

1. Einleitung und Zielsetzung

Im Zuge der sich weltweit verschärfenden Auswirkungen der anthropogenen Eingriffe in lokale und globale Ökosysteme, wachsen die Bemühungen zur Transformation fossil-basierter und Einweg-Produkte-herstellender Wirtschaftszweige zu einer umweltfreundlicheren, auf erneuerbaren Ressourcen und Recycling basierenden Wirtschaft. Dabei stehen insbesondere die Energiegewinnung aus fossilen Quellen (Erdgas, Erdöl) als auch Wertstoffketten für verschiedene Produkte aus der Material- (Kunststoffe, Metalle, Textilien) und Lebensmittelbranche (Proteine) im Fokus. In allen genannten Bereichen kann die Biotechnologie zu nachhaltigeren Prozessketten und Produkten beitragen, indem Bakterien oder Pilze die Herstellung bio-basierter Materialien (Polymere, Textilien), Chemikalien (Antibiotika, organische Säuren, Alkohole) und Lebensmittel (Proteine, Vitamine) unter Nutzung erneuerbarer Ressourcen aus Sekundärrohstoffen oder per CO₂-Fixierung aus der Atmosphäre ermöglichen [1–4].

Die Verwendung umweltfreundlicherer Materialien ist dabei oft auch mit Biopolymeren verbunden, von denen im Alltag Xanthan als Verdickungsmittel, pflanzliche Cellulose in Textilien oder Polymilchsäure (PLA) als Verpackungsmaterial vorkommen. Doch auch in Hochtechnologie-Anwendungen spielen Biopolymere eine zentrale Rolle, wobei sie im Idealfall mit bioökonomischen Prozessen - also der Kreislaufführung und Verwertung biologischer Nebenprodukte - kombiniert werden. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wird beispielsweise an der Modifikation von Textil-Fasern mit Chitosan geforscht, um Kleidung unter Nutzung natürlicher Rohstoffe wasserabweisend zu gestalten, oder der Verwendung von Lignin als anodischem Aktivmaterial für Li-Ionen-Batterien, wobei letzteres bereits die Kommerzialisierung erreicht hat [5,6].

Die gleichzeitig hohe Bedeutung der Erforschung leistungsfähiger und nachhaltiger elektrochemischer Energiespeicher zeigt sich in der Gründung der europäischen Forschungsinitiative „BATTERY 2030+“ [7], die sich dem Thema in einem als „*chemistry neutral*“ beschriebenen Ansatz widmen wird. Neben neuen Materialien und Speichertechnologien steht mit der zunehmenden Verbreitung von Li-Ionen-Sekundärzellen - also wiederaufladbaren Batterien - auch deren effektives Recycling im Fokus, um die Abhängigkeiten von Lieferketten als auch den ökologischen Fußabdruck langfristig zu reduzieren. Dies erhält besondere Relevanz in Anbetracht der benötigten Kapazitäten für die Umstellung des Individualverkehrs auf die Elektromobilität [8] oder den Ausbau von kommerziellen elektrochemischen Großspeichern zur Netzstabilisierung, deren singuläre Kapazitäten 2014 mit wenigen MWh begannen und inzwischen auf 250 MWh angestiegen sind [9,10].

Dieser Bedarf an Speicherkapazität für den Wechsel von vorwiegend fossilen auf erneuerbare Energien erfordert für einen möglichst niedrigen Umwelteinfluss auch die Nutzung bio-basierter Materialien wie Biopolymeren. Diese können nicht nur zu einem nachhaltigeren Produkt führen, sondern durch die natürliche Vielfalt an funktionellen Gruppen auch zu besseren Eigenschaften der Energiespeicher beitragen. Der Ursprung und die Herstellungsbedingungen von Biopolymeren können deren Eigenschaften - ähnlich wie bei synthetischen Polymeren - jedoch stark beeinflussen und sollten daher sowohl bekannt als auch im Idealfall beeinflussbar sein. Obwohl der Einsatz von Biopolymeren in Li-Ionen-Batterien vor allem durch die Anwendung teilweise bio-basierter Anoden-Binder bereits Kommerzialisierung erfahren hat, gilt es für aktuelle und zukünftige Batterie-Technologien die Vorteile alternativer Biopolymer-Materialien weiter herauszuarbeiten.

