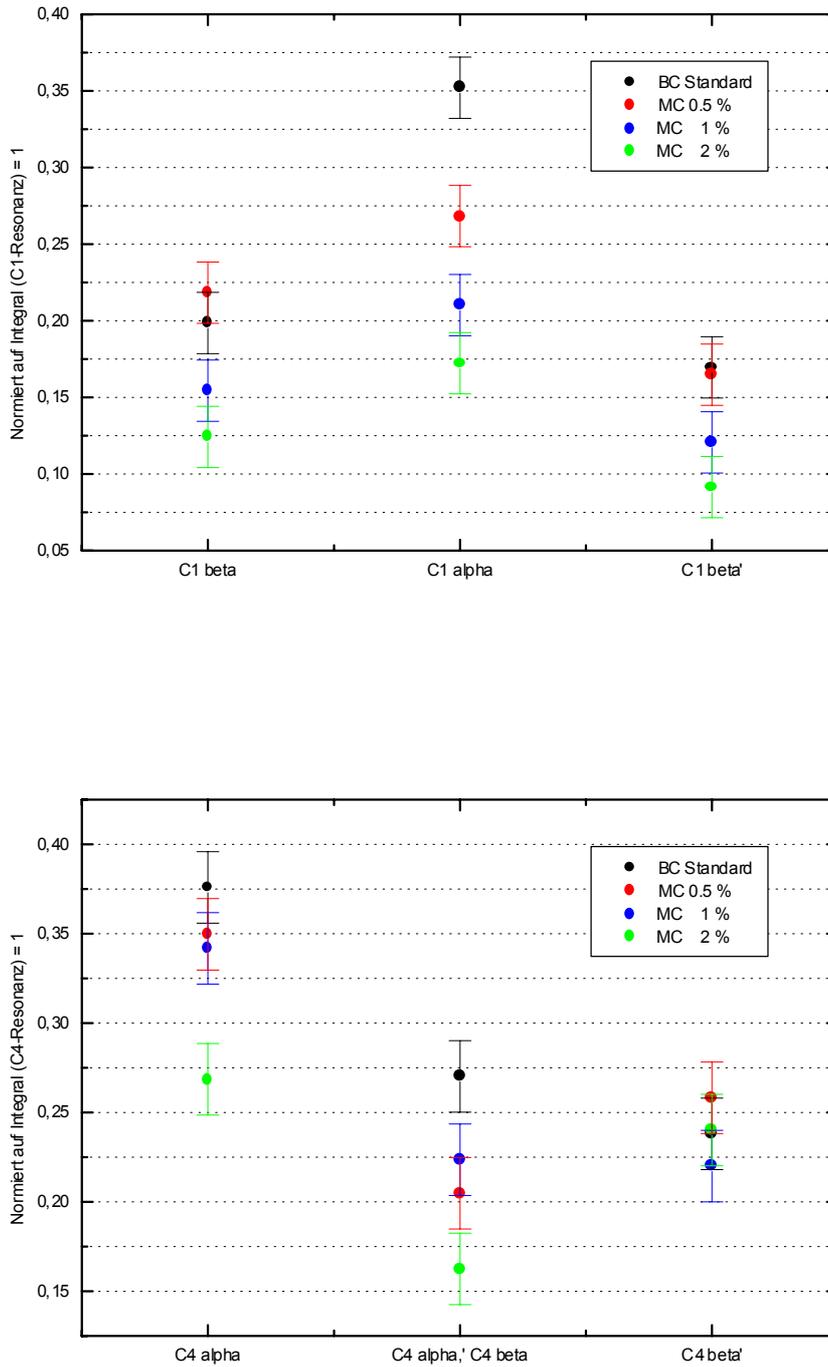


Abb. 11: Diagramm der normierten Integral-Werte für C1 α , C1 β und C1 β' (oben) sowie C4 α , C4 α' , C4 β und C4 β' (unten) der MC-Reihe (Proben 52-54) im Vergleich zu St(b)

Anhand Abb. 10 (obere Grafik) wird eine Abnahme des C1 α -Anteils der BC durch Zusatz von CMC deutlich. Er sinkt von 35% für St(b) auf ca. 20% für alle BC, die in Gegenwart von 0,5 bis 2,0% CMC (Proben 42 - 44) hergestellt worden sind. Es tritt jedoch kaum Veränderung im Gehalt der β -Modifikation auf. Eine Zunahme von C1 β ist lediglich tendenziell und im Rahmen der Meßgenauigkeit zu vernachlässigen. Die Ergebnisse für C4 (Abb. 10 untere Grafik) zeigen keine signifikanten Unterschiede im I α / I β - Verhältnis. Im Fall der C4 α' - und C4 β -Anteile kann keine exakte Aussage getroffen werden, da sich beide ¹³C-Resonanzen überlagern. C4 β' wird unwesentlich größer und C4 α kleiner, doch die Änderungen sind zu gering für genauere Aussagen.

Die Abnahme des Anteils der I α -Modifikation der Bakteriencellulose, die durch Zusatz von CMC entwickelt wurde, ist eher mit einer Zunahme amorpher Teile als mit Zunahme der I β -Modifikation verbunden.

Im Falle der BC-MC-Komposite nehmen für C1 (Abb. 11 oben) die Anteile beider Modifikationen ab. Besonders deutlich tritt das Verhalten für C1 α von 35% für BC-Standard St(b) bis zu ca. 17% für 54 (BC + 2,0% MC) hervor. Dieser generellen Abnahme liegt offensichtlich eine Zunahme des amorphen Beitrags zugrunde. Auch eine Reduzierung der C4 α -Fraktion ist zu verzeichnen (Abb. 11 unten). Für den C4 β' -Anteil treten keine Veränderungen auf. C4 α' und C4 β nehmen zwar insgesamt ab, aber aufgrund der ¹³C-Resonanz-Überlagerung läßt sich keine exakte Aussage machen.

Die Abnahme des Gehaltes an I α - sowie I β -Modifikation der BC, die in Gegenwart von MC synthetisiert wurde, hängt offenbar mit einer Zunahme der amorphen Anteile zusammen.

In der BC-PVA-Serie sind keine Veränderungen der I α / I β - Fraktionen der Bakteriencellulose zu beobachten. Das bedeutet, trotz Anwesenheit von PVA im Nährmedium während der Kultivierung, hat es keine nachweisliche Auswirkung auf die Cellulose-Kristallisation.

3.2 Schlußfolgerungen aus der IR-Spektroskopie

Um einen möglichen Gehalt an WSP in den gereinigten und gefriergetrockneten Kompositen zu sichern und die Ergebnisse der NMR zu verifizieren, wurden IR-Spektren (vom Feststoff mit KBr vermahlen) aufgenommen und mit den Spektren von reiner BC und reinem WSP verglichen.

Die typische, starke (ν_{as} COONa)-Bande von CMC bei 1599 cm⁻¹ erscheint in allen BC-CMC-Proben (42 - 44) mit steigender Intensität bei größeren Konzentrationen von CMC im Nährmedium während der Kultivierung (Abb.12). Das bestätigt die Einlagerung von CMC ins Cellulose-Netzwerk.

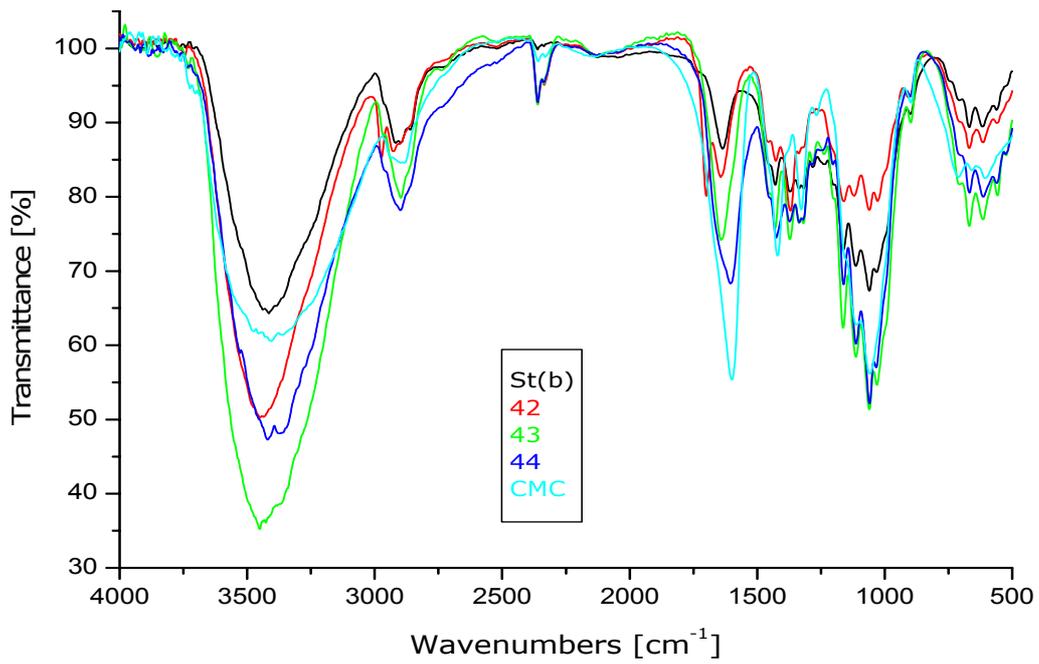


Abb. 12: IR-Spektren von St(b), 42, 43, 44 und reiner CMC

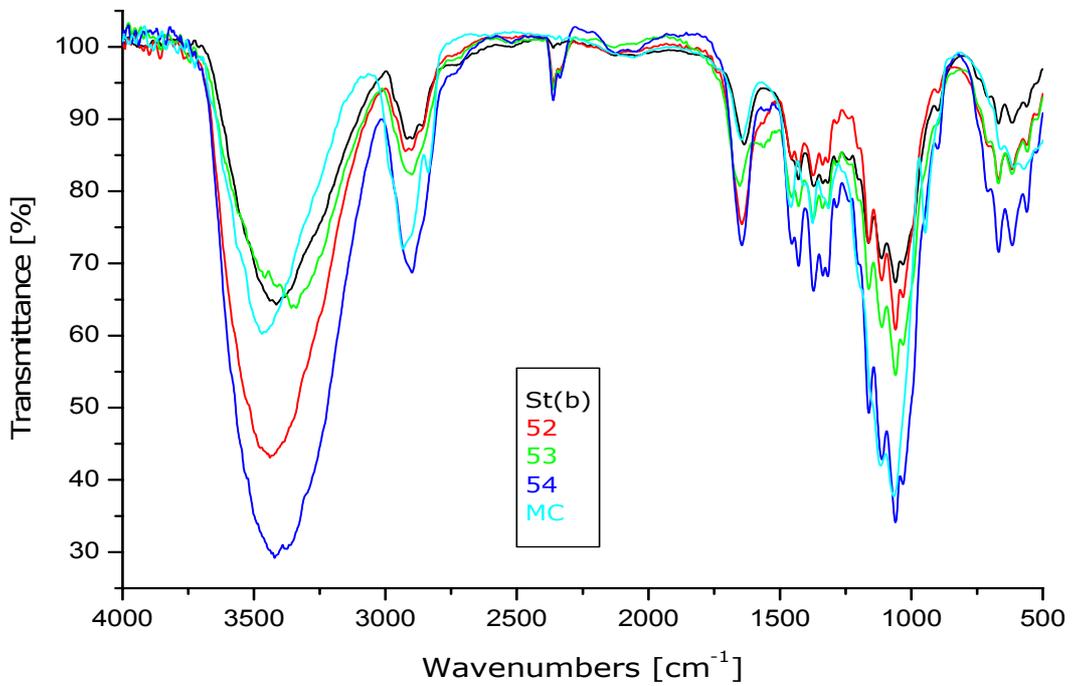


Abb. 13: IR-Spektren von St(b), 52, 53, 54 und reiner MC

Im Falle von MC konnte das WSP durch eine Bande bei 1646 cm^{-1} identifiziert werden. In allen BC-Vliesen, die in Gegenwart von MC in der Nährlösung synthetisiert wurden (52 - 54), ist MC enthalten (Abb. 13). Ebenfalls sind die MC-(νOCH_3)-Signale bei ca. 2830 cm^{-1} in den Probenspektren erkennbar.

Das IR-Spektrum von reinem PVA ist gegenüber BC charakterisiert durch Banden bei 1570 und 850 cm^{-1} . Diese Signale konnten in den BC-PVA-Produkten (62 - 64) nicht detektiert werden (Abb. 14).

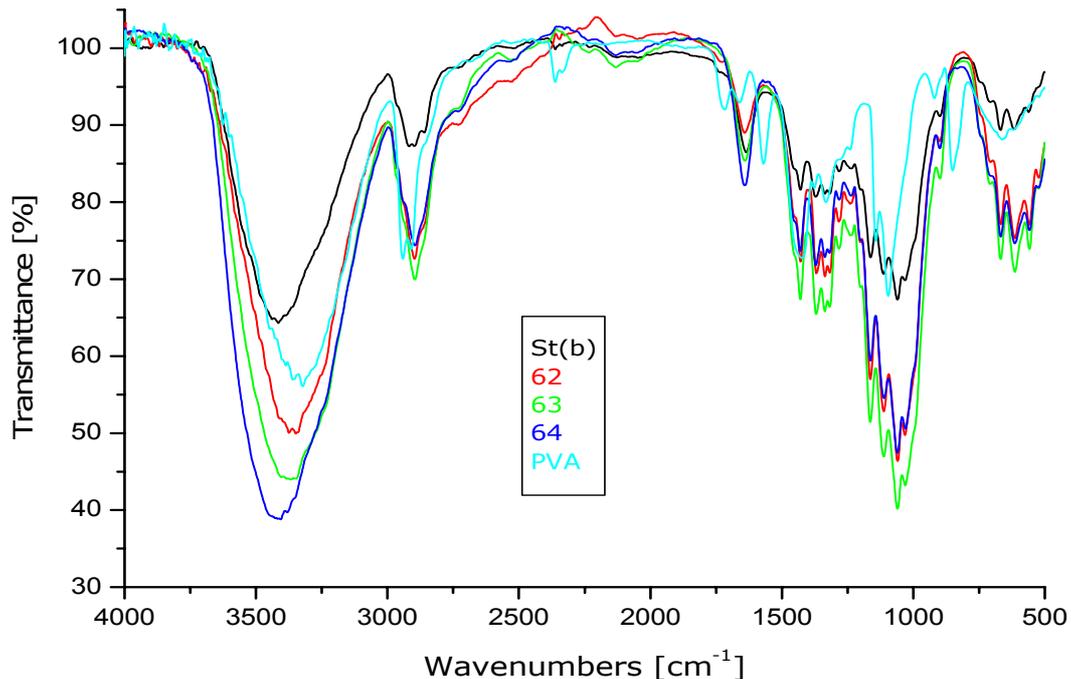


Abb. 14: IR-Spektren von St(b), 62, 63, 64 und reinem PVA

Von den Proben, die durch Variation der C-Quelle entstanden sind, wurden die Oberflächen der Unterseite der Vliese direkt IR-spektroskopisch untersucht (Abb. 15, 16 und 17). Die Spektren sind praktisch identisch mit dem der Kontrollprobe St(a). Das läßt darauf schließen, daß es sich bei diesen Produkten um reine Bakteriencellulose von einheitlicher Primärstruktur handelt. Es tauchen keinerlei Signale auf, die auf

- Glycerin (charakteristische Banden bei 2885 , 1411 , 858 cm^{-1}),
- Glucuronsäure als Na-Salz (charakteristische Banden bei 1596 , 737 cm^{-1}) bzw. auf
- freie Glucuronsäure (charakteristische Banden bei 1709 , 716 cm^{-1})

oder auf anhaftende Verunreinigungen aus der Nährlösung oder Zellbestandteilen hinweisen.

Das stimmt mit anderen IR-Ergebnissen überein, nach denen AX in der Lage ist, aus verschiedenen C-Quellen Cellulose zu produzieren [Shirk und Greathouse, 1952].

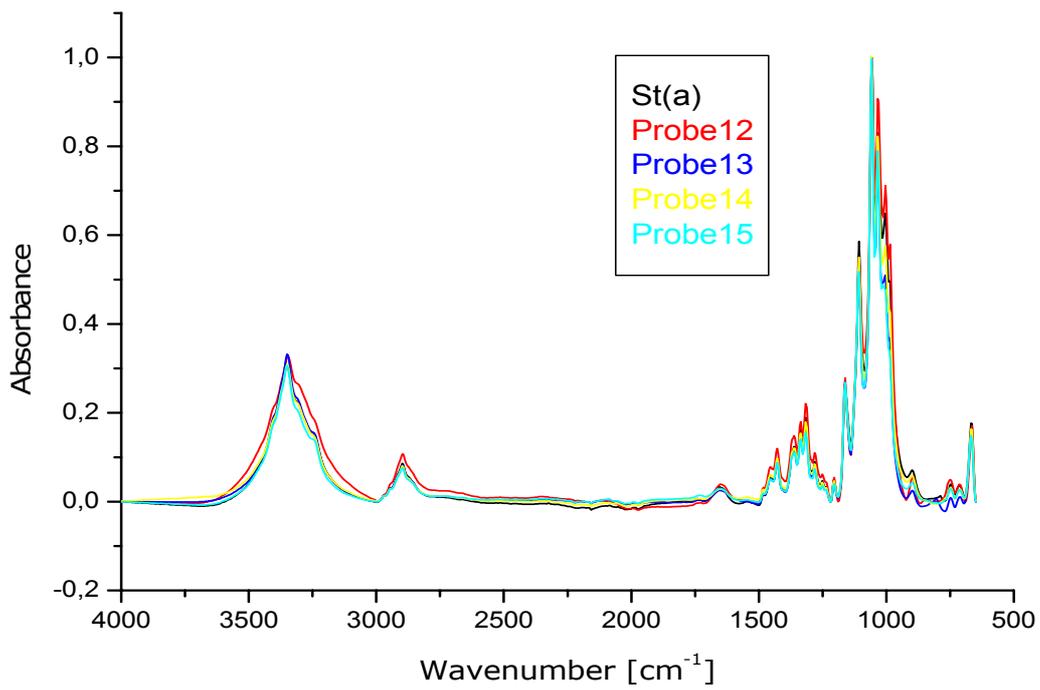


Abb. 15: IR-Spektren der unteren Vlies-Seite von St(a), 12, 13, 14 und 15

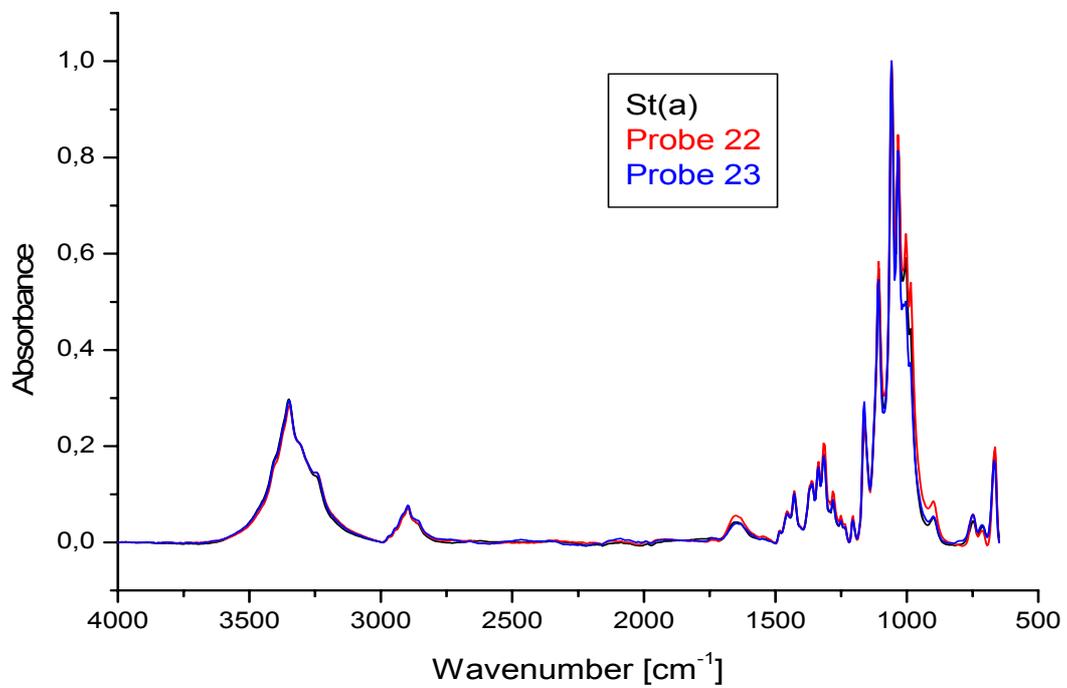


Abb. 16: IR-Spektren der unteren Vlies-Seite von St(a), 22 und 23

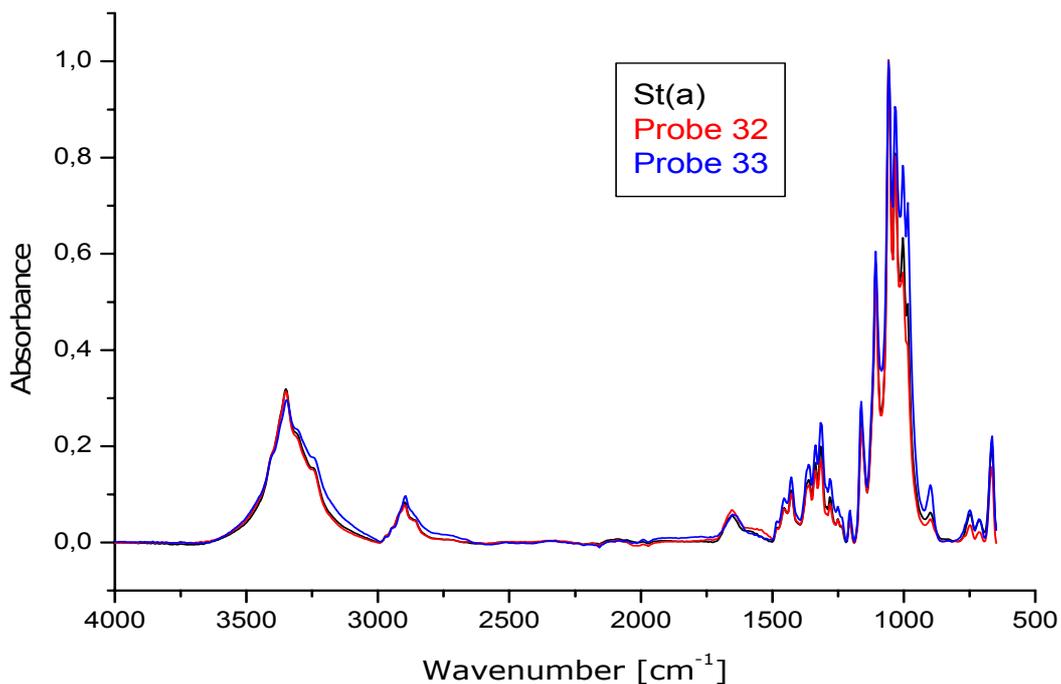


Abb. 17: IR-Spektren der unteren Vlies-Seite von St(a), 32 und 33

Die Produktion von reiner BC ohne Begleitstoffe ist in Verbindung mit der signifikanten Ausbeute-Steigerung durch Glycerin als C-Quelle ein wesentliches Argument für den medizinischen Einsatzbereich im Körperinneren.

3.3 HPLC der Hydrolysate der Bakteriencellulose-Proben

Die HPLC ist eine ausgezeichnete Methode, um Gemische in einer Lösung aufzutrennen, die Bestandteile zu identifizieren und zu quantifizieren. Hydrolysiert man bspw. die Bakteriencellulose-Vliese, erhält man eine Lösung der Glucose-Monomere. Aber man erfaßt nicht nur alle Bausteine des bakteriell synthetisierten Polysaccharids. Auch dem Produkt anhaftende Moleküle wie die WSP-Zusätze, die alternativen C-Quellen oder Verunreinigungen in Form von Nährlösungs- oder Zell-Resten lassen sich, sofern sie ebenfalls in der Lösung sind, über die HPLC getrennt detektieren.

Zu diesem Zweck wurden die gefriergetrockneten Vliese mit Perchlorsäure hydrolysiert und die Lösungen anschließend der HPLC als Reinheits- und Produktkontrolle zugeführt.

Wie aus der IR-Spektroskopie hervorging, ist bei den C-Quellen-variierten Proben nicht mit im BC-Material eingeschlossenen AGU-fremden Bestandteilen zu rechnen. Stellvertretend für die BC-Proben, die durch Variation der C-Quelle entstanden sind, wurde die Reihe gewählt, bei der Glucose in der Nährlösung durch Glucuronsäure Na-Salz ersetzt worden ist, und soll hier diskutiert werden.

Die Chromatogramme der Hydrolysate von St(a), 22 und 23 zeigen erwartungsgemäß jeweils einen einzigen Peak bei einer Retentionszeit von 10,258 min (Abb. 18). Durch Vergleich mit den Chromatogrammen von Referenzsubstanzen im gleichen HPLC-System konnte dieser Retentionszeit zweifelsfrei die Elution von D-Glucose zugeordnet werden. D-Glucuronsäure Na-Salz hat dagegen eine Verweildauer von 9,075 min. Unter den entsprechenden Peaks bei 10,258 min verbergen sich jeweils Flächen von 100%. Das bedeutet, daß die untersuchten Bakteriencellulosen laut HPLC-Analytik tatsächlich komplett aus Glucose-Einheiten aufgebaut sind und keinerlei Nebenprodukte oder Verunreinigungen enthalten. Damit ist auch die mögliche Hypothese, daß D-Glucuronsäure von AX mit in die Cellulose-Ketten eingebaut wird, widerlegt.

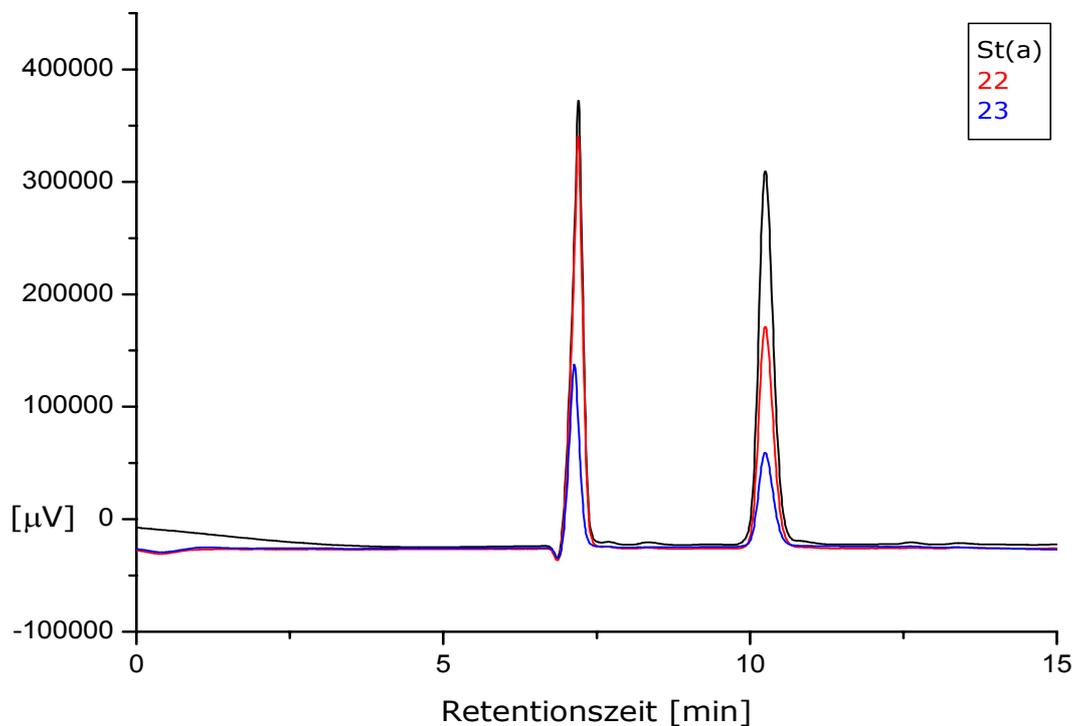


Abb. 18: HPLC-Elugramme von St(a), 22 und 23

In Abb. 19 sind die Chromatogramme der CMC-Reihe dargestellt. Hier findet sich jeweils ein Hauptpeak bei 10,258 min, dem sich wiederum D-Glucose zuordnen läßt. Daneben erscheinen allerdings noch zwei andere Peaks mit zunehmendem Flächeninhalt bei höherem CMC-Zusatz zur Nährlösung. Nach Vergleich mit verschiedenen Glucose-Derivaten unter gleichen HPLC-Bedingungen gehören diese Signale zu 6-Carboxymethylglucose (Mono-CM-Glc) und 2,6-Di-carboxymethylglucose (Di-CM-Glc). In Tab. 4 sind die Retentionszeiten der Substanzen der Hydrolysate und die zugehörigen Flächen aufgelistet.

