

# 1 Einleitung

Insbesondere während der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde eine Reihe neuer und technisch bedeutender Polysaccharide entdeckt, die durch mikrobielle Fermentation gewonnen werden können. Der wissenschaftliche und kommerzielle Erfolg dieser mikrobiellen Polysaccharide beruht auf mehreren Faktoren, die pflanzliche und chemische Polymere nicht oder nur eingeschränkt bieten: Erstens können sie unter kontrollierten Bedingungen hergestellt werden, zweitens besitzen sie eine große strukturelle Regelmäßigkeit und drittens können verschiedene Spezies eine große Anzahl ionischer und neutraler Polysaccharide mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und Eigenschaften synthetisieren. Eine derart große strukturelle Vielfalt ist unter den pflanzlichen Polysacchariden nicht bekannt und kann auch durch herkömmliche chemische Synthese nicht erreicht werden.

Der industrielle Nutzen wasserlöslicher Polymere auf Kohlenhydratbasis beruht vor allem auf ihrer hohen Funktionalität. Die wichtigste Funktion besteht in ihrer Fähigkeit, die Eigenschaften wässriger Lösungen maßgeblich zu verändern. Hierbei sind insbesondere das Verdicken, Emulgieren, Stabilisieren, Flocken und Suspendieren bzw. die Bildung von Gelen, Filmen oder Membranen zu nennen. Ein anderer wichtiger Vorteil besteht in ihrer Synthese aus natürlichen, erneuerbaren Ressourcen sowie ihrer Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit.

Die wichtigsten bakteriellen Polysaccharide wurden mit Dextran und Xanthan bereits in den 1940er bzw. 1960er Jahren erschlossen. Insbesondere Xanthan wurde nach der Genehmigung als Lebensmittelzusatzstoff (USA: 1969, Frankreich: 1978, restliche EU: 1982) zu einem kommerziell äußerst erfolgreichen

Produkt [11]: Lag die jährliche Produktionshöchstmenge Ende der 1970er Jahre noch bei 8.000 t [79], stieg diese 1983 bereits auf 20.000 t an [131]. Für das Jahr 2001 wurde das Produktionsvolumen bereits auf 35.000 t geschätzt [11] und es ist anzunehmen, dass die jährliche Produktionsmenge mittlerweile über 40.000 t beträgt, so dass Xanthan in jeder Hinsicht zu den biotechnologisch hergestellten Bulkchemikalien zuzuordnen ist.

Eine weitere sehr interessante Gruppe von bakteriellen Polysacchariden mit herausragenden Eigenschaften stellen die Sphingane dar. Unter den Handelsnamen Gellan, Welan, Rhamsan und Diutan werden einige dieser Polysaccharide kommerziell von der Kelco Company hergestellt und vertrieben. Im Gegensatz zum bereits seit vielen Jahrzehnten etablierten Produkt Xanthan ist die Produktion von Sphinganen jedoch noch deutlich weniger untersucht bzw. in der Literatur beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die mikrobielle Produktion eines Sphingan-Exopolysaccharids am Beispiel des PS-EDIV aus *Sphingomonas pituitosa* DSM 13101 untersucht werden. Dieser Bakterienstamm wurde 2001 erstmals beschrieben und schien anhand erster orientierender Untersuchungen ein für Sphingomonaden äußerst ungewöhnliches und potentiell kommerziell interessantes Polysaccharid zu synthetisieren [20].

Die Untersuchungen zum Wachstum und zur Produktbildung erfolgen in qualitativer und quantitativer Hinsicht in batch- und kontinuierlichen Kultivierungen. Außerdem sollte untersucht werden, inwieweit sich das Polymer aus der Kulturbrühe abtrennen und isolieren lässt, um auf diese Weise auch Anwendungen mit hohen Ansprüchen an die Qualität des Produktes gerecht werden zu können. Zu diesem Zweck sind vergleichende Experimente auf Basis von Zentrifugation, Querstrom-Ultrafiltration und Alkoholpräzipitation durchzuführen.

## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Exopolysaccharide der Gattung *Sphingomonas*

Zu der Gattung *Sphingomonas* zählen viele Bakterienarten, die ursprünglich einmal den Gattungen *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter* und *Xanthobacter* zugeordnet waren [85]. Aufgrund von rRNA-Analogien und des gemeinsamen Vorkommens eines seltenen Sphingoglycolipids in der Zellmembran erfolgte 1990 eine Neu-Einordnung durch Yabuuchi et al. [130]. Bei den Vertretern dieser Gattung handelt es sich durchweg um Gram-negative, obligat aerobe und monopolar polytrich begeißelte Stäbchen, die der alpha-Gruppe der Proteobakterien zugehörig sind. Sphingomonaden zeichnen sich durch ihre physiologische anspruchslosigkeit und ihre Fähigkeit, eine Reihe von Xenobiotika abzubauen, aus [17, 25, 75, 134]. Viele Sphingomonaden produzieren zudem extrazelluläre, vorwiegend anionische Heteropolysaccharide (Sphingane) mit verwandten Strukturen, von denen einige aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften industrielle Verwendung finden. Die Struktur einer Auswahl von Sphinganen ist in **Abb. 2.1** dargestellt.

S-60 Gellan	$\rightarrow 4) \alpha\text{-L-Rha (1}\rightarrow 3) \beta\text{-D-Glc (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-GlcA (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-Glc (1-}$ <div style="text-align: center;">2</div> $\text{L-glyceryl}$
S-130 Welan	$\rightarrow 4) \alpha\text{-L-Rha (1}\rightarrow 3) \beta\text{-D-Glc (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-GlcA (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-Glc (1-}$ <div style="text-align: center;">3</div> <div style="text-align: center;">1</div> $\alpha\text{-L-Rha oder Man}$
S-194 Rhamsan	$\rightarrow 4) \alpha\text{-L-Rha (1}\rightarrow 3) \beta\text{-D-Glc (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-GlcA (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-Glc (1-}$ <div style="text-align: center;">6</div> <div style="text-align: center;">1</div> $\beta\text{-D-Glc (1}\rightarrow 6) \alpha\text{-D-Glc}$
S-657 Diutan	$\rightarrow 4) \alpha\text{-L-Rha (1}\rightarrow 3) \beta\text{-D-Glc (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-GlcA (1}\rightarrow 4) \beta\text{-D-Glc (1-}$ <div style="text-align: center;">3</div> <div style="text-align: center;">1</div> $\alpha\text{-L-Rha (1}\rightarrow 4) \alpha\text{-L-Rha}$

Abb. 2.1: Auswahl an Sphinganen mit industriellem Nutzen [7]

### 2.1.1 Eigenschaften und Anwendungen von Sphinganen

Sphingane werden grundsätzlich als kapsuläre Exopolysaccharide gebildet [85]. Im Gegensatz zu Schleimen werden kapsuläre Polysaccharide nicht frei ins Medium abgegeben, sondern bleiben durch einen unbekanntem Mechanismus mit den Zellen verbunden [110]. Durch die Polymerkapseln werden die begeißelten Bakterien zunehmend unbeweglich. Pollock und Armentrout [87] beschreiben *Sphingomonas*-Populationen in Flüssigkulturen als dimorph: Während der Großteil der Population aufgrund der Polysaccharidsynthese ihre Beweglichkeit einbüßt, verbleiben einige Zellen weiterhin hoch beweglich. Die kapsuläre Bindung befähigt Sphingomonaden, in großen Aggregaten von einigen 100 bis

10.000 Zellen zu wachsen und Biofilme zu bilden [5, 41]. Innerhalb der Aggregate sind die Zellen aufgrund der Polymerkapsel etwa einen halben Zelldurchmesser voneinander entfernt und im Gegensatz zum planktonischen Wachstum besser vor Phagozytose und Bioziden geschützt.

Eine große Anzahl Sphingan bildender Organismen wurde im Rahmen ausgedehnter Screening-Programme der Kelco-Company in den 1970er und 1980er Jahren isoliert [7]. Die kommerziell wichtigsten Sphingane sind im Folgenden dargestellt.