Das Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, mikrobielle Biopolymere für den Einsatz in Li-Ionen-Batterien zu identifizieren und zu produzieren sowie deren Eignung anhand charakteristischer mechanischer und elektrochemischer Eigenschaften zu beurteilen. Zusätzlich zu der stark verbreiteten Li-Ionen-Technologie sollten jedoch auch alternative elektrochemische Energiespeicher auf Anwendungsmöglichkeiten für Biopolymere untersucht werden, die Potenzial für eine zukünftige Verbreitung aufweisen. Hierbei stellen Zn-basierte Sekundärbatterien eine mehrerer Technologie-Möglichkeiten dar, bei denen sich Potenziale für Biopolymere als Separator-Material eröffnen. Um der Reduktion fossiler Energien nicht mit massiver Landnutzung und Eutrophierung im Rahmen der Produktionsketten mikrobieller Biopolymere zu begegnen, sollte dabei neben der strukturellen Charakterisierung auch die Produktion der Biopolymere auf weitestgehend umweltfreundlichen Verfahren beruhen und bioökonomische Aspekte beinhalten.

2. Theorie

2.1 Mikrobielle Biopolymere

Biopolymere sind ein Teil der Grundbausteine des Lebens und lassen sich nach ihrer Funktion oder chemischen Wiederholungseinheit klassifizieren. Die Desoxyribonukleinsäure (DNS) als verbreitete chemische Speichereinheit für Erbinformationen zählt daher genau wie Proteine mit ihren jeweiligen biokatalytischen Funktionen, Kohlenhydrate als Zellwand-Bestandteile oder polymere Speicherstoffe zu den Biopolymeren.

Insbesondere Polysaccharide (z. B. Cellulose, Alginat) oder auf Carbon- und Fettsäuren basierende Polymere (z. B. PLA, Polyhydroxyalkanoate) finden im Zuge des Wechsels zu nachhaltigeren Prozessen und Materialien oft Anwendung als Plastik-Ersatz, Membran-Material oder hochfunktionaler Komposit-Werkstoff. Sofern diese auf Basis von Sekundärrohstoffen oder CO₂ gewonnen wurden, können sie einen Beitrag zu kreiswirtschaftlichen Prozessen leisten und dabei fossile Produkte nicht nur ersetzen, sondern auch um neue Funktionalitäten ergänzen.

In diesem Kontext wurde der Fokus dieser Arbeit auf die mikrobiellen Biopolymere γ -Polyglutaminsäure, Sphingan PS-EDIV und bakterielle Cellulose gelegt, die sich hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung und davon abgeleiteten Eigenschaften sehr unterscheiden. Die biotechnologisch produzierten Biopolymere werden daher in den folgenden Kapiteln u. a. im Hinblick auf ihre Struktur, Biosynthese, Gewinnung und Anwendungsmöglichkeiten vorgestellt.

2.1.1 γ -Polyglutaminsäure

2.1.1.1 *Struktur & Funktion*

Bakteriell synthetisierte γ -Polyglutaminsäure ist eine aus D- und L-Glutaminsäure-Monomeren aufgebaute Polyaminosäure mit pH-abhängiger Struktur, deren Lösung durch das Ostwald-de-Waele-Gesetz abbildbare, scherverdünnende Fließigenschaften aufweist [11]. Die Polyaminosäure ist chemisch durch die Verknüpfung der α -NH₂-Gruppe eines Glutaminsäure-Monomers mit der γ -COOH-Gruppe eines anderen per Amidbindung gekennzeichnet, was sie strukturell von Proteinen unterscheidet, wo stets α -Peptidbindungen zu finden sind [12]. Dieser Unterschied gewährt dabei einen relevanten Vorteil: γ -Peptidbindungen sind nur durch sehr wenige Proteasen spaltbar, was das Biopolymer zu einer resilienten Schutzhülle macht.