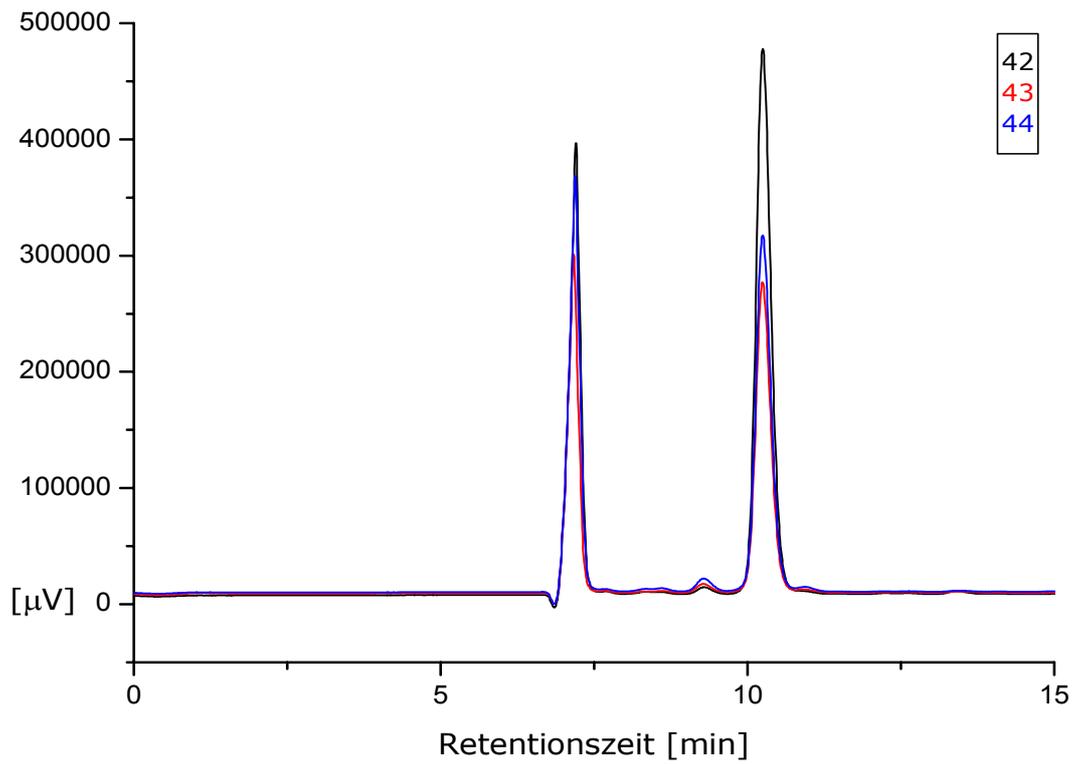


Abb. 19: HPLC-Elugramme von 42, 43 und 44

Tab. 4: Auswertung der HPLC-Chromatogramme von 42, 43 und 44

Probe	Retentionszeit [min]	Substanz	Fläche [µV s]	Fläche [%]
42	8,567	Di-CM-Glc	16530,583	0,201
	9,300	Mono-CM-Glc	93662,930	1,137
	10,258	Glucose	8128072,483	98,662
43	8,608	Di-CM-Glc	31285,269	0,639
	9,292	Mono-CM-Glc	143061,077	2,923
	10,258	Glucose	4719745,692	96,438
44	8,600	Di-CM-Glc	55601,305	0,974
	9,300	Mono-CM-Glc	209944,909	3,677
	10,258	Glucose	5443874,435	95,349

Aus Tab. 4 geht hervor, daß der Gesamtgehalt an Glucose im BC-Produkt um so stärker abnimmt, je mehr CMC der Nährlösung während der Kultivierung zugesetzt war. Demgegenüber nehmen in der gleichen Richtung die Mengen an Mono-CM-Glc und Di-CM-Glc zu. Diese beiden substituierten Glucosen entstammen der CMC, die während der Biosynthese der BC anwesend war. Die kommerziell erhältliche CMC, die eingesetzt wurde, hat einen von der Fabrik angegebenen Substitutionsgrad (DS) von 0,6 bis 0,95. Da der DS maximal 3 sein kann und diese Differenz unsubstituierte AGUs der CMC darstellen, ergeben sich die in Tab. 5 berechneten Gehalte an CMC für die Proben 42, 43 und 44.

Tab. 5: Berechnung des CMC-Gehaltes aus den HPLC-Daten für 42, 43 und 44

Probe	Gesamtgehalt an substituierten AGUs [%]	Mindestgehalt an CMC bei DS = 0,95 [%]	Maximalgehalt an CMC bei DS = 0,6 [%]
42	1,338	4,23	6,69
43	3,562	11,25	17,81
44	4,651	14,69	23,23

Schätzt man aus den durchschnittlichen CMC-Gehalten der Proben aus den HPLC-Daten die CMC-Masse in den Proben ab, läßt sich in etwa sagen, wieviel Prozent der dem Nährmedium zugesetzten CMC in das Vlies eingelagert wurde (Tab. 6).

Tab. 6: Abschätzung der CMC-Menge, die in ein Vlies eingelagert wurde, in Relation zur CMC-Menge, die der Nährlösung zugesetzt war

Probe	Gehalt an CMC (aus HPLC) [%]	Masse des Vlieses [mg]	Geschätzte Masse an CMC im Vlies [mg]	Masse an CMC in Nährlösung [mg]	Geschätzte eingelagerte CMC-Menge aus Nährlösung [%]
42	5,46	255,8	14	150	9
43	14,53	258,8	38	300	13
44	18,96	255,8	48	600	8

Der Masse-Anteil von CMC im Vlies nimmt proportional zur angebotenen CMC in der Nährlösung zu. Schätzungsweise 10% der zur Verfügung stehenden CMC werden in das Vlies aufgenommen bzw. verbleiben darin nach der Wasch-Prozedur.

Die Gesamtmasse der Produkte nimmt jedoch nicht in gleicher Weise zu, sie bleibt im Gegenteil nahezu konstant. Das bedeutet, daß in Gegenwart größerer Mengen CMC weniger Bakteriencellulose produziert wird. Ab einem Gehalt von 1,0% (m/V) CMC im Nährmedium nimmt die Masse an synthetisierter BC gegenüber St(b) sogar ab. Allerdings wird bei 2,0% (m/V) CMC eine BC mit immerhin noch etwa 1,28 mmol AGU hergestellt, was einer Glucose-Ausbeute von 38% entspricht. Diese Ausbeute ist zwar geringer als die unter den Bedingungen von St(b), aber trotzdem noch größer als die Ausbeute von St(a), sie liegt also, die Wirtschaftlichkeit betreffend, noch in einem durchaus vertretbaren Rahmen.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt interpretieren:

Die wasserlösliche CMC ist vermutlich homogen in der Nährlösung verteilt. Die CMC-Ketten lagern sich an die durch AX5 entstehenden Mikrofibrillen oder Cellulosefasern an, und zwar in einem bestimmten Verhältnis zur Konzentration. Die beim Reinigen der Vliese dem H₂O zugänglichen CMC-Ketten werden wieder herausgewaschen, sofern sie durch das Cellulose-Netzwerk herausgespült werden können. Es scheint also zunächst einen rein statistischen Zusammenhang zu geben zwischen Konzentration an CMC, Anlagerung an BC und Ausspülung beim Waschen. Bei einem größeren Angebot an CMC ist auch die Wahrscheinlichkeit größer, daß mehr CMC im Cellulose-Netzwerk anzutreffen ist. Es verbleiben stets etwa 10% der angebotenen CMC im Produkt.

Die Proben 42, 43 und 44 unterscheiden sich jedoch ganz erheblich in ihrem stofflichen Aufbau. Bei annähernd gleichen Gesamtmassen enthalten sie unterschiedliche BC/CMC-Zusammensetzungen. Die Vliese 42, 43 bzw. 44 enthalten ca. 5, 15 respektive 19% CMC.

Es stehen somit differenzierte BC-Produkte zur Verfügung, die z.B. für die Verwendung als Adsorbentien hinsichtlich unterschiedlicher spezifischer Aufnahmekapazitäten für Metall-Ionen getestet werden könnten.

4 Steigerung des Polymerisationsgrades der Bakteriencellulose

Grundsätzlich gibt es viele Möglichkeiten, die Molmasse einer Substanz zu bestimmen. Der erfolgreiche Einsatz einer bestimmten Methode hängt von verschiedenen Faktoren ab. Im Falle von Bakteriencellulose handelt es sich um eine hochmolekulare Verbindung, wobei mit einer Molmassenstreuung zu rechnen ist. Unter anderem bietet sich für polydisperse Stoffe die Gelpermeationschromatographie (GPC) an. Die GPC stellt eine Säulenchromatographie dar, bei welcher Sieb- und Adsorptionseffekte ausgenutzt werden, wodurch nach der Molekülgröße fraktioniert wird. Man erhält Durchschnittsmolmassen und Molmassenverteilungen. Dabei läßt sich der arithmetische Mittelwert der Molmasse (Gewichtsmittel der Molmasse M_w) als auch der arithmetische Mittelwert der Molekülzahlverteilung (Zahlenmittel der Molmasse M_n) angeben. Je größer die Differenz zwischen diesen beiden Werten, um so uneinheitlicher ist die Molmasse. Ein Maß für die molekulare Uneinheitlichkeit ist der Polydispersitätsindex PDI [Braun et al., 1999]:

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} .$$

Für die Angabe der Kettenlänge eignet sich der Polymerisationsgrad DP, der sich aus dem Quotienten von Gewichtsmittel der Molmasse des Polymeren und der Molmasse des Monomeren (für Cellulose: AGU) berechnen läßt:

$$DP_w = \frac{M_w}{M_{AGU}} .$$

In einer Kooperation mit dem Institut für Chemie der Universität für Bodenkultur in Wien konnten die BC-Produkte St(a), 12 - 15, 42 - 44 und 52 - 54 per GPC untersucht werden. Dafür wurden molekular disperse Lösungen der BC-Proben in N,N-Dimethylacetamid (DMAc) / LiCl angefertigt [Röhring et al., 2002].

In dieser Zusammenarbeit konnte schon während der BASYC-Forschung gezeigt werden, daß AX5 des Institutes für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Universität Jena die einzig bisher bekannte formelreine Cellulose herstellt. Der Carbonylgruppengehalt ist adäquat dem Endgruppengehalt, d.h., er entspricht genau der Anzahl der Celluloseketten. Der DP_w lag bei etwa 6600 mit einem PDI von ca. 9.

Die Molekulargewichtsverteilung von silylierter BC des AX5-Stammes über GPC ergab einen durchschnittlichen DP_w von 4500 mit $PDI = 2,1$ [Einfeldt und Klemm, 1997].

Im Rahmen eines DFG-Projektes mit dem Thema „Synthese und Reaktivität molekular einheitlicher Cellulose“ wurden BC-Proben vom gleichen Stamm in Cadmium-tris(2-aminoethyl)amin gelöst und die Molmasse per Lichtstreuungsmessung ermittelt [Saalwächter et al., 2000]. Dabei erhielt man einen DP_w um 5000.

4.1 Einfluß von Glycerin als C-Quelle auf die Molmassenverteilung

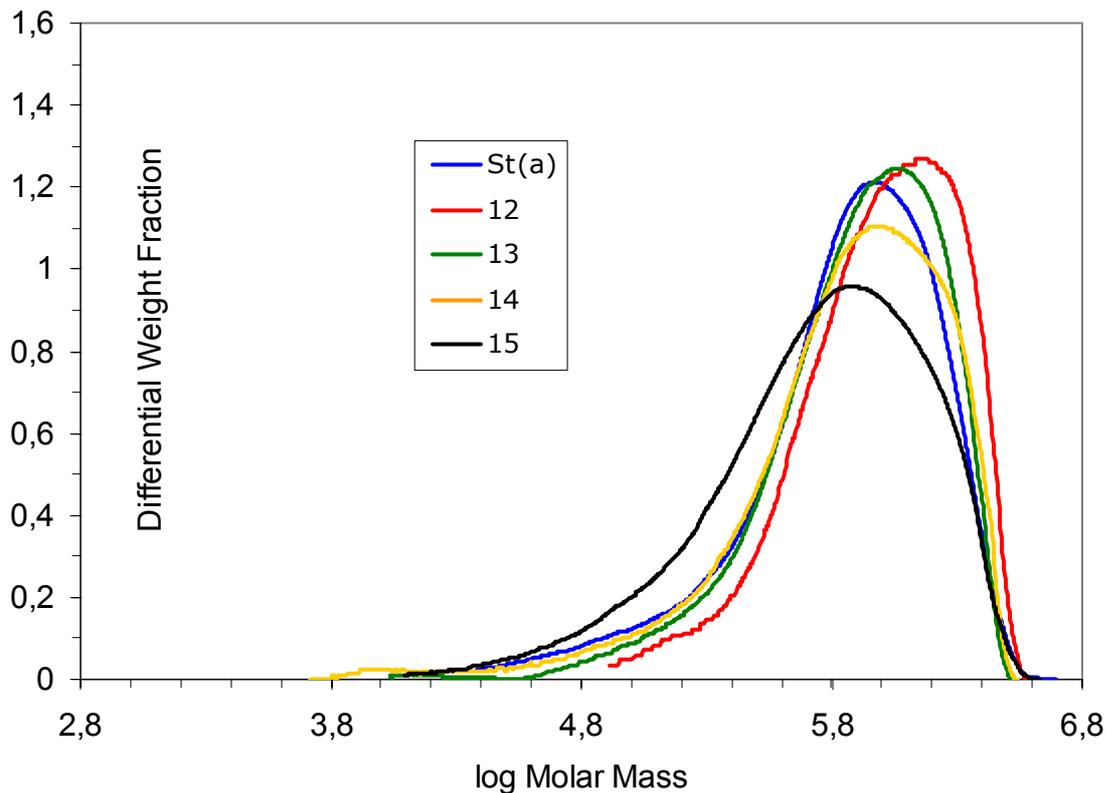


Abb. 20: Graphische Darstellung der Molmassenverteilung der BC in Abhängigkeit der D-Glucose / Glycerin - Zusammensetzung der C-Quelle während der Kultivierung

Aus Abb. 20 ist zunächst ersichtlich, daß Probe 12 (75% Glucose, 25% Glycerin) die größte Molmasse und den schärfsten Peak aufweist. Dagegen ist das Kurvenmaximum für 15 (100% Glycerin) bei der geringsten Molmasse in dieser Reihe. Probe 14 (25% Glucose, 75% Glycerin) hat einen relativ hohen Anteil an niedermolekularen Fraktionen mit Molmassen um 10000 g/mol. In Tab. 7 sind die zugehörigen Daten als auch die daraus berechneten PDI- und DP_w -Werte aufgelistet.

Die Kettenlänge der Bakteriencellulosen variieren um 2400 Wiederholungseinheiten. Je nach der Glucose / Glycerin - Zusammensetzung der C-Quelle im Nährmedium läßt sich ein DP_w von ca. 5000 bis 7400 einstellen. Dabei zeichnet sich die Probe 12 sowohl durch den größten DP_w als auch den geringsten PDI aus. Mit zunehmendem Glycerin-Gehalt der C-Quelle (Probe 13-15) sinkt die Kettenlänge der Cellulose wieder.

Tab. 7: GPC-Ergebnisse für die Glycerin-Reihe

Probe	M_w [g/mol]	M_n [g/mol]	PDI	DP_w
St(a)	935700	412900	2,27	5776
12	1200000	718100	1,67	7407
13	999100	439100	2,28	6167
14	972800	319300	3,05	6005
15	809300	290900	2,78	4996

Mit 100% Glycerin als C-Quelle (15) erhält man sogar eine BC mit einem noch geringeren DP_w als die Vergleichsprobe St(a). Während das BC-Molekulargewicht einerseits von den Kultivierungsbedingungen abhängt [Ridout et al., 1998], wird auch eine Cellulase-Aktivität von AX bei C-Quellen wie Glycerin oder CMC diskutiert [Oiawa et al., 1994]. Die veränderten Kultivierungsbedingungen (Glycerin als C-Quelle) könnten eine kürzere Generationszeit der Bakterien bei gleicher BC-Synthesegeschwindigkeit oder eine langsamere BC-Bildung bei gleich langer Lebensdauer der Bakterien bewirken.

Erwähnenswert scheint noch die Tatsache, daß die Standard-BC St(a) einen durchaus vergleichbaren DP aufweist wie in den eingangs genannten Untersuchungen. Das bedeutet für die Bakteriencellulose vom AX5-Stamm des IOMC der Universität Jena eine relativ gute Reproduzierbarkeit über eine langjährige Zeitdauer sowie eine verhältnismäßig geringe Standort- und Personenunabhängigkeit.

Innerhalb der DP-Dimension von 4500 bis 6600 schwanken die Daten allerdings gebunden an die Bestimmungsmethode und die unterschiedlichen Herstellungsbedingungen. Als Gemeinsamkeit liegt im Prinzip nur der gleiche AX-Stamm und eine statische Flüssig-Kultivierung im HS-Medium zugrunde. Allein verschiedene Brutschränke und Kultivierungsstandorte implizieren unterschiedliche Temperatur- und Lichtverhältnisse. Wie in der Einleitung (s. 1.2 Abb. 2b) bereits skizziert, könnten andere mögliche Ursachen für die DP-Schwankungen von Standard-BC einerseits bei Abweichungen der Inokulationsbedingungen oder andererseits in den weiteren Inkubationsbedingungen liegen.

Für diese Arbeit wurden die Konditionen für die Herstellung der BC-Produkte weitestgehend definiert und bis auf die Komposition des Nährmediums konstant gehalten. So bleibt der Vergleich der DP-Werte der Proben der Glycerinreihe zum DP von St(a) innerhalb der gleichen Herstellungsbestimmungen in jedem Falle glaubhaft. Bemerkenswert sind die geringeren PDI von St(a) und allen anderen Proben dieser Arbeit ($\approx 2,4$) im Vergleich zum durchschnittlichen PDI der BC-Vliese aus der BASYC-Forschung (≈ 9), die über die gleiche Bestimmungsmethode erhalten worden sind.

4.2 Kettenverlängerung durch CMC

Wie aus Abb. 21 hervorgeht und in Tab. 8 spezifiziert, ändert sich das Gewichtsmittel der Molmasse durch unterschiedliche Zugaben von CMC zur Nährlösung kaum. Der errechnete DP_w schwankt um 7600 und scheint in keinem direkten Zusammenhang zur Menge des Additivs in der Nährlösung zu stehen. Leider stehen keine Angaben zu $St(b)$ zur Verfügung. Deswegen kann kein Vergleich angestellt werden, ob die Kettenlänge der BC durch CMC-Zusatz generell höher oder niedriger ist als ohne Zusatz bei ansonsten gleicher Herstellung. Allerdings liegt der DP_w -Bereich für die Standard-BC zwischen 4500 und 6600 (s. 4 bzw. 4.1), der auch in etwa für $St(b)$ zu erwarten wäre, in jedem Fall um ca. 1000 AGU niedriger als für die Proben 42-44.

Die Gewichtsfractionen von 8000 bis 70000 g/mol gehören den Molekülen der CMC an, was sich natürlich auf den Polydispersitätsindex auswirkt, womit die Einheitlichkeit der bakteriell synthetisierten Cellulosestränge verfälscht wird. Der PDI müßte also für alle drei Proben nach unten korrigiert werden.

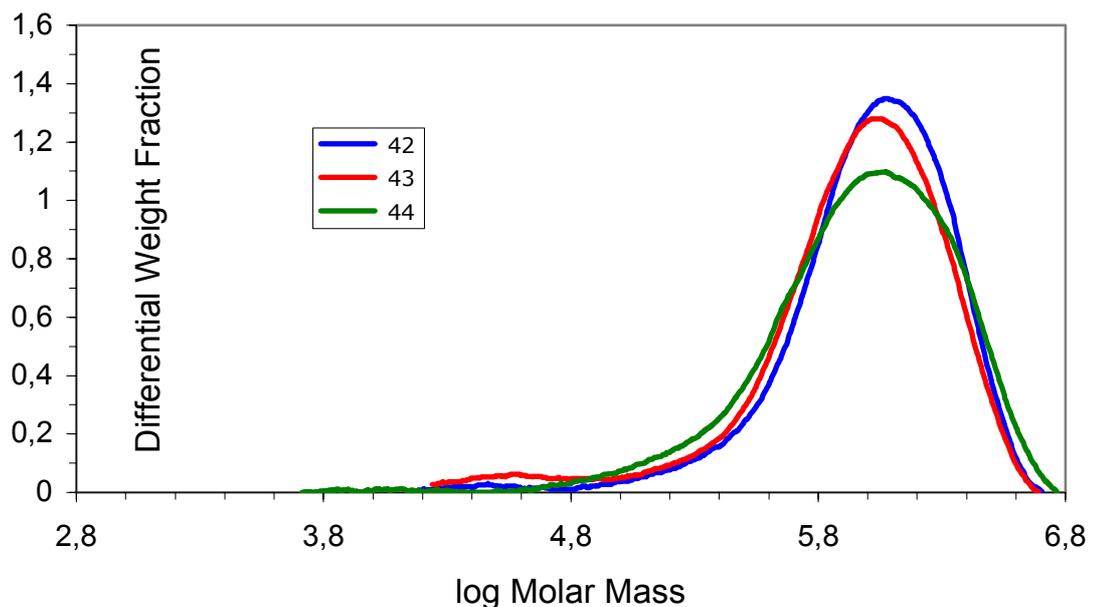


Abb. 21: Graphische Darstellung der Molmassenverteilung der BC in Abhängigkeit vom CMC-Zusatz in der Nährlösung während der Kultivierung

Tab. 8: GPC-Ergebnisse für die CMC-Reihe

Probe	M_w [g/mol]	M_n [g/mol]	PDI	DP_w
42	1273000	613100	2,08	7858
43	1160000	443400	2,62	7160
44	1259000	500800	2,51	7772

Obwohl eine Cellulase-Aktivität von AX in Gegenwart von CMC als C-Quelle dokumentiert wird [Oiawa et al., 1994; Tahara et al., 1997], wodurch sowohl CMC-Ketten abgebaut und dem Bakterium zugänglich gemacht werden als auch BC hydrolysiert wird, scheint AX5 keine oder nur sehr geringe Cellulase-Aktivität zu besitzen. Das kann daran liegen, daß genügend D-Glucose als C-Quelle angeboten wird, die Bakterien also nicht zwangsweise Cellulase-Enzyme synthetisieren müssen.

4.3 Kettenverlängerung durch MC

Wie Abb. 22 und Tab. 9 zeigen, produziert AX5 in Gegenwart von 0,5 bzw. 1,0% MC prinzipiell längere Celluloseketten als in Gegenwart von CMC. Der DP_w liegt im Mittel bei 8860. Die BC-Ketten von Proben 52 und 53 sind um mindestens 2000 Glucose-Bausteine länger als Standard-BC mit einem DP_w zwischen 4500 und 6600 (s. 4 bzw. 4.1). Es ist also gelungen, die Kettenlänge durch die Komposition der Nährlösung um 30% zu vergrößern. Allerdings ist ein Trend von abnehmendem DP bei weiter zunehmendem MC-Zusatz zu verzeichnen. So fällt der DP_w der BC bei Herstellung in Gegenwart von 2,0% MC auf 7284.

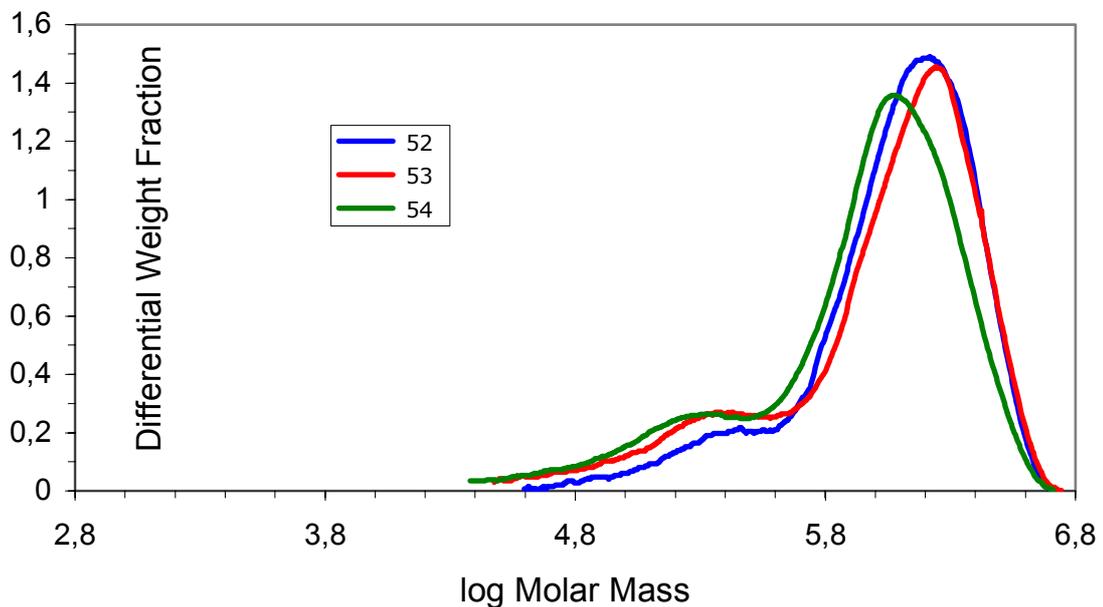


Abb. 22: Graphische Darstellung der Molmassenverteilung der BC in Abhängigkeit vom MC-Zusatz in der Nährlösung während der Kultivierung

Tab. 9: GPC-Ergebnisse für die MC-Reihe

Probe	M_w [g/mol]	M_n [g/mol]	PDI	DP_w
52	1457000	741900	1,96	8994
53	1413000	518000	2,73	8722
54	1180000	428000	2,76	7284

In allen drei Molmassenverteilungskurven ist ein Nebenmaximum von etwa 25000 bis 160000 g/mol erkennbar. Den Ergebnissen der NMR- und IR-Spektroskopie zufolge haftet den BC-Netzwerken MC an. Diese eingelagerten MC-Ketten verursachen die Schultern an den Hauptpeaks.

Die im Gegensatz zur BC-Kettenlänge kürzeren MC-Moleküle beeinflussen den PDI und verfälschen die Einheitlichkeit der bakteriell synthetisierten Cellulose nachteilig. Um den BC-PDI objektiv beurteilen zu können, müßten die angegebenen Werte nach unten korrigiert werden.

Die Ergebnisse der GPC dienen in erster Linie der Strukturaufklärung. Die Möglichkeit, die Kettenlänge über die Zusammenstellung der Kulturlösung zu regulieren, bietet aber wertvolle Perspektiven im Hinblick auf das Design von BC-Produkten für konkrete Fragestellungen.

5 Modifizierung der Porenstruktur der Bakteriencellulose

5.1 Visualisierte Differenzen im Cellulose-Netzwerk (REM)

Um Unterschiede in der Netzwerkstruktur zu visualisieren, wurden vom Vlies-Inneren Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) gemacht. Zu diesem Zweck wurden gefriergetrocknete Vliese verwendet, da bei der Sublimationstrocknung die innere Vlies-Struktur weitestgehend erhalten bleibt. Sie wurden gefroren und gebrochen. Die Bruch-Oberfläche wurde anschließend mit Gold bedampft und mittels REM untersucht, wobei die Sekundärelektronen registriert wurden. Abb. 23 veranschaulicht in einer Skizze die Position im Vlies, die betrachtet worden ist.

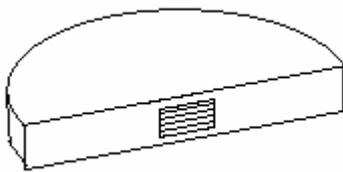


Abb. 23: Skizze zur REM-Betrachtungsposition (linierter Bereich) im BC-Vlies

Die einzelnen Vlies-Schichten liegen nach einer Drehung des Bildes um etwa 45° zur Korrektur der Perspektive wieder horizontal. Poren, die sich zwischen zwei Schichten befinden und an den vertikalen Seiten durch Schicht-Verbindungen begrenzt sind, wurden praktisch aufgeschnitten. In günstigen Fällen lassen sich hier Maße für den Poren-Querschnitt angeben. Ganz allgemein sollten sich Aussagen machen lassen über den Ordnungszustand der Schichten.

5.1.1 Beschreibung und Ursache der Struktur von Standard-Bakteriencellulose

In Abb. 24 sind die Aufnahmen von Standard-Bakteriencellulose St(a) wiedergegeben. Schon in der 500- und 2000-fachen Vergrößerung ist die Schichtstruktur gut erkennbar. Die Schichten entstehen, weil die Bakterien in einer statischen Flüssigkultur nur an der Phasengrenze zwischen Nährlösung und Luft Cellulose produzieren. Dabei bewegen sie sich hauptsächlich horizontal in Höhe der Flüssigkeitsoberfläche, indem sie eine Cellulosefaser ausstoßen. Ist diese Ebene örtlich schon durch BC-Produkt beansprucht, wird das ältere Cellulose-Geflecht automatisch nach unten gedrückt, während darüber eine neue horizontale Schicht entsteht. Die Bildungsrate der BC sollte an allen Punkten auf der Oberfläche gleich sein, da im Mittel überall in dieser Ebene die gleiche Konzentration an Bakterien, damit verbunden auch die gleiche Teilungsfrequenz und Sterberate vorherrscht.

Die horizontale Schichtstruktur wird eigentlich erst durch die Löcher erkennbar, die vermutlich die abgestorbenen und herausgewaschenen Bakterienzellen hinterlassen (5000- und 10000-fache Vergrößerung). Die Dimension der Löcher (im Querschnitt etwa $4 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) paßt gut mit den Maßen der AX-Zellen überein ($1 - 4 \mu\text{m}$ lang und $0,6 - 0,8 \mu\text{m}$ breit [Pilz, 2001]). Diese Poren müssen natürlich nicht zwangsweise in parallelen Ebenen angeordnet sein. Das würde voraussetzen, daß nur zu bestimmten Zeitpunkten Bakterien absterben dürfen. Vielmehr sollten die Orte und Zeitpunkte des Absterbens einer Zelle einer statistischen Verteilung folgen. Deswegen sind in verschiedenen Bildsegmenten etwa gleich viele Poren sichtbar, d.h., die gesamte Aufnahme ergibt ein homogenes Erscheinungsbild (500- und 2000-fache Vergrößerung).

Liegen mehrere Fasern parallel in einer Höhe (Schicht) nebeneinander, ist eine Aggregation sichtbar (5000- und 10000-fache Vergrößerung). Eine Schicht wird offenbar durch tote Zellen (später Poren) in ihrer Ausdehnung begrenzt. Die Fasern liegen außerhalb einer zusammenhängenden Schicht meist einzeln vor. Hier treten Umwicklungen von zwei oder mehr Fasern auf, wodurch der lineare Verlauf einer Faser abgewinkelt wird (10000-fache Vergrößerung). Die Faserstärke läßt sich aus der 20000-fachen Vergrößerung gut abschätzen und beträgt etwa $0,078 \mu\text{m}$.

