

1 Einleitung

Bakterielle Polysaccharide werden technisch vielseitig und in großen Mengen in vielen Bereichen des alltäglichen Lebens eingesetzt. Eines ihrer Haupteinsatzgebiete ist dabei die Verwendung als Konsistenzgeber in Lebensmitteln und Kosmetikartikeln. Zudem werden Polysaccharide auch als Zusatzstoff in Pharmazieprodukten und in Bohrspülflüssigkeiten im Bereich der tertiären Erdölförderung [2, 33, 75-78] eingesetzt. Da der Bedarf an Polysacchariden mit geeigneten rheologischen Eigenschaften mit wachsenden Anwendungsgebieten stetig steigt, wird auch nach neuen Alternativen zu den bisher eingesetzten Polymeren gesucht. Mit dem Exopolysaccharid EDIV aus *Sphingomonas pituitosa* DSM 13101 [23] wurde eine mögliche Alternative gefunden, welche es in dieser Arbeit zu untersuchen galt. Dabei sollte das Hauptaugenmerk auf rheologische Untersuchungen gerichtet sein.

Die Rheologie spielt bei verschiedenen Anwendungen von Polysacchariden eine große Rolle. So ist sie zum Beispiel bei der Herstellung und Verarbeitung von Schokolade ein ausschlaggebendes Qualitätskriterium [31]. Bei anderen Lebensmitteln wie Saucen und Cremesuppen oder bei Lotionen aus dem Bereich der Kosmetik sind die Fließeigenschaften im Endzustand von großer Bedeutung. Sie können mit Hilfe von Polysacchariden vielseitig eingestellt werden. Für den einzelnen Anwendungsfall ist somit eine genaue Kenntnis der rheologischen Eigenschaften einer Polymerlösung wichtig.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der umfangreichen Charakterisierung des Exopolysaccharids PS-EDIV, welches durch den Stamm *Sphingomonas pituitosa* DSM 13101 produziert wird. Es wurden verschiedene rheologische Unter-

suchungen sowohl mit Biomasse-Polymer-Suspension als auch mit aufgereinigter Polysaccharidlösung durchgeführt. Diese sollten darüber Aufschluss geben, wie das rheologische Verhalten in beiden Fällen ausgeprägt ist und welche Viskositätsbereiche erreicht werden. Die so gewonnenen Ergebnisse könnten dann einer späteren großtechnischen Produktion von PS-EDIV als Basisdaten dienen. In weitergehenden Untersuchungen wurde der Einfluss von Salzen, der Temperatur und dem pH-Wert dokumentiert. Das rheologische Verhalten erklärt sich meist aus den molekularen Eigenschaften. Daher war eine Bestimmung des Molekulargewichts des Polymers genauso wichtig wie eine Strukturaufklärung auf molekularer Ebene.

2 Theorie

2.1 Exopolysaccharide der Gattung *Sphingomonas*

Sphingomonaden bilden eine Vielzahl von wasserlöslichen Exopolysacchariden (Sphingane), welche sich im grundsätzlichen strukturellen Aufbau ähnlich sind, wie **Abb. 2.1** zeigt [64, 74]. Allerdings unterscheiden sich ihre Eigenschaften durchaus beträchtlich. So ist prinzipiell zwischen geladenen und ungeladenen Polysacchariden und Polymeren mit oder ohne Seitenketten zu differenzieren.

Die Hauptkette der Sphingane besteht aus Untereinheiten, sog. Repeating Units, die größtenteils konserviert sind. Eine Repeating Unit hat die generelle Abfolge $[\rightarrow 4) \alpha\text{-L-Rha}$ oder $\alpha\text{-L-Man}$ $(1\rightarrow 3) \beta\text{-D-Glc}$ $(1\rightarrow 4) \beta\text{-D-GlcA}$ $(1\rightarrow 4) \beta\text{-D-Glc}$ $(1\rightarrow)$ [73]. Die aktivierten Zucker werden mit Hilfe eines membranassoziierten Isoprenylphosphat-Lipid-Carriers zu einer Oligosaccharid Repeating Unit zusammengesetzt. Der Aufbau beginnt dabei stets mit Glucose-1-phosphat am IP-Carrier. Die nachfolgende Addition von Monosacchariden erfolgt am nicht-reduzierenden Ende der Repeating Unit mit spezifischen Glykosyltransferasen. Das wachsende Polysaccharid bleibt dabei membranassoziiert [74]. Bei den linearen Sphinganen Gellan (S-60), NW-11 und PS-P4 ist entweder Rhamnose oder Mannose an Position 1 der Repeating Unit zu finden (Abb. 2.1), bei den Sphinganen S-88 und S-198 (beide nicht dargestellt) treten beide Komponenten zu etwa gleichen Teilen an dieser Stelle im Molekül auf [18, 39]. Eine ähnliche Substitution ist in der Seitenkette von Welan (S-130) zu finden [42, 43, 65, 83]. Das einzige Sphingan, welches keine Rhamnose enthält, ist NW-11 [66]. Die

