

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Membrangestützte Herstellung bakterieller Cellulose  
mit *Gluconacetobacter xylinus***

**Michael Dominic Hofinger**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Tim C. Lüth  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 06.07.2011 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 24.10.2011 angenommen.



One sometimes finds what one is not looking for.

*Alexander Flemming*



# Vorwort

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung von Betreuern, Kollegen und Freunden nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz für die Möglichkeit meine Dissertation unter den hervorragenden Bedingungen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München zu vollenden, bedanken. Neben der dieser Arbeit zugrundeliegenden Idee, stammten von Ihm wichtige Ratschläge an entscheidenden Punkten der Arbeit. Bei Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Tim C. Lüth möchte ich mich für die Übernahme der Aufgabe des Prüfungsvorsitzes bedanken und bei Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Wolfgang Liebl für die des 2. Prüfers der Dissertation.

Ich möchte mich bei Dr. Günter Bertholdt und allen Mitarbeitern der Bioregeneration GmbH für die exzellente Zusammenarbeit bedanken.

Zusätzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Lehrstühle für Medizintechnik und Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München für die Möglichkeit der Nutzung spezieller Geräte bedanken.

Ein großer Dank gilt all meinen Studenten Thomas Römer, Sabine Huber, Ilka Sührer, Sabine Blaumaier, Silvia Pirrung und Paraskevi Christogianni.

Danke an alle Kollegen des Lehrstuhls für die freundliche und produktive Atmosphäre. Ein besonderer Dank gilt Michael Weiner, Martin Demler, Danielle Dennewald und Dirk Hebel.

Schließlich bin ich für die große Unterstützung in allen Dingen durch Mirja Platzbecker dankbar.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Motivation und Zielsetzung</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>5</b>
3.1	Bioprozesse . . . . .	5
3.1.1	Mikrobielles Wachstum . . . . .	5
3.1.2	Betrieb von Bioreaktoren . . . . .	7
3.2	Membranverfahren . . . . .	8
3.3	Bakterielle Cellulose . . . . .	11
3.3.1	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> . . . . .	11
3.3.2	Synthese von bakterieller Cellulose . . . . .	15
3.3.3	Eigenschaften von bakterieller Cellulose . . . . .	18
3.3.4	Herstellung von bakterieller Cellulose . . . . .	19
3.4	Biofilme . . . . .	26
3.4.1	Biologie . . . . .	26
3.4.2	Stofftransport in Biofilmen . . . . .	28
3.5	Medizinische Voraussetzungen . . . . .	30
3.5.1	Biokompatibilität . . . . .	30
3.5.2	Blutkompatibilität . . . . .	31
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>34</b>
4.1	Lösungen . . . . .	34
4.2	Medium . . . . .	34
4.3	Mikroorganismen . . . . .	35
4.4	Stammhaltung . . . . .	35
4.5	Inokulumsherstellung . . . . .	36
4.5.1	Schüttelkolben . . . . .	36

4.5.2	Rührkesselreaktor . . . . .	36
4.6	Membranverfahren . . . . .	37
4.6.1	Membranmodule: Materialien und Herstellung . . . . .	37
4.6.2	Membranmodule: Zusammenbau . . . . .	38
4.6.3	Versuchsaufbau . . . . .	41
4.6.4	Satzverfahren . . . . .	41
4.6.5	Zulaufverfahren . . . . .	42
4.6.6	Definierte Reaktionsbedingungen . . . . .	42
4.7	Reinigung . . . . .	42
4.8	Lyophilisation . . . . .	43
4.9	Quantifizierung des Biofilms . . . . .	44
4.9.1	Biomasse . . . . .	44
4.9.2	Matrix . . . . .	46
4.10	Charakterisierung des Cellulosepellikel . . . . .	47
4.10.1	Rasterelektronenmikroskopie . . . . .	47
4.10.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie . . . . .	48
4.10.3	Quecksilberporosimetrie . . . . .	49
4.10.4	Sauerstoffmessung . . . . .	50
4.10.5	Blutkompatibilität . . . . .	50
4.11	Bestimmung von binären Diffusionskoeffizienten . . . . .	53
4.12	Analytik . . . . .	54
4.12.1	Metabolite . . . . .	54
4.12.2	Protein . . . . .	57
4.13	Optimierung . . . . .	57
4.14	Datenverarbeitung . . . . .	60

<b>5</b>	<b>Konstruktion von Membranmodulen</b>	<b>61</b>
5.1	Glasmodul . . . . .	61
5.2	Polypropylenmodul . . . . .	65
5.3	Diskussion . . . . .	67
<b>6</b>	<b>Identifikation einer geeigneten Membran</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Inokulumherstellung</b>	<b>73</b>
7.1	Inokulumherstellung im Schüttelkolben . . . . .	73
7.2	Inokulumherstellung im Rührkesselreaktor . . . . .	77
7.3	Diskussion . . . . .	80
<b>8</b>	<b>Online-Erfassung der Celluloseproduktion</b>	<b>81</b>
8.1	Lasertriangulation . . . . .	81
8.2	Korrelation . . . . .	82
8.3	Diskussion . . . . .	83
<b>9</b>	<b>Celluloseproduktion im Satzverfahren</b>	<b>85</b>
9.1	Statische Oberflächenkultur . . . . .	85
9.2	Membranmodul mit kleinem Bypassgefäß . . . . .	89
9.3	Membranmodul mit großem Bypassgefäß . . . . .	93
9.4	Diskussion . . . . .	97
<b>10</b>	<b>Definiertes Medium</b>	<b>100</b>
10.1	Optimierung . . . . .	100
10.2	Validierung . . . . .	105
10.3	Diskussion . . . . .	108
<b>11</b>	<b>Analyse des Stofftransports im Pellicle</b>	<b>110</b>
11.1	Nährstoffe . . . . .	110
11.2	Sauerstoff . . . . .	116
11.3	Diskussion . . . . .	117

<b>12 Celluloseproduktion im Zulaufverfahren</b>	<b>118</b>
12.1 Membranmodul mit kleinem Bypassgefäß . . . . .	118
12.2 Diskussion . . . . .	123
<b>13 Charakterisierung der Cellulosepellikel</b>	<b>125</b>
13.1 Makrostruktur . . . . .	125
13.2 Dichte . . . . .	126
13.3 Lasertriangulation . . . . .	131
13.4 Diskussion . . . . .	136
<b>14 Eigenschaften bakterieller Cellulose</b>	<b>138</b>
14.1 Reinigung . . . . .	138
14.2 Biokompatibilität . . . . .	139
14.2.1 Blutkompatibilität . . . . .	139
14.2.2 Besiedlung . . . . .	142
14.3 Diskussion . . . . .	144
<b>15 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>146</b>
<b>16 Literaturverzeichnis</b>	<b>151</b>
<b>17 Abkürzungen</b>	<b>159</b>
<b>A Anhang</b>	<b>160</b>
A.1 Zeichnungen der Membranmodule . . . . .	160
A.2 Leitfähigkeitsmessung . . . . .	164
A.3 Optimierung . . . . .	165
A.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie . . . . .	167
A.5 Materialien . . . . .	169

# 1 Einleitung

Es ist seit langer Zeit bekannt, dass Mikroorganismen Polymere herstellen. Die erste Beschreibung eines bakteriellen Polymers gelang Louis Pasteur. In der Mitte des neunzehnten Jahrhunderts entdeckte er Dextran in Wein. Kurz darauf wurde das verantwortliche Bakterium identifiziert. Das zweite entdeckte bakterielle Polymer war Cellulose. Brown (1886) konnte zeigen, dass Essigsäurebakterien Cellulose produzieren.

Obwohl bakterielle Cellulose bereits seit 1886 bekannt war, fand das Material kaum Anwendung, da von Pflanzen produzierte Cellulose als häufigstes Biopolymer der Erde in großen Mengen zur Verfügung steht. Bakterielle Cellulose wurde ausschließlich in der analytischen Chemie wegen ihrer hohen Reinheit und der hohen Kristallinität untersucht. Der wichtigste Produzent von bakterieller Cellulose ist *Gluconacetobacter xylinus* (früher *Acetobacter xylinum*). Die Mikroorganismen wurden hauptsächlich als Modellorganismus für die pflanzliche Cellulosesynthese untersucht.

Das Interesse an bakterieller Cellulose hat erst kürzlich zugenommen, als eine Vielzahl von Anwendungen für das Material entdeckt wurden. Bakterielle Cellulose wird unter anderem als Lautsprechermembran, elektronisches Display und Membran für Brennstoffzellen vorgeschlagen [Nishi *et al.*, 1990; Shah und Brown, 2005; Evans *et al.*, 2003].

Das wahrscheinlich vielversprechendste Anwendungsgebiet liegt jedoch in der Medizin. Bakterielle Cellulose löst nach Implantation im Körper keine Fremdkörperreaktion aus [Helenius *et al.*, 2005]. Zusätzlich verfügen Säugetiere über keine Cellulasen. Implantate aus Cellulose bleiben daher über lange Zeit stabil im Körper. Die Struktur von bakterieller Cellulose kann als Matrix für das Wachstum von eukaryotischen Zellen dienen. Diese Eigenschaften qualifizieren bakterielle Cellulose bereits für viele Anwendungen in der Medizin und der Gewebekultur. Aktuelle Untersuchungen zeigen darüber hinaus eine geringe Thrombogenität, so dass bakterielle Cellulose auch als Blutgefäßersatz eingesetzt werden könnte [Wippermann *et al.*, 2009]. Besonders in diesem Bereich besteht ein sehr großer Bedarf, da es für Gefäße mit einem Innendurchmesser  $<5\text{ mm}$  derzeit keinen künstlichen Ersatz gibt [Kakisis *et al.*, 2005].

## 2 Motivation und Zielsetzung

Das größte Verwendungsgebiet für bakterielle Cellulose liegt in der medizinischen Anwendung. Bakterielle Cellulose hat sich als sehr gut biokompatibel erwiesen, es bleibt im Körper lange Zeit stabil und kann als Gerüststruktur für den Aufbau oder die Regeneration von Gewebe verwendet werden [Helenius *et al.*, 2006; Bäckdahl *et al.*, 2006; Bodin *et al.*, 2007]. In diesem Bereich werden bereits Anwendungen in der Zellkultur bis hin zu Implantaten mit Blutkontakt untersucht. Für diese Anwendungen wird bakterielle Cellulose in der Regel in Form eines festen Hydrogels ("Pellicel") benötigt. Die Produktion von bakterieller Cellulose erfolgt durch das gram-negative Bakterium *Gluconacetobacter xylinus*. Die obligat aeroben Bakterien produzieren einen Pellicel an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase. Der Pellicel besteht aus einzelnen miteinander verbundenen Schichten, die parallel zur Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase angeordnet sind. Während der Produktion ist es von entscheidender Bedeutung, dass der Pellicel mechanisch nicht belastet wird, damit sich die Verbindungen zwischen den einzelnen Schichten des Pellicels vollständig ausbilden können.

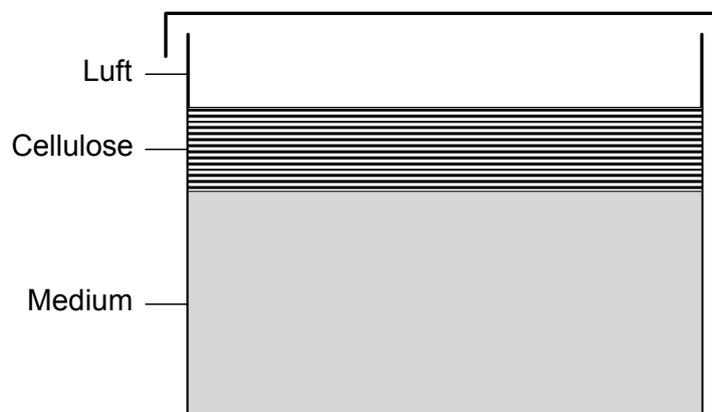


Abbildung 1: In statischer Kultivierung bildet *Gluconacteobacter xylinus* einen Pellicel aus Cellulose an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase produziert. Der Sauerstoffeintrag erfolgt diffusiv über die Gasphase (Luft).

Um dies zu vermeiden erfolgt die Produktion in der Regel in Standkultur in Glasgefäßen im einfachen Satzverfahren (Abb. 1). Die Begasung erfolgt diffusiv über die Oberfläche, die Kohlenstoffquelle wird diffusiv über die Flüssigphase (Medium) zugeführt. Die obligat aeroben Mikroorganismen produzieren Cellulose an der Grenzschicht Gas-Pellicel. Eine Kontrolle der Reaktionsbedingungen ist in der Flüssigphase nur schwer möglich, da kein Leistungseintrag durch ein Rührorgan erfolgen kann. Dies führt dazu, dass sich die

Reaktionsbedingungen (Substrat- und Metabolitkonzentrationen, pH) wie im Satzverfahren üblich im Laufe des Produktionsprozesses verändern. Dieses einfache Satzverfahren in Standkulturen begrenzt zum einen den Celluloseertrag. Zum anderen kann es durch die sich unkontrolliert ändernden Reaktionsbedingungen zur Ausbildung von Celluloseschichten mit als Funktion der Höhe veränderlicher Struktur kommen. Dies beeinflusst die mechanischen Eigenschaften der Cellulose in der späteren Anwendung.

Zielsetzung ist die Entwicklung eines Verfahrens zur definierten Herstellung mikrobieller Cellulose unter kontrollierten Reaktionsbedingungen.

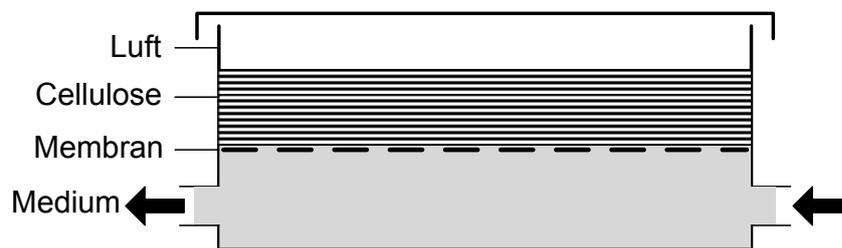


Abbildung 2: Eine Membran an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase soll den Pellikel mechanisch schützen und den konvektiven Transport der Flüssigphase (Medium) und damit die einfache Kontrolle der Reaktionsbedingungen ermöglichen.

Hierzu bietet sich ein Membranverfahren an. Eine steife Mikrofiltrationsmembran an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase ermöglicht den konvektiven Transport der Flüssigphase unterhalb der Membran, so dass die sich auf der Oberseite der Membran ausbildenden Celluloseschichten nicht mechanisch belastet werden (Abb. 2). *Gluconacetobacter xylinus* wird auf der Oberseite der Mikrofiltrationsmembran in einer Suspension aufgebracht. Das Medium wird diffusiv durch die Poren der Membran transportiert. Der von *Gluconacetobacter xylinus* produzierte Pellikel liegt direkt auf der Membran auf. Zur einfachen Kontrolle der Reaktionsbedingungen bietet sich die Anwendung dieses Membranverfahrens im "Bypass" zu einem kontrolliertem Standardbioreaktor an. Die Gasphase kann ebenfalls einfach im Durchlauf kontrolliert werden. Auf diese Weise soll der Aufbau für medizinische Anwendungen geeigneter homogener Struktur der Celluloseschichten ermöglicht werden.

Zur Entwicklung und zur reaktionstechnischen Charakterisierung dieses Membranverfahrens zur definierten Herstellung bakterieller Celluloseschichten soll wie folgt vorgegangen werden:

- Entwicklung und Aufbau eines Labormusters für reaktionstechnische Untersuchungen der membrangestützten Cellulosebildung.
- Auswahl geeigneter Membranen.
- Entwicklung eines Verfahrens zur reproduzierbaren Herstellung von Inokulum für das Membranverfahren.
- Entwicklung einer online Messtechnik zur Bestimmung der produzierten Menge an Cellulose im Membranverfahren.
- Reaktionstechnische Untersuchungen zur Herstellung bakterieller Cellulose mit *Gluconacetobacter xylinus* im Satzverfahren.
- Reaktionstechnische Untersuchungen zur Entwicklung eines definierten Mediums für das Membranverfahren.
- Reaktionstechnische Untersuchungen zur Herstellung bakterieller Cellulose mit *Gluconacetobacter xylinus* im Zulaufverfahren.
- Charakterisierung der Struktur der im Membranverfahren produzierten bakteriellen Cellulose.
- Untersuchungen zur Aktivierung der Blutgerinnung und des angeborenen Immunsystems durch die produzierte Cellulose.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Bioprozesse

#### 3.1.1 Mikrobielles Wachstum

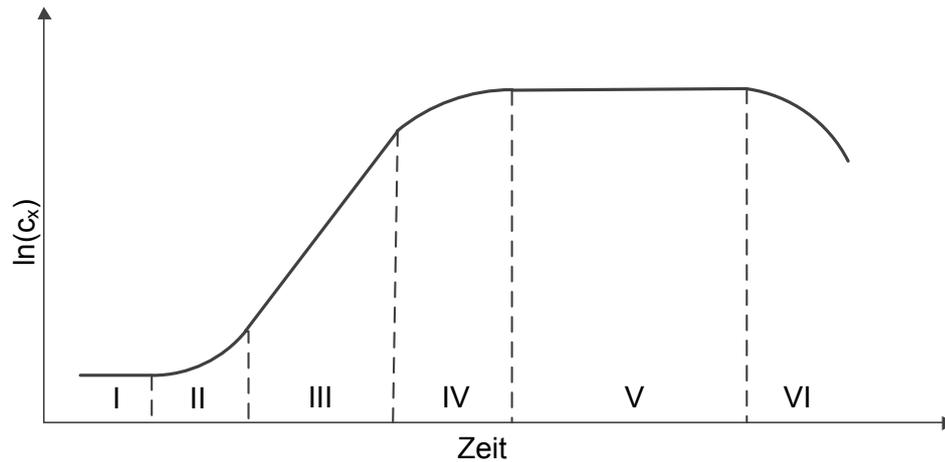


Abbildung 3: Schematische Wachstumskurve von Mikroorganismen in Suspensionskultur im Satzverfahren.

Abbildung 3 zeigt einen typischen Verlauf der Biomassekonzentration im Satzverfahren. Aus Änderungen in der Biomassekonzentration kann die zellspezifische Wachstumsrate ( $\mu$ ) der Mikroorganismen bestimmt werden (Gl. 1).

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad (1)$$

Während einer Kultivierung von Mikroorganismen im Satzverfahren sind verschiedene Phasen erkennbar (Tab. 1). In der ersten Verzögerungsphase (I) findet kein Wachstum statt. Der Metabolismus der Bakterien passt sich an die Umgebungsbedingungen an. Der Beginn der Übergangsphase (II) kennzeichnet die Anpassung der Organismen an die Umgebung. Wachstum setzt ein. In der exponentiellen Phase (III) wächst die Biomasse exponentiell mit der maximalen Wachstumsrate ( $\mu_{max}$ ). In der 2. Übergangsphase (IV) wird ein Substrat limitierend und die Wachstumsrate nimmt ab. Während der stationären Phase (V) entspricht die Wachstumsrate der Sterberate. Insgesamt bleibt die Biomassekonzentration in dieser Phase konstant. In der Absterbephase (VI) überwiegt die Sterberate und die Biomassekonzentration nimmt ab.

Tabelle 1: Wachstumsphasen.

Phase	Beschreibung	Wachstumsrate
I	Anpassungsphase	$\mu = 0$
II	Übergangsphase 1	$0 < \mu < \mu_{max}$
III	exponentielle Phase	$\mu = \mu_{max}$
IV	Übergangsphase 2	$0 < \mu < \mu_{max}$
V	stationäre Phase	$\mu = 0$
VI	Absterbephase	$\mu < 0$

Die spezifische Wachstumsrate kann in der exponentiellen Phase und in der 2. Übergangsphase unter Annahme eines limitierenden Substrats ( $c_S$ ) durch eine einfache Sättigungskinetik beschrieben werden (Gl. 2).

$$\mu = \mu_{max} \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad (2)$$

Die Sättigungskinetik enthält die Sättigungskonzentration  $K_S$  bei der die Hälfte der maximalen Wachstumsrate erreicht wird. Für Substratkonzentrationen, die wesentlich größer sind als  $K_S$ , nähert sich die spezifische Wachstumsrate,  $\mu_{max}$  an.

Durch Integration von Gleichung (1) ist es, ausgehend von einer konstanten Wachstumsrate  $\mu_{max}$ , möglich die Biomassekonzentration basierend auf der Startkonzentration ( $c_x^0$ ) und der Prozesszeit ( $t$ ) zu beschreiben (Gl. 3).

$$c_x(t) = c_x^0 \cdot e^{\mu_{max} \cdot t} \quad (3)$$

Ausgehend von einer konstanten Wachstumsrate  $\mu_{max}$ , ist es möglich die Biomassekonzentration basierend auf der Startkonzentration ( $c_x^0$ ) und der Prozesszeit ( $t$ ) zu beschreiben (Gl. 3).

Analog der Wachstumsrate werden alle anderen zellspezifischen Substratverbrauchs- oder Produktbildungsraten definiert (Gl. 4). Die Rate kann je nachdem, ob der Stoff gebildet oder verbraucht wird, positiv oder negativ sein.

$$q_i \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_i}{dt} \quad (4)$$

Biomasse, wie auch Produkte, sollen aus dem limitierenden Substrat hergestellt werden. Die "Stöchiometrie" dieser Umwandlung wird durch Ausbeutekoeffizienten wiedergegeben.  $Y_{X,S}$  ist die Menge an Biomasse, die pro Menge an verbrauchtem Substrat gebildet wird (Gl. 5). Sie wird als Biomasse-Substrat-Selektivität bezeichnet.

$$Y_{X/S} = \frac{dc_x}{dc_s} = \frac{\mu}{q_s} \quad (5)$$

Die Ausbeute eines Produkts pro Substrateinheit ist ähnlich definiert (Gl. 6).

$$Y_{P/S} = \frac{dc_p}{dc_s} \quad (6)$$

### 3.1.2 Betrieb von Bioreaktoren

Bioreaktoren können auf verschiedene Arten betrieben werden. Für die folgenden Beschreibungen wird ein ideal durchmischter Rührkesselreaktor angenommen. Bei einer Kultivierung im Satzverfahren werden alle Mediumkomponenten beim Start des Prozesses vorgelegt. Nur Gas und Korrekturmittel, wie zur pH Kontrolle oder zur Schaumzerstörung werden nachträglich in geringen Mengen in den Reaktor eingebracht.

$$\frac{dc_i}{dt} = c_x \cdot r_i \quad (7)$$

Jede Konzentrationsveränderung einer Komponente wird durch eine Reaktion ( $r_i$ ), die durch die Biomasse katalysiert wird, verursacht (Gl. 7). Bei der kontinuierlichen Kultivierung werden Medien kontinuierlich in den Reaktor eingebracht. Gleichzeitig wird ein entsprechendes Volumen an Medium aus dem Reaktor entfernt. Beim Zulaufverfahren wird frisches Medium in den Reaktor gepumpt, ohne dass gleichzeitig Medium entfernt wird. Das Volumen der Flüssigkeit im Reaktor erhöht sich während des Zulaufs. In der Regel wird dieses Verfahren eingesetzt, um die Verfügbarkeit eines limitierenden Substrats zu kontrollieren.

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{\dot{V}_{in}}{V_R} \cdot (c_i^{in} - c_i) + c_x \cdot q_i \quad (8)$$

Gleichung 8 beschreibt zeitliche Konzentrationsänderung einer Komponente im Zulaufverfahren. Der Zulauf ( $\dot{V}_{in}$ ) verdünnt das Reaktionsvolumen ( $V_R$ ). Die Konzentration der Komponente im Zulauf ist  $c_i^{in}$ . Zulauflösungen sind in der Regel hochkonzentriert, um die Verdünnung des Mediums im Reaktor zu begrenzen.

### 3.2 Membranverfahren

Membranen können auf Grund von verschiedenen Eigenschaften klassifiziert werden. Im allgemeinen existieren Porenmembranen und Lösungs-Diffusions-Membranen, in denen sich Stoffe im Membranmaterial lösen können. Technische Membranverfahren werden in der Regel nach der Größe der getrennten Partikel eingeteilt (Abb. 4). Je kleiner die Partikel, desto kleiner sind die Poren der Membran und umso höher ist der notwendige Transmembrandruck.

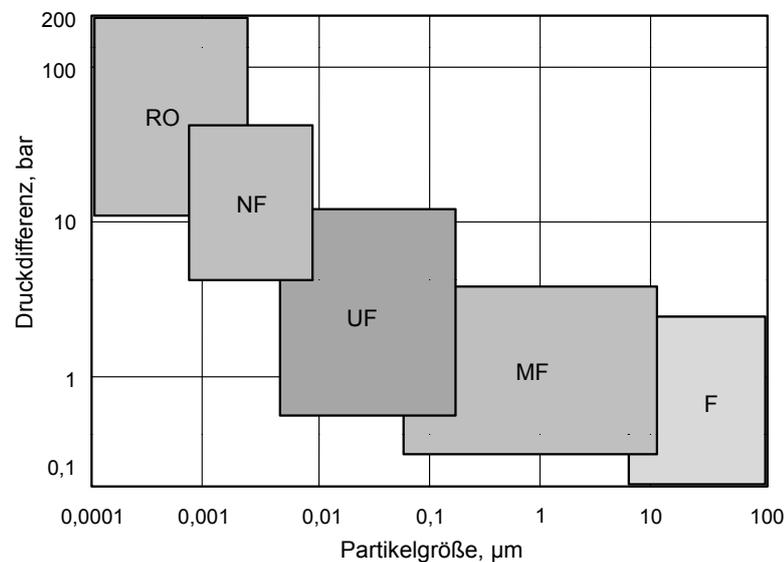


Abbildung 4: Einteilung von Membranverfahren nach Partikelgröße und Transmembrandruck. F: Filtration, MF: Mikrofiltration, UF: Ultrafiltration, NF: Nanofiltration und RO: Umkehrosmose.

Um *Gluconacetobacter xylinus* zurückzuhalten, sind Mikro- und Ultrafiltrationsmembranen anwendbar. Zusätzlich sind nur hydrophile Membranen geeignet, da das Kulturmedium die Membran ohne einen Transmembrandruck durchdringen soll. Solche Membranen sind in verschiedenen Materialien, Strukturen und Formen verfügbar (Tab. 2).

Für einen Membranprozess ist es in der Regel von Vorteil, wenn die Dicke der Membran gering ist, um zusätzliche Transportwiderstände zu minimieren. Eine hohe mechanische Stabilität kann jedoch leichter mit einer höheren Schichtdicke erreicht werden. Aus diesem Grund wurden asymmetrische Membranen entwickelt, bei denen eine dünne Trennschicht von einer porösen Stützschiicht unterstützt wird. Auf diese Weise kann die Stabilität der

Tabelle 2: Klassifizierung von Membranen nach Material, Struktur, Herstellung und Form [Ulbricht, 2006].

Material	Struktur	Herstellung	Form
organische Polymere	symmetrisch	Phasentrennung	Flachmembran
anorganische Polymere	asymmetrisch	sol-gel Verfahren	Hohlfaser
anorganische Keramik	mehrlagig	Grenzflächenreaktion	hohle Kapsel
anorganische Metalle	gemischte Matrix	Ziehen	
Komposite		Extrusion	
		"Track-Etching"	
		"Mikrofabrikation"	

Membran erhöht werden, ohne den Transportwiderstand wesentlich zu erhöhen. Dies ist besonders für keramische Membranen wichtig, die oft eine hohe Schichtdicke benötigen.

Alle Mikro- oder Ultrafiltrationsmembranen sind Porenmembranen. Die Membranen werden durch die Größe der Poren definiert. Da es häufig eine Verteilung der Porengrößen gibt, bezieht sich die angegebene Porengröße in der Regel auf eine Größe bei der ein Anteil von 95 - 98 % der Partikel ausgeschlossen wird. In der Mikrofiltration liegt die Porengröße zwischen 0,1-0,45  $\mu m$ . Diese relativ großen Poren führen zu einem geringen Transportwiderstand. Aus diesem Grund ist es nicht essentiell, dass Mikrofiltrationsmembranen asymmetrisch aufgebaut sind. Für Ultrafiltrationsmembranen wird die Porengröße nicht als Durchmesser, sondern als Molekulargewicht von Referenzpartikeln angegeben. Die Ausschlussgröße bezeichnet das Molekulargewicht, bei dem 90-95 % der Moleküle ausgeschlossen werden. Die tatsächliche Filtration wird dabei stark von den Interaktionen der Moleküle mit dem Membranmaterial beeinflusst [Melin und Rautenbach, 2007].

Die Struktur von Membranen kann durch drei Parameter beschrieben werden [Melin und Rautenbach, 2007].

Gleichung (9) definiert die Porosität ( $\epsilon$ ) als den Volumenanteil der Poren ( $V_P$ ) im Vergleich zum Gesamtvolumen der Membran ( $V_T$ ).

$$\epsilon = \frac{V_P}{V_T} \quad (9)$$

Die tatsächliche Oberfläche ( $S_V$ ) einer Membran wird nicht nur durch die zweidimensionale Form definiert. Nach Gleichung (10) wird ebenfalls die Oberfläche der Poren ( $A_P$ )

berücksichtigt.

$$S_V = \frac{A_P}{V_T \cdot (1 - \epsilon)} \quad (10)$$

$$\tau = \frac{L_P}{X_M} \quad (11)$$

Weiterhin sind die Poren einer Membran in der Regel nicht gerade Röhren durch die Membran, wie sie oft in schematischen Zeichnungen repräsentiert sind. Die Porenkanäle folgen in der Regel einem gekrümmten Weg. Aus diesem Grund ist die tatsächliche Wegstrecke eines Stoffes signifikant länger als die Membrandicke ( $X_M$ ). Dies wird durch die Tortuosität ( $\tau$ ) beschrieben, welche das Verhältnis der Länge der Porenkanäle ( $L_P$ ) zur Membrandicke beschreibt. Typische Werte für die Tortuosität sind 2 - 2,5 [Melin und Rautenbach, 2007].

### Konzentrationspolarisation

Stoffe durchdringen eine selektive Membran mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Dies führt zu einer Konzentrationspolarisation. In der Schicht direkt auf der Oberfläche der Zufuhrseite der Membran ist die Konzentration eines Stoffes, der die Membran durchdringen kann, niedriger als im Hauptteil der Flüssigkeit. Dies reduziert die Triebkraft der Diffusion und damit den Stofffluss. Diese Schicht wird Konzentrationsgrenzschicht (CBL) genannt.

Die Dicke der Konzentrationsgrenzschicht ( $\delta$ ) und der Diffusionskoeffizient ( $D_W$ ) können zu einem Stofftransportkoeffizienten ( $k$ ) kombiniert werden (Gl. 12).

$$k = \frac{D_W}{\delta} \quad (12)$$

Die Dicke der Grenzschicht wird von den hydrodynamischen Gegebenheiten beeinflusst (Gl. 13), die durch die Reynolds-, Sherwood- und Schmidt Zahlen gekennzeichnet sind.

$$Sh = \frac{k \cdot d_h}{D_W} = C \cdot Re^i \cdot Sc^j \quad (13)$$

Der hydrodynamische Durchmesser  $d_h$  ist in Gleichung (14) definiert.

$$d_h = \frac{4\epsilon}{S_V \cdot (1 - \epsilon)} \quad (14)$$

Eine hohe Reynoldszahl stellt eine turbulente Strömung nahe der Membranoberfläche sicher. Auf diese Weise wird  $\delta$  vermindert. Aus diesem Grund kann eine hohe Reynoldszahl auch bei rein diffusivem Stofftransport zu einer höheren Flussrate führen.

Diffusionskoeffizienten für Partikel können nach der Stokes-Einstein Gleichung (15) abgeschätzt werden. Hierdurch wird die Brown'sche Molekularbewegung beschrieben. Die Beweglichkeit der Partikel basiert auf dem Durchmesser ( $d_p$ ), der dynamischen Viskosität ( $\eta$ ), der Temperatur ( $T$ ) und einer Konstanten ( $C_{SE}$ ).

$$D = \frac{C_{SE} \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot d_p} \quad (15)$$

Definitionen der Kennzahlen:

$$Re = \frac{d_h \cdot \nu \cdot \rho}{\eta} \quad (\text{Reynolds}) \quad (16)$$

$$Sh = \frac{k \cdot d_h}{D_{ij}} = \frac{d_h}{\delta_{GS}} \quad (\text{Sherwood}) \quad (17)$$

$$Sc = \frac{\eta}{\rho \cdot D_{ij}} \quad (\text{Schmidt}) \quad (18)$$

### 3.3 Bakterielle Cellulose

#### 3.3.1 *Gluconacetobacter xylinus*

Wie alle Essigsäurebakterien ist *Gluconacetobacter xylinus* Gram negativ, stäbchenförmig und obligat aerob (Abbildungen 5, 6, Die Abbildungen sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden) [Deppenmeier und Ehrenreich, 2009]. Nach der Taxonomie gehören Essigsäurebakterien zur Familie der Acetobacteriaceae, Alphaproteobacteria und der Ordnung Rhodospirillales. Die Gattungen sind *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* und *Kozakia* [Deppenmeier und Ehrenreich, 2008]. Eine Analyse der rRNA führte zu einer Neuklassifizierung von *Acetobacter xylinum* zu *Gluconacetobacter xylinus*. Essigsäurebakterien sind bekannt für die oft unvollständige Oxidation von Substraten. Diese Eigenschaft wird in einigen biotechnologischen Prozessen genutzt. Die Mikroorganismen werden beispielsweise für die Produktion von Sorbose (Vitamin C Synthese),

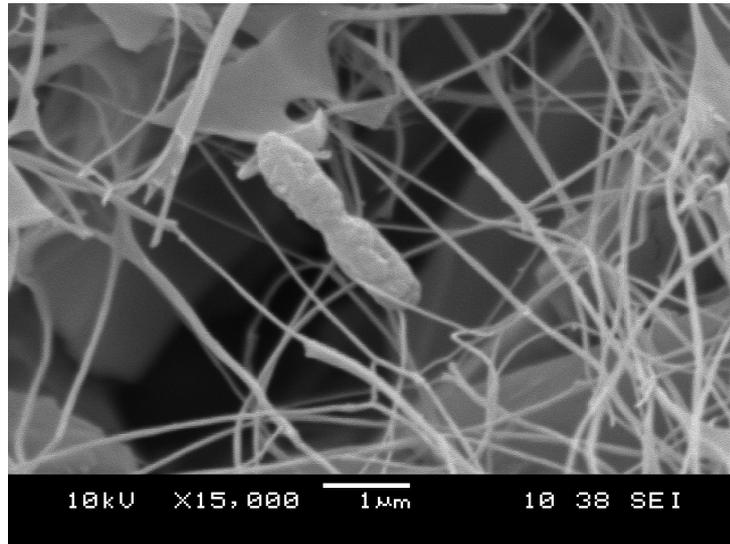


Abbildung 5: Stäbchenförmige Zelle von *Gluconacetobacter xylinus* eingebettet in Cellulosefasern.

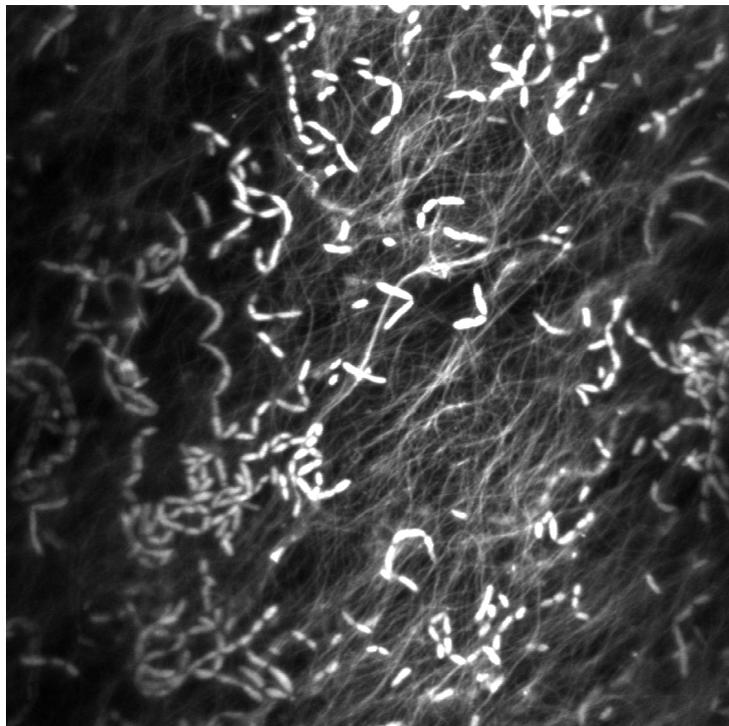


Abbildung 6: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie Aufnahme einer Kultur von *Gluconacetobacter xylinus*.

Dihydroxyaceton oder Glukonat eingesetzt [Deppenmeier *et al.*, 2002]. Der bekannteste Organismus ist *Gluconobacter oxydans*. Die Bakterien oxidieren Glukose nahezu quantitativ zu Glukonat. Ihre Toleranz gegen hohe Zuckerkonzentrationen macht die Bakterien zu effektiven Biokatalysatoren.

Essigsäurebakterien produzieren ebenfalls Exopolysaccharide wie Acetan, Levan und Cellulose. *Gluconacetobacter xylinus* ist der bekannteste Produzent von reiner Cellulose in großen Mengen [Ross *et al.*, 1991].

Die Organismen sind an eine Umgebung angepasst, in der eine Kohlenstoffquelle in großer Menge zur Verfügung steht, wie Pflanzen oder Früchte. Dennoch produzieren sie Biomasse nur langsam. Um in der Konkurrenz zu anderen Mikroorganismen bestehen zu können, entwickelten Essigsäurebakterien eine andere Strategie. Die primäre Kohlenstoffquelle wird sehr schnell zu Produkten oxidiert, die von anderen Mikroorganismen nicht direkt verwertet werden können. In der Regel senken die Oxidationsprodukte zudem den pH. Gekoppelt mit der hohen Säuretoleranz der Bakterien stellt dies einen zusätzlichen Schutz gegen Konkurrenz dar.

Trotz der zahlreichen biotechnologischen Anwendungen ist der Stoffwechsel der Essigsäurebakterien noch nicht gut verstanden. Der bestcharakterisierte Organismus ist *Gluconobacter oxydans*. Die Oxidationsreaktionen werden sowohl von löslichen Dehydrogenasen (DH) im Zytoplasma, als auch von Dehydrogenasen in der inneren Membran katalysiert (Abb. 7). Jedoch verfügen die membrangebundenen Dehydrogenasen über eine wesentlich höhere Aktivität als die intrazellulären [Kornmann *et al.*, 2003]. Sie sind Pyrrolochinolinchinon (PQQ) abhängig und direkt an die Elektronentransportkette gekoppelt [Shigematsu *et al.*, 2005].

Glukose und Glukonsäure werden diffusiv über die Zellmembran transportiert. Ein Transportsystem ist nicht bekannt. Die Synthese von Cellulose geht aus von Glukose-6-P. Phosphoglukomutase überträgt den Phosphatrest auf das C<sub>1</sub> Atom. Vor der Polymerisation zu Cellulose wird das Phosphat durch Uracildiphosphat (UDP) ausgetauscht. Cellulose wird durch einen Multienzymkomplex produziert. Interessanterweise kann intrazelluläre Glukose nicht über die Glykolyse im Citronensäurezyklus verwertet werden, da eine Phosphofruktokinase fehlt [Ross *et al.*, 1991]. Glukose wird über 6-Phosphoglukonat in den oxidativen Pentosephosphatweg eingeschleust. Im Gegensatz zu *Gluconobacter* kann *Gluconacetobacter* Acetat und Laktat über den Citronensäurezyklus komplett zu CO<sub>2</sub> oxidieren. Auch der Glyoxylatzyklus ist vorhanden [Deppenmeier und Ehrenreich, 2009]. *Gluconacetobacter* ist in der Lage ein großes Spektrum an Substraten zu verwerten [Jonas

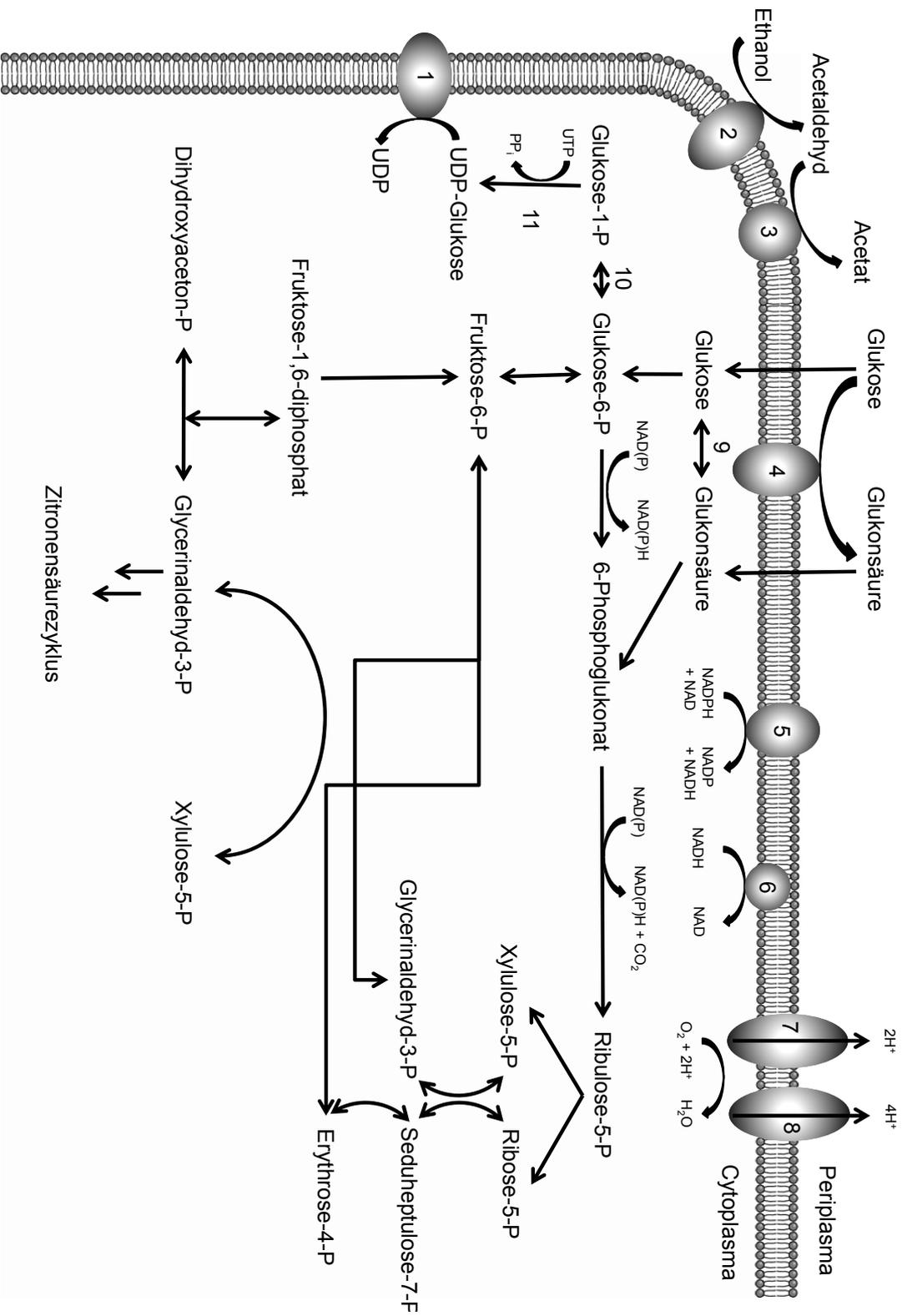


Abbildung 7: Übersicht über den Metabolismus von *G. xylinus*. 1: Cellulose Synthasekomplex, 2: Alkohol Dehydrogenase, 3: Acetaldehyd Dehydrogenase, 4: PQQ-abhängige Glukose Dehydrogenase, 5: Transhydrogenase, 6: NADH-Dehydrogenase, 7: Chinol Oxidase (cytochrom bd), 8: Chinol Oxidase (cytochrom bo<sub>3</sub>), 9: lösliche Glukose Dehydrogenase, 10: Phosphoglucomutase, 11: UDP-G-Pyrophosphorylase [Shigematsu *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 1991; Deppenmeier und Ehrenreich, 2008].

und Farah, 1997; Mikkelsen *et al.*, 2009]. Darüber hinaus sind die Bakterien in der Lage in einem großen pH Bereich zu wachsen. Hwang *et al.* (1999) beschrieb einen optimalen pH zwischen 4 - 6. Wachstum wurde jedoch bei einem pH bis zu 3 beobachtet. Die Wachstumstemperatur sollte zwischen 25 - 30 °C liegen [Jonas und Farah, 1997].

### 3.3.2 Synthese von bakterieller Cellulose

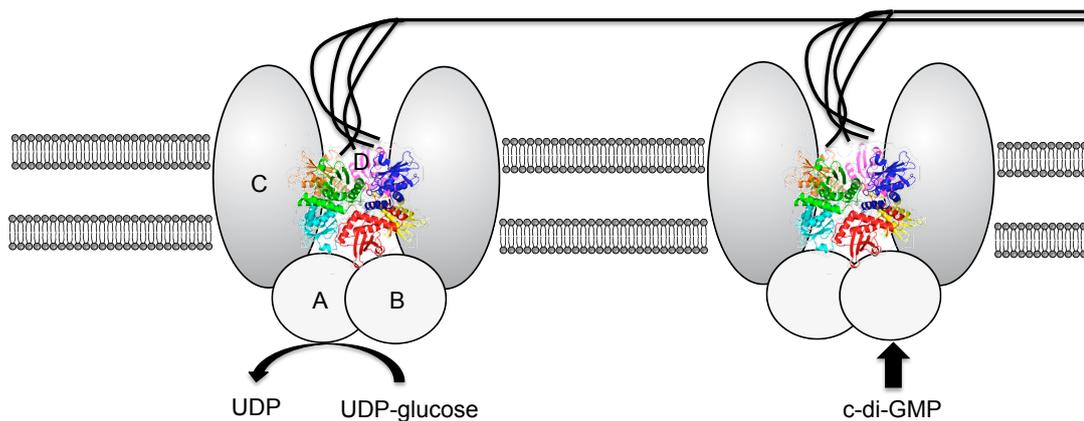


Abbildung 8: Schematische Zeichnung der Cellulosesynthese von *G. xylinus*. Die Proteine des *axces* Operons sind gekennzeichnet.

Jede Zelle von *Gluconacetobacter xylinus* produziert eine einzelne Fibrille mit einem Durchmesser von etwa 100 nm [Ross *et al.*, 1991] (Abb. 8). Die Polymerstränge werden von Multienzymkomplexen, genannt Terminale Komplexe (TC), synthetisiert. Die Synthesekomplexe überbrücken wahrscheinlich beide Membranen und den Periplasmatischen Raum. Sie sind linear entlang der Zellachse angeordnet [Itoh *et al.*, 2007]. Ein terminaler Komplex produziert Aggregate von Cellulosesträngen, genannt Mikrofibrillen, mit einem Durchmesser von 3 - 7 nm. Entlang der Zellachse kristallisieren die Mikrofibrillen zu einer Fibrille mit einem Durchmesser von 70 - 140 nm [Brown und Laborie, 2007]. Die lineare Anordnung der terminalen Komplexe wird wahrscheinlich während der Synthese der Fibrille durch die Kristallisation der Mikrofibrillen erreicht [Saxena *et al.*, 1994].

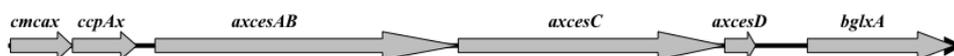


Abbildung 9: Operon der Cellulosesynthese [Kawano *et al.*, 2002]

Die Gene der Cellulosesynthese sind im *axces* Operon angeordnet (Abb. 9). AxCeSA und AxCeSB bilden die Cellulosesynthetase. Die Untereinheit AxCeSA bindet UDP-Glucose

und AxCeSB bindet *c*-di-GMP. AxCeSB hat wahrscheinlich eine regulatorische Funktion. Die Funktion von AxCeSC ist noch nicht bekannt, das Protein ist jedoch wahrscheinlich ebenfalls Teil des Porenkomplexes. Die Kristallstruktur von AxCeSD wurde kürzlich aufgeklärt [Hu *et al.*, 2010]. Das Protein bildet ein Oktamer, das für vier Polymerstränge durchgängig ist. Aus diesem Grund wird für AxCeSD eine zentrale Rolle in dem Porenkomplex der Cellulosesynthese postuliert. Die Kanäle durch AxCeSD sind nicht gerade und könnten dazu beitragen die Polymerstränge zu verdrehen. Hu *et al.* postulierte ein Modell für einen terminalen Komplex, bestehend aus  $(A_2B_2)_4C_8D_8$ . BglxA ist eine  $\beta$ -Glukosidase, die Cellotriosen hydrolysiert. Das Enzym ist nicht essentiell für die Cellulosesynthese [Kawano *et al.*, 2002]. Überraschenderweise ist auch eine Endo- $\beta$ -1,4-Glukanase, CMCac, in dem Operon kodiert. Es ist bekannt, dass Endoglukanasen für die Cellulosesynthese förderlich sein können. Das Enzym ist sekretorisch, bleibt jedoch mit der Membran assoziiert [Yasutake *et al.*, 2006]. Obwohl gezeigt werden konnte, dass das Enzym Carboxymethylcellulose (CMC) hydrolysieren kann, wurde nie ein Abbau der produzierten bakteriellen Cellulose gezeigt. Es ist *Gluconacetobacter xylinus* daher nicht möglich, einmal polymerisierte Cellulose wieder zu verwerten. Aus diesem Grund ist zu erwarten, dass die Cellulosesynthese komplex reguliert ist.