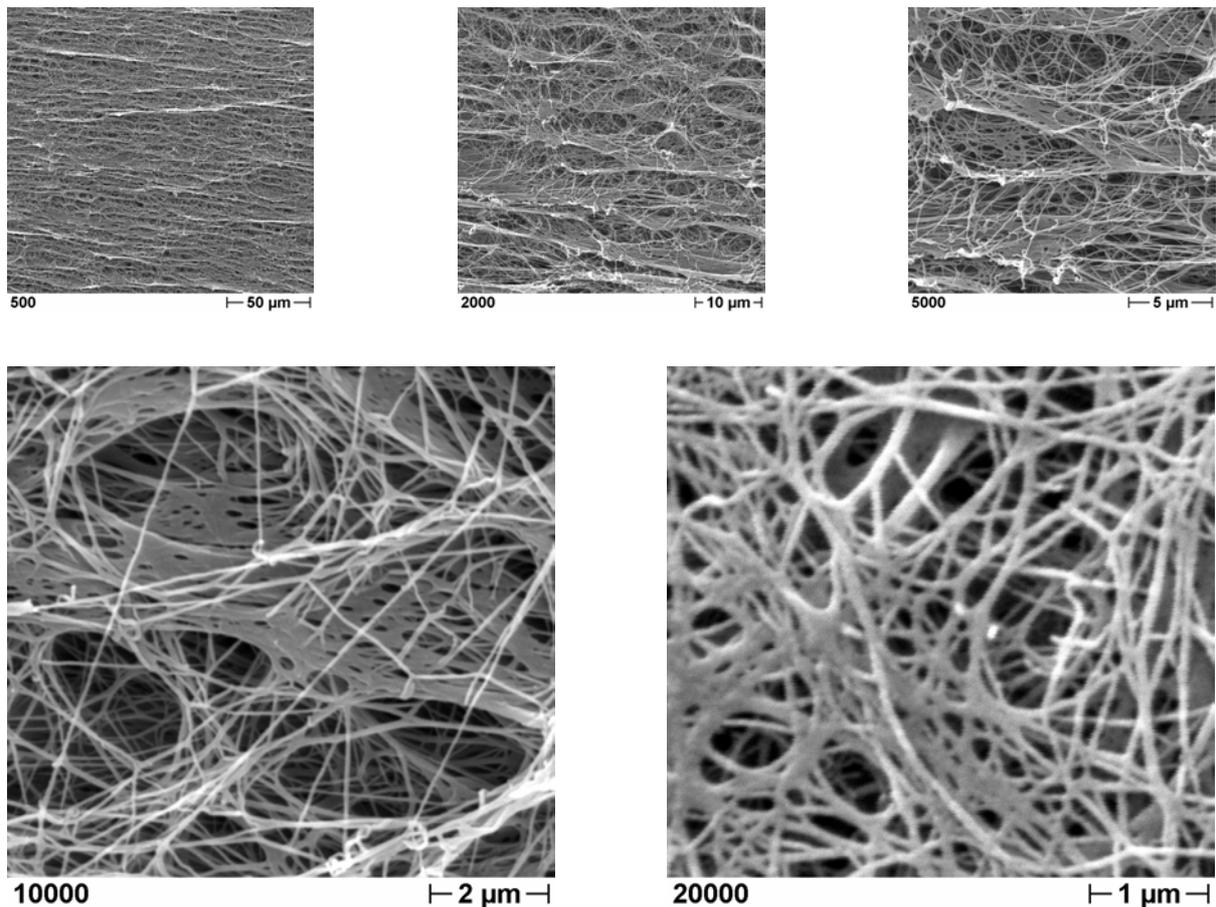


Abb. 24: REM-Aufnahmen von St(a) in 500-, 2000-, 5000-, 10000- und 20000-facher Vergrößerung

St(b) dient als Standard-Bakteriencellulose bzw. Kontrollprobe für die BC-Proben, die in Gegenwart von Additiven entstanden sind. St(b) wurde wie St(a) ebenfalls im HS-Medium produziert, aber unter abweichenden Herstellungsbedingungen, welche zu einer signifikanten Steigerung der Produkt-Ausbeute führten. Die Untersuchung von St(b) mit einem Rasterelektronenmikroskop dokumentiert aber einen ähnlichen strukturellen Aufbau. Die Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen sind in Abb. 25 vorgestellt.

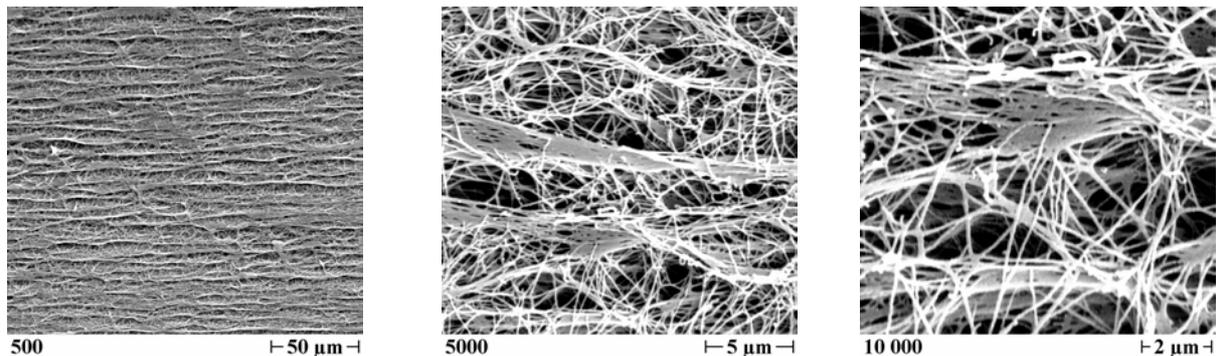


Abb. 25: REM-Aufnahmen von St(b) in 500-, 5000- und 10000-facher Vergrößerung

Von der Standard-Bakteriencellulose St(b) wurden außerdem noch die Ober- und Unterseite eines gefriergetrockneten Vlieses inspiziert. Dabei ergeben sich auffällige Unterschiede, wie Abb. 26 zeigt.

Die untere, älteste Vlies-Fläche besteht aus einem losen, weiträumigen Faser-Netz (Abb. 26 links). Es sind keinerlei aggregierte Fasern oder Schichten zu erkennen. Das könnte darauf hinweisen, daß, wenn nach entsprechender Vermehrung der inokulierten Zellen und genügendem Glucose-Konsum die Cellulose-Bildung einsetzt, sich zunächst ein Geflecht aus einzelnen Fasern bildet. In diesem frühen Stadium der Kultivierung sind die Fasern offenbar noch wahllos und zufällig ausgerichtet. Erst nachdem das junge Netz eine bestimmte Stärke aufweist, können die Zellen vermutlich darauf schwimmen, und ihre Cellulose-Fasern weisen dann bevorzugt eine Orientierung in der horizontalen Ebene der Nährlösungsoberfläche auf. Solche parallelen Fasern in der gleichen Ebene können sich nun zu Schichten vereinigen. Weiterhin sind in diesem anfänglichem Netzwerk keine Poren zu erkennen. Das deutet darauf hin, daß entweder bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Zellen abgestorben sind oder daß sie noch nicht getragen und eingebettet werden konnten und deshalb abgesunken sind.

Blickt man auf die obere Vlies-Fläche, zeichnet sich ein feines, enges Netzwerk mit örtlichen Schichten aus zusammengelagerten Fasern ab (Abb. 26 rechts). Diese Fläche stellt die letzte, zum Zeitpunkt des Kultivierungsabbruchs aktuelle BC-Synthese-Region dar. Die Cellulose-Produktion wurde hier durch das Totsterilisieren der aktiven AX-Zellen quasi abgebrochen. Dadurch gewinnt man einen Einblick in momentan entstehende Areale.

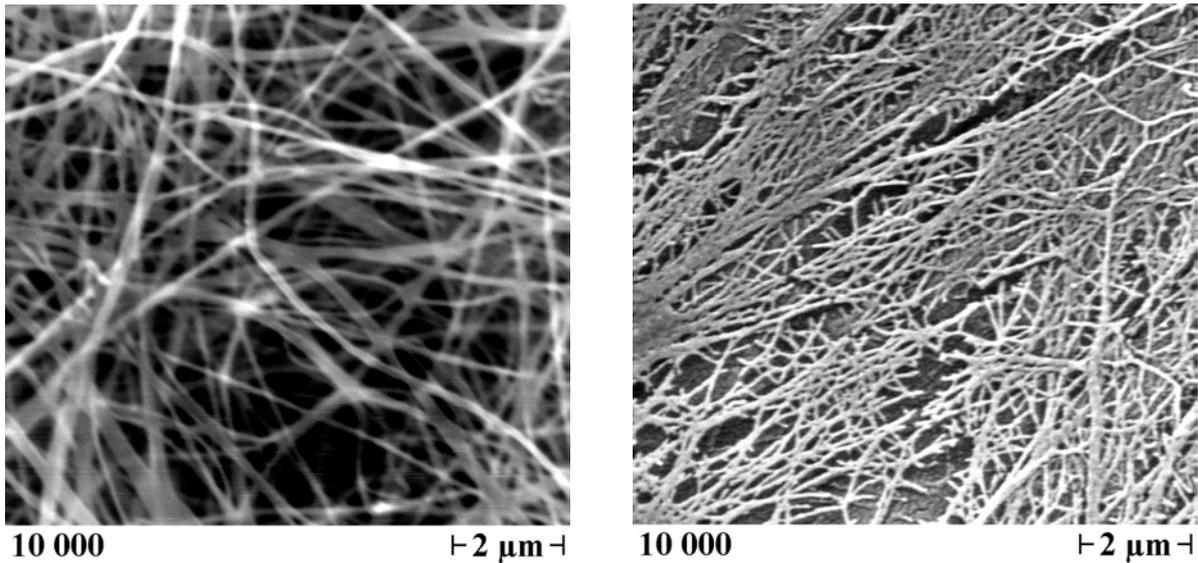


Abb. 26: REM-Aufnahmen der Unterseite (links) und der Oberseite (rechts) eines St(b)-Vlieses in 10000-facher Vergrößerung

5.1.2 Auswirkungen der Variation der C-Quelle auf die Struktur

5.1.2.1 Größere Unordnung in der Struktur durch Glycerin

In Abb. 27 sind die REM-Bilder der Glycerin-Reihe im Vergleich zu St(a) dargestellt. Während bei Probe 12 die Schichten großflächiger und stärker als bei St(a) erscheinen, nehmen die horizontalen Ausdehnungen der einzelnen Schichten bei höheren Glycerin-Gehalten (Proben 13 - 15) wieder ab. Es sind zwar sehr kräftige Faser-Vereinigungen zu erkennen, sie erstrecken sich aber nur über kurze Distanzen. Außerdem fällt in Richtung 12 - 15 zunehmend eine nicht-horizontale Orientierung der Struktur-Verstärkungen auf. Bei 100% Glycerin als C-Quelle (Probe 15) liegen die Faser-Aggregationen kaum noch in horizontaler Ebene des BC-Vlieses. Sie ergibt ein eher wirres Netzwerk mit größerer Unordnung gegenüber St(a).

Auch eine stärkere Vergrößerung von Probe 15 bestätigt diese Charakteristik (Abb. 28). Der Poren-Querschnitt beträgt etwa $4 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$. Außerdem sind deutlich mehr Faser-Enden im Vergleich zu St(a) zu erkennen, die aus den starken Faser-Verbänden herausragen (s. 5.1.1 Abb. 24). Das korreliert mit den Daten der GPC, wonach Probe 15 eine kürzere Kettenlänge aufweist als St(a), was bei einer höheren Produkt-Ausbeute für 15 eine größere Ketten-Anzahl, also auch mehr Faser-Enden bedeutet.

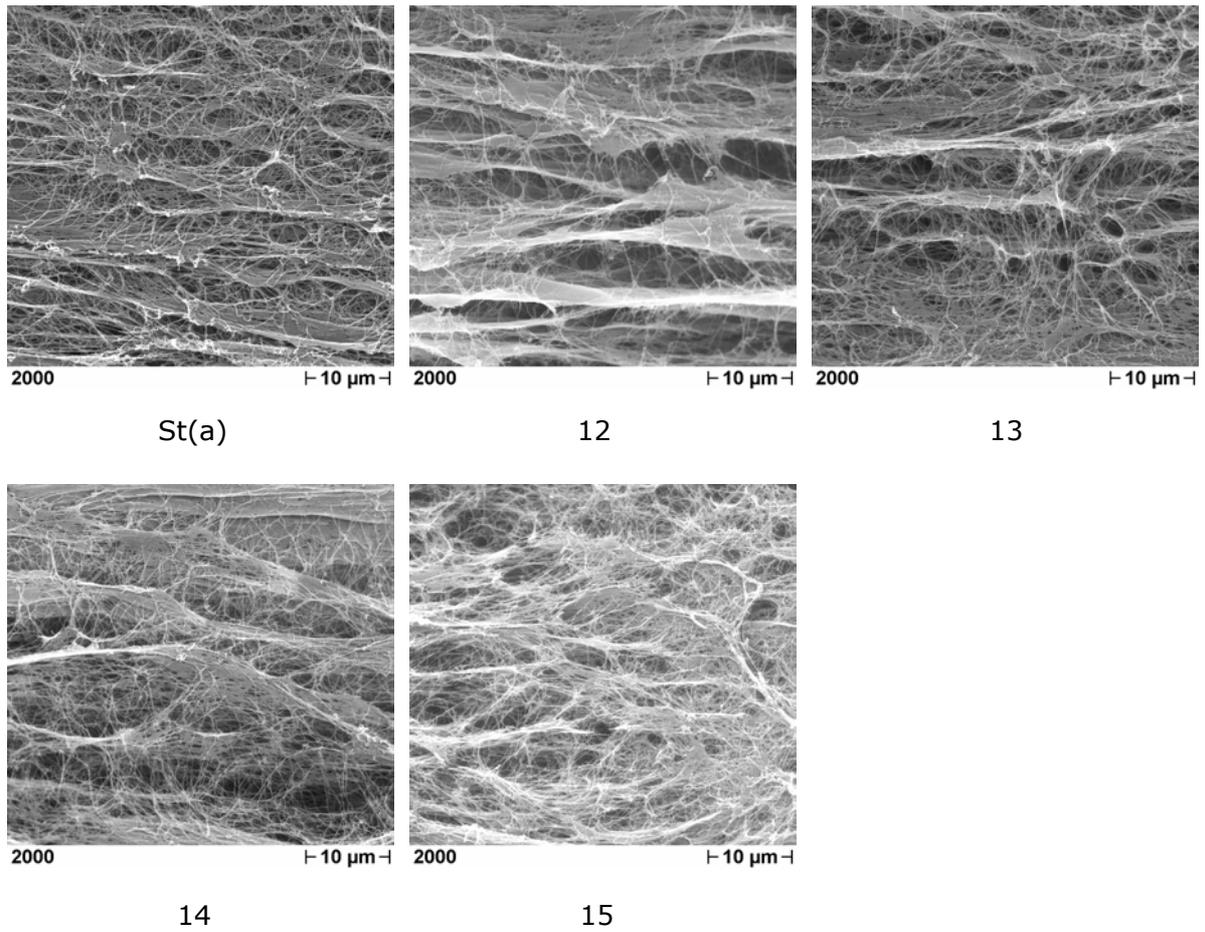


Abb. 27: REM-Aufnahmen der Glycerin-Reihe in 2000-facher Vergrößerung

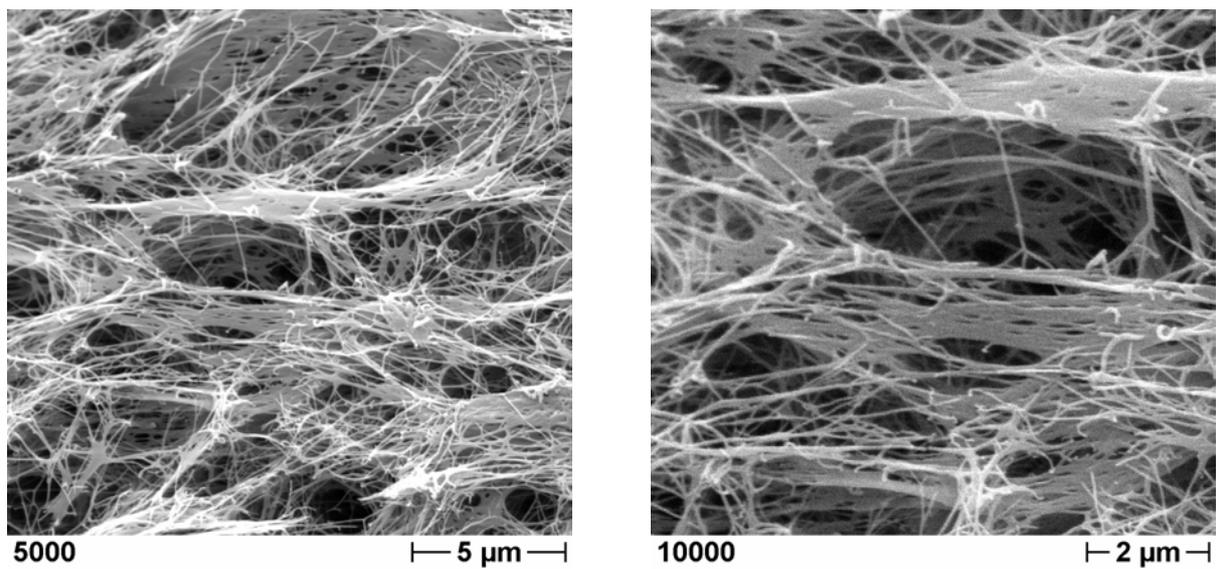


Abb. 28: REM-Aufnahmen von Probe 15 in 5000- und 10000-facher Vergrößerung

5.1.2.2 Größere Ordnung in der Struktur durch D-Glucuronsäure Na-Salz

Wie in Abb. 29 zu sehen ist, zeichnet sich Probe 22 durch eine große Ordnung in ihrer supramolekularen Struktur aus (500-fache Vergrößerung). Die Schichten dehnen sich über weite Flächen zusammenhängend aus, dabei sind sie bemerkenswert gleichmäßig in ihrer Stärke und ihrem Abstand zueinander. Die Poren (ca. $4\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$), die vermutlich von abgestorbenen Bakterien herrühren, liegen meist in gleichen Höhen nebeneinander, so daß sich BC-Schichten mit Poren-Ebenen abwechseln.

So ergibt sich nicht wie für St(a) ein Bild von zufällig angeordneten Poren mit kleinen Schichten darunter und darüber, die zwar vorzugsweise horizontal, aber in ihrer Höhe gegeneinander versetzt liegen, sondern eine sehr regelmäßige Ansicht. Das könnte in einem Gleichtakt der Generationszeit, zumindest aber im Gleichtakt von absterbenden Zellen begründet sein.

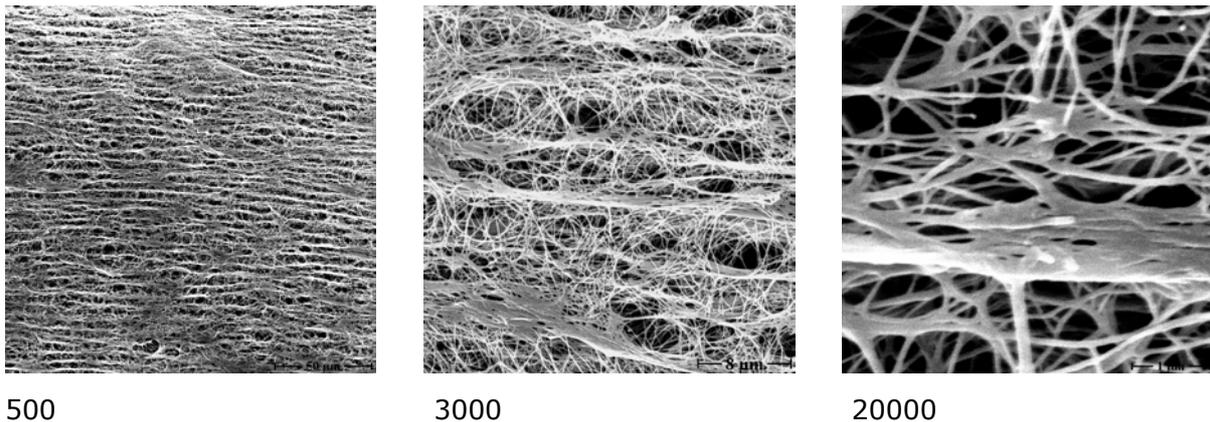
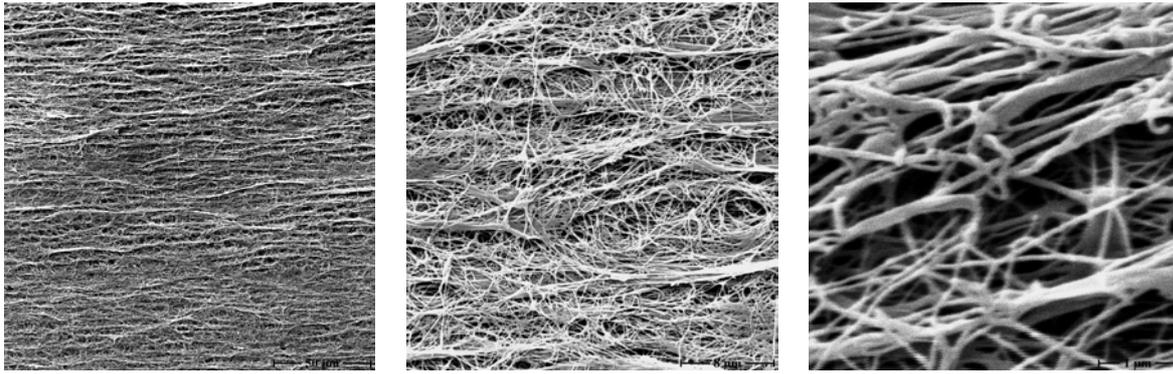


Abb. 29: REM-Aufnahmen von Probe 22 in 500-, 3000- und 20000-facher Vergrößerung

Die 20000-fache Vergrößerung von Probe 22 zeigt im Vergleich zu St(a) (s. 5.1.1 Abb. 24) weniger vereinzelte Fasern, sondern stärkere Faser-Aggregate mit größeren Abständen dazwischen.

Probe 23 weist eine etwas weniger regelmäßige Struktur auf als 22, aber dafür noch stärkere Faserverbände (Abb. 30). Die Porengröße scheint unverändert mit etwa $4\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ im Querschnitt.



500

3000

20000

Abb. 30: REM-Aufnahmen von Probe 23 in 500-, 3000- und 20000-facher Vergrößerung

5.1.3 Porenvergrößerung durch Additive

Abb. 31 zeigt die REM-Aufnahmen der Proben 43, 44, 53, 54 und 64 in 5000-facher Vergrößerung.

In Gegenwart von CMC in der Nährlösung entwickelt sich eine BC-Struktur mit relativ großen Poren. Die Poren erreichen in Probe 44 Maße von etwa $6,5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ im Querschnitt. Wie die Aufnahmen von 44 einer anderen Charge in Abb. 32 verdeutlichen, sind diese Poren größtenteils in gleichen Höhen angeordnet, also nicht statistisch verteilt, was zu einer höheren Ordnung im Strukturbild führt. Starke Cellulose-Schichten wechseln sich mit Poren-Ebenen ab, wobei die Verbindungen zwischen den Schichten nahezu rechtwinklig zu ihnen stehen. Diese senkrechten Vernetzungen sind außerdem viel dünner als die Schichten selbst, sie werden nur von vergleichsweise wenigen, vereinzelt Fasern bewerkstelligt. Es läßt sich natürlich optisch kein Unterschied ausmachen zwischen bakteriell synthetisierter Cellulose und eingelagerter CMC. Die große Schichtdicke im Vergleich zu den scheinbar labilen Schicht-Verflechtungen indiziert allerdings ein CMC-Vorkommen vorrangig innerhalb der horizontalen Schichten.

Im Gegensatz dazu verursacht ein Nährmedium mit MC-Zusatz die Synthese einer BC-Struktur mit leicht vergrößerten Löchermaßen (ca. $5 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ in Probe 54) und nahezu gleich starken Schichten wie Schicht-Verbindungen (Abb. 31). In Probe 54 sind kaum noch einzelne Cellulose-Fasern erkennbar. Sie sind zu mächtigen Aggregaten zusammengeschlossen und beherbergen vermutlich auch die MC-Stränge. Durch MC als Additiv läßt sich also die feine Netzwerk-Struktur der Standard-BC in ein Material mit porösem, dickwandigem, maschenartigen Aufbau modifizieren.

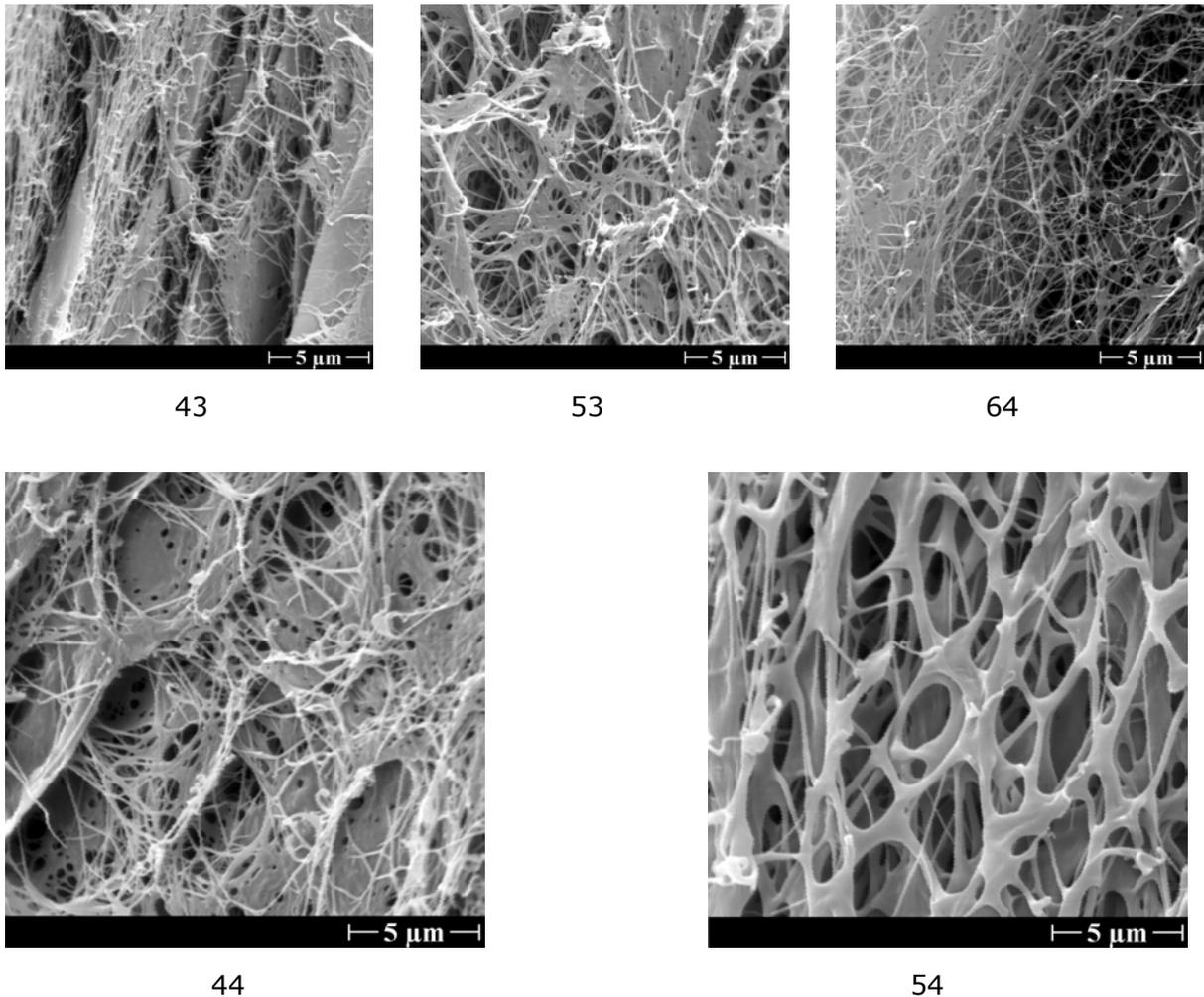


Abb. 31: REM-Aufnahmen der Proben 43, 53, 64, 44, 54 in 5000-facher Vergrößerung (Diese Bilder wurden nicht um 45° gedreht, um die Schichten waagrecht darzustellen.)

Interessanterweise werden den lyophilisierten Kompositen CMC- und MC-BC in der Literatur nach REM-Untersuchungen kleinere Poren im Vergleich zu Standard-BC zugeschrieben. Dabei sollte aber bedacht werden, daß diese Vliese eine Kultivierungszeit von nur 7 Tagen hatten und einer anderen Wasch-Prozedur zugeführt wurden, so daß sie noch 34-45% (m/m) CMC bzw. 11-23% (m/m) MC enthielten. [Tajima et al., 1995]

An anderer Stelle wird erwähnt, daß die Additive CMC und MC die Aggregation der Fibrillen zu Fasern verhindern und die Fibrillen (6-12 nm breit) separiert bleiben. Hier muß berücksichtigt werden, daß die untersuchten Vliese eine Kultivierungsdauer von nur 24 Stunden hatten. [Yamamoto et al., 1996]

Das Bild von 64 zeigt ein homogenes, feines Fasernetz ohne Schichten (Abb 31). Ohne die verstärkten Begrenzungen sind Poren nur schwer auszumachen. Bei genügender Vergrößerung der Aufnahme lassen sich Poren von etwa 3 µm x 1 µm ausmachen.