### 2.1.1.1 Gellan

Gellan, auch unter dem Namen Sphingan S-60 bekannt, wird von *Sphingomonas paucimobilis* (ehemals *Sphingomonas elodea* bzw. *Pseudomonas elodea*) gebildet und ist mit einem jährlichen Produktionsumfang von 1000 t das mit Abstand kommerziell erfolgreichste Sphingan [86]. Die Artbezeichnung „paucimobilis“ (lat: unbeweglich) deutet dabei die verminderte Beweglichkeit der Zellen bei der Gellanbildung an. Bei der technischen Produktion werden bis zu 50 % der Kohlenstoffquelle in Gellan umgewandelt. Die Grundstruktur von Gellan weist im Gegensatz zu den meisten anderen Sphinganan keine glycosidischen Seitenketten auf (siehe Abb. 2.1). Die stattdessen über Esterbindungen verknüpften Acetat- und Glycerat-Gruppen können dagegen relativ einfach durch alkalische Behandlung (80 °C, pH 10) entfernt werden [48]. Das auf diese Weise deacetylierte Gellan bildet nach Zugabe divalenter Kationen äußerst thermostabile Gele aus, die hinsichtlich Festigkeit und der erforderlichen Gelierungskonzentration anderen Produkten wie z.B. Agar-Agar deutlich überlegen sind [46]. Gellan ist mittlerweile in einer Reihe von Ländern, darunter auch Japan und die Europäische Union (unter der Bezeichnung E418), als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen und wird von mehreren Herstellern unter den Namen Kelcogel bzw. Gelrite (Kelco), Phytigel (Sigma) und Gel-Gro (ICN Biochemicals) vertrieben. Der Anwendungsvielfalt von Gellan wird dadurch Rechnung getragen, dass bereits über 600 Patentanmeldungen aus unterschiedlichsten Bereichen vorliegen [86].

### 2.1.1.2 Welan

Welan (S-130) besitzt dasselbe glycosidische Rückgrat wie Gellan, zusätzlich ist allerdings jede zweite Glucose zu gleichen Teilen durch Mannose oder Rhamnose modifiziert (Abb. 2.1). Durch die glycosidischen Seitenketten geht zwar die Gelierbarkeit vollständig verloren, jedoch ist die Viskosität im Vergleich zu nativem Gellan deutlich höher. Der stark viskositätssteigernde Einfluss glycosidischer Seitenketten wurde bei der Untersuchung von Struktur-Eigenschaftsbeziehungen bei einer Reihe von Sphinganen festgestellt [53, 66]. Welan weist insbesondere bei niedrigen Scherraten schon bei geringen Konzentrationen verhältnismäßig hohe Viskositäten auf, ist thermostabil (kein Viskositätsverlust bei Temperaturen bis 142 °C innerhalb einer Stunde) und ist relativ unempfindlich gegen Scherung [46]. Außerdem besitzt es eine hohe Salz- und pH-Wert-Toleranz [110]. Aufgrund seiner Eigenschaften wird es hauptsächlich als Bauchemikalie zur Steuerung der Viskosität von Gußbeton [2], als Kristallisationsinhibitor in Enteisungsmitteln [127] und als Viskositätserhöher in wasserbasischen Bohrspülungen [66] eingesetzt. Der Produktionsorganismus weist mit 60 % Umsatz das höchste Konvertierungsverhältnis der Kohlenstoffquelle in Polysaccharid auf [46].

### 2.1.1.3 Rhamsan

Rhamsan besitzt dasselbe glycosidische Rückgrat wie Welan, wobei jedoch abweichend an jeder ersten Glucose der Grundstruktur eine Glucose-Glucose Disaccharid Seitenkette gebunden ist (Abb. 2.1). Rhamsan hat ähnliche rheologische Eigenschaften wie Welan, zeigt aber eine höhere Scherresistenz und bei niedrigen Konzentrationen und kleinen Scherraten eine noch höhere Viskosität. Allerdings nimmt die Viskosität bei Temperaturen über 100 °C stärker ab als bei Welan [86]. Aufgrund der hohen Scherstabilität und der Resistenz gegenüber hohen Salzkonzentrationen wie Ammoniumphosphat eignet sich Rhamsan u.a. als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Kunstdünger-Formulierungen. Weitere Anwendungen, in denen sich Rhamsan anderen Polymeren überlegen zeigt, ist die Verwendung in Holzschutzmitteln und in „low-rank coal-water“ zur thermischen Verwertung qualitativ niederwertiger Steinkohle [84]. Die geringen

Produktionsausbeuten und die damit verbundenen hohen Herstellungskosten führten zu einer verhältnismäßig geringen Nachfrage, so dass die reguläre Produktion durch Kelco im Jahr 2002 eingestellt wurde [86].

### 2.1.1.4 Diutan

Diutan (S-657) ist das neueste durch Kelco produzierte Sphingan und wird seit 2002 anstelle von Rhamsan hergestellt. Strukturell ähnelt es Welan, anstelle eines Rhamnose oder Mannose Monomers enthält es jedoch eine Rhamnose-Rhamnose Disaccharid Seitenkette (Abb. 2.1). Diutan ist das thermisch stabilste aller bekannten Sphingane. Die Viskosität niedrig konzentrierter Diutan-Lösungen übersteigt zudem die von Rhamsan, Welan und Xanthan [82]. Trotz der offenbar geringen Produktivität wird Diutan aufgrund der oben genannten Eigenschaften, der guten Löslichkeit in Wasser und der Kompatibilität mit den meisten Salzen und Additiven erfolgreich als Bau- und Ölfeldchemikalie eingesetzt [126].