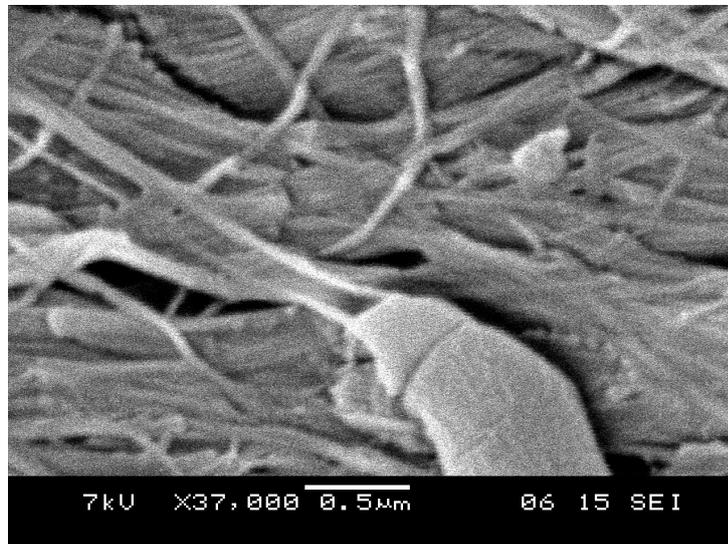


Abbildung 10: Cellulosefibrille, die von einer Zelle von *Gluconacetobacter xylinus* produziert wird. Elektronenmikroskopische Aufnahme bei 37000 facher Vergrößerung.

Es ist bekannt, dass AxCeSB zyklisches-di-GMP (*c*-di-GMP) bindet. *C*-di-GMP ist ein intrazelluläres Signalmolekül, von dem bekannt ist, dass es eine Reihe von Signalen integriert (Abb. 11). Das Molekül wird häufig mit "quorum sensing" in Verbindung gebracht und

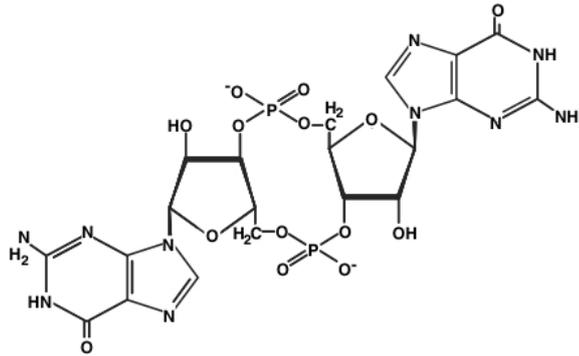


Abbildung 11: Struktur von c-di-GMP [Camilli *et al.*, 2006].

vermittelt wahrscheinlich extrazelluläre Signale intrazellulär. Es ist daher wahrscheinlich, dass c-di-GMP an der Regulation der Beweglichkeit der Zellen und der Biofilmbildung beteiligt ist [Camilli *et al.*, 2006; Hengge, 2009]. Die Synthese von c-di-GMP geht aus von zwei Molekülen GTP und wird von einer Diguanylatzyklase (DGC) katalysiert. Der Abbau erfolgt durch eine Phosphodiesterase [Tal *et al.*, 1998]. Die Celluloseproduktion in *Gluconacetobacter xylinus* könnte daher von "quorum sensing" beeinflusst werden. Iida *et al.* (2008) konnte zeigen, dass mehrere *Gluconacetobacter* Stämme über ein N-Acylhomoserin Laktone (AHL) basiertes Quorum Detektionssystem verfügen.

*Gluconacetobacter xylinus* zeigt genetische Instabilität. Besonders in Suspensionskultur können Mutanten auftreten, die keine Cellulose produzieren (*Cel*<sup>-</sup>). Dies wurde bereits von Hestrin und Schramm (1954) beobachtet, die die Mutanten als reversibel und irreversibel klassifizierten. Die Gene, die für die Phosphoglukomutase und die Glukose-1-phosphat Uridyltransferase kodieren, konnten von Krystynowicz *et al.* (2002) als nichtfunktionell in *Cel*<sup>-</sup> Mutanten identifiziert werden (siehe Abb. 7). Es ist möglich, dass die Gene schnell durch mobile Elemente inaktiviert werden können. Krystynowicz *et al.* (2002) postulierten, dass der Zusatz von 1 % EtOH den Anteil an *Cel*<sup>-</sup> Mutanten in einer Suspensionskultur senkt. Eine Erklärung für das Auftreten von *Cel*<sup>-</sup> Mutanten könnte sein, dass die Mutanten regelmäßig auftreten, in einer stationären Oberflächenkultur jedoch einem evolutionären Nachteil unterliegen. Die Celluloseproduktion könnte dazu beitragen, dass die Organismen an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase verbleiben, wo sie Zugang zu Sauerstoff haben. In einer Suspensionskultur mit Gaseintrag werden alle Zellen, unabhängig von ihrer Position mit Sauerstoff versorgt. *Cel*<sup>+</sup> unterliegen hier eventuell einem Nachteil gegenüber den *Cel*<sup>-</sup> Mutanten, da sie einen erheblichen Teil der Energie für die Celluloseproduktion aufwenden.

In stationärer Oberflächenkultur produziert *Gluconacetobacter xylinus* Cellulose an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase in Form eines Pellikels, da die Zellen Zugang zu Sauerstoff benötigen. Der Pellikel besteht aus einem Netz aus Cellulosefasern mit einer definierten dreidimensionalen Struktur.

### 3.3.3 Eigenschaften von bakterieller Cellulose

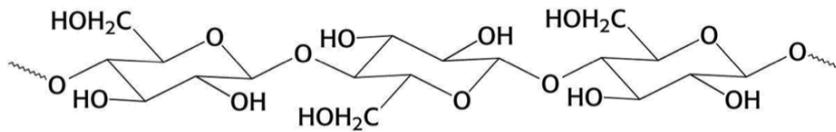


Abbildung 12: Chemische Struktur von Cellulose [Stryer *et al.*, 2002].

Cellulose besteht aus  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpften D-Glukose Molekülen (Abb. 12). Das Monomer der Cellulose besteht aus zwei Glukose Molekülen, die um  $180^\circ$  gedreht sind und somit Cellobiose bilden. Im Gegensatz zu Stärke und Glykogen, die  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verbunden sind und eine helikale Struktur bilden, sind Cellulosestränge linear. Das nicht-reduzierende Ende des Polymerstrangs ist die Hydroxylgruppe des C<sub>4</sub>-Atoms. Das andere Ende des Strangs ist reduzierend, da die Ringform von Glukose im Gleichgewicht mit der offenen Form steht, die eine Aldehydgruppe am C<sub>1</sub>-Atom besitzt. Cellulose ist in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden und ist daher hydrophil. Das Polymer ist jedoch nicht wasserlöslich. Durch die lineare Struktur der Polymerstränge können sich die Stränge aneinander ausrichten und über Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals Kräfte teilkristalline Strukturen bilden (Abb. 13) [Ross *et al.*, 1991]

Cellulosefasern wie sie von *Gluconacetobacter xylinus* produziert werden sind etwa 100 mal dünner als pflanzliche Cellulosefasern. Darüber hinaus ist bakterielle Cellulose im Vergleich zu Cellulose aus anderen Quellen hochkristallin. Abhängig vom Produktionsverfahren beträgt der Anteil der kristallinen Regionen der Cellulose zwischen 80 - 90 % [Czaja *et al.*, 2004; Mikkelsen *et al.*, 2009]. Das Molekulgewicht eines Polymerstrangs wurde mit  $192 \cdot 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  bestimmt. Daraus ergibt sich ein Polymerisationsgrad von etwa 10000 [Matsumoto *et al.*, 2001]. Der Cellulosepellikel, der von *Gluconacetobacter xylinus* produziert wird, wird häufig als Hydrogel bezeichnet. Etwa 99 % des Feuchtgewichts macht Wasser aus [Kramer *et al.*, 2006]. Die restliche Fraktion von etwa 1 % besteht aus den Cellulosefasern. Wird dem Pellikel unter dem Erhalt der Struktur das Wasser entzogen entsteht ein Aerogel [Liebner *et al.*, 2010]. Dennoch sind die Cellulosefasern für die

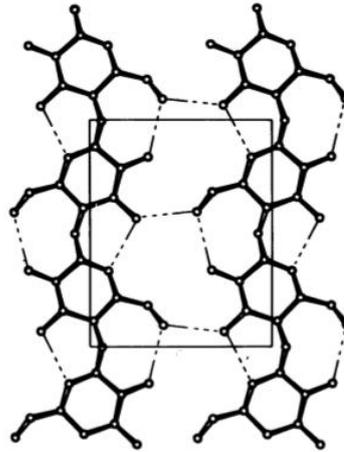


Abbildung 13: Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Cellulosesträngen [Ross *et al.*, 1991].

erstaunliche Festigkeit des Pellikels verantwortlich [Bäckdahl *et al.*, 2005]. Das Material wird sogar als Meniskusersatz untersucht [Bodin *et al.*, 2007]. Die Belastung beim Bruch bei Zugversuchen wurde mit  $0,33 \text{ MPa}$  bestimmt und das Modulus mit  $8,25 \text{ MPa}$  [Bäckdahl *et al.*, 2008]. Ein möglicher Nachteil ist die Elastizität. Selbst bei geringer Verformung wurde kein lineares elastisches Verhalten beobachtet [Bäckdahl *et al.*, 2006]. Schließlich ist Cellulose für ein Biopolymer erstaunlich temperaturstabil und übertrifft sogar viele synthetische Polymere. Bakterielle Cellulose wird erst bei über  $300^\circ\text{C}$  thermisch zersetzt [George *et al.*, 2005]. Diese Eigenschaft erlaubt eine sichere Dampfsterilisation und sogar eine Heißluftsterilisation.

### 3.3.4 Herstellung von bakterieller Cellulose

*Gluconacetobacter xylinus* produziert einen homogenen Pellikel, wenn während der Produktion keine mechanische Belastung auftritt. Aus diesem Grund ist die Standardmethode der Kultivierung eine statische Oberflächenkultur, wobei der Pellikel an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase produziert wird. Diese Kultivierungsmethode ist seit mindestens 4000 v.Ch. bekannt [Deppenmeier *et al.*, 2002]. In der Essigherstellung entsteht ein Pellikel an der Kulturoberfläche, der später verworfen wird. Der Pellikel, der sich auf einer "Kombuchakultur" bildet, wurde von Brown vor über 120 Jahren (1886) als Cellulose identifiziert. Kombucha, ebenfalls bekannt als Teepilz, ist eine Mischkultur von einigen Essigsäurebakterien, darunter *Gluconacetobacter xylinus*, und Hefen. Gesüßter Tee wird mit einem Pellikel einer früheren Kultur angeimpft. Nach einigen Tagen wird der neu

produzierte Pellicel verworfen und der Tee kann konsumiert werden.

Da die vorteilhaften Eigenschaften bakterieller Cellulose in der Regel nur im nativen Zustand vorhanden sind, muss die Formgebung des Pellicels weitgehend während der Kultivierung erfolgen. Unter Berücksichtigung der beschriebenen Voraussetzungen hinsichtlich der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, wurden mehrere Verfahren entwickelt, um Cellulose in definierten Formen herzustellen.

Im Allgemeinen lassen sich Herstellungsprozesse unterscheiden, bei denen Sauerstoff homogen im Medium verfügbar ist und Prozesse mit einer definierten Flüssig-Gas-Grenzschicht. Die traditionelle statische Oberflächenkultivierung wurde als zu ineffizient für eine Produktion im großen Maßstab betrachtet [Chao *et al.*, 2001]. Um die Raum-Zeit Ausbeute zu erhöhen wurde versucht den Leistungseintrag zu erhöhen. Findet ein Energieeintrag in das Kulturmedium und damit auf die Cellulose statt, wird bakterielle Cellulose in der Regel in Form eines Pellets produziert. Czaja *et al.* (2004) beschreiben hierzu eine Kultivierung von *Gluconacetobacter xylinus* in Schüttelkolben (Abb. 14).

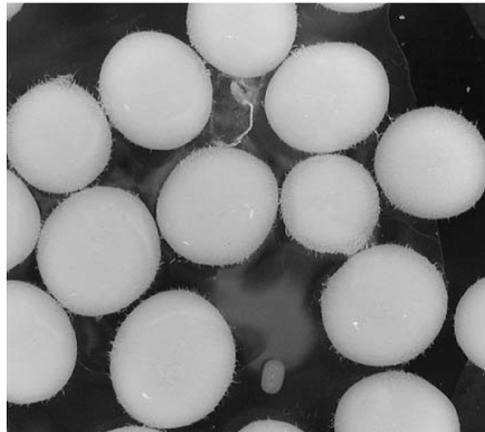


Abbildung 14: Pellets aus bakterieller Cellulose, die durch eine Suspensionskultur in Schüttelkolben produziert wurden [Czaja *et al.*, 2004].

Der Prozess wurde auf Rührkesselreaktoren im Satz- und Zulaufverfahren übertragen [Bae und Shoda, 2004; Bae und Shoda, 2005]. Dabei hängt die Größe der entstehenden Pellets von den auftretenden Scherkräften ab. Durch die relativ hohen Scherkräfte, die in Rührkesselreaktoren auftreten können, entstehen sehr kleine Aggregate von Cellulose, die die Viskosität des Mediums erhöhen. Chao *et al.* (2001) setzten einen Mammutschlaufenreaktor zur Produktion von Cellulosepellets bei geringen Scherkräften ein.

Wie bereits beschrieben können alle Arten der Celluloseproduktion, bei denen Sauerstoff homogen im Medium verteilt ist, das Auftreten von *Cel<sup>-</sup>* Mutanten fördern [Krystyno-

wicz *et al.*, 2002]. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Verfahren entwickelt, um die statische Oberflächenkultivierung von *Gluconacetobacter xylinus* zu verbessern. Sakairi *et al.* (1998) konstruierten ein Gerät, das Cellulose kontinuierlich aus einem flachen Kulturgefäß entfernt (Abb. 15). Entnommene Cellulose wird über eine Reihe von Rollen und eine Waschlösung auf eine Aufnahmerolle transportiert.

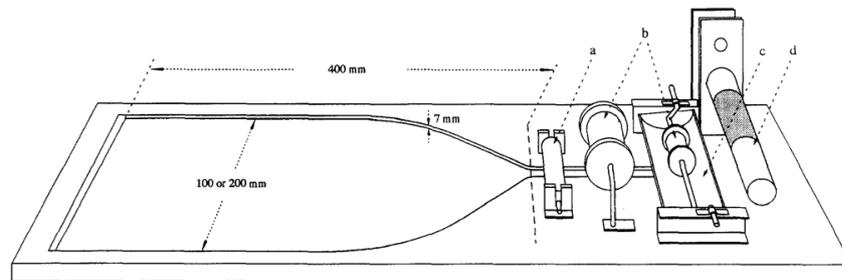


Abbildung 15: Kontinuierliche Oberflächenkultivierung zur Celluloseproduktion [Sakairi *et al.*, 1998]. Cellulosepellicle entstehen in einer flachen Vertiefung und werden über Rollen aus dem Gefäß transportiert.

Kralisch *et al.* (2010) entwickelten eine vergleichbares Konzept in größerem Maßstab (Abb. 16). In einem langen Tank wird Cellulose in einer Oberflächenkultur produziert. Sobald der Pellicle eine hinreichende Stabilität erreicht hat, wird die Cellulose an einem Ende des Tanks kontinuierlich durch ein Förderband entnommen und durch Reinigungs- und Waschbäder transportiert. Dabei wird die Cellulose mit einer so langsamen Geschwindigkeit entfernt, dass sich der Pellicle kontinuierlich neu bildet.

Die bisher vorgestellten Methoden beruhen darauf, die Effizienz der Celluloseproduktion durch eine teilweise kontinuierliche Produktion zu verbessern. Ein weiterer Ansatz ist die Erhöhung der Oberfläche, die zur Produktion des Pellicle zur Verfügung steht. Dies wurde durch den Einsatz eines Konzepts aus der Abwasserbehandlung erreicht. Krystynowicz *et al.* (2002) und Mormino und Bungay (2003) setzten einen Tauchtropfkörper ein. Cellulose wird hierbei auf den Scheiben produziert (Abb. 17).

Ein sehr ungewöhnliches Konzept wurde von Hornung *et al.* (2007) entwickelt. Der Cellulosepellicle wird auf einer festen, undurchlässigen Auflage produziert. Das Kulturmedium wird zusammen mit dem Sauerstoff über die Oberfläche, in Form eines Aerosols, bereitgestellt (Abb. 18).

Die bisher beschriebenen Verfahren verfolgen weitgehend das Ziel, Cellulose in großem Maßstab herzustellen.



Abbildung 16: "Horizontal Lift Reactor"(Holir) [Kralisch *et al.*, 2010]. Cellulosepellikel werden kontinuierlich mit einem Förderband aus einem langgestreckten Glastank gefördert



Abbildung 17: Cellulosescheiben aus einem Tauchtropfkörper [Krystynowicz *et al.*, 2002].

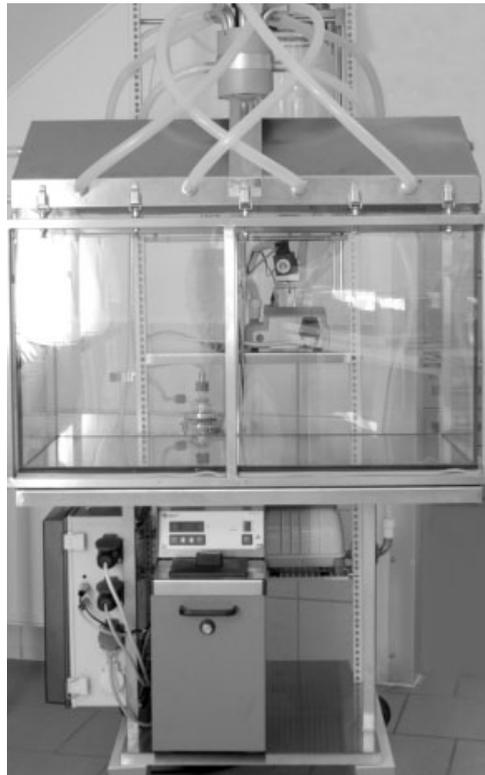


Abbildung 18: Aerosol Bioreaktor [Hornung *et al.*, 2007]. Der Pellikel entsteht auf dem Boden der Glaskammer. Das Kulturmedium wird als Aerosol über die Oberfläche bereitgestellt.

Es wurden ebenfalls bereits Verfahren entwickelt, die in der Lage sind, bakterielle Cellulose in bestimmten Formen zu produzieren. Von besonders großem Interesse ist die Herstellung von Röhren für medizinische Anwendungen. Ein frühes japanisches Patent von Yamana-ka (1996) beschreibt das Einbringen einer Form in die Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase (Abb. 19). Da der Querschnitt der produzierten Cellulose der Grenzschicht entspricht, ist es möglich mit dieser Methode Röhren verschiedener Geometrie herzustellen. Ein Nachteil dieser Methode ist die sehr lange Herstellungszeit, da die Länge der Röhre der Höhe des Pellicels entspricht. Zusätzlich besteht die Gefahr der Instabilität der Röhre, da die Schichten des Pellicels nicht radial zur Achse der Röhre verlaufen.

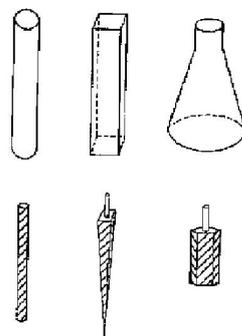


Abbildung 19: Herstellung von definierten Formen von bakterieller Cellulose durch das Einbringen von Formen an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase [Yamanaka, 1996; JP000008126697A]. Kulturgefäße (obere Reihe) definieren den äußeren Umfang des Pellicels und Formkörper (untere Reihe) die Form einer Öffnung des Pellicels.

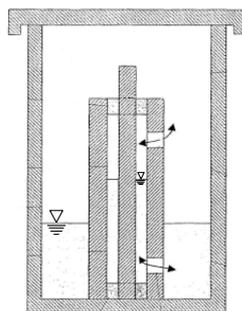


Abbildung 20: Herstellung von Röhren aus bakterieller Cellulose in einem durch zwei Glasröhren definierten Zwischenraum [US 2003/0013163 A1]. Die Gasversorgung findet über die Oberfläche statt und Kulturmedium wird durch die untere Öffnung der äußeren Röhre bereitgestellt.

Das Verfahren wurde weiterentwickelt von Klemm *et al.* (2003). Zwei Glasröhren definieren

einen Zwischenraum, in dem Cellulose produziert wird. Über zwei Öffnungen erfolgt die Versorgung mit Sauerstoff und Nährlösung. Bei diesem Verfahren entspricht ebenfalls die Länge der produzierten Röhre der Höhe des Pellikels. Die Schichten des Pellikels verlaufen horizontal.

Bodin *et al.* (2006) entwickelten ein Produktionsverfahren, das die speziellen Eigenschaften von Silikon ausnutzt. Ein Silikon Schlauch wird als Lösungs-Diffusions-Membran genutzt um Sauerstoff in das Kulturmedium einzubringen (Abb. 21). Die äußere Form des Schlauchs definiert dabei die Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase, so dass *Gluconacetobacter xylinus* eine Celluloseröhre um den Schlauch produziert. Im Vergleich zu dem Verfahren von Yamanaka (1996) wurde die benötigte Kultivierungsdauer reduziert, da die Höhe des Pellikels nur der Wandstärke der Röhre entspricht. Außerdem sind die Schichten des Pellikels radial angeordnet, wodurch wahrscheinlich ein höherer Berstdruck der Celluloseröhren erreicht wird.

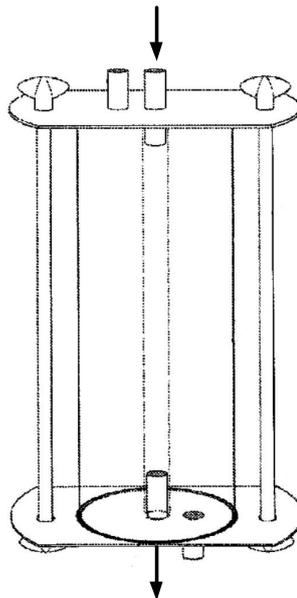


Abbildung 21: Silikonröhre in einer mit Kulturmedium mit *Gluconacetobacter xylinus* gefüllten Glasröhre [Bodin *et al.*, 2010; US020100042197A1]. Die Gasphase wird über die Silikonröhre bereitgestellt (Pfeile). Es entsteht eine Celluloseröhre um die Silikonröhre.

Schließlich wurde auch das Prinzip der "verlorenen Form" auf die Celluloseproduktion angewandt. Ein Beispiel ist der Einsatz von Paraffinpartikeln um die Porosität der bakteriellen Cellulose für Anwendungen in der Zellkultur zu erhöhen. Bäckdahl *et al.* (2008) entwickelten basierend auf der Methode von Bodin *et al.* (2006) ein Verfahren, bei dem die Paraffinpartikel um den Silikon Schlauch eingebracht werden. Während der Synthese

des Pellikels werden die Partikel in das Material integriert. Nach der Produktion der Cellulose wird das Paraffin durch eine Hitzebehandlung und Lösungsmittel aus der Cellulose entfernt [Bäckdahl *et al.*, 2008]. Das Negativ der Paraffinpartikel verbleibt dabei in der Cellulose und bildet Poren.

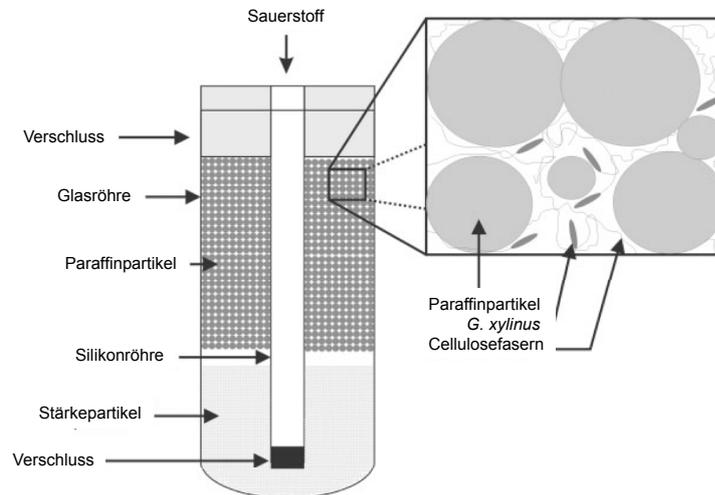


Abbildung 22: Paraffin Partikel werden während der Synthese in die Cellulose integriert [Bäckdahl *et al.*, 2008]. Nach der Synthese werden die Partikel entfernt und bleibt eine poröse Cellulosestruktur.

## 3.4 Biofilme

### 3.4.1 Biologie

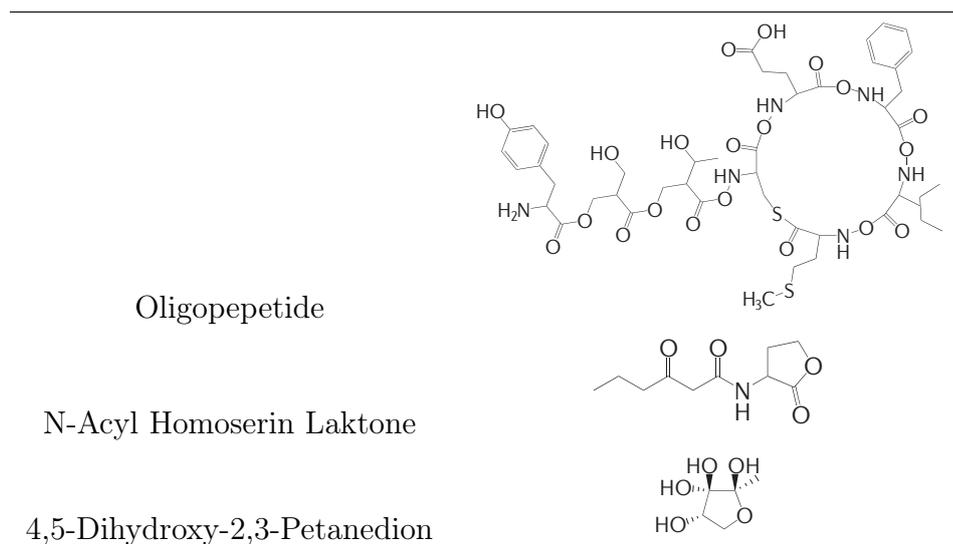
Biofilme sind nicht eindeutig definiert. Der Begriff beschreibt in der Regel Aggregate von Mikroorganismen, die in eine Matrix eingeschlossen sind. Häufig treten sie an Phasengrenzflächen wie flüssig-gas oder flüssig-fest auf [Flemming und Wingender, 2010]. Ein hoher Anteil von Mikroorganismen sind in der Natur in Biofilmen organisiert. Dabei beträgt der Anteil an Biomasse oft nur etwa 10 % des Trockengewichts. Den Hauptanteil stellt die extrazelluläre Matrix dar. Die Matrix besteht aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die von den Mikroorganismen produziert und sekretiert werden. Die EPS umfassen Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und andere Biopolymere. Die Struktur von Biofilmen ist in der Regel heterogen. Die Morphologie wird von den Umweltbedingungen, wie auftretenden Scherkräften und Nährstoffen und der Zusammensetzung der Gemeinschaft an Mikroorganismen beeinflusst. Tritt nur geringe Strömung

auf, bilden Biofilme oft zusammenhängende Einheiten. Unter starker Strömung bilden sich häufig Filamente aus, die sich in der Strömung bewegen [Battin *et al.*, 2007]. Ebenfalls typisch sind pilzartige Strukturen, die die Oberfläche des Biofilms erhöhen. Zusätzlich enthalten Biofilme oft Kanäle, die einen teils konvektiven Transport von Nährstoffen erlauben.

Während der Biofilmbildung befinden sich Mikroorganismen in einem anderen metabolischen Zustand als in Phasen, in denen sie beweglich sind. Da die Produktion der Biofilmmatrix Energie und Ressourcen verbraucht, die ansonsten für das Wachstum genutzt werden könnten, ist der Eintritt in die Phase der Biofilmbildung reguliert. Meist ist die Biofilmbildung nur von Vorteil für einzelne Bakterien, wenn eine ausreichend hohe Anzahl an Mikroorganismen vorhanden ist. Sind zu wenige vorhanden, kann eventuell keine zusammenhängender Biofilm erzeugt werden und die einzelnen Zellen verschwenden ihre Ressourcen.

Häufig wird der notwendige Grenzwert, ab dem die Biofilmbildung vorteilhaft ist, mit Hilfe des "quorum sensing" detektiert. Hierfür sekretieren die Bakterien Moleküle, die spezifische Rezeptoren aktivieren, sobald eine Grenzkonzentration überschritten wird. Oft sind die Signalmoleküle spezifisch für eine Spezies. Sie können prinzipiell in drei Klassen unterteilt werden (Tab. 3).

Tabelle 3: Klassen der "quorum sensing" Signalmoleküle [Keller und Surette, 2006].



Die Signale könne kurze Peptide sein, häufig sind es jedoch Produkte des Fettsäuremetabolismus. Weit verbreitet sind N-acyl Homoserin Laktone (AHL), die sich in Kettenlän-

ge und Oxidation unterscheiden. Die dritte Klasse bildet 4,5-Dihydroxy-2,3-Petanedion (Autoinducer-2, AI-2). Hierfür scheint es keine chemische Variation zu geben [Keller und Surette, 2006].

Signalkaskaden, die durch "quorum sensing" ausgelöst werden, können vielfältige Wirkung in der Zelle haben. Es kann eine Enzymaktivität direkt beeinflusst werden, es sind jedoch auch Effekte bis hin zu globaler Genregulation möglich.

### 3.4.2 Stofftransport in Biofilmen

Stofftransport in Biofilmen erfolgt durch Konvektion durch Kanäle oder durch Diffusion durch die Matrix. Häufig ist die Struktur von Biofilmen stark heterogen. Dies erschwert die Beschreibung von Stofftransportvorgängen durch Diffusion und Konvektion. Der Pellikel aus bakterieller Cellulose ist jedoch sehr homogen aufgebaut und enthält keine Kanäle. Aus diesem Grund erfolgt der Stofftransport ausschließlich durch Diffusion.

$$J = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad (19)$$

Gleichung (19) ist das erste Fick'sche Gesetz. Ein Stofffluss ( $J$ ) wird durch einen Konzentrationsgradienten ( $\partial c$ ) über eine Distanz ( $\partial x$ ) hervorgerufen. Spezifisch für den Stoff und die Matrix wird der binäre Diffusionskoeffizient ( $D$ ) eingesetzt. Das erste Fick'sche Gesetz beschreibt eindimensionale Diffusion unter stationären Verhältnissen.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (20)$$

Das zweite Fick'sche Gesetz (Gl. 20) berücksichtigt lokale Konzentrationsänderungen, die durch die Diffusion verursacht werden.

$$D_F = f_D \cdot D_W \quad (21)$$

Der Diffusionskoeffizient für einen Stoff ist abhängig von der Matrix, in der die Diffusion erfolgt. Dies ist in Gleichung (21) beschrieben. Der binäre Diffusionskoeffizient in Wasser ( $D_W$ ) wird durch die relative Diffusivität ( $f_D$ ) mit dem Diffusionskoeffizient im wässrigen Biofilm ( $D_F$ ) in Verbindung gebracht. Da Biofilme in der Regel ein Hindernis für die freie Diffusion darstellen, nimmt die relative Diffusivität meist Werte zwischen 0 und 1 an. Niedrige Werte von  $f_D$  konnten mit einer hohen Biofilmdichte korreliert werden [Horn und Morgenroth, 2005].

Horn und Morgenroth (2005) postulieren, dass die relative Diffusivität basierend auf der Porosität ( $\epsilon$ ) und der Tortuosität ( $\tau$ ) des Biofilms berechnet werden kann (Gl. 22).

$$f_D = \frac{\epsilon}{\tau^2} \quad (22)$$

Wird die Tortuosität als der Kehrwert der Porosität betrachtet, kann die Gleichung weiter vereinfacht werden (Gl. 23).

$$f_D = \epsilon^3 \quad (23)$$

Es sind mehrere Methoden bekannt, um den effektiven binären Diffusionskoeffizienten ( $D_F$ ) in Biofilmen zu bestimmen. Beuling *et al.* (1998) bestimmten den binären Diffusionskoeffizienten in Wasser mittels NMR. Für  $f_D$  wurden Werte von 0,59 - 0,89 beobachtet.

Eine weitere Methode um lokale binäre Diffusionskoeffizienten zu bestimmen ist "fluorescence recovery after photobleaching" (FRAP) [Lubelski und Klafter, 2008]. Mit Hilfe von FRAP ist es sogar möglich, die Diffusion dreidimensional zu verfolgen. Beobachtete Stoffe müssen jedoch mit einem Fluorophor markiert werden. Konzentrationsprofile können direkt durch Mikroelektroden gemessen werden. Häufig wird diese Methode für Sauerstoff angewandt. Die Methode ist jedoch anfällig für Konzentrationsgrenzschichten (Cbl) an den Biofilmoberflächen, da hier der Diffusionskoeffizient dem in Wasser ( $D_W$ ) entspricht [Horn und Morgenroth, 2005].

Eine oft eingesetzte Methode zur Bestimmung der Diffusionskonstante ist eine Diffusionszelle (Abb. 23). Zwei Kammern werden durch einen Biofilm bekannter Dicke getrennt. Durch unterschiedliche Konzentrationen eines Stoffes in den Kammern wird ein Gradient erzeugt. Die Diffusionskonstante kann aus der Konzentrationsänderung in den Kammern berechnet werden, da jede Konzentrationsänderung durch einen Fluss über den Biofilm verursacht wurde.

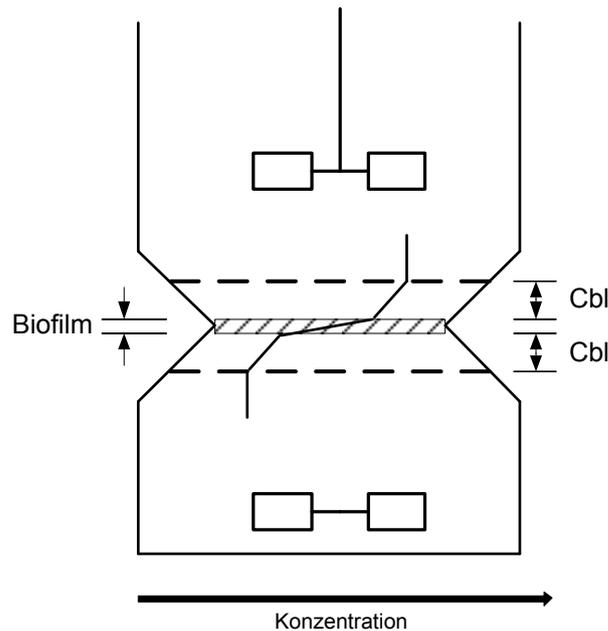


Abbildung 23: Diffusionskammer. Ein Biofilm bekannter Dicke trennt die Kammern.

## 3.5 Medizinische Voraussetzungen

### 3.5.1 Biokompatibilität

Es existiert keine allgemein gültige Bedingung für Biokompatibilität, da verschiedene Anwendungen spezifische Anforderungen an ein Material stellen. Williams (1999) definiert Biokompatibilität daher als "die Fähigkeit eines Materials eine angemessenen Reaktion in einer spezifischen Anwendung auszulösen". Für einige Anwendungen bedeutet dies, dass das Material so inert wie möglich sein soll. Bakterielle Cellulose eignet sich jedoch wahrscheinlich vor allem als Weichgewebeersatz. Hierfür ist eine Integration des Materials in das Empfängergewebe erwünscht, wobei keine Entzündung oder Fremdkörperreaktion hervorgerufen werden soll.

Das Netzwerk von Fasern der bakteriellen Cellulose ist visuell sehr ähnlich der Struktur von Kollagen [Bäckdahl *et al.*, 2006]. Zusammen mit der Hydrathülle kann dies für einige der günstigen Eigenschaften der bakteriellen Cellulose verantwortlich sein. Helenius *et al.* (2006) implantierten bakterielle Cellulose subkutan in Ratten für bis zu 12 Wochen. Es wurde keine Fremdkörperreaktion, wie die Bildung einer Kapsel beobachtet und es trat keine Entzündungsreaktion auf. Das Material wurde von Fibroblasten besiedelt und in das umgebende Gewebe integriert. Bakterielle Cellulose wurde ebenfalls als Interponat in die Halsschlagader (*Arteria carotis*) von Schweinen eingesetzt, wo das Material in Kon-

takt mit Blut war [Wippermann *et al.*, 2009]. Die Autoren berichteten, dass nach drei Monaten 87,5 % der Interponate für den Blutfluss durchgängig waren. Es wurden sogar erste Tests an Menschen durchgeführt. Czaja *et al.* (2006) setzten bakterielle Cellulose als Wundaufflage bei Brandwunden ein. Bakterielle Cellulose wird jedoch nicht nur für den Weichgewebeersatz untersucht. Svensson *et al.* (2005) testeten das Material als Knorpelersatz und Bodin *et al.* (2007) untersuchen bakterielle Cellulose als Meniskusimplantat. Bakterielle Cellulose wurde in einer Vielzahl von Anwendungen untersucht und häufig für geeignet befunden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass bakterielle Cellulose in vielen Anwendungen biokompatibel ist.

### 3.5.2 Blutkompatibilität

Bakterielle Cellulose wird hinsichtlich vieler Anwendungen in der Medizin untersucht. Bei vielen Anwendungen steht bakterielle Cellulose dabei in Kontakt mit Blut. Einer der wichtigen Faktoren, die hierfür berücksichtigt werden müssen, ist die Aktivierung des Immunsystems. Besonders das angeborene Immunsystem kann sehr schnell reagieren und reagiert in allen Menschen ähnlich. Das angeborene Immunsystem erkennt definierte Signale, die mit pathogenen Organismen in Verbindung gebracht werden. Ein wichtiger Effektor des angeborenen Immunsystems ist das Komplement System.

Das Komplementsystem wird von drei Signalkaskaden aktiviert (Abb. 24). Die Signalkaskaden arbeiten häufig über Proteasen. Der klassische Weg ist abhängig von C1 und wird von speziellen Antikörperkomplexen aktiviert, die an die Oberfläche von Pathogenen binden. Ein zweiter Weg, der Lektin-Weg, geht aus von Mannan-bindendem Lektin (MBL), das an spezielle Glykosylierungsmuster von Pathogenen bindet. Die Aktivierung wird über MBL assoziierte Serine Proteasen (MASP) vermittelt. Beide Wege führen zur Spaltung von C4 und C2, wodurch die C3 und C5 Konvertasen gebildet werden. Ein alternativer Weg wird durch die Bindung von C3b an die Oberfläche von Bakterien aktiviert. Dieser Weg ist Teil einer Aktivierungsschleife, da C3b ein Produkt der C3 Konvertase ist und für die Opsonisierung (Markierung) von Pathogenen verantwortlich ist. Es liegt jederzeit eine geringe Aktivierung dieses Weges vor, da C3 spontan hydrolysieren kann und so C3b entsteht. Die anderen Produkte der Spaltung der Konvertasen C3 und C5 sind die Faktoren C3a und C5a, die eine Entzündungsreaktion vermitteln, und C5b-C9 die den Membranangriffskomplex darstellen [Kemper und Atkinson, 2007; Murphy *et al.*, 2007]. Für Biomaterialien ist besonders eine Aktivierung von C3a schädlich, da hierdurch eine lang anhaltende Entzündungsreaktion hervorgerufen werden kann.

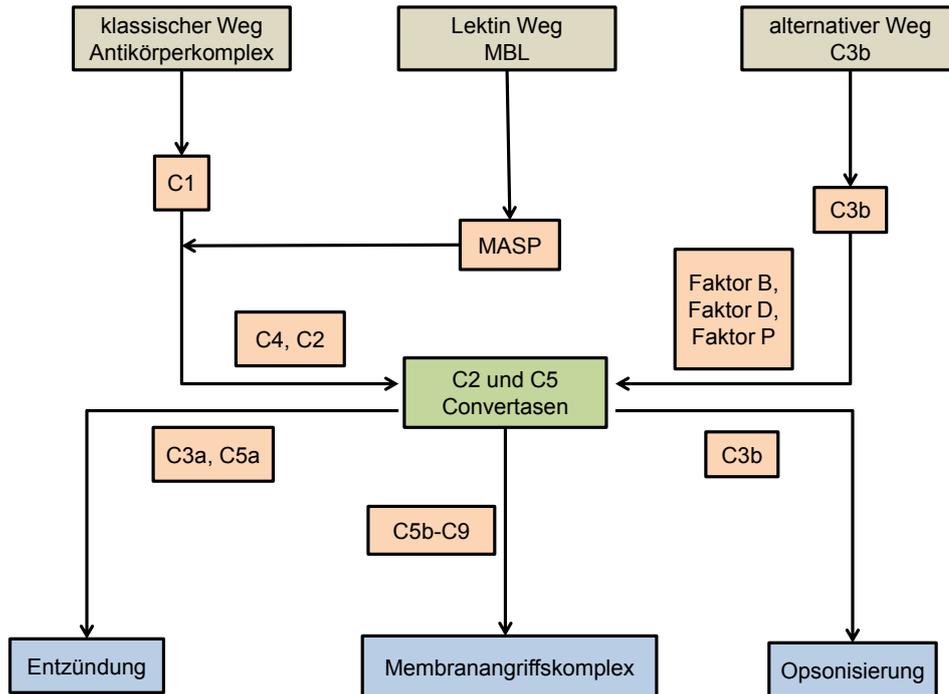


Abbildung 24: Wege der Komplement Aktivierung [Kemper und Atkinson, 2007].

Für eine gute Blutzirkulation ist es erforderlich, dass das Blut eine geringe Viskosität hat und frei fließt. Wird das Blutgefäßsystem jedoch verletzt ist es für den Körper wichtig den Blutverlust so schnell wie möglich zu stoppen, indem der Blutfluss zum Stillstand gebracht wird. Das Gleichgewicht zwischen diesen Zuständen wird als Hämostase bezeichnet. Hämostase wird durch das Zusammenspiel von Blutgefäßen, Plättchen und Koagulationsfaktoren erreicht.

Abbildung 25 zeigt die Faktoren der Gerinnungskaskade. Es gibt zwei Wege, die zur Bildung eines Fibrinpflöpsens führen. Ein Weg wird durch den Kontakt mit "tissue factor"(TF) induziert. Dies tritt auf, wenn Gewebe verletzt wird und Zellen, wie Fibroblasten, die TF präsentieren in Kontakt mit aktivierten Faktor VIIa kommen. Faktor VIIa aktiviert Faktor IX und Faktor X. Faktor Xa bildet zusammen mit Faktor Va die Prothrombinase, die Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) umsetzt. Schließlich katalysiert Thrombin die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen. Faktor XIII verbindet die Fibrinfasern zusätzlich kovalent mit einander. Der zweite Weg wird durch den Kontakt mit Kollagen ausgelöst. Kollagen bildet einen Teil der Matrix von Blutgefäßen. Blutkontakt besteht nur, wenn das Endothel verletzt wird. Dieser Kontaktweg beginnt mit der Ausbildung eines Komplexes von hochmolekularem Kininogen (HK) Prokallikrein und

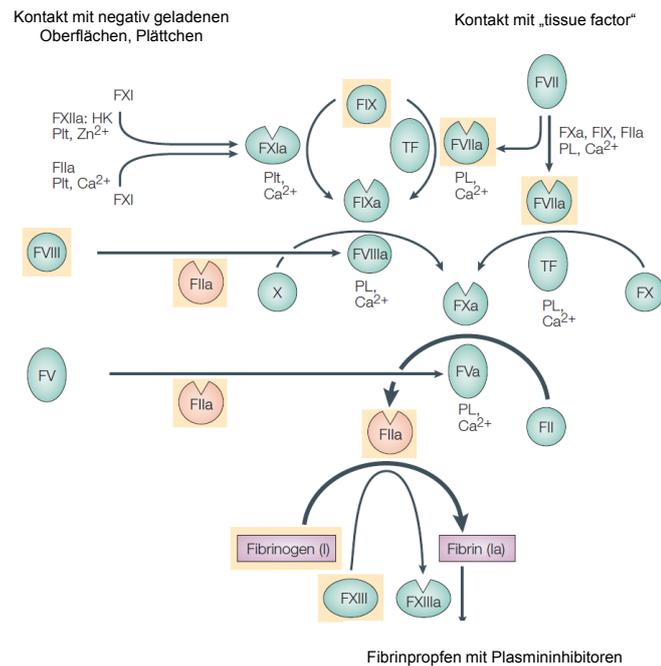


Abbildung 25: Die Blutgerinnungskaskade [Bishop und Lawson, 2004]. Pfeile zeigen die Umwandlung in die jeweils aktive Form des Faktors.

Faktor XII auf Kollagen. Faktor XII wird hierdurch aktiviert und bildet Faktor XI. Hierdurch wird der TF-abhängige Weg der Gerinnungskaskade aktiviert.

## 4 Methoden

### 4.1 Lösungen

PBS ("Phosphate-buffered saline") 10 fach.

Tabelle 4: Zusammensetzung von PBS.

Substanz	Konzentration	
	[mol L <sup>-1</sup> ]	[g L <sup>-1</sup> ]
NaCl	1,37	80
KCl	27 · 10 <sup>-3</sup>	2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	43 · 10 <sup>-3</sup>	15,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14 · 10 <sup>-3</sup>	2

SDS Probenpuffer 2 fach ("Lämli").

Tabelle 5: Zusammensetzung des SDS Probenpuffers.

Substanz	Konzentration
	[g L <sup>-1</sup> ]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,1
SDS	20
Bromphenolblau	0,01
Dithiothreitol	31
Glycerol	2

### 4.2 Medium

Ein Großteil der Versuche wurde mit Schramm und Hestrin (Hestrin und Schramm, 1954) Komplexmedium, das durch 2 mM MgSO<sub>4</sub> (HS<sup>+</sup>) ergänzt wurde, durchgeführt (Tab. 6) [Krystynowicz *et al.*, 2002]. Das Medium wurde durch die Zugabe von HCl auf einen pH von 5,7 eingestellt und durch Autoklavieren sterilisiert. Für feste Agarplatten wurde 15 g L<sup>-1</sup> Agarose vor dem Autoklavieren zugegeben. Das Medium wurde heiß in sterile Polykarbonatplatten gegossen.

Tabelle 6: Zusammensetzung des HS<sup>+</sup> Mediums.

Substanz	Konzentration	
	[mmol l <sup>-1</sup> ]	[g l <sup>-1</sup> ]
Glukose · Monohydrat	0,1	20
Hefeextrakt	-	5
Baktopen	-	5
Natriumdihydrogenphosphat	20	2,7
Zitronensäure · Monohydrat	5,47	1,15
Magnesiumsulfat · Heptahydrat	2,03	0,5

Alle Kultivierungen wurden bei 30°C durchgeführt.

### 4.3 Mikroorganismen

*Gluconacetobacter xylinus* Stamm DSM 2325 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Deutschland) bezogen. Der Stamm entspricht LMG 1518 und ATCC 11142. Die Bakterien wurden aus einer gefriergetrockneten Kultur wiederbelebt. Die Kultur wurde in 1 ml HS<sup>+</sup> für 5 min rehydriert. Mit 900 µl der Suspension wurden 10 ml HS<sup>+</sup> einer statischen Kultur inokuliert. Die verbleibenden 100 µl wurden auf eine HS<sup>+</sup> Platte aufgebracht.