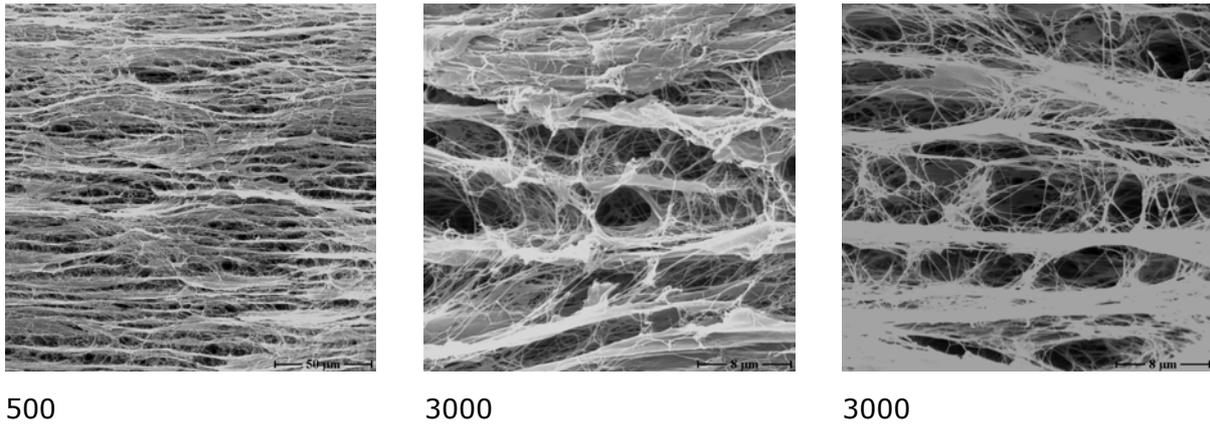


Abb. 32: REM-Aufnahmen der Probe 44 in 500- und 3000-facher Vergrößerung

5.1.4 Faser- und Schichtgrößen im Überblick

Anhand der REM-Aufnahmen lassen sich Faserbreiten und mittlere Schichtdicken abschätzen. Die Ergebnisse wurden in Tab. 10 zusammengetragen. Zur besseren Übersicht sind die im Text schon erwähnten Porengrößen mit aufgelistet. Als Faser gilt der Strang aus verdrehten Mikrofibrillen, den ein Bakterium produziert. Für die Faserbreiten wurden die schmalsten erkennbaren, einzelnen Stränge im Bildvordergrund abgemessen. Sie sind im allgemeinen etwas stärker als 40 bis 60 nm, wie in der Literatur beschrieben wird [Haigler und Benziman, 1982]. Das kann vom Stamm abhängen und an der unterschiedlichen Anzahl an Celluloseketten in einer Mikrofibrille oder an einer unterschiedlichen Anzahl an Mikrofibrillen selbst liegen. Auffällig sind die Faserbreiten von 43, 44, 53 und 54. Es ist nicht auszuschließen, daß der schmalste erkennbare Strang schon ein Aggregat aus zwei Fasern ist. Möglich wäre aber auch eine Faserverbreiterung durch eingelagerte CMC- oder MC-Moleküle.

Tab. 10: Abmessungen von Poren, Fasern und Schichten im Überblick

Proben- bez.	Porengröße im Querschnitt [µm x µm]	Faserbreite [nm]	Schichtdicke [nm]	Bemerkungen zu den Schichten
St(a)	4 x 2	78	80	horizontal, höhenversetzt
15	4 x 2	70	150	wahllos orientiert, kurz
22	4 x 2	69	150	horizontal, sehr lang
43	5 x 3	90	450	horizontal
44	6,5 x 5	120	800	horizontal, sehr lang, kräftig
53	5 x 2,5	100	450	Faser-Aggregate
54	5 x 3	129	900	sehr starke Faser-Aggregate
64	3 x 1	64	-	keine Schichten im Bild

5.2 Erfassung der inneren Oberfläche mittels Physisorption

Die verschiedenen BC-Produkte müßten aufgrund ihrer differenzierten Netzwerk-Struktur eine unterschiedliche innere Oberfläche aufweisen. Aussagen zur inneren Oberfläche und zur Porenstruktur lassen sich bspw. durch volumetrische Sorptionsmessungen machen. Zu diesem Zweck werden je eine N_2 -Adsorptions- und N_2 -Desorptionskurve aufgenommen, wobei sich Physisorptionsisothermen ergeben. Die Physisorption beruht auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Adsorbat (N_2) und Substrat (BC). Zunächst wird die Druckabhängigkeit des dynamischen Gleichgewichts zwischen den freien und den adsorbierten Gasmolekülen und der Oberfläche des Substrats bei 77,35 K im Bereich zwischen 0 und 1013 mbar gemessen. Trägt man die adsorbierte Menge an N_2 über den relativen Druck p/p° (p = gemessener Dampfdruck; p° = Sättigungsdampfdruck) auf, erhält man verschiedene Isothermen-Typen. Anhand dieser Typen lassen sich nach Brunauer, Deming, Deming und Teller z.B. mikroporöse, mesoporöse und makroporöse bzw. unporöse Festkörper unterscheiden [Brunauer et al., 1940]. Dabei werden folgende Größenbereiche unterteilt, wobei r_p dem Radius der Pore entspricht:

- Mikroporen mit $r_p < 1$ nm,
- Mesoporen mit $1 \text{ nm} < r_p < 25$ nm und
- Makroporen mit $r_p > 25$ nm.

Aus den Meßwerten im Bereich $0,05 < p/p^\circ < 0,3$ kann man die spezifische Oberfläche nach Brunauer, Emmett und Teller bestimmen [Brunauer et al., 1938]. Die Auswertung nach dieser BET-Methode berücksichtigt dabei nicht nur die monomolekulare Belegung der inneren und äußeren Substrat-Oberfläche durch N_2 , sondern auch die Adsorption weiterer N_2 -Schichten [Atkins, 1990].

Liegen Mesoporen vor, kommt es zwischen Adsorptions- und Desorptionsisotherme zu einer Hysterese. Diese wird am geometrischen Modell der Zylinderpore durch das Auftreten von Kapillarkondensation erklärt. Zur Berechnung der Porengrößenverteilung und des entsprechenden Porenvolumens wird die Desorptionsisotherme ausgewertet. [Barrett et al., 1951]

Der volumetrische Sorptionsautomat AUTOSORB-1 liefert sowohl den graphischen Kurvenverlauf als auch die rechnerische Auswertung der BET-Oberfläche. Für mesoporöse Stoffe werden zusätzlich der durchschnittliche Porendurchmesser und das spezifische Gesamtporenvolumen ausgegeben.

5.2.1 Der Effekt der Vakuumtrocknung von Bakteriencellulose

In Abb. 33 sind die Sorptionsisothermen von gefriergetrockneter und vakuumgetrockneter Standard-BC St(a) dargestellt, wobei beide im Sorptionsautomat sowohl bei 50°C als auch bei 150°C ausgeheizt und jeweils anschließend vermessen worden sind.

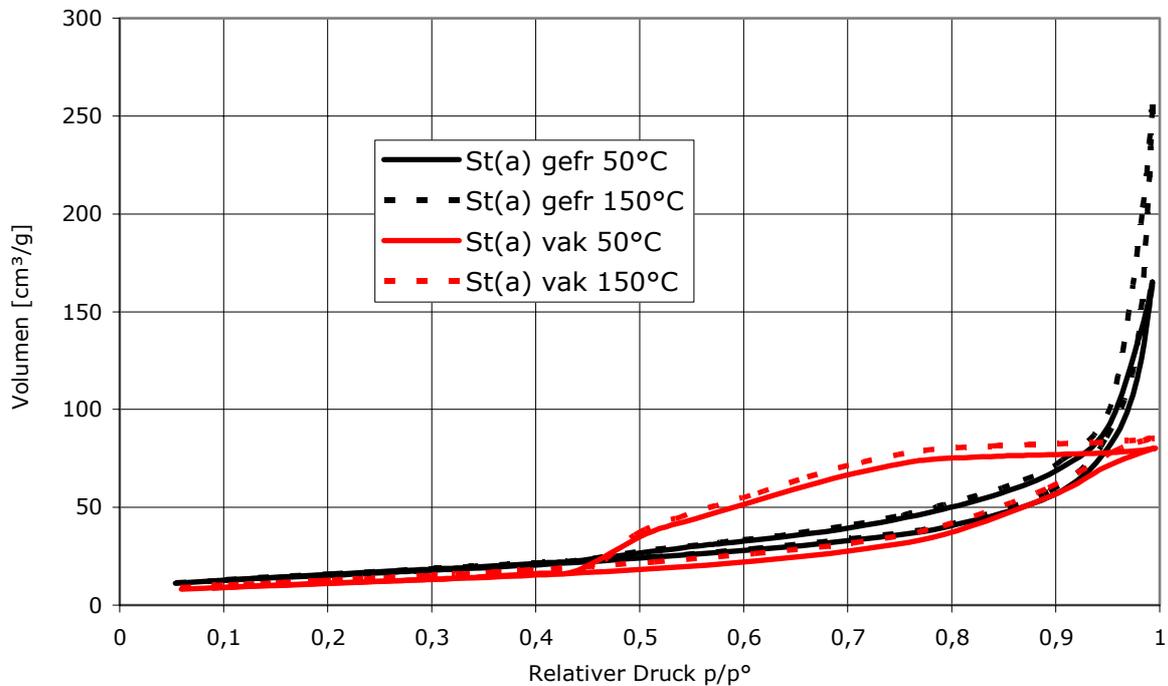


Abb. 33: Physisorptionsisothermen von gefriergetrockneter (gefr) Standard-BC St(a), ausgeheizt bei 50 bzw. bei 150°C, und von vakuumgetrockneter (vak) Standard-BC St(a), ausgeheizt bei 50 bzw. bei 150°C

Die gefriergetrocknete Standard-BC St(a) zeigt einen Physisorptionsisothermen-Typ II, welcher makro- und unporösen Stoffen zugeordnet wird. Der Porendurchmesser ist quasi größer als 50 nm. Die Ausheizung der Probe im Vakuum direkt vor der Messung bewirkt eine Trocknung des hygroskopischen Materials, sozusagen eine Entleerung der Poren. Bis zu einem bestimmten Punkt sollte bei höherer Ausheiztemperatur (T_{Heiz}) entsprechend mehr Platz und Raum für das Adsorptiv N_2 geschaffen werden. Tatsächlich nimmt die spezifische Oberfläche der Probe mit der Ausheiztemperatur zu (Tab. 11). Allerdings ist die Veränderung relativ gering, so daß zugunsten des temperaturempfindlichen Materials entschieden wurde, alle weiteren gefriergetrockneten Proben bei 50°C im Vakuum auszuheizen.

Tab. 11: Ergebnisse der Messung der N₂ – Physisorptionsisothermen für St(a)

Proben- vorbe- reitung	T _{Heiz} [°C]	Iso- thermen- form	spezif. Oberfläche [m ² /g]	Poren- durchmesser [nm]	spezif. Gesamtvolumen für alle Poren mit r _p < 43 nm [cm ³ /g]
gefr	50	II	55,9		
gefr	150	II	56,2		
vak	50	IV	41,2	11,8	0,12
vak	150	IV	48,2	10,8	0,13

Die vakuumgetrocknete Standard-BC St(a) hingegen entspricht der Isothermenform IV, charakteristisch für mesoporöse Festkörper (Abb. 33). Auch hier wirkt sich eine intensivere Ausheizung im Vakuum direkt vor der Messung auf eine größere spezifische Oberfläche für die N₂-Monoschicht aus (Tab. 11). Da sich aber dabei die Probe gelblich verfärbt, wird auch für die restlichen vakuumgetrockneten Proben ein Ausheizen bei 50°C bevorzugt.

Anhand dieser Ergebnisse von gefrier- und vakuumgetrockneter BC läßt sich ausgezeichnet der Effekt studieren, der durch die Vakuumtrocknung eintritt. Bei der Lyophilisierung wird das Vlies zuerst tiefgefroren und anschließend im Vakuum dehydratisiert. Es handelt sich dabei um eine äußerst schonende, die innere Vlies-Struktur erhaltende Sublimationstrocknung. 1 g gefriergetrocknete Standard-BC besitzt 55,9 m² spezifische Oberfläche, auf die sich die N₂-Moleküle verteilen können. Im Vergleich zu spezifischen Oberflächen bekannter Adsorbentien wie Aktivkohle mit 500 - 1500, aktive Aluminiumoxide mit etwa 300 oder Kieselsäuren mit 30 - 800 m²/g ist die spezifische Oberfläche von BC immerhin beachtlich [Römpp, 1995]. Die Poren oder Abstände zwischen den Fasern sind so groß, daß sie über diese Methode nicht erfaßt werden können.

Wird die Substanz dagegen im Vakuum (bei 60°C) getrocknet, ohne daß die Struktur durch Einfrieren stabilisiert wird, fallen durch den angelegten Unterdruck die Makroporen in sich zusammen. Die Schichten und Fasern nähern sich zwangsläufig einander an, wenn das Wasser dazwischen verdampft. Die innere Oberfläche entlang der Fasern verkleinert sich (nur aufgrund örtlicher Zusammendrängung und Überschneidung) relativ wenig (auf 41,2 m²/g), während die Hohlräume im Netzwerk deutlich schrumpfen. Das Zusammenfallen der inneren Struktur verringert den Porendurchmesser auf durchschnittlich 11,8 nm (bei 50°C ausgeheizt).

5.2.2 Kleinere spezifische Oberfläche durch Variation der C-Quelle

Die BC-Proben, die durch Variation der C-Quelle entwickelt worden sind, ähneln im Gesamtbild der Standard-BC St(a). Gefriergetrocknet ergeben sie makroporöse (Abb. 34), vakuumgetrocknet mesoporöse Festkörper (Abb. 35). Alle Proben wurden unmittelbar vor der Aufnahme der Sorptionsisothermen bei 50°C ausgeheizt.

Im Detail weist allerdings die gefriergetrocknete Glycerin-Serie eine kleinere spezifische Oberfläche im Vergleich zu St(a) auf (Tab. 12). Probe 12 hat z.B. eine BET-Oberfläche von 40,2 m²/g. Unter Berücksichtigung der REM-Aufnahmen von St(a) und 12 (s. 5.1.2.1 Abb. 27) ist das darauf zurückzuführen, daß die Fasern von 12 dichter aneinander liegen und stärkere Schichten bilden, wobei sich die einzelnen Faser-Oberflächen überlagern. Nach vakuumgetrockneter Probenvorbereitung zeigt BC 12 ebenfalls eine kleinere spezifische Oberfläche (36,4 m²/g) als vakuumgetrocknete St(a).

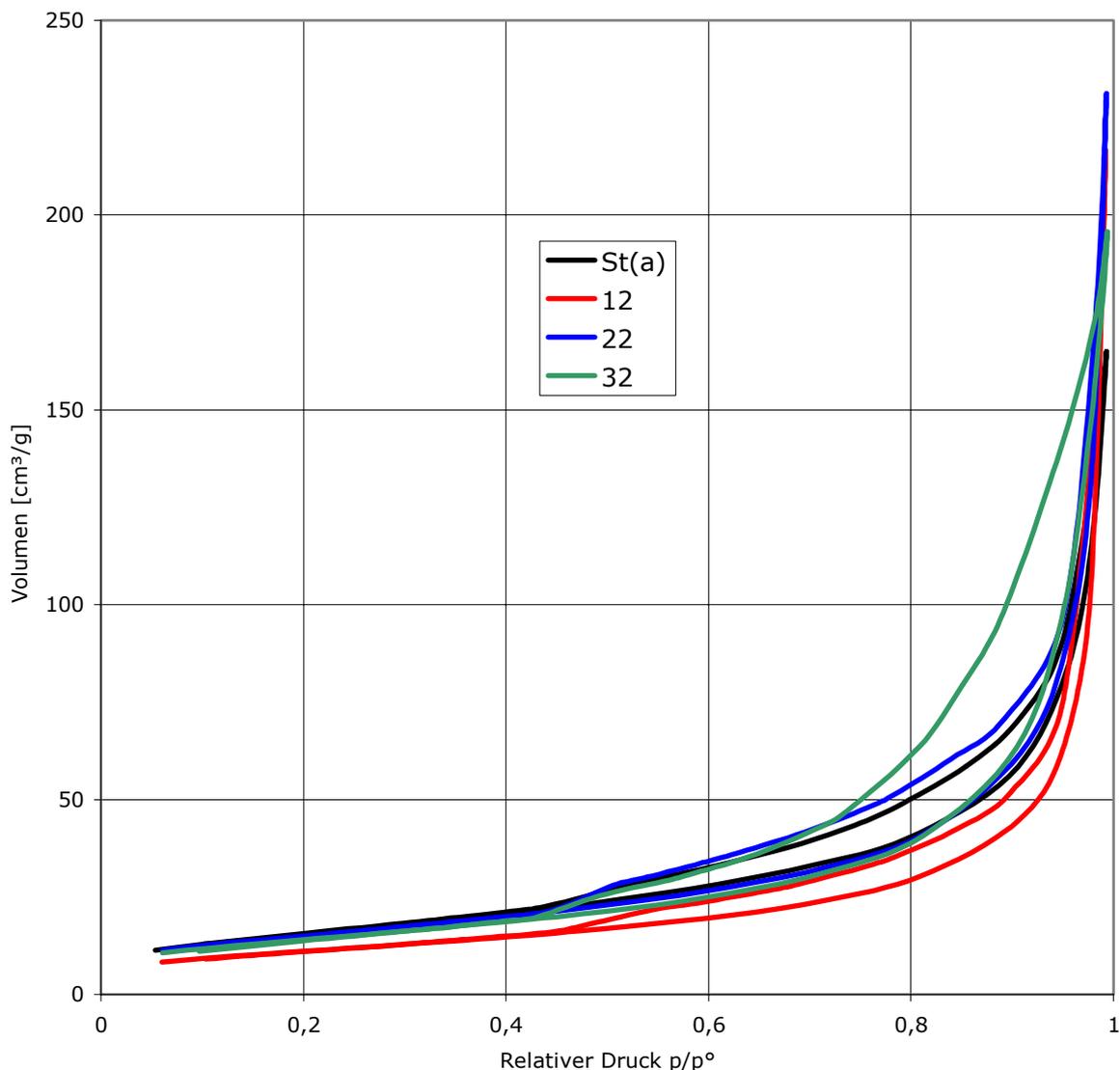


Abb. 34: Physisorptionsisothermen der gefriergetrockneten Proben St(a), 12, 22 und 32

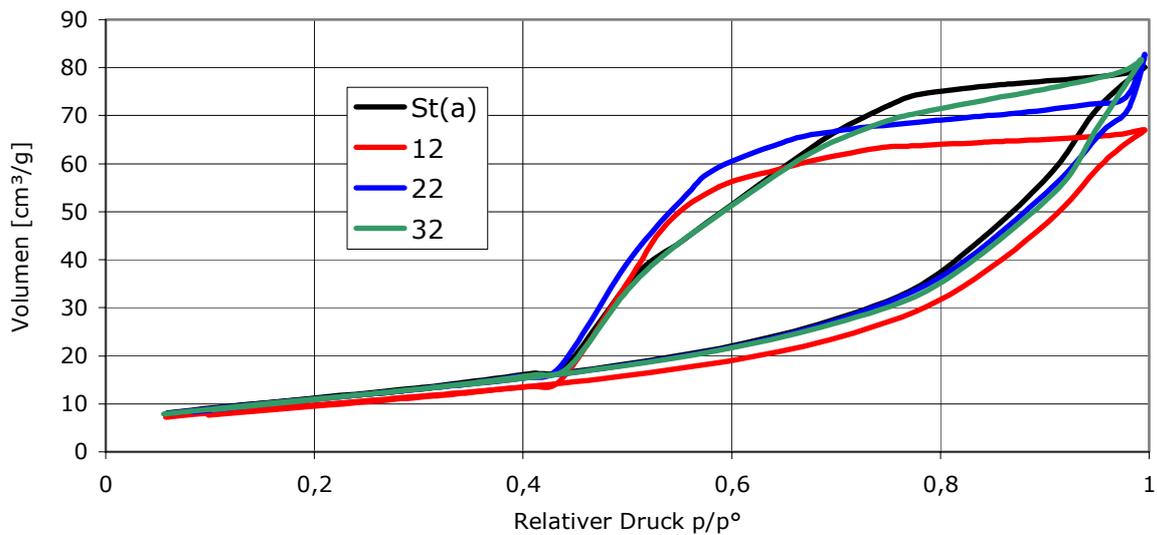


Abb. 35: Physisorptionsisothermen der vakuumgetrockneten Proben St(a), 12, 22 und 32

Tab. 12: Ergebnisse der Messung der N₂ - Physisorptionsisothermen von BC in Abhängigkeit der Variation der C-Quelle im Nährmedium (Ausheiztemperatur 50°C)

Probe	Proben- vorbe- reitung	Iso- thermen- form	spezif. Oberfläche [m ² /g]	Poren- durchmesser [nm]	spezif. Gesamtvolumen für alle Poren mit r _p < 43 nm [cm ³ /g]
St(a)	gefr	II	55,9		
12	gefr	II	40,2		
13	gefr	II	33,7		
14	gefr	II	48,1		
15	gefr	II	45,8		
22	gefr	II	54,8		
23	gefr	II	53,4		
32	gefr	II	50,8		
St(a)	vak	IV	41,2	11,8	0,12
12	vak	IV	36,4	11,3	0,10
22	vak	IV	41,3	11,1	0,14
32	vak	IV	41,4	11,9	0,12

Proben 22, 23 und 32 haben in gefriergetrockneter Form etwas kleinere spezifische Oberflächen als St(a). Die durchschnittlichen Porendurchmesser und spezifischen Gesamtvolumina (für alle Poren mit r_p < 43 nm) der vakuumgetrockneten und damit mesoporösen Proben liegen in der gleichen Größenordnung wie die Werte für St(a).

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß durch die Variationen der C-Quelle mit Glycerin und D-Glucuronsäure die spezifische Oberfläche der Vliese im lyophilisierten Zustand leicht verringert worden ist.

5.2.3 Minimale spezifische Oberfläche durch Additive und Struktur-Kollaps beim Vakuumtrocknen

Alle Produkte der CMC- und MC-Reihen zeigen in gefriergetrocknetem Zustand Isothermenform II, welche makroporösen Substanzen entspricht. Auffallend sind die geringen inneren Oberflächen.

Schon die REM-Aufnahme von 44 (s. 5.1.3 Abb. 32) zeigte große, aufgeweitete Poren, die vorzugsweise in gleichen Höhen lagen. So entstand ein Bild mit großer Ordnung, in dem sich starke, lange und parallele BC-Schichten mit Poren-Ebenen abwechselten. Diese Charakteristik widerspiegelt sich auch in den Ergebnissen der Physisorption. Probe 44 (makroporös) weist im gefriergetrockneten Zustand eine BET-Oberfläche von nur 32 m²/g auf, sie ist damit sogar kleiner als 41,1 m²/g von vakuumgetrockneter Standard-BC St(b) (Tab. 13). CMC scheint bei der Aggregation der Fasern zu Schichten eine wesentliche Rolle zu spielen. Der Effekt der Verkleinerung der spezifischen Oberfläche in der CMC-Serie steht jedoch nicht in direktem Zusammenhang zur zugegebenen CMC-Menge.

Probe 54 (makroporös) zeigt die kleinste BET-Oberfläche aller gefriergetrockneten BC-Vliese mit 26,4 m²/g (Tab. 13). Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit dem REM-Bild (s. 5.1.3 Abb. 31) überein, das kaum einzelnen Fasern zeigte, sondern eine poröse Struktur mit dicken, glatten Wänden, also weniger Oberfläche. Der Zusatz MC im Nährmedium sorgt vermutlich für eine stärkere Anziehung zwischen den Fasern. Die spezifische Oberfläche wird in der MC-Reihe kleiner, je mehr MC der Nährlösung zugesetzt wurde.

Tab. 13: Ergebnisse der Messung der N₂ – Physisorptionsisothermen von BC in Abhängigkeit von Additiven im Nährmedium (Ausheiztemperatur 50°C)

Probe	Probenvorbereitung	Isothermenform	spezif. Oberfläche [m ² /g]
42	gefriergetrocknet	II	51,4
43	gefriergetrocknet	II	30,1
44	gefriergetrocknet	II	32,0
52	gefriergetrocknet	II	50,1
53	gefriergetrocknet	II	40,1
54	gefriergetrocknet	II	26,4

Bei Vakuumtrocknung der CMC- und der MC-Serien tritt ein interessantes Phänomen auf. Die Proben haben nach dem Prozeß der Vakuumtrocknung praktisch keine Hohlräume mehr. Es ist weder eine innere Oberfläche noch eine Porengröße meßbar. Die Physisorptionsisothermen zeigen einen deutlich anderen Kurvenverlauf als St(b) (Abb. 36 und 37).

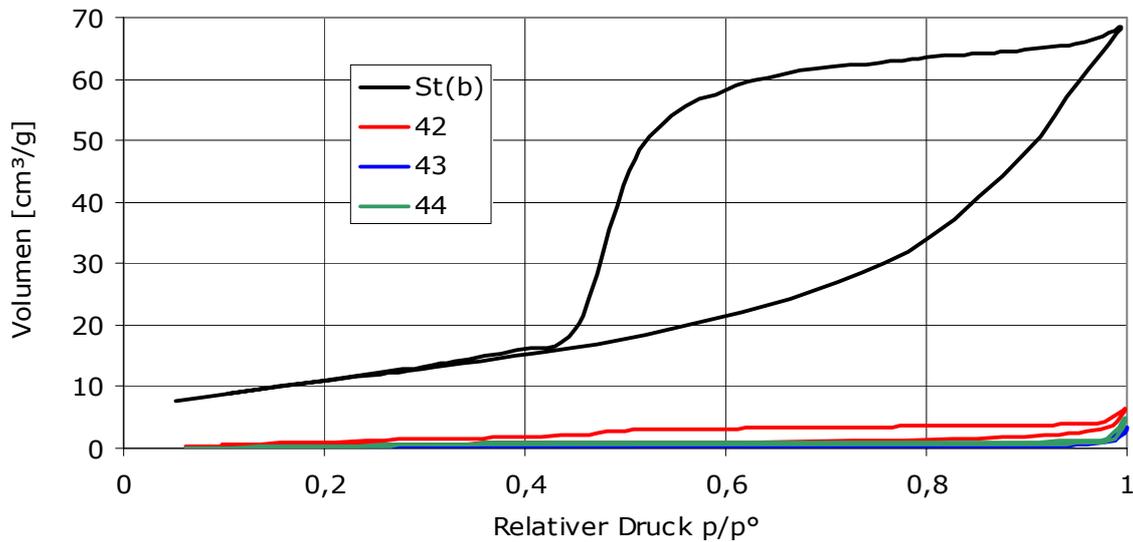


Abb. 36: Physisorptionsisothermen der vakuumgetrockneten Proben St(b), 42, 43 und 44

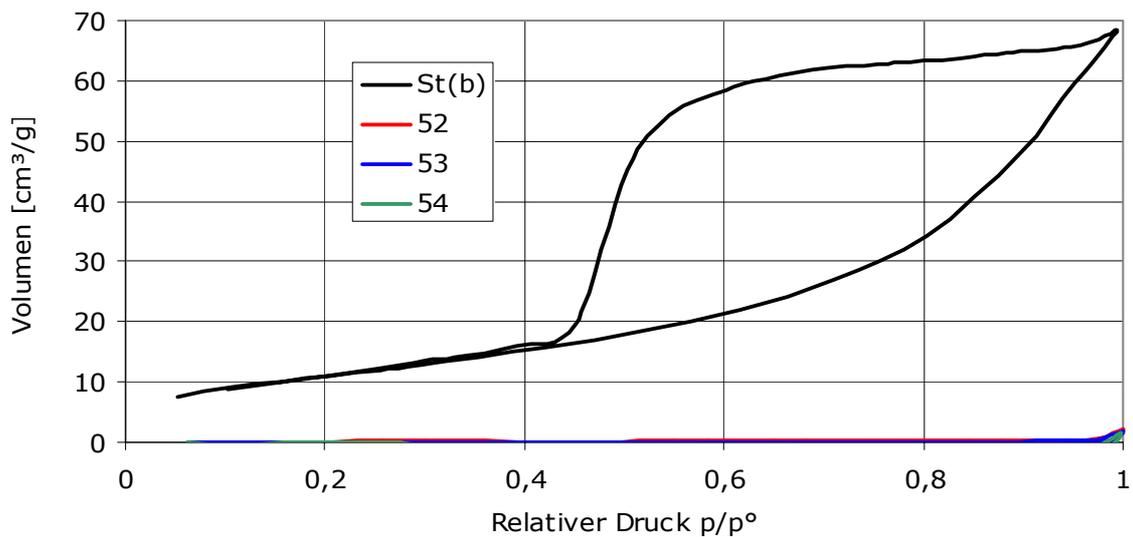


Abb. 37: Physisorptionsisothermen der vakuumgetrockneten Proben St(b), 52, 53 und 54

Bei der Suche nach den Ursachen für dieses Erscheinungsbild sollte man sich die gefriergetrockneten Strukturen von 44 und 54 vergegenwärtigen (s. 5.1.3 Abb. 31 und 32). Die Fasern liegen in großen Verbänden zusammen, das bedeutet, die Poren dazwischen sind nahezu faserfrei, und im niemals getrockneten Stadium nur von Wasser ausgefüllt. Die Tendenz in Richtung faserfreie Poren ist bei Probe 54 (2% MC) noch stärker ausgeprägt als bei 44 (2% CMC). Dieses fehlende Stützgeflecht, das alle anderen Proben (St(a) und St(b) sowie die durch Variation der C-Quelle entstandenen) haben, bewirkt einen totalen Kollaps der Poren bei anliegendem Unterdruck. Die parallelen Schichten werden ohne Hindernis aneinandergesaugt, und aus dem anfänglich ca. 1 cm dicken Vlies wird eine superdünne Folie. Mikroskopisch besteht sie immer noch aus den einzelnen BC-Schichten, aber makroskopisch ist sie flach und plan.