### 2.1.2 *Sphingomonas pituitosa* und Sphingan PS-EDIV

Der in dieser Arbeit verwendete Organismus *Sphingomonas pituitosa* DSM 13101 wurde aus einem eutrophierten Brunnen in Wien isoliert und von Denner et al. [20] phylogenetisch untersucht und beschrieben. Der Organismus wächst auf saccharosehaltigen festen Nährböden in Form von viskosen Kolonien, was bereits auf die Fähigkeit zur Exopolysaccharidbildung hindeutet. *S. pituitosa* zeigt große phylogenetische Homologien zu anderen Sphingomonaden wie *S. paucimobilis* und *S. truepeti*, synthetisiert aber offenbar ein für Sphingane äußerst ungewöhnliches Exopolysaccharid. Komponentenanalysen zeigten, dass sich das PS-EDIV aus Glucose, Rhamnose, Glucuron- und Desoxyglucuronsäure zusammensetzt und ein mittleres Molekulargewicht von etwa  $3 \cdot 10^6$  Dalton aufweist [101]. PS-EDIV ist somit das erste publizierte Sphingan, welches zwei unterschiedliche Uronsäuren in der Repeating Unit beinhaltet.

### 2.1.3 Biochemie der Sphingansynthese

Die Synthesewege von Sphinganen wurden im Vergleich zu dem Polysaccharid Xanthan bislang nur im geringen Maße untersucht. Die Untersuchungen konzentrieren sich zudem ausschließlich auf die Synthese von Gellan unter Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle. Aufgrund der hohen genetischen Übereinstimmung der Organismen und der strukturellen Ähnlichkeit der einzelnen Sphingane ist es zumindest wahrscheinlich, dass die Synthese der meisten Sphingane große Ähnlichkeiten zu der von Gellan aufweist. Die Konversion von Glucose in Intermediärmetabolite, Zellwandbestandteile und Exopolysaccharid wurde von Thorne et al. [116] sowie von Martins und Sa-Correia [62] beschrieben und ist in **Abb. 2.2** schematisch zusammengefasst.

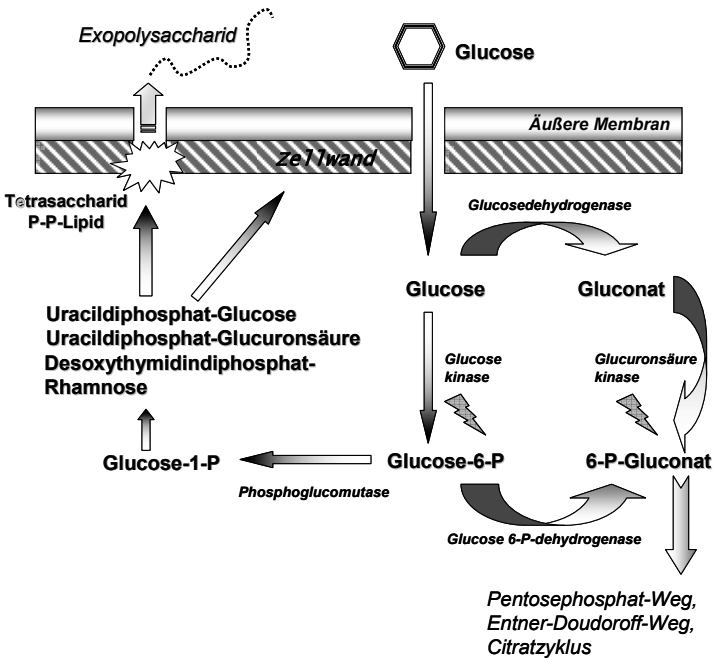


Abb. 2.2: Postulierter Biosyntheseweg von Sphinganen aus Glucose (ohne Darstellung der Cytoplasmamembran und der Transportbausteine)