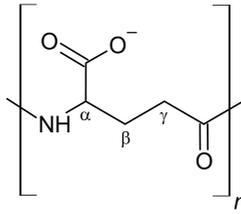


Abbildung 1: Wiederholungseinheit des Biopolymers γ -Polyglutaminsäure.

Bei der erstmaligen Bestimmung der chemischen Natur des Biopolymers im Jahre 1937 mutmaßten daher Ivánovic und Bruckner, dass die Virulenz des γ -PGA-produzierenden Pathogens *Bacillus anthracis* (Milzbrand-Erreger) für höhere Organismen gerade auf dessen Kapselbildung, einen „fermentresistente[n] Schild“, zurückzuführen sein könnte [13]. Neben diesem Schutzmechanismus der Bakterien gegenüber dem Immunsystem der Wirte, Phagen oder auch antimikrobiellen Proteinen wurden jedoch auch weitere mögliche Habitat-abhängige Funktionen der Polymer-Bildung beschrieben. Diskutiert wurden daher auch der Schutz gegen verschiedene Umweltbedingungen wie Trockenheit oder Schwermetall- und Salz-Akkumulation. Durch Komplexierung bindet γ -PGA multivalente Kationen, was in der Folge einen biologischen Wachstumsvorteil ausmachen würde. Zuletzt kann das Biopolymer auch als Ersatz-Kohlenstoff- und -Stickstoff-Quelle dienen [14].

2.1.1.2 Vorkommen & Biosynthese

Die Fähigkeit zur Biosynthese von γ -PGA ist in allen drei Domänen des Lebens vertreten, jedoch ist es vor allem die Gattung der Gram-positiven *Bacillus* bei denen die Produktion besonders verbreitet ist. Aufgrund der hohen Produktivität stellen insbesondere *B. subtilis* und *B. licheniformis* die am meisten erforschten Arten dar. Diese untergliedern sich jedoch nochmals in spezifische Stämme, die zur Glutaminsäure-abhängigen (z. B. *B. licheniformis* ATCC 9945A, *B. subtilis* subsp. *chungkookjang*) oder auch -unabhängigen γ -PGA-Produktion fähig sind. Insbesondere bei der Glutaminsäure-abhängigen Produkt-Biosynthese lassen sich besonders hohe Polymer-Konzentrationen und -Erträge erzielen, die jedoch den geringeren Kosten für das Produktionsmedium bei den anderen Stämmen entgegenstehen [15,16].

Unabhängig vom Substrat-Bedarf erfolgt die nicht-ribosomale Polymer-Biosynthese bei den Stämmen überwiegend äquivalent zueinander und besteht grundsätzlich aus den folgenden Schritten: Racemisierung, Polymerisierung, Abtrennung/Verankerung. Bei Glutaminsäure-unabhängigen Stämmen erfolgt noch ein vorhergehender Schritt, bei dem das Monomer L-Glutaminsäure aus dem Tricarbonsäure-Zyklus (TCA, *tricarboxylic acid*) heraus synthetisiert wird. Für diesen Fall zeigt **Abbildung 2** die ablaufenden metabolischen Vorgänge. Nach der Generierung der notwendigen L-Monomere

wird ein Teil von diesen enzymatisch direkt über eine Glutamat Racemase oder indirekt über mehrere Zwischenschritte (vgl. **Abb. 2**) in D-Glutaminsäure umgewandelt. Daraufhin folgt die Polymerisierung durch die aus bis zu vier verschiedenen Proteinen aufgebaute Polyglutamate Synthase (Pgs). Bei dieser bilden PgsB und PgsC die katalytischen Einheiten zur ATP-abhängigen Polymerisierung, wohingegen PgsA der Entfernung der verlängerten Polymer-Kette dient. Die ebenso vorhandene PgsE-Untereinheit wurde als für die Synthese nicht essentiell beschrieben, scheint aber eine stabilisierende Funktion für den Transmembran-Komplex einzunehmen. Zuletzt wird der gebildete Polymerstrang durch γ -Glutamyltranspeptidasen entweder am Peptidoglycan der Zellwand fixiert (CapD bei *B. anthracis*) oder ins Medium sekretiert (PgsS bei *B. licheniformis* und *B. subtilis*) [14,15].