Die Skizze in Abb. 38 soll den Zusammenhang zwischen dem unterschiedlichen Vlies-Aufbau (grobporig oder netzwerkartig) und der resultierenden Struktur nach dem Vakuumtrocknen veranschaulichen. Der totale Zusammenbruch der Hohlräume (links) erklärt das verschwindend geringe spezifische Volumen im vakuumgetrockneten Zustand, während sich aus einem Netzwerk-Aufbau (rechts) Mesoporen ergeben.

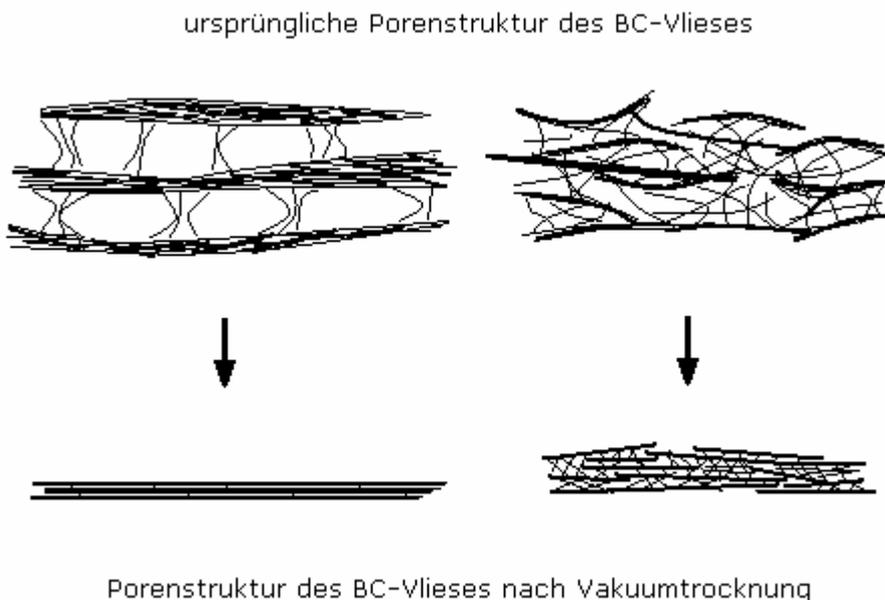


Abb. 38: Skizze von BC-Vlies-Strukturen vor und nach dem Vakuumtrocknen

Aus welchem Grund sind die Additive CMC und MC aber in der Lage, solche drastischen Veränderungen im BC-Material hervorzurufen, so daß bei Vakuumtrocknung der BC-Aufbau in sich zusammenstürzen kann? CMC und MC sind kommerziell erhältliche pflanzliche Cellulose-Derivate, CMC ist ein Carboxymethylether, MC ein Methylether von Cellulose. Die Einführung der funktionellen Gruppen mit vermutlich statistischer Verteilung entlang der Ketten in die Cellulose dient in erster Linie dazu, die pflanzliche Cellulose überhaupt wasserlöslich zu machen.

Beiden Additiven ist zwar die Ether-Gruppe gemeinsam, wobei es sich aber in einem Fall um einen Alkyl-Ether der Cellulose handelt (kleiner, unpolarer Rest) und im anderen Fall um einen Hydroxyessigsäure-Ether (mit einem stark polaren Carbonsäure-Rest). Aufgrund dieses enormen Unterschiedes der Substituenten kann also nicht die Art des Substituenten die Ursache für die Struktur-Veränderung der BC in beiden Fällen sein.

Der Substituenten-Typ differenziert sicherlich Art und Stärke der zwischenmolekularen Kräfte, die sich beim Anlagern von Additiv-Molekülen an BC-Stränge ergeben. Schon in frühen Arbeiten wurde vermutet, daß CMC aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Carboxyl-Gruppen zunächst die Kristallisation und Aggregation der BC-Fibrillen verzögert [Ben-Hayyim und Ohad, 1965]. So werden bis zu 1% aller Fibrillen durch CMC-Anlagerung schmaler in ihrem Durchmesser und liegen separat vor, also nicht zu Fasern verdrillt, was mit der Abnahme des Anteils an Cellulose I α korreliert [Hirai et al., 1998].

Dieser ladungsabhängige Effekt der CMC kann für MC nicht gelten, kann also nicht die Ursache für das Phänomen sein, daß BC-Strukturen entstehen, die im Vakuum kollabieren. Die Cellulose-Ether CMC und MC haben außer der Wasserlöslichkeit noch eine Gemeinsamkeit. Sie bestehen aus kürzeren Ketten als die Bakteriencellulose. Eine GPC-Untersuchung der verwendeten Additive hat die in Tab. 14 zusammengefaßten Daten ergeben.

Tab. 14: GPC-Ergebnisse der Additive CMC und MC

Additiv	M _w [g/mol]	M _n [g/mol]	PDI	DP _w	DP _w
CMC	65910	11230	5,9	374 (DS=1)	390 (DS=0,5)
MC	43700	3793	11,5	136 (DS=2)	155 (DS=1,5)

Im Vergleich zu den BC-Wiederholungseinheiten in den Proben 44 und 54 von 7772 bzw. 7284 sind die DP_w-Werte von CMC und MC sehr gering. Das heißt, die im Nährmedium gelösten Additive sind beweglicher, zumal die langen BC-Ketten noch zu Mikrofibrillen und Fasern verdreht sind. CMC und MC könnten sich also an naszierende BC-Fasern aufgrund von zwischenmolekularen Kräften anlagern und sich dabei der gegebenen Form und Ausrichtung anpassen. Die Ausbildung weiterer Nebervalenzbindungen zu anderen Additiv-Molekülen könnte dabei helfen, Räume zwischen getrennt und starr liegenden BC-Fasern zu überbrücken (Abb. 39). So können vermutlich auch ferne und nicht parallele BC-Fasern in einen Verband eingliedert werden. Die Tatsache, daß CMC als waschmittelaktive und MC als oberflächenaktive Substanzen bekannt sind [Römpp, 1995], unterstützt diese Theorie noch. Je stärker aber die Verbände und Schichten werden (kleinere Innenoberfläche), um so weniger freie Fasern liegen natürlich außerhalb dieser Porenwände vor, und um so weniger gestützt sind dadurch die Hohlräume bei Anlegen eines starken Unterdruckes, so daß sie regelrecht kollabieren können.

In Gegenwart von 2% (m/V) Additiv sind in 30 ml Nährlösung 600 mg Zusatz, d.h. etwa 9,10 μmol CMC (Probe 44) bzw. 13,7 μmol MC (Probe 54) unter Einbeziehung des M_w (Tab. 14), enthalten. Wenn etwa 10% an Additiv CMC nach der Wasch-Prozedur im Vlies eingelagert bleiben, wie die HPLC-Daten ergaben (s. 3.3 Tab. 6), sind quasi noch etwa 0,91 μmol CMC im Produkt 44 vorhanden. Für 54 ergeben sich bei 10% MC-Einlagerung 1,37 μmol MC, wobei aufgrund einer höheren Produkt-Ausbeute der Wert wahrscheinlich noch nach oben korrigiert werden müßte. Legt man die St(b)-Masse mit 235,6 mg (ohne Additiv-Einbau) und die M_w -Werte (s. 4.2 Tab. 8 und 4.3 Tab. 9) zugrunde, ergeben sich für 44 0,187 μmol und für 54 0,199 μmol BC-Ketten. Weiterhin muß man bedenken, daß sich die einzelnen BC-Moleküle zu Mikrofibrillen von 10 – 15 Glucan-Ketten vereinigen und diese noch zu Fasern aus 50 – 80 Mikrofibrillen [Pilz, 2001]. Damit bleiben durchschnittlich 0,23 nmol BC-Fasern im Vlies 44 und 0,24 nmol in 54. Es kommen also auf 1 Faser etwa 4000 – 5000 Additiv-Moleküle.

Diese Überschlagsrechnung macht die Theorie eines Additiv-BC-Verbandes zumindest vorstellbar. MC scheint gegenüber CMC noch engere Verbände zwischen den BC-Fasern hervorzurufen (glatteres Aussehen der Porenwände im REM-Bild, kleinste spezifische Oberfläche für 54), unabhängig von ihrer Orientierung zur Oberfläche, woraus gleich starke Struktur-Wände und faserleere Poren resultieren. CMC hingegen verbindet eher die horizontalen Fasern zu Schichten und weitert damit die Höhen der Poren stark aus (auf etwa 5 μm statt 2 μm). Aber in beiden Fällen könnten die nahezu faserfreien (durch CMC-BC-Verbände) bzw. faserleeren (durch MC-BC-Verbände) Poren die Ursache für den Struktur-Kollaps beim Vakuumtrocknen sein.

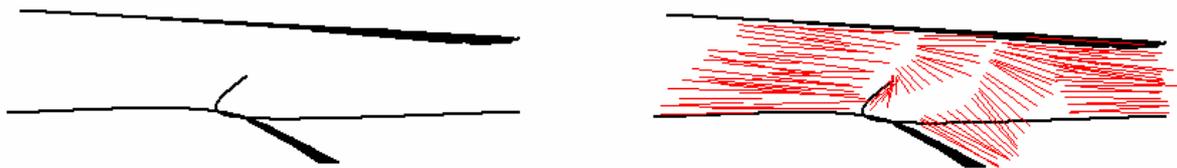


Abb. 39: Skizze zu einzeln vorliegenden Fasern im BC-Netzwerk (links) und zur Einbindung dieser Fasern in Verbände durch (rote) Additiv-Moleküle (rechts)

6 Verbesserung von charakteristischen Eigenschaften der Bakteriencellulose

6.1 Steigerung des Wassergehaltes

Eine wichtige Eigenschaft von Bakteriencellulose ist ihr ausgezeichnetes Wasserrückhaltevermögen im niemals getrockneten Zustand [White und Brown, 1989; Brown, 1992]. Die Wasserkapazität eines BC-Vlieses ist natürlich stark abhängig vom strukturellen Aufbau, also von innerem Volumen und spezifischer Oberfläche. Je größer die innere Oberfläche ist, um so mehr Wasser kann direkt adsorbiert werden. Hier kommen Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Wasser und OH-Gruppen der BC in Frage. Die Netzwerk-Zwischenräume müssen eine Mindestgröße haben, so daß Wassermoleküle hineinpassen, und eine Maximalgröße, bis zu der Wassermoleküle als Assoziat tropfsicher festgehalten werden können. Bieten sich ideale Raumverhältnisse für solche Wasser-Assoziat, spielt die innere Oberfläche keine große Rolle mehr, und die Wasserkapazität dürfte enorm ansteigen.

Die Bestimmung der Wasserkapazität ist eine ausgezeichnete Analyse, bei der das Material nicht getrocknet werden muß. Man erhält quasi Eigenschaftsmerkmale der Produkte im Original-Zustand. Allerdings kann man auch von gefriergetrockneten Vliesen eine Wasserkapazität ermitteln, nachdem sie in Wasser regequollen wurden. Die Ergebnisse können dann mit den Aussagen zur Porenstruktur von gefriergetrockneten Vliesen aus der REM und Physisorption verglichen werden.

Um die Wasserkapazität einer Substanz zu messen, wird sie zunächst 15 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute auf einer Fritte zentrifugiert. Durch das Schleudern werden alle Proben standardmäßig vorbereitet, und es wird bestimmt, wieviel Wasser eine Probe unter diesen Bedingungen zurückhalten kann. Anschließend wird die Probe gewogen ($m_{\text{naß}}$), bis zur Masse-Konstanz getrocknet und das Trockengewicht bestimmt (m_{trocken}). Die Differenz zwischen Naß- und Trockengewicht entspricht der Wassermasse, die in der Probe enthalten war.

Das in der Fachliteratur übliche Wasserrückhaltevermögen (WRV) bezieht sich auf das Trockengewicht und errechnet sich nach [Jayme und Rothamel, 1948]:

$$\text{WRV} = \frac{m_{\text{naß}} - m_{\text{trocken}}}{m_{\text{trocken}}} \cdot 100\% .$$

Um eine anschauliche Demonstration der Produkt-Eigenschaft zu gewährleisten, wurde für diese Arbeit der Terminus Wassergehalt gewählt. Der Wassergehalt (WG) ergibt sich aus der Wassermasse, bezogen auf das Gesamtgewicht der Probe:

$$WG = \frac{m_{\text{naß}} - m_{\text{trocken}}}{m_{\text{naß}}} \cdot 100\% .$$

In Abb. 40 wird die Beziehung zwischen WRV und WG verdeutlicht. Während der WG maximal 100% erreichen kann, geht das WRV gegen unendlich.

Für Bakteriencellulosen sind Wassergehalte zwischen 80 und 98% der Naßmasse relevant. Gerade in diesem Bereich sind enorme Differenzen in den entsprechenden WRV-Werten, was sich auf die Fehler-Statistik auswirkt. Hat man z.B. für eine Probensorte 3 Meßwerte für die Wassermasse, die Wassergehalten von 92, 93 und 94% entsprechen, errechnet sich ein Mittelwert von $WG = 93\%$ mit einer Standardabweichung $s = 1\%$. Gibt man aber das WRV aus diesen 3 Meßergebnissen an, ergeben sich die Werte 1150, 1329 und 1567%. Diese lassen sich durch den Mittelwert $WRV = 1349\%$ mit $s = 209\%$ ausdrücken. Einerseits wird der Mittelwert im WRV immer nach oben verfälscht (1349% WRV entsprechen mehr als 93% WG), andererseits streuen die Werte des WRV viel stärker, man erhält also größere Standardabweichungen zum WRV, insbesondere bei großen Wasserkapazitäten. Diese Problematik wird durch die Angabe des Wassergehaltes umgangen.

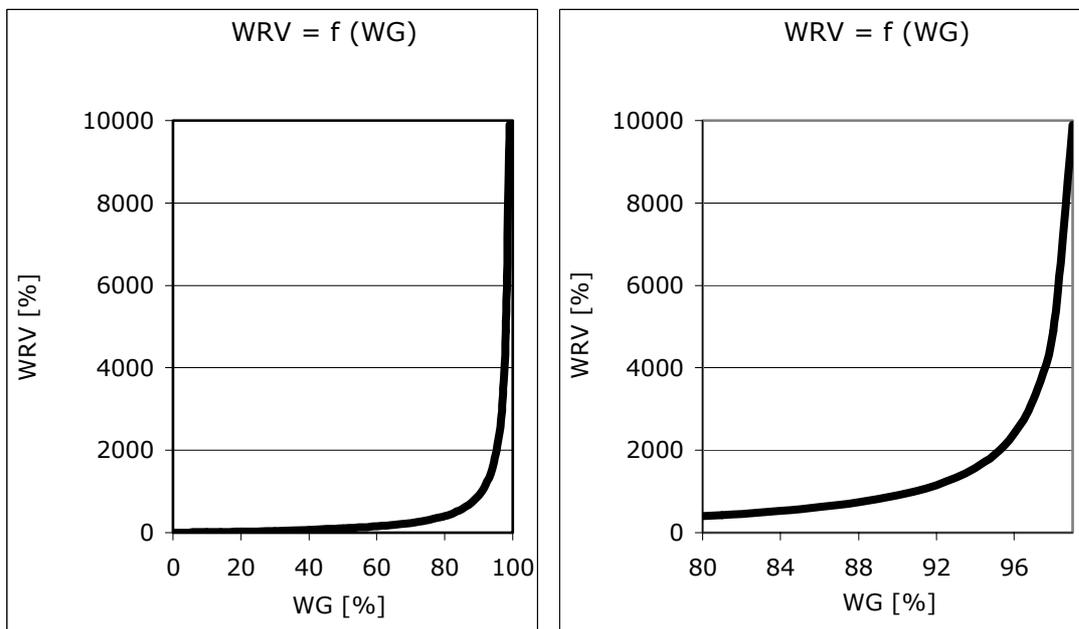


Abb. 40: Beziehung zwischen Wasserrückhaltevermögen (WRV) und Wassergehalt (WG)

Außerdem konnte die Methode zur Bestimmung des Wassergehaltes verfeinert werden. Während beim herkömmlichen Verfahren die Proben auf Fritten sowohl zentrifugiert als auch anschließend naß gewogen, vakuumgetrocknet und trocken gewogen worden sind, werden sie nach der neuen Methode auf trockenen Wägegläschen gewogen und

getrocknet. Das schließt ein mögliche Mitbestimmung der Wasserkapazität der Fritten aus und vermeidet somit Fehler und unnötige Meßwertschwankungen.

Wie Abb. 41 zeigt, ist der tatsächliche Wassergehalt der niemals getrockneten BC-Vliese niedriger als bisher angenommen. Die Ergebnisse wurden im Rahmen der Forschung zu BASYC-Röhrchen erhalten. Alle für Abb. 41 verwendeten Proben wurden von AX5 (Stamm des IOMC der Universität Jena) in 40 ml HS-Medium innerhalb von 14 Tagen synthetisiert, ein Teil bei der Firma SurA Chemicals (Jena) und ein Teil am IOMC. Bei den BC-Vliesen der Firma SurA ist eine größere Differenz zwischen dem WG nach alter und neuer Bestimmungsmethode zu verzeichnen als bei den Vliesen des IOMC. Das kommt dadurch zustande, daß bei den SurA-Proben mehr Wasser beim Zentrifugieren abgeflossen ist (der tatsächliche WG von SurA-Vliesen ist kleiner als von IOMC-Vliesen), es haftete demzufolge mehr Wasser in den Fritten und täuschte nach der alten Methode einen größeren WG vor.

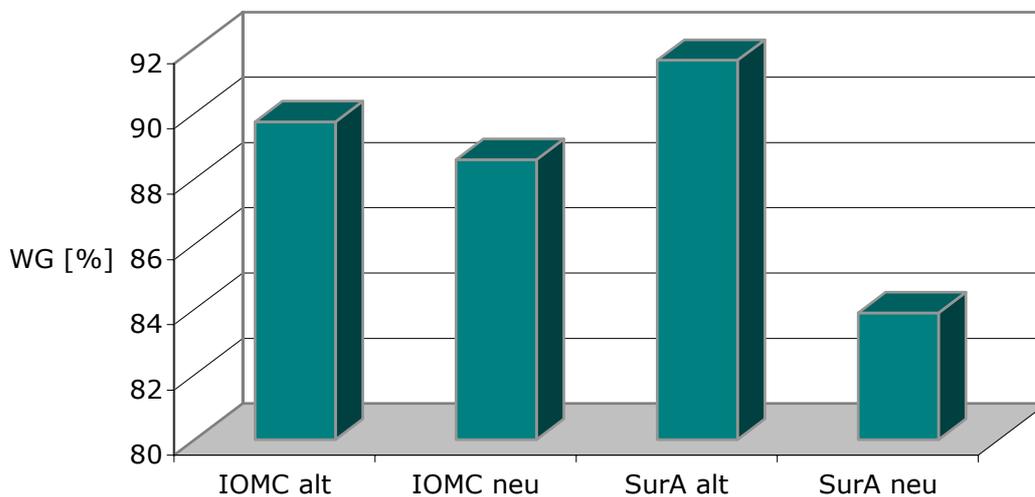


Abb. 41: Darstellung des Wassergehaltes von niemals getrockneten BC-Vliesen des Institutes für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie (IOMC) und der Firma SurA Chemicals (SurA) nach der alten und neuen Bestimmungsmethode

Für die Vergleichsprobe St(a) wurden sowohl von 5 niemals getrockneten als auch von 5 gefriergetrockneten Vliesen unterschiedlicher Chargen die Wassergehalte bestimmt. Dabei wurde jedes Vlies in 4 Viertel geteilt, um den Einfluß des Meßfehlers gering zu halten. Dabei ergab sich für die niemals getrocknete Standard-BC St(a) ein Wassergehalt von 87,45% mit $s_{orig} = 1,65\%$ und $RSA_{orig} = 1,89\%$ ($n=20$). Für gefriergetrocknete St(a) belief sich der Wassergehalt auf 79,67% mit $s_{gefr} = 3,01\%$ und $RSA_{gefr} = 3,78\%$ ($n=20$). Die Meßwerte der lyophilisierten Proben schwanken deutlich mehr, allerdings chargenabhängig. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Gefrier Trocknung nicht exakt reproduzierbar ist.

Tab. 15: Wassergehalte von niemals getrockneten (orig) und gefriergetrockneten (gefr) BC-Vliesen, die durch Variation der C-Quelle entstanden sind

	St(a)	12	13	14	15	22	23	32
WG _{orig} [%]	87,45 s _{orig} = 1,65%	85,91	86,45	86,14	86,89	88,27	86,89	87,9
WG _{gefr} [%]	79,67 s _{gefr} = 3,01%	79,06	79,76	76,98	77,85	77,41	80,66	84,54

Wie aus Tabelle 15 hervorgeht, sind die Wassergehalte bei allen Proben, die aus der Variation der C-Quelle hervorgegangen sind, im gefriergetrockneten Zustand kleiner als im Originalzustand. Ursache ist die irreversible Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Fasern, die erst nach Entfernung des Wassers aus dem Netzwerk, also bei Trocknung einsetzt [Colvin und Leppard, 1977]. Deshalb kann trotz der strukturschonenden Gefriertrocknung anschließend weniger Wasser re-adsorbiert werden.

In Anbetracht der Standardabweichungen s_{orig} und s_{gefr} muß bei kritischer Betrachtung gesagt werden, daß sich die Wassergehalte innerhalb der niemals getrockneten bzw. der gefriergetrockneten BC-Proben nur unwesentlich ändern.

In Abb. 42 sind die Wassergehalte der niemals getrockneten BC-Vliese dargestellt, die in Gegenwart der WSP erhalten werden konnten. Als Vergleich dient St(b) mit einem WG_{orig} von 87,2%. Hier zeichnet sich in der CMC- und MC-Reihe eine deutliche Zunahme der Wasserkapazität gegenüber St(b) ab [Seifert et al., 2004].

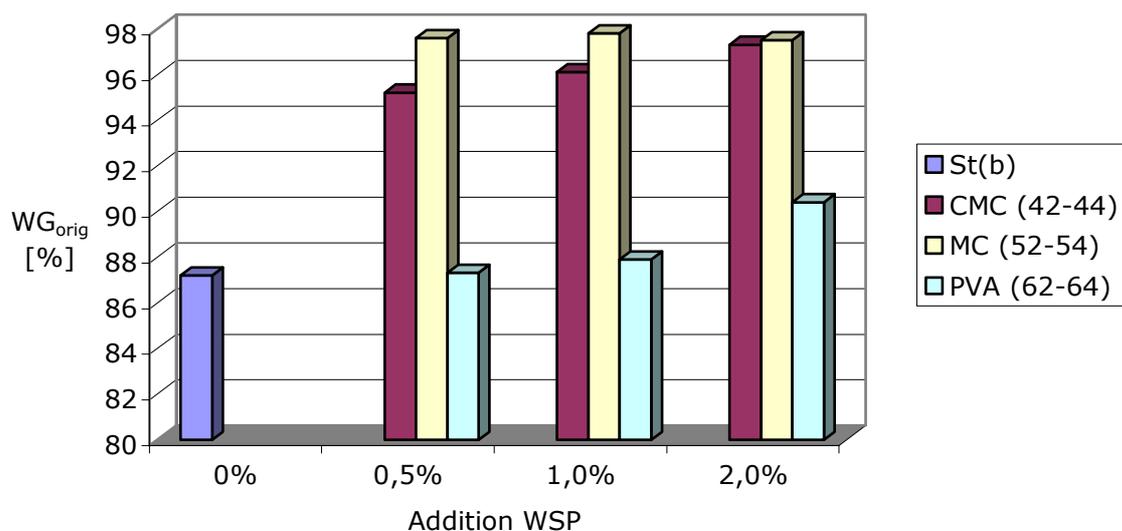


Abb. 42: Wassergehalte von niemals getrockneten BC-Vliesen, die unter Zusatz von CMC, MC bzw. PVA produziert wurden

Schon durch Addition von 0,5% MC zur Nährlösung (Probe 52) steigt der WG auf 97,6%. Auch unter Zusatz von 2% CMC (Probe 44) gewinnt man eine BC, die im Original-Zustand 97,3% Wasser enthält.

Auch in gefriergetrockneter Form besitzen die Produkte, die in Anwesenheit der Additive CMC und MC während der Kultivierung gewonnen wurden, eine enorme Wasserkapazität (Abb. 43). Während St(b) einen WG_{gefr} von nur 73,3% hat, besteht Probe 52 nach Requellung zu 92,8% aus Wasser. Probe 44 erreicht sogar einen WG_{gefr} von 95,9%. Dagegen läßt sich durch Zugabe von 0,5% PVA zur Nährlösung der Wassergehalt deutlich verringern auf 61,9%. [Seifert et al., 2004]

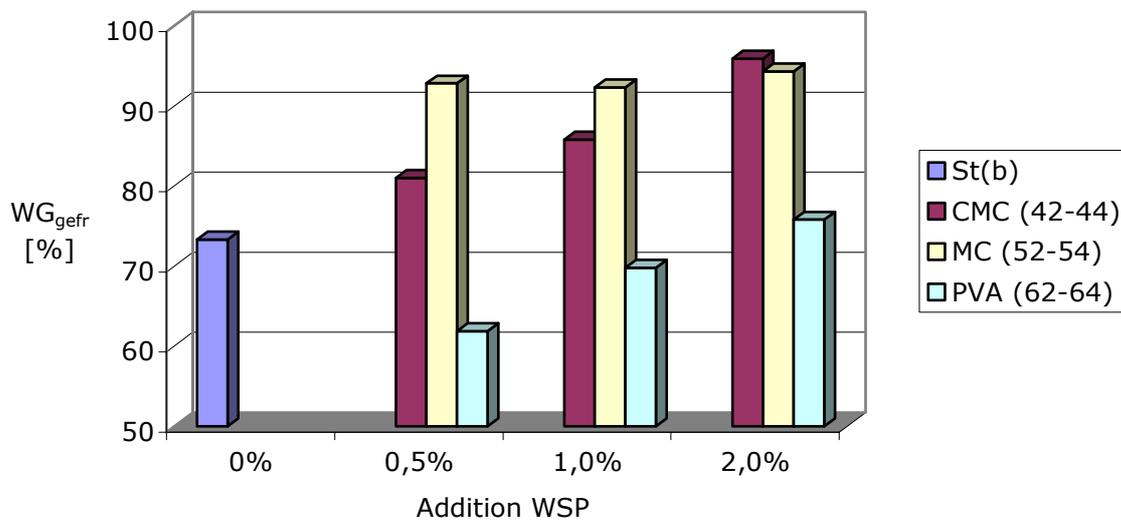


Abb. 43: Wassergehalte von gefriergetrockneten BC-Vliesen, die unter Zusatz von CMC, MC bzw. PVA produziert wurden

In der CMC-Reihe tritt dabei eine Abhängigkeit von steigendem WG mit höherem WSP-Zusatz zur Nährlösung zutage, sowohl im niemals getrockneten als auch im lyophilisierten Zustand. Dagegen scheint der Anstieg des WG durch MC unabhängig von der im Rahmen dieser Arbeit zugesetzten Menge zu sein.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Wassergehalte der BC aus den CMC- und MC-Serien zu überprüfen, wurde die Untersuchung ca. 2 Jahre später wiederholt. Bei dieser 2. Studie ergeben sich für die Vliese im Original-Zustand vergleichbare WG-Werte zur 1. Studie (Abb. 44). Die Mittelwerte resultieren aus jeweils 2 Vliesen, also 8 Messungen. Es zeigt sich wieder ein positiver Einfluß der addierten CMC-Menge auf den WG. Erst bei 2% CMC-Zugabe zur Nährlösung (44) wird der maximale WG_{orig} von 97,7% erzielt. Hingegen genügen innerhalb der MC-Serie schon 0,5% Additiv (52), um den größtmöglichen WG_{orig} von 97% zu erlangen. Die Wiederholstudie bescheinigt also eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der bemerkenswerten Wasserkapazitäten.