Für Stammkulturen wurden 850 µl der Bakteriensuspension mit 150 µl sterilem Glycerol in einem sterilen Schraubröhrchen vermischt. Die Kultur wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

### 4.4 Stammhaltung

Da für einen Großteil dieser Arbeit keine Stammkultur verfügbar war, wurde *Gluconacetobacter xylinus* in wachsender Kultur gehalten. *Gluconacetobacter xylinus* wurde jede Woche auf HS<sup>+</sup> Agarplatten aufgebracht. Durch einen Verdünnungsausstrich wurden einzelne Kolonien erhalten. Zusätzlich wurden die Zellen in Flüssigkultur erhalten. Sterile Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten (Riplate, Ritter GmbH, Schwabmünchen, Deutschland) wurden mit jeweils 4 ml Medium pro Kavität befüllt. Inokuliert wurde mit Medium

aus einer statischen Oberflächenkultur. Die Mikrotiterplatten wurden mit steriler Aluminiumfolie abgedeckt und statisch inkubiert. Alle Elemente der Stammhaltung wurden in einem Profors Inkubator (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) auf 30 °C temperiert.

## 4.5 Inokulumsherstellung

### 4.5.1 Schüttelkolben

Ein Pellikel aus einer Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten wurde in einen sterilen 500 ml Kolben gegeben und 50 ml HS<sup>+</sup> wurden zugegeben. Um die Mikroorganismen freizusetzen wurde 40 µl sterilfiltrierte Cellulase (Celluclast aus *Trichoderma reesii*, Novozyme, Bagsvaerd, Dänemark) hinzugefügt. Kultivierungen wurden bei 30 °C und 120 min<sup>-1</sup> in einem Schüttelinkubator (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Sauerstoffeintrag in das Medium kann zum Auftreten von *Cel*<sup>-</sup> Mutanten führen. Um sicherzustellen, dass die Kultur von celluloseproduzierenden Organismen dominiert wurde, wurden Proben mit PBS gewaschen um die Cellulase zu entfernen und auf Agarplatten aufgebracht. *Cel*<sup>-</sup> Kolonien wachsen schneller als *Cel*<sup>+</sup> Kolonien und sind glatt und rund.

### 4.5.2 Rührkesselreaktor

Um ausreichende Mengen einer Suspension von *Gluconacetobacter xylinus* herzustellen wurden Versuche im Rührkesselreaktor durchgeführt. Um das Auftreten von *Cel*<sup>-</sup> Mutanten zu verhindern wurde der  $k_{La}$  im Vergleich zur Kultivierung in Schüttelkolben konstant gehalten. Um dies zu erreichen wurde der  $k_{La}$  im Schüttelkolben nach Maier (2002) (Gl. 34) abgeschätzt.

$$k_{La} = 6,67 \cdot 10^{-6} \cdot V_L^{-0,83} \cdot n^{1,16} \cdot d_O^{0,38} \cdot d^{1,92} \quad (24)$$

$V_L$  ist das Füllvolumen in ml,  $n$  die Frequenz in min<sup>-1</sup>,  $d_O$  ist die Exzentrizität in cm und  $d$  der maximale Durchmesser des Kolbens.

Ein 1 L Rührkesselreaktor (Labfors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) wurde mit 1 L HS<sup>+</sup> Medium und 150 µl Antischaum befüllt und autoklaviert. 800 µl sterilfiltrierter Celluclast wurden zugegeben. Der Versuch wurde mit einer Biotrockenmasse von 0,1 g L<sup>-1</sup> inokuliert. Das Inokulum stammte aus einem Versuch in Schüttelkolben. Der Rührkesselreaktor wurde für 24 h bei 30 °C betrieben. Der abgeschätzte  $k_{La}$  betrug 0,01 s<sup>-1</sup>. Um dies zu

erreichen betrug die Gasflussrate  $16,2 \text{ L h}^{-1}$  (0,27 vvm) und Rührer wurde bei  $600 \text{ min}^{-1}$  betrieben.

## 4.6 Membranverfahren

### 4.6.1 Membranmodule: Materialien und Herstellung

Die Membranmodule wurden mit CATIA V5 (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, Frankreich) entworfen.

#### Glasmodul

Tabelle 7: Bestandteile des Glasmoduls.

Teil	Bezeichnung	Hersteller
Flansch	Schliffflansch ohne Vertiefung DN 60	Schott
Glasröhre GL 25 Gewinde	-	Schott
Schraubdeckel	Schraubdeckel PBT, rot GL 25	Schott
Schraubdeckel	Schraubdeckel GL 25, PP, 2 Anschlüsse GL 14	Schott
Klammer	Klammer mit drei Segmenten, Edelstahl	Schott
Polypropyleneinsatz	-	-

Das Glasmodul bestand aus zwei identischen Teilen basierend auf einem Flansch (Tab. 7). Die Dichtung wurde durch Silikonflachdichtungen und eine Edelstahlklammer erreicht. Der Einsatz für das Glasmodul wurde aus Polypropylen (PP) hergestellt. Das Glasmodul verfügt zusätzlich über einen externen Überlauf aus zwei ineinandergreifenden Glasröhren.

#### Polypropylenmodul

Das zylindrische Modul wurde weitgehend aus Polypropylen konstruiert (Tab. 8). Alle Anschlüsse, Schrauben und die Lochplatte waren aus Edelstahl. Die Polykarbonatbdeckung erlaubte eine Lasermessung.

Tabelle 8: Bestandteile des Polypropylenmoduls.

Teil	Bezeichnung	Hersteller
Polypropylen	-	-
Polykarbonatabdeckung	Petrischale	Carl Roth
Edelstahlplatte	Lochplatte	-
Edelstahlrohr	Saugrohr	-
Fitting	Einlass	-

#### 4.6.2 Membranmodule: Zusammenbau

##### Glasmodul

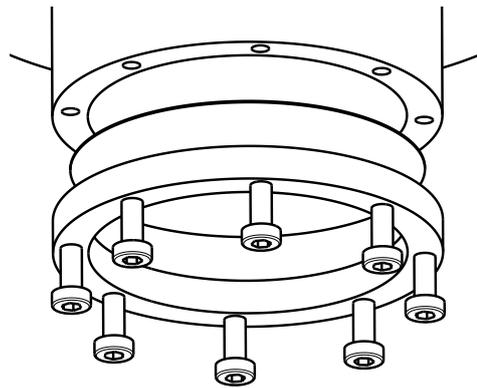


Abbildung 26: Zusammenbau des Einsatzes für das Glasmodul.

Die Polyethersulfonmembran (PES) (Membrana GmbH, Wuppertal, Deutschland) wurde als Scheibe mit einem Durchmesser von 50 *mm* ausgestanzt. Anschließend wurden 3 mm Löcher in der Membranscheibe ausgestanzt um Durchgänge für die Schrauben zu erhalten (Abb. 26). Mit einem Nylonnetz wurde genauso verfahren. Das Nylonnetz wurde unter der Membran platziert. Die Membran wurde durch einen PP Ring mit 8 Schrauben am Einsatz befestigt. Durch Silikon wurde die Membran abgedichtet.

Der Einsatz trocknete mindestens 12 h. Anschließend wurde der Einsatz zwischen die Glasteile des Moduls platziert. Die Abdichtung erfolgte durch Silikonflachdichtungen und eine Edelstahlklammer. Der Auslass des Moduls wurde mit dem Überlauf verbunden.

Vor dem Autoklavieren wurde das Modul mit deionisiertem Wasser befüllt um Schäden an der Membran zu verhindern. Das Wasser wurde kurz vor der Inokulation entleert, um

eine Trocknen der Membran zu verhindern. Zur Inokulation wurde eine Suspension von *Gluconacetobacter xylinus* mit einer Kanüle auf die Membran aufgebracht. Während des Betriebs wurde der Flüssigkeitsspiegel im Modul so eingestellt, dass er sich 1 mm über der Membran befand. Hierdurch wurde eine homogene Verteilung von *Gluconacetobacter xylinus* auf der Membranoberfläche sichergestellt.

### Polypropylenmodul

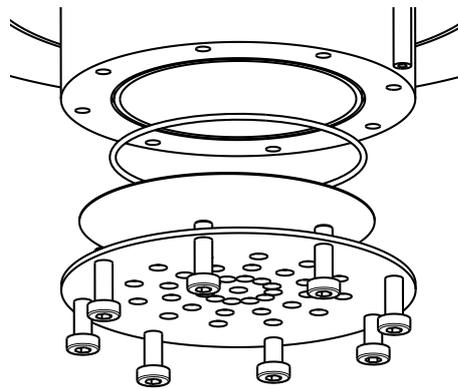


Abbildung 27: Zusammenbau des oberen Körpers des Polypropylenmoduls.

Die Polyethersulfonmembran (Membrana GmbH, Wuppertal, Deutschland) wurde als Scheibe mit einem Durchmesser von 50 mm ausgestanzt. Ein Nylonnetz wurde ebenfalls als Scheiben mit einem Durchmesser von 50 mm ausgestanzt. Die Membran wurde mit der Rollseite nach unten auf einer perforierten Edelstahlplatte platziert, die als Unterstützung dient. Das Nylonnetz wurde zwischen der Membran und der Stahlplatte platziert, um eine gleichmäßige Verteilung des Mediums auf die Membran zu gewährleisten. Dieser Aufbau wurde durch 8 M3 Schrauben am oberen Teil des Membranmoduls befestigt (Abb. 27). Die Dichtung zwischen der Membran und dem Modul wurde durch Silikon sichergestellt. Der aufgebaute obere Teil des Moduls wurde durch 8 M3 Schrauben auf dem unteren Teil befestigt. Die Abdichtung wurde durch Silikon sichergestellt. Das Modul trocknete mindestens 12 h. Anschließend wurde das Modul mit deionisiertem Wasser befüllt, um eine Schädigung der Membran während des Autoklavierens zu verhindern. Das Wasser wurde kurz vor der Inokulation entfernt, um eine Trocknen der Membran zu verhindern. Anschließend wurde die sterile Polykarbonatabdeckung platziert. Das Modul wurde durch das Aufbringen einer Suspension von *Gluconacetobacter xylinus* auf die Membranoberfläche inokuliert. Während des Betriebs wurde der Flüssigkeitsspiegel im Modul durch die

Absaugung so eingestellt, dass er sich 1 mm über der Membran befand. Hierdurch wurde eine homogene Verteilung von *Gluconacetobacter xylinus* auf der Membranoberfläche sichergestellt.

### Bypassgefäße

Das Konzept der Celluloseproduktion in Membranmodulen sah vor, dass die Flüssigphase über ein Bypassgefäß zirkuliert wurde. In dem Bypassgefäß erfolgte die Durchmischung des Kulturmediums, die Probenahme, die Erfassung des pH und gegebenenfalls die Zufuhr von Korrekturmitteln zur pH-Kontrolle. Hierfür sollte ein Standard Bioreaktor eingesetzt werden.

Für die Charakterisierung des Prozesses ist es von Vorteil, wenn deutliche Konzentrationsänderungen der Metabolite in kurzer Zeit erfasst werden können. Da Reaktionen ausschließlich im Pellikel erfolgen ist hierfür das Verhältnis der Membranoberfläche zum Gesamtvolumen entscheidend. Um das Gesamtvolumen zu reduzieren wurde ein Bypassgefäß mit 0,1 L Arbeitsvolumen konstruiert (Abb. 28).

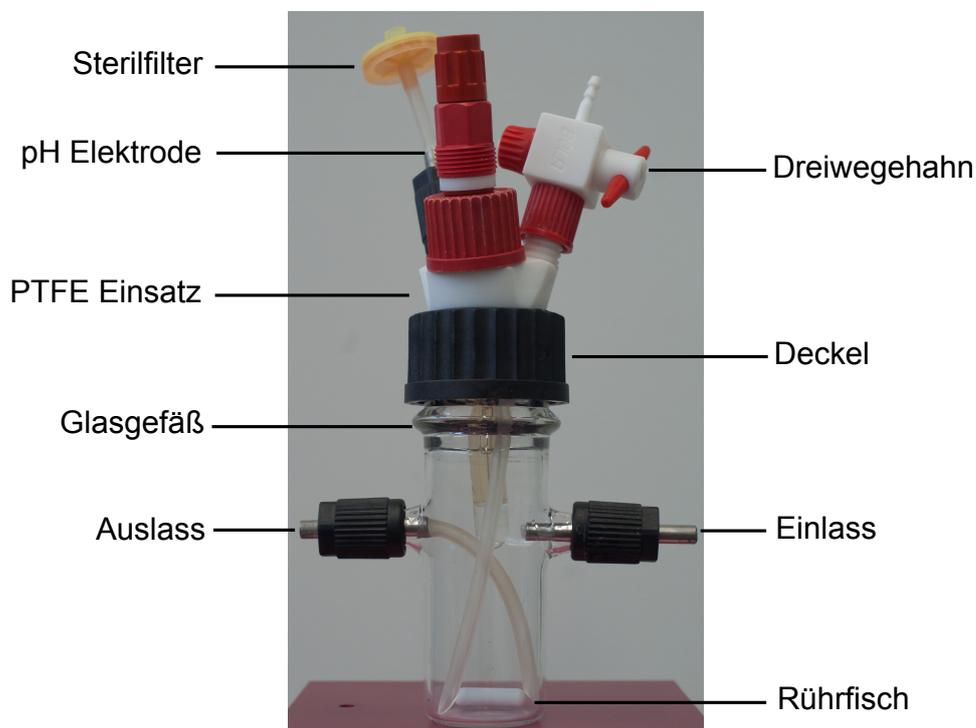


Abbildung 28: 0,1 L Bypassgefäß mit Anbauten.

Das Gefäß basiert auf einem Glaskörper mit zwei Anschlüssen um das Medium über das Membranmodul zu zirkulieren. Die Durchmischung erfolgte durch einen magnetischen An-

trieb. Gas wurde nicht in das Medium eingetragen. Im Schraubdeckel des Gefäßes wurde ein PTFE Einsatz mit drei Anschlüssen integriert. Diese wurden für einen Sterilfilter zum Druckausgleich, eine pH Elektrode und einen Dreiwegehahn (Discofix, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zur Probennahme genutzt. Zur steilen Probenahme wurde der Hahn mit Ethanol gespült.

Das Polypropylenmodul wurde ebenfalls an einen 42 L Rührkesselreaktor (Techfors, Infors AG, Switzerland) angeschlossen um unter anderem die Möglichkeit des Anschlusses eines Membranmoduls an Standard Bioreaktoren zu testen.

#### 4.6.3 Versuchsaufbau

Im Glasmodul wurde der Flüssigkeitsspiegel durch die Auslassröhre im externen Überlauf eingestellt. Von hier floss das Medium frei in das Bypassgefäß. Aus diesem Grund war es erforderlich, dass hier ein ausreichendes Gefälle bestand. Das Bypassgefäß wurde magnetisch gerührt. Eine peristaltische Pumpe (HS FIXO, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) transportierte das Medium aus dem Bypassgefäß in das Glasmodul.

Das Polypropylenmodul verfügte über keinen passiven Überlauf. Das Modul wurde über zwei peristaltische Pumpen mit dem Bypassgefäß (HS FIXO, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz; 205 U, Watson-Marlow Pumps GmbH, Rommerskirchen/Anstel, Deutschland) verbunden. Eine Pumpe wurde mit dem Einlass verbunden; die andere Pumpe mit der Absaugung. Die absaugende Pumpe wurde mit einer höheren Flussrate betrieben als die zuführende Pumpe um den Mediumspiegel konstant zu halten.

#### 4.6.4 Satzverfahren

Für Versuche im Satzverfahren wurde der gesamte Aufbau in einem Inkubator (Profors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) betrieben. Die Temperatur wurde auf 30 °C kontrolliert und mit der Software fed-batch pro (DASGIP AG, Jülich, Deutschland) überwacht.

Der pH wurde durch eine Glaselektrode (Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland) gemessen.

Die Daten eines Lasertriangulationssensor zur Messung der Celluloseschichthöhe wurden mit der LK-Navigator Software (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) ausgewertet.

#### 4.6.5 Zulaufverfahren

Für das Zulaufverfahren wurde der Versuchsaufbau des Satzverfahrens um eine peristaltische Pumpe erweitert. Eine  $500 \text{ g L}^{-1}$  Glukoselösung wurde dem Bypassgefäß intermittierend mit einem Intervall von 12 h zugeführt.

#### 4.6.6 Definierte Reaktionsbedingungen

Definierte Reaktionsbedingungen wurden im Satzverfahren durch eine Vergrößerung des Flüssigvolumens im Satzverfahren erreicht. Hierfür wurde ein 42 L Rührkesselreaktor (Techfors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) im Bypass verwendet. Der Versuchsaufbau konnte nicht mehr in einem Inkubator platziert werden. Aus diesem Grund war eine externe Temperaturkontrolle des Membranmoduls erforderlich. Dies wurde durch ein Wasserbad (EH III, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) erreicht. Der Kopfraum des Moduls wurde ebenfalls durch das Wasserbad beheizt um Kondensation auf der PC Abdeckung zu verhindern. Um die Gefahr einer Kontamination gering zu halten wurde der Rührkesselreaktor auf  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  temperiert. Der Rührkesselreaktor wurde mit Sonden für pH,  $\text{pO}_2$ , Schaum, Temperatur und Druck betrieben. Vor der Sterilisation wurde der Reaktor mit  $19 \text{ L HS}^+$  Medium ohne Glukose und  $2 \text{ ml}$  Antischaum befüllt.  $1 \text{ L } 400 \text{ g L}^{-1}$  Glukoselösung wurden nach der Sterilisation zugegeben. Um die Zirkulation des Mediums über das Membranmodul zu ermöglichen wurde das Bodenauslassventil des Reaktors mit dem Einlass des Membranmoduls verbunden. Die Absaugung des Membranmoduls wurde über den Deckel in den Reaktor zurückgeführt. Antischaum 50 % (v/v), 20 % (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und 2 M NaOH wurden ebenfalls über den Deckel bei Bedarf zugeführt. Wichtige Prozessgrößen wurden mit einer Software (Iris, Infors AG, Schweiz) aufgezeichnet und geregelt. Daten des Lasertriangulationssensors wurden durch die LK-Navigator Software (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) auf einem separaten Computer aufgezeichnet.

### 4.7 Reinigung

Der Pellikel wurde mechanisch aus dem Kulturgefäß entfernt und anschließend autoklaviert. Nach George *et al.* (2005) erfolgte die Reinigung mit 0,1 M NaOH bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  für 4 h. Abschließend wurde der Pellikel in deionisiertem Wasser gewaschen (Abb. 29). Um die gereinigten Pellikel lagern zu können, wurden sie abschließend autoklaviert und steril aufbewahrt.



Abbildung 29: Gereinigter Pellikel.

#### 4.8 Lyophilisation



Abbildung 30: Gefriergetrockneter Pellikel.

Für die Gefriertrocknung (Lyophilisation) wurden die Pellikel bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren. Die Lyophilisation erfolgte in einer Laborgefrier- und Trocknungsanlage (Christ Alpha 1-2LD, Martin Christ Gefrier- und Trocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland). Der Gefrier- und Trockner wurde bei  $-60\text{ °C}$  und  $0,003\text{ mbar}$  betrieben, bis die Temperatur stabil war und die Cellulose getrocknet war (Abb. 30). Nach dem Trocknen wurden die Pellikel luftdicht aufbewahrt, um eine erneute Aufnahme von Wasser aus der Atmosphäre zu verhindern.

## 4.9 Quantifizierung des Biofilms

### 4.9.1 Biomasse

Ein großer Anteil der Biomasse von *Gluconacetobacter xylinus* sind in den Pellicel eingebettet und somit einer direkten Messung der optischen Dichte oder Trockenmasse nicht zugänglich. Eine Möglichkeit der Bestimmung der Biomasse ist es, die Zellen aus dem Pellicel freizusetzen. Der Pellicel aus bakterieller Cellulose kann durch eine 1,4-(1,3:1,4)-D-Glucan 4-Glukano-Hydrolase von *Trichoderma reesei* (E.C. 3.2.1.4; Celluclast, Novozyme, Bagsvaerd, Dänemark) hydrolysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Cellulose mechanisch aus dem Kulturgefäß entfernt und mit 0,1 M Natriumacetatpuffer auf pH 5 eingestellt. Es wurde 2 % (v/v) Celluclast zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 50 °C, 500  $\text{min}^{-1}$  für 3 h bis die Cellulose vollständig abgebaut war. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde die  $OD_{660}$  der freigesetzten Zellen bestimmt. Die  $OD_{660}$  wurde mit der Biotrockenmasse (BTM) korreliert (Gl. 25).

$$BTM = 1,04 \cdot OD_{660} \quad (25)$$

Die Korrelation ist spezifisch für das eingesetzte Photometer (Spectronic Genesys 20, Thermo Electron GmbH, Dreieich, Deutschland).

Es sind viele Methoden bekannt, um Biofilme zu quantifizieren [Peeters *et al.*, 2008]. Von besonderem Interesse für diese Arbeit war die Quantifizierung der aktiven Biomasse um die Erfassung der gesamten Biomasse zu ergänzen.

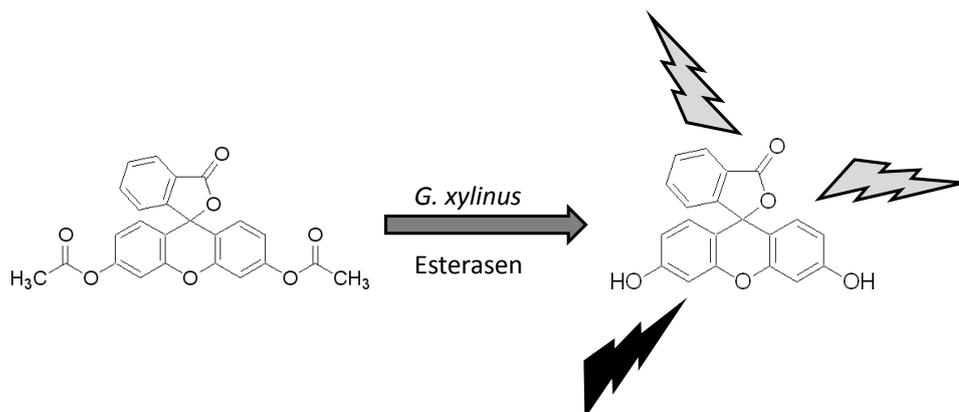


Abbildung 31: Fluoresceindiacetat wird von unspezifischen Esterase aktiver *Gluconacetobacter xylinus* Zellen zu Fluorescein gespalten.

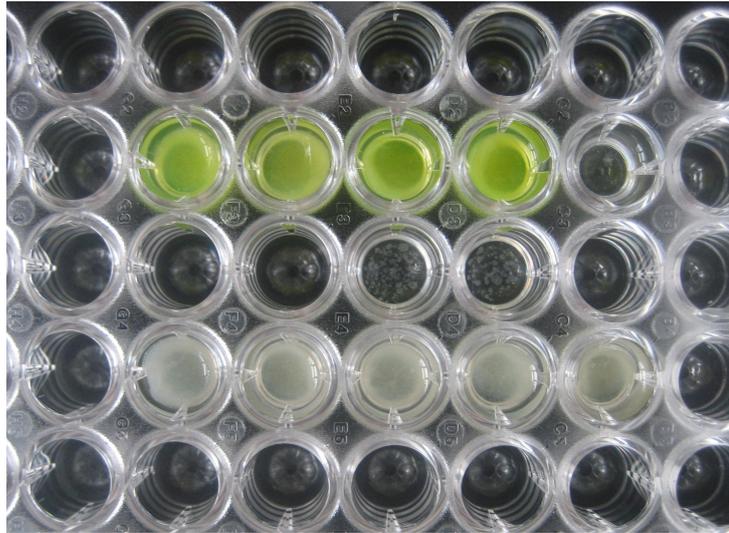


Abbildung 32: Freigesetztes Fluorescein.

Es wurde ein Nachweisverfahren eingesetzt, das auf der Freisetzung von Fluorescein aus Fluoresceindiacetat (FDA) basiert [Peeters *et al.*, 2008]. Das Nachweisverfahren nutzt die metabolische Aktivität der Mikroorganismen. Unspezifische Esterasen spalten die Acetatreste von Fluorescein ab. Das Produkt kann fluorimetrisch nachgewiesen werden (Abb. 31).

Das Nachweisverfahren wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt (Abb. 32). Der Pellikel mit *Gluconacetobacter xylinus* wurde mechanisch aus einer Kavität einer statischen Oberflächenkultivierung im 4 ml Satzverfahren entfernt und in zwei Schritten mit einem MOPS (3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure) Puffer auf pH 7 eingestellt. Fluoresceindiacetat wurde in einer Konzentration von  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  in Aceton bei  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor dem Einsatz wurde die Lösung 1:50 in MOPS verdünnt und 1 ml zum gepufferten Cellulosepellikel gegeben. Proben wurden bei  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $1000 \text{ min}^{-1}$  (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Proben von  $100 \text{ }\mu\text{l}$  wurden alle  $10 \text{ min}$  genommen. Die Reaktion wurde durch Mischen der Proben mit  $100 \text{ }\mu\text{l}$  MOPS Puffer mit 20% (v/v) Glycerol, der auf  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt war, gestoppt. Die Proben wurden durch ein Mikrotiterplattenphotometer (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) quantifiziert. Die Anregungswellenlänge betrug  $485 \text{ nm}$ . Die Emission wurde bei  $518 \text{ nm}$  erfasst.

Abbildung 33 zeigt die Freisetzung von Fluorescein im zeitlichen Verlauf. Durch lineare Regression wurde die Steigung  $a$  der Geraden ermittelt. Es wurde angenommen, dass die Aktivität und damit die Steigung  $a$  mit der Zahl aktiver Bakterien korreliert. Die Steigung wurde mit der *Gluconacetobacter xylinus* Biotrockenmasse korreliert (Gl. 26).

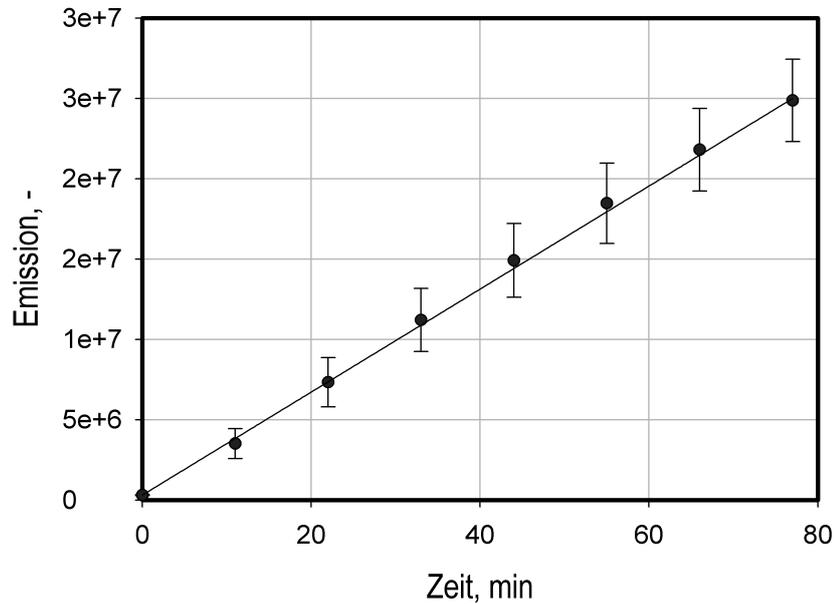


Abbildung 33: Typischer Verlauf der Fluoresceinfreisetzung.

$$BTM = 1,5 \cdot 10^{-2} \cdot a \quad (26)$$

Die Korrelation ist spezifisch für das Mikrotiterplattenphotometer (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz).

#### 4.9.2 Matrix

Die Methode der Erfassung der Pellikelhöhe durch eine Laserabstandsmessung basierte auf der Methode von Okkerse *et al.* (2000). Lasertriangulationssensoren werden häufig in Fertigungsstraßen eingesetzt und sind sehr schnell und genau.

Es wurde ein LK-G82 (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) Laser Triangulations Sensor (LTS) eingesetzt. Der Sensor verfügt über eine maximale Auflösung von  $0,2 \mu m$  und einen Frequenzbereich von 1 Hz bis 50 kHz. Der Messabstand beträgt  $80 mm$  und der Messbereich ist  $\pm 15 mm$ . Der Laser arbeitet bei einer Wellenlänge von  $650 nm$ .

Die Steuerung erfolgte über die LK-Navigator Software (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland).

Die Parameter der Lasermessung wurden über die Software vorgegeben (Tab. 9).

Tabelle 9: Parameter der Lasertriangulation

Parameter	Einstellung
Messmodus	halbtransparentes Objekt
Reflexionsart	diffuse Reflexion
Berechnungsverfahren	1. Spitze
Filter	gleitender Mittelwert (256)
Abtastzyklus	1 <i>ms</i>

## 4.10 Charakterisierung des Cellulosepellikel

### 4.10.1 Rasterelektronenmikroskopie

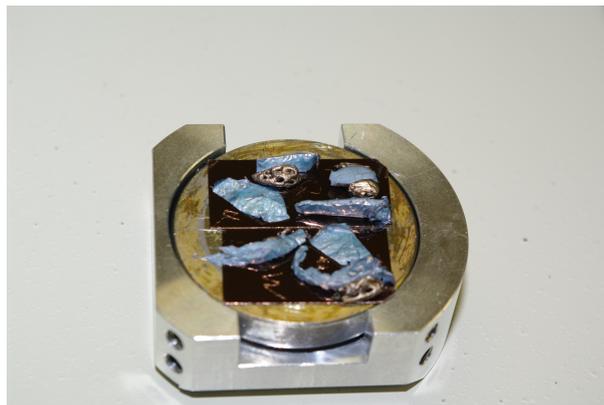


Abbildung 34: Goldbeschichtete Probe auf einem Aluminiumträger.

Da sich die Probenkammer des Elektronenmikroskops im Hochvakuum befindet, müssen alle Proben trocken sein. In den Proben verbleibendes Wasser würde verdampfen und die Probenstruktur schädigen. Aus diesem Grund wurden alle Proben gefriergetrocknet. Querschnitte des Pellikels wurden durch Schneiden mit einem Skalpell erzeugt. Die Proben wurden mit einem Kohlenstoffklebeband auf Aluminiumträgern fixiert (Abb. 34). Falls kein ausreichender Kontakt der Probe zum Träger bestand, wurden Proben zusätzlich mit einer Kohlenstoffpaste unterstützt, um die Ableitung der elektrischen Ladung sicherzustellen.

Um eine Beobachtung durch das Elektronenmikroskop (REM) zu erlauben, müssen Proben leitfähig sein. Da Cellulose nicht leitfähig ist, wurden die Proben durch Kathodenzerstäubung mit Gold beschichtet (MED 020, BAL-TECH, Macclesfield, England). Die Proben wurden unter Argon Atmosphäre in einem Abstand von 5 *cm* zur Kathode beschichtet.

Hierfür wurde die Kammer zunächst bis auf  $1 \cdot 10^{-5}$  mbar evakuiert und anschließend mit Argon geflutet. Durch den Fluss von Argon und die Absaugung der Vakuumpumpe wurde ein Druck von  $5 \cdot 10^{-2}$  mbar während der Beschichtung aufrechterhalten. Die Beschichtung erfolgte bei 40 mA bis eine Goldschicht von 4 nm auf der Probe erreicht wurde. Die hierfür benötigte Zeit wurde durch ein Quarz QSG (BAL- TECH, Macclesfield, England) reguliert.

Es wurde ein Rasterelektronenmikroskop (REM) genutzt (Jeol 6060LV, Jeol GmbH, Eching, Deutschland). Das REM wurde ausschließlich im Sekundärelektronenmodus (SEI) betrieben. Der Abstand des Ringdetektors zur Probe wurde auf 10 mm eingestellt. Die Größe eines Rasterpunktes ("spot size") wurde auf 40 eingestellt. Für sehr hohe Vergrößerungen (<15000x) wurde die "spot size" reduziert, um die maximale Auflösung zu erhöhen. Die Beschleunigungsspannung wurde zwischen 3 - 20 kV variiert.



Abbildung 35: Informationen in den REM Aufnahmen.

Jede REM Aufnahme enthält mehrere Parameter (Abb. 35). Von links nach rechts sind die Informationen die Beschleunigungsspannung in kV, die Vergrößerung, der Maßstab, der Arbeitsabstand, die "spot size" und der Betriebsmodus.

#### 4.10.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Eine Analyse durch Rasterelektronenmikroskopie erfordert ein Trocknen der Proben. Hierdurch kann die Struktur beeinflusst werden. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden bakterielle Cellulosepellikel auch im nativen, feuchten Zustand untersucht. Hierzu wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM) mit einem in Wasser eintauchendem Objektiv verwendet (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Im Unterschied zu einem gewöhnlichen Lichtmikroskop ist das CLSM in der Lage den Laser auf eine einzelne Ebene durch die Probe zu fokussieren. Es wurden Aufnahmen im Abstand von  $1 \mu\text{m}$  durch die Probe aufgenommen. Die auf diese Weise gewonnen 2D Aufnahmen bilden somit einen Stapel, der genutzt wurde um ein 3D Modell der Probe zu berechnen (Abb. 36).

Das Mikroskop wurde im Reflektionsmodus betrieben, bei dem alles reflektierte Laserlicht zur Bildgebung verwendet wird, und für Fluoreszenzfärbungen bei bestimmten Wellen-

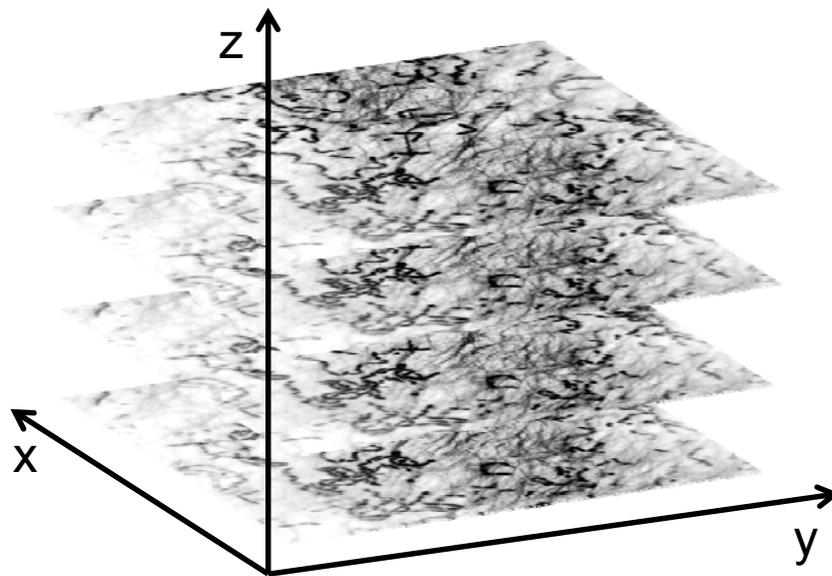


Abbildung 36: Stapel von 2D Aufnahmen mit definiertem Abstand in Z-Richtung können zur Berechnung eines 3D Modells genutzt werden.

längen. Für Fluoreszenzaufnahmen wurden die Proben mit einem Lektin (AAL488 *Aleuria aurantia* Lektin, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland), um die Cellulosefasern zu färben, und einem DNA Farbstoff (Syto60, Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland), um *Gluconacetobacter xylinus* zu markieren, angefärbt. Die Bildverarbeitung erfolgte durch Image J (NIH) [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>] und Avira (Mercury Systems, Chelmsford, USA).

#### 4.10.3 Quecksilberporosimetrie

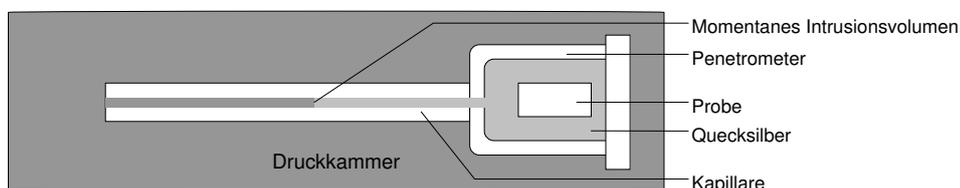


Abbildung 37: Schematischer Aufbau eines Penetrometers für die Quecksilberporosimetrie.

Um die Porengröße von Pelliceln aus unterschiedlichen Herstellungsverfahren quantifizieren zu können, wurde Quecksilberporosimetrie eingesetzt. Quecksilber benetzt die Probe nicht. Mit steigendem Druck, kann Quecksilber in kleinere Poren eindringen. Die Intrusion des Quecksilber kann mit der Häufigkeit bestimmter Porengrößen korreliert werden.

Die Cellulose wurde gereinigt und gefriergetrocknet, da Proben für die Quecksilberporosimetrie trocken sein müssen. Die Proben wurden passend für die Probenkammer des Penetrometers zurechtgeschnitten. Vor und nach der Analyse wurden die Proben gewogen. Die Versuche wurden mit einem AutoPore IV (Micromeritics GmbH, Aachen, Deutschland) Porosimeter durchgeführt. Hierfür wurde ausschließlich die Kammer für geringen Druck genutzt.

#### 4.10.4 Sauerstoffmessung

Um die Sauerstoffkonzentration in einem Pellikel als Funktion der Schichthöhe zu bestimmen wurden Pellikel mit aktiven *Gluconacetobacter xylinus* aus einer 4 ml Mikrotiterplatte verwendet. Eine Clark Typ Glasmikroelektrode (Unisense A/S, Aarhus, Dänemark) wurde in den Pellikel eingestochen. Die Elektrode wurde mit einem Amperometer (pico-ammeter, PA 2000, Unisense A/S, Aarhus, Dänemark) ausgelesen und durch einen Mikromanipulator (MM33-M, Unisense A/S, Aarhus, Dänemark) und einen Schrittmotor (encoder mike controller 18011, Oriol, Stratford, CT) bewegt. Zur Steuerung wurde die Software Profix (Version 2.2, Pyro Science, Aachen, Deutschland) eingesetzt [Hille *et al.*, 2009]. Die Mikroelektrode wurde auf eine Sauerstoffsättigungskonzentration von  $8 \text{ mg L}^{-1}$  kalibriert. Die Sauerstoffkonzentration wurde in Schritten von  $10 \mu\text{m}$  Tiefe bestimmt, bis kein Sauerstoff mehr messbar war.

#### 4.10.5 Blutkompatibilität

Um die Blutkompatibilität von bakterieller Cellulose zu untersuchen wurden Faktoren des Komplementsystems und der Blutgerinnungskaskade bestimmt.

Um realistische Werte zu erhalten wurde menschliches Vollblut verwendet. Etwa 40 ml Blut wurden einem männlichen Spender mit einem Butterfly System (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) abgenommen. Für die Inkubation der Proben mit dem Blut wurden zellkulturgeeignete Mikrotiterplatten mit 12 Kavitäten (Neolab, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt. 4 ml Blut wurde in 9 Kavitäten vorgelegt. 3 Scheiben bakterieller Cellulose in PBS Puffer und 3 Scheiben ePTFE (W. L. Gore Associates, Delaware, USA) von gleicher Oberfläche wurden in 6 Kavitäten inkubiert. Die verbleibenden Kavitäten fungierten als Kontrolle. Die Proben wurden für 8 min bei Raumtemperatur inkubiert (Abb. 38).

Für den C3a Test wurde jeweils 1 ml des inkubierten Bluts in 1,3 ml Teströhrchen überführt, die 1,6 mg EDTA (Sarstedt Aktiengesellschaft Co, Nürnberg, Deutschland) enthielten. Für die Analyse der Faktoren 1+2 und Faktor XII wurden 1,5 ml des Bluts in 2 ml Teströhrchen mit 150 µl Natriumcitrat (3,13 %) (Eifelfango, Chemisch-Pharmazeutische Werke J. Graf Metternich GmbH Co. KG, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland) überführt. Natriumcitrat und EDTA komplexieren Kalziumionen und stoppen hierdurch die Blutgerinnungskaskade. 500 µl des EDTA Bluts wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C und 2000 *rcf* (Biofuge Fresco, Andreas Hettich GmbH Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) für 15 *min* zentrifugiert. Das Blutplasma war nun als klarer gelber Überstand sichtbar. Das Plasma wurde in Aliquots von 20 µl bei -80 °C eingefroren. Für die Bestimmung von Faktor 1+2 wurden 500 µl des Citratbluts in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei Raumtemperatur für 10 *min* zentrifugiert. Das Plasma wurde in Aliquots von 100 µl bei -80 °C eingefroren. 800 µl des Citratblutes wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt für den Faktor XII Test. Die Proben wurden bei Raumtemperatur und 2000 *rcf* für 15 *min* zentrifugiert. Je 200 µl des Plasmas wurden bei -80°C eingefroren.

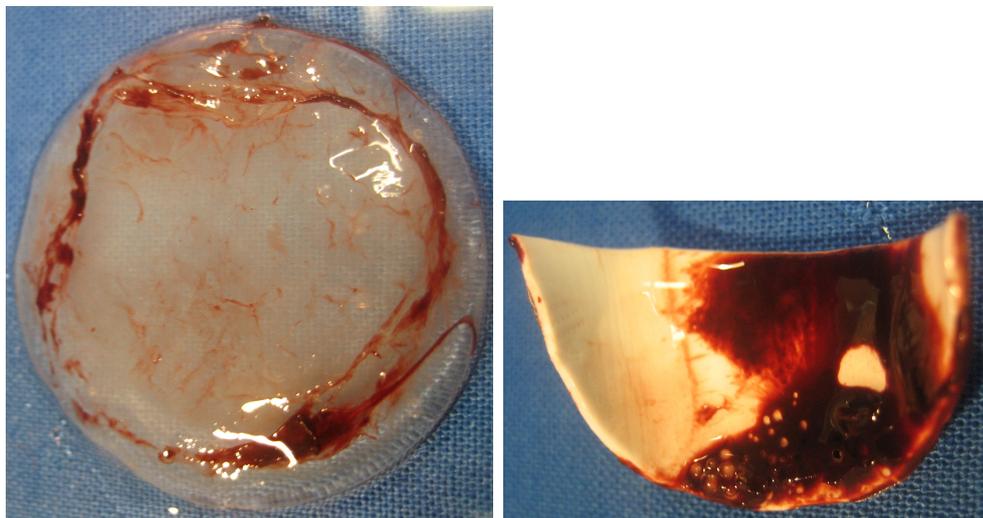


Abbildung 38: Scheiben aus Cellulose (links) und ePTFE (rechts) nach der Inkubation mit Blut. Es sind Blutgerinnsel auf der Oberfläche zu erkennen.

### C3a Bestimmung

Für die Bestimmung von C3a-desArg (Epitop des Antikörpers) wurde ein ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay") Test (PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutsch-

land) verwendet.

Die Mikrotiterplatte war mit einem monoklonalem Antikörper anti-C3a-desArg beschichtet. Der Antikörper bindet C3a-desArg. In einem zweiten Schritt bindet ein monoklonaler muriner anti-C3a Antikörper an das gebundene C3a-desArg. Der zweite Antikörper ist mit einer Peroxidase konjugiert. Im letzten Schritt wurde eine chromogene TMB (Tetramethylbenzidin) Lösung zugegeben. Die Peroxidase katalysiert die Farbreaktion. Nach 15 *min* wurde die Reaktion mit 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und durch die Messung der Absorption bei 450 *nm* quantifiziert.

Die Konzentration von C3a wurde durch eine Standardkurve aus 4 Standards bestimmt und mit einer Kontrolle verglichen (Tab. 10). Als Kontrolle wurde lyophilisiertes humanes Plasma mit einer bekannten C3a Konzentration von <150 *ng ml*<sup>-1</sup> eingesetzt.

Tabelle 10: Konzentration der C3a Standard Lösungen.

Standard	1	2	3	4
Konzentration [ <i>ng ml</i> <sup>-1</sup> ]	137,5	275	550	1100

Die gefrorenen Plasmaproben wurden bei 37 °C aufgetaut. Der Test wurde nach Anleitung durchgeführt.

### F 1+2 Bestimmung

Faktor 1+2 ist ein Fragment von Prothrombin, das äquimolar zu Thrombin auftritt. Der eingesetzte ELISA basierte auf einem monoklonalem Antikörper gegen F 1+2 (Enzygnost, Dade Behring Marburg GmbH, Deutschland).

Die Mikrotiterplatte ist mit einem monoklonalem murinen Antikörper gegen Faktor 1+2 beschichtet. Faktor 1+2 bindet an den Antikörper und verbleibt so an die Platte gebunden. Ein zweiter muriner Antikörper bindet an F 1+2. Der zweite Antikörper ist mit einer Peroxidase konjugiert. Die Peroxidase katalysiert die chromogene Umsetzung von TMB bis die Reaktion durch Zugabe von 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt wurde. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 450 *nm*.

Konzentrationen wurden durch eine Standardkurve basierend auf 4 Standards berechnet (Tab. 11).

Die gefrorenen Plasmaproben wurden bei 37 °C aufgetaut. Der Test wurde nach Anleitung durchgeführt.

Tabelle 11: Konzentrationen der F 1+2 Standard Lösungen.

Standard	1	2	3	4
Konzentration [pmol l <sup>-1</sup> ]	20	80	400	1200

### Factor XIIa Bestimmung

Faktor XIIa wird beim letzten Schritt der Gerinnungskaskade generiert. Diese Test ist kein ELISA sondern basiert auf der Aktivität von Faktor XIIa (UNITEST Faktor XIIa-like Activity, Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, Deutschland). Die Aktivitätsmessung bestimmt hauptsächlich Faktor XIIa gebunden an  $\alpha_2$ -Macroglobulin. Das Plasma wurde mit einem chromogenen Peptid inkubiert. Faktor XIIa spaltet p-Nitroanilin ab, dass photometrisch bei 405 nm bestimmt wurde.

Es wurden 2 Standards für den Test benutzt. Plasma mit hoher und geringer bekannter Aktivität.

Die gefrorenen Plasmaproben wurden bei 37 °C aufgetaut. Der Test wurde nach der Anleitung für die Mikrotitermethode durchgeführt. Da geringe Aktivitäten erwartet wurden, wurden die Proben 60 min statt 20 min inkubiert. Die Aktivität in Units pro Liter wurde durch Multiplikation der optischen Dichte mit 87,7 erhalten.

## 4.11 Bestimmung von binären Diffusionskoeffizienten

Versuche in der Diffusionszelle wurden mit drei Pellikeln unterschiedlicher Höhe durchgeführt (Tab. 12).

Tabelle 12: Höhe der eingesetzten Pellikel.

Probe	1	2	3
Dicke [mm]	0,7	1,7	3,2

Es wurde die Diffusion von KCl und Glukose untersucht (Tab. 13). Angegeben sind die finalen Konzentrationen auf die gesamte Flüssigphase der Kammer bezogen.

Tabelle 13: Konzentrationen in den Diffusionsexperimenten.

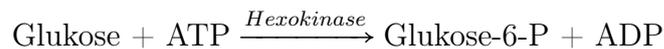
Substanz	Konzentration [mol L <sup>-1</sup> ]
	0,01
KCl	0,015
	0,02
Glukose	0,0125
	0,025

## 4.12 Analytik

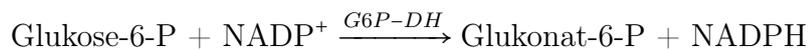
### 4.12.1 Metabolite

#### D-Glukose

Wegen der großen chemischen Ähnlichkeit von Glukose und Glukonsäure wurden die Konzentrationen durch einen spezifischen Enzymtest (Roche Diagnostics AG, Risch, Schweiz) bestimmt. Der Test enthält einen ATP+NADP<sup>+</sup> Puffer und eine Suspension aus den Enzymen Hexokinase und Glukose-6-P Dehydrogenase (G6P-DH).



Die Hexokinase transferiert ein Phosphat von ATP auf Glukose wodurch Glukose-6-P entsteht.



G6P-DH oxidiert Glukose-6-P zu Glukonat-6-P und transferiert das Proton auf NADP<sup>+</sup> wodurch NADPH entsteht. NADPH kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden. Da NADPH äquimolar zu Glukose entsteht, kann so die Glukose quantifiziert werden.

Tabelle 14: Konzentration der Glukose Standard Lösungen.

Standard	1	2	3	4	5
Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	0,025	0,05	0,075	0,1	0,125

Mit jedem Test wurde ein Standard aus verdünnten Glukoselösungen mitbestimmt (Tab. 14).

Der Test wurde auf das Mikrotiterplattenformat angepasst, um einen höheren Durchsatz als in Küvetten zu ermöglichen. Die Zusammensetzungen der Testlösungen sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Testlösungen.

	VE-H <sub>2</sub> O [ $\mu$ l]	Puffer [ $\mu$ l]	Standard [ $\mu$ l]	Probe [ $\mu$ l]
Kontrolle	80	50	-	-
Standard	60	50	20	-
Probe	60	50	-	20

Die Absorption des Ansatzes bei 340 nm entspricht  $E_1$ .