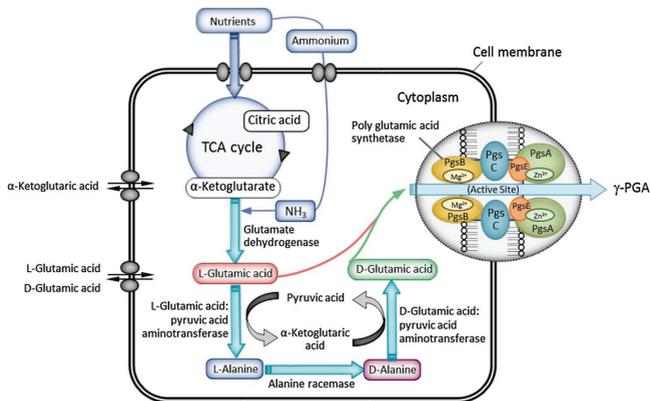


Abbildung 2: Vermuteter γ -PGA-Biosynthese-Mechanismus für Glutaminsäure-unabhängige *Bacillus* sp. (Wiedergabe mit Genehmigung von Springer Nature: Springer [16], Copyright 2017).

2.1.1.3 Produktion & Aufarbeitung

Zur Untersuchung optimaler Produktionsbedingungen wurden überwiegend *Batch*- und *Fed-Batch*-Prozesse in Bioreaktoren durchgeführt, wobei mehrere Parameter die Produkt-Qualität und -Quantität kritisch beeinflussen. Das vor allem für den Glutaminsäure-abhängigen Organismus *B. licheniformis* ATCC 9945A entwickelte Medium E enthält entsprechend hohe Mengen des Polymer-Monomers zusammen mit Glycerin und Citronensäure [17], die jeweils entweder die Membran-Zusammensetzung positiv für die Sekretion des Produktes verändern oder eine Quelle zur schnellen Energiegewinnung und Monomer-Vorstufen-Synthese darstellen [18,19]. Neben den Kohlenstoff-Quellen sind jedoch gerade auch Metall-Kationen wie Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} von essentieller Bedeutung für die enzymatische γ -PGA-Synthese (vgl.

Abb. 2), weswegen die Verwendung von destilliertem Wasser oder Leitungswasser zu großen Unterschieden in der Produktbildung führen kann [20]. Zusätzlich zum Medium gilt die Regulation des pH-Wertes als ein wichtiger Parameter für die Biomasse- und Produkt-Zunahme, was für *B. licheniformis* ATCC 9945A von Cromwick et al. (1996) auf pH 6,5 eingegrenzt wurde [21]. Je nach Produktionsphase können sich die Optima für Wachstums- (pH 7,0) und Produkt-Bildungsprozesse (pH 6,5) jedoch auch leicht unterscheiden, weswegen Prozessführungen mit einer pH-Switch-Strategie bei *B. subtilis* CGMCC 0833 zu höheren Polymer-Konzentrationen geführt haben [22]. Die Optimierungsansätze müssen dabei jedoch auch von einem ausreichenden Leistungseintrag begleitet werden, um die Sauerstoffversorgung und Durchmischung des Mediums zu gewährleisten, da sonst u. a. der TCA-Zyklus in Ermangelung an Reduktionsäquivalenten nicht mehr genügend Vorstufen-Moleküle aufbauen oder Energie-Gewinnung ermöglichen kann [16,21]. Dies stellt gerade bei Stämmen und Prozessen mit finalen Produkt-Konzentrationen von 20–50 g L⁻¹ aufgrund der hohen sich ausbildenden Viskosität eine Herausforderung dar. Neben einer hohen Produkt-Konzentration ist jedoch auch die Produkt-Qualität im Sinne des Molekulargewichts (engl. *molecular weight*, MW) für die Prozessführung entscheidend. Da verschiedene Produktionsstämme nicht nur das gegen Proteasen resistente γ -PGA herstellen, sondern auch die zum Abbau notwendigen Exo- und Endo- γ -glutamylpeptidasen sekretieren oder gebunden an deren Zellmembran bilden, sind die Prozesse auch (zeit-)abhängig von dem parallelen Abbau der Polymer-Ketten [14,21]. Die Produktion besonders hochmolekularer Polymere mit geringem Polydispersitätsindex (PDI) wurde daher ebenfalls untersucht und über die gentechnische Inaktivierung der Polymer-Hydrolasen oder die Verwendung von Stämmen wie *B. subtilis* subsp. *chungkookjang* erzielt, die nur eine geringere Hydrolyse-Aktivität aufweisen [14,23].