Sphingane I-886 und S-7 weisen an Position 3 der Repeating Unit anstelle von Glucuronsäure ausschließlich 2-desoxy-Glucuronsäure auf. Sie unterscheiden sich lediglich in einer α (I-886) bzw. β -Bindung (S-7) in der Seitenkette. Eine 2-desoxy-Glucuronsäure ist in der Natur ebenso selten wie eine L-Mannose, darüber hinaus ist es säurelabil, was die Sphingane I-886 und S-7 empfindlich gegenüber saurer Hydrolyse macht.

Gellan (S-60)	→4) α -L-Rha (1→3) β -D-Glc (1→4) β -D-GlcA (1→4) β -D-Glc (1→ 2 L-Glycerinsäure
NW-11	→4) α -L-Man (1→3) β -D-Glc (1→4) β -D-GlcA (1→4) β -D-Glc (1→
PS-P4	→4) α -L-Rha (1→3) β -D-Glc (1→4) β -D-Glc (1→
Diutan (S-657)	→4) α -L-Rha (1→3) β -D-Glc (1→4) β -D-GlcA (1→4) β -D-Glc (1→ 3 1 α -L-Rha (1→4) α -L-Rha
Welan (S-130)	→4) α -L-Rha (1→3) β -D-Glc (1→4) β -D-GlcA (1→4) β -D-Glc (1→ 3 1 α -L-Rha oder Man
Rhamsan (S-194)	→4) α -L-Rha (1→3) β -D-Glc (1→4) β -D-GlcA (1→4) β -D-Glc (1→ 6 1 β -D-Glc (1→6) α -D-Glc
I-886	→4) α -L-Rha (1→3) β -D-Glc (1→4) β -D-2dGlcA (1→4) β -D-Glc (1→ 6 1 β -D-Glc (1→6) α -D-Glc
S-7	→4) α -L-Rha (1→3) β -D-Glc (1→4) β -D-2dGlcA (1→4) β -D-Glc (1→ 6 1 β -D-Glc (1→6) β -D-Glc

Abb. 2.1 Strukturen der Repeating Units verschiedener Sphingane [29, 54, 74], Glc: Glucose, GlcA: Glucuronsäure, 2dGlcA: 2-desoxy-Glucuronsäure, Man: Mannose, Rha: Rhamnose

Sofern Seitenketten am Molekül vorkommen, sind diese immer an einem der beiden Glucosereste glycosidisch gebunden. Folgende Seitenketten sind bisher

beobachtet worden: L-Glycerinsäure, L-Rhamnose, L-Mannose, L-Rhamnose-L-Rhamnose, D-Glucose- α -D-Glucose sowie D-Glucose- β -D-Glucose, wobei nicht bekannt ist, ob die Seitenketten nach Fertigstellung einer Repeating Unit in Form einer Verzweigung angefügt werden oder ob sie vor der Komplettierung der Tetrasaccharidstruktur implementiert werden.

Rhamsan (S-194) unterscheidet sich zu I-886 dabei nur in der Oxidationsstufe der Glucuronsäure [29, 40]. Eine Besonderheit ist das Sphingan PS-P4, welches nicht die übliche Repeating Unit aus vier Untereinheiten aufweist, sondern nur aus den drei Bausteinen Rhamnose-Glucose-Glucose als Repeating Unit besteht.

Allen Sphinganen gemeinsam ist das Vorhandensein einer Acetylgruppe an ca. 50 % der Repeating Units; die exakte Position der Acetylgruppe ist jedoch nur für die Sphingane Welan und Gellan erforscht. Welan trägt die Acetylgruppe an der zweiten Position der L-Rhamnose [83], Gellan an der sechsten Position der Glucose am reduzierenden Ende der Rhamnose [52]. An zweiter Position derselben Glucose ist darüber hinaus eine L-Glycerinsäure zu finden [41, 52].