Die Enzymlösung wurde 1:20 im Puffer verdünnt. 20  $\mu$ l wurden zu dem Testansatz zugegeben.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{Probe} - (E_2 - E_1)_{leer} \quad (27)$$

Der Ansatz wurde 20 *min* inkubiert um die Reaktion vollständig ablaufen zu lassen. Die Absorption bei 340 nm entspricht  $E_2$ . Der Unterschied in der Absorption wurde nach Gleichung (27) berechnet.

$$c_{Glukose} = \frac{V \cdot M_{Glukose}}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E \quad (28)$$

Mit Gleichung (28) wurde die Glukosekonzentration ( $c_{Glukose}$ ) basierend auf  $\Delta E$  bestimmt. In die Gleichung gehen das Testvolumen ( $V[m^3]$ ), das Molekulargewicht von Glukose ( $M_{glucose}[g \text{ mol}^{-1}]$ ), der molare Absorptionskoeffizient ( $\epsilon[L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ ), die Dicke der Schicht ( $d[cm]$ ) und das Probenvolumen ( $v$ ) ein.

## Glukonsäure

Glukonsäure wurde durch einen spezifischen Enzymtest quantifiziert (Roche Diagnostics AG, Risch, Schweiz). Der Test enthält einen ATP+NADP<sup>+</sup> Puffer und die Enzyme Glukonatkinase und 6-Phosphogluconat Dehydrogenase.

Unter Verbrauch von ATP transferiert die Glukonatkinase einen Phosphatrest auf Glukonat.



Glukonat-6-P wird durch die 6-Phosphogluconat Dehydrogenase (6PG-DH) zum Lakton oxidiert.



Äquimolar zu Glukono-1,5-Lakton-6-P entsteht NADPH. NADPH kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden.

Tabelle 16: Konzentration der Glukonat Standard Lösungen.

Standard	1	2	3	4	5
Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

Jeder Testansatz enthielt einen Standard aus Verdünnungen einer Glukonatlösung (Tab. 16).

Der Test wurde auf das Mikrotiterplattenformat angepasst, um einen höheren Durchsatz als in Küvetten zu ermöglichen. Die Zusammensetzungen der Testlösungen sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Testlösungen.

	VE-H <sub>2</sub> O [ $\mu$ l]	Puffer [ $\mu$ l]	Standard [ $\mu$ l]	Probe [ $\mu$ l]
Kontrolle	80	50	-	-
Standard	60	50	20	-
Probe	60	50	-	20

Das Enzym Glukonatkinase wurde 1:20 in dem Puffer verdünnt. 20  $\mu$ l der Enzymlösung wurden jedem Testansatz zugegeben.

Die Absorption bei 340 nm entspricht  $E_1$ .

6-Phosphogluconat Dehydrogenase wurde 1:20 in dem Puffer verdünnt. 20  $\mu$ l der Enzymlösung wurden jedem Testansatz zugegeben.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{leer}} \quad (29)$$

Der Testansatz wurde 50 *min* inkubiert, bis die Reaktion den Endpunkt erreicht hatte. Die Absorption bei 340 *nm* entspricht  $E_2$ . Die Differenz der Absorption wurde nach Gleichung (29) berechnet.

$$c_{Glukonat} = \frac{V \cdot M_{Glukonat}}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E \quad (30)$$

Die Konzentration von Glukonat ( $c_{Glukonat}$ ) wurde nach Gleichung (30) basierend auf  $\Delta E$  ermittelt. In die Gleichung gehen das Testvolumen ( $V[m^3]$ ), das Molekulargewicht von Glukose ( $M_{Glukose}[g \text{ mol}^{-1}]$ ), der molare Absorptionskoeffizient ( $\epsilon[L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ ), die Dicke der Schicht ( $d[cm]$ ) und das Probenvolumen ( $v$ ) ein.

#### 4.12.2 Protein

Die Proteinkonzentration wurde durch einen Bicinchoninsäure Test (BCA) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) bestimmt. Der Test wurde eingesetzt, um die Menge an Protein in einem Pellikel zu bestimmen. Die Proteinkonzentration ( $c_{Protein}$ ) wurde mit der *Gluconacetobacter xylinus* Biotrockenmasse (*BTM*) korreliert (Gl. 31), indem die Proteinkonzentration einer bekannten Konzentration von *Gluconacetobacter xylinus* bestimmt wurde.

$$BTM = 1,8 \cdot 10^{-6} c_{Protein} \quad (31)$$

Der Pellikel wurde in PBS gewaschen, um verbleibendes Medium zu entfernen. Es wurde angenommen, dass verbleibendes Protein von Bakterien stammte. Das Protein wurde extrahiert, indem der Pellikel in einem Lämli-puffer mit 4 % SDS auf 95 °C erhitzt wurde. Dies schloss gleichzeitig die Bakterien auf. Der Test wurde nach der Anleitung durchgeführt. Die die Testlösung SDS enthält, muss die kompatible Version des BCA Tests genutzt werden, die ein Reduktionsmittel enthält.

#### 4.13 Optimierung

Für später Anwendungen im medizinischen Bereich kann ein komplett definiertes Medium von Vorteil sein. Da kein komplett definiertes Medium in der Literatur verfügbar war, wurde ein definiertes Medium erstellt und die Zusammensetzung optimiert. Das definierte Medium basierte auf Yeast Nitrogen Base (YNB). Glukonsäure und Methionin wurden ergänzt.

Tabelle 18: Variablen der Optimierung.

Variable	Komponente	Stammlösung	Bereich
		g/l	$\mu\text{l}/50\text{ml}$
1	Glukose	500	0-4000
2	Glukonsäure	500	0-2000
3	Zitronensäure	115	0-1000
4	HNa <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	0-4000
	MgSO <sub>4</sub>	50	
5	NaCl	10	0-4000
	CaCl <sub>2</sub>	10	
6	Ammoniumsulfat	125	0-4000
		$\mu\text{g}/\text{L}$	
7	Kalzium Pantothenat	20000	0-1000
	Biotin	100	
	Folsäure	100	
	Inositol	100000	
	Nicotinamid	20000	
8	p-Aminobenzoesäure	10000	0-2000
	Pyridoxin Hydrochlorid	20000	
	Riboflavin	10000	
	Thiamin Hydrochlorid	20000	
	Methionin	1000000	
	Kaliumiodid	10000	
	Borsäure	50000	
	Kupfersulfat	4000	
9	Eisenchlorid	20000	0-1000
	Mangansulfat	40000	
	Natriummolybdat	20000	
	Zinksulfat	40000	

Tabelle 18 zeigt die Komponenten des definierten Mediums. Die Medienzusammensetzung wurde mit einem genetischen Algorithmus zur experimentellen Versuchsplanung optimiert (GAME.opt, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität München, Garching, Deutschland) [Link und Weuster-Botz, 2006]. Um die Zahl der Variablen der Optimierung zu begrenzen, wurden die Komponenten des Mediums zu 9 Variablen zusammengefasst. Jede der Kohlenstoffquellen und der Puffer bildeten eine eigene Variable. Die Salze wurden zu einer Variablen zusammengefasst. Alle Vitamine und alle Spurenelemente wurden zu jeweils einer Variablen kombiniert. Die Stickstoffquelle Ammoniumsulfat wurde wie Pantothenat separat betrachtet. Jede Variable wurde mit 6 bit kodiert. Dies ermöglichte 64 Konzentrationsstufen für jede Variable.

Unter der Annahme von einer Suchraumabdeckung ( $p_M$ ) von 99 %, waren nach Gleichung (32) mindestens 14 Individuen notwendig [Weuster-Botz, 2000].

$$M \geq 1 + \frac{\log(1 - p_M^{\frac{1}{l}})}{\log 0,5} \quad (32)$$

Es wurden 15 verschiedene Mediumzusammensetzungen (Individuen) in jeder Generation untersucht. Die externe Population enthielt 7 Individuen. Die Mutationsrate wurde auf 1 % Wahrscheinlichkeit festgelegt und es wurden 2 Kreuzungspunkte für die Rekombination mit 100 % Kreuzungswahrscheinlichkeit verwendet. Die gewählten Parameter der Optimierung sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Parameter der Optimierung.

Parameter	Wert
Anzahl der Variablen	9
Auflösung	64
Bit/Variable	6
Bit/Individuum	54
Individuen	15
Externe Population	7
Kreuzungspunkte	2
Mutationswahrscheinlichkeit	0,01

Die Medien wurden sterilfiltriert. Die Experimente erfolgten in 4 ml Mikrotiterplatten (siehe 4.4). Jedes Individuum wurde sechsfach parallel angesetzt. Nach 7 Tagen wur-

de der Pellikel entfernt und gereinigt (siehe 4.7). Das Trockengewicht wurde nach dem Gefriertrocknen (siehe 4.8) bestimmt. Das mittlere Trockengewicht und die berechneten Kosten des Mediums wurden in GAME.opt eingegeben, um die nächste Generation zu generieren.

#### 4.14 Datenverarbeitung

Das Signal des Lasertriangulationssensors wurde mit 1 Hz aufgezeichnet. Da der Zwischenspeicher der verarbeitenden Einheit nur 65000 Datenpunkte speichern kann, wurden die Daten alle 12 h extrahiert und als .xls Datei gespeichert. Die Dateien wurden durch ein Matlab Skript zusammengeführt. Kultivierungen bis zu 800 h erzeugten große Datenmengen. Um die Datenmenge zu reduzieren, wurde für das Cellulose-trockengewicht jeweils der Mittelwert aus 300 Datenpunkten generiert. Für die Produktionsraten wurde der Mittelwert aus 10800 Datenpunkten verwendet.

Das Laserhöhen-signal wurde mit dem Trockengewicht korreliert und auf eine Membranfläche von 1  $m^2$  normalisiert. Die Produktionsrate der Cellulose ( $p_{cell}$ ) wurde aus der Differenz von jeweils zwei Punkten, die aus 10800 Datenpunkten ermittelt wurden, berechnet (Gl. 33).

$$p_{cell} = \frac{g_{cell,DW_{i+1}} - g_{cell,DW_i}}{A_{Membran} \cdot t} \quad (33)$$

## 5 Konstruktion von Membranmodulen

Ziel dieses Arbeitsabschnitts war die Entwicklung eines Membranmoduls für reaktionstechnische Untersuchungen der membrangestützten Celluloseproduktion für den Laboreinsatz. Folgende Anforderungen sollten dabei erfüllt werden:

- Modulare Konstruktion zum Anschluss an ein Bypassgefäß.
- Leichte Austauschbarkeit der eingesetzten Membran.
- Gleichmäßige Inokulation der Gasseite der Membran mittels einer Suspension von *Gluconacetobacter xylinus*.
- Effektive diffusive Versorgung von *Gluconacetobacter xylinus* mit Nährstoffen über die Membran.
- Autoklavierbarkeit.
- Online Messtechnik zur Quantifizierung der produzierten Cellulose.
- Sterile Langzeitoperation.

### 5.1 Glasmodul

Das Glasmodul basiert auf zwei identischen Teilen, die aus Glas angefertigt wurden um die Celluloseproduktion visuell beobachten zu können (siehe Abb. 39, 40; Zeichnungen siehe Appendix A.1). Es wurde eine runde Form gewählt, da hierfür ein kommerziell verfügbarer Glasflansch, in modifizierter Form, eingesetzt werden konnte. Zusätzlich erlaubt der kreisförmige Querschnitt eine sichere sterile Abdichtung durch kommerziell verfügbare o-Ring Dichtungen. Das Glasbauteil verfügt über zwei Anschlüsse, in Form einer Olive. Für die Membran wurde ein Durchmesser von 45 mm ausgewählt, da in dieser Größe eine große Zahl kommerzieller Flachmembranen verfügbar ist. Die Membran wurde mit Hilfe eines Polypropylen-Einsatzes in das Glasmodul integriert. Der Einsatz besteht aus zwei Elementen. Das obere Element wird zwischen die beiden Glasteile geklemmt und erstreckt sich zylinderförmig in das untere Glasteil. Das untere Element des Einsatzes bildet einen Ring, der die Membran fixiert. Die Abdichtung der Membran erfolgt durch Silikon. Zusätzlich wurden eine Polymermembranen durch ein Nylonnetz unterstützt um die mechanische Stabilität zu erhöhen. Bei keramischen Membranen war dies hingegen nicht erforderlich.

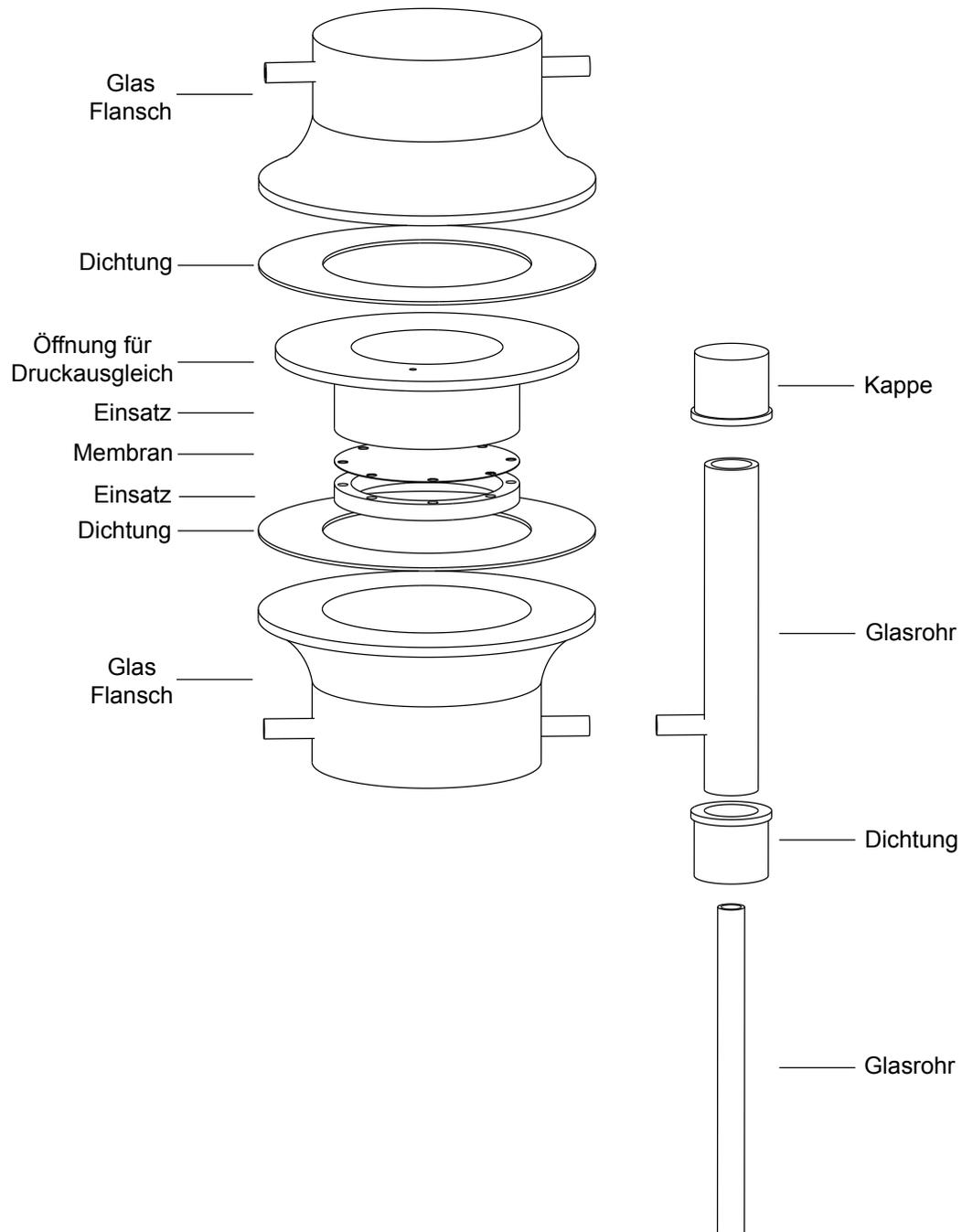


Abbildung 39: Explosionszeichnung des Glasmoduls (links) mit externem Überlauf (rechts). Die Membran ist in einen Polypropyleneinsatz integriert.

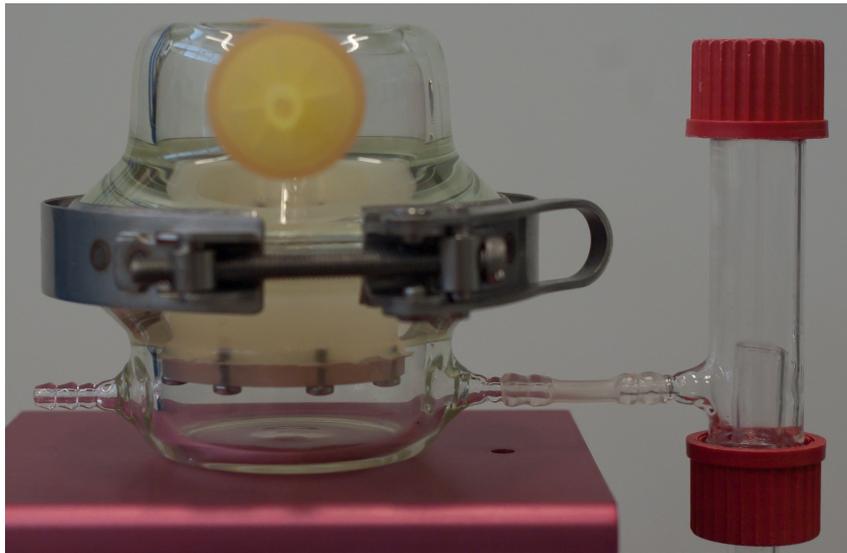


Abbildung 40: Foto des Glasmoduls (links) mit externem Überlauf (rechts). Die Membran ist in einen Polypropyleneinsatz integriert. Das Modul wird durch eine Edelstahlklammer verschlossen.

Das obere Element des Einsatzes enthält eine Bohrung, die einen Druckausgleich zwischen den beiden Glasteilen des Moduls ermöglicht. Zur Inokulation des Moduls wurde eine Suspension von *Gluconacetobacter xylinus* auf der oberen, Luftseite der Membran aufgebracht. Um eine homogene Verteilung der Bakterien auf der Membranoberfläche zu gewährleisten, wurde der Flüssigkeitsspiegel im Modul auf 1 mm über der Membran eingestellt. Es wurde erwartet, dass sich die Bakterien in der Suspension über der Membran gleich verteilen. Um den Gasaustausch des Glasmoduls mit der Umgebung zu gewährleisten, stand das Modul über einen Sterilfilter am oberen Glasteil mit der Umgebung in Verbindung. Die Abdichtung des Moduls erfolgte durch Silikonflachdichtungen. Die Glasteile wurden durch eine Edelstahlklammer aufeinander gepresst.

Der Flüssigkeitsspiegel im Modul wurde mit Hilfe eines externen Überlaufs eingestellt (siehe Abb. 39). Der Überlauf besteht aus zwei Glasröhren. Die äußere Glasröhre steht in Verbindung mit dem unteren Teil des Glasmoduls. Es stellt sich der gleiche Flüssigkeitsspiegel wie in dem Modul ein. Die zweite Röhre befindet sich höhenverstellbar in der äußeren Glasröhre. Erreicht der Flüssigkeitsspiegel die Öffnung der zweiten Röhre, fließt weitere Flüssigkeit ab.

Abbildung 41 zeigt ein Fließschema des Versuchsaufbaus. Das Kulturmedium wurde durch eine peristaltische Pumpe aus dem Bypassgefäß in den unteren Teil des Glasmoduls gefördert. Aus dem Überlauf wurde das Kulturmedium frei fließend in das Bypassgefäß

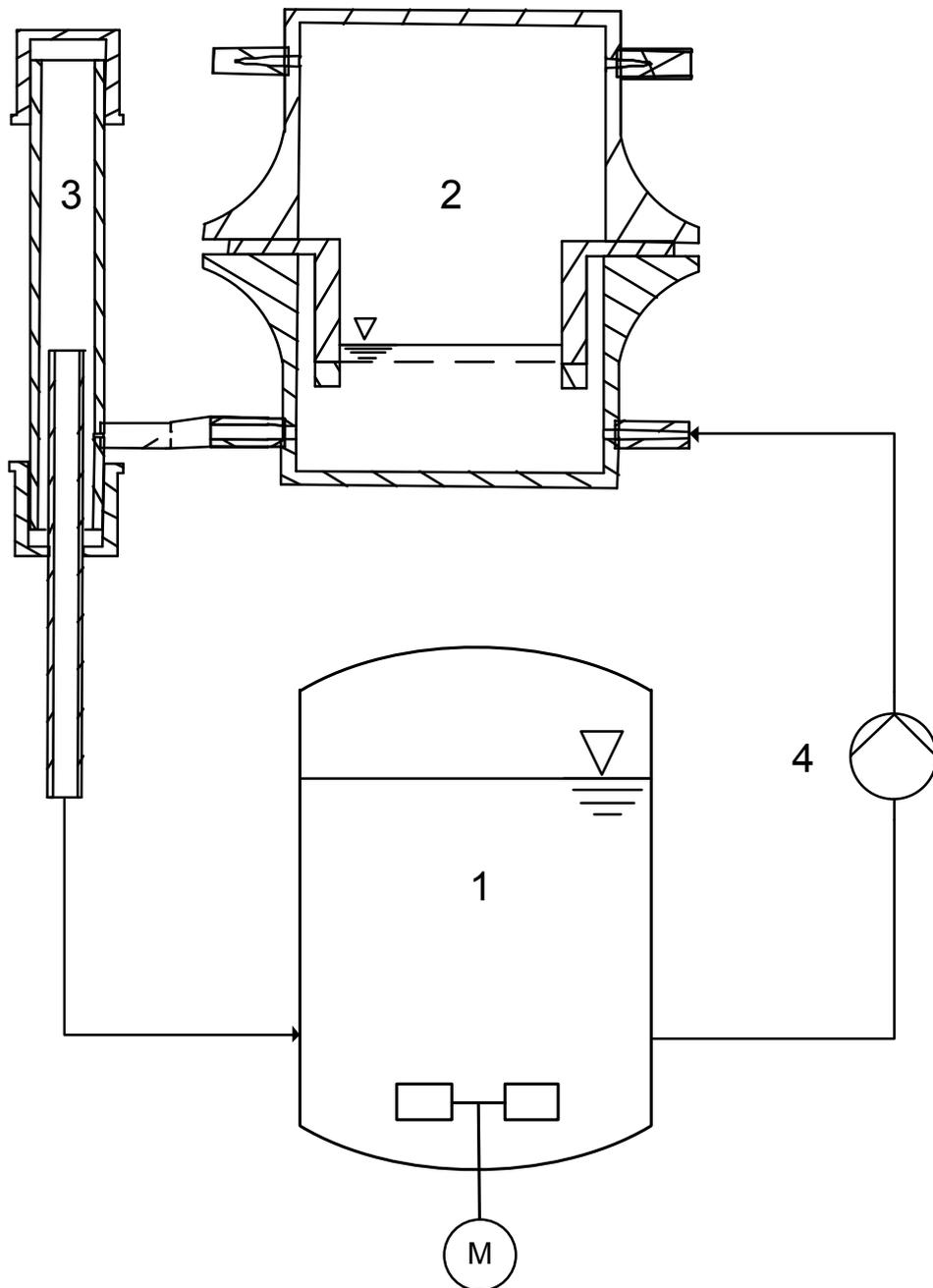


Abbildung 41: Fließschema des Versuchsaufbaus für den Betrieb des Glasmoduls. 1: gerührtes Bypassgefäß, 2: Glasmodul, 3: Überlauf, 4: peristaltische Pumpe.

zurückgeführt. Hierzu war es erforderlich, dass ein Gefälle vom Modul zum Bypassgefäß vorliegt.

Das Modul ist komplett autoklavierbar.

## 5.2 Polypropylenmodul

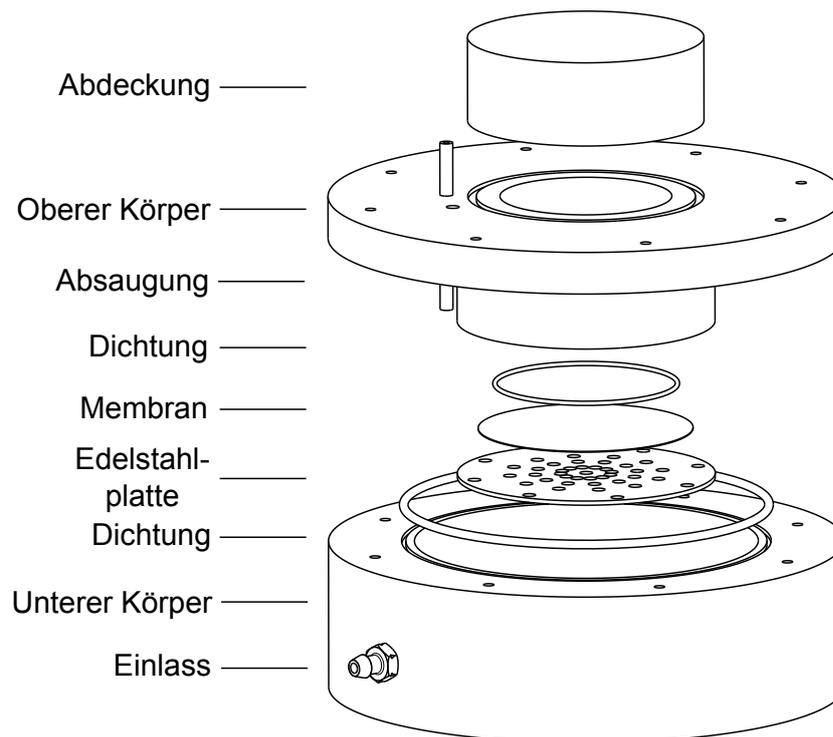


Abbildung 42: Explosionszeichnung des Polypropylenmoduls.

Das Polypropylenmodul besteht aus zwei gedrehten Modulkörpern aus Polypropylen (siehe Abb. 42, 43; Zeichnungen siehe Appendix A.1). Ähnlich des Konzepts des Glasmoduls enthielt der untere Modulkörper die Flüssigphase. Das Modul wurde ausschließlich für den Einsatz einer Polymermembran ausgelegt. Die Membran wurde direkt an dem oberen Polypropylenkörper befestigt. Die Dichtung erfolgte durch Silikon. Dabei anstand, wie im Glasmodul, ein zylinderförmiger Raum mit einem Durchmesser von 45 *mm* für die Produktion des Pellikels. Die Membran wurde von einer perforierten Edelstahlplatte gestützt. Zwischen der Membran und der Edelstahlplatte befand sich ein Nylonnetz, um das Kulturmedium homogen aus den Bohrungen der Edelstahlplatte auf die Membran zu verteilen. Durch das Verschrauben der Edelstahlplatte mit dem oberen Modulkörper wurde die Membran mit einem O-Ring abgedichtet. Der Hohlraum des oberen Bauteils

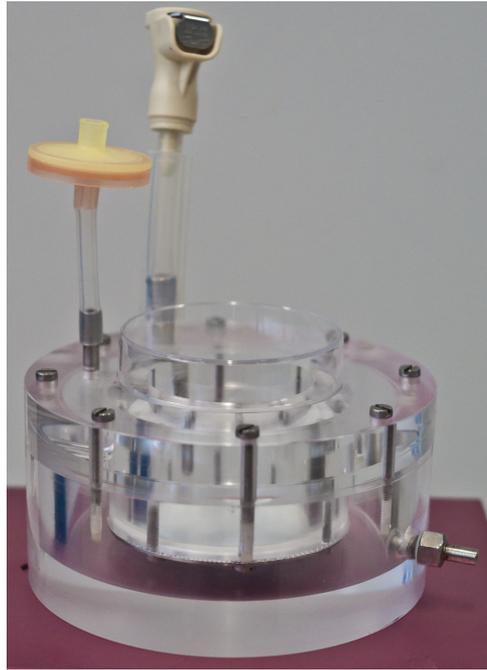


Abbildung 43: Nachbau des Polypropylenmoduls mit identischen Maßen aus Polymethylmethacrylat zu Demonstrationszwecken. Die weiße PES Membran ist zu erkennen.

wurde durch eine Polykarbonat Abdeckung verschlossen um gute optische Eigenschaften für die online Messung der Cellulosebildung zu gewährleisten. Das Modul wurde inokuliert, indem eine Suspension an *Gluconacetobacter xylinus* auf die Luftseite der Membran aufgebracht wurde. Wie im Glasmodul wurde der Flüssigkeitsspiegel im Modul so eingestellt, dass 1 mm Flüssigkeit über der Membran stand, um eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien zu gewährleisten. Der Flüssigkeitsspiegel wurde mit Hilfe einer Absaugvorrichtung, die in das obere Bauteil integriert war, eingestellt. Der Gasaustausch mit der Umgebung erfolgte über einen Sterilfilter im oberen Bauteil. Beide Modulkörper wurden miteinander verschraubt und durch einen O-Ring abgedichtet.

Abbildung 44 zeigt ein Fließschema des Versuchsaufbaus für das Polypropylenmodul. Eine peristaltische Pumpe förderte Kulturmedium aus dem Bypassgefäß in den Hohlraum des Moduls unterhalb der Membran. Eine weitere peristaltische Pumpe förderte das Kulturmedium über das Absaugrohr aus dem Modul, um den Flüssigkeitsspiegel einzustellen. Die Absaugung wurde mit einer höheren Flussrate betrieben als die Zufuhr, um einen Anstieg des Flüssigkeitsspiegels über die Höhe des Absaugrohrs zu verhindern. Über der Membranoberfläche wurde ein Lasersensor platziert, der durch die Polykarbonat Abdeckung den Abstand zur Membran oder dem Pellikel erfasste.

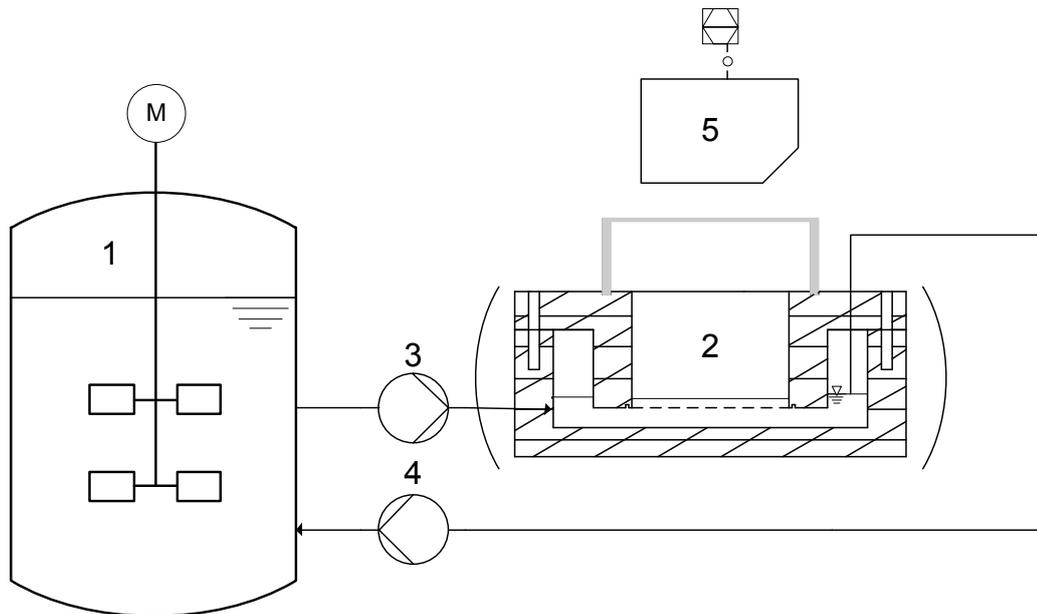


Abbildung 44: Fließschema des Versuchsaufbaus für den Betrieb des Polypropylenmoduls. 1: gerührtes Bypassgefäß; 2: Polypropylenmodul; 3, 4: peristaltische Pumpen; 5: Lasertriangulationssensor.

Das Polypropylenmodul ist mit Ausnahme der Polykarbonat Abdeckung autoklavierbar.

### 5.3 Diskussion

Die Unterschiede zwischen den Modulen sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Vergleich der Membranmodule.

	Glasmodul	Polypropylenmodul
Membranoberfläche [mm <sup>2</sup> ]	1590	1590
Komplett autoklavierbar	Ja	Nein
Lasertriangulation	Nein	Ja
Benötigte Pumpen	1	2

Das Glasmodul konnte durch den flexiblen Einsatz leichter an verschiedenen Membraneigenschaften, wie die größere Dicke einer keramischen Membran angepasst werden. Zusätzlich ist Glas besser autoklavierbar als Polypropylen. Der externe Überlauf zur Einstellung des Flüssigkeitsspiegels des Glasmoduls erwies sich als fehleranfällig. Der exakte

Versuchsaufbau ist hier sehr wichtig, da unter anderem ein ausreichendes Gefälle zum Bypassgefäß sichergestellt werden muss. Dieses Konstruktionsprinzip scheint daher nicht geeignet für eine industrielle Produktion.

Aufgrund der Möglichkeit, die Schichthöhe der Cellulose durch einen Lasertriangulations-sensor zu erfassen, wurde für die folgenden Arbeiten hauptsächlich das Polypropylenmodul eingesetzt. Die in das Polypropylenmodul integrierte Absaugvorrichtung zur Einstellung des Flüssigkeitsspiegels im Modul war wesentlich zuverlässiger als der externe Überlauf des Glasmoduls. Zusätzlich war hierdurch eine größere Flexibilität im Versuchsaufbau möglich, da kein Gefälle zum Bypassgefäß erforderlich war.

Produzierte Cellulosepellikel aus beiden Modulen wirkten über die Membranoberfläche betrachtet homogen. Es wurde daher angenommen, dass durch den Flüssigkeitsspiegels von 1 *mm* über der Membran eine gleichmäßige Inokulation der Membranoberfläche erreicht werden konnte.

In beiden Modulen wurden Versuche mit einer Dauer von über 4 Wochen durchgeführt. Eine sterile Langzeitoperation konnte erreicht werden.

Beide Module wurden für den Einsatz im Labor entwickelt und stellen keinen Prototyp für ein Modul für einen industriellen Prozess dar. Für die industrielle Anwendung sollte das Membranmodul aus Edelstahl gefertigt werden und *in situ* dampfsterilisierbar sein. Beide entwickelte Module müssen extern temperiert werden. Eine Temperaturkontrolle durch einen Doppelmantel würde den Aufbau eines industriellen Prozesses erleichtern.

Da bakterielle Cellulose nur an der Grenzfläche von Flüssig- und Gasphase produziert wird, bestimmt die Modulgeometrie weitgehend die finale Form des Pellikels. Dies muss bei der Auslegung eines Membranmoduls berücksichtigt werden.

## 6 Identifikation einer geeigneten Membran

Eine geeignete Membran zur Integration in die entwickelten Membranmodule sollte folgende Anforderungen erfüllen:

- Zurückhaltung von *Gluconacetobacter xylinus*.
- Permeabel für Nährstoffe aus dem Kulturmedium, die für Wachstum und Celluloseproduktion benötigt werden.
- Autoklavierbar.
- Mechanische Stabilität, nicht verformbar.
- Leichte Handhabung bei der Integration in das Modul.
- pH-Stabilität im Säuren bis pH 3.
- Kommerziell verfügbar in einem Maßstab, der auch für eine industrielle Produktion von Cellulose geeignet ist.

Aus ökonomischen Gründen kann es zusätzlich erforderlich sein, dass die Membran gereinigt und wiederholt autoklaviert werden kann.

Aus den Kriterien des Größenausschlusses von Mikroorganismen und der Permeabilität für das Kulturmedium, konnte abgeleitet werden, dass eine hydrophile Porenmembran mindestens im Bereich der Mikrofiltration benötigt wurde. Zusätzlich sollte die Temperaturstabilität bei über 120 °C liegen, um ein Verformen der Membran während des Autoklavierens verhindern zu können.

In diesem Bereich sind eine Vielzahl von organischen und anorganischen Membranen verfügbar. In Tabelle 21 ist eine Auswahl der gebräuchlichsten organischen und anorganischen Membranmaterialien, die die Vorgaben erfüllen können, aufgeführt [Melin und Rautenbach, 2007; Ulbricht, 2006].

Anorganische Membranen sind in der Regel chemisch beständig, gegen viele Lösungsmittel und in einen weitem pH-Bereich einsetzbar. Die hohe Temperaturresistenz und die mechanische Belastbarkeit erlauben eine Dampfsterilisation. Häufig können sie über lange Standzeiten eingesetzt und durch Rückspülung effektiv gereinigt werden. Das Sintermaterial ist allerdings spröde und macht Dicken von einigen Millimetern nötig um eine

Tabelle 21: Membranmaterialien.

organisch	anorganisch
Polyethersulfon	Keramik
Polyvinylidenfluorid	Glas
Cellulose, regeneriert	Kohlenstoff
Cellulosenitrat	Metall
Celluloseacetat	Zeolith
Polysulfon	
Polykarbonat	
Polyamid	

ausreichende mechanische Stabilität zu gewährleisten. Eine teils erhebliche thermische Ausdehnung, vor allem bei der Sterilisation, kann zu Dichtungsproblemen führen.

Polymermembranen sind in einer solchen Vielfalt vorhanden, dass nahezu alle Eigenschaften erreicht werden können.

Für weitere Untersuchungen wurde basierend auf der Vorauswahl der Materialien jeweils eine organische und eine anorganische Membran ausgewählt. Als organische Membran wurde eine asymmetrische Polyethersulfon (PES) Mikrofiltrationsmembran mit einer Porengröße von  $0,45 \mu\text{m}$  (MicroPES, Membrana GmbH, Wuppertal, Deutschland) eingesetzt. Die Dicke der Membran betrug  $0,2 \text{ mm}$ . Polyethersulfon Membranen gelten als besonders tolerant gegen Oxidationsmittel und sind bis zu einem pH von 2 über lange Zeit einsetzbar [Arkhangelsky *et al.*, 2007]. Zusätzlich sind sie in industriellen Anwendungen weit verbreitet und kommerziell auch in großem Maßstab verfügbar.

Als anorganische Membran wurde eine keramische Mikrofiltrationsmembran (IBMEM, Frankfurt/Main, Deutschland) eingesetzt. Die asymmetrische Membran bestand aus einem porösen Träger aus Aluminiumoxid, Titanoxid und Zirkonoxid. Die Trennschicht bestand aus einer dünnen Schicht Titanoxid. Die gesamte Dicke der keramischen Membran betrug  $3,0 \text{ mm}$ .

Beide Membranen wurden als Scheibe in das Glasmodul integriert. Auf Grund der ähnlichen Daten beider Membranen wurde eine vergleichbare Celluloseproduktion erwartet. Die PES Membran musste unter Wasser autoklaviert werden, um ein Verformen im Modul zu vermeiden.

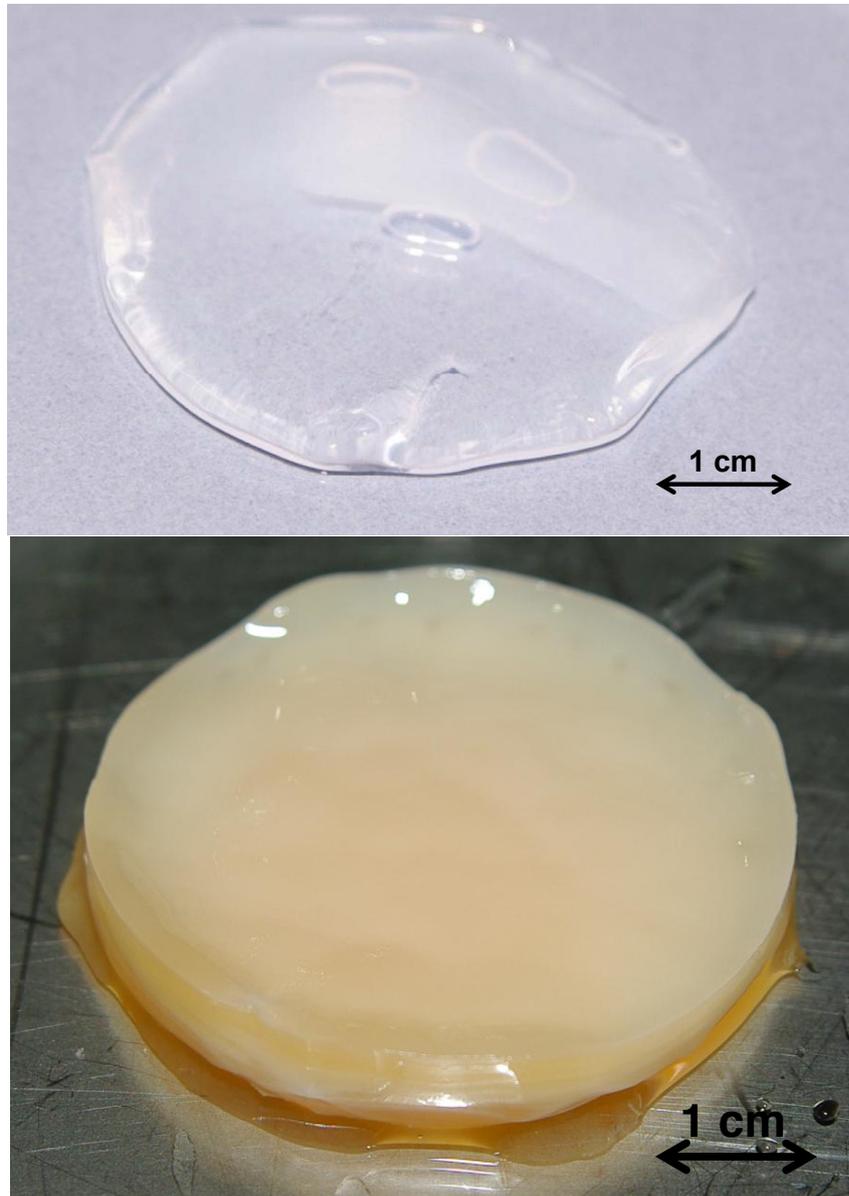


Abbildung 45: Pelikel aus einem Glasmodul mit einer keramischen Membran (oben) und einer PES Membran (unten). Der Pelikel, der auf der PES Membran entstand wirkt deutlich dichter.

Es wurden Versuche mit dem  $\text{HS}^+$  Komplexmedium mit einem Inokulum aus einer statischen Oberflächkultivierung durchgeführt. Die gebildete Menge an Cellulose wurde im Endpunkt als Trockengewicht bestimmt.

Beide Membranen wurden vom Nährmedium drucklos durchdrungen, schlossen aber *Gluconacetobacter xylinus* vom Medium aus. Auf der keramischen Membran wurde jedoch wesentlich weniger Cellulose in der gleichen Zeit produziert als auf der PES Membran (Abb. 45). In 320 h wurde mit der keramischen Membran ein Pellikel mit einem Trockengewicht von  $11,3 \text{ g m}^{-2}$  produziert. Die entspricht nur etwa einem Zehntel des durchschnittlichen Trockengewichts, das mit der PES Membran erreicht wurde. Zusätzlich wurde eine wesentlich stärkere Adhäsion der Cellulose auf der Keramik als auf PES beobachtet. Die keramische Membran konnte gereinigt und wiederverwendet werden. Die PES Membran wurde hingegen nach jedem Versuch ersetzt, da eine Reinigung die durchschnittliche Porengröße erhöhen kann [Arkhangelsky *et al.*, 2007].

## Diskussion

Die geringere Celluloseproduktion der keramischen Membran könnte auf die wesentlich höhere Dicke von  $3,0 \text{ mm}$  im Vergleich zur Dicke der PES Membran von  $0,2 \text{ mm}$  zurück zu führen sein. Da die keramische Membran asymmetrisch aufgebaut ist, macht einen Großteil der Dicke zwar ein hochporöser Träger aus, dennoch liegt im Träger ebenfalls keine Konvektion vor. Die Diffusionsstrecke für Bestandteile des Mediums ist bei der keramischen Membran wesentlich höher als bei der PES Membran.

Für alle weiteren Versuche wurde die Polyethersulfonmembran (MicroPES, Membrana GmbH, Wuppertal, Deutschland) eingesetzt.

## 7 Inokulumsherstellung

Das Ziel dieses Arbeitsabschnitts waren reaktionstechnische Untersuchungen zur Herstellung eines definierten Inokulums in Form einer Suspension von *Gluconacetobacter xylinus*, die auf die Membran aufgebracht werden kann. Wichtig ist hierzu nicht nur eine hohe Zelldichte, sondern vor allem die Vermeidung von Mutanten, die keine Cellulose mehr produzieren können (*Cel*<sup>-</sup>).

*Cel*<sup>-</sup> Mutanten treten unter allen Reaktionsbedingungen auf, da diese wegen der fehlenden Cellulosebildung einen Wachstumsvorteil haben. In einer statischen Kultivierung sind *Cel*<sup>-</sup> Zellen jedoch benachteiligt, da diese durch die fehlende Celluloseproduktion nicht in der oberen Schicht des Pellikels verbleiben und somit den Zugang zu Sauerstoff verlieren. In begasteten, homogen durchmischten Reaktoren haben alle Zellen Zugang zu Sauerstoff. *Cel*<sup>+</sup> Zellen sind hier benachteiligt, da sie einen Teil ihrer Energie für die Celluloseproduktion aufwenden.

Auch in Suspensionskulturen ist ein großer Teil der Zellen von *Gluconacetobacter xylinus* in die Cellulosepellets eingeschlossen. Diese Zellen können somit nicht direkt in Suspension auf die Membran aufgebracht werden.

Aus diesen Gründen wird häufig eine statische Oberflächenkultivierung zur Produktion eines Inokulums vorgeschlagen. Der Pellikel wird verworfen und das Kulturmedium als Inokulum verwendet. Auf diese Weise können jedoch nur geringe Zelldichten erreicht werden.

Es sind verschiedene Ansätze möglich um den Hauptteil der Zellen, die in den Pellikel integriert werden, für ein Inokulum zu nutzen. Die Cellulosematrix kann beispielsweise durch eine Cellulase abgebaut werden [Saxena *et al.*, 1994]. Dies kann nach oder während der Cellulosesynthese erfolgen. Beide Ansätze wurden reaktionstechnisch untersucht.

Für die folgenden Untersuchungen wurde basierend auf Brackmann *et al.* (2010) dem Kulturmedium 0,08 % (v/v) Celluclast (Cellulase von *Trichoderma reesei*, Novozyme, Bagsvaerd, Dänemark) zugesetzt, um den Aufbau einer Cellulosematrix zu verhindern.

### 7.1 Inokulumsherstellung im Schüttelkolben

Es wurden Kolben ohne Schikanen bei einer Drehzahl von 120  $min^{-1}$  eingesetzt um den Sauerstoffeintrag nach Brackmann *et al.* (2010) zu begrenzen. Es wurde erwartet, dass auf

diese Weise eine wesentlich höhere Zelldichte als in der statischen Inokulumsherstellung erreicht werden kann.

Der  $k_La$  im Schüttelkolben wurde nach Maier (2002) abgeschätzt (Gl. 34).

$$k_La = 6,67 \cdot 10^{-6} \cdot V_L^{-0,83} \cdot n^{1,16} \cdot d_O^{0,38} \cdot d^{1,92} \quad (34)$$

$V_L$  ist das Füllvolumen des Kolbens in  $ml$ ,  $n$  die Schüttelfrequenz in  $min^{-1}$ ,  $d_O$  die Exzentrizität in  $cm$  und  $d$  der Maximaldurchmesser des Schüttelkolbens in  $cm$ . Der  $k_La$  wurde mit etwa  $0,01 s^{-1}$  bestimmt.

Abbildung 46 zeigt den Verlauf der Konzentration der Biotrockenmasse von *Gluconacetobacter xylinus* (BTM) und der zwei wichtigsten Metabolite Glukose und Glukonsäure, in Schüttelkolben (siehe 4.5). Die Schüttelkolben wurden mit einem Pellikel aus einer statischen Oberflächenkultur im  $4 ml$  Maßstab inokuliert. Aus diesem Grund war die Startkonzentration der Biomasse und die insgesamt verfügbare Menge an Glukose nicht exakt bekannt. Die Aufzeichnung der Messwerte begann daher nach dem Abbau des Pelli-kels durch die Cellulase nach 8 h (Phase I), wodurch *Gluconacetobacter xylinus* freigesetzt wurde (Phase II). Innerhalb der ersten 15,3 h wurde eine *Gluconacetobacter xylinus* Bio-trockenmasse (BTM) von  $1,15 g L^{-1}$  erreicht. Im selben Zeitraum nahm die Glukosekon-zentration auf  $1,4 g L^{-1}$  ab, während eine Anreicherung von Glukonsäure auf  $13,7 g L^{-1}$  stattfand. Bis 39 h nahm die BTM nur auf  $1,5 g L^{-1}$  zu. Glukose konnte nicht mehr nach-gewiesen werden und die Konzentration der Glukonsäure viel auf  $3,8 g L^{-1}$ . In der letzten Prozessphase wurde die Glukonsäure vollständig aufgenommen und die BTM erreichte  $2,1 g L^{-1}$ .