Zur Aufreinigung des Biopolymers stellen Fällungsreaktionen als auch verschiedene Filtrationsverfahren die am weitesten verbreiteten Methoden dar. Allen geht jedoch eine Separation der Biomasse vom Kultivierungsüberstand zuvor, die meist per Zentrifugation erfolgt [24]. Hierfür hat sich herausgestellt, dass eine Verringerung des pH-Wertes der Kultivierungsbrühe auf pH 3 die Viskosität maßgeblich senken und die Biomasse aggregieren lassen kann, was die Zentrifugation vereinfacht und den notwendigen Energie-Verbrauch auf bis zu 17% des Referenz-Verfahrens bei pH 6 senken kann [25]. Die zur weiteren Aufreinigung verwendeten Fällungsverfahren unterteilen sich dabei in Lösungsmittel- und Metall-Ionen-basierte Fällungen. Während bei erstem die Präzipitation mit kaltem Ethanol oder anderen (günstigen) organischen Lösemitteln eine auch von anderen (Bio-)Polymeren bekannte Methode darstellt, zeichnet sich die Aufreinigung durch die Komplexbildung des Biopolymers mit z. B. Cu²⁺-Ionen durch ihre hohe Selektivität aus, da im resultierenden Präzipitat nur 3% der zuvor im Überstand befindlichen Proteine nachgewiesen wurden, während beim Ethanol-

Verfahren bis zu 48% der Proteine mit ausgefällt wurden [26]. Kritisch gilt es dabei jedoch den Einsatz der Metall-Kationen und die anschließende Reinigung mit EDTA zu betrachten. Alternativ können mehrere Querstromfiltrationsprozesse aufgrund des Größenunterschiedes zwischen möglichen Verunreinigungen ausgenutzt werden, um den Einsatz sowohl von organischen Lösemitteln oder Metall-Kationen zu umgehen. Dies erfordert jedoch die Verdünnung der Kultivierungsbrühe und längere Operationszeiten, um das Fouling der Membranen zu mindern bzw. rückgängig zu machen [24]. Zuletzt wurden im Anschluss an die Biomasse-Entfernung auch Ionen-Austauscher oder die 2-Phasen-Extraktion via Propanol/ NaCO_3 oder PEG/ KH_2PO_4 untersucht, wobei sich gerade letztere Methode durch hohe Extraktionsraten auszeichnete und aufgrund einer guten Recyclingfähigkeit eine neue Möglichkeit zur umweltfreundlichen und effektiven γ -PGA-Aufarbeitung bietet [27].