2.1.1 Anionische Polysaccharide ohne Seitenketten

Zu den von Sphingomonaden gebildeten anionischen Polysacchariden gehört u. a. Gellan aus *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 (vormals *Pseudomonas elodea*) [32, 46] oder *Auromonas elodea* als das wohl bekannteste. Weiterhin zu dieser Gruppe gehört das Sphingan NW-11 aus *Xanthobacter sp.* ATCC 53272 und ein von *Sphingomonas paucimobilis* GS1 gebildetes Exopolysaccharid.

Anionische Sphingane ohne Seitenketten unterscheiden sich von anderen Sphinganen vor allem durch ihre Gelierfähigkeit. So bildet Gellan in nativem Zustand ein weiches, elastisches Gel [93]. In deacetyliertem Zustand prägt Gellan in Anwesenheit von Kationen ein thermoreversibles, festes, sprödes, optisch klares Gel aus [44, 47]. Für die Gelbildung ist ein Erhitzen und Abkühlen erforderlich. Die Gelbildung erfolgt durch die Umlagerung der inneren Helixstrukturen. Die Kationen dienen mit ihren ionischen Wechselwirkungen mit den negativ

geladenen Carboxylgruppen des Polymers dem Zusammenhalt der Struktur [63]. Dabei bewirken zweiwertige Kationen, wie z. B. Ca^{2+} oder Mg^{2+} , Gele mit höherer Vernetzung und daraus folgender höherer Festigkeit, wohingegen einwertige Kationen, wie z. B. Na^+ oder K^+ , eher weichere Gele mit geringerem Vernetzungsgrad bewirken [15, 16]. Die Ausbildung einer Helixstruktur ist für Biopolymere nicht ungewöhnlich, so ist dies u. a. bei Gellan und Xanthan beobachtet worden [11, 77]. In nativem Zustand bildet Gellan eine dreifach symmetrische Doppelhelix aus, wobei sich an der Außenseite die Acetylgruppen und im Kernbereich die Glycerylgruppen befinden [62]. Die Stabilisierung der Doppelhelix erfolgt durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen [13, 14].

Auch das Exopolysaccharid aus *Sphingomonas paucimobilis* GS1 bildet in deacetyliertem Zustand ein klares, Agar-ähnliches thermoreversibles Gel [5], aufgrund dessen auf eine lineare Struktur ohne Seitenketten zu schließen ist. Als Hauptbestandteile wurden Glucose, Galacturonsäure und Glucuronsäure ermittelt. Neben der Gelierfähigkeit besitzt es die Eigenschaft, mit organischen Lösungsmitteln, wie Benzen, Kerosin oder Hexadekan, und Ölen, beispielsweise Kokusnuss- oder Olivenöl, schon in Konzentrationen von 1 mg/mL stabile Emulsionen zu bilden [4]. Im Vergleich zu kommerziellen Stabilisierungsmitteln, wie Xanthan oder Tragant, hat sich in dieser Hinsicht eine erhöhte Effizienz von Sphinganen herausgestellt, da sich die Emulsionen über einen längeren Zeitraum auch bei hohen NaCl-Konzentrationen als stabil erweisen.

2.1.2 Anionische Polysaccharide mit Seitenketten

Zu den anionischen Polysacchariden mit Seitenketten zählen u. a. Rhamsan (S-194) aus *Alcaligenes species* ATCC 31961, das Sphingan I-886 (= RMDP17) aus *Sphingomonas paucimobilis*, Welan (S-130) aus *Alcaligenes species* ATCC 31555 und Diutan (S-657) aus *Xanthomonas campestris* ATCC 53159. Anionische Polysaccharide mit Seitenketten sind größtenteils nicht in der Lage, stabile, feste Gele zu bilden. Dies liegt an der sterischen Hinderung durch die Seitenketten, welche eine Ausbildung einer regelmäßigen netzartigen Struktur verhindern. Wie

bei Kwon *et al.* [53], Moorehouse [60], Podolsak *et al.* [72] und Talashek und Brant [90] beschrieben, steigt die Viskosität mit zunehmender Seitenkettenlänge, während die Geliereigenschaften verloren gehen.