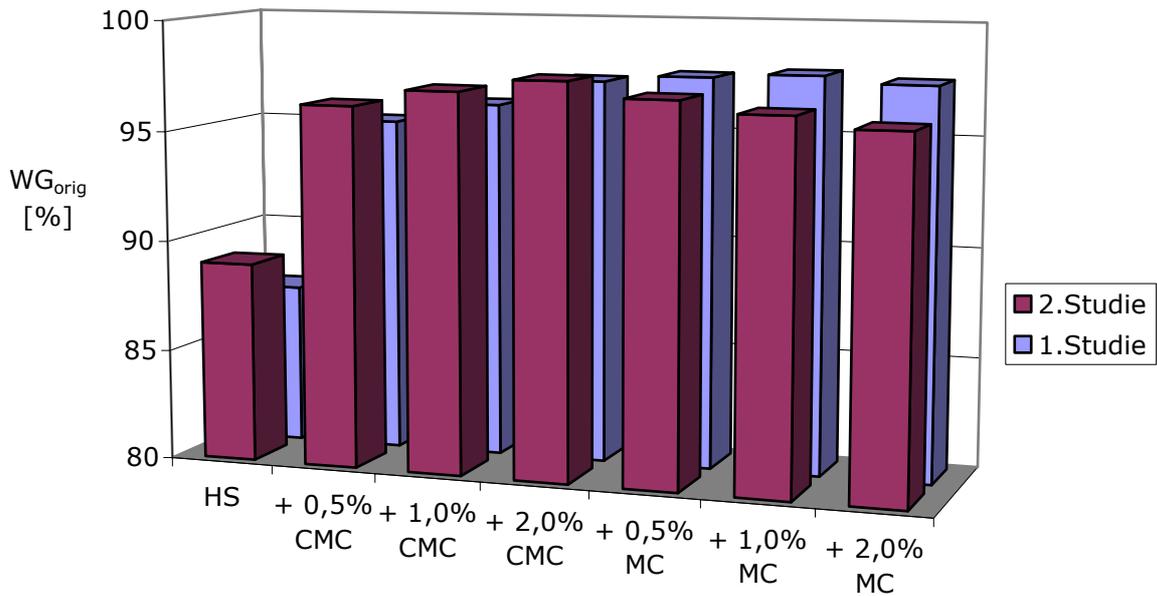


Abb. 44: Vergleich der Wassergehalte von niemals getrockneten BC-Vliesen, die unter Zusatz von CMC bzw. MC produziert wurden, aus der 1. Studie (2001) und der 2. Studie (2003)

Außerdem wurden jeweils 2 Vliese der BC-Produkte, die in Gegenwart von CMC bzw. MC in der 2. Studie synthetisiert wurden, gefriergetrocknet und in Wasser regequollen, um WG_{gefr} zu bestimmen. Dieser Vorgang ist dreimal wiederholt worden, wobei pro Produkt ein WG_{gefr} für die 1., 2. und 3. Requellung (a 8 Meßwerte) resultiert. Setzt man den Wassergehalt, den eine Probe bei der 1. Requellung erreicht ($WG_{\text{gefr}1.}$), 100%, so ergeben sich bei den wiederholten Requellungen an ein und derselben Probe die in Tab. 16 aufgelisteten Relativwerte. Durch eine besonders gute Requellbarkeit nach bis zu 3 Trocknungszyklen zeichnen sich Proben 44 und 52 aus.

Tab. 16: Wassergehalte der CMC- und MC-Reihen aus wiederholten Requellungen im Verhältnis zum $WG_{\text{gefr}1.}$

	St(b)	42	43	44	52	53	54
$WG_{\text{gefr}1.}$ [%]	100	100	100	100	100	100	100
$WG_{\text{gefr}2.}$ [%]	99	99	94	100	100	98	95
$WG_{\text{gefr}3.}$ [%]	98	95	91	100	99	93	90

Allerdings liegen alle Daten des lyophilisierten Materials in der 2. Studie um 10-15% niedriger als in der 1. Studie. Die Ursache scheint ein Fehler zu sein, der während der Gefriertrocknung aufgetreten ist.

Mit der Entwicklung von Produkten mit ausgezeichneten Wasserrückhaltefähigkeiten eröffnen sich prinzipiell einige Anwendungsmöglichkeiten. Zum einen bietet sich ein Einsatz als Wundauflage an, bei dem äußere Wunden vor Austrocknung geschützt werden sollen. Zum anderen ließen sich Adsorbentien aus biologischem Material gewinnen, welche in trockenem Zustand lagerfähig sind. Auch als grob-porige Filter wäre eine Verwendung denkbar, wie z.B. in der Lebensmittel-Industrie für die Klärung von diversen Fruchtsäften.

Aus der Masse an Wasser, die in einem Vlies nach dem Zentrifugieren vorhanden ist, läßt sich über die Dichte ρ (H_2O) $\approx 1 \text{ g/cm}^3$ (20°C, 1013 mbar) ein inneres Volumen abschätzen. Das spezifische Volumen ergibt sich dabei aus

$$V_{\text{spezif}} = \frac{V_{\text{H}_2\text{O}}}{m_{\text{trocken}}} = \frac{\frac{m_{\text{H}_2\text{O}}}{\rho_{\text{H}_2\text{O}}}}{m_{\text{trocken}}} = \frac{m_{\text{naß}} - m_{\text{trocken}}}{\rho_{\text{H}_2\text{O}} \cdot m_{\text{trocken}}} .$$

$$\text{Da } V_{\text{spezif}} = \frac{\text{WRV}}{\rho_{\text{H}_2\text{O}} \cdot 100\%} \quad \text{und} \quad \text{WRV} = \frac{\text{WG}}{100\% - \text{WG}} \cdot 100\% ,$$

errechnet sich das spezifische Volumen einer Probe aus ihrem gemittelten Wassergehalt recht einfach folgendermaßen:

$$V_{\text{spezif}} = \frac{\text{WG}}{\rho_{\text{H}_2\text{O}} \cdot (100\% - \text{WG})} .$$

Beim Zentrifugieren sollte überschüssiges Wasser von den Außenseiten der Proben abgetrennt werden, um standardisierte Naßgewichte zu gewährleisten. Offen bleibt, wieviel Wasser trotzdem an den äußeren Fasern haften bleibt und das innere Volumen nach oben verfälscht. Da weiterhin nicht ausgeschlossen werden kann, daß außer von der Proben-Außenoberfläche je nach BC-Struktur auch Wasser aus dem Vlies-Inneren abfließt, was den Wert wiederum nach unten verfälschen würde, können die Angaben zum spezifischen Volumen in Tab. 17 nur Schätzwerte sein.

Tab. 17: Spezifische Volumina der niemals getrockneten (orig) und der gefriergetrockneten (gefr) BC-Proben, die sich aus ihrer Wasserkapazität ergeben

Probenbezeichnung	V _{spezif} (orig) [cm ³ /g]	V _{spezif} (gefr) [cm ³ /g]	Probenbezeichnung	V _{spezif} (orig) [cm ³ /g]	V _{spezif} (gefr) [cm ³ /g]
St(a)	7,0	3,9	42	19,8	4,3
12	6,1	3,8	43	24,6	6,0
13	6,4	3,9	44	36,0	23,4
14	6,2	3,3	52	40,1	12,9
15	6,6	3,5	53	44,5	12,0
22	7,5	3,4	54	39,0	16,5
23	6,6	4,2	62	6,9	1,6
32	7,3	5,5	63	7,3	2,3
St(b)	6,8	2,8	64	9,4	3,1

Im folgenden sollen die Verhältnisse etwas veranschaulicht werden. Das Außenvolumen eines durchschnittlichen Vlieses beträgt etwa 28,3 cm³ (Zylinder mit 6 cm Durchmesser und 1 cm Höhe). Da bspw. ein St(b)-Vlies 235,6 mg wiegt, hat 1 g St(b) ein Gesamtvolumen von ca. 120 cm³. Im Originalzustand beansprucht Wasser davon ein Volumen von 6,8 cm³ (Tab. 17). Demzufolge hat die BC selbst ein Eigenvolumen von 113,2 cm³/g. Die Werte kann man auch als Dichte ausdrücken: $\rho_{\text{St(b)}} \approx 0,0083 \text{ g/cm}^3$ (Rohdichte) und $\rho_{\text{St(b)}} \approx 0,0088 \text{ g/cm}^3$ (Reindichte). Das ist eine ungewöhnlich geringe Dichte für einen Feststoff (Vergleichsdichten bei 20°C [g/cm³]: Holz 0,4 – 0,8; Ethanol 0,791; Schaumstoffe < 0,05; Luft bei 0°C 0,00129 [Römpp, 1995]).

Demgegenüber hat Probe 52 bei einer Vliesmasse von etwa 290 mg ein Gesamtvolumen von etwa 97 cm³/g. Davon nimmt Wasser im niemals getrockneten Zustand des Vlieses 40,1 cm³ ein (Tab. 17), folglich hat BC 52 ein Eigenvolumen von 56,9 cm³/g. Das bedeutet eine Rohdichte des Materials von 0,0103 g/cm³ und eine Reindichte von 0,0176 g/cm³. Trotz geringerem Gesamtvolumen von 52 gegenüber St(b) wird mehr Hohlraum (für Wasser) geschaffen durch eine größere Dichte der Substanz.

Die Verhältnisse gestalten sich ähnlich für gefriergetrocknete Proben. Die Reindichten betragen $\rho_{\text{St(b)}} \approx 0,0085 \text{ g/cm}^3$ und $\rho_{52} \approx 0,0119 \text{ g/cm}^3$. Eine größere Faserdichte für 52 geht (bei vergleichbarem Gesamtvolumen) einher mit größeren Poren. Das korreliert mit der geringeren inneren Oberfläche (Physisorption) und der enormen Wasserkapazität.

Somit ist für die CMC- und MC-Serien bewiesen, daß das Wasser hier nicht nur an den Faserflächen adsorbiert wird, sondern vorrangig in großen Assoziaten gehalten werden kann. Durch die Beigaben von 2% CMC oder 0,5% MC zum Nährmedium läßt sich die Struktur von Bakteriencellulose derart modifizieren, daß ideale Porenverhältnisse für eine maximale Wasserkapazität gestaltet werden.

Demgegenüber haben die Proben aus der C-Quellen-Variation zwar auch eine kleinere BET-Oberfläche als Standard-BC, was aber nicht automatisch zu größerem inneren Volumen und größerer Wasserkapazität führt.

Um den Zusammenhang zwischen innerer Oberfläche und innerem Volumen der BC in Abhängigkeit von der Komposition der Nährlösung und ihren Einfluß auf charakteristische Größen wie die Wasserkapazität beweiskräftig interpretieren zu können, wären exakte Volumen- und Dichte-Messungen nötig. Weiterführende Arbeiten sind für ein tieferes Verständnis dieses Aspekts sehr wünschenswert.

6.2 Erhöhung der Zugfestigkeit

Es liegt die Vermutung nahe, daß die BC-Struktur Auswirkungen auf die mechanische Belastbarkeit des Materials hat. Untersuchungen zur Zug- und Reißfestigkeit der Glycerin-Reihe deuten auf einen direkten Zusammenhang zwischen Ausprägung von starken Schichten in wahlloser Orientierung und maximaler Zugfestigkeit.

Bei den Zug-Dehnungs-Messungen wirkt auf die Probe eine Zugkraft ein, die sie dehnt, wobei der Querschnitt verkleinert wird, bis die Probe schließlich reißt. So erhält man 4 Werte aus einem Meßversuch: maximale Zugkraft F_{\max} und entsprechende Ausdehnung Δl_{\max} des Körpers, sowie Zugkraft beim Bruch des Körpers F_{Bruch} und entsprechende Ausdehnung Δl_{Bruch} [Braun et al., 1999]. Dabei ergibt sich die Zugfestigkeit σ_{\max} aus maximaler Zugkraft dividiert durch Anfangsquerschnitt A_0 :

$$\sigma_{\max} = \frac{F_{\max}}{A_0} .$$

Die Zugdehnung ε_{\max} ist die bei maximaler Kraft auftretende Dehnung Δl_{\max} im Verhältnis zur Anfangslänge l_0 :

$$\varepsilon_{\max} = \frac{\Delta l_{\max}}{l_0} \cdot 100\% .$$

Adäquat lassen sich Reißfestigkeit σ_R und Reißdehnung ε_R errechnen. [Braun et al., 1999] Für diese Untersuchung wurden die Proben der Glycerin-Reihe schon nach 7 Tagen Kultivierungszeit geerntet, um eine möglichst geringe Vliesdicke für einen kleinen Anfangsquerschnitt A_0 zu gewährleisten. Vom niemals getrockneten Material wurden aus dem Mittelbereich eines Vlieses 8 Streifen geschnitten, die Streifenbreite ermittelt und naß an einer Material-Prüfmaschine vermessen. Die Skizze in Abb. 45 soll die Probenvorbereitung für die Zug-Dehnungs-Messungen und den Vorgang beim

Meßversuch demonstrieren. A_0 geht aus der Vliesdicke und der Streifenbreite hervor. Für die Anfangslänge wurden 2 cm gewählt.

In Tab. 18 sind die Vliesdicken nach 7 Tagen Kultivierungsdauer, Zugfestigkeit und Zugdehnung, Reißfestigkeit und Reißdehnung von St(a) und der Glycerin-Reihe aufgelistet. Es wurden pro Probensorte 2 Vliese verwendet. Die Mittelwerte ergeben sich also aus jeweils 16 Messungen.

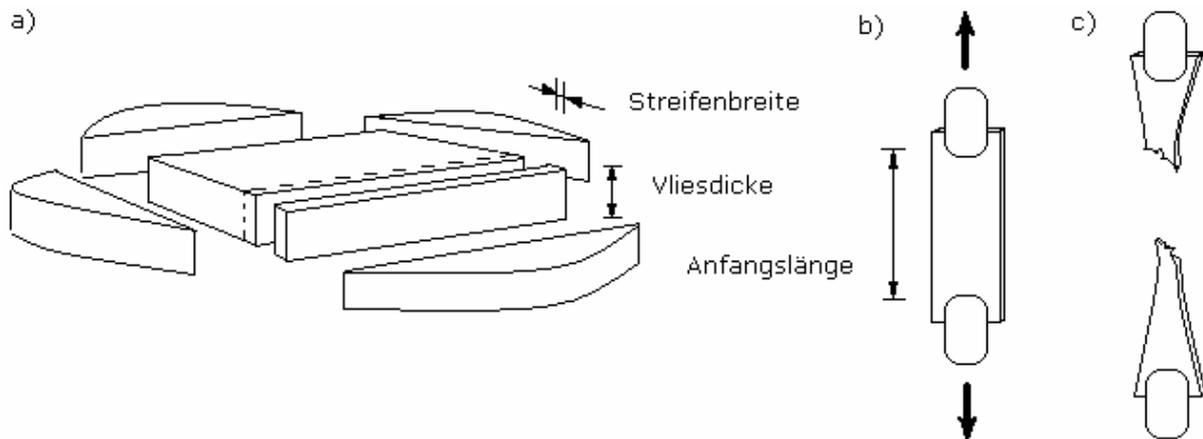


Abb. 45: Skizze zur Zug-Dehnungs-Messung, a) Probenvorbereitung, b) eingespannte Probe zu Beginn des Versuchs, c) gerissene Probe bei Versuchsende

Tab. 18: Zugfestigkeit σ_{\max} , Zugdehnung ϵ_{\max} , Reißfestigkeit σ_R und Reißdehnung ϵ_R sowie die Relationen E_{\max} und E_{Bruch} der Glycerin-Reihe im Vergleich zu St(a), gemessen an niemals getrockneten Vliesen nach 7 Tagen Kultivierungszeit

Proben-bez.	Vliesdicke [mm]	σ_{\max} [N/mm ²]	ϵ_{\max} [%]	E_{\max} [N/mm ²]	σ_R [N/mm ²]	ϵ_R [%]	E_{Bruch} [N/mm ²]
St(a)	6	0,63	41,14	1,53	0,32	50,63	0,63
12	5	0,90	33,49	2,69	0,47	43,32	1,08
13	5	0,77	24,49	3,14	0,42	34,80	1,21
14	3,2	0,82	29,62	2,77	0,44	39,11	1,13
15	1,8	0,76	23,73	3,20	0,48	29,56	1,62

Aus dieser Studie geht hervor, daß alle Proben, die anteilig oder vollständig aus Glycerin synthetisiert wurden, eine höhere Zugfestigkeit σ_{\max} bei kleinerer Zugdehnung ϵ_{\max} haben als die Standard-BC St(a). Trotz größerer Kraft F_{\max} , die auf sie einwirkt, dehnen sich die Proben 12 – 15 dabei nicht so weit aus wie St(a). Für eine übersichtliche Beurteilung von Zugfestigkeit bei zugehöriger Zugdehnung der Produkte, wurde das Verhältnis E_{\max} an diesem Punkt ausgerechnet:

$$E_{\max} = \frac{\sigma_{\max}}{\epsilon_{\max}}, \text{ wobei hier } \sigma_{\max} = \frac{F_{\max}}{A_0} \text{ und } \epsilon_{\max} = \frac{\Delta l_{\max}}{l_0} .$$

Die Ergebnisse von E_{\max} belegen, daß alle Glycerin-Proben deutlich besser in der Zugfestigkeit in Bezug zum Dehnungsausmaß abschneiden. Probe 15 erreicht dabei 209% vom St(a)-Wert, Probe 13 immerhin 205%.

Allgemein zeigen die BC-Produkte die Erscheinung der Verstreckung. Nach dem Einwirken der maximalen Kraft erfährt das Material weitere Längenänderung bei geringerer Zugkraft. Deswegen sind die Zugkräfte, die letztendlich zum Zerreißen der Probe führen, kleiner als die maximalen Zugkräfte.

Um die Glycerin-Proben zu zerreißen, benötigt man durchweg eine größere Kraft als für St(a). Im Gegensatz dazu dehnen sie sich bis zum Bruch weniger aus. Für einen einfachen Vergleich wurde auch für den Reißpunkt die Relation E_{Bruch} berechnet (analog E_{\max}). Dabei wird die gleiche Tendenz offensichtlich wie bei E_{\max} . Allen Glycerin-Proben wird ein besseres Verhältnis von Reißfestigkeit zu Reißdehnung gegenüber St(a) bescheinigt. BC 13 erzielt 192% und 15 sogar 257% vom Standard-Wert.

Wie läßt sich diese Verbesserung interpretieren? Bei den Zug-Dehnungs-Messungen wird der Vlies-Streifen in horizontaler Richtung bezüglich seiner Lage während der Kultivierung auseinander gezogen. Da bei St(a) eine Struktur vorherrscht, die durch relativ dünne, zwar in ihren Höhen zueinander versetzte, aber parallele Schichten in horizontaler Ebene gekennzeichnet ist (s. 5.1.1), erlaubt sie ein leichtes Verschieben der Lagen gegeneinander. Dies führt zu einer größeren Ausdehnung bei geringer Krafteinwirkung. Dagegen dokumentierten die REM-Aufnahmen der Glycerin-Serie in Kapitel 5.1.2.1 allgemein eine zunehmende Unordnung im Vlies-Aufbau mit größerem Glycerin-Anteil der C-Quelle: stärkere Schichten im Verleich zu St(a), die nur über kurze Distanzen reichen, dafür aber zunehmend nicht-horizontal, sondern wahllos orientiert sind. Diese Struktur-Charakteristik scheint die Ursache für die besseren Zug- und Reißfestigkeiten der Glycerin-Proben zu sein. Die nicht parallelen Schichten lassen sich nur schwer gegeneinander verschieben, zudem sorgt ihre Stärke für zusätzliche Stabilität. Diese Erkenntnis könnte sich für einen erfolgreichen Einsatz der BASYC-Röhrchen als Blutgefäß-Ersatz als sehr wertvoll erweisen.

Die hier beschriebene Untersuchung der Glycerin-Reihe auf ihre Zug- und Reißfestigkeit stellt primär eine erste Eignungsprüfung des uns zur Verfügung stehenden Meßverfahrens in Verbindung mit den Bakteriencellulosen dar. So erweisen sich sowohl Methode als auch Material als tauglich für weitergehende Untersuchungen. Interessant wäre zum einen der Einfluß, den die Gefriertrocknung oder Vakuumtrocknung auf die Zug- und Reißfestigkeit der Proben ausüben, zum anderen der Unterschied zu den Produkten, die in Gegenwart der WSP hergestellt wurden.

Unter Hitze zu Folien gepreßte BC erreicht durch die hochplanare Orientierung der Fasern eine Zugfestigkeit von 250 N/mm² bei einer Dehnung von 2% [Yamanaka und Watanabe, 1994]. CMC- bzw. MC-BC sollen sogar bis zu 280% des Elastizitätsmoduls von Standard-BC erreichen [Tajima et al., 1995].

7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das gramnegative, aerobe Bakterium *Acetobacter xylinum* (AX) produziert extrazellulär Cellulose. Vor dem Hintergrund der breiten Anwendungsgebiete dieser Bakterienzellulose (z.B. im medizinischen Bereich als BioFill oder BASYC, für die Industrie als Adsorbens bzw. Filter, bei Sony als Audiokopfhörer-Membran oder in der Lebensmittelbranche als diätischer Zusatzstoff) bestand immer dringender die Notwendigkeit, ein Konzept für das methodische Design von BC-Strukturen zu entwickeln. In dieser Arbeit wurde der Einfluß der Zusammenstellung des Nährmediums auf die Struktur der BC von AX5 untersucht. Zum einen wurde die C-Quelle variiert und statt D-Glucose Glycerin bzw. D-Glucuronsäure (als freie Säure und als Na-Salz) angeboten. Zum anderen sind der Nährlösung während der Kultivierung wasserlösliche Polymere wie CMC, MC respektive PVA zugesetzt worden.

Im einzelnen wurden die nachstehenden Proben entwickelt:

- a) durch Variation der C-Quellen-Zusammensetzung im HS-Medium: 12 (75% D-Glucose, 25% Glycerin), 13 (50% D-Glucose, 50% Glycerin), 14 (25% D-Glucose, 75% Glycerin), 15 (100% Glycerin), 22 (75% D-Glucose, 25% D-Glucuronsäure Na-Salz), 23 (50% D-Glucose, 50% D-Glucuronsäure Na-Salz), 32 (75% D-Glucose, 25% D-Glucuronsäure), 33 (50% D-Glucose, 50% D-Glucuronsäure) und
- b) in Gegenwart von Additiven im HS-Medium: 42 (0,5% CMC), 43 (1,0% CMC), 44 (2,0% CMC), 52 (0,5% MC), 53 (1,0% MC), 54 (2,0% MC), 62 (0,5% PVA), 63 (1,0% PVA), 64 (2,0% PVA).

Die Produkte wurden mittels verschiedener Analysemethoden charakterisiert. Dabei konnten die folgenden Zusammenhänge zwischen der Zusammenstellung der Nährlösung, der daraus resultierenden BC-Struktur und anderen Produkt-Eigenschaften aufgedeckt, formuliert und reproduziert werden:

Ausbeute-Steigerung

Es ist gelungen, durch die Veränderung der Zusammensetzung der Nährlösung in vielen Fällen den Produkt-Gewinn zu steigern. Die Proben 13, 14 und 15 haben prinzipiell höhere Produkt-Ausbeuten als Standard-BC. Dabei erreicht 14 mit einer statistischen Sicherheit von 99% eine signifikant höhere Produkt-Masse von 116% im Vergleich zu Standard-BC. In der Literatur sind dagegen nur 93% in Relation zur BC-Ausbeute aus D-Glucose angegeben [Masaoka et al., 1993]. Im Gegensatz zur Literatur [Tajima, 1999; Tajima et al., 1995] läßt sich mit MC als Additiv zur Nährlösung quantitativ mehr Produkt gewinnen als mit CMC. So erzielen die Proben 42, 43 und 44 etwa 109%, hingegen 52, 53 und 54 sogar 123% verglichen mit Standard-BC. Mit einer statistischen Sicherheit von 99% sind die Ausbeuten von 22, 23, 32 bzw. 33 aber signifikant niedriger gegenüber

Standard-BC. Aus ökonomischer Sicht ist der Erkenntnisgewinn, mit welchen Nährlösungszusammenstellungen die Ausbeute an BC-Material gesteigert werden kann, von großem Vorteil, da die Kultivierung von AX bislang noch eine relativ teure Methode zur Cellulose-Produktion darstellt.

Einlagerung der Additive

In den ^{13}C -NMR-Spektren ist ein Einbau von CMC in das BC-Gerüst der Proben 42 - 44 nur unter Vorbehalt erkennbar, die Einlagerung von MC in 52 - 54 nimmt mit Erhöhung der angebotenen Konzentration aber eindeutig zu, und PVA ist nur bei Zusatz von 2,0% (m/V) zum Nährmedium (Probe 64) im Produkt nachzuweisen. Die Ergebnisse der IR-Spektroskopie bestätigen einen Gehalt von CMC und MC in den Proben 42 - 44 bzw. 52 - 53. Weiterhin kann durch NMR-Spektroskopie eine Abnahme des Anteils der I α -Modifikation (und I β -Modifikation) der Bakteriencellulose, die durch Zusatz von CMC (bzw. MC) entwickelt wurde, detektiert werden. Neu ist die Erkenntnis, daß die Reduzierung der kristallinen Anteile der Bakteriencellulose durch CMC respektive MC mit einer Zunahme der amorphen Anteile verbunden ist. Damit ist ein wichtiger Beitrag zur Diskussion über die Kristallinität der Bakteriencellulosen verschiedener AX-Stämme in der Fachliteratur geliefert worden. In den Produkten 62, 63 und 64 sind keine Veränderungen in den I α / I β - Fraktionen der Bakteriencellulose zu beobachten. [Seifert et al., 2004]

Die Auswertung der HPLC-Chromatogramme der Hydrolysate von 42, 43 und 44 ergibt einen Verbleib von etwa 10% der angebotenen CMC-Menge in der BC. Bei annähernd gleichen Gesamtmassen unterscheiden sich die Vliese 42, 43 und 44 jedoch ganz erheblich in ihrer stofflichen Zusammensetzung. So können jetzt definierte BC-Produkte hergestellt werden, die ca. 5, 15 bzw. 19% CMC enthalten und z.B. der Erforschung ihrer differenzierten Fähigkeiten als Adsorbens hinsichtlich spezifischer Aufnahmekapazitäten zur Verfügung stehen.

Die Proben, die durch Variation der C-Quelle entstanden sind, liefern mit dem Standard identische IR-Spektren und HPLC-Elugramme. Das läßt darauf schließen, daß es sich bei diesen Produkten um reine Bakteriencellulose von einheitlicher Primärstruktur handelt. Für den Einsatz einer solchen BC ohne fremde Bestandteile, wie z.B. im medizinischen Bereich, ist in Verbindung mit der Ausbeute-Steigerung durch Glycerin als C-Quelle ein bedeutender Fortschritt gelungen.

Steigerung des Polymerisationsgrades der Bakteriencellulose

Je nach der D-Glucose / Glycerin - Zusammensetzung der C-Quelle im Nährmedium läßt sich ein DP_w der Bakteriencellulose von ca. 5000 bis ca. 7400 einstellen. Bei den Proben

42 – 44 liegt der DP_w um 7600. In Gegenwart von MC produziert AX noch längere Celluloseketten, der DP_w von 52 und 53 beträgt im Mittel 8860. Diese Erkenntnisse dienen primär der Strukturaufklärung im Sinne der Grundlagenforschung. Die Steuerbarkeit der Kettenlänge der Bakteriencellulose über die Wahl des Nährmediums ist aber in jedem Fall ein wertvoller Aspekt im Hinblick auf anwendungsbezogene Entwicklungen von BC-Strukturen.

Modifizierung der inneren Struktur

Die Proben 12 – 15 zeigen in REM-Aufnahmen stärkere Faser-Aggregate als Standard-BC, die aber zunehmend eine wahllose Orientierung aufweisen. Ein Gemisch aus D-Glucose und D-Glucuronsäure als C-Quelle verursacht dagegen sehr ausgeprägte, parallele Schichten von weiter Ausdehnung in horizontaler Lage. In Gegenwart von CMC in der Nährlösung entwickelt sich eine BC-Struktur mit sehr großen Poren. Durch MC als Additiv läßt sich die feine Netzwerk-Struktur der Standard-BC derart modifizieren, daß ein Material mit grob-porösem, dickwandigem Aufbau entsteht. Für 54 sind äußerst starke Faser-Aggregate charakteristisch. In Tabelle 10 sind die wichtigsten Proben-Kennzeichen der Struktur zusammengefaßt.

Tab. 10: Abmessungen von Poren, Fasern und Schichten im Überblick

Proben-bez.	Porengröße im Querschnitt [$\mu\text{m} \times \mu\text{m}$]	Faserbreite [nm]	Schichtdicke [nm]	Bemerkungen zu den Schichten
Standard	4 x 2	78	80	horizontal, höhenversetzt
15	4 x 2	70	150	wahllos orientiert, kurz
22	4 x 2	69	500	horizontal, sehr lang
43	5 x 3	90	450	horizontal
44	6,5 x 5	120	800	horizontal, sehr lang, kräftig
53	5 x 2,5	100	450	Faser-Aggregate
54	5 x 3	129	900	sehr starke Faser-Aggregate
64	3 x 1	64	-	keine Schichten im Bild

Mit der Zuordnung von genauen Herstellungsvorschriften und den entsprechenden charakteristischen Merkmalen ihrer BC-Produkte ist im Sinne einer Übersicht von Ursache und Wirkung ein Katalog für das Design gewünschter BC-Strukturen entstanden.

Verringerung der inneren Oberfläche

Physisorptionsmessungen haben ergeben, daß Standard-BC 55,9 m²/g (gefriergetrocknet) bzw. 41,2 m²/g (vakuumgetrocknet) spezifische Oberfläche besitzt. Durch Einsatz von Glycerin oder D-Glucuronsäure als C-Quelle läßt sich die innere Oberfläche leicht verringern. In Anwesenheit von CMC oder MC in der Nährlösung minimiert sich die spezifische Oberfläche aber noch stärker. So weist Probe 44 im gefriergetrockneten Zustand eine BET-Oberfläche von 32 m²/g auf, Probe 54 sogar nur 26,4 m²/g. Die Vliese der CMC- und MC-Reihen sind ursprünglich makroporös, haben aber nach der Vakuumtrocknung interessanterweise keine innere Oberfläche mehr. Die Ursache für dieses Phänomen könnte in Additiv-BC-Verbänden liegen, die durch CMC bzw. MC hervorgerufen werden. Sie bewirken nahezu faserfreie (CMC-BC-Verbände) bzw. faserleere (MC-BC-Verbände) Poren, die beim Vakuumtrocknen kollabieren.