2.1.1.4 Anwendungen

Die bekannteste Anwendung erfährt γ -PGA in Form des traditionellen japanischen Gerichtes Nattō, das auf fermentierten Sojabohnen basiert. Dabei weist der Wortursprung der auch in anderen asiatischen Ländern verbreiteten Speise auf den Ausdruck „Bohnen einer Tempel-Küche“ (jap. *nasso*, Tempel-Küche und jap. *tō*, Bohnen) und die in Japan vegetarisch lebenden Mönche hin. Erstmals schriftlich dokumentiert findet sich das γ -PGA-basierte Gericht 1405 als „Fäden-ziehende Sojabohnen“ (jap. *itohiki daizu*) beschrieben, woraus sich später der heute verwendete Begriff entwickelte [28]. Die ersten wissenschaftlichen Forschungen zur Bildung des Biopolymers gehen dabei auf Sawamura (1906) zurück, der zwei verschiedene *Bacillus* sp. isolierte und sie aufgrund der Bildung des beliebten viskosen „vegetable cheese“ als *Bacillus natto* taufte [29].

Inzwischen findet das Biopolymer neben weiteren Beispielen aus der Lebensmittel-Industrie auch Anwendung in Kosmetika als Feuchtigkeit-haltendes Verdickungsmittel oder im Medizin-Sektor, wo es z. B. als Wirkstofftransporter für das hydrophobe Malaria-Medikament Chinin oder das Chemotherapeutikum Paclitaxel eingesetzt wurde [30]. Aufgrund seiner Schwermetall-komplexierenden Eigenschaften eignet es sich auch zur Behandlung entsprechender Vergiftungen oder zur Reinigung von belasteten Abwässern [14]. Mehrere Untersuchungen testeten auch erfolgreich die Eignung von γ -PGA als Hauptbestandteil von bio-abbaubaren Plastik-Ersatzstoffen [20,31]. Insgesamt sind die Anwendungsmöglichkeiten des Biopolymers vielfältig, aber auch abhängig vom korrespondierenden MW, da eine hohe Viskosität nicht überall wünschenswerte Effekte mit sich bringt und daher die zielgerichtete Produktion von großer Bedeutung ist.

2.1.2 Sphingan PS-EDIV

2.1.2.1 Struktur & Funktion

Das Biopolymer Sphingan PS-EDIV ist ein anionisches, verzweigtes Heteropolysaccharid, das kapsulär von dem gelb-pigmentierten (Nostoxanthin) *Sphingomonas pituitosa* DSM 13101 gebildet wird und zur Gruppe der Sphingan-Polymere gezählt wird [32]. Es zeichnet sich vor allem durch seine rheologischen Eigenschaften und hohen induzierten Viskositäten aus. Das Biopolymer erzeugt scherverdünnende Lösungen mit thixotropem Charakter, die Gel-Eigenschaften ($G' > G''$) aber keine Gelierung aufweisen [33]. Wie bei den ebenso zu den Sphinganen gehörenden Biopolymeren Gellan, Welan, Diutan und Rhamsan besteht das Rückgrat der Wiederholungseinheit des Sphingan PS-EDIV aus vier Zuckern, wobei an der ersten, zweiten und vierten Position jeweils Rhamnose, Glukose und Glukose stehen [34,35]. An dritter Position wird in ~ 90–95% der Fälle 2-Desoxyglucuronsäure oder andernfalls Glucuronsäure eingebaut, wodurch das Biopolymer ähnlich dem Rhamsan oder Welan eine alternierende Wiederholungseinheit aufweist (vgl. **Abb. 3**). Zusätzlich ist an das Glukose-Monomer an zweiter Position eine aus zwei Glukose-Einheiten bestehende Seitenkette geknüpft, die mit zu der hohe Viskositäten induzierenden Wirkung des Biopolymers beiträgt [33,34].

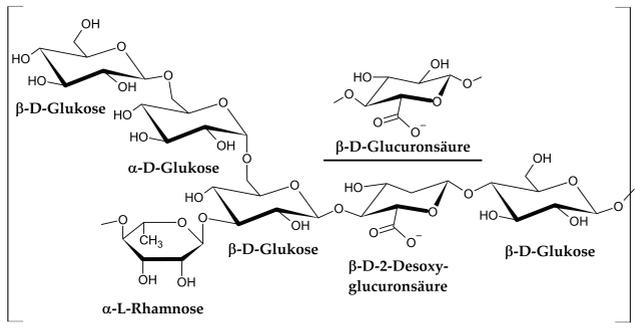


Abbildung 3: Wiederholungseinheit des Biopolymers Sphingan PS-EDIV nach [34].