Der wohl bekannteste Vertreter der Gruppe anionischer Polysaccharide mit Seitenketten ist Rhamsan, welches von Peik *et al.* [68] bereits 1981 patentiert und von Sandford *et al.* [80] als salz- und scherstabiles Polysaccharid beschrieben wurde. Die von Rhamsan ausgebildete Doppelhelix wird durch die Disaccharidseitenketten stabilisiert, was auch bis zu Temperaturen von 100 °C zu beobachten ist [62]. Dieses Polymer hat in seiner nativen Form ausgezeichnete verdickende Eigenschaften; bei vergleichbarer Menge und Temperatur wurden höhere Viskositäten als bei Xanthan beobachtet [72]. Diese Stabilität bringt Rhamsan in vielen Anwendungsgebieten Vorteile gegenüber dem häufig eingesetzten Xanthan und rückt die Gruppe der Sphingane mehr in das Interesse der Industrie. Dem Rhamsan sehr ähnlich im Aufbau ist das Sphingan I-886 [9, 29]. Die Unterschiede der beiden Polysaccharide beschränken sich zum Einen auf die Stabilität der Doppelhelixstruktur, welche bei deacetyliertem I-886 stärker ausgeprägt ist als bei deacetyliertem Rhamsan, und zum Anderen auf die Gelierungsfähigkeit, welche bei Rhamsan stärker ausgebildet ist, während I-886 in Anwesenheit von mindestens zweiwertigen Kationen nur sehr schwache Gele ausbildet [91]. Welan ist ebenfalls ein Doppelhelix bildendes Polysaccharid, welches aufgrund seiner stabilisierend wirkenden Monosaccharidseitenkette sehr hitzestabil ist und exzellente verdickende, suspendierende und stabilisierende Fähigkeiten hat [45, 62, 80]. Im Zuge der verstärkten kommerziellen Nachfrage nach wasserlöslichen Heteropolysacchariden mit verschiedenen Funktionen im rheologischen Bereich wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, und 1992 wurde von Peik *et al.* [69] Diutan entdeckt. Auch dieses Polymer zeigt nützliche verdickende, suspendierende und stabilisierende Eigenschaften.

2.1.3 Ungeladene Polysaccharide

Die vorteilhaften Eigenschaften bakterieller Polysaccharide wurden schon um 1940 an Dextran entdeckt, welches damit zum ersten kommerziell eingesetzten Biopolymer avancierte [47]. Dextran ist ein hochmolekulares, ungeladenes Polysaccharid bestehend aus Glucosemonomeren, welches von der Gattung *Leuconostoc* extrazellulär produziert wird [96]. Auch Sphingomonaden produzieren ungeladene Polymere, z. B. das Exopolysaccharid PS-P4 aus *Sphingomonas paucimobilis* P4 (DSM 6418). Bei PS-P4 handelt es sich um ein Polysaccharid mit einer Repeating Unit aus drei Untereinheiten, ausschließlich bestehend aus den Neutralzuckern Glucose und Rhamnose im Verhältnis 2:1. Da PS-P4 keine Seitenketten aufweist, ist es in der Lage, in Anwesenheit von Phosphationen in alkalischem Milieu wässrige Gele zu bilden. Die Gelbildung ist bei PS-P4 allerdings nur schwach ausgeprägt, weshalb hier die viskositätsgebenden Eigenschaften viel interessanter sind für technische Anwendungen als das Gelierungspotential [54].

2.2 Anwendung von Sphinganen

Die rheologischen Eigenschaften einer Polysaccharidlösung sind abhängig von den intrinsischen physikochemischen Eigenschaften, wie Molekulargewicht, Polydispersität und Substitutionsgrad [58]. Bei mikrobiellen Polysacchariden hängen die physikochemischen Eigenschaften auch mit dem Kultivierungsprozess zusammen. So sind Medienzusammensetzung, pH-Wert, Kultivierungstemperatur, Rührertyp und Rührerdrehzahl oft die einflussreichsten Faktoren auf die Biosynthese [32]. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die rheologischen Eigenschaften ist der Salzgehalt in der Polymerlösung. Die gesamte Handhabung und die nach der Produktion erforderliche Aufreinigungsstrategie hängen entscheidend von den rheologischen Eigenschaften der Polymerlösung ab. Sphingane verhalten sich im Allgemeinen strukturviskos und viskoelastisch. Dies

prädestiniert sie für eine Anwendung als Konsistenzgeber bzw. Geliermittel in Bereichen wie der Lebensmittelindustrie und der Kosmetikindustrie.