In der ersten Prozessphase bis ca. 20 h wurde Biomasse unter Verwendung von Glukose als Substrat produziert. Die maximale Wachstumsrate  $\mu$  von  $0,12 h^{-1}$  wurde in dieser Phase erreicht. Gleichzeitig wurden 71 % (mol/mol) der Glukose zu Glukonsäure oxidiert.

In der nächsten Phase bis 39 h wurde  $9,8 g L^{-1}$  Glukonsäure verbraucht, aber nur wenig Biomasse gebildet. In der letzten Prozessphase wurde eine Zunahme der BTM von  $0,65 g L^{-1}$  unter dem Verbrauch von  $3,5 g L^{-1}$  Glukonsäure erreicht. Die Wachstumsra-te betrug hier nur  $0,02 h^{-1}$ . Aus den Daten geht nicht hervor, ob die Verwendung von Glukonsäure als Substrat begann, nachdem die Glukose komplett abgebaut war, oder ob noch  $2 g L^{-1}$  Glukose vorhanden waren. Da kein Phosphotransferase System (PTS) für *Gluconacetobacter xylinus* bekannt ist, ist eine gleichzeitige Verwertung beider Substrate nicht ausgeschlossen. Die Regulation der Substratverwertung erfolgt in anderen Bakterien

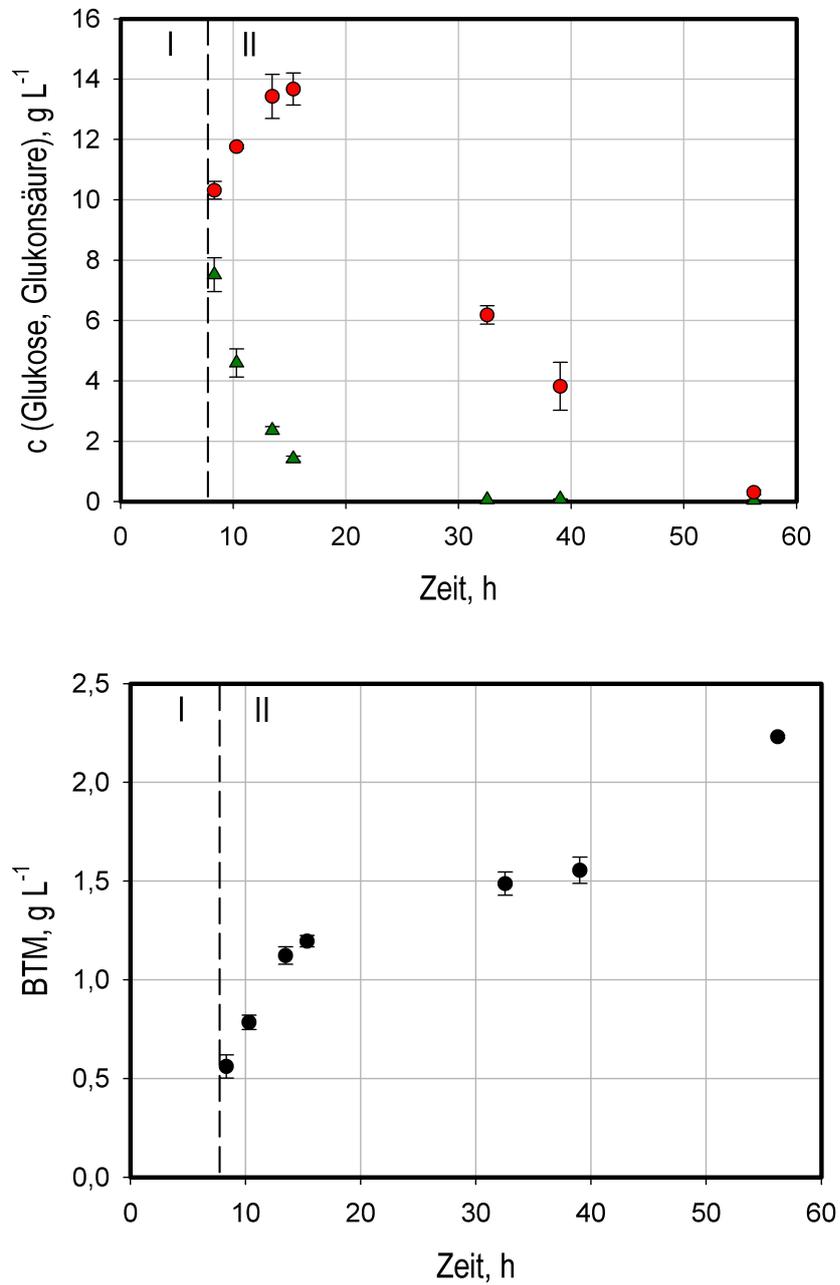


Abbildung 46: Inokulumsherstellung in Schüttelkolben mit 0,08 % (v/v) Cellulase im HS<sup>+</sup> Medium. *Gluconacetobacter xylinus* Biomasse (●), Glukonsäurekonzentration (●), Glukosekonzentration (▲).

häufig über das Transportsystem. Die relativ geringe Biomassebildung in der Phase der beginnenden Glukonsäureverwertung ist möglicherweise auf die Produktion von Cellulose zurückzuführen. Cellulose war nicht messbar, da sie von der Cellulase abgebaut wurde.

Es konnte effektiv Biotrockenmasse produziert werden. Im folgenden sollte überprüft werden, ob die Zellen noch aktiv sind und die Kultur von *Cel*<sup>+</sup> Zellen dominiert wird. Hierzu wurden Proben aus dem Schüttelkolben durch Waschen mit PBS von der Cellulase befreit und auf festem HS<sup>+</sup> Medium ausplattiert.

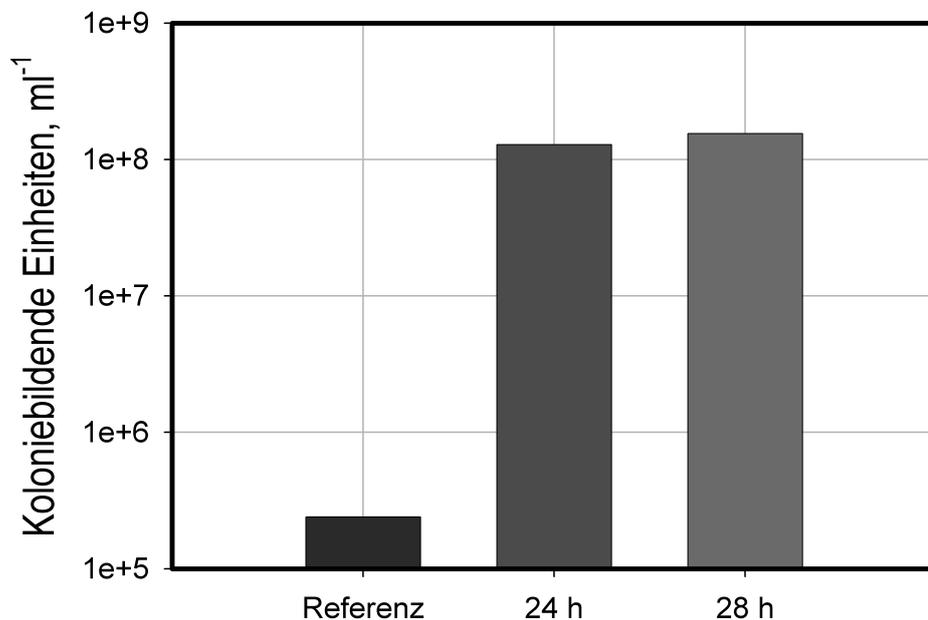


Abbildung 47: Koloniebildende Einheiten von Celluloseproduzenten im Schüttelkolben als Funktion der Prozesszeit.

Abbildung 47 zeigt die Koloniebildenden Einheiten (KBE) von *Cel*<sup>+</sup> Zellen von *Gluconacetobacter xylinus* nach 24 h und 48 h. Als Referenz wurde das Kulturmedium einer statischen Oberflächenkultur verwendet. Die Zahl der Koloniebildenden Einheiten von nur 240000 *KBE ml*<sup>-1</sup> ist hierfür typisch. Nach 24 h der geschüttelten Kultur wurden  $1,28 \cdot 10^8$  *KBE ml*<sup>-1</sup> erreicht. Nach 48 h lag die Zahl der KBE bei  $1,55 \cdot 10^8$  *KBE ml*<sup>-1</sup>. Im Vergleich zur Referenz wurde eine Steigerung der KBE um den Faktor von bis zu 500 erreicht. Es wurden keine *Cel*<sup>-</sup> Kolonien beobachtet.

## 7.2 Inokulumsherstellung im Rührkesselreaktor

Für eine technische Anwendung ist es notwendig, Inokulum möglichst reproduzierbar in der benötigten Menge herstellen zu können. Zu diesem Zweck sollte die geschüttelte Inokulumsherstellung auf einen Rührkesselreaktor übertragen werden, um eine ausreichende Menge herstellen zu können. Zusätzlich sollte die Lagerfähigkeit des Inokulums bei  $-80\text{ °C}$  ermittelt werden.

Um wie im Schüttelkolben *Cel*<sup>-</sup> Mutanten zu vermeiden wurde der Sauerstoffeintrag im Rührkesselreaktor gleich dem des Schüttelkolbens gehalten. Ein 1 L Rührkesselreaktor (Labfors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) wurde mit  $16,2\text{ L h}^{-1}$  (0,27 vvm) Luft begast und mit  $600\text{ min}^{-1}$  gerührt um vergleichbare Bedingungen für den Sauerstoffeintrag einzustellen. Der Rührkesselreaktor wurde mit einer Biotrockenmasse von  $0,1\text{ g L}^{-1}$  mit einer Suspension aus einer geschüttelten Inokulumsherstellung inokuliert. Der pH wurde nicht kontrolliert.

Abbildung 48 zeigt die Ergebnisse der Inokulumsherstellung im Rührkesselreaktor. Der pH begann sofort nach der Inokulation zu fallen. Bis 22 h fiel der pH fast linear von pH 5,7 auf pH 3,7. Bis zum Prozessende bei 25 h war die Abnahme geringer und der pH betrug 3,6. Das Wachstum von *Gluconacetobacter xylinus* begann nach 8 - 14 h. Von 16 h bis 22 h war die Zunahme der Biotrockenmasse annähernd linear. Die maximale Wachstumsrate  $\mu$  in dieser Phase betrug  $0,17\text{ h}^{-1}$ . Die Glukosekonzentration fiel bis 16 h nur relativ langsam von  $20\text{ g L}^{-1}$  auf  $14\text{ g L}^{-1}$ . Bis 22 h war der Abfall nahezu linear. Die eingesetzte Glukose wurde sofort zu Glukonsäure oxidiert. Nach 22 h wurden  $16\text{ g L}^{-1}$  Glukonsäure erreicht. Bis zum Prozessende blieb die Glukonsäurekonzentration konstant. Vor 8 h fand kein Wachstum von *Gluconacetobacter xylinus* statt. In dieser Phase wurden 62 % der Glukose (mol/mol) zu Glukonsäure oxidiert. Zwischen 16 h und 22 h war der Verlauf der Konzentrationen von Glukose und Glukonsäure annähernd linear. Die zellspezifischen Produktionsraten von Glukonsäure ( $q_{GA}$ ) und die Aufnahmeraten von Glukose ( $-q_{GK}$ ) fielen jedoch in dieser Phase auf Grund der steigenden Biomasse. Die maximale spezifische Aufnahmerate von Glukose wurde mit  $-4,4\text{ g g}_{BTM}^{-1}\text{ h}^{-1}$  bei 16 h bestimmt. Die maximale spezifische Produktionsrate von Glukonsäure bei 18 h betrug  $4,8\text{ g g}_{BTM}^{-1}\text{ h}^{-1}$ . Im Unterschied zu den Daten aus den Schüttelkolbenversuchen war kein Verbrauch von Glukonsäure erkennbar.

Es wurde eine mit den Schüttelkolbenversuchen vergleichbare maximale Wachstumsrate und Ausbeute an Glukonsäure erreicht. Die erreichte Biomasse im Rührkesselreaktor nach 25 h betrug jedoch nur etwa ein Drittel der erreichten Biotrockenmasse im Schüttelkolben

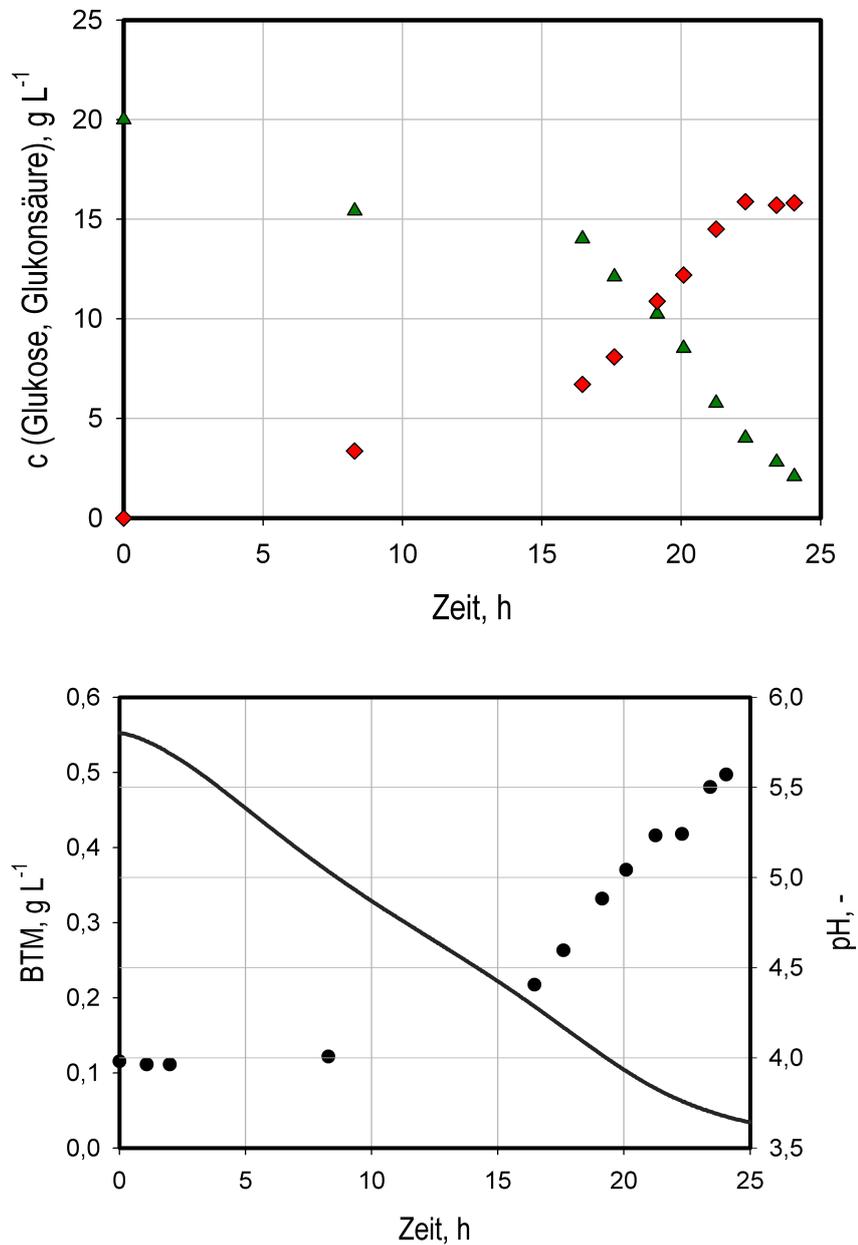


Abbildung 48: Inokulumsherstellung im Rührkesselreaktor mit 0,08 % (v/v) Cellulase im  $\text{HS}^+$  Medium ( $V=1 \text{ L}$ ). *Gluconacetobacter xylinus* Biotrockenmasse ( $\bullet$ ), Glukonsäurekonzentration ( $\blacklozenge$ ), Glukosekonzentration ( $\blacktriangle$ ), pH ( $-$ ).

nach dieser Zeit. Dies liegt wahrscheinlich an der beim Start eingesetzten Biomasse, die im Schüttelkolben nicht genau definiert war. Die geringere Biomasse in Rührkesselreaktor und die lange Verzögerungsphase führten dazu, dass ein großer Teil der Glukose zu Glukonsäure oxidiert war, bevor das Wachstum der Bakterien einsetzte.

Die Phase der Metabolisierung von Glukonsäure wurde nicht erreicht.

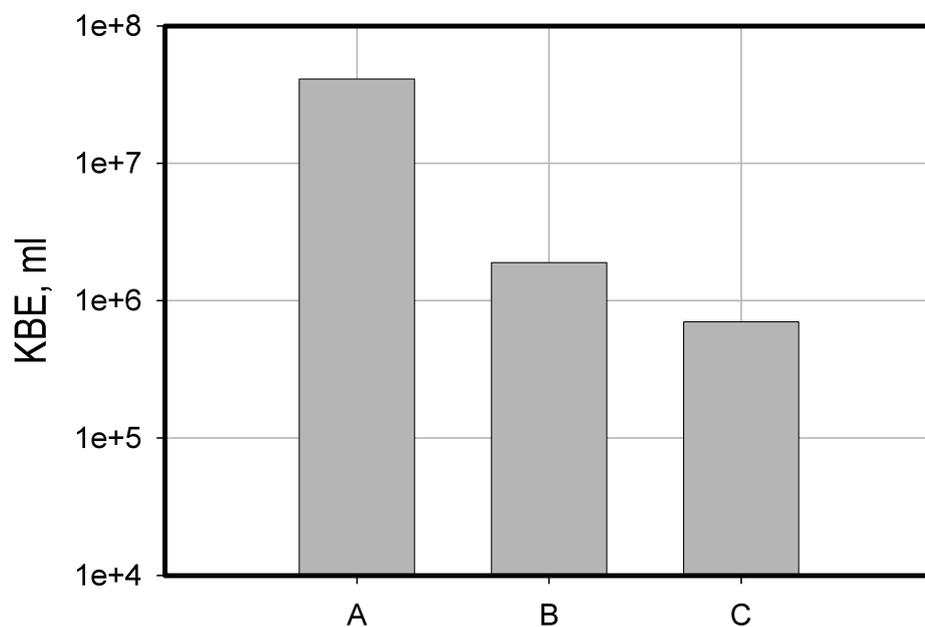


Abbildung 49: Logarithmische Darstellung der Koloniebildenden Einheiten von Celluloseproduzenten. Vor dem Einfrieren (A), nach 27 Tagen bei  $-80\text{ °C}$  (B) und 67 Tagen bei  $-80\text{ °C}$  (C).

Ein Ziel des Versuchs im Rührkesselreaktor war die Produktion eines bei  $-80\text{ °C}$  lagerfähigen Inokulums. Abbildung 49 zeigt den Verlauf der Koloniebildenden Einheiten von *Gluconacetobacter xylinus* des bei  $-80\text{ °C}$  gelagerten Inokulums. Vor dem Einfrieren wurden  $4,1 \cdot 10^7\text{ KBE ml}^{-1}$  gezählt. Durch das Einfrieren wurde die Zahl aktiver Zellen um etwa den Faktor 20 reduziert. Nach einem Monat wurden noch  $1,9 \cdot 10^6\text{ KBE ml}^{-1}$  bestimmt. Anschließend verlangsamte sich die Abnahme der Zellzahl. Nach 67 Tagen betrug die Zellzahl  $0,7 \cdot 10^5\text{ KBE ml}^{-1}$ . Die starke Abnahme der Zahl aktiver Zellen durch das Einfrieren wurde erwartet.

### 7.3 Diskussion

Der unmittelbare Abbau der Cellulose durch Zugabe einer Cellulase in das Medium ermöglicht den Einsatz klassischer Suspensionskultivierungsverfahren für *Gluconacetobacter xylinus* zur Herstellung eines Inokulums. Es ist überraschend, dass keine *Cel*<sup>-</sup> Mutanten beobachtet wurden, da die Zugabe von Cellulase in das Medium die Selektionsbedingungen nicht ändert. *Cel*<sup>+</sup> Mutanten produzieren in Suspensionskultur Cellulose ohne dadurch einen besseren Zugang zu Sauerstoff zu erhalten als *Cel*<sup>-</sup> Mutanten. Es ist ebenfalls möglich, dass die Produktion von Cellulose unter sauerstofflimitierten Bedingungen eingeschränkt ist und somit kein großer Nachteil für *Cel*<sup>+</sup> Zellen entsteht.

Die Lagerfähigkeit des Inokulums bei -80 °C konnte erst über einen kurzen Zeitraum gezeigt werden. Hier sind weitere Langzeituntersuchungen notwendig.

Ein weiteres Ziel dieses Abschnitts war es zusätzliche Informationen über den Metabolismus von *Gluconacetobacter xylinus* zu gewinnen. Die schnelle Oxidation von Substraten ist typisch für alle Essigsäurebakterien [Deppenmeier und Ehrenreich, 2008]. Auf diese Weise werden leicht verwertbare Substrate aus der Umgebung entfernt und die Bakterien verfügen durch ihre Fähigkeit die Oxidationsprodukte aufzunehmen über einen kompetitiven Vorteil gegenüber anderen Mikroorganismen. Es ist interessant, dass die Oxidation der Glukose begann, bevor das Wachstum der Bakterien einsetzte. Die membrangebundenen Dehydrogenasen sind wahrscheinlich ohne Anpassungsphase sofort aktiv. Gleichzeitig senkt die steigende Glukonsäurekonzentration durch den  $pK_s$  von 3,86 den pH. Dies ist ein zusätzlicher Vorteil von *Gluconacetobacter xylinus* gegenüber weniger säuretoleranten Bakterien. Hwang *et al.* (1999) zeigten ebenfalls für *Gluconacetobacter xylinus* die Oxidation von Glukose zu Glukonsäure und die anschließende Verwertung der Glukonsäure. Die Oxidation erfolgt hauptsächlich durch Dehydrogenasen in der inneren Membran, die direkt an die Elektronentransportkette gekoppelt sind [Shigematsu *et al.*, 2005]. Da kein PTS-System bekannt ist, muss die Regulation der Substratverwertung an anderer Stelle erfolgen [Ross *et al.*, 1991].

## 8 Online-Erfassung der Celluloseproduktion

Da die Produktion eines Pellikels ein relativ langsamer Prozess ist und mehrere Tage benötigt, war es wichtig möglichst viele Daten aus den einzelnen Ansätzen zu gewinnen. Aus diesem Grund war es das Ziel dieses Arbeitsabschnitts eine schnelle und präzise Methode zur Quantifizierung der Celluloseproduktion zu etablieren.

Häufig eingesetzte Methoden zur Quantifizierung von Biofilmen sind Trocken und anschließendes Wiegen oder eine Analyse mit einem konfokalem Mikroskop zur Bestimmung des Volumens. Auf diese Weise ist in der Regel nur eine Endpunktbestimmung möglich. Es existieren nur wenige Ansätze einer Onlineanalytik. Okkerse *et al.* (2000) quantifizierten die Biofilmbildung durch die Bestimmung der Schichthöhe mittels Lasertriangulation. Basierend auf dieser Methode wurde eine online-Messung der Schichthöhe des Pellikels auf der Membran etabliert. Es wurde erwartet, dass auf diese Weise eine genaue Kinetik der Celluloseproduktion bestimmt werden kann. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das Volumen der Celluloseschicht mit dem Trockengewicht korreliert werden kann.

### 8.1 Lasertriangulation

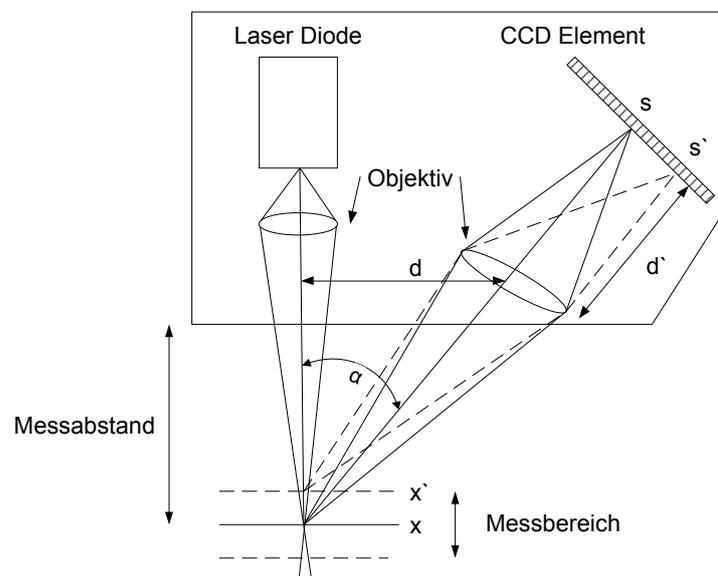


Abbildung 50: Funktionsprinzip der Lasertriangulation.

Es wurde ein Lasertriangulations Sensor (LTS) eingesetzt, um den Abstand des fest installierten Sensors zur Membran- bzw. Pellikeloberfläche zu bestimmen (Abb. 50). Das

Abstandssignal des LTS wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Die Lasertriangulation basiert darauf, dass auf eine Oberfläche fokussiertes Laserlicht mit einem mit einem bevorzugten konstanten Winkel  $\alpha$  reflektiert wird.

Durch die geometrische Gleichung (35) ist es möglich die Probenhöhe ( $xx'$ ) aus der Verschiebung des Signals auf dem CCD-Element ( $ss'$ ), aus dem Abstand der fokussierenden Linsen für die Lichtquelle und das CCD-Element ( $d$ ) und aus dem Abstand der der fokussierenden Linsen des CCD-Elements vom CCD-Element ( $d'$ ) bestimmen.

$$xx' = \frac{d \cdot d' \cdot \cos(\alpha)}{d' \cdot \sin(\alpha) + ss'} \quad (35)$$

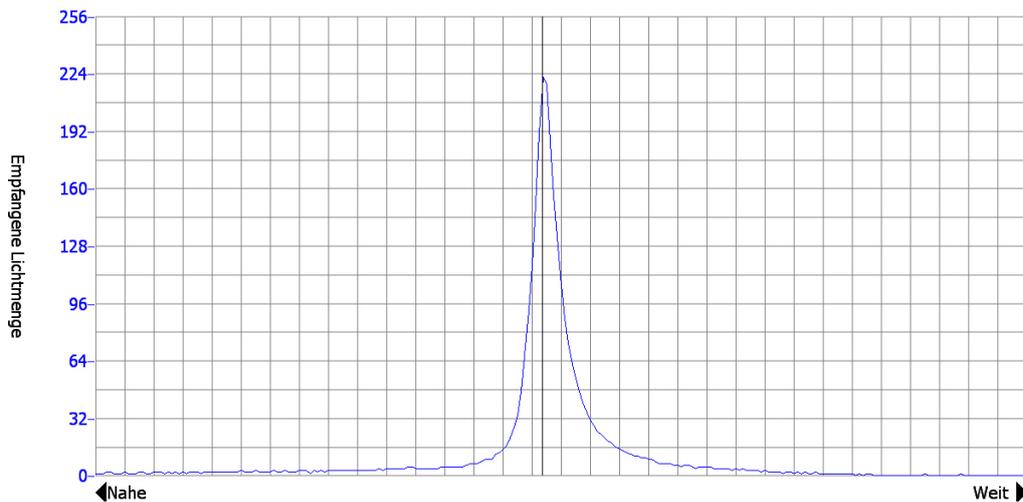


Abbildung 51: Signal des Lasersensors bei der Erfassung eines Pellikels (Screenshot).

Abbildung 51 zeigt das Signal des CCD-Elements des Lasersensors bei der Messung eines Pellikels. Es ist nur ein Maximum sichtbar und es treten keine Störungen auf, so dass der Sensor in der Lage war die Oberfläche der Cellulose zuverlässig zu erfassen.

## 8.2 Korrelation

Die Höhe des Pellikels auf der Membran konnte durch Lasertriangulation bestimmt werden. Um die Bestimmung des Trockengewichts der Cellulose zu ersetzen war es erforderlich die Schichthöhe mit dem Trockengewicht des Pellikels zu korrelieren. Bei konstanter Dichte des Pellikels wurde eine lineare Beziehung erwartet.

Da der Pellikel die gesamte der Gasphase zugängliche Oberfläche der Membran im Membranmodul bedeckt, war es möglich, das Volumen des Pellikels ( $V_{cell}$ ) basierend auf der

Höhe ( $h$ ) zu berechnen (Gl. 36).

$$V_{cell} = \pi \cdot \left(\frac{d_{Membran}}{2}\right)^2 \cdot h \quad (36)$$

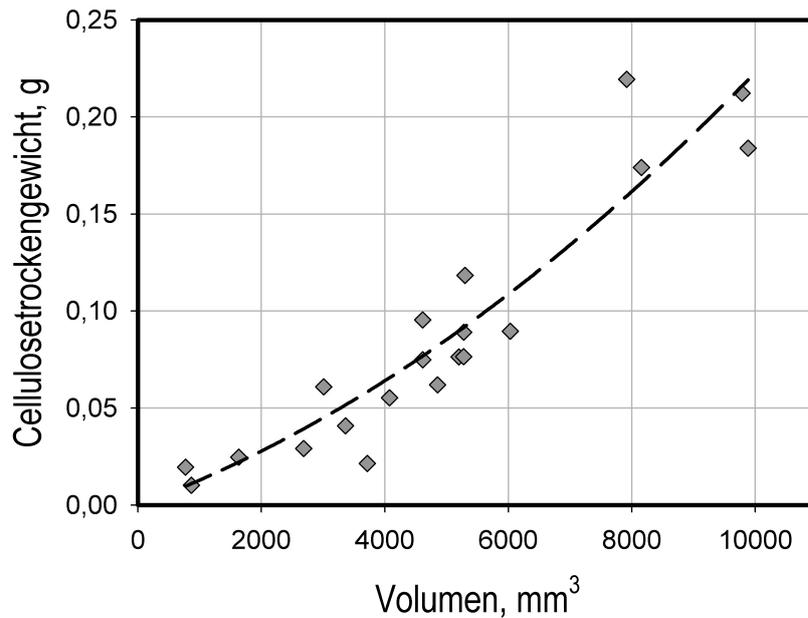


Abbildung 52: Korrelation der Volumen nativer Pellikel mit den Trockengewichten gereinigter Pellikel. Die Anpassung erfolgte durch ein Polynom 2. Ordnung.

Anschließend wurden Pellikel mit auf diese Weise bekanntem Volumen gereinigt und gefriergetrocknet. Abbildung 52 zeigt das Volumen ( $V_{cell,WW}$  [ $mm^3$ ]) und das jeweils ermittelte Trockengewicht ( $G_{cell,DW}$  [ $g$ ]) für 21 Pellikel bis zu einer Höhe von 8 mm. Die Korrelation ist nicht ideal linear. Pellikel mit einem Volumen von bis zu etwa 4000  $mm^3$  haben eine geringere Dichte als später produzierte Cellulose. Um dies in der Korrelation zu berücksichtigen wurde eine Polynom 2. Ordnung verwendet um die Daten besser wiedergeben zu können (Gl. 37).

$$G_{cell,DW} = 1,037 \cdot 10^{-9} \cdot V_{cell,WW}^2 + 1,173 \cdot 10^{-5} \cdot V_{cell,WW} \quad (37)$$

### 8.3 Diskussion

Die Messung der Höhe der sich bildenden Celluloseschicht im Membranmodul ist wichtig, um quantitative Daten zur Kinetik der Cellulosebildung zu erhalten. Eine ähnliche

Methode wurde erst ein mal zur Quantifizierung von Biofilmen eingesetzt [Okkerse *et al.*, 2000]. Das online Verfahren ist klassischen Endpunkt Methoden wie Trocknen und Wiegen, mechanischer Höhenmessung und konfokaler Mikroskopie deutlich überlegen.

Die Möglichkeit einer Korrelation des Biofilmvolumens mit dem Trockengewicht war bereits bekannt. Horn und Hempel (1997) fanden eine Korrelation zwischen der durch eine Mikrometerschraube bestimmten Höhe und dem Gewicht von Biofilmen. Es wurde allerdings ein linearer Zusammenhang ermittelt. Die genaue Korrelation ist abhängig von dem Typ des Biofilms. Die anfänglich geringere Dichte des Pellicels wurde ebenfalls bereits visuell beobachtet [Wippermann *et al.*, 2009].

## 9 Celluloseproduktion im Satzverfahren

### 9.1 Statische Oberflächenkultur

Das häufigste Verfahren zur Produktion eines Pellikels aus bakterieller Cellulose ist die statische Oberflächenkultur. Aus diesem Grund wurde dieses Verfahren als Referenz für die membrangestützte Produktion von Cellulose eingesetzt. Das Verfahren erlaubt nur eine Endpunktbestimmung des Cellulose-trockengewichts, da ohne Membran keine definierte Starthöhe für eine Laserhöhenmessung verfügbar ist. Endpunktbestimmungen erforderten eine große Zahl an Versuchen. Die Versuche wurden daher in 4 *ml* Mikrotiterplatten durchgeführt um eine große Zahl von Parallelansätzen zu ermöglichen. Zusätzlich sollte auf diese Weise direkte Informationen zur Kinetik der *Gluconacetobacter xylinus* Biomassebildung gewonnen werden, da die Biomasse nur im Endpunkt erfasst werden konnte. Alle Versuche wurden mit HS<sup>+</sup> Komplexmedium durchgeführt.

Am Ende des Versuchs wurde der Pellicel aus der Kavität entfernt, gereinigt und gefriergetrocknet um das Trockengewicht zu bestimmen. Jeder Messpunkt wurde aus je einer Mikrotiterplatte gewonnen. Die Ansätze wurden sequentiell durchgeführt. Aus dem Medium unter dem Pellicel wurden Proben entnommen, um die Glukose- und Glukonsäurekonzentration zu ermitteln. Abbildung 53 zeigt den Verlauf des Cellulose-trockengewichts und der Konzentrationen von Glukose und Glukonsäure über 480 h. Die erste Bestimmung des Cellulose-trockengewichts war nach 48 h möglich. Bis zu 96 h scheint die Zunahme nahezu linear. Die Produktionsgeschwindigkeit nahm bis 216 h ab und nach 216 h fand bis 336 h keine weitere Produktion an Cellulose statt. Schließlich nahm das Cellulose-trockengewicht bis 480 h leicht zu auf  $66,5 \text{ g m}^{-2}$ . Über die gesamte Prozesszeit wurde Glukose verbraucht. Die Konzentration fiel von  $18 \text{ g L}^{-1}$  auf  $11,3 \text{ g L}^{-1}$  in den ersten 120 h. Anschließend verlangsamte sich die Abnahme, bis bei 480 h noch  $1,6 \text{ g L}^{-1}$  Glukose verblieben. Glukonsäure wurde bereits in den ersten 24 h produziert. Von 48 h auf 120 h stieg die Konzentration stark von  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  auf  $6,0 \text{ g L}^{-1}$ . Bei 336 h wurde die maximale Konzentration von  $6,9 \text{ g L}^{-1}$  bestimmt. Anschließend fiel die Konzentration auf  $1,2 \text{ g L}^{-1}$  bei 480 h.

Die statische Oberflächenkultur zeigt Charakteristiken von *Gluconacetobacter xylinus* die auch bei der Inokulumsherstellung beobachtet wurden. Glukose wurde sofort durch Dehydrogenasen in der inneren Membran zu Glukonsäure oxidiert. Die Glukonsäureausbeute betrug bei 120 h 85 % (mol Glukonsäure/mol Glukose) und war damit noch höher als in der Schüttelkolbenkultur. Die restliche Glukose wurde nahezu vollständig für den Aufbau

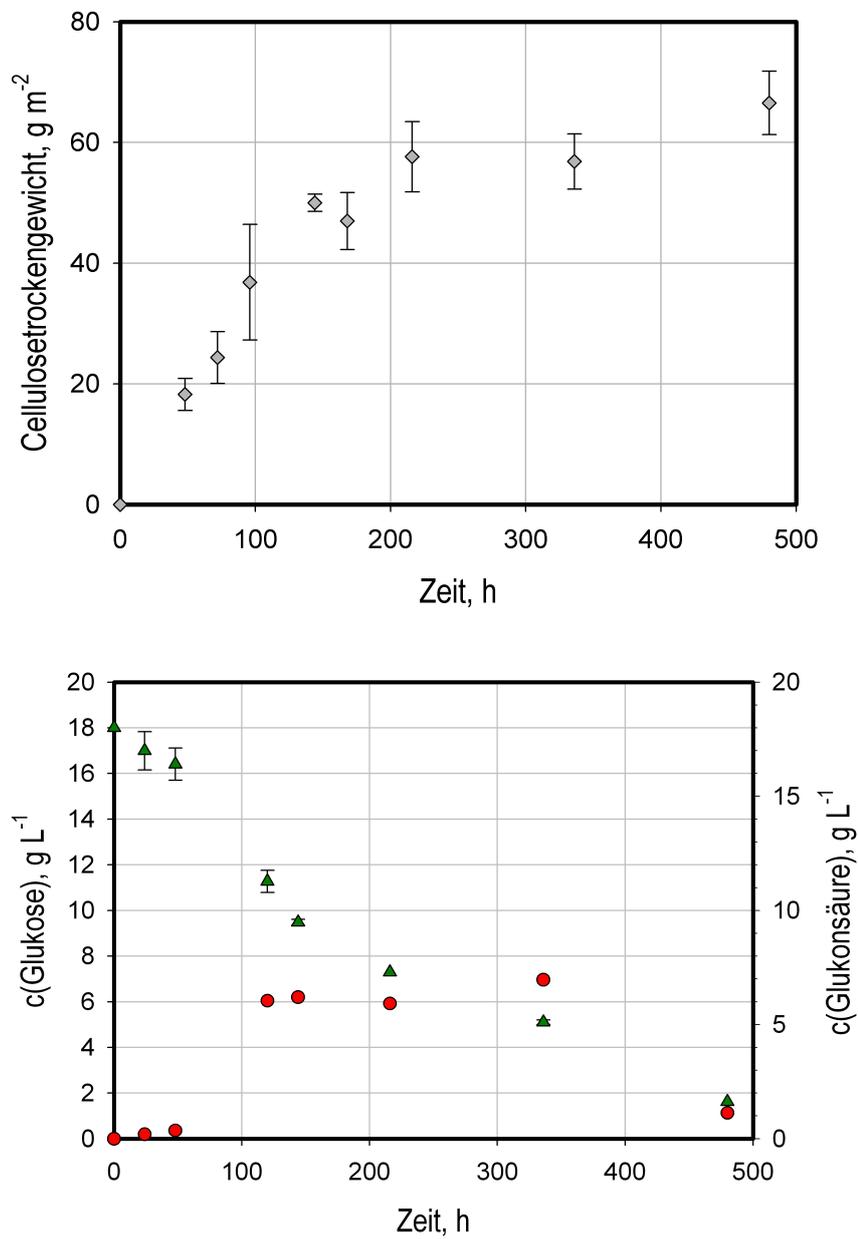


Abbildung 53: Celluloseproduktion in statischer Oberflächenkultivierung im 4 ml Maßstab mit HS<sup>+</sup> Medium. Cellulose trockengewicht (◆), Glukonsäurekonzentration (●), Glukosekonzentration (▲).

von Cellulose genutzt. Die auftretende Verzögerungsphase betrug unter 24 h. Zu diesem Zeitpunkt waren einzelne Cellulosefasern zu erkennen, die Cellulosemenge war jedoch zu gering für eine Quantifizierung. Zwischen 48 h bis 120 h wurde am meisten Glukonsäure und Cellulose gebildet.

Nach 336 h wurde Glukonsäure metabolisiert. Gleichzeitig scheint die Glukosekonzentration zu fallen. Dies würde eine simultane Verwendung von zwei Substraten bedeuten, wie bereits in der Inokulumsherstellung vermutet wurde. Zu Cellulose polymerisierte Kohlenstoffquelle kann von *Gluconacetobacter xylinus* nicht wieder verwertet werden, da die Zellen über keine Cellulaseaktivität verfügen [Ross *et al.*, 1991].

Ein Vorteil der Endpunktbestimmung ist die Möglichkeit die Biomasse von *Gluconacetobacter xylinus* im Pellikel zu quantifizieren. Es wurde die Gesamtbiomasse, sowie die metabolisch aktive Biomasse bestimmt.

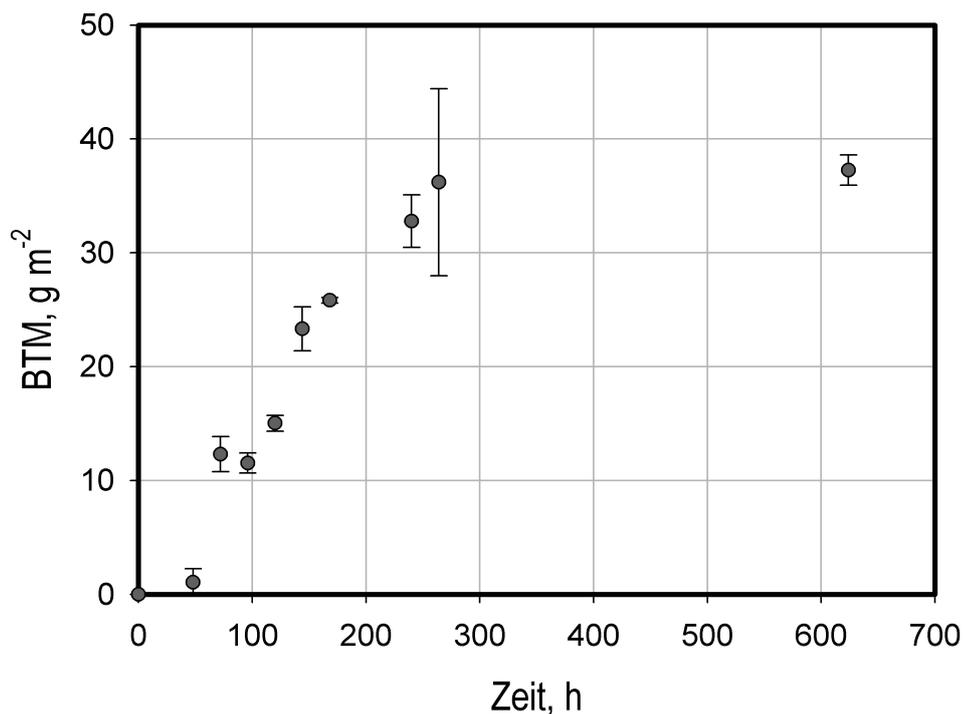


Abbildung 54: *Gluconacetobacter xylinus* Biotrockenmassebeladung in statischer Oberflächenkultivierung im 4 ml Maßstab.

Um die Gesamtbiomasse zu bestimmen, wurden die Pellikel aus der Mikrotiterplatte entnommen und die Cellulose durch eine Cellulase (Celluclast) abgebaut. Die Konzentration der freigesetzten Zellen wurden durch die Messung der optischen Dichte  $OD_{660}$  über die

Korrelationsgleichung (25) bestimmt (Abb. 54). In den ersten 40 h wurde sehr wenig *Gluconacetobacter xylinus* Biomasse produziert, obwohl hier bereits  $18 \text{ g m}^{-2}$  Cellulose-trockengewicht vorlagen. Bis 180 h war die Zunahme der Biomasse fast linear auf  $28 \text{ g m}^{-2}$ . Die maximale bestimmte Wachstumsrate betrug  $0,009 \text{ h}^{-1}$ . Die weitere Zunahme der Biomassebelastung auf  $37 \text{ g m}^{-2}$  bei 280 h verlief langsamer. Bis zum Versuchsende bei 620 h wurde keine Zunahme der Biomasse beobachtet. Es trat jedoch ebenfalls keine Absterbephase auf. Im Unterschied zur Suspensionskultur sind keine Phasen der Metabolisierung von Glukose und Glukonsäure zuzuordnen. Nach 340 h wurde Glukonsäure aufgenommen. An diesem Umkehrpunkt ist der Fehler in der Biomasse groß. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass Biomasse auch unter Verwendung von Glukonsäure produziert wurde, wie dies in der Suspensionskultur beobachtet wurde. Der Hauptteil der Biomasse wurde jedoch unter Verwendung von Glukose produziert.

Die hier eingesetzte Messmethode erlaubte keine Unterscheidung zwischen aktiver und inaktiver Biomasse.

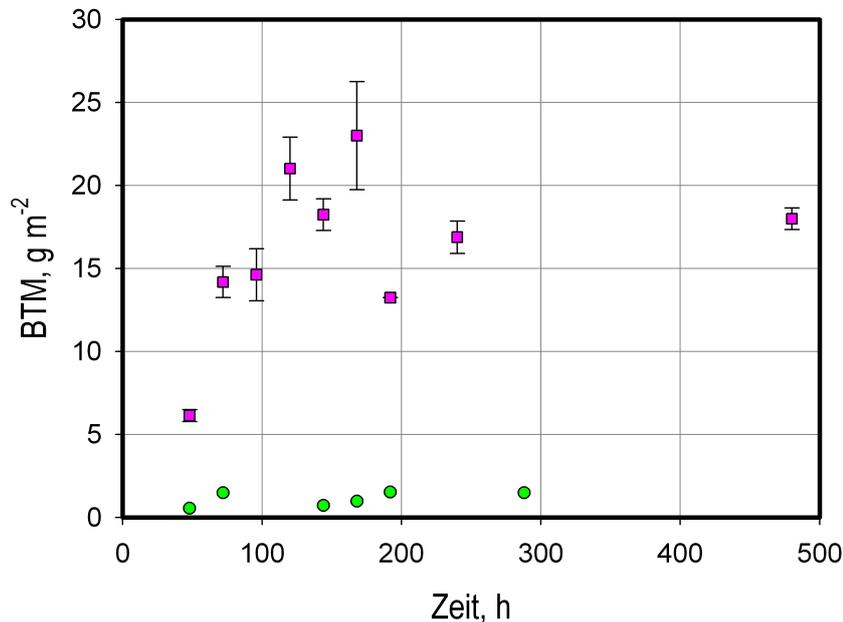


Abbildung 55: *Gluconacetobacter xylinus* Biomasse abgeschätzt über die Proteinkonzentration (■) und die metabolische Aktivität (●) in statischer Oberflächenkultivierung im 4 ml Maßstab.

Zwischen aktiver und inaktiver *Gluconacetobacter xylinus* Biomasse wurde durch zwei Analyseverfahren unterschieden, die auf der Gesamtproteinkonzentration und der meta-

bolischen Aktivität von *Gluconacetobacter xylinus* basierten. Das Gesamtprotein wurde aus dem gewaschenen Pellikel extrahiert und quantifiziert (Abb. 55). Bis 180 h nahm die über die Proteinkonzentration abgeschätzte Biomasse auf etwa  $20 \text{ g m}^{-2}$  zu. Bis zum Versuchsende bei 480 h blieb die Gesamtproteinkonzentration stabil.

Aktive Zellen weisen eine unspezifische Esteraseaktivität auf. Diese wurde genutzt, um die Umsetzung von nicht fluoreszierendem Fluoresceindiacetat zu Fluorescein zu katalysieren. Die Aktivität wurde über die Proteinkonzentration mit der Biomassebeladung korreliert. Die Ergebnisse beider Analyseverfahren sind wesentlich weniger genau, als die Bestimmung der Biomasse über die optische Dichte. Es wurde jedoch deutlich, dass nur ein kleiner Teil der Biomasse metabolisch aktiv ist. Die Biomassebeladung aktiver Zellen betrug nach 72 h  $1,5 \text{ g m}^{-2}$ . Diese blieb bis 288 h mit Schwankungen weitgehend stabil.

## 9.2 Membranmodul mit kleinem Bypassgefäß

Alle folgenden Kultivierungen wurden mit dem Polypropylenmodul mit einer Polyethersulfonmembran durchgeführt, da mit diesem Versuchsaufbau die Messung der Schichthöhe durch den Lasersensor möglich war. Es wurde ein speziell konstruiertes Bypass-Gefäß mit einem maximalen Arbeitsvolumen von  $0,1 \text{ L}$  eingesetzt. Die Probenahme und die Messung des pH erfolgten im Bypass-Gefäß. Der pH wurde nicht geregelt. Für alle Versuche wurde  $\text{HS}^+$  Komplexmedium verwendet. Die Membranoberfläche wurde mit einer Suspension von *Gluconacetobacter xylinus* aus einer statischen Inokulumherstellung mit einer Zellzahl von  $360000 \text{ KBE}$  inokuliert.