Steigerung des Wassergehaltes

Schon durch Addition von 0,5% MC zur Nährlösung (Probe 52) steigt der Wassergehalt des BC-Produktes auf 97,6% (bezogen auf das Naßgewicht) im Gegensatz zu 87,2% für Standard-BC. Unter Zusatz von 2% CMC (Probe 44) gewinnt man eine BC, die im Original-Zustand 97,3% Wasser enthält. Auch in gefriergetrockneter Form besitzen die BC-Vliese, die in Anwesenheit der Additive CMC und MC während der Kultivierung gewonnen wurden, eine enorme Wasserkapazität. Gegenüber einem Wassergehalt von 73,3% für lyophilisierte Standard-BC lassen sich nach Requellung 92,8% (Probe 52) und sogar 95,9% (44) erreichen. [Seifert et al., 2004]

Eine größere Wasserkapazität bedeutet bei kleinerer spezifischer Oberfläche, daß das Wasser nicht nur direkt an den Faser-Oberflächen adsorbiert ist, sondern hauptsächlich in ganzen Assoziaten in den Hohlräumen gehalten werden kann. Die Additive CMC und MC bewirken offensichtlich durch die Ausbildung der Additiv-BC-Verbände ideale Porenverhältnisse für ein maximales Wasseraufnahmevermögen. Durch eine besonders gute Requellbarkeit nach bis zu 3 Trocknungszyklen zeichnen sich ebenfalls die Proben 44 und 52 aus. Eine Wiederholstudie nach 2 Jahren bescheinigt eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der bemerkenswerten Wasserkapazitäten der CMC- und MC-Reihen. Allerdings kann man durch Zugabe von 0,5% PVA zur Nährlösung den Wassergehalt des Produktes auf 61,9% deutlich verringern. Aus dem Wassergehalt läßt sich ein inneres Volumen abschätzen, das den Hohlräumen im Vlies entspricht. Im gefriergetrockneten Zustand ist z.B. Probe 44 durch 23,4 cm³/g im Vergleich zu 2,8 cm³/g für Standard-BC gekennzeichnet.

Die Erkenntnisse, die sich aus den Physisorptionsmessungen und der Bestimmung der Wasserkapazität ergeben haben, könnten einerseits der Verbesserung von großporigen

Filtern für hochmolekulare Lösungen oder Suspensionen in der Lebensmittel-Branche, wie z.B. bei der Klärung von Fruchtsäften, dienlich sein. Andererseits besteht nun die Möglichkeit einer Anwendung differenzierter Adsorbentien aus biologischem Material im medizinischen Bereich. Nicht zuletzt sollte auch auf die Verwendbarkeit als Wundauflage hingewiesen werden, wo ein großes Wasserrückhaltevermögen nötig ist, um die Wunde vor Flüssigkeitsverlust zu schützen. Dabei ist zu beachten, daß die BC-Vliese der CMC- und MC-Serien lyophilisiert gelagert und erst unmittelbar vor ihrem Einsatz regequollen werden können, wobei sie trotzdem in der Lage sind, wesentlich mehr Wasser aufzunehmen und zurückzuhalten als niemals getrocknete Standard-BC.

Erhöhung der Zug- und Reißfestigkeit

Alle Proben, die anteilig oder vollständig aus Glycerin synthetisiert wurden, weisen eine höhere Zugfestigkeit bei kleinerer Zugdehnung als Standard-BC auf. Zudem sind die Proben 12 – 15 ebenfalls durch eine bessere Reißfestigkeit charakterisiert. Obwohl noch weitere Messungen wünschenswert sind, zeichnet sich zumindest für die aus Glycerin synthetisierte BC ein großes Potential ab. Im Zusammenspiel mit der Ausbeute-Steigerung bei chemisch identischer Cellulose-Primärstruktur im Vergleich zur Standard-BC könnte die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften einen wesentlichen Beitrag zum Erfolg der BASYC-Röhrchen als Blutgefäßersatz leisten.

Es konnte dokumentiert werden, daß sich allein über die Zusammenstellung des Nährmediums bei der Kultivierung von *Acetobacter xylinum* AX5 die Struktur und andere Eigenschaften der Bakteriencellulose verändern lassen. Aufgrund der vielseitigen Untersuchung der Produkte konnten Zusammenhänge zwischen der speziellen Struktur und den damit verbundenen charakteristischen Attributen aufgeklärt werden. So ist es gelungen, eine Strategie zu erarbeiten, um die Struktur und andere Merkmale von Bakteriencellulose je nach Motivation gezielt modifizieren zu können. Dies erlaubt zukünftig eine anwendungsbezogene und problemorientierte Bereitstellung differenzierter BC-Produkte.

8 Experimenteller Teil

8.1 Material, Geräte und Analysemethoden

Die Chemikalien, die für die Kulturlösungen verwendet wurden, sind kommerziell erhältlich bei Merck-Schuchardt, Fluka, Acros Organics bzw. Difco. Entionisiertes Wasser ist mittels eines Wasservollentsalters Behropur der Firma Behr bereitgestellt worden. Zur gleichmäßigen Aufteilung von Lösungen wurden ein Handy Step Electronic von Brand bzw. Eppendorf-Pipetten benutzt. Sterilisiert wurden die Nährlösungen im Varioklav Dampfsterilisator von H+P. Zum Arbeiten in steriler Umgebung wurde ein Reinraum-arbeitsplatz Köttermann 8580 (mit Gegenluftstrom) genutzt, eine Mischung aus absolutem Ethanol und entionisiertem Wasser (7:3) sowie ein Kartuschen-Gasbrenner. Die Kultivierung erfolgte im Inkubationsschrank von Heraeus und Kendro Laboratory Products bzw. unter einer Bruthaube von Edmund Bühler. Dabei kamen Weithals-Erlenmeyerkolben aus Borosilikatglas zum Einsatz, die mit reißfester Aluminium-Folie abgeschlossen wurden. Für die Wasch-Prozedur ist ein Rotator Swip KM-2 von Edmund Bühler verwendet worden. Zur Probentrocknung dienten die Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 1-2 (in Verbindung mit einer Kirsch Kältemaschine von Bosch) bzw. ein Vakuumtrockenschrank Vacutherm von Heraeus Instruments (bei 60°C). Für die Stammhaltung wurden handelsübliche Petrischalen, Parafilm, Reagenzgläser und eine Impföse mit Platin-Draht benutzt. Für Vorkultur- und Wasch-Lösungen wurden 200ml-Weithals-Erlenmeyerkolben aus Schott Duranglas verwendet. Der AX-Stamm des IOMC der Universität Jena AX5 ist ursprünglich aus der Stammsammlung des Institutes für Biotechnologie Leipzig (Prof. Dr. H. P. Schmauder) erhalten worden.

- Einwaage der Nährlösungsbestandteile und Ausbeute-Bestimmung

Die Massen wurden bestimmt an einer Analysenwaage Sartorius CP423S mit einer Genauigkeit von 0,001 g.

- Elementaranalyse

Die Bestimmung der C-, H- und N-Gehalte der vakuumgetrockneten BC-Proben erfolgte am Leco CHNS 932.

- Festkörper-¹³C-NMR-Spektroskopie

¹³C-CP-MAS mit TPPM-Entkopplung (4 mm High-Kopf): Die Spektren wurden am 400 MHz-Widebore-Spektrometer (AMX 400 WB) von Bruker gemessen bei einem statischen Magnetfeld von 9,4 T. Alle Proben wurden mit einer Frequenz von 6,5 kHz rotiert. Die Wiederholzeit (Zeit zwischen den Scans) betrug 2 s. Die Kontaktzeit beim CP (Kreuzpolarisation – Polarisationsübertrag von den Protonen auf die ¹³C-Kerne) war bei allen Proben 1 ms.

- IR-Spektroskopie

Ein Teil der Spektren (1 mg gefriergetrocknete Substanz, vermischt mit 200 mg KBr) wurde am Nicolet / Impact 400 erhalten. Die Spektren von der Oberfläche der Vlies-Unterseite wurden an einem Biorad FTS-25 mit ATR-Küvette aufgenommen.

- GPC

Die Lösung der gefriergetrockneten BC in DMAc / LiCl (0,9%, m/V) wurde automatisch injiziert, über 4 serielle GPC-Säulen chromatographiert und über Fluoreszenz (TSP FL 2000, 290 nm Anregung, 340 nm Emission), MALLS (Multiple-angle laser light scattering, Wyatt Dawn DSP mit Argon-Ionen-Laser 488 nm) und Refraktionsindex (Shodex RI-71) detektiert. Als Eluent wurde DMAc / LiCl (0,9%, m/V), filtriert durch einen 0,02 µm - Filter, benutzt. Die Molekulargewichtsverteilung sowie Polymer-relevante Parameter wurden mittels Software-Programmen kalkuliert, basierend auf einem Refraktionsindex-Inkrement zu 0,140 ml/g Cellulose in DMAc / LiCl (0,9%, m/V) bei 25°C und 488 nm. Die Flußrate betrug 1 ml/min, als Säulen wurden PL Gel mixedA ALS, 20 µm, 7,5 x 300 mm verwendet, das Injektionsvolumen lag bei 100 µl und die Laufzeit bei 45 min. [Röhrling et al., 2002]

Die GPC der Additive CMC und MC (Lösung in H₂O, Injektionsvolumen 100 µl) erfolgte an einer Gerätekombination der Firma Jasco mit 3 Säulen (HEMA Bio 100n V, HEMA Bio 1000 und HEMA Bio Linear) und 3 Detektoren (Lichtstreuung 90°, Jasco UV 260 nm, Jasco Refraktionsindex). Als Eluent wurde NaNO₃/NaH₂PO₄/H₃PO₄ benutzt bei einer Flußrate von 1 ml/min und 35°C.

- REM

Die lyophilisierten BC-Vliese wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und gebrochen. Die Bruchfläche wurde mit Gold bedampft und mittels einem Rasterelektronenmikroskop DSM 940A (Zeiss), mit dem Photoaufnahmesystem DISS (Point Electronic) und einer Bildgröße von 1000 x 1000 Pixel inspiziert, indem die Sekundärelektronen registriert wurden. (Eine einzige Probe konnte nur mit Kohlenstoff bedampft werden: St(b) für die Untersuchung der unteren Vlies-Seite.)

- Physisorption

Die Aufnahme der Adsorptions- und Desorptionsisothermen als auch die rechnerische Auswertung erfolgte am volumetrischen Sorptionsautomat AUTOSORB-1 (Quantachrome Corporation). Als Adsorptiv wurde N₂ verwendet bei einer Bad-Temperatur von 77,35 K und einem Druckbereich zwischen 0 und 1013 mbar. Die Proben wurden entweder gefriergetrocknet oder vakuumgetrocknet, zerkleinert und direkt vor der Messung ausgeheizt bei 50 bzw 150°C.

- HPLC

Die gefriergetrocknete BC wurde zunächst hydrolysiert. Dafür wurde 0,1 g Probe 10 min gequollen in 2 ml 70%iger HClO₄. Nach Verdünnung auf 20 ml wurde unter Rückfluß bei 100°C 16 h gerührt, anschließend mit KOH neutralisiert und das Perchlorat abgetrennt. Für die HPLC wurde folgendes System verwendet: Biorad HPX, 65°C, 0,005 M H₂SO₄, 0,5 ml/min.

- Wasserkapazität

Niemals getrocknete bzw. gefriergetrocknete BC-Proben (nach Requellung in H₂O für 2 h bei 30°C) wurden auf G3-Fritten für 15 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Naßgewichte wurden auf (bei 105°C getrockneten und im Exsikkator auf RT abgekühlten) Wägegläschen an einer Sartorius-Waage BP211D mit einer Genauigkeit von 0,01 mg (bis 80 g) bestimmt. Die Proben wurden im Trockenschrank bei 105°C bzw. tiefgefroren in der Gefriertrocknungsanlage bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und erneut gewogen (Trockengewicht).

- Zug-Dehnungs-Messung

Von den niemals getrockneten BC-Vliesen wurden mit einer Rasierklinge Streifen aus dem Mittelbereich geschnitten. Die Messung erfolgte an einer Materialprüfmaschine der Firma Zwick, Modell-Nummer 1435. Die Anfangslänge wurde voreingestellt auf $l_0 = 2,0$ cm.

8.2 Herstellung der Bakteriencellulose-Vliese

8.2.1 Allgemeine Herstellungsvorschriften und Kultivierungsbedingungen

Im folgenden Abschnitt wird die generelle, vollständige Arbeitsvorschrift für die Entwicklung der BC-Produkte chronologisch geordnet aufgeführt. Dabei wird in die Herstellungsprinzipien C-Quellen-Variation im HS-Medium (Variante A) und WSP-Addition zum HS-Medium (Variante B) unterteilt.

Man bringt eine saubere, vereinzelte Kolonie einer Festkultur (Petrischale, HS-Medium + Agar) von AX5 (des IOMC der Universität Jena) unter sterilen Bedingungen in eine flüssige Standkultur (20 ml HS-Nährlösung im Erlenmeyerkolben). Nach 14 Tagen kann eine Vorkulturlösung von 80 ml HS-Medium im 250ml-Weithals-Erlenmeyerkolben mit 4 ml (A) bzw. von 30 ml HS-Medium im 100ml-Weithals-Erlenmeyerkolben mit 1 ml (B) dieser Zellsuspension beimpft werden. Die Vorkulturlösung wird 10 Tage (A) bzw. 7 Tage (B) inkubiert. Die entsprechend der speziellen Vorschrift (s. 8.2.2) in Weithals-Erlenmeyerkolben (Größe: 100 ml, Bodendurchmesser: 6 cm, Borosilikatglas) eingewogenen C-Quellen (A) bzw. Additive (B) werden aufgefüllt mit 25 ml HS-Medium (ohne Glucose, A) bzw. 30 ml HS-Medium (komplett, B).

Das HS-Standard-Nährmedium besteht aus folgenden Komponenten in wäßriger Lösung:

- 20 g/l D-(+)-Glucose (anhydrous) von Fluka, Reinheit $\geq 99,5\%$,
- 3,4 g/l Dinatriumhydrogenphosphat $\cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ von Fluka, Reinheit $\geq 98\%$,
- 1,15 g/l Zitronensäure $\cdot \text{H}_2\text{O}$ von Fluka, Reinheit $\geq 99,5\%$,
- 5 g/l Hefeextrakt, Bacto Yeast Extract, Extrakt aus autolytierten Hefezellen von Difco,
- 5 g/l Bactopepton, enzymatisch abgebautes Protein von Difco.

Die Ansätze werden solange gerührt, bis eine klare Lösung vorliegt (pH 4 – 6), und mit reißfester Aluminium-Folie verschlossen. Anschließend werden sie dampfsterilisiert, um alle Fremdkeime abzutöten (15 min bei 121°C). An einem Reinraumarbeitsplatz werden die Nährlösungen unter sterilen Bedingungen mit 0,5 ml (A) bzw. 1,0 ml (B) der Zellsuspension aus der Vorkulturlösung inokuliert, wobei das Vorkultur-Vlies vorher ausgedrückt und entfernt wird, und wieder dicht verschlossen. Die Ansätze werden bei 28°C als Standkultur für 3 Wochen ($504 \pm 3 \text{ h}$, A) bzw. 2 Wochen ($336 \pm 3 \text{ h}$, B) inkubiert.

Nach Ablauf dieser Kultivierungsdauer erfolgt die Totsterilisation der AX-Zellen im BC-Vlies im Dampfsterilisator (15 min bei 121°C), wobei für Variante A das Vlies in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml entionisiertem Wasser gebracht wird, für Variante B das Vlies noch im Kulturgefäß verbleibt.

Anschließend werden die Vliese mit einer Pinzette vorsichtig in frisches, entionisiertes Wasser (ca. 80 ml pro Vlies) geerntet und einer Wasch-Prozedur unterworfen, um sie von Zellresten und Nährlösungsbestandteilen zu befreien. Die verwendete SDS-Lösung besteht aus einer wäßrigen Lösung von 5 g/l Natriumdodecylsulfat und 20 g/l NaOH.

Das Reinigungsverfahren erfolgt in Erlenmeyerkolben (Größe: 250 ml, Duranglas), mit Portionen von etwa 80 ml pro Vlies, auf einem Rotator bei 200 Umdrehungen pro Minute (horizontal) bei Raumtemperatur bzw. mit einem Rührfisch versehen auf einem Heizrühr Tisch bei 80-90°C, und umfaßt folgende Schritte (Tab. 19):

Tab. 19: Waschverfahren für die Vliese aus der Herstellung nach Variante A und B

Wasch-Prozedur Variante A	Wasch-Prozedur Variante B
3 x 30 min in H ₂ O bei RT	3 x 30 min in H ₂ O bei RT
20 min in SDS-Lösung bei 80-90°C	20 min in SDS-Lösung bei 80-90°C
über Nacht in H ₂ O bei RT	über Nacht in H ₂ O bei RT
5 x 30 min in H ₂ O bei RT	3 x 30 min in H ₂ O bei RT
über Nacht in H ₂ O bei RT	20 min in SDS-Lösung bei 80-90°C
10 min in H ₂ O bei 80-90°C	über Nacht in H ₂ O bei RT
3 x 30 min in H ₂ O bei RT	3 x 30 min in H ₂ O bei RT
	2 x 10 min in H ₂ O bei 80-90°C

8.2.2 Spezielle Herstellungsvorschriften und Produkt-Charakterisierung

St(a)

- hergestellt nach Variante A, HS-Medium
- 25 ml Nährlösung, + 0,5 ml Zellsuspension (aus 80 ml Vorkultur, 10 Tage alt), 3 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), April 2002 - Oktober 2003
- Ausbeute: 165,3 mg
- Elementaranalyse: C 43,83%, H 6,12%, N 0%
- IR-Spektroskopie (ATR): Cellulose
- HPLC nach Hydrolyse: 100% Glucose
- GPC: M_w 935700 g/mol, M_n 412900 g/mol, PDI 2,27, DP_w 5776
- WG_{orig} 87,45%, WG_{gefr} 79,67%
- REM: Porengröße im Querschnitt 4 μm x 2 μm , Faserbreite 78 nm, Schichtdicke 80 nm
- Spezifische Oberfläche (BET) [m^2/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 55,9, gefr (T_{Heiz} 150°C) 56,2, vak (T_{Heiz} 50°C) 41,2, vak (T_{Heiz} 150°C) 48,2
- Zug- und Reißfestigkeit, orig, 7 Tage inkubiert [N/mm^2]: σ_{max} 0,63, σ_R 0,32
- Zug- und Reißdehnung, orig, 7 Tage inkubiert [%]: ϵ_{max} 41,14, ϵ_R 50,63

12

- hergestellt nach Variante A, HS-Medium mit C-Quellen-Zusammensetzung: 75% D-Glucose (375 mg), 25% Glycerin (128 mg)
- 25 ml Nährlösung, + 0,5 ml Zellsuspension (aus 80 ml Vorkultur, 10 Tage alt), 3 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), April 2002 - Oktober 2003
- Ausbeute: 165,3 mg
- Elementaranalyse: C 42,86%, H 6,29%, N 0,15%
- IR-Spektroskopie (ATR): Cellulose
- GPC: M_w 1200000 g/mol, M_n 718100 g/mol, PDI 1,67, DP_w 7407
- WG_{orig} 85,91%, WG_{gefr} 79,06%
- Spezifische Oberfläche (BET) [m^2/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 40,2, vak (T_{Heiz} 50°C) 36,4
- Zug- und Reißfestigkeit, orig, 7 Tage inkubiert [N/mm^2]: σ_{max} 0,90, σ_R 0,47
- Zug- und Reißdehnung, orig, 7 Tage inkubiert [%]: ϵ_{max} 33,49, ϵ_R 43,32

13

- hergestellt nach Variante A, HS-Medium mit C-Quellen-Zusammensetzung: 50% D-Glucose (250 mg), 50% Glycerin (226 mg)

-25 ml Nährlösung, + 0,5 ml Zellsuspension (aus 80 ml Vorkultur, 10 Tage alt), 3 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), April 2002 - Oktober 2003

-Ausbeute: 178,8 mg

-Elementaranalyse: C 42,59%, H 6,39%, N 0,22%

-IR-Spektroskopie (ATR): Cellulose

-GPC: M_w 999100 g/mol, M_n 439100 g/mol, PDI 2,28, DP_w 6167

- WG_{orig} 86,45%, WG_{gefr} 79,76%

-Spezifische Oberfläche (BET) [m^2/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 33,7

-Zug- und Reißfestigkeit, orig, 7 Tage inkubiert [N/mm^2]: σ_{max} 0,77, σ_R 0,42

-Zug- und Reißdehnung, orig, 7 Tage inkubiert [%]: ϵ_{max} 24,49, ϵ_R 34,80

14

-hergestellt nach Variante A, HS-Medium mit C-Quellen-Zusammensetzung: 25% D-Glucose (125 mg), 75% Glycerin (383 mg)

-25 ml Nährlösung, + 0,5 ml Zellsuspension (aus 80 ml Vorkultur, 10 Tage alt), 3 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), April 2002 - Oktober 2003

-Ausbeute: 191 mg

-Elementaranalyse: C 42,87%, H 6,28%, N 0,20%

-IR-Spektroskopie (ATR): Cellulose

-GPC: M_w 972800 g/mol, M_n 319300g/mol, PDI 3,05, DP_w 6005

- WG_{orig} 86,14%, WG_{gefr} 76,98%

-Spezifische Oberfläche (BET) [m^2/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 48,1

-Zug- und Reißfestigkeit, orig, 7 Tage inkubiert [N/mm^2]: σ_{max} 0,82, σ_R 0,44

-Zug- und Reißdehnung, orig, 7 Tage inkubiert [%]: ϵ_{max} 29,62, ϵ_R 39,11

15

-hergestellt nach Variante A, HS-Medium mit C-Quellen-Zusammensetzung: 100% Glycerin (511 mg)

-25 ml Nährlösung, + 0,5 ml Zellsuspension (aus 80 ml Vorkultur, 10 Tage alt), 3 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), April 2002 - Oktober 2003

-Ausbeute: 182,5 mg

-Elementaranalyse: C 43,29%, H 6,34%, N 0,28%

-IR-Spektroskopie (ATR): Cellulose

-GPC: M_w 809300 g/mol, M_n 290900 g/mol, PDI 2,78, DP_w 4996

- WG_{orig} 86,89%, WG_{gefr} 77,85%

-REM: Porengröße im Querschnitt 4 μm x 2 μm , Faserbreite 70 nm, Schichtdicke 150 nm

- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 45,8
- Zug- und Reißfestigkeit, orig, 7 Tage inkubiert [N/mm²]: σ_{\max} 0,76, σ_R 0,48
- Zug- und Reißdehnung, orig, 7 Tage inkubiert [%]: ϵ_{\max} 23,73, ϵ_R 29,56

22

- hergestellt nach Variante A, HS-Medium mit C-Quellen-Zusammensetzung: 75% D-Glucose (375 mg), 25% D-Glucuronsäure Na-Salz (162 mg, Fluka)
- 25 ml Nährlösung, + 0,5 ml Zellsuspension (aus 80 ml Vorkultur, 10 Tage alt), 3 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), April 2002 - Oktober 2003
- Ausbeute: 134,8 mg
- Elementaranalyse: C 43,47%, H 6,48%, N 0,65%
- IR-Spektroskopie (ATR): Cellulose
- HPLC nach Hydrolyse: 100% Glucose
- WG_{orig} 88,27%, WG_{gefr} 77,41%
- REM: Porengröße im Querschnitt 4 µm x 2 µm, Faserbreite 69 nm, Schichtdicke 150 nm
- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 54,8, vak (T_{Heiz} 50°C) 41,3

23

- hergestellt nach Variante A, HS-Medium mit C-Quellen-Zusammensetzung: 50% D-Glucose (250 mg), 50% D-Glucuronsäure Na-Salz (325 mg, Fluka)
- 25 ml Nährlösung, + 0,5 ml Zellsuspension (aus 80 ml Vorkultur, 10 Tage alt), 3 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), April 2002 - Oktober 2003
- Ausbeute: 90,5 mg
- Elementaranalyse: C 43,29%, H 6,61%, N 0,57%
- IR-Spektroskopie (ATR): Cellulose
- HPLC nach Hydrolyse: 100% Glucose
- WG_{orig} 86,89%, WG_{gefr} 80,66%
- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 53,4

32

- hergestellt nach Variante A, HS-Medium mit C-Quellen-Zusammensetzung: 75% D-Glucose (375 mg), 25% D-Glucuronsäure (135 mg, Fluka)
- 25 ml Nährlösung, + 0,5 ml Zellsuspension (aus 80 ml Vorkultur, 10 Tage alt), 3 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), April 2002 - Oktober 2003
- Ausbeute: 119,5 mg
- Elementaranalyse: C 43,48%, H 6,51%, N 0,03%

- IR-Spektroskopie (ATR): Cellulose
- HPLC nach Hydrolyse: 100% Glucose
- WG_{orig} 87,9%, WG_{gefr} 84,54%
- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 50,8, vak (T_{Heiz} 50°C) 41,4

33

- hergestellt nach Variante A, HS-Medium mit C-Quellen-Zusammensetzung: 50% D-Glucose (250 mg), 50% D-Glucuronsäure (269 mg, Fluka)
- 25 ml Nährlösung, + 0,5 ml Zellsuspension (aus 80 ml Vorkultur, 10 Tage alt), 3 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), April 2002 - Oktober 2003
- Ausbeute: 12,75 mg
- Elementaranalyse: C 43,11%, H 6,23%, N 0%
- IR-Spektroskopie (ATR): Cellulose

St(b)

- hergestellt nach Variante B, HS-Medium
- 30 ml Nährlösung, + 1,0 ml Zellsuspension (aus 30 ml Vorkultur, 7 Tage alt), 2 Wochen Kultivierung, 28°C
- inkubiert unter Bruthaube, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 1:1), im November 2001:
- Ausbeute: 300 mg
- Elementaranalyse: C 42,72%, H 6,44%, N 0%
- Festkörper-¹³C-NMR-, IR-Spektroskopie (in KBr): Cellulose
- WG_{orig} 87,23%, WG_{gefr} 73,26%
- inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), Januar - Juli 2003:
- Ausbeute: 235,6 mg
- WG_{orig} 89,25%, WG_{gefr1} 68,36%, WG_{gefr2} 68,34%, WG_{gefr3} 66,23%
- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: vak (T_{Heiz} 50°C) 41,1

42

- hergestellt nach Variante B, HS-Medium + 0,5% CMC (m/V, 150 mg, CMC Na-Salz, DS 0,6 - 0,95, pH 1% in H₂O: 5,5 - 8,5, Fluka)
- 30 ml Nährlösung, + 1,0 ml Zellsuspension (aus 30 ml Vorkultur, 7 Tage alt), 2 Wochen Kultivierung, 28°C
- inkubiert unter Bruthaube, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 1:1), im November 2001:
- Ausbeute: 331 mg

- Elementaranalyse: C 42,18%, H 6,37%, N 0,12%
- Festkörper-¹³C-NMR-, IR-Spektroskopie (in KBr): Cellulose + CMC
- WG_{orig} 95,15%, WG_{gefr} 81,03%
- inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), Januar - Juli 2003:
- Ausbeute: 255,8 mg
- HPLC: 5,46% CMC-Anteil im Vlies (9% der angebotenen CMC)
- GPC: M_w 1273000 g/mol, M_n 613100 g/mol, PDI 2,08, DP_w 7858
- WG_{orig} 96,32%, WG_{gefr1}. 74,22%, WG_{gefr2}. 72,42%, WG_{gefr3}. 70,39%
- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 51,4, vak (T_{Heiz} 50°C) → 0

43

- hergestellt nach Variante B, HS-Medium + 1,0% CMC (m/V, 300 mg, CMC Na-Salz, DS 0,6 – 0,95, pH 1% in H₂O: 5,5 – 8,5, Fluka)
- 30 ml Nährlösung, + 1,0 ml Zellsuspension (aus 30 ml Vorkultur, 7 Tage alt), 2 Wochen Kultivierung, 28°C
- inkubiert unter Bruthaube, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 1:1), im November 2001:
- Ausbeute: 380 mg
- Elementaranalyse: C 41,77%, H 6,23%, N 0,08%
- Festkörper-¹³C-NMR-, IR-Spektroskopie (in KBr): Cellulose + CMC
- WG_{orig} 96,09 %, WG_{gefr} 85,76%
- REM: Porengröße im Querschnitt 5 µm x 3 µm, Faserbreite 90 nm, Schichtdicke 450 nm
- inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), Januar - Juli 2003:
- Ausbeute: 258,8 mg
- HPLC: 14,53% CMC-Anteil im Vlies (13% der angebotenen CMC)
- GPC: M_w 1160000 g/mol, M_n 443400 g/mol, PDI 2,62, DP_w 7160
- WG_{orig} 97,1%, WG_{gefr1}. 75,42%, WG_{gefr2}. 70,89%, WG_{gefr3}. 68,44%
- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 30,1, vak (T_{Heiz} 50°C) → 0

44

- hergestellt nach Variante B, HS-Medium + 2,0% CMC (m/V, 600 mg, CMC Na-Salz, DS 0,6 – 0,95, pH 1% in H₂O: 5,5 – 8,5, Fluka)
- 30 ml Nährlösung, + 1,0 ml Zellsuspension (aus 30 ml Vorkultur, 7 Tage alt), 2 Wochen Kultivierung, 28°C
- inkubiert unter Bruthaube, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 1:1), im November 2001:
- Ausbeute: 343 mg

- Elementaranalyse: C 41,35%, H 6,13%, N 0,4%
- Festkörper-¹³C-NMR-, IR-Spektroskopie (in KBr): Cellulose + CMC
- WG_{orig} 97,26%, WG_{gefr} 95,91%
- REM: Porengröße im Querschnitt 6,5 µm x 5 µm, Faserbreite 120 nm, Schichtdicke 800 nm
- inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), Januar - Juli 2003:
- Ausbeute: 255,8 mg
- HPLC: 18,96% CMC-Anteil im Vlies (8% der angebotenen CMC)
- GPC: M_w 1259000 g/mol, M_n 500800 g/mol, PDI 2,51, DP_w 7772
- WG_{orig} 97,68%, WG_{gefr1} 81,17%, WG_{gefr2} 81,19%, WG_{gefr3} 81,46%
- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 32,0, vak (T_{Heiz} 50°C) → 0