Gellan (S-60) findet Anwendung als verdickender, stabilisierender oder gelierender Zusatz z. B. im Lebensmittelbereich [49, 56, 67, 79], in der pharmazeutischen und chemischen Industrie [7], als mikrobieller Agarersatz [10, 48] oder in pflanzlichen Gewebekulturen [20, 38]. Auch ist eine Anwendung von Gellangelen bei der Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA [19] oder bei der Herstellung fotografischer Schichten [28] denkbar. In jüngerer Vergangenheit wurden Untersuchungen zur Anwendung von Gellan bei der mikrobiologischen Sanierung kontaminierter Böden und Gewässer durchgeführt [93]. Gellan ist das kommerziell erfolgreichste Sphingan mit einem weltweiten Produktionsvolumen von 1.000 Tonnen im Jahr (Stand 2000) [74]. Es ist außer in den USA und Japan auch in der Europäischen Union als Lebensmittelzusatzstoff E418 zugelassen und wird unter den Namen Kelcogel[®] (CP Kelco, Atlanta, USA), Gelrite[®] bzw. Phytigel[®] (Sigma-Aldrich, München, Germany) und Gellan Gum (Fluka, Buchs SG, Switzerland) weltweit vertrieben [10].

Rhamsan (S-194) findet überall da Anwendung, wo Stellmittel mit guten suspendierenden Eigenschaften benötigt werden, wie z. B. in Flüssigdünger, in welchen meist hohe Konzentrationen an Salzen zu finden sind [6, 47, 67], in fließfähigen Pestiziden [80] oder auch in Holzschutzmittelemulsionen [72]. Im Jahr 1988 wurde von der E. Merck OHG (heutige Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ein Patent zur Verwendung von Rhamsan im Kosmetik- und Pharmaziebereich zur Anwendung auf Haut oder Schleimhaut angemeldet [57]. Da es beim Sterilisationsprozess im Autoklaven seine rheologischen Eigenschaften beibehält, ist ein Einsatz in der pharmazeutischen Industrie aufgrund der Hitzestabilität des Rhamsans möglich. Im Jahr 2005 erfolgten Untersuchungen mit einem Collagen-Rhamsan-Verbundstoff zur Stabilisierung von Mikrofibrillen in Collagengelpräparaten im Bereich der plastischen Chirurgie, bei dem sich der Einsatz von Rhamsan als gute Alternative zu den bisher eingesetzten Glutaraldehyden herausstellte [22].

Auch in der Tertiären Erdölförderung finden Sphingane Anwendung als Zusatz zu wasserbasischen Bohrspülflüssigkeiten, wo sie eine Agglomeration der Kohlepartikel verhindern sollen, über einen langen Zeitraum statische und dynamische Stabilität gewähren und die Fließfähigkeit aufrecht erhalten sollen [2, 72, 75, 77]. Aufgrund seiner Temperaturstabilität ist Welan in diesem Anwendungsgebiet zu finden. Zudem eignet es sich als Zusatz in Enteisungsflüssigkeiten und Reifendichtungsmitteln sowie zur besseren Suspendierung von Pigmenten in Beton und in Farben [71, 95]. Moorehouse [60] gibt im Weiteren eine Zusammenstellung von diversen Produktionsbereichen, in denen Polysaccharide als Produktionshilfsmittel eingesetzt werden.

2.3 Strukturaufklärung und Molmassenbestimmung von Polysacchariden

2.3.1 Strukturaufklärung

Eine Strukturaufklärung ist für eine umfassende Charakterisierung des PS-EDIV unerlässlich, da die Eigenschaften von Polysacchariden auf die molekulare Struktur zurückzuführen sind und mit Kenntnissen darüber auf die speziellen Anwendungen geschlossen werden kann. Zur Analyse der Molekülstruktur werden Methoden wie die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und die Massenspektrometrie (MS) angewendet.

Die Kernspinresonanzspektroskopie dient hauptsächlich der Konstitutionsaufklärung eines Moleküls, indem es Informationen über die Struktur in der Umgebung von Atomkernen, insbesondere von Wasserstoff- und Kohlenstoffatomen, liefert. Die Analysemethode basiert auf der Absorption (bzw. Emission) von Strahlung durch die zu untersuchenden Moleküle [92]. Durch elektromagnetische Strahlung werden dabei die Moleküle angeregt, es treten Molekülschwingungen, Rotationen oder Umorientierungen des Kernspins auf. Die dabei