Ein typischer Verlauf der Celluloseproduktion im Satzverfahren im  $0,1 \text{ L}$  Maßstab ist in Abbildung 56 dargestellt. Die Höhe der Celluloseschicht wurde mit dem Lasersensor (LTS) erfasst. Nach einer Verzögerungsphase von ca. 24 h setzte die Cellulosebildung ein. Bis 70 h verlief die Höhenzunahme exponentiell. Hier trat ein Maximum der Produktionsraten mit  $0,059 \text{ mm h}^{-1}$  auf. Anschließend nahmen die Produktionsraten schnell auf  $0,03 \text{ mm h}^{-1}$  bei 85 h ab. Über den restlichen Prozessverlauf nahmen die Produktionsraten langsam auf  $0,015 \text{ mm h}^{-1}$  ab. Es wurde eine Höhe der Celluloseschicht auf der Membran von  $5,8 \text{ mm}$  nach 330 h erreicht.

In Abbildung 57 ist der Verlauf der Metabolitkonzentrationen, sowie der Cellulosebeladung der Membran für einen typischen Versuch im Membranmodul im  $0,1 \text{ L}$  Maßstab dargestellt. Nach einer Verzögerungsphase von 24 h begann der pH von 5,7 abzufallen. Das pH Minimum wurde nach 150 h mit pH 4,7 erreicht. Bis zum Prozessende bei 340 h

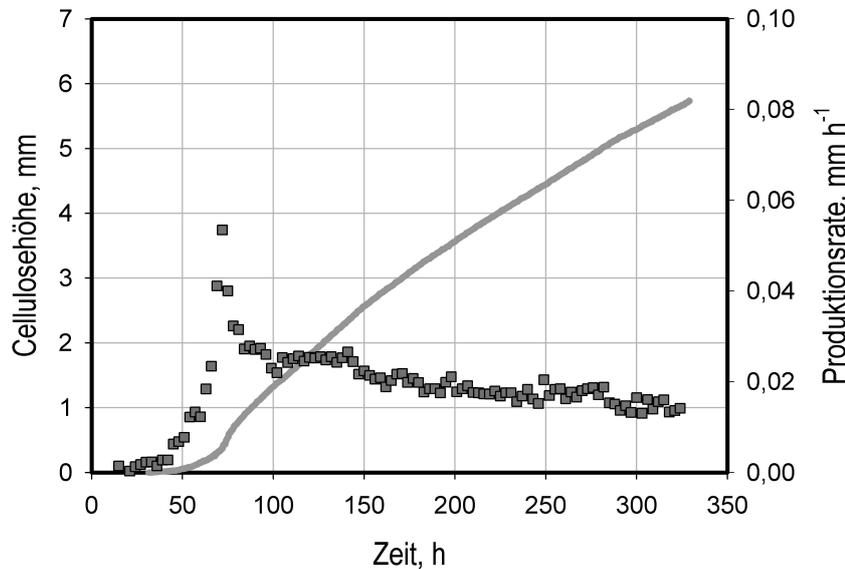


Abbildung 56: Typischer Verlauf der Celluloseproduktion im Satzverfahren im Membranmodul im 0,1 L Maßstab mit HS<sup>+</sup> Medium. Cellulosehöhe (–), Produktionsrate (■).

stieg der pH wieder auf pH 4,8. Glukose war in einer Startkonzentration von  $18 \text{ g L}^{-1}$  verfügbar. In den ersten 30 h fiel die Konzentration auf  $13,6 \text{ g L}^{-1}$ . Im weiteren Verlauf war die Abnahme der Glukosekonzentration nahezu linear. Wie in den anderen Versuchen wurde Glukonsäure produziert. Die größte Konzentrationszunahme wurde in den ersten 30 h erzielt. In dieser Phase wurde eine Ausbeute  $Y_{GA/GK}$  von  $0,56 \text{ mol [Glukonsäure] mol}^{-1} \text{ [Glukose]}$  bestimmt. Die maximal erreichte Konzentration der Glukonsäure betrug  $3,2 \text{ g L}^{-1}$ . Die Oxidation der Glukose zu Glukonsäure entspricht den Beobachtungen, die in anderen Verfahren gemacht wurden. Es wurden jedoch geringere Konzentrationen an Glukonsäure erreicht und die Glukosekonzentration fiel weniger stark als in der statischen Oberflächenkultivierung im  $4 \text{ ml}$  Maßstab. Dies ist durch das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis zu erklären, da alle Reaktionen ausschließlich im Pellikel stattfinden. Das Oberflächen zu Volumen Verhältnis war mit  $0,0159 \text{ m}^2 \text{ L}^{-1}$  um den Faktor 2,9 geringer als das der Versuche im  $4 \text{ ml}$  Maßstab von  $0,047 \text{ m}^2 \text{ L}^{-1}$ .

Das Cellulose trockengewicht wurde als Höhe des Pellikels mit dem Lasersensor (LTS) erfasst und mit Hilfe der Korrelation abgeschätzt. Die Verzögerungsphase betrug etwa 24 h. Nach 24 h trat eine kurze exponentielle Phase auf bis 70 h. Hier erreichte die Produktionsrate das Maximum von  $0,72 \text{ g [Cellulose trockengewicht] m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Nach der exponentiellen Phase fielen die Produktionsraten schnell auf etwa die Hälfte des Maximums mit

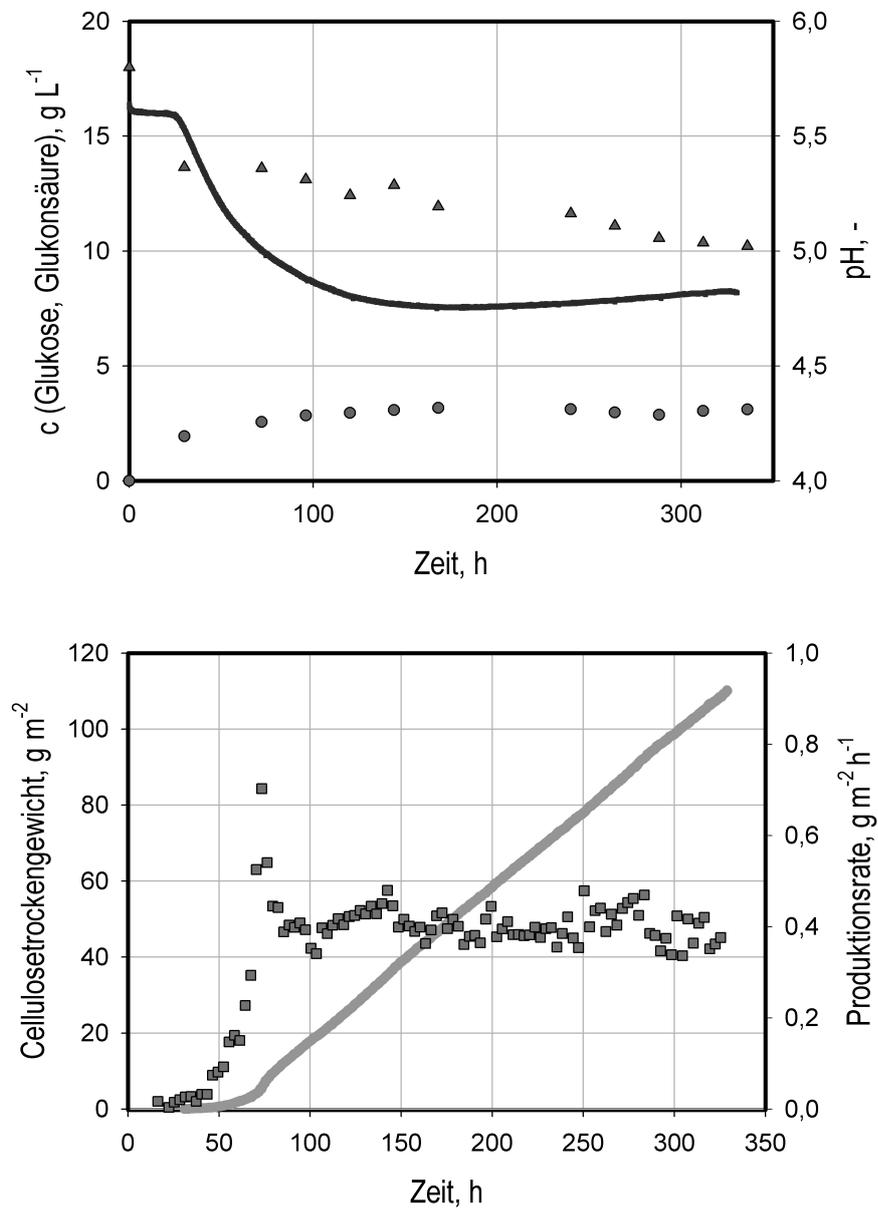


Abbildung 57: Typischer Versuchsverlauf im Satzverfahren im Membranmodul im 0,1 L Maßstab mit HS<sup>+</sup> Medium. pH (—), Glukonsäurekonzentration (●), Glukosekonzentration (▲), Cellulose trockengewicht (—), Produktionsrate (■).

$0,4 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  ab. Bis zum Prozessende bei 330 h fielen die Produktionsraten nur noch sehr langsam ab. Durch diese lange Phase mit fast konstanter Produktionsrate kann die Schichthöhe des Pellikels über die Zeit genau eingestellt werden. Über die gesamte Prozesszeit betrachtet betrug die Ausbeute von Cellulose  $Y_{P/GK} = 0,18 \text{ (g Cellulose/g Glukose)}$ . Es wurde ein Cellulose-trockengewicht von  $118 \text{ g m}^{-2}$  auf der Membran erreicht.

Die Produktionsraten scheinen sich nach 100 h nur sehr langsam zu verringern. Um dies zu untersuchen wurde ein Langzeitversuch über 830 h durchgeführt (Abb. 58).

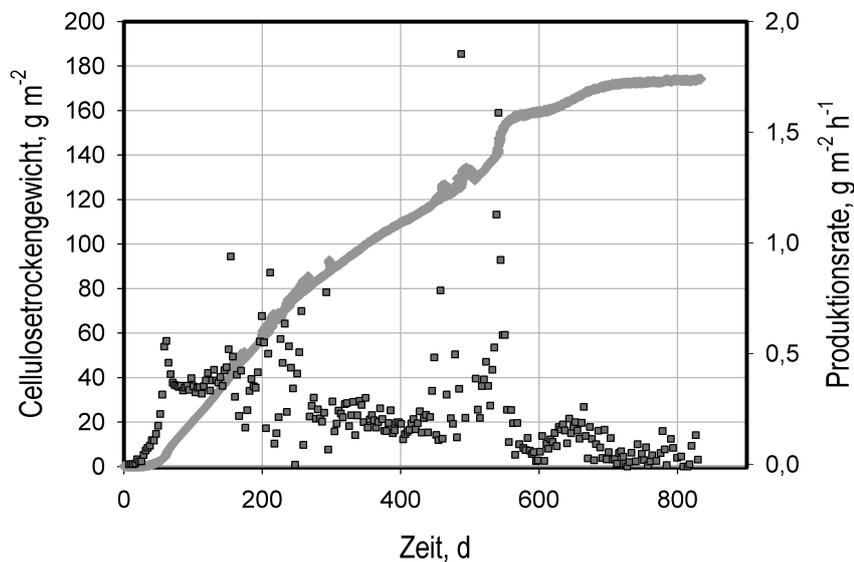


Abbildung 58: Celluloseproduktion im Membranmodul im Satzverfahren im 0,1 L Maßstab über 830 h mit HS<sup>+</sup> Medium. Cellulose-trockengewicht (—), Produktionsrate (■).

Die Produktionsraten zeigen das erwartete Maximum bei 80 h und den anschließenden Abfall auf die Hälfte der maximalen Produktionsrate. Nach etwa 200 h wurde die Abnahme der Celluloseproduktion deutlich erkennbar. Der Anstieg der Produktionsraten bei 550 h ist wahrscheinlich durch eine Veränderung der Oberflächeneigenschaften des Pellikels und eine Veränderung der Streuung des Laser hierdurch zu erklären. Dies kann durch eine teilweise Trocknung der Oberfläche verursacht worden sein. Nach 800 h fand keine weitere Celluloseproduktion mehr statt. Es wurde ein Cellulose-trockengewicht von  $174 \text{ g m}^{-2}$  erreicht, was einer Höhe von  $8 \text{ mm}$  entspricht. Dies ist wahrscheinlich die maximale Menge an Cellulose, die im  $100 \text{ ml}$  Satzverfahren produziert werden kann.

Im 0,1 L Maßstab konnte bisher kein Verbrauch von Glukonsäure beobachtet werden, wie er in anderen Versuchen aufgetreten war. Dies ist wahrscheinlich auf das Oberflächen zu

Volumen Verhältnis zurück zu führen. Um dies zu untersuchen, wurde das Volumen des Versuchsansatzes auf  $70\text{ ml}$  reduziert, wobei die Membranoberfläche konstant blieb.

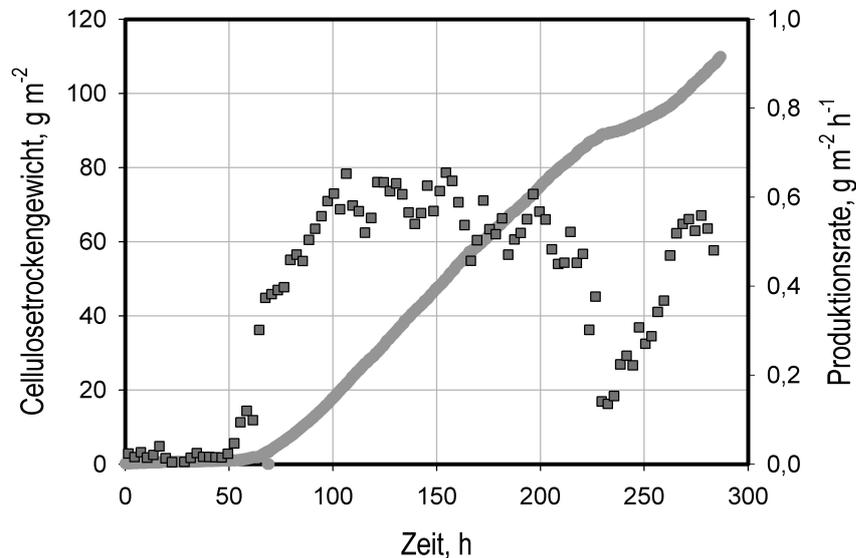


Abbildung 59: Celluloseproduktion im Membranmodul im Satzverfahren im  $0,07\text{ L}$  Maßstab mit  $\text{HS}^+$  Medium. Cellulose-trockengewicht (—), Produktionsrate (■).

Abbildung 59 zeigt das Cellulose-trockengewicht und die Produktionsraten über  $290\text{ h}$ . Die maximale Produktionsrate wurde nach  $100\text{ h}$  mit  $0,68\text{ g m}^{-2}\text{ h}^{-1}$  erreicht und trat damit  $20\text{ h}$  später auf als im  $0,1\text{ L}$  Ansatz und erreichte nicht die maximale Produktionsrate. Bis  $240\text{ h}$  fielen die Produktionsraten auf  $0,1\text{ g m}^{-2}\text{ h}^{-1}$ . Anschließend wurde jedoch ein Anstieg der Produktionsraten beobachtet.

### 9.3 Membranmodul mit großem Bypassgefäß

Das typische Maximum in den Produktionsraten der Cellulose bei etwa  $70\text{ h}$ , der im  $0,1\text{ L}$  Satzverfahren beobachtet wurde, konnte bisher nicht erklärt werden. Mögliche Einflussgrößen sind der Abfall der Glukosekonzentration oder die Akkumulation der Glukonsäure im Medium, die auch den pH beeinflusst. Um dies zu untersuchen sollte die Celluloseproduktion unter möglichst konstanten kontrollierten Bedingungen erfolgen. Zusätzlich sollte eine Kultivierung unter konstanten Bedingungen Daten für einen späteren großtechnischen Prozess liefern. Um dies zu erreichen wurde die Membranoberfläche konstant gehalten, aber das Volumen auf  $20\text{ L}$  erhöht. Zu diesem Zweck wurde ein Rührkesselreak-

tor (Techfors, Infors AG, Schweiz) im Bypass eingesetzt. Dies reduzierte das Oberflächen-Volumen-Verhältnis auf  $7,95 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ L}^{-1}$ .

Dieses Oberflächen-Volumen-Verhältnis ermöglicht die reaktionstechnische Untersuchung der membrangestützten Celluloseproduktion mit *Gluconacteobacter xylinus* unter definierten konstanten Reaktionsbedingungen.

Zunächst sollte der Einfluss des pH auf die Celluloseproduktion zwischen pH 4,3 und pH 5,7 untersucht werden, da auf Basis des bisherigen Satzverfahrens im 0,1 L Maßstab das Maximum der Celluloseproduktion bei pH 5,0 beobachtet wurde.

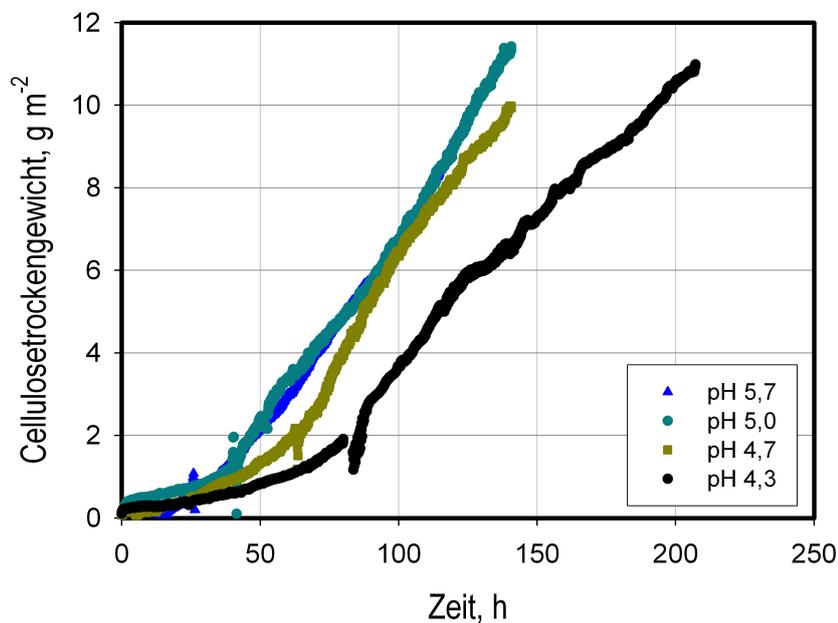


Abbildung 60: Einfluss des konstanten pH auf die membrangestützte Celluloseproduktion im 20 L Maßstab mit *Gluconacteobacter xylinus* im HS<sup>+</sup> Medium.

Während aller Versuche fand kein messbarer Abfall der Glukosekonzentration ausgehend von  $20 \text{ g L}^{-1}$  statt und auch Glukonsäure akkumulierte nicht im Medium. Abbildung 60 zeigt den Verlauf des Cellulose-trockengewichts für Versuche, die bei jeweils konstantem pH zwischen pH 4,3 und pH 5,7 durchgeführt wurden. Die Verzögerungsphase betrug 20 h in allen Versuchen. Trotz der Differenz von fast einer pH Einheit traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchen bei pH 5,7 und pH 5,0 auf. Bei pH 4,7 wurde bis 60 h weniger Cellulose produziert als bei den Versuchen mit höherem pH. Anschließend wurde jedoch mit  $0,18 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  die maximale Produktionsrate aller Versuche bei konstantem pH erreicht und bei 100 h wurde die Cellulosemenge der Versuche bei höherem pH erreicht.

Anschließend sanken die Produktionsraten im Vergleich zu den Versuchen bei pH 5,0 und pH 5,7. Versuche bei pH 4,3 zeigten eine deutlich verlangsamte Celluloseproduktion. Das Cellulose-trockengewicht von  $11,5 \text{ g m}^{-2}$ , das bei pH 5,7 in 145 h erreicht wurde, wurde erst nach mehr als 200 h erreicht.

Der optimale pH Bereich für eine Kultivierung unter konstanten Bedingungen liegt zwischen pH 5,7 und pH 5,0. Trotz kontrollierter Bedingungen konnte nicht die selbe Celluloseproduktion wie im 0,1 L Satzverfahren im Membranmodul erreicht werden. Um die Unterschiede genauer zu analysieren wurden die Produktionsraten der Kultivierungen bei pH 5,7 und pH 5,0 mit denen des 0,1 L Satzverfahrens verglichen (Abb. 61).

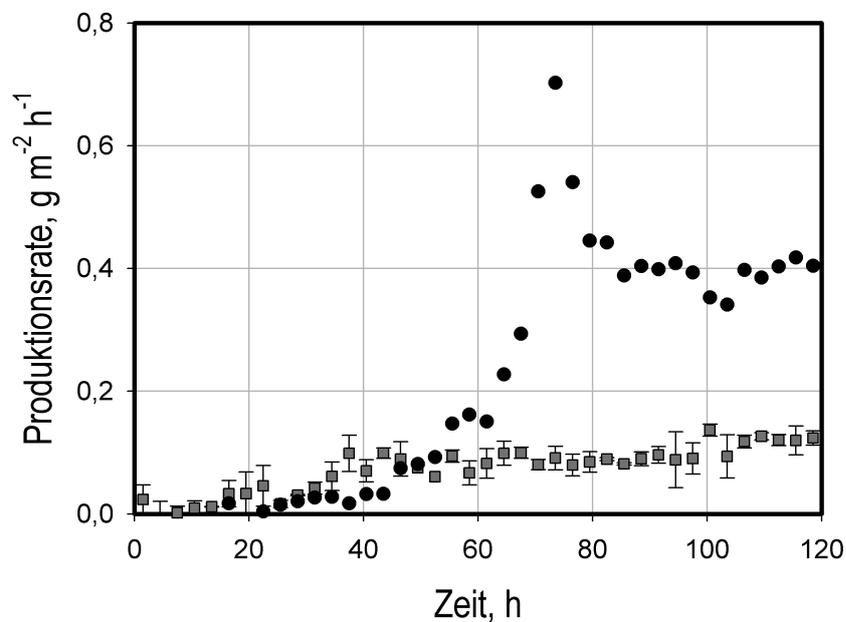


Abbildung 61: Membrangestützte Celluloseproduktionsrate von *Gluconacteobacter xylinus* im 20 L Maßstab im pH Bereich von 5,0 - 5,7 (●) und im 0,1 L Maßstab (■) als Funktion der Prozesszeit.

In der Anfangsphase wurde in den Versuchen mit konstantem pH eine höhere Produktionsrate erreicht als im 0,1 L Satzverfahren. Nach 55 h übertraf jedoch der Versuch im 0,1 L Satzverfahren die Versuche bei konstantem pH und erreichte eine Maximum von  $0,72 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  bei 70 h. Zu diesem Zeitpunkt wurden im 20 L Maßstab nur  $0,1 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  erreicht. Bis zum Prozessende stiegen die Produktionsraten auf  $0,14 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  während die Produktionsraten im 0,1 L Maßstab auf  $0,4 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  fielen. Es ist auffällig, dass das typische Maximum der Produktionsraten aus dem 0,1 L Satzverfahren im 20 L Maß-

stab nicht auftrat. Das abgeschätzte Cellulose trockengewicht ist wesentlich geringer als im 0,1 L Satzverfahren.

Um zu untersuchen, ob der pH Abfall im 0,1 L Satzverfahren hohe Produktionsraten hervorrufen kann, wurde der pH im 20 L Maßstab in einem Sprung von pH 5,7 auf pH 4,7 gesenkt (Abb. 62).

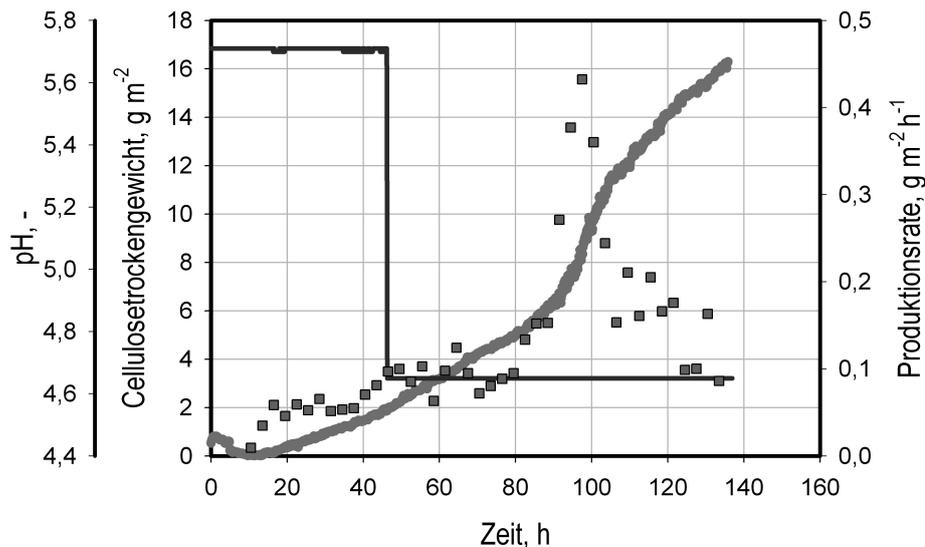


Abbildung 62: Membrangestützte Celluloseproduktion im Satzverfahren im 20 L Maßstab mit *Gluconacteobacter xylinus* mit aufgeprägter pH Sprungfunktion. pH (—), Produktionsrate (■), Cellulose trockengewicht (—).

Der pH Sprung bei 42 h hatte keinen sofortigen Effekt. Es wurde jedoch ein deutliches Maximum in den Produktionsraten bei 98 h mit  $0,44 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  erreicht. Anschließend fielen die Produktionsraten auf  $0,1 - 0,2 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Durch den pH Sprung konnte das Maximum der Produktionsraten aus dem 0,1 L Satzverfahren reproduziert werden. Der Grund für den starken Abfall der Produktionsraten ist jedoch noch nicht geklärt. Dieses Ergebnis trat reproduzierbar auf.

Wenn die Induktion der Celluloseproduktion auf den pH Sprung als Stressfaktor für *Gluconacteobacter xylinus* zurück zu führen ist, kann eventuell eine ähnliche Reaktion durch andere Stressfaktoren ausgelöst werden. Um dies zu untersuchen, wurde die Sauerstoffsättigung im Medium durch intermittierende Stickstoffbegasung gesenkt (Abb. 63).

Während der ersten Absenkung der Sauerstoffsättigung fielen die Produktionsraten, erreichten kurz darauf jedoch eine Maximum von  $0,19 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Es scheint, dass die Bakterien auf den Sauerstoffentzug mit einer verstärkten Produktion von Cellulose reagierten.

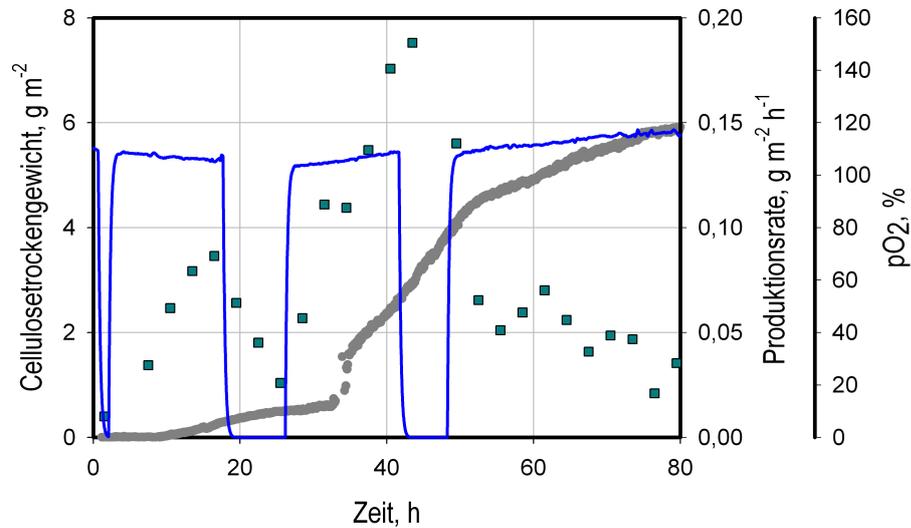


Abbildung 63: Wiederholte Absenkung des  $pO_2$  im 20 L Satzverfahren. Produktionsrate (■), Cellulose-trockengewicht (—),  $pO_2$  (—).

Dies ist jedoch im selben Versuch nicht wiederholbar. Nach einer weiteren Absenkung der Sauerstoffsättigung fielen die Produktionsraten bis zum Prozessende auf  $0,04 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Eventuell kann die Celluloseproduktion auch durch andere Stressfaktoren, wie Temperaturerniedrigungen induziert werden.

## 9.4 Diskussion

Mit abnehmender Substratkonzentration nahm die Celluloseproduktion ab. Ross *et al.* (1991) postulierten, dass die Celluloseproduktion wachstumsassoziiert ist und somit generell in Phasen hoher metabolischer Aktivität erfolgt. Die Oxidation von Glukose durch die membranständigen Dehydrogenasen stellt direkt Energie für die Zelle zur Verfügung, indem die Elektronen in die Elektronentransportkette eingespeist werden.

Da die Synthese von Cellulose von Glukose-1-P ausgeht, ist Glukose wahrscheinlich ein besseres Substrat als Glukonsäure, die erst zu Glukose reduziert werden muss. Die Abnahme in der Celluloseproduktion nach dem Maximum bei 70 h ist daher eventuell auf die niedrigere Glukosekonzentration zurück zu führen. Es scheint unwahrscheinlich, dass die Glukonsäurekonzentration sich inhibierend auf *Gluconacetobacter xylinus* auswirkt, da die Zellen in Suspensions noch bei wesentlich höheren Konzentrationen Wachstum zeigten. In der Literatur wurde ebenfalls Celluloseproduktion bei höheren Glukonsäurekonzentrationen

nen gezeigt [Shigematsu *et al.*, 2005]. Zusätzlich muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Oxidation der Glukose im Pellikel erfolgt. Da hier der Transport nur durch Diffusion erfolgt, ist die Konzentration von Glukose im Pellikel wahrscheinlich niedriger als im Medium gemessen wurde, während die Glukonsäurekonzentration im Pellikel höher ist.

Es wurde nie ein Abbau produzierter Cellulose beobachtet. *Gluconateobacter xylinus* verfügt über keine Cellulaseaktivität [Ross *et al.*, 1991]. Interessanterweise wurde keine Abnahme der *Gluconateobacter xylinus* Biomassekonzentration beobachtet. Wie in den Versuchen im 4 ml Maßstab zu erkennen, befanden sich die Zellen sogar nach 600 h noch in der stationären Phase. *Gluconateobacter xylinus* scheint eingebettet in die Cellulose über sehr lange Zeit stabil zu bleiben. Dies ist ein Unterschied zu anderen Essigsäurebakterien, die für ihre schnelle Lyse bekannt sind. Es ist jedoch nur ein geringer Teil der *Gluconateobacter xylinus* Biomasse metabolisch aktiv. Dies ist wahrscheinlich auf eine Sauerstofflimitierung zurück zu führen, da Sauerstoff nur über die Oberfläche des Pellikels in die Cellulose diffundiert.

In den Membranmodulen konnten erfolgreich Pellikel produziert werden, die äußerlich sehr dicht und homogen wirkten (Abb. 64).



Abbildung 64: Auf der Membranoberfläche produzierter Pellikel mit einer Höhe von 5 mm und einem Durchmesser von 45 mm.

Die Quantifizierung der bakteriellen Cellulose durch einen Lasertriangulationssensor im Polypropylenmodul erlaubte eine bisher nicht erreichte Genauigkeit der Celluloseproduktionsgeschwindigkeit. Die Unterscheidung der verschiedenen Produktionsphasen wäre durch

eine Endpunktbestimmung oder eine weniger präzisen Höhenmessung nicht möglich gewesen.

Im 0,1 L Satzverfahren wurde ein typisches Maximum der Produktionsraten bei 70 h beobachtet. Dies konnte im 20 L Ansatz unter konstanten Reaktionsbedingungen nicht reproduziert werden. Es scheint, dass das Maximum in den Produktionsraten nicht im normalen Verlauf der Celluloseproduktion auftritt und die Produktionsraten anschließend durch einen niedrigen pH oder die Glukosekonzentration limitiert werden. Vielmehr müssen hier Faktoren auftreten, die im 20 L Maßstab nicht berücksichtigt wurden. Eine Möglichkeit ist eine aktive Regulation der Cellulosesynthese durch *Gluconacteobacter xylinus*. Bakterielle Cellulose kann als eine spezielle Form eines Biofilms betrachtet werden. Es ist bekannt, dass Biofilmbildung in der Natur häufig Teil einer Stressantwort von Mikroorganismen auf Umweltfaktoren ist [Mah und O'Toole, 2001]. Um die maximale Celluloseproduktion zu erreichen war es nötig einen Stressfaktor, wie einen pH Sprung oder eine Reduktion der Sauerstoffsättigung, einzuführen. Dies legt nahe, dass die Celluloseproduktion nicht nur von den Substratkonzentrationen abhängt, sondern auch in erheblichem Maß aktiv reguliert wird.

Der anschließende Abfall der Produktionsraten könnte auf eine Limitierung der Versorgung mit Glukose zurück geführt werden. Da Sauerstoff wahrscheinlich nur im Oberen Teil des Pellikels zur Verfügung steht und *Gluconacteobacter xylinus* obligat aerob ist, müssen alle Nährstoffe aus dem Medium durch Diffusion durch eine wachsende Celluloseschicht bereitgestellt werden.

Im 20 L Ansatz fanden durch das geringe Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis keine messbaren Konzentrationsänderungen statt.

Durch das geringere Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis im 0,1 L Ansatz änderten sich die Glukose- und Glukonsäurekonzentrationen als Funktion der Prozesszeit. Glukonsäure wurde allerdings nicht wieder verstoffwechselt, wie es in den Referenzversuchen ohne Membran im 4 ml Maßstab zu beobachten war.

Die Ausbeute der Cellulose auf Glukose lag bei etwa 20 %. Ähnliche Ausbeuten wurden auch in der Literatur beschrieben [Hwang *et al.*, 1999]. Bae und Shoda (2005) veröffentlichten eine Ausbeute von  $Y_{P/GK} = 0,22$  (g/g) in einem Rührkesselreaktor mit 23 g L<sup>-1</sup> Glukose. In Anbetracht des kurzen Stoffwechselweges von der Glukoseaufnahme zur Cellulosesynthese scheint dies gering. Jedoch dominiert in *Gluconacteobacter xylinus* die Oxidation der Glukose zu Glukonsäure mit Ausbeuten bis zu 70 %.

## 10 Definiertes Medium

Viele Anwendungen bakterieller Cellulose liegen im medizinischen Bereich. Hier kann es für eine sichere Produktion von Vorteil sein, ein komplett definiertes Kulturmedium einzusetzen. Zusätzlich bietet ein definiertes Medium die Möglichkeit den Nährstoffverbrauch von *Gluconacetobacter xylinus* genauer zu analysieren. In der Literatur ist ein komplett definiertes Medium bekannt [Forng *et al.*, 1989]. Es konnte jedoch kein Wachstum von *Gluconacetobacter xylinus* in diesem Medium erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Gründen sollte ein komplett definiertes Medium neu entwickelt werden. Da *Gluconacetobacter xylinus* in der Natur auch in Ko-Kultur mit Hefe auftritt, wurde ein Hefemedium (YNB, "yeast nitrogen base") als Ausgangspunkt für ein definiertes Medium gewählt.

### 10.1 Optimierung

Das so erhaltene synthetische Medium wurde über 6 Generationen mit einem Genetischen Algorithmus (GAME.opt) optimiert [Link und Weuster-Botz, 2006]. Um eine große Anzahl von Parallelexperimenten zu ermöglichen, wurden die Versuche in Platten mit 24 Kavitäten durchgeführt. Jedes Medium wurde sechsfach parallel untersucht. Das Trockengewicht der Cellulose wurde als Endpunkt nach 7 Tagen bestimmt. Als Zielfunktionen wurden eine Erhöhung des Cellulose-trockengewichts und eine Reduktion der Kosten des Mediums ausgewählt. Es wurden 9 Variablen in 64 Stufen untersucht. Um alle Kombinationen zu untersuchen wären hierfür  $1,8 \cdot 10^{16}$  Mediumzusammensetzungen notwendig.

In der ersten Generation wurde nur in 4 von 15 Medien Cellulose produziert (Abb. 65). Das Ergebnis wurde drei mal reproduziert. Die Celluloseproduktion scheint stark von kleinen Schwankungen in der Zusammensetzung des Mediums beeinflusst zu werden. Trotz dieser Ausgangsposition war es dem Genetischen Algorithmus möglich, die Anzahl celluloseproduzierender Individuen in den folgenden Generationen zu erhöhen. Die Abdeckung des Suchraums von  $1,8 \cdot 10^{16}$  Mediumzusammensetzungen wirkte trotz der geringen Ausgangszahl von 90 untersuchten Individuen ausgeglichen. In Abb. 65 sind die Ergebnisse aller Medien der 6 Generationen bezüglich der Zielfunktionen zusammengefasst (Ergebnisse siehe Tab. A.3 im Anhang).

Das maximale Cellulose-trockengewicht wurde zufällig bereits in der ersten Generation von Individuum 13 erreicht. Das günstigste Medium trat in Generation 6 auf. Von allen Generationen gibt es Individuen in der Paretofront. Der genetische Algorithmus war nicht in der Lage ein Medium zu generieren, dass die Cellulosemenge des besten Individuums aus

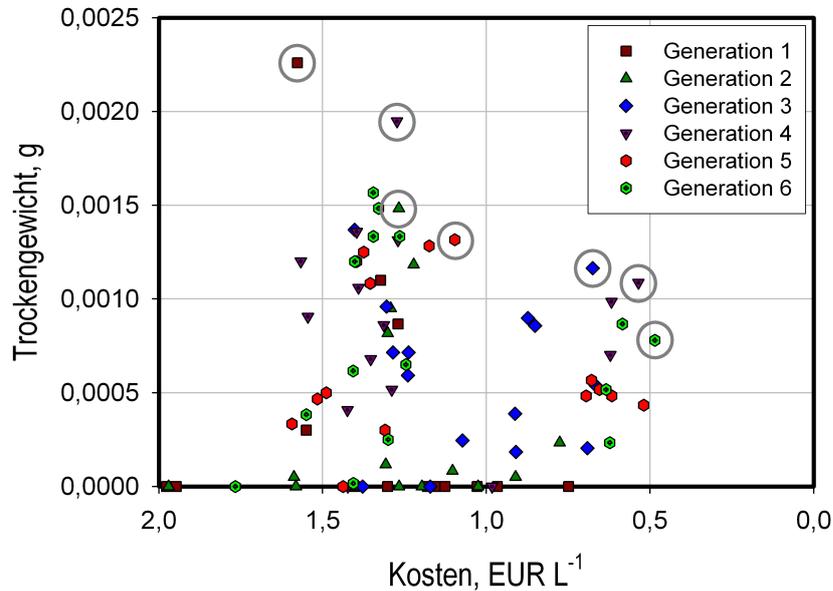


Abbildung 65: Ergebnisse der Individuen der 6 Generationen hinsichtlich der Zielfunktionen. Die Pareto Front ist gekennzeichnet.

der ersten Generation übertraf. Da das Suchverfahren zufällig initiiert wurde, ist es möglich, dass dieses Medium bereits nahe an dem bestmöglichen Ergebnis lag. Verbesserungen wurden hauptsächlich durch eine Reduktion der Kosten der Medien erreicht. In der vierten Generation erreichte ein Medium jedoch wieder annähernd das Cellulose-trockengewicht des besten Individuums aus Generation 1.

Die Varianz der einzelnen Variablen ist durch Box Plots in Abbildung 66 als Funktion der Generationszahl zusammengefasst. Die Glukosekonzentration wurde bezogen auf den Startwert auf eine leicht erhöhte Konzentration eingegrenzt. Für Glukonsäure war keine deutliche Eingrenzung des Konzentrationsbereichs erkennbar. Diese Variable war eventuell schwer zu optimieren, da Glukonsäure nicht nur eine Kohlenstoffquelle ist, sondern auch Einfluss auf den pH bei Prozessbeginn hat. Der pH wurde nicht als Variable behandelt, sondern ergab sich aus der Mediumzusammensetzung. Auch Zitronensäure hat wahrscheinlich mehrere Funktionen im Medium, da sie eine Kohlenstoffquelle sein kann, den pH beeinflusst und zusätzlich andere Medienbestandteile komplexieren kann. Die Konzentration wurde auf die mittlere Starkkonzentration eingegrenzt. Natriumdihydrogenphosphat bildet die Phosphatquelle und einen Teil des Puffers. Die Konzentrationen wurden in späteren Generationen stark reduziert, so dass Individuen der letzten Generation nur noch minimale Mengen an Natriumdihydrogenphosphat enthielten. Dies war überraschend, da

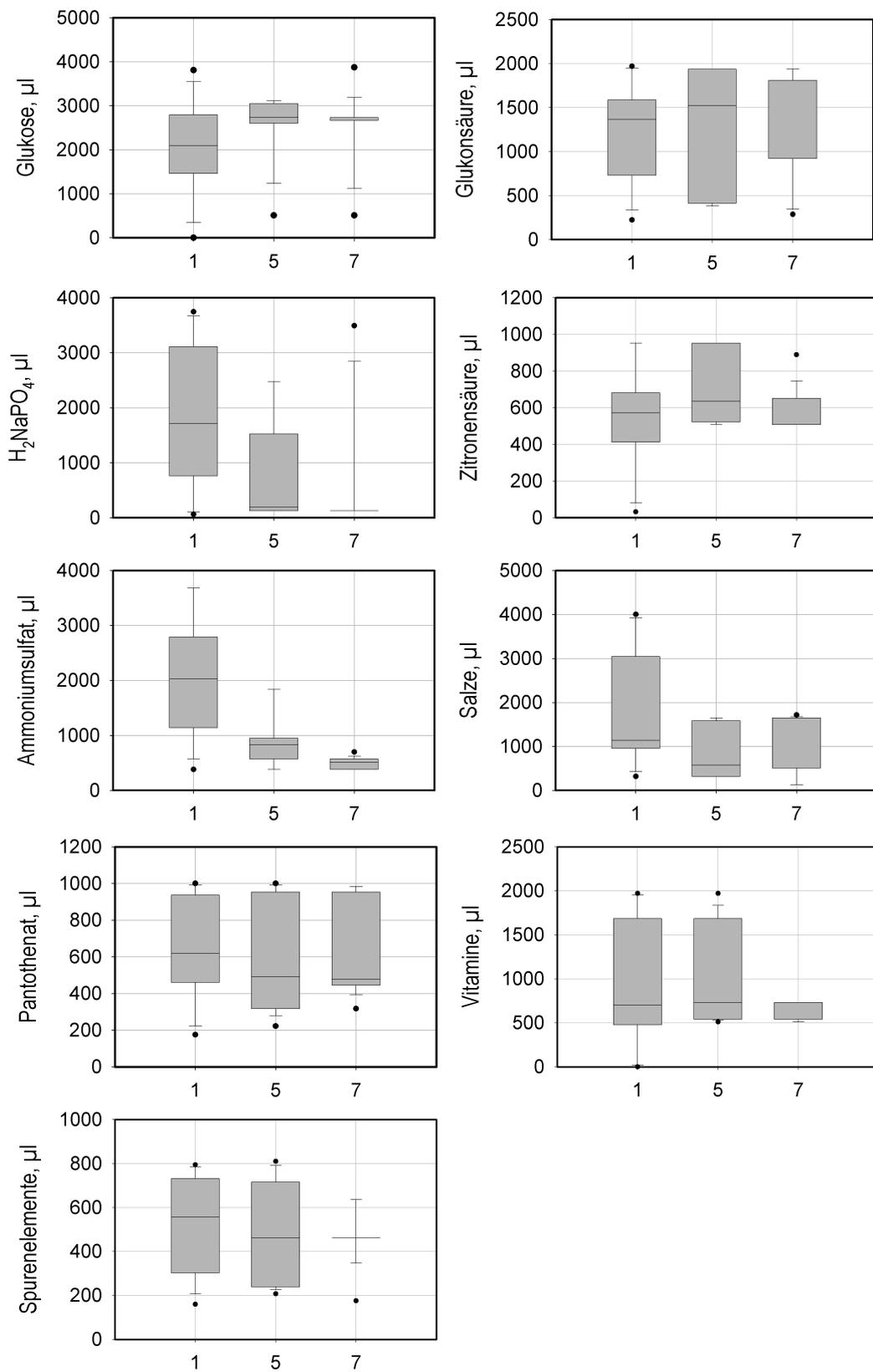


Abbildung 66: Box Plots der Variablen der Optimierung als Funktion der Generation.

Phosphat ein wichtiger Bestandteil der Zellen ist. Zu geringe Konzentrationen können die Zellteilung behindern, da zur Synthese von DNA Phosphat benötigt wird. Zusätzliche Versuche mit einer erhöhten Phosphatkonzentration verbesserten die Celluloseproduktion jedoch nicht. NaCl, CaCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> waren in der Variable "Salze" zusammengefasst. Ähnlich wie für Natriumdihydrogenphosphat wurde hier die Bandbreite und die Konzentration in späteren Generationen gesenkt. Auch Ammoniumsulfat wurde in ähnlicher Weise reduziert. Die verbleibende Menge an Sulfat scheint wie bei Phosphat ausreichend für das Wachstum von *Gluconacetobacter xylinus* zu sein. Es wurde erwartet, dass Pantothenat großen Einfluss auf die Celluloseproduktion hat, da das Molekül eine Vorstufe zu Acetyl-CoA ist. Eine sehr geringe Konzentration könnte den Eintritt von Metaboliten in den Zitratzyklus behindern und damit den Stofffluss zur Cellulosesynthese erhöhen. Es wurde jedoch kein deutlicher Einfluss erkennbar. Die Bandbreite der Konzentrationen wurde nicht reduziert. Andere regulatorische Mechanismen überlagern wahrscheinlich den Effekt von Pantothenat. Bis zur fünften Generation war der Box Plot der Vitamine unverändert. In der letzten Generation wurde jedoch die Bandbreite reduziert und die mittlere Konzentration wurde auf die Hälfte der Startkonzentration reduziert. Die Konzentration der Spurenelemente wurde auf etwa die mittlere Startkonzentration bestätigt. Auf Grund der geringen Konzentrationen spielen die Vitamine und Spurenelemente nahezu keine Rolle für die Kosten des Mediums.

Das im Komplexmedium (HS<sup>+</sup>) erzielte Cellulose-trockengewicht konnte in keinem synthetischen Medium erreicht werden (Abb. 67). Das maximal erreichte Trockengewicht beträgt nur ein Drittel des Trockengewichts aus dem Komplexmedium. Werden beide Zielfunktionen berücksichtigt, dominiert das (HS<sup>+</sup>) Medium jedoch nur ein Individuum der Pareto Front. Wird die Priorität auf die Kostenreduktion des synthetischen Mediums gelegt, sind fast alle Individuen der Pareto Front dem Komplexmedium überlegen. Das günstigste Medium aus Generation 6 kostet nur 0,5 EUR L<sup>-1</sup>, gegenüber 1,6 EUR L<sup>-1</sup> für das (HS<sup>+</sup>) Medium.

Da das Cellulose-trockengewicht als einzige Messgröße nach 7 Tagen als Endpunkt bestimmt wurde, sind die Medien aus der Optimierung auf diese speziellen Bedingungen hin optimiert. Im weiteren sollen die besten Medien im Membranmodul validiert werden.

Tabelle 22 zeigt die Zusammensetzung des Mediums mit dem die maximale Menge an Cellulose erreicht wurde (Generation1/Individuum 13).

Tabelle 22: Zusammensetzung des Mediums mit dem die maximale Cellulosemenge erreicht wurde.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
	<i>g L<sup>-1</sup></i>
Glukose	27,3
Glukonsäure	19,4
Zitronensäure	1,16
HNa <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,43
MgSO <sub>4</sub>	0,31
NaCl	0,063
CaCl <sub>2</sub>	0,063
Ammoniumsulfat	4,6
	<i>mg L<sup>-1</sup></i>
Calcium Pantothenat	0,34
Biotin	0,001
Folsäure	0,001
Myo-Inositol	1,1
Nikotinamid	0,22
p-Aminobenzoe Säure	0,11
Pyridoxin Hydrochlorid	0,22
Riboflavin	0,11
Thiamin Hydrochlorid	0,22
Methionin	10,8
Kaliumiodid	0,09
Borsäure	0,46
Kupfersulfat	0,04
Eisenchlorid	0,18
Mangansulfat	0,37
Natriummolybdat	0,18
Zinksulfat	0,37

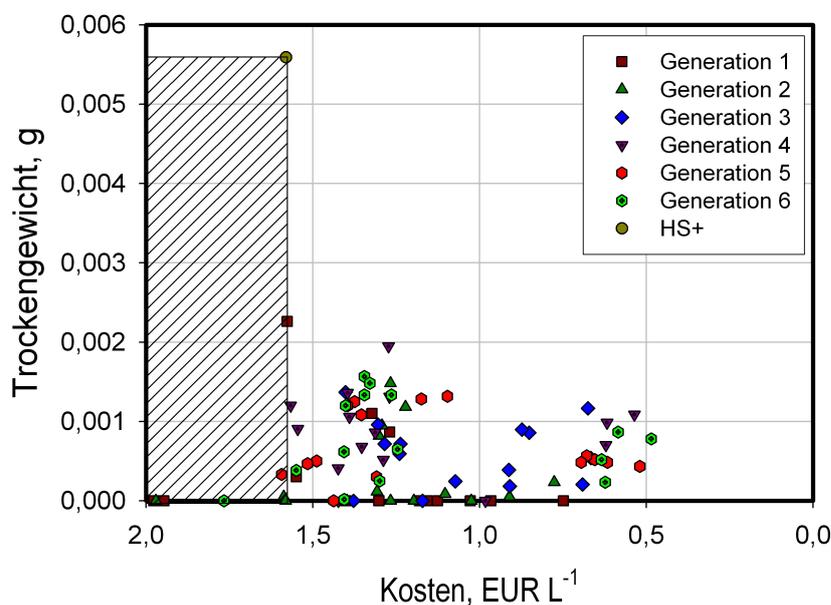


Abbildung 67: Vergleich der Optimierung des synthetischen Mediums mit der Komplexmediumreferenz.