52

- hergestellt nach Variante B, HS-Medium + 0,5% MC (m/V, 150 mg, MC, Viskosität 2% in H₂O: 12 – 18 cP, Acros Organics)
- 30 ml Nährlösung, + 1,0 ml Zellsuspension (aus 30 ml Vorkultur, 7 Tage alt), 2 Wochen Kultivierung, 28°C
- inkubiert unter Bruthaube, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 1:1), im November 2001:
- Ausbeute: 327 mg
- Elementaranalyse: C 42,89%, H 6,43%, N 0,55%
- Festkörper-¹³C-NMR-, IR-Spektroskopie (in KBr): Cellulose + MC
- WG_{orig} 97,57%, WG_{gefr} 92,83%
- inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), Januar - Juli 2003:
- Ausbeute: 289,4 mg
- GPC: M_w 1457000 g/mol, M_n 741900 g/mol, PDI 1,96, DP_w 8994
- WG_{orig} 97%, WG_{gefr1} 74,54%, WG_{gefr2} 76,19%, WG_{gefr3} 73,82%
- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 50,1, vak (T_{Heiz} 50°C) → 0

53

- hergestellt nach Variante B, HS-Medium + 1,0% MC (m/V, 300 mg, MC, Viskosität 2% in H₂O: 12 – 18 cP, Acros Organics)
- 30 ml Nährlösung, + 1,0 ml Zellsuspension (aus 30 ml Vorkultur, 7 Tage alt), 2 Wochen Kultivierung, 28°C
- inkubiert unter Bruthaube, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 1:1), im November 2001:
- Ausbeute: 476 mg

- Elementaranalyse: C 44,47%, H 6,80%, N 0,24%
- Festkörper-¹³C-NMR-, IR-Spektroskopie (in KBr): Cellulose + MC
- WG_{orig} 97,81%, WG_{gefr} 92,33%
- REM: Porengröße im Querschnitt 5 µm x 2,5 µm, Faserbreite 100 nm, Schichtdicke 450 nm
- inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), Januar - Juli 2003:
- Ausbeute: 295,8 mg
- GPC: M_w 1413000 g/mol, M_n 518000 g/mol, PDI 2,73, DP_w 8722
- WG_{orig} 96,49%, WG_{gefr1}. 83,7%, WG_{gefr2}. 82,22%, WG_{gefr3}. 77,93%
- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 40,1, vak (T_{Heiz} 50°C) → 0

54

- hergestellt nach Variante B, HS-Medium + 2,0% MC (m/V, 600 mg, MC, Viskosität 2% in H₂O: 12 – 18 cP, Acros Organics)
- 30 ml Nährlösung, + 1,0 ml Zellsuspension (aus 30 ml Vorkultur, 7 Tage alt), 2 Wochen Kultivierung, 28°C
- inkubiert unter Bruthaube, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 1:1), im November 2001:
- Ausbeute: 433 mg
- Elementaranalyse: C 44,44%, H 6,76%, N 0,35%
- Festkörper-¹³C-NMR-, IR-Spektroskopie (in KBr): Cellulose + MC
- WG_{orig} 97,47%, WG_{gefr} 94,34%
- REM: Porengröße im Querschnitt 5 µm x 3 µm, Faserbreite 129 nm, Schichtdicke 900 nm
- inkubiert im Brutschrank, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 20:1), Januar - Juli 2003:
- Ausbeute: 285,8 mg
- GPC: M_w 1180000 g/mol, M_n 428000 g/mol, PDI 2,76, DP_w 7284
- WG_{orig} 95,63%, WG_{gefr1}. 87,32%, WG_{gefr2}. 83,13%, WG_{gefr3}. 78,22%
- Spezifische Oberfläche (BET) [m²/g]: gefr (T_{Heiz} 50°C) 26,4, vak (T_{Heiz} 50°C) → 0

62

- hergestellt nach Variante B, HS-Medium + 0,5% PVA (m/V, 150 mg, PVA 72000, Merck-Schuchardt)
- 30 ml Nährlösung, + 1,0 ml Zellsuspension (aus 30 ml Vorkultur, 7 Tage alt), 2 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert unter Bruthaube, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 1:1), im November 2001
- Ausbeute: 218 mg

- Elementaranalyse: C 43,28%, H 6,21%, N 0,14%
- Festkörper-¹³C-NMR-, IR-Spektroskopie (in KBr): Cellulose
- WG_{orig} 87,25%, WG_{gefr} 61,89%

63

- hergestellt nach Variante B, HS-Medium + 1,0% PVA (m/V, 300 mg, PVA 72000, Merck-Schuchardt)
- 30 ml Nährlösung, + 1,0 ml Zellsuspension (aus 30 ml Vorkultur, 7 Tage alt), 2 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert unter Bruthaube, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 1:1), im November 2001
- Ausbeute: 218 mg
- Elementaranalyse: C 43,73%, H 6,34%, N 0,15%
- Festkörper-¹³C-NMR-, IR-Spektroskopie (in KBr): Cellulose
- WG_{orig} 87,93%, WG_{gefr} 69,84%

64

- hergestellt nach Variante B, HS-Medium + 2,0% PVA (m/V, 600 mg, PVA 72000, Merck-Schuchardt)
- 30 ml Nährlösung, + 1,0 ml Zellsuspension (aus 30 ml Vorkultur, 7 Tage alt), 2 Wochen Kultivierung, 28°C, inkubiert unter Bruthaube, im Dunkeln und in künstlichem Licht (etwa 1:1), im November 2001
- Ausbeute: 290 mg
- Elementaranalyse: C 43,90%, H 6,37%, N 0,15%
- Festkörper-¹³C-NMR-, IR-Spektroskopie (in KBr): Cellulose + PVA
- WG_{orig} 90,36%, WG_{gefr} 75,75%
- REM: Porengröße im Querschnitt 3 µm x 1 µm, Faserbreite 64 nm

9 Literaturverzeichnis

Atkins, P. W., *Physikalische Chemie*, Atkins, P. W., Ed., VCH, Weinheim, 1990

Barrett, E. P., Joyner, L. G., Halenda, P. P., The determination of pore volume and area distributions in porous substances, I., Computations from nitrogen isotherms, *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, p. 373, 1951

Barsha, J., Hibbert, H., Reactions relating to carbohydrates and polysaccharides, XLVI., Structure of the cellulose synthesized by the action of *Acetobacter xylinus* on fructose and glycerol, *Can. J. Research*, 10, p. 170, 1934

Ben-Hayyim, G., Ohad, I., Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*, VIII, Formation and orientation of bacterial cellulose fibrils in the presence of acidic polysaccharides, *Journal of Cell Biology*, 25 (2), p. 191, 1965

Bonusfield, E. G., Wright, G. G. H., Walker, T. K., Oxidation of glycerol by *Acetobacter* species, *Journal of the Institute of Brewing*, 53, p. 258, 1947

Braun, D., Cherdrón, H., Ritter, H., *Praktikum der Makromolekularen Stoffe*, Braun, D., Ed., WILEY-VCH, Weinheim, 1999

Brown, R. M., Jr., Willison, J. H., Richardson, C., Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process, *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 73, p. 4565, 1976

Brown, R. M., Jr., Emerging technologies and future prospects for industrialization of microbially derived cellulose, in *Harnessing Biotechnology for the 21st Century*, Ladisch, M. R., Bose, A., Eds., American Chemical Society, Washington DC, p. 76, 1992

Brown, R. M., Jr., Microbial cellulose modified during synthesis, U.S. Patent 4,942,128; 1990

Brunauer, S., Deming, L. S., Deming, W. E., Teller, E., On a theory of the van der Waals adsorption of gases, *Journal of the American Chemical Society*, 62, p. 1723, 1940

Brunauer, S., Emmet, P. H., Teller, E., Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Amer. Chem. Soc.*, 60, p. 309, 1938

Cannon, R. E., Anderson, S. M., Biogenesis of bacterial cellulose, *Critical Reviews in Microbiology*, 17 (6), p. 435, 1991

Colvin, J. R., Leppard, G., The biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* and *Acetobacter acetigenus*, *Canadian Journal of Microbiology*, 23 (6), p. 701, 1977

Delmer, D. P., Cellulose Biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study, *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, p. 245, 1999

Einfeldt, L., Klemm, D., The control of cellulose biosynthesis by *Acetobacter xylinum* in view of molecular weight and molecular weight distribution, Part I: Change of molecular weight of bacterial cellulose by simple variation of culture conditions, *J. Carbohydrate Chemistry*, 16, p. 635, 1997

Fink, H.-P., Purz, H.-J., Bohn, A., Kunze, J., Investigation of the supramolecular structure of never dried bacterial cellulose, *Macromol. Symp.*, 120, p. 207, 1997

Fontana, J. D., Desouza, A. M., Fontana, C. K., Torriani, I. L., Moreschi, J. C., Gallotti, B. J., Desouza, S. J., Narcisco, G. P., Bichara, J. A., Farah, L. F., X., *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24, p. 253, 1990

Haigler, C. H., Benziman, M., Biogenesis of cellulose I microfibrils occurs by cell-directed self-assembly in *Acetobacter xylinum*, in *Cellulose and Other Natural Polymer Systems*, Brown, R. M., Jr., Ed., Plenum Press, New York, chap. 14, 1982

Haigler, C. H., Relationship between polymerization and crystallization in microfibril biogenesis, in *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*; Haigler, C. H., Weimer, P. J., Eds., Marcel Dekker, Inc., 5, p. 99, 1991

Hestrin, S., Schramm, M., Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* II: Preparation of freeze dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose, *Biochemical Journal*, 58 (2), p. 345, 1954

Hibbert, H., Barsha, J., Synthetic cellulose and textile fibers from glucose, *Journal of the American Chemical Society*, 53, p. 3907, 1931

Hirai, A., Tsuji, M., Yamamoto, H., Horii, F., In situ crystallization of bacterial cellulose, III., Influences of different polymeric additives on the formation of microfibrils as revealed by transmission electron microscopy, *Cellulose*, 5 (3), p. 201, 1998

<http://sn2000.taxonomy.nl> (Systema Naturae 2000, Amsterdam, The Netherlands, Stand 15.6.2002) > Main classification: Life > Domain Bacteria > Phylum Proteobacteria > Class Alphaproteobacteria > Order Rhodospirillales > Family Acetobacteraceae > Genus Gluconacetobacter > Gluconacetobacter xylinus > Gluconacetobacter xylinus xylinus

<http://www.emp.tsak.net> (EmpOnline der Freien Universität Berlin, Stand 2004) > Material: Folien > Vorlesung: T-Test für unabhängige Stichproben (pdf)

Jayme, G., Rothamel, L., Development of a standard centrifugal method for determining the swelling values of pulps, *Papier* (Bingen, Germany), 2, p. 7, 1948

Jonas, R., Farah, L. F., Production and application of microbial cellulose, *Polymer Degradation and Stability*, 59, p. 101, 1998

Kai, A., Kobayashi, T., Influence of poly(vinyl alcohol) on the structure of bacterial cellulose spherulite, *Polymer Journal*, , 24 (1), p. 131, 1992

Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., Marsch, S., Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery, *Prog. Polym. Sci.*, 26, p. 1561, 2001

Klemm, D., Udhardt, U., Schumann, D., Marsch, S., Heublein, B., Wurdinger, J., Hussein, A., Seifert, M., Struktur-Eigenschaftsbeziehungen des Biowerkstoffes BASYC, *Tagungsband, naro.tech., 4. Symposium „Werkstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen“*, Erfurt, September, 2003

Krause, B., Metzler, P., Angewandte Statistik, Lehr- und Arbeitsbuch für Psychologen, Mediziner, Biologen und Pädagogen, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin, 1984

Krystynowicz, A., Bielecki, S., Czaja, W., Rzyska, M., Application of bacterial cellulose for clarification of fruit juices, *Progress in Biotechnology*, 17, p. 323, 2000

Kuga, S., Brown, R. M., Jr., Physical structure of cellulose microfibrils: Implication for biogenesis, in *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*; Haigler, C. H., Weimer, P. J., Eds., Marcel Dekker, Inc., 6, p. 125, 1991

Marx-Figini, M., The control of molecular weight and molecular-weight distribution, in *Cellulose and Other Natural Polymer Systems*, Brown, R. M., Jr., Ed., Plenum Press, New York, p. 243, 1982

Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N., Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75 (1), p. 18, 1993

Oiawa, D., Takagi, M., Ameyama, M., Detection of carboxymethyl cellulase activity in *Acetobacter xylinum* KU-1, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58 (11), p. 2102, 1994

Pilz, D., Bakterielle Celluloseproduktion von *Acetobacter xylinum* im Erlenmeyerkolben und im Bioreaktor, Dissertation, Universität Hohenheim, 2001

Rehm, H. J., Biotechnologie, in *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, Bartholomé, E., Biekert, E., Hellmann, H., Ley, H., Eds., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., Band 8, 4. Auflage, p. 496, 1974

Ridout, M. J., Brownsey, G. J., Gunning, A. P., Morris, V. J., Characterization of the polysaccharide produced by *Acetobacter xylinum* strain CR1/4 by light scattering and atomic force microscopy, *International Journal of Biological Macromolecules*, 23 (4), p. 287, 1998

Röhring, J., Potthast, A., Rosenau, T., Lange, T., Ebner, G., Sixta, H., Kosma, P., A Novel method for the determination of carbonyl groups in cellulose by fluorescence labeling. 1. Method Development, *Biomacromolecules*, 3, p. 959, 2002

Römpp Chemie Lexikon, CD-ROM, Falbe, J., Regitz, M., Eds., Thieme-Verlag, Stuttgart, 1995

Ross, P., Mayer, R., Benziman, M., Biochemistry of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, in *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*, Haigler, C. H., Weimer, P. J., Eds., Marcel Dekker, Inc., 11, p. 219, 1991

Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, O., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., De Vroom, E., Benziman, M., Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid, *Nature*, 325, p. 279, 1987

Saalwächter, K., Burchard, W., Klüfers, P., Kettenbach, G., Mayer, P., Klemm, D., Dugarmaa, S., Cellulose solutions in water containing metal complexes, *Macromolecules*, 33, p. 4094, 2000

Sakairi, N., Suzuki, S., Ueno, K., Han, S.-M., Nishi, N., Tokura, S., Biosynthesis of hetero-polysaccharides by *Acetobacter xylinum* – Synthesis and characterization of metal-ion adsorptive properties of partially carboxymethylated cellulose, *Carbohydrate Polymers*, 37 (4), p. 409, 1998

Salmon, S., Hudson, S. M., Crystal Morphologie, Biosynthesis, and Physical Assembly of Cellulose, Chitin, and Chitosan, *J. M. S. – Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C37 (2), p. 199, 1997

Seifert, M., Hesse, S., Kabrelian, V., Klemm, D., Controlling the water content of never dried and reswollen bacterial cellulose by the addition of water-soluble polymers to the culture medium, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 42, p. 463, 2004

Shirk, H. G., Greathouse, G. A., Infrared spectra of bacterial cellulose, *Anal. Chem.*, 24, p. 1774, 1952

Tahara, N., Tabuchi, M., Watanabe, K., Yano, H., Morinaga, Y., Yoshinaga, F., Degree of polymerization of cellulose from *Acetobacter xylinum* BPR2001 decreased by cellulase produced by the strain, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61 (11), p. 1862, 1997

Tajima, K., Enhancement of bacterial cellulose (BC) production by carboxymethyl cellulose (CMC), *Cellulose Communications*, 6 (1), p. 18, 1999

Tajima, K., Fujiwara, M., Takai, M., Hayashi, J., Synthesis of bacterial cellulose composite by *Acetobacter xylinum*, I., Its mechanical strength and biodegradability, *Mokuzai Gakkaishi*, 41, p. 749, 1995

Takai, M., Nonomura, F., Inukai, T., Fujiwara, M., Hayashi, J., Filtration and permeation characteristics of bacterial cellulose composite, *Sen-i Gakkaishi*, 47 (3), p. 119, 1991

Tanaka, M., Yoshida, M., Murakami, S., Aoki, K., Shinke, R., The characterization of phenotypic features of cellulose-forming acetic acid bacteria, *Kobe Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku*, 23 (1), p. 65, 1998

Tokura, S., Asano, H., Sakairi, N., Nishi, N., Direct filtration of bacterial cellulose from culture medium, *Macromol. Symp.*, 127, p. 23, 1998

Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., De Wulf, P., Improved production of bacterial cellulose and its application potential, *Polymer Degradation and Stability.*, 59, p. 93, 1998

White, D. G., Brown, R. M., Jr., Prospects for the commercialization of the biosynthesis of microbial cellulose, in *Cellulose and Wood-Chemistry and Technology*, Schuerch, C., Ed., John Wiley & Sons, New York, p. 573, 1989

Yamamoto, H., Horii, F., In situ crystallization of bacterial cellulose, I., Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation of celluloses I α and I β as revealed by cross polarization / magic angle spinning (CP/MAS) carbon-13 NMR spectroscopy, *Cellulose*, 1, p. 57, 1994

Yamamoto, H., Horii, F., Hirai, A., In situ crystallization of bacterial cellulose, II., Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I α and I β at the early stage of incubation, *Cellulose*, 3, p. 229, 1996

Yamanaka, S., Watanabe, K., Applications of Bacterial Cellulose, in *Cellulosic Polymers, Blends and Composites*, Gilbert, R. D., Ed., Hauser Verlag, München, 11, p. 207, 1994

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGU	Anhydro Glucose Unit
AX	<i>Acetobacter xylinum</i>
BASYC	BACTERIAL SYNTHESIZED CELLULOSE
BC	Bakteriencellulose
BET	Brunauer-Emmett-Teller
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CMC	Carboxymethylcellulose
CP	Cross Polarization
d.h.	das heißt
DP	Degree of Polymerization
DP _w	Degree of Polymerization, berechnet aus M _w
DS	Degree of Substitution
ε _{max} , ε _R	Zugdehnung, Reißdehnung
F	Kraft
gefr	gefriergetrocknet
Glc	Glucose
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HS	Hestrin-Schramm
IOMC	Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie
IR	Infrarot
l	Länge
m	Masse
MC	Methylcellulose
min	Minute
M _n	Zahlenmittel der Molmasse
M _w	Gewichtsmittel der Molmasse
n	Anzahl der Meßwerte
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
orig	niemals getrocknet
PDI	Polydispersitätsindex
ppm	Parts per million
PVA	Polyvinylalkohol
ρ	Dichte

REM	Rasterelektronenmikroskopie
r_p	Porenradius
RSA	Relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
σ_{\max} , σ_R	Zugfestigkeit, Reißfestigkeit
s	Standardabweichung
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
spezif.	spezifisch
Tab.	Tabelle
T_{Heiz}	Ausheiztemperatur
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volumen
vak	vakuumgetrocknet
WG	Wassergehalt
WRV	Wasserrückhaltevermögen
WSP	Water Soluble Polymer

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1 Strukturformel von Cellulose	1
Abb. 2 Schema für Synthesestrategien und Gestaltungsmöglichkeiten von a) einer einfachen modellhaften chemischen Reaktion bzw. b) einer Biosynthese von Bakteriencellulose	4
Abb. 3 Darstellung der prinzipiellen Unterschiede nach der Isolierung und Reinigung von a) einem Produkt C einer chemischen Reaktion bzw. b) Bakteriencellulose	6
Abb. 4 C-Quellen-Zusammensetzung des Nährmediums, alternative C-Quelle sowie Probenbezeichnungen	9
Abb. 5 Anteil der Additive zum Standard-Medium, verwendete Additive und Probenbezeichnungen	10
Abb. 6 Einfluß der C-Quellen-Zusammensetzung auf die Ausbeute im Vergleich zu St(a)	13
Abb. 7 Zellkolonien von AX – Vergrößerter Ausschnitt einer Festkultur nach 14 Tagen	16
Abb. 8 Festkörper- ¹³ C-NMR-Spektren von gefriergetrockneten BC-Vliesen, hergestellt in Gegenwart von Additiven, ihre Differenzspektren zur Standard-BC St(b) sowie Vergleichsspektren der Additive CMC, MC bzw. PVA	18
Abb. 9 Demonstration der C1-Resonanz-Zerlegung in Gauß-Linien für C1 α , C1 β , C1 β' und amorphe Teile	19
Abb. 10 Diagramm der normierten Integral-Werte für C1 α , C1 β und C1 β' sowie C4 α , C4 α' , C4 β und C4 β' der CMC-Reihe (Proben 42 – 44) im Vergleich zu St(b)	20
Abb. 11 Diagramm der normierten Integral-Werte für C1 α , C1 β und C1 β' sowie C4 α , C4 α' , C4 β und C4 β' der MC-Reihe (Proben 52 – 54) im Vergleich zu St(b)	21
Abb. 12 IR-Spektren von St(b), 42, 43, 44 und reiner CMC	23
Abb. 13 IR-Spektren von St(b), 52, 53, 54 und reiner MC	23
Abb. 14 IR-Spektren von St(b), 62, 63, 64 und reinem PVA	24
Abb. 15 IR-Spektren der unteren Vlies-Seite von St(a), 12, 13, 14 und 15	25
Abb. 16 IR-Spektren der unteren Vlies-Seite von St(a), 22 und 23	25
Abb. 17 IR-Spektren der unteren Vlies-Seite von St(a), 32 und 33	26
Abb. 18 HPLC-Elugramme von St(a), 22 und 23	27
Abb. 19 HPLC-Elugramme von 42, 43 und 44	28
Abb. 20 Graphische Darstellung der Molmassenverteilung der BC in Abhängigkeit der D-Glucose / Glycerin – Zusammensetzung der C-Quelle während der Kultivierung	32
Abb. 21 Graphische Darstellung der Molmassenverteilung der BC in Abhängigkeit vom CMC-Zusatz in der Nährlösung während der Kultivierung	34
Abb. 22 Graphische Darstellung der Molmassenverteilung der BC in Abhängigkeit vom MC-Zusatz in der Nährlösung während der Kultivierung	35
Abb. 23 Skizze zur REM-Betrachtungsposition im BC-Vlies	37

Abb. 24 REM-Aufnahmen von St(a)	38
Abb. 25 REM-Aufnahmen von St(b)	39
Abb. 26 REM-Aufnahmen der Unterseite und der Oberseite eines St(b)-Vlieses	40
Abb. 27 REM-Aufnahmen der Glycerin-Reihe	41
Abb. 28 REM-Aufnahmen von Probe 15	41
Abb. 29 REM-Aufnahmen von Probe 22	42
Abb. 30 REM-Aufnahmen von Probe 23	43
Abb. 31 REM-Aufnahmen der Proben 43, 53, 64, 44 und 54	44
Abb. 32 REM-Aufnahmen der Probe 44	45
Abb. 33 Physisorptionsisothermen von gefriergetrockneter St(a), ausgeheizt bei 50 bzw. 150°C, und von vakuumgetrockneter St(a), ausgeheizt bei 50 bzw. 150°C	47
Abb. 34 Physisorptionsisothermen der gefriergetrockneten Proben St(a), 12, 22 und 32	49
Abb. 35 Physisorptionsisothermen der vakuumgetrockneten Proben St(a), 12, 22 und 32	50
Abb. 36 Physisorptionsisothermen der vakuumgetrockneten Proben St(b), 42, 43 und 44	52
Abb. 37 Physisorptionsisothermen der vakuumgetrockneten Proben St(b), 52, 53 und 54	52
Abb. 38 Skizze von BC-Vlies-Strukturen vor und nach dem Vakuumtrocknen	53
Abb. 39 Skizze zu einzeln vorliegenden Fasern im BC-Netzwerk und zur Einbindung dieser Fasern in Verbände durch Additiv-Moleküle	55
Abb. 40 Beziehung zwischen Wasserrückhaltevermögen (WRV) und Wassergehalt (WG)	57
Abb. 41 Darstellung des Wassergehaltes von niemals getrockneten BC-Vliesen des IOMC und der Firma SurA Chemicals nach der alten und neuen Bestimmungsmethode	58
Abb. 42 Wassergehalte von niemals getrockneten BC-Vliesen, die unter Zusatz von CMC, MC bzw. PVA produziert wurden	59
Abb. 43 Wassergehalte von gefriergetrockneten BC-Vliesen, die unter Zusatz von CMC, MC bzw. PVA produziert wurden	60
Abb. 44 Vergleich der Wassergehalte von niemals getrockneten BC-Vliesen, die unter Zusatz von CMC bzw. MC produziert wurden, aus der 1. Studie (2001) und der 2. Studie (2003)	61
Abb. 45 Skizze zur Zug-Dehnungs-Messung	65
a) Probenvorbereitung	
b) eingespannte Probe zu Beginn des Versuchs	
c) gerissene Probe bei Versuchsende	

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1 Ausbeute-Unterschiede der BC-Vliese durch Variation der C-Quelle	11
Tab. 2 Berechnung der Ausbeute an BC, bezogen auf die Glucose-Anfangskonzentration	14
Tab. 3 Herstellungs- und daraus folgende Ausbeute-Unterschiede für St(a) und St(b)	15
Tab. 4 Auswertung der HPLC-Chromatogramme von 42, 43 und 44	28
Tab. 5 Berechnung des CMC-Gehaltes aus den HPLC-Daten für 42, 43 und 44	29
Tab. 6 Abschätzung der CMC-Menge, die in ein Vlies eingelagert wurde, in Relation zur CMC-Menge, die der Nährlösung zugesetzt war	29
Tab. 7 GPC-Ergebnisse für die Glycerin-Reihe	33
Tab. 8 GPC-Ergebnisse für die CMC-Reihe	34
Tab. 9 GPC-Ergebnisse für die MC-Reihe	36
Tab. 10 Abmessungen von Poren, Fasern und Schichten im Überblick	45
Tab. 11 Ergebnisse der Messung der N ₂ – Physisorptionsisothermen für St(a)	48
Tab. 12 Ergebnisse der Messung der N ₂ – Physisorptionsisothermen von BC in Abhängigkeit der Variation der C-Quelle im Nährmedium	50
Tab. 13 Ergebnisse der Messung der N ₂ – Physisorptionsisothermen von BC in Abhängigkeit von Additiven im Nährmedium	51
Tab. 14 GPC-Ergebnisse der Additive CMC und MC	54
Tab. 15 Wassergehalte von niemals getrockneten und gefriergetrockneten BC-Vliesen, die durch Variation der C-Quelle entstanden sind	59
Tab. 16 Wassergehalte der CMC- und MC-Reihen aus wiederholten Reuellungen im Verhältnis zum WG _{gefr.1} .	61
Tab. 17 Spezifische Volumina der niemals getrockneten und der gefriergetrockneten BC-Proben, die sich aus ihrer Wasserkapazität ergeben	63
Tab. 18 Zugfestigkeit, -dehnung, Reißfestigkeit und -dehnung sowie die Relationen E _{max} und E _{Bruch} der Glycerin-Reihe im Vergleich zu St(a)	65
Tab. 19 Waschverfahren für die Vliese aus der Herstellung nach Variante A und B	75

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. D. Klemm. Er ermöglichte mir die Arbeit auf dem faszinierenden Gebiet der Bakterienzellulose, gestattete mir sehr viel Freiraum für eine individuelle Forschung und unterstützte mich bei der Entwicklung meiner fachlichen Qualifikation auf seine angenehme, menschliche Art und Weise.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Prof. Klemm im Zeitraum von 1999 bis 2004 für ein produktives Arbeitsklima und viele konstruktive Diskussionen sowie all den Mitarbeitern des IOMC, die für eine freundschaftliche, entspannte Atmosphäre zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen beigetragen haben.

Zum Gelingen dieser Dissertation trugen insbesondere die folgenden Personen bei, denen ich zu großem Dank verpflichtet bin: Ulrike Udhardt, Dr. Vasken Kabrelian (Aleppo, Syrien), Stefanie Hesse, Dr. Tilo Breyer, Frau Dr. Potthast (Wien, Österreich), Susanne Sölter, Karin Muchina, Frau Lemanczyk, Frau Schneider, Frau Sentis, Frau Lentvogt, Frau Schönfeld, Frau Arnold, Dr. Katrin Petzold, Frau Göbel, Daniel Koth, Magda Wrzalik, Dr. Brigitte Heublein, Susann Barthel, Björn Kusebauch, Anja Burkhardt und Jana Becher.

In privater Hinsicht, und deshalb besonders herzlich, danke ich Sven Kalmring, meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden für ihre Zeit, ihre Geduld, ihr Lachen, ihre Liebe. Sie alle verdienen meinen tiefen Respekt und meine ergebenste Verbundenheit.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten	Name	<u>Marit</u> Rica Seifert
	Geburtstag	1. Mai 1972
	Geburtsort	Zwickau
	Staatsangehörigkeit	deutsch
	Familienstand	ledig
Schulbildung	9.1978 – 8.1988	zehnklassige Schulbildung an der Polytechnischen Oberschule „Juri-Gagarin“ in Zwickau
Berufsausbildung	9.1988 – 4.1990	Lehrausbildung an der Berufsschule „Clara Zetkin“ zur Fachverkäuferin für Textilien, Schuhe und Lederwaren beim Einzelhandelsbetrieb Zwickau
Beruflicher Werdegang	5.1990 – 8.1991	Delegierung nach Ückeritz/Usedom (für 3 Monate) als Saison-Hilfe, Einsatz als Stellvertretende Verkaufsstellenleiterin in Zwickau
Abitur	9.1991 – 7.1993	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am „Vogtland-Kolleg“ in Plauen, Leistungskurse: Informatik und Englisch
Studium	10.1993 – 10.1998	Diplomstudiengang Chemie an der „Friedrich-Schiller-Universität“ in Jena, Vertiefungsrichtungen: Analytische Chemie und Bioorganische Chemie, Diplomarbeit: „Analytische Untersuchungen an Hydroxyethylcellulosen und -cyclodextrinen“
	1997	Chemisches Praktikum an der „National Technical University“ in Athen, Griechenland
Beruflicher Werdegang	2.1999 – 4.2001	Arbeit als Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der FSU Jena zu den Themen „Selektive Acetalisierung der sekundären OH-Gruppen von Cellulose“ und „Das Reaktionsverhalten von Pd(en)-Cellulose“
	seit 5.2001	Arbeit an der vorliegenden Dissertation

 Ort, Datum

 Unterschrift

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Ort, Datum

Unterschrift