Die viskoelastischen Eigenschaften tragen dabei zur Ausbildung eines persistenten Biofilms bei, der als Schutz gegen Umwelteinflüsse wie Trockenheit, extreme pH-Werte oder Antibiotika wirkt und die Adhäsion an Oberflächen in wässrigen wie ländlichen Habitaten ermöglicht. Die Assoziation vieler Sphingomonaden mit Pflanzen bestärkt dabei insbesondere die biologische Bedeutung der Adhäsions-vermittelnden Eigenschaften des Biofilms [36].

2.1.2.2 Vorkommen & Biosynthese

Die Sekretion eines kapsulären Polysaccharids wurde bislang nur für einige Spezies der Gattung *Sphingomonas* beschrieben, wobei die Biopolymere untereinander jeweils leichte Variationen in der Zusammensetzung der Wiederholungseinheit aufweisen [35]. Mit am längsten stehen dabei *S. elodea* ATCC 31461 (Gellan) und *S. sp.* ATCC 31555 (Welan) im Fokus der Forschung, wenn auch weiteren Spezies aufgrund herausragender (meist) rheologischer Eigenschaften ihrer Biopolymere zeitweise eine größere Bedeutung zuteilwurde.

Die Biosynthese des hier fokussierten Sphingan PS-EDIV wurde bei *S. pituitosa* DSM 13101 bislang nicht explizit erforscht, kann aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft mit dem besser untersuchten *S. elodea* ATCC 31461 und *S. sp.* WG (Sphingan WL) jedoch als vergleichbar angenommen werden [37]. Wie auch die Xanthan-Biosynthese bei *Xanthomonas campestris* erfolgt die Bildung des Sphingan PS-EDIV nach dem sogenannten Wzx/Wzy-Weg [38]. Dieser beinhaltet drei wesentliche Schritte: cytosolische Bereitstellung benötigter Nukleotid-Zucker (z. B. Uridindiphosphat (UDP)-Glukose), Zusammensetzung der Wiederholungseinheit und Polymerisation im Periplasma mit paralleler Sekretion. Nach der Synthese der Nukleotid-Zucker aus Glukose-1-Phosphat [39], erfolgt die Zusammensetzung der für die Wiederholungseinheit notwendigen Zucker durch mehrere Glykosyltransferasen, deren Anzahl und Lokalisierung im Biosynthese-Operon maßgeblich die finale Zusammensetzung des Biopolymers bestimmt [38]. Zur Initiierung dieses Vorgangs überträgt die primäre Glykosyltransferase einen Nukleotid-Zucker auf einen cytoplasmatischen Lipidanker (Polyprenolphosphat) der Zellmembran, der dann um die weiteren Zucker erweitert wird. Mutmaßlich erfolgt nach Fertigstellung des Rückgrats der Wiederholungseinheit die Modifikation mit Seitengruppen (z. B. Acetylierung) als auch die Kopplung mit weiteren Zucker-Seitenketten. Nach der Fertigstellung wird die Wiederholungseinheit über eine Flippase, das Wzx-Protein, in den periplasmatischen Raum befördert. Dort erfolgt die Polymerisation durch eine Wzy-Polymerase als auch die Sekretion durch ein Export-Protein (OPX) [38].

2.1.2.3 Produktion & Aufarbeitung

Die finalen Eigenschaften wie MW und Modifikationsgrad des jeweiligen Sphingans hängen maßgeblich vom Produktionsprozess (Medium, pH, Energie-Eintrag) selbst ab. Dabei kann in der meist *Batch*-weisen Produktion von Sphinganen im Forschungs- und industriellen Maßstab auf vergleichsweise einfache Minimal-Medien zurückgegriffen werden, wobei als Kohlenstoff-Quellen vor allem Glukose und Saccharose zum Einsatz kommen, deren Ersetzung durch Melasse ebenfalls möglich ist [40]. Die Kohlenstoff-Quelle liegt, im Vergleich zum Stickstoff, üblicherweise im Überschuss vor,