## 10.2 Validierung

Um die Ergebnisse der Optimierung eines synthetischen Mediums im 4 *ml* Maßstab zu validieren, wurden Versuche im Glas- und Polypropylenmembranmodul im 0,1 *L* Maßstab durchgeführt. Da für diese Arbeit eine hohe Celluloseproduktion Priorität hatte, wurde das Medium, in dem das höchste Cellulose-trockengewicht erreicht wurde, bevorzugt untersucht (G1/I13).

Abbildung 68 zeigt den Verlauf der Konzentrationen von Glukose, Glukonsäure und den pH einer Kultivierung im Membranverfahren mit dem synthetischen Medium (G1/I13). Die Glukosekonzentration fiel von 27  $g L^{-1}$  auf 15,2  $g L^{-1}$  in 168 h. Von 144 h bis 168 h wurde nahezu keine Glukose mehr verbraucht. Im Unterschied zum Komplexmedium enthielt das synthetische Medium auch Glukonsäure in einer Startkonzentration von 18  $g L^{-1}$ . Nach 108 h zeigte sich nur ein leichter Anstieg der Konzentration auf 19,9  $g L^{-1}$ . Anschließend stieg die Konzentration nur sehr geringfügig auf 20,6  $g L^{-1}$  bei Prozessende. Der Start pH des Mediums liegt bei 4,8. Bis 25 h war eine leichten Anstieg des pH auf 4,9 zu beobachten, der im Komplexmedium nicht auftrat. Anschließend fiel der pH auf 4,1 nach 168 h.

Die Celluloseproduktion bei der Kultivierung im Membranverfahren ist in Abbildung 69

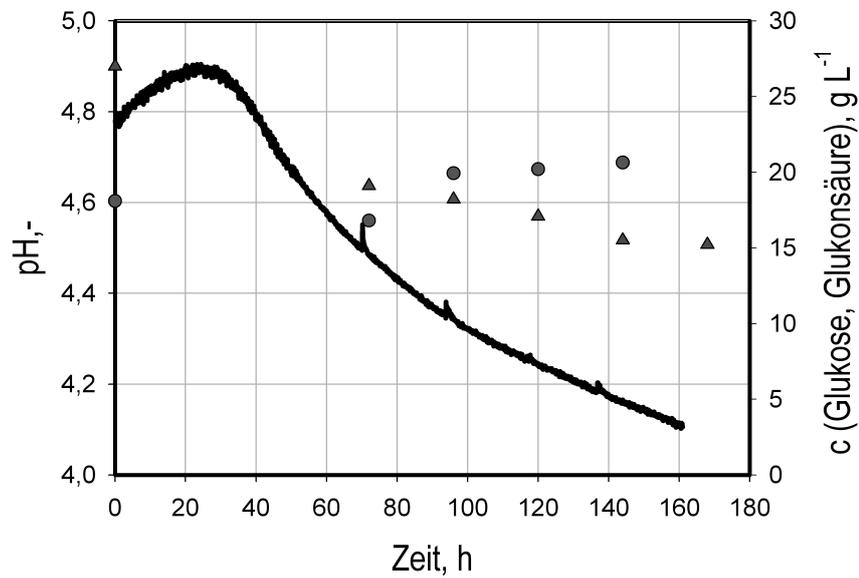


Abbildung 68: Verlauf der Metabolitkonzentrationen und des pH im Membranverfahren zur Herstellung von Cellulose mit *Gluconacetobacter xylinus* im 0,1 L Maßstab mit dem synthetischen Medium (G1/I13). pH (—), Glukonsäurekonzentration (●), Glukosekonzentration (▲).

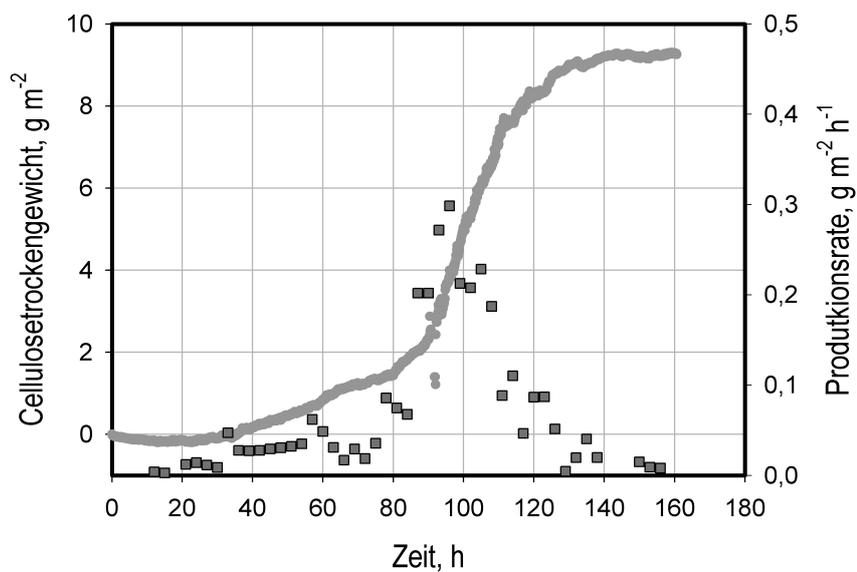


Abbildung 69: Celluloseproduktion im Membranmodul mit dem synthetischen Medium (G1/I13) im 0,1 L Maßstab. Cellulose-trockengewicht (—), Produktionsrate (■).

dargestellt. Nach einer Verzögerungsphase von 20 h setzte die Celluloseproduktion ein. Die maximale Produktionsrate wurde bei 96 h mit  $0,28 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  erreicht. Nach 140 h fiel die Produktionsrate bereits auf  $0 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Dies führte zu einer sigmoidalen Kurve für das Cellulose-trockengewicht. Insgesamt wurden  $9,6 \text{ g m}^{-2}$  Cellulose produziert.

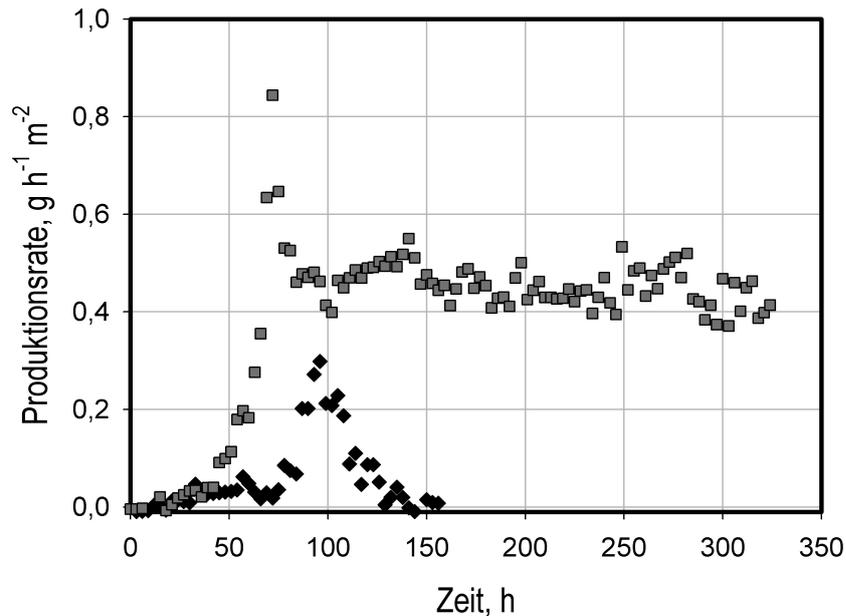


Abbildung 70: Celluloseproduktionsraten ( $q_{cell}$ ) des Komplexmediums (■) und des synthetischen Mediums (◆).

Durch den Vergleich der Produktionsraten werden die Unterschiede der Celluloseproduktion im Komplexmedium und im synthetischen Medium deutlich (Abb. 70). Die Celluloseproduktion im synthetischen Medium begann parallel zum Komplexmedium und verlief bis 40 h ähnlich. Das typische Maximum der Produktionsraten aus dem Komplexmedium trat auch im synthetischen Medium auf. Es lag allerdings 20 h später und erreichte 40 % des Wertes aus dem Komplexmedium. Anschließend fiel die Celluloseproduktion im synthetischen Medium jedoch bis 150 h stark ab. Nach 150 h wurde keine Cellulose mehr produziert. Hier zeigt sich der deutlichste Unterschied zum Komplexmedium.

Im folgenden wurde untersucht, ob das synthetische Medium die Morphologie von *Glucanacetobacter xylinus* beeinflusst. Abbildung 71 zeigt Zellen auf einem Pellicel, der mit dem synthetischen Medium produziert wurde. Die Morphologie vieler Zellen weist deutliche Unterschiede zu der kurzen Stäbchenform auf, die von Kultivierungen mit  $\text{HS}^+$  bekannt war. Es wurden Zellen beobachtet, die länger als  $20 \mu\text{m}$  zu sein scheinen. Zusätzlich wa-

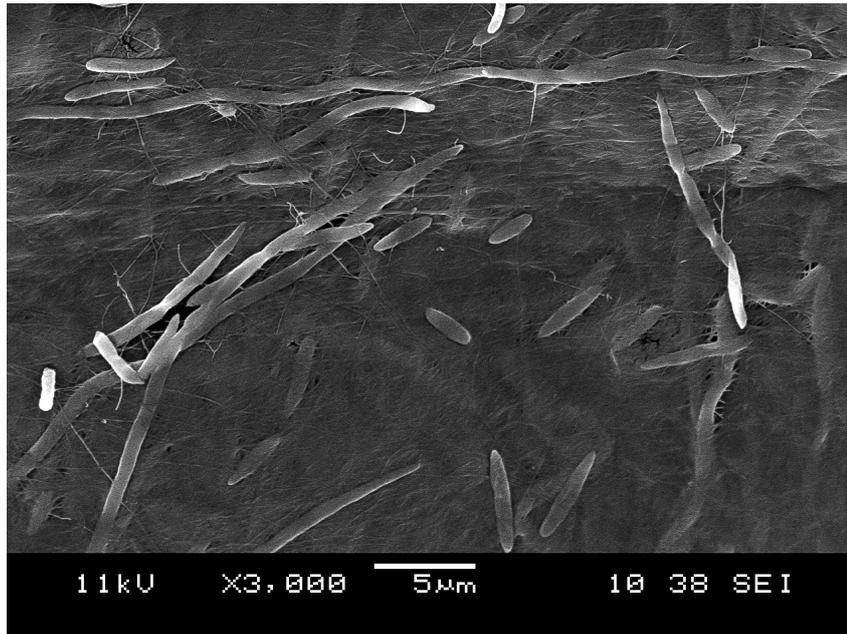


Abbildung 71: Morphologie von *G. xylinus* im synthetischen Medium (REM).

ren die Zellen entlang der Längsachse verdrillt. Dies könnte auf Fehler in der Zellteilung verursacht durch das synthetische Medium hinweisen.

### 10.3 Diskussion

Für die Kultivierung von *Gluconacetobacter xylinus* sind mehrere semisynthetische Medien bekannt [Chao *et al.*, 2001]. Diese enthalten in der Regel eine undefinierte Komponente wie CSL ("corn steep liquor"). CSL kann Aminosäuren und andere Stoffe enthalten. Von Forng *et al.* (1998) ist ein komplett synthetisches Medium publiziert. Das Medium enthält jedoch keine Spurenelemente und nur Nikotinamid als Vitamin. Für den eingesetzten Stamm *Gluconacetobacter xylinus* DSM 2325 konnte kein Wachstum in diesem Minimalmedium gezeigt werden. Aus diesen Gründen war kein synthetisches Medium verfügbar. YNB wurde als Basis für die Optimierung eines synthetischen Mediums gewählt, da *Gluconacetobacter xylinus* in der Natur unter anderem in Ko-Kultur mit Hefen in Kombucha vorkommt [Teoh *et al.*, 2004]. Ein genetischer Algorithmus wurde eingesetzt, da nur wenig über die spezifischen Bedürfnisse der Bakterien bekannt war und so Variablen in einem großen Bereich variiert werden mussten. In der zufällig initiierten ersten Generation produzierten nur wenige Individuen Cellulose. GAME.opt war dennoch in der Lage das Medium in den nachfolgenden Generationen zu verbessern. Dennoch konnte die Celluloseproduktion in einem komplett definierten Medium gezeigt werden.

Die Ergebnisse aus der Optimierung konnten im Membranmodul validiert werden. Hier wurde deutlich, dass ein limitierender Faktor im synthetischen Medium vorliegt, der im Komplexmedium nicht auftritt. Eine Möglichkeit ist, dass die Konzentration der Glukonsäure mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  inhibierend werden könnte. Eine Reduktion der Glukonsäurekonzentration führte jedoch zu keiner Verbesserung der Celluloseproduktion. Auch der pH fällt nicht unter 4 und ist somit nicht inhibierend. Es ist interessant, dass dennoch 40 % der maximalen Produktionsrate des Komplexmediums erreicht wurden. Anfänglich scheinen die Bedingungen des synthetischen Mediums für die Celluloseproduktion geeignet zu sein. Es ist daher denkbar, dass Komponenten des Medium nicht stabil oder zu gering konzentriert sind. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass nicht alle Kultivierungen mit dem Komplexmedium erfolgreich waren. In einigen Fällen ist es nach Inokulum den Zellen nicht gelungen sich an das synthetische Medium anzupassen und es wurde keine Cellulose produziert.

## 11 Analyse des Stofftransports im Pellicle

Abbildung 97 zeigt schematisch die wichtigsten Stofftransportvorgänge im Pellicel.

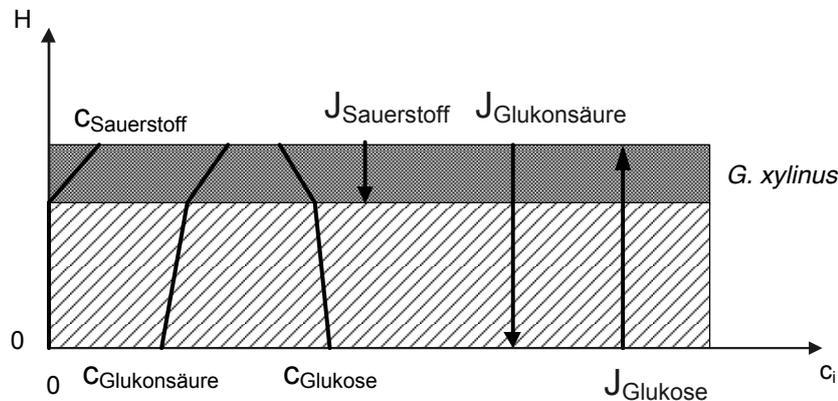


Abbildung 72: Stofftransport und Gradienten im Pellicel. Die Eindringtiefe von Sauerstoff definiert die aktive Schicht von *Gluconacetobacter xylinus*.

Sauerstoff wird über die Oberfläche des Pellicels bereitgestellt, während Glukose von unten über die Membran in den Pellicel diffundiert. Glukose wird von *Gluconacetobacter xylinus* zu einem Teil zu Glukonsäure oxidiert, die aus dem Pellicel in das Kulturmedium zurück diffundiert. *Gluconacetobacter xylinus* ist obligat aerob. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Zellen nur metabolisch aktiv sind, wenn sie Zugang zu Sauerstoff haben. Dies bedeutet, dass Reaktionen hauptsächlich in der oberen Schicht des Pellicels stattfinden, der von Sauerstoff durchdrungen wird. Auf Grund der durch den wachsenden Pellicel teilweise erheblichen Diffusionsstrecke ist davon auszugehen, dass die im Medium gemessenen Konzentrationen der Nährstoffe nicht den eigentlichen Konzentrationen in der aktiven Schicht des Pellicels entsprechen.

Um dies quantifizieren zu können, wurde das Eindringen von Sauerstoff in den Pellicel und der Transport von Nährstoffen in der Cellulosematrix untersucht.

### 11.1 Nährstoffe

Alle Nährstoffe müssen in den Pellicel diffundieren, bevor sie *Gluconacetobacter xylinus* zur Verfügung stehen. Daher wurde die Diffusion von KCl und Glukose durch bakterielle Cellulose untersucht.

Hierfür wurde eine Diffusionskammer konstruiert, die auf dem Glasmodul basiert (Abb. 73) [Grzegorzczyn *et al.*, 2008]. Eine Hälfte des Glasmoduls bildet die untere Kammer.

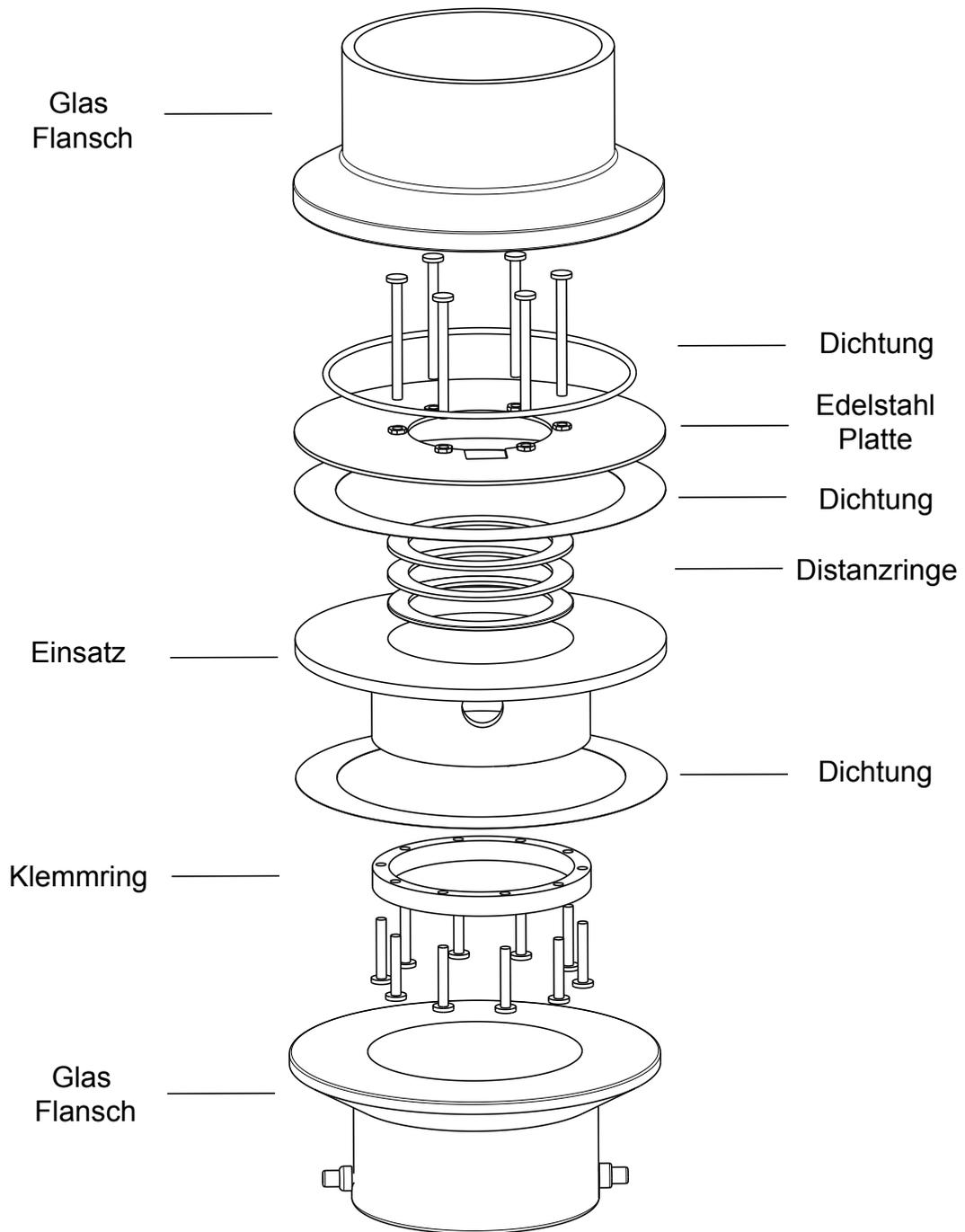


Abbildung 73: Diffusionskammer basierend auf dem Glasmodul. Pellikel wurden in den Polypropylen Einsatz integriert.

Die obere Kammer besteht aus einem offenen Glasflansch. Es wurden Pellikel bekannter Höhe in den Polypropylen-Einsatz an Stelle der PES Membran integriert (Tab. 23). Auf diese Weise ist sichergestellt, dass die Orientierung der Pellikel der im Membranverfahren entspricht.

Tabelle 23: Dicke der eingesetzten Pellikel.

Probe	1	2	3
Dicke [mm]	0,7	1,7	3,2

Beide Kammern wurden gerührt, um eine homogene Durchmischung der Flüssigphase zu erreichen und die Dicke der Konzentrationsgrenzschichten auf der Pellikeloberfläche gering zu halten. Die untere Kammer wurde durch einen Magnetrührer durchmischt, die obere Kammer durch einen Tauchrührer. Konzentrationsgrenzschichten wurden vernachlässigt. Die Versuche wurden bei ca. 30 °C durchgeführt.

Um einen Konzentrationsgradient zwischen den Kammern herzustellen wurde der Analyt als Sprungfunktion in die untere Kammer eingebracht. Die Antwort wurde in der oberen Kammer gemessen.

Da durch Verdunstung die Konzentration in der oberen Kammer scheinbar erhöht werden kann, wurde das verdunstete Volumen ( $V_{verd}$ ) linear angenähert (Gl. 38).

$$V_{verd}(t) = \dot{V}_{verd} \cdot \Delta t \quad (38)$$

Die Konzentration in der oberen Kammer ( $c_{oben}(t)$ ) ist durch die Masse des Stoffes, der in die Kammer diffundiert ( $m_{oben}(t)$ ) und das Startvolumen ( $V_{start,oben}$ ) gegeben. In Gleichung 39 wurde, um  $c_{oben}(t)$  zu berechnen, zusätzlich die Verdunstung und das Probenvolumen berücksichtigt.

$$c_{oben}(t) = \frac{m_{oben}(t)}{V_{start,oben}} = \frac{c_{gemessen,oben}(t) \cdot (V_{start,oben} - V_{verd}(t) - n_{proben}(t) \cdot V_{probe})}{V_{start,oben}} \quad (39)$$

Die Konzentration in der unteren Kammer zum Zeitpunkt  $t = 0$  ist durch die eingebrachte Masse des Stoffes ( $m_{total}$ ) und das Kammervolumen ( $V_{unten}$ ) gegeben (Gl. 40).

$$c_{unten}(t) = \frac{m_{unten}(t)}{V_{unten}} = \frac{m_{total} - m_{oben}(t)}{V_{unten}} = \frac{c_{eingespritzt} \cdot V_{eingespritzt} - c_{oben}(t) \cdot V_{start,oben}}{V_{unten}} \quad (40)$$

Damit ist der Konzentrationsgradient ( $\Delta c_t(x)$ ), der die treibende Kraft der Diffusion darstellt, zwischen den Kammern bekannt (Gl. 41).

$$\Delta c_t(x) = c_{unten}(t) - c_{oben}(t) \quad (41)$$

Der Stofffluss ( $J(t)$ ) kann durch die Konzentrationsänderung in der oberen Kammer bezogen auf die Stoffaustauschfläche ( $A$ ) bestimmt werden (Gl. 42).

$$J(t) = \frac{V_{oben} \cdot (c_{oben}(t_{i+1}) - c_{oben}(t_i))}{A \cdot (t_{i+1} - t_i)} \quad (42)$$

Nach dem Fick'schen Gesetz kann nun der effektive Diffusionskoeffizient eines Stoffes berechnet werden (Gl. 43).

$$D_{eff} = -J \cdot \frac{\partial x}{\partial c} = -J \cdot \frac{d_{cell}}{\Delta c_t(x)} \quad (43)$$

## KCl

Die Konzentration von KCl in der oberen Kammer wurde durch eine Leitfähigkeitssonde gemessen (siehe Anhang A.2). Es wurden drei Konzentrationen von KCl und drei Pellikel bekannter Höhe untersucht.

Für Abbildung 74 wurden die Stoffflüsse durch einen Pellikel von 0,7 mm Dicke ausgewählt. Wie erwartet, fielen die Stoffflüsse anfangs sehr schnell und näherten sich später langsam 0 an. Der Fluss wurde direkt aus den Konzentrationsänderungen in der oberen Kammer bezogen auf die Membranoberfläche bestimmt (Gl. 38). Der effektive Diffusionskoeffizient von KCl in Cellulose ( $D_{eff,KCl}$ ) wurde über das Fick'sche Gesetz bestimmt. Eine höhere finale Konzentration führte zu einer höheren Stoffstromdichte zu Beginn, da der Anfangskonzentrationsgradient zwischen den Kammern höher war. Im Mittel aus allen Messungen wurde ein binärer Diffusionskoeffizient  $D_{eff,KCl}$  von  $2,04 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  geschätzt.

In einigen Fällen wurde ein anfangs steigender Fluss beobachtet (Abb. 75). Wahrscheinlich ist dies darauf zurück zu führen, dass KCl zunächst an die Cellulose absorbierte und somit nicht die gesamte Masse den Pellikel durchdringen konnte, bis dieser gesättigt war. Hierfür spricht, dass der Effekt bei Pellikeln größerer Dicke stärker ausgeprägt war. Es wurden nur Messungen berücksichtigt, die keine sichtbare Absorption zeigten. Hieraus ergab sich ein binärer Diffusionskoeffizient von  $D_{eff,KCl} 9,7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ .

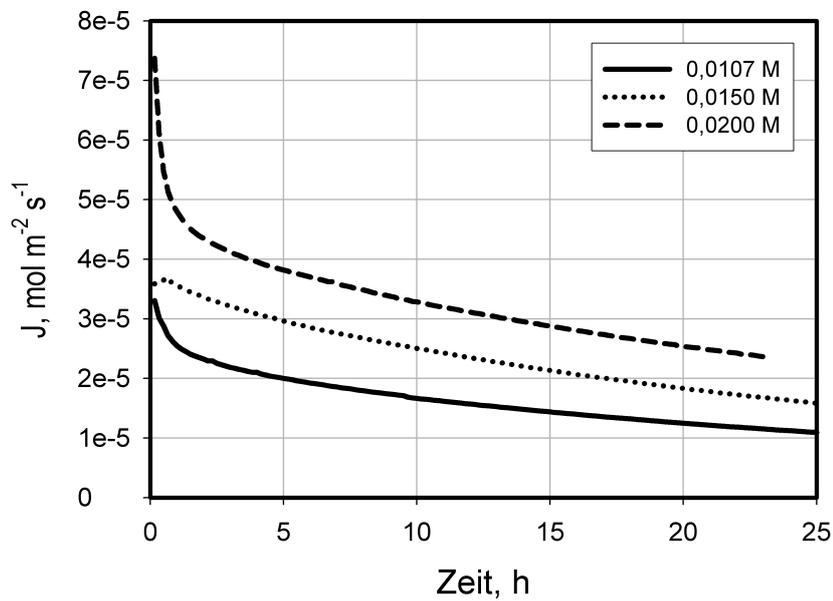


Abbildung 74: Gemessene Stoffstromdichte für KCl durch einen Pellicel von  $0,7 \text{ mm}$  Dicke bei den drei zu erwartenden KCl Endkonzentrationen in der gesamten Flüssigphase.  $0,0107 \text{ M}$ ,  $0,015 \text{ M}$ ,  $0,02 \text{ M}$ .

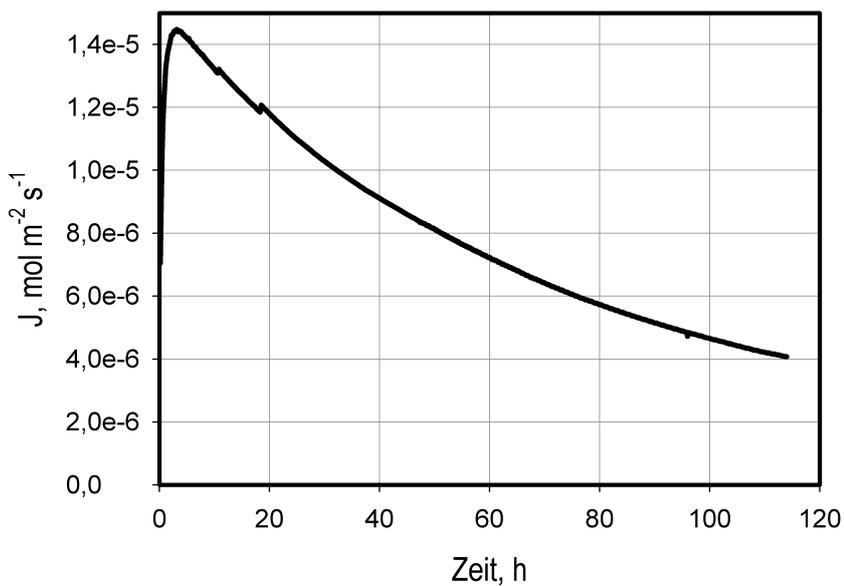


Abbildung 75: Anfänglich steigende Stoffstromdichte für KCl bei Diffusion durch einen Pellicel.

## Glucose

Die Diffusion von Glukose wurde ähnlich wie für KCl untersucht. Für die Analyse wurden drei Pellikel mit zwei finalen Konzentrationen von Glukose untersucht. Die Glukosekonzentration wurde durch einen enzymatischen Test in entnommenen Proben bestimmt.

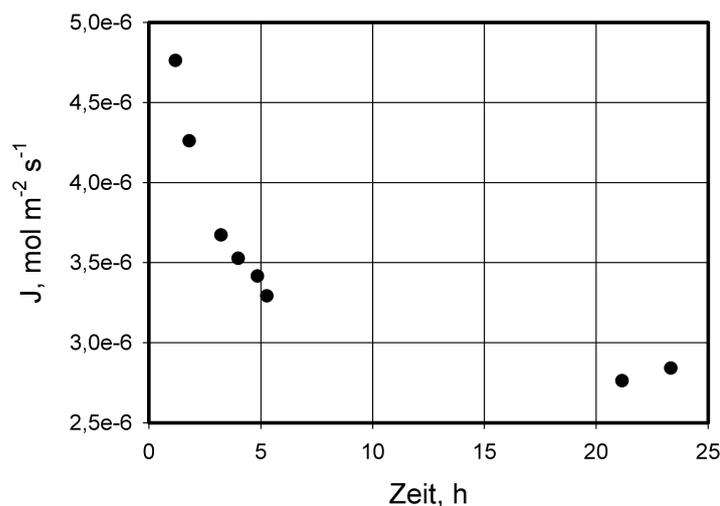


Abbildung 76: Gemessene Stoffflussdichte an Glukose durch einen Pellikel von 0,7 mm Dicke bei einer Glukose Endkonzentrationen von 0,0247 M in der gesamten Flüssigphase.

Der Stofffluss von Glukose war um eine Größenordnung langsamer als für KCl (Abb. 76). Dies wurde erwartet, da der hydrodynamische Durchmesser von Glukose größer ist als der von KCl. Es wurde ein mittlerer effektiver Diffusionskoeffizient für Glukose in Cellulose ( $D_{eff,GC}$ ) von  $2,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \pm 7,4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  bestimmt.

Tabelle 24: Vergleich der effektiven binären Diffusionskoeffizienten mit den binären Diffusionskoeffizienten in Wasser bei 30 °C.

	$D_{eff}$ $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$	$D_W$ $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$	$f_D$ -
KCl	$9,7 \cdot 10^{-10}$	$1,99 \cdot 10^{-9}$	0,49
Glukose	$2,8 \cdot 10^{-10}$	$6,7 \cdot 10^{-10}$	0,42

Die Diffusionsgeschwindigkeit von Stoffen ist in Biofilmen in der Regel geringer als in Wasser. In Tabelle 24 wurden die bestimmten effektiven Diffusionskoeffizienten mit Literaturwerten der Diffusionskoeffizienten in Wasser verglichen [Hartikainen *et al.*, 2003;

Beuling *et al.*, 1999]. Der Faktor zwischen beiden Diffusionskoeffizienten wird als relative Diffusivität ( $f_D$ ) bezeichnet, und beträgt typischerweise zwischen 0,1 - 0,8 in dichten Biofilmen [Horn und Morgenroth, 2005].

## 11.2 Sauerstoff

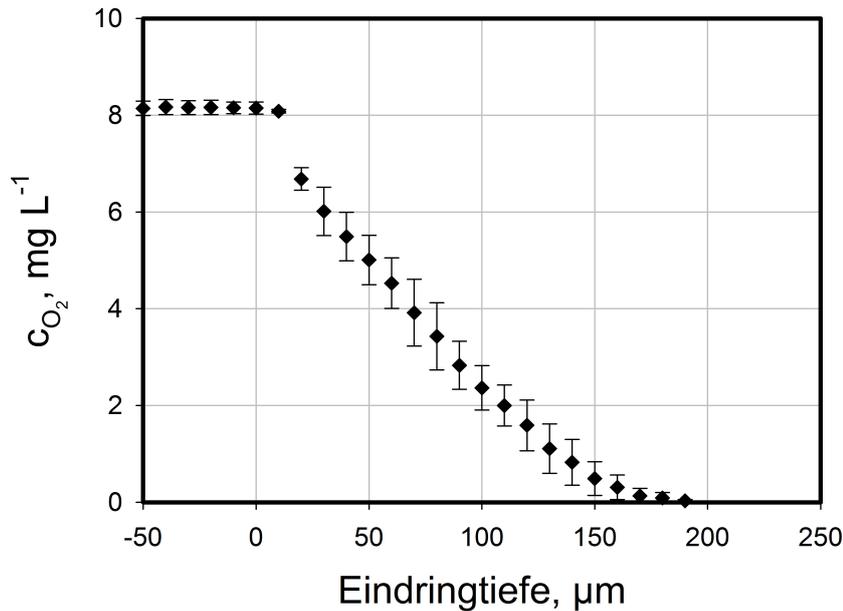


Abbildung 77: Durch eine Mikroelektrode gemessene Sauerstoffkonzentration in einem Cellulose Pellikel von 3 mm Höhe mit aktiven *Gluconacetobacter xylinus*.

Um das Eindringen von Sauerstoff in den Pellikel zu untersuchen, wurde eine Sauerstoffmikroelektrode vom Clark Typ in zwei Pellikel mit aktiven *Gluconacetobacter xylinus* eingestochen. Die Elektrode wurde für eine Temperatur von 25 °C auf eine Gleichgewichtskonzentration von 8  $\text{mg L}^{-1}$  Gelöstsauerstoff kalibriert. Abbildung 77 zeigt die Gelöstsauerstoffkonzentration ( $c_{\text{O}_2}$ ) über der Tiefe des Pellikels beginnend mit der Oberfläche bei 0  $\mu\text{m}$ . Mit der Eindringtiefe fiel die Sauerstoffkonzentration ab, bis nach 180  $\mu\text{m}$  kein Sauerstoff mehr festgestellt werden konnte.

Aus dem Profil wurde der Sauerstofffluss über die Pellikeloberfläche bestimmt. Der maximale Sauerstoffgradient an der Pellikeloberfläche betrug 0,055  $\text{mg L}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$ . Zusätzlich wird der effektive Diffusionskoeffizient benötigt, um den Stofffluss zu ermitteln. In dichten Biofilmen ist ein typischer Wert für die relative Diffusivität  $f_D = 0,5$ . Diese Annahme

konnte auch durch die Diffusionsmessungen für KCl unterstützt werden. Hier wurde eine sehr ähnliche relative Diffusivität von 0,49 bestimmt.

$$D_{eff,O_2} = f_D \cdot D_{W,O_2} \quad (44)$$

Der effektive Diffusionskoeffizient  $D_{eff,O_2}$  wurde nach Gleichung (44), unter Annahme einer relativen Diffusivität  $f_D = 0,5$ , basierend auf dem Diffusionskoeffizienten von Sauerstoff in Wasser  $D_{W,O_2} = 2,249 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  abgeschätzt.

$$J_{O_2} = D_{eff,O_2} \frac{\partial c_{O_2}}{\partial x} \quad (45)$$

Nach Gleichung (45) wurde hieraus der Stofffluss über die Pellikeloberfläche mit  $5,39 \pm 0,48 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass Sauerstoff bei Begasung mit Luft nur  $180 \mu\text{m}$  in den wachsenden Pellikel eindringt. *Gluconacetobacter xylinus* kann also nur in der obersten Schicht des Pellikels metabolisch aktiv sein. Dies bietet eine Erklärung für die konstante Dichte des Pellikels nach einer Anfangsphase. Cellulose wird nur an der Pellikeloberfläche produziert und die Dichte der tieferen Schichten des Pellikels kann somit nicht erhöht werden. Durch eine Erhöhung des Sauerstoffanteils in der Luft, könnte eine größere Eindringtiefe in den Pellikel erreicht werden.

### 11.3 Diskussion

Durch die Messungen des Stofftransports für Sauerstoff und Glukose konnte die Hypothese, dass im Pellikel Gradienten auftreten bestätigt werden. Große Bedeutung kommt hier der Begrenzung der aktiven Schicht von *Gluconacetobacter xylinus* durch die Eindringtiefe des Sauerstoffs zu. Eine Eindringtiefe von etwa  $200 \mu\text{m}$  ist typisch für einen dichten Biofilm [Hille *et al.*, 2005]. Dieses Ergebnis hat große Auswirkungen auf die Auslegung eines Membranmoduls. Cellulose wird nur direkt an der Grenzschicht von Flüssigphase/Pellikel und der Gasphase gebildet. Durch die geringe Eindringtiefe bestimmt die zweidimensionale Grenzschicht die Form des Pellikels.

Die effektiven binären Diffusionskoeffizienten für Glukose und KCl in Cellulose betragen etwa die Hälfte der jeweiligen binären Diffusionskoeffizienten in Wasser. Es ist zu erwarten, dass der Stofftransport von Glukose durch den Pellikel in die aktive Schicht einen limitierenden Faktor für die Celluloseproduktion darstellt.

## 12 Celluloseproduktion im Zulaufverfahren

### 12.1 Membranmodul mit kleinem Bypassgefäß

Die Diffusionslimitierung bezüglich Glukose kann eventuell durch ein Zulaufverfahren aufgehoben werden.

Glukose wird in der obersten Schicht des Pellikels verbraucht, während die Diffusionstrecke von der Membran zur Spitze des Pellikels ( $h$ ) steigt. Der Konzentrationsunterschied von Glukose ( $\Delta c_{GK}$ ) wurde basierend auf der Stoffstromdichte von Glukose und dem gemessenen effektiven Diffusionskoeffizienten ( $D_{eff,GK}$ ) abgeschätzt (Gl. 46). Die Stoffstromdichte wurde direkt aus der Abnahme der Glukosekonzentration im Medium in einem Versuch im Satzverfahren im 0,1 L Maßstab ermittelt. Da keine Reaktion im Medium auftritt, wird jede Konzentrationsänderung durch einen Fluss über die Membran ausgelöst.

$$\Delta c_{GK} = \frac{J_{GK}}{D_{eff,GK}} \cdot h \quad (46)$$

Aus dem Konzentrationsunterschied kann die Konzentration in der aktiven Schicht  $c_{GK}^a$  berechnet werden (Gl. 47).

$$c_{GK}^a = c_{GK}^r - \Delta c_{GK} \quad (47)$$

Nach 70 h wurde eine deutliche Differenz zwischen der berechneten Glukosekonzentration in der aktiven Schicht ( $c_{GK}^a$ ) und der gemessenen Konzentration ( $c_{GK}^r$ ) im Medium sichtbar (Abb. 78). Durch die steigende Schichthöhe des Pellikels  $h$  fiel die Glukosekonzentration in der aktiven Schicht im Prozessverlauf. Zum Prozessende betrug der Unterschied in den Konzentrationen  $7 \text{ g L}^{-1}$ .

Glukonsäure wurde durch Oxidation der Glukose in der aktiven Schicht des Pellikels produziert. Berechnete Konzentrationen in der aktiven Schicht wichen jedoch nicht mehr als  $1 \text{ g L}^{-1}$  von den gemessenen Konzentrationen ab (Abb. 79). Glukonsäure akkumuliert nicht wesentlich in der aktiven Schicht und inhibiert die Celluloseproduktion wahrscheinlich nicht.

Die Stoffstromdichte von Glukose durch den Pellikel kann durch eine Erhöhung des Konzentrationsgradienten von Glukose vergrößert werden. Glukose wurde daher dem Bypassgefäß intermittierend zugeführt um damit die Glukosekonzentration in der aktiven Schicht zu erhöhen. Das Zulaufprofil wurde so eingestellt, dass der Stofffluss etwa auf dem Niveau

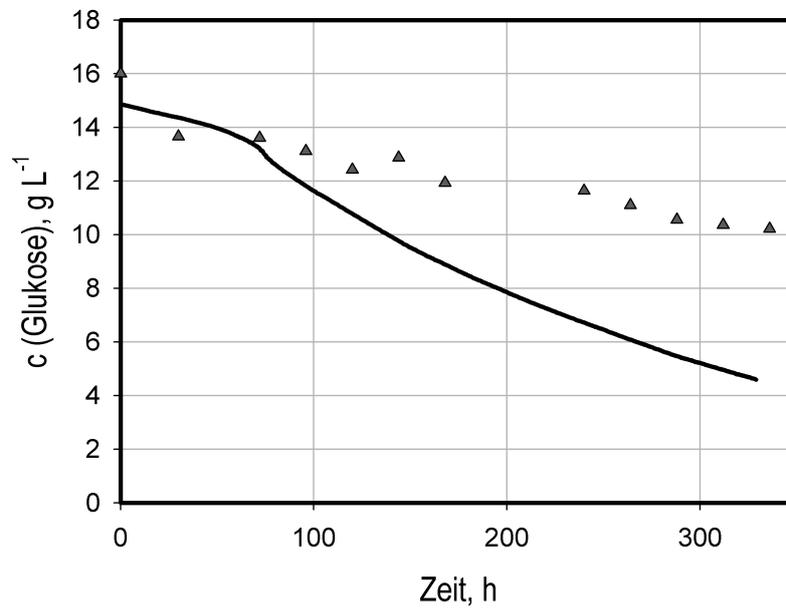


Abbildung 78: Gemessene Glukosekonzentration im Medium ( $\blacktriangle$ ) und berechnete Konzentration in der aktiven Schicht (-) in einem Versuch im Satzverfahren im 0,1 L Maßstab.

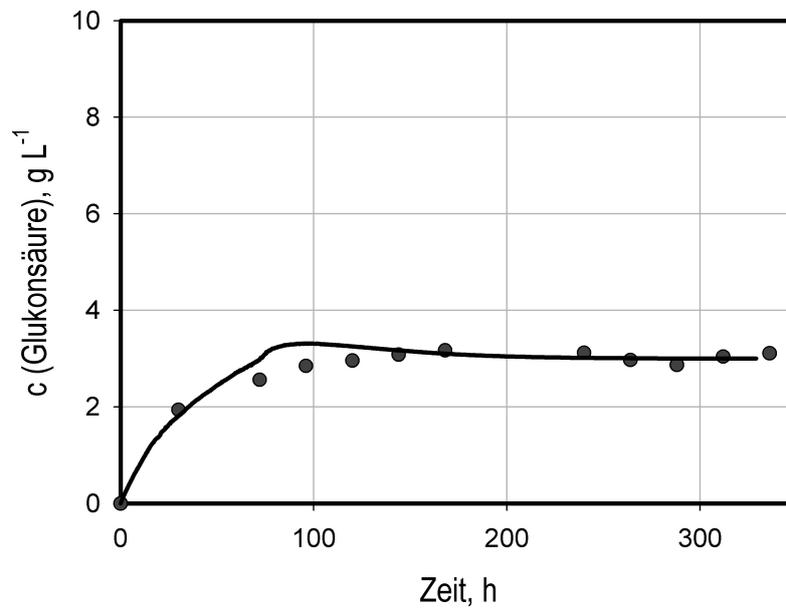


Abbildung 79: Gemessene Glukonsäurekonzentration im Medium ( $\bullet$ ) und berechnete Konzentration in der aktiven Schicht (-) in einem Versuch im Satzverfahren im 0,1 L Maßstab.

der maximalen Celluloseproduktion von  $J_{GK} = 1,26 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  bei 70 h konstant gehalten wurde (Gl. 48).

$$c_{GK}^r = \frac{J_{GK}}{D_{eff,GK}} \cdot h + c_{GK}^a \quad (48)$$

Um die notwendige Glukosekonzentration  $c_{GK}^r$  zu berechnen, wird der Verlauf der Schichthöhe des Pellikels  $h$  benötigt. Hierfür wurde das Höhenprofil eines Versuchs im Satzverfahren im 0,1 L Maßstab verwendet.

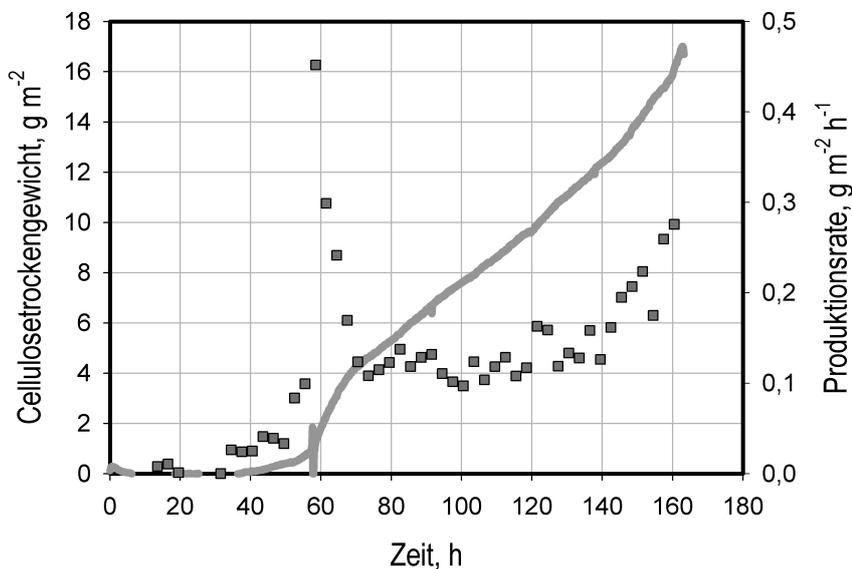


Abbildung 80: Membrangestützte Celluloseproduktion mit *Gluconacetobacter xylinus* im Zulaufverfahren im 0,1 L Maßstab mit HS<sup>+</sup> Medium. Celluloseproduktgewicht (—), Produktionsrate (■).

Abbildung 80 zeigt den Verlauf des Celluloseproduktgewichts bei membrangestützter Celluloseproduktion im Zulaufverfahren im 0,1 L Maßstab. Bei 60 h war ein ausgeprägtes Maximum der Celluloseproduktionsraten von  $0,46 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  sichtbar. Anschließend fielen die Produktionsraten auf  $0,12 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  bis 120 h. Zum Prozessende stieg die Celluloseproduktion wieder auf maximal  $0,38 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Es ist deutlich erkennbar, dass der Zulaufprozess die Celluloseproduktion beeinflusst. Die Produktionsrate von  $0,46 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  beträgt nur 64 % der maximalen im Satzverfahren erreichte Produktionsrate. Das Ziel die Celluloseproduktion konstant zu halten wurde nicht erreicht.