Der Abbau von Glucose durch *Sphingomonas paucimobilis* erfolgt offenbar nicht über den Fructosebiphosphatweg, da keine 6-Phosphofruktokinase-Aktivität nachgewiesen werden konnte [120], sondern über den KDPG- (Entner-Doudoroff) und über den Pentosephosphat-Weg. Der zentrale Ausgangsmetabolit (bzw. Precursor) dieser beiden Wege, 6-Phosphogluconat, wird aus Glucose über Gluconat oder über Glucose-6-Phosphat gebildet. Letzteres Glucose-6-Phosphat ist zudem auch Grundbaustein für die Synthese von Gellan. Dabei findet zunächst eine durch die Phosphoglucomutase katalysierte Isomerisierung in Glucose-1-Phosphat statt, welches durch die Bindung an Nucleotidcarrier aktiviert und anschließend teilweise in Rhamnose und Glucuronsäure umgesetzt wird. Diese Synthesebausteine werden, analog zur Synthese der Zellwandkomponenten, an einen zellmembranassoziierten C55-Lipid-Carrier gebunden und zur Repeating Unit zusammengesetzt [86].

Bei den meisten Exopolysacchariden erfolgt der eigentliche Polymerisationsvorgang analog zur Biosynthese der O-Antigene [93, 96, 124]. Der Mechanismus der Polymerisation, die Bestimmung der Kettenlänge und der Export von Polysacchariden wurden am ausführlichsten bei *Xanthomonas* untersucht [118]. Da in den meisten Gram-negativen Bakterien vergleichbare Zellwandstrukturen vorkommen, kann allerdings bei Sphingomonaden von ähnlichen Synthesystemen ausgegangen werden [109, 125]. Die Polymerisation der Repeating Units bei der Xanthan-Synthese findet an einem aktivierten Lipid in der äußeren Membran statt, wobei nicht-glycosidische Modifikationen (Acetat, Pyruvat) offenbar eine Funktion bei der Ausschleusung des Polymers haben.

Die Kontrolle der Kettenlänge wird durch das *gumC* Operon kontrolliert. Strukturelle Untersuchungen zeigten, dass das Regulationsprotein für die Kettenlänge des Xanthans offenbar aus zwei hochkonservierten Transmembrandomänen besteht [68, 109]. Bei Sphingomonaden bleiben die Polymerketten auch nach der Synthese fest mit den Membranproteinen verbunden, was zur kapsulären Struktur führt.

## 2.2 Biotechnologische Produktion

Während sich die Literatur zur biotechnologischen Produktion von Sphinganen in den 1980er Jahren nahezu ausnahmslos auf zumeist unvollständige Angaben aus Patentschriften beschränkt [43-45, 47], wurde die Sphinganproduktion mittlerweile von mehreren Arbeitsgruppen detaillierter untersucht [4, 29, 73, 123]. Aufgrund der großen kommerziellen Relevanz (siehe 2.1.1.1) konzentrieren sich die Untersuchungen fast ausschließlich auf die Produktion von Gellan durch *Sphingomonas paucimobilis*. Die bereits erwähnte große Ähnlichkeit der Sphingomonaden u.a. hinsichtlich ihrer Phylogenie und der physiologischen Ansprüche lässt vermuten, dass sich fundamentale Kultivierungsstrategien auch auf die Produktion von Welan, Rhamsan oder Diutan übertragen lassen.

### 2.2.1 Produktionsmedien

Sphingomonaden sind physiologisch anspruchslos und können eine große Zahl unterschiedlicher Verbindungen metabolisieren. Bei der Kelco Company verwendet man als Medienbestandteile für die Produktion von Gellan, Rhamsan, Welan, S-198 und S-119 Glucose als Kohlenstoffquelle, Ammoniumnitrat als anorganische und Sojabohnenpepton als organische Stickstoffquelle [44], ferner Phosphat zur Pufferung und eine Reihe von Spurenelementen [46]. Um eine optimale Exopolysaccharidproduktion zu gewährleisten, muss das Medium allerdings hinsichtlich seiner Zusammensetzung genau auf den einzelnen Produktionsstamm abgestimmt werden. Aus diesem Grund weichen die Literaturangaben hinsichtlich der Zusammensetzung der Produktionsmedien teilweise deutlich von denen der Kelco Company ab.

So verglichen Fialho et al. [22] die Gellanbildung unter Verwendung von Glucose bzw. Lactose als jeweils alleinige Kohlenstoffquelle. Dabei ergab sich mit Lactose trotz geringerer Polymerausbeute eine höhere Viskosität des Kulturmediums. Die Autoren erklären dieses Phänomen mit einem unterschiedlichen Ausmaß an