wodurch der Prozess Stickstoff-limitiert abläuft [41]. Dabei eignen sich sowohl organische (Pepton, Soyton, Trypton) als auch anorganische (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) Verbindungen, wobei organische tendenziell zu einer erhöhten Sphingyan-Produktion führen [42,43]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine stetige Erhöhung der wachstumsgekoppelten Sphingyan PS-EDIV-Produktion allein durch mehr Kohlenstoff- oder Stickstoff-Verfügbarkeit nicht mit einer ebenso großen Produktionssteigerung einhergeht, was in Substratüberschusshemmungen als auch den zunehmenden Transport-Limitierungen in der hochviskosen Kultivierungsbrühe begründet liegt [44]. Sowohl der Sauerstoff-Transport als auch die Durchmischung werden aufgrund der scherverdünnenden Eigenschaften des Biopolymers im Verlauf der Kultivierung immer limitierender, da insbesondere bei Rushton-Rührern zunehmend nur das den Rührer umgebende Medium durchmischt wird. Dies kann sowohl die Sphingyan-Bildung reduzieren als auch dessen Eigenschaften hinsichtlich des MWs oder Modifikationsgrades beeinflussen [45], wobei ab zu hohen Rührerdrehzahlen ($600\text{--}800\text{ min}^{-1}$) wieder bevorzugt die Biomasse-Bildung induziert werden könnte [46]. Letzteres konnte bei *S. pituitosa* DSM 13101 bis hin zu einer Rührerdrehzahl von 750 min^{-1} (Rushton-Rührer) jedoch nicht festgestellt werden. Durch den verbesserten Sauerstoffeintrag und Stofftransport konnte dabei noch immer von der höheren Sphingyan PS-EDIV-Produktion profitiert werden [44]. Das pH-Optimum zur Kultivierung und Polymer-Bildung verschiedener Sphingane liegt um 6,5–7,0 [47,48] und eine pH-Regulierung in diesem Bereich zeigte sich für die Welan-Produktion förderlich. Dies stimmt mit *S. pituitosa* DSM 13101 überein, bei dem ein Wachstumsraten-Optimum zwischen pH 7,0–7,5 bestimmt wurde und eine pH-Regulierung das Absinken in leicht saure (pH \sim 5,0) Bereiche und somit niedrigere Wachstumsraten unterbindet [44]. Parallel fördert die Regulierung eine bessere Durchmischung, da die Viskosität im schwach sauren Milieu bis zu 90% über der bei pH 6–12 liegt, was gerade bei der Aufarbeitung der Kultivierungsbrühe Berücksichtigung finden sollte [33].

Diese ist bei Sphingyanen generell in die Abschnitte Vorbehandlung, Zell-Abtrennung, Fällung und Dialyse untergliedert. Die Vorbehandlung beinhaltet eine starke Verdünnung der Kultivierungsbrühe mit Wasser, die mit einer vorherigen Erhitzung auf $70\text{--}95\text{ }^\circ\text{C}$ für ~ 15 min verbunden sein kann, um sowohl die Viskosität für die folgenden Schritte zu senken als auch die Zellen abzutöten [45,49,50]. Die daran anschließenden mehrfachen Zentrifugations- und Waschschrte ermöglichen dann die Abtrennung der Biomasse vom Überstand, was durch die Zugabe von Substanzen wie Dimethylsulfoxid (DMSO) verbessert wird, da es zu einem Ablösen des Polymers von den Zellen kommt [45]. Nach erfolgreicher Separation erfolgt die Fällung des Biopolymers aus dem Überstand mit organischen Lösemitteln wie Isopropanol oder Ethanol bei niedriger Temperatur ($4\text{ }^\circ\text{C}$) [49,51]. Ersteres zeigte sich bei dem Sphingyan PS-EDIV als am besten zur Fällung geeignet, was sich mit der weiten Verbreitung der Methode