Um die Celluloseproduktion möglichst konstant zu halten, wurde das Zulaufprofil so an-

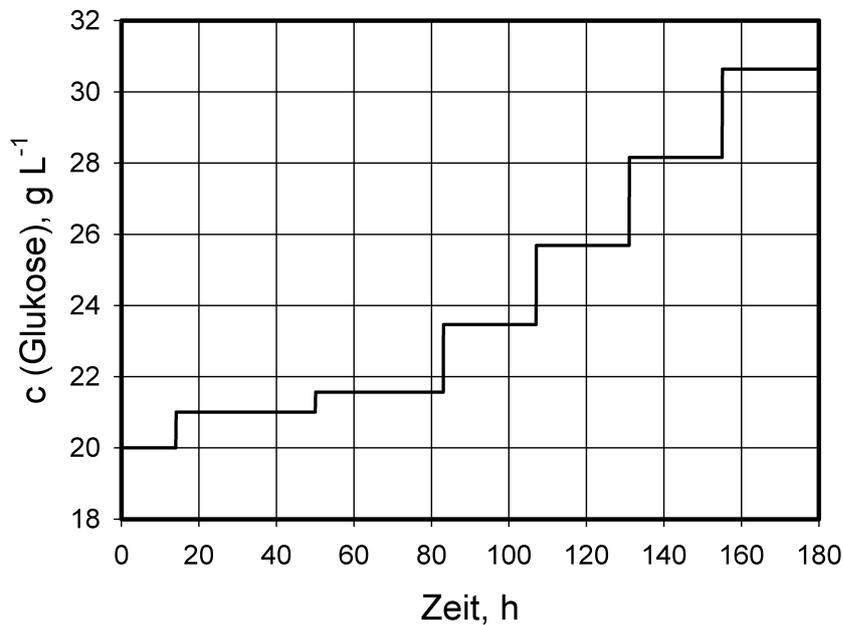


Abbildung 81: Glukosekonzentration im Bypassgefäß mit Zulauf von Glukose im 0,1 L Maßstab als Funktion der Prozesszeit, ohne Verbrauch von Glukose durch *Gluconacetobacter xylinus*.

gepasst, dass vor 60 h weniger Glukose zugeführt wurde, indem die entsprechende Konzentrationsstufe um 12 h verlängert wurde (Abb. 81).

Durch das veränderte Zulaufprofil konnte eine nahezu konstante Celluloseproduktion erreicht werden (Abb. 82). Es wurde ein Cellulose trockengewicht von  $18 \text{ g m}^{-2}$  nach 165 h erreicht.

Bis 60 h sind die Produktionsraten im 0,1 L Satz- und Zulaufverfahren identisch. Zu dieser Zeit war die Glukosekonzentration in der Flüssigphase nur um  $1 \text{ g L}^{-1}$  erhöht. Ähnlich wie im Satzverfahren wurde bei 70 h das Maximum der Produktionsrate mit  $0,24 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  erreicht (Abb. 83). Die maximale Produktionsrate betrug jedoch nur 33 % der maximalen Produktionsrate im 0,1 L Satzverfahren. Bis 140 h konnten die Produktionsraten zwischen  $0,2 - 0,15 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  stabilisiert werden und erreichten damit etwa ein Drittel der Raten im Satzverfahren. Am Prozessende begannen die Produktionsraten auf  $0,1 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  zu fallen.

Im Vergleich mit dem Satzverfahren war die deutlich geringe Celluloseproduktion im Zulaufverfahren überraschend, da *Gluconacetobacter xylinus* eine höhere Glukosekonzentration in der aktiven Schicht zur Verfügung stand.

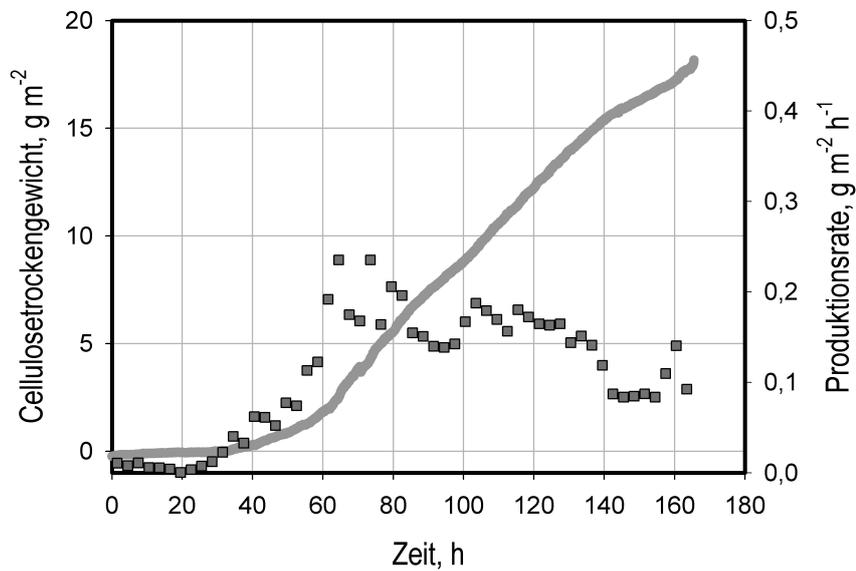


Abbildung 82: Membrangestützte Celluloseproduktion mit *Gluconacetobacter xylinus* im Zulaufverfahren im 0,1 L Maßstab mit HS<sup>+</sup> Medium. Cellulose trockengewicht (—), Produktionsrate (■).

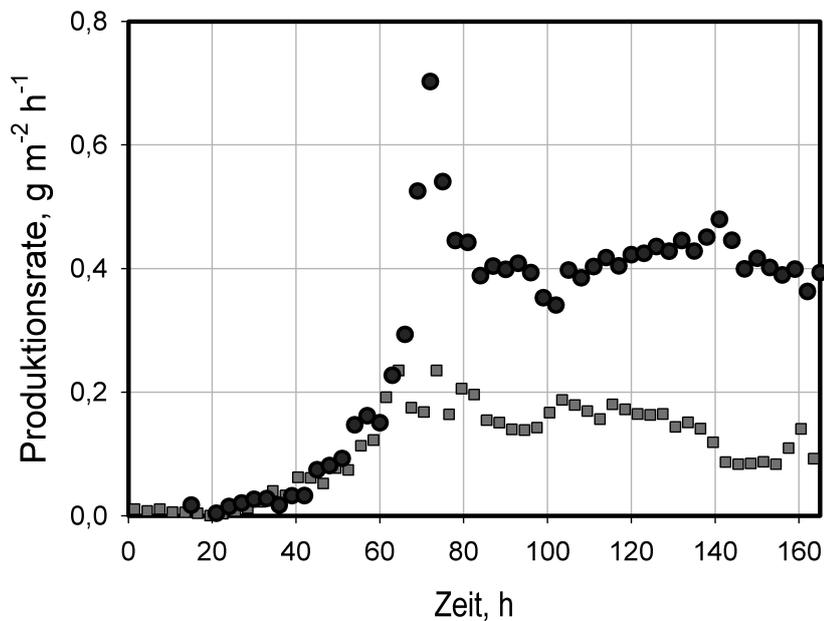


Abbildung 83: Vergleich der Celluloseproduktionsrate der membrangestützten Celluloseproduktion im 0,1 L Satzverfahren (●) und Zulaufverfahren (■).

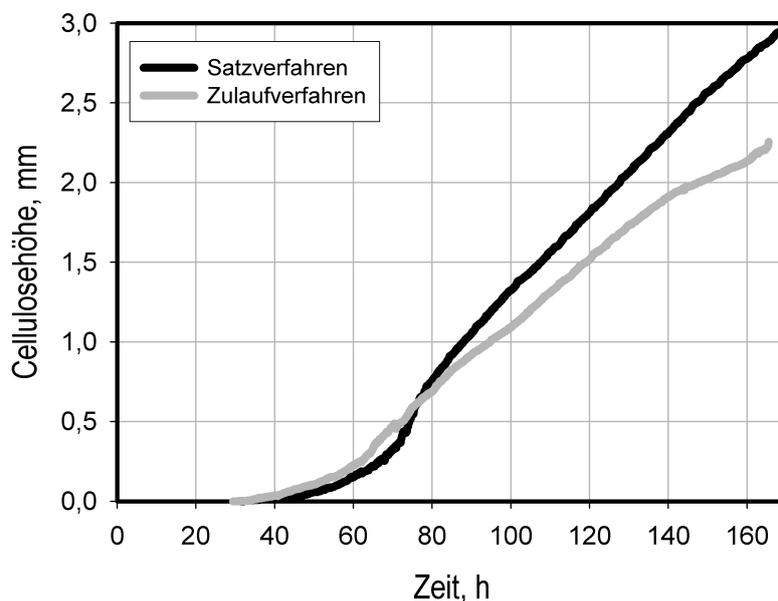


Abbildung 84: Vergleich des Verlaufs der Celluloseschichthöhe von Satzverfahren und Zulaufverfahren der membrangestützten Celluloseproduktion mit *Gluconacetobacter xylinus* im 0,1 L Maßstab.

Die Schichthöhe des Pellikels in der membrangestützten Celluloseproduktion mit *Gluconacetobacter xylinus* im 0,1 L Satz- und Zulaufverfahren ist in Abbildung 84 verglichen. Bis 75 h liegt die Schichthöhe der Cellulose im Zulaufverfahren über der Höhe des Pellikels im Satzverfahren. Bis 60 h waren auch die Produktionsraten bezogen auf das Trockengewicht identisch. Nach 75 h wurde jedoch im Satzverfahren eine größere Schichthöhe des Pellikels erreicht.

## 12.2 Diskussion

Durch das Zulaufverfahren konnte die Celluloseproduktion bezogen auf die Membranbeladung zwischen 60 h und 140 h stabilisiert werden. Es wurde jedoch wesentlich weniger Cellulose produziert als im Satzverfahren. Interessanterweise wurde jedoch eine mit dem Satzverfahren vergleichbare Schichthöhe des Pellikels im Zulaufverfahren erreicht. Bis 60 h konnte die Celluloseproduktion bezogen auf die Schichthöhe leicht gesteigert werden. Die Celluloseproduktion von *Gluconacetobacter xylinus* scheint sehr sensibel auf die Glukosekonzentration zu reagieren. Durch eine leichte Erhöhung der Glukosekonzentration konnte zu Prozessbeginn die Schichthöhe bei jedoch leicht verringerter Dichte gesteigert werden.

Im weiteren Prozessverlauf beeinflusste die erhöhte Glukosekonzentration im Zulaufverfahren die Dichte des produzierten Pellicels stark. Eine reine Erhöhung der Glukosekonzentration ist somit nicht geeignet die Menge der produzierten Cellulose im Vergleich mit dem Satzverfahren zu verbessern. Es liegt hier eine komplexe Regulation der Celluloseproduktion von *Gluconacetobacter xylinus* anhängig von der Glukosekonzentration vor. Um die Celluloseproduktion im Vergleich zum 0,1 L Satzverfahren zu steigern, muss wahrscheinlich in die Regulation der Cellulosesynthese eingegriffen werden.

Es ist jedoch möglich auf diese Weise Pellicel mit geringerer Dichte zu produzieren. Diese können eventuell als Matrix in der Zellkultur Anwendung finden, da die Zellen in die weniger dichte Struktur wahrscheinlich leichter eindringen können.

## 13 Charakterisierung der Cellulosepellikel

Ein Ziel des Membranverfahrens für die Produktion bakterieller Cellulose war die Herstellung eines homogenen Pellikels. Es wurde erwartet, dass durch die mechanische Stabilisierung der Celluloseschichten durch die Membran besonders homogene Strukturen entstehen. Außerdem sollte untersucht werden, ob verschiedene Produktionsverfahren einen Einfluss auf die Struktur der Cellulose haben. Zusätzlich ist eine genaue Kenntnis der Struktur erforderlich für ein späteres Design von Produkten aus bakterieller Cellulose.

### 13.1 Makrostruktur

Die Makrostruktur des Pellikels wurde durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) und konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM) visualisiert. Die Proben wurden für die Rasterelektronenmikroskopie gefriergetrocknet.



Abbildung 85: Oberfläche eines gefriergetrockneten Pellikels bei 7000 facher Vergrößerung (REM). Zellen von *Gluconacetobacter xylinus* stellen ein dichtes Netzwerk aus Cellulosefasern her.

Abbildung 85 ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines im

Membranmodul produzierten Pellikles. Deutlich sichtbar ist das dichte Netzwerk an Cellulosefasern. Einzelne Fasern haben einen Durchmesser von etwa 100 nm.

Im Querschnitt des Pellikels konnte eine klare Struktur des Pellikels beobachtet werden (Abb. 86). Aus der Orientierung des Pellikels im Elektronenmikroskop im Vergleich mit der Orientierung auf der Membran wurde deutlich, dass die erkennbaren Schichten parallel zur Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase angeordnet sind. Die gesamte Struktur ist homogen mit parallelen Schichten in gleichmäßigem Abstand von 5  $\mu\text{m}$ . Einzelne Schichten scheinen extrem dünn und dicht zu sein. Die Proben mussten für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen allerdings gefriergetrocknet werden. Die Trocknung kann zur Bildung von Artefakten führen. Um dies zu untersuchen, wurden Pellikel zusätzlich mit Hilfe von konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) vermessen. Mit dieser Methode ist eine Analyse im nassen, nativen Zustand möglich.

Abbildung 87 zeigt eine isometrische Ansicht einer dreidimensionalen Struktur eines Pellikels, die aus Schichtaufnahmen des konfokalen Laserscanning Mikroskops erstellt wurde (Zusätzliche Aufnahmen mit spezifischer Färbung siehe Anhang A.4). Die bereits im Elektronenmikroskop beobachtete Schichtstruktur ist auch im nativen Zustand sichtbar. Die Eindringtiefe des Lasers reichte jedoch nur bis zur vierten Schicht. Der Abstand zwischen den Schichten wurde mit etwa 10  $\mu\text{m}$  bestimmt. Die Schichten selbst weisen im Unterschied zu den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ebenfalls eine signifikante Dichte von etwa 10  $\mu\text{m}$  auf. Das konfokale Laserscanning Mikroskop war jedoch nicht in der Lage einen Pellikel, der auf einer Membran produziert wurde, in eine ausreichende Tiefe zu durchdringen. Für die konfokale laserscanning mikroskopische Analyse mussten Pellikel aus einer statischen Oberflächenkultur verwendet werden. Zusätzlich wurde die weniger dichte Unterseite visualisiert [Wippermann *et al.*, 2009]. Aus diesem Grund sind die absoluten Messwerte nicht mit den Rasterelektronenmikroskop Aufnahmen von Pellikeln aus dem Membranverfahren vergleichbar. Der generelle Aufbau aus Schichten konnte jedoch bestätigt werden. Zusätzlich wurde deutlich, dass die Schichten selbst über eine wesentlich höhere Dichte verfügen, als es in den gefriergetrockneten Pellikeln erkennbar war. Das native Netzwerk an Cellulosefasern ist wahrscheinlich nicht so dicht wie es in den Rasterelektronenmikroskop Aufnahmen scheint.

## 13.2 Dichte

Die visuelle Analyse der Pellikel durch Elektronenmikroskopie oder konfokale Mikroskopie erlaubt nur die jeweilige Betrachtung eines kleinen Ausschnitts der Probe. Dies erschwert

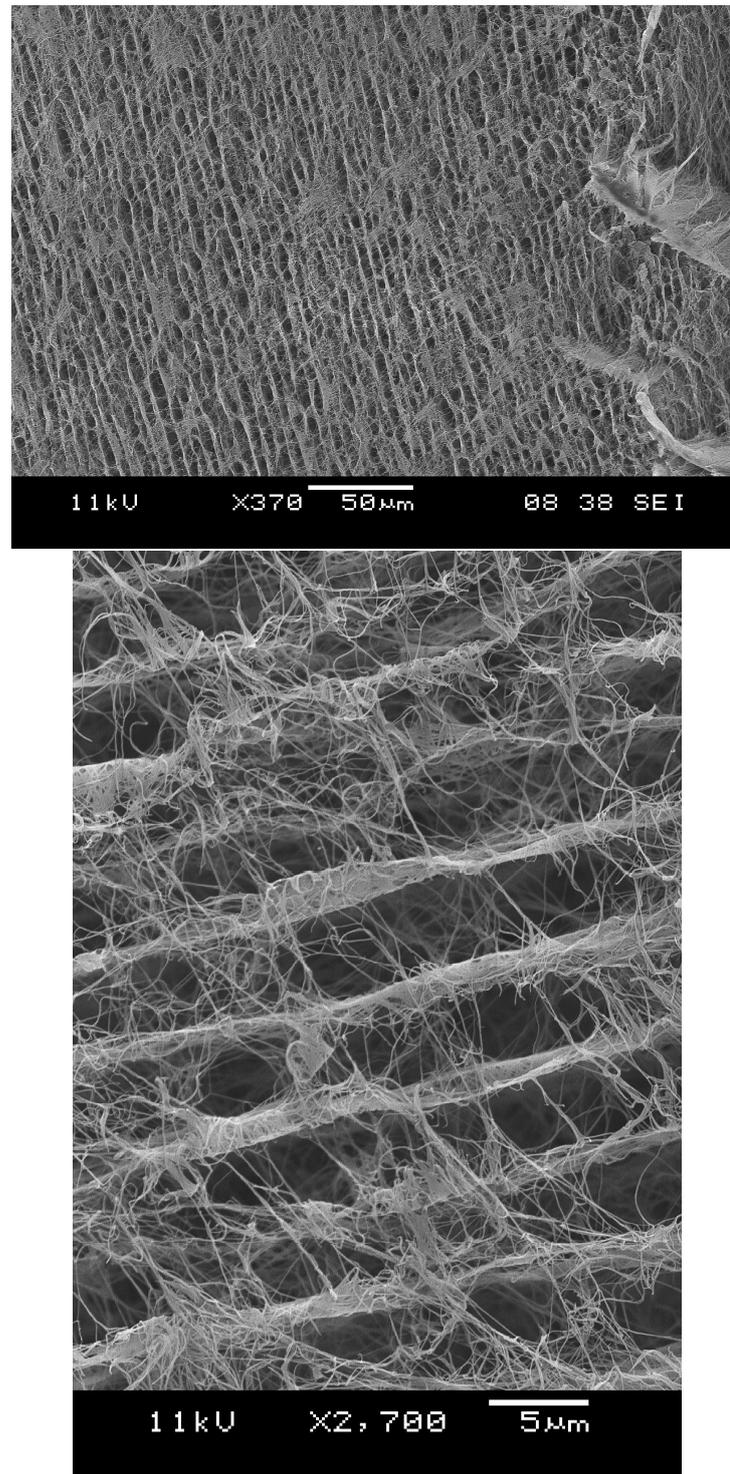


Abbildung 86: Querschnitt eines Pellicels bei Vergrößerungen von 370 fach (oben) und 4300 fach (unten) (REM). Die Struktur besteht aus Schichten die parallel zur Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase sind.

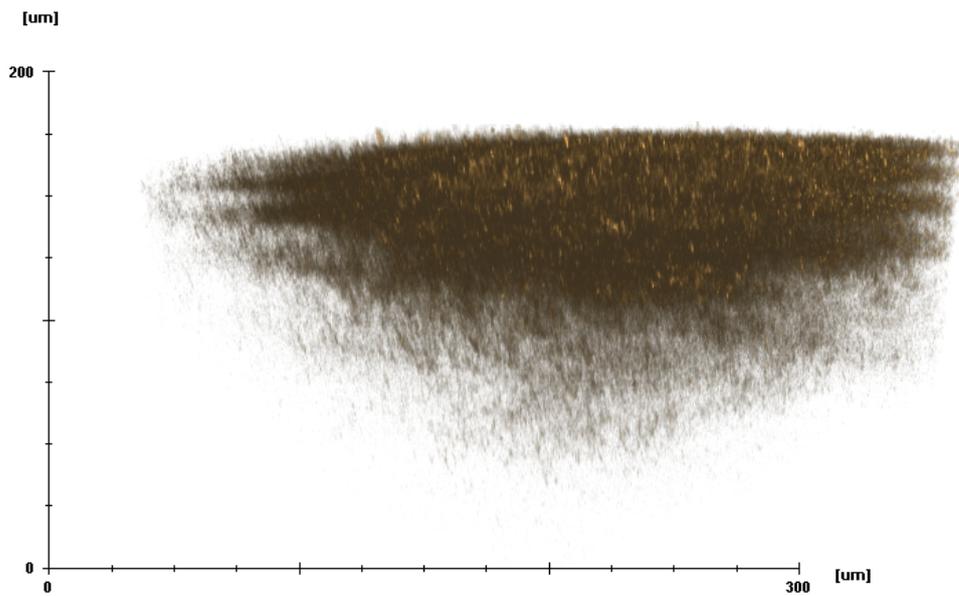


Abbildung 87: Dreidimensionale Struktur nativer bakterieller Cellulose (CLSM).

eine zuverlässig Quantifizierung. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Dichte und die Porengröße betrachtet, um verschiedenen Herstellungsverfahren zuverlässig vergleichen zu können.

Bakterielle Cellulose wurde im Satz-, Zulaufverfahren und unter annähernd konstanten Bedingungen im Komplexmedium und im Satzverfahren im definierten Medium produziert. Die produzierten Pellikel wurden in der Korrelation von Trockengewicht und Volumen verglichen (Abb. 88). Es wurde deutlich, dass alle Verfahren generell eine geringere Dichte produzierten als das Satzverfahren mit dem komplexen Medium. Bei Pellikeln mit geringer Höhe sind die Unterschiede weniger ausgeprägt, da hier auch das Satzverfahren mit dem komplexen Medium eine geringere Dichte aufweist. Anfangs erreicht die Kultivierung unter konstanten Verfahren die Dichte des Satzverfahrens.

Tabelle 25: Lineare Korrelation des Volumens mit dem Trockengewicht für verschiedenen Produktionsverfahren.

Verfahren	Steigung [g mm <sup>-3</sup> ]
0,1 L Zulaufverfahren	$8,05 \cdot 10^{-6}$
20 L Satzverfahren	$8,58 \cdot 10^{-6}$
0,1 L Satzverfahren (synthetisches Medium)	$7,56 \cdot 10^{-6}$

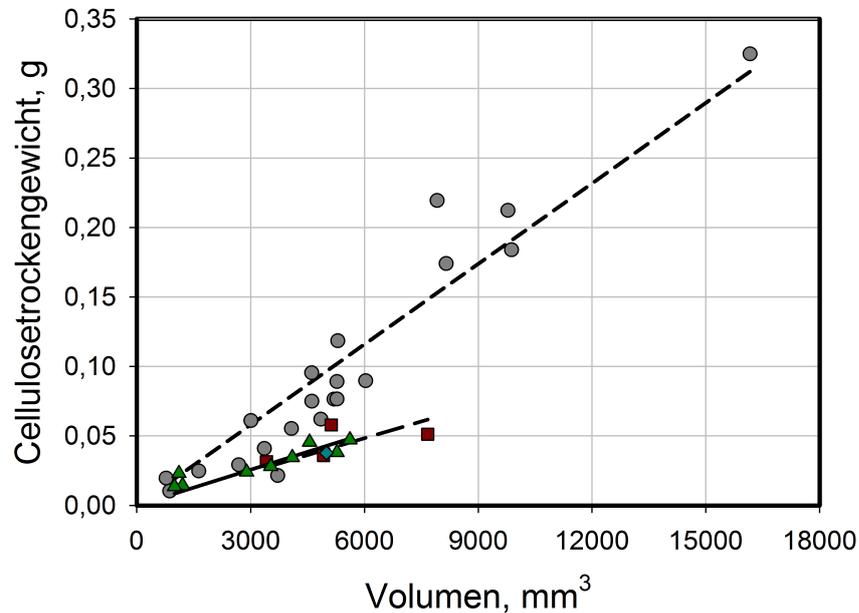


Abbildung 88: Korrelation von Trockengewicht und Volumen der Cellulosepellikel aus verschiedenen Produktionsverfahren. 0,1 L Satzverfahren (●), 0,1 L Zulaufverfahren (■), 20 L Satzverfahren (▲), 0,1 L Satzverfahren mit synthetischem Medium (◆).

Die Korrelation für das 0,1 L Satzverfahren wurde durch ein Polynom 2. Ordnung beschrieben. Dies ist jedoch nicht für andere Produktionsverfahren anwendbar. Auf Grund der geringen Anzahl an Daten, wurde das Volumen der Cellulosepellikel für die anderen Produktionsverfahren linear mit dem Trockengewicht korreliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 zusammengefasst. Das der Schichthöhe entsprechende Trockengewicht wurde in dieser Arbeit für diese Verfahren mit den linearen Korrelationen berechnet.

Aus dem Volumen und dem Trockengewicht kann direkt die Dichte bestimmt werden. Die Durchschnittliche Dichte der mit verschiedenen Verfahren hergestellten Pellikel ist in Abbildung 89 dargestellt. Im Satzverfahren wurde die höchste Dichte mit  $17019 \text{ g m}^{-3}$  erreicht. Die Dichte bei konstanter Kultivierung im 20 L Maßstab betrug  $10766 \text{ g m}^{-3}$ . Die geringste Dichte im Komplexmedium wurde im Zulaufverfahren mit  $8627 \text{ g m}^{-3}$  erreicht. Mit dem synthetischen Medium wurden vergleichbar geringe Dichten von durchschnittlich  $7564 \text{ g m}^{-3}$  bestimmt. Dies bedeutet, dass die verwendete Korrelation von Trockengewicht und Volumen, die auf dem Satzverfahren basiert, das Trockengewicht von Pellikeln aus anderen Verfahren überschätzt. Die Dichte eines gefriergetrockneten Pellikels von bakterieller Cellulose ist sehr gering. Das Material wurde bereits als Aerogel bezeichnet [Liebner

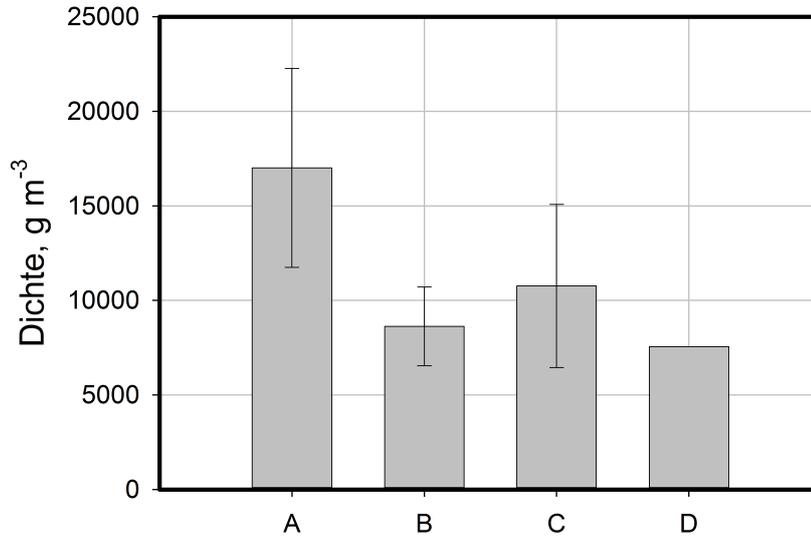


Abbildung 89: Dichte der Pellikel aus verschiedenen Verfahren. A: 0,1 L Satzverfahren, B: 0,1 L Zulaufverfahren, C: 20 L Satzverfahren, D: 0,1 L Satzverfahren mit synthetischem Medium.

*et al.*, 2010].

Es wurde angenommen, dass die Dichteunterschiede auf eine unterschiedliche Porosität der Pellikel zurück zu führen sind. Da nur die Dichten des Satz- und Zulaufverfahrens signifikant getrennt sind, wurden Proben aus diesen Verfahren mit Hilfe von Quecksilberporosimetrie untersucht.

Das Verfahren nutzt die speziellen Eigenschaften von Quecksilber. Quecksilber interagiert nicht mit dem Probenmaterial und benetzt die Oberfläche kaum. Die Fähigkeit des Quecksilbers kleine Poren zu füllen ist abhängig vom angelegten Druck.

$$D_{Pore} = \frac{-4\gamma \cdot \cos(\theta)}{P} \quad (49)$$

Die Beziehung zwischen dem Druck ( $P$ ) und der Porengröße ( $D_{Pore}$ ) wird durch die Washburn Gleichung (49) beschrieben. Die Oberflächenspannung ( $\gamma$ ) und der Kontaktwinkel ( $\theta$ ) von Quecksilber sind bekannt.

Abbildung 90 zeigt eine typische Größenverteilung von Poren in einem Pellikel aus dem Satzverfahren. Die Menge des eingedrungenen Quecksilbers korreliert mit der Häufigkeit der entsprechenden Porengröße. Beginnend mit einem geringen Druck fand bei einer Porengröße von  $70 \mu\text{m}$  die erste signifikante Intrusion von Quecksilber statt. Die maximale

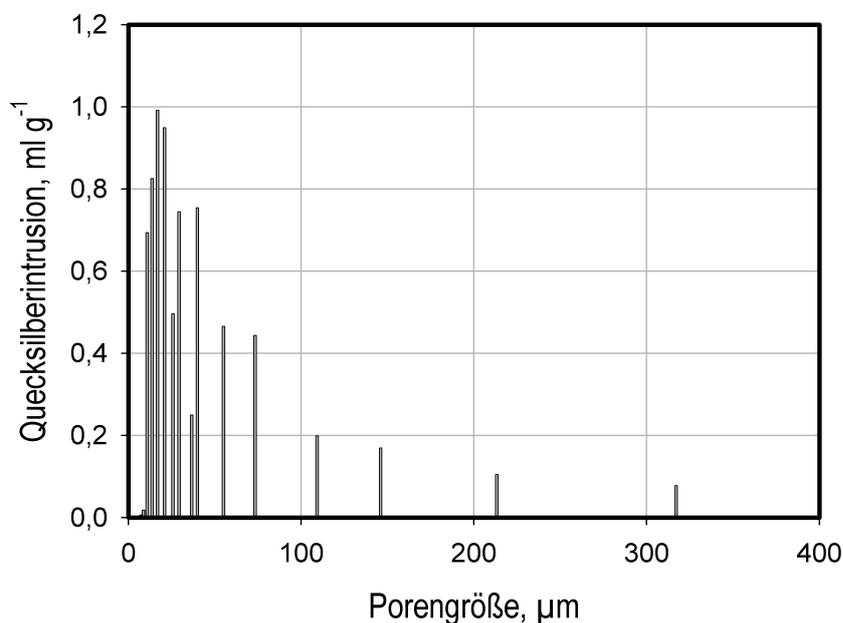


Abbildung 90: Größenverteilung der Poren in einem typischen Pellicel bestimmt durch Quecksilberporosimetrie.

Intrusion wurde jedoch bei einer Porengröße von  $20 \mu\text{m}$  beobachtet. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Pellicel für die Analyse zurechtgeschnitten werden mussten. Eventuell sind die beobachteten großen Poren auf Schäden im Material durch das Schneiden zurück zu führen.

Abbildung 91 zeigt den durchschnittlichen Porendurchmesser für Proben aus dem Satz- und Zulaufverfahren. Wie bereits aus der Dichtebestimmung erwartet, sind Unterschiede in der Porengröße erkennbar. Pellicel aus dem Satzverfahren weisen eine durchschnittliche Porengröße von  $23 \mu\text{m}$  auf, gegenüber  $35 \mu\text{m}$  im Zulaufverfahren.

### 13.3 Lasertriangulation

Die eingesetzte Lasertriangulation ist zu einer maximalen Auflösung von  $0,2 \mu\text{m}$  fähig. Es ist möglich, dass eine Analyse des Lasersignals ebenfalls Rückschlüsse auf die Struktur des Pellicels erlaubt. Während der Datenanalyse wurde das Signal durch ein Fenster von 300 Punkten gemittelt, um die Datenmenge zu reduzieren und hochfrequente Störungen zu entfernen. Durch diese Verfahren ging jedoch Auflösung des Signals verloren. Im folgendem sollten durch eine möglichst verlustfreie Filterung des Signals hochfrequente

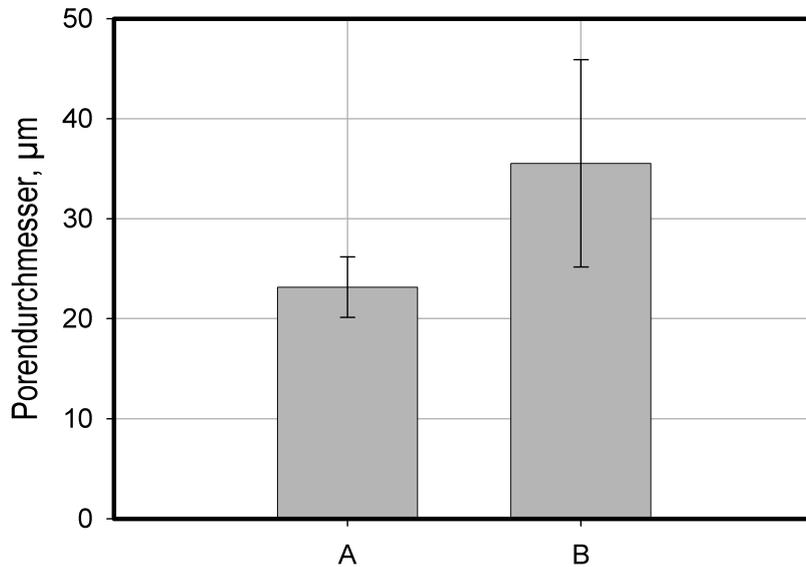


Abbildung 91: Durchschnittlicher durch Quecksilberporosimetrie bestimmter Porendurchmesser im Satzverfahren (A) und Zulaufverfahren (B).

Störungen entfernt werden, ohne die Auflösung zu beeinträchtigen. Auf diese Weise sollten Informationen über die Entstehung der dreidimensionalen Struktur gewonnen werden.

Abbildung 92 zeigt ein unverarbeitetes Signal des Lasertrinaugulationssensors (LTS). In dem Detailausschnitt ist deutlich zu erkennen, dass das Signal von Störungen überlagert wird. Hierdurch wird die Auflösung reduziert und es sind keine Rückschlüsse auf die Detailstruktur des Pellikels möglich.

Um die Art des Rauschens zu untersuchen wurde eine Fouriertransformation des Signals durchgeführt, um das zeitabhängige Signal in ein frequenzabhängiges Signal umzuwandeln. Es ist nur die positive Hälfte des Spektrums dargestellt, und die Amplituden wurden quadriert (Abb. 93). Eine deutliche Struktur des Frequenzspektrums ist zu erkennen. Mehrere Maxima, deren Frequenz ein Vielfaches von  $0,02 \text{ Hz}$  ist, sind zu erkennen.

$$\Delta T = \frac{1}{f} \quad (50)$$

Die Frequenz ( $f$ ) ist der Kehrwert der Periode ( $T$ ) (Gl. 50). Die Frequenz von  $0,02 \text{ Hz}$  entspricht daher einer Periodendauer von  $50 \text{ s}$ . Da das Frequenzmuster nicht zufällig zu sein scheint und die Periodendauer von  $50 \text{ s}$  zu kurz scheint für einen biologischen Prozess, wurde angenommen, dass Druckdifferenzen auf der Membran der Grund für die Störungen

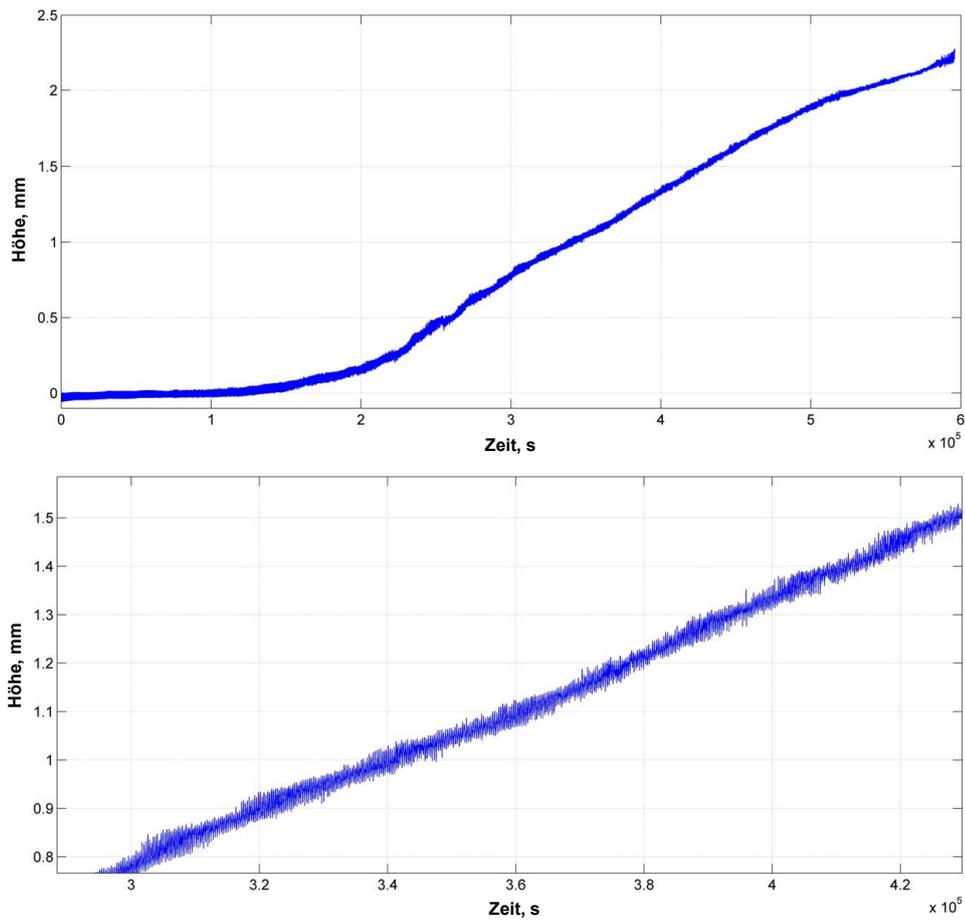


Abbildung 92: Gesamtes unverarbeitetes Signal des LTS (oben) und Detailausschnitt (unten). Es wurde die Schichthöhe eines Pellikels bei der membrangestützten Celluloseproduktion erfasst.

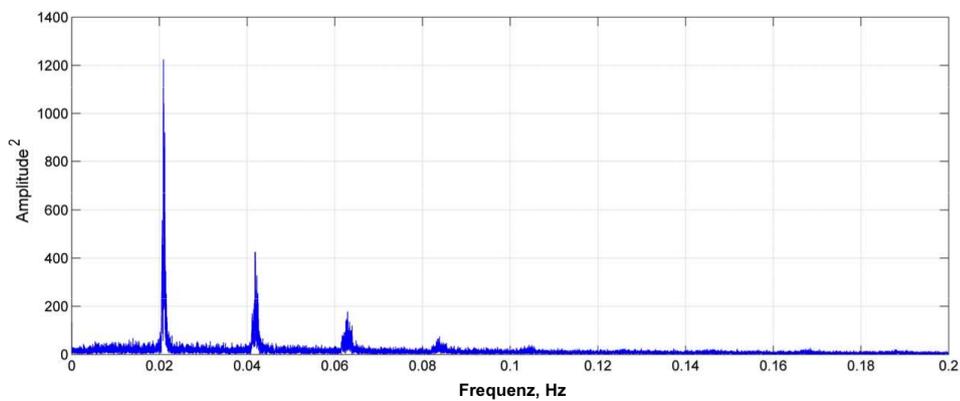


Abbildung 93: Fouriertransformation des LTS Signals.

sind. Diese treten wahrscheinlich durch das Zusammenspiel der beiden peristaltischen Pumpen auf, die das Membranmodul versorgen.

Um diese Störungen aus dem Signal zu entfernen wurde ein nichtkausaler nullphasiger Tiefpassfilter angewendet (Abb. 94). Dabei blieb die Form des Signals sehr gut erhalten. Es kam zu keiner Phasenverschiebung.

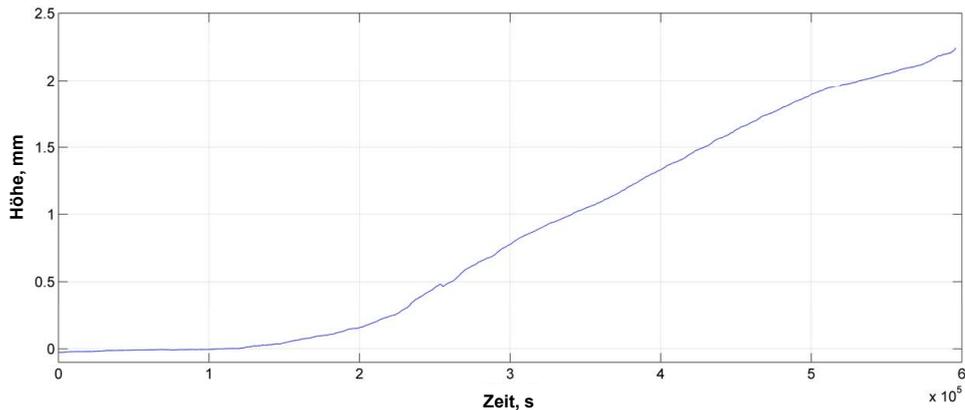


Abbildung 94: Tiefpass gefiltertes Signal des LTS.

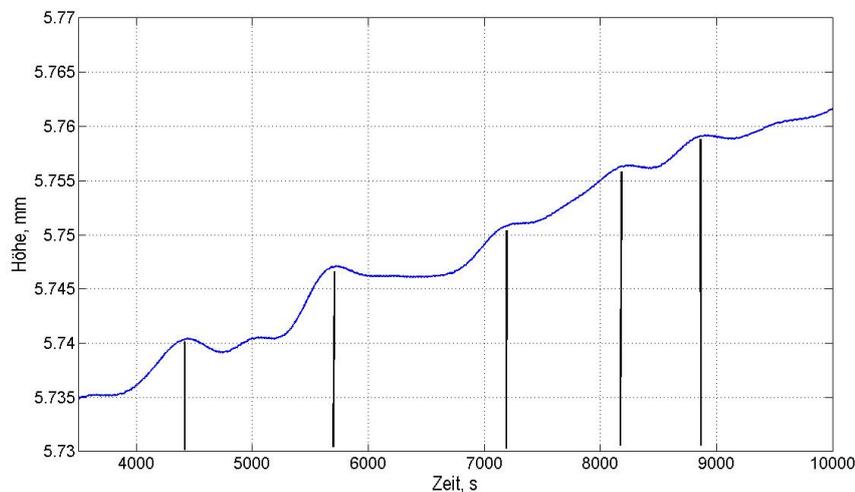


Abbildung 95: Detail des Tiefpass gefilterten LTS Signals.

Im Detail ist zu erkennen, dass das Signal nicht vollständig glatt ist (Abb. 95). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Pellicel aus Schichten aufgebaut ist, die der Lasertrinaugulationssensor theoretisch auflösen kann. Die verbleibenden Abstufungen des Lasersignals sind variabel. Im Durchschnitt ergab sich bei der Vermessung von 50 Stufen eine Abstand von  $17,5 \pm 4,6 \text{ min}$  und eine Höhe  $4,5 \pm 1,4 \mu\text{m}$ .

Der selbe Pellikel wurde gefriergetrocknet und im Elektronenmikroskop untersucht, um zu untersuchen, ob die Abstufungen des Lasersignals wiedergefunden werden können.

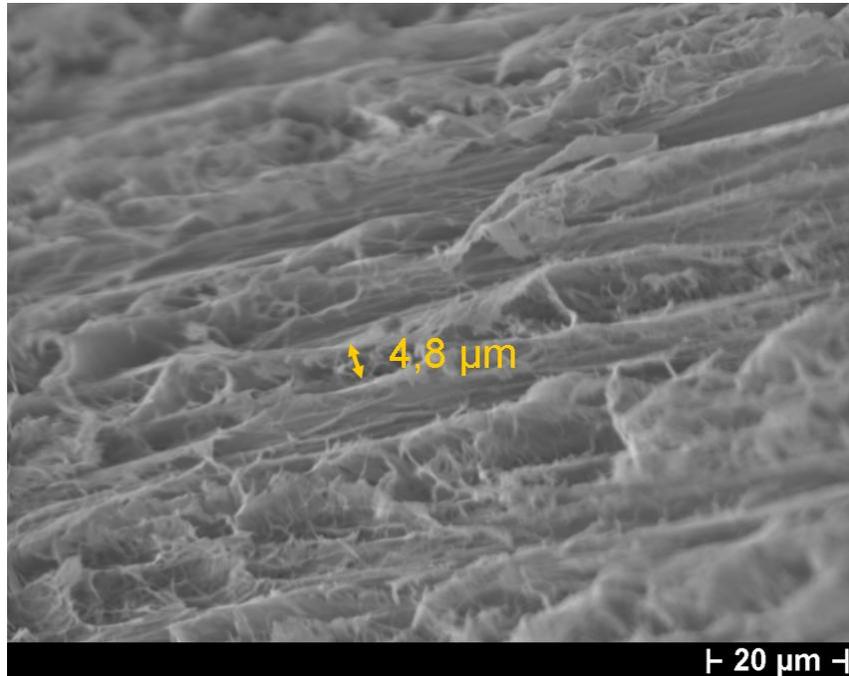


Abbildung 96: Querschnitt des Pellikels, der mit dem LTS untersucht wurde, im Detail (REM). Die Schichten haben einen Abstand von  $4,8 \mu m$  zueinander.

Die einzelnen Schichten haben, wie bereits beobachtet, einen Abstand zueinander von etwa  $5 \mu m$  (Abb. 96). Die Schichten erscheinen jedoch deutlich regelmäßiger als die Abstufungen des Lasersignals. Eine Betrachtung des gesamten Pellikels erlaubte Rückschlüsse auf den zeitlichen Abstand der Schichten zu ziehen.

Die Höhe des gesamten getrockneten Pellikels betrug in der rasterelektronenmikroskopischen Analyse  $2200 \mu m$ . Unter Berücksichtigung des Schichtabstands, bestand der Pellikel aus 440 Schichten. Bezogen auf die bekannte Produktionszeit des Pellikels im Membranmodul ergab sich ein zeitlicher Abstand der Schichten von etwa  $17 \text{ min}$ . Dies entspricht gut den Abstufungen, die im Lasersignal sichtbar waren. Es scheint möglich die Produktion der Schichten direkt im Lasersignal zu verfolgen. Dies erlaubt erstmals eine zeitliche Auflösung. Wie bereits durch das konfokale Laserscanning Mikroskop (CLSM) für den Schichtabstand gezeigt, scheint auch zeitliche Regelmäßigkeit des Schichtaufbaus nicht so regelmäßig zu sein, wie aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen angenommen.

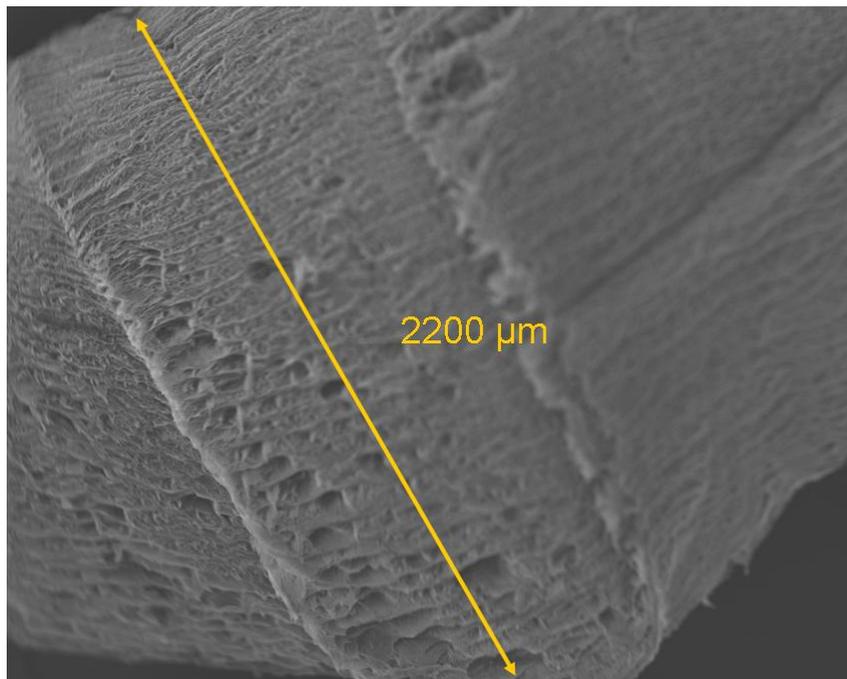


Abbildung 97: Gesamter Querschnitt eines Pellikels (REM). Die Höhe beträgt 2,2 *mm*.

#### 13.4 Diskussion

Es wurde deutlich, dass ein Pellikel homogen aus Schichten parallel zur Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase besteht. Die Schichtstruktur wurde bereits in der Literatur veröffentlicht. Brackmann *et al.* (2010) visualisierten bakterielle Cellulose im nativen Zustand durch "second harmonic generation" Mikroskopie. Es wurden ähnliche Schichtabstände von 5-8  $\mu\text{m}$  bestimmt. Bisher konnte nicht aufgeklärt werden, wie die definierte dreidimensionale Struktur entsteht. Mechanische oder hydrodynamische Einflüsse wie Adhäsion an der Gefäßwand oder die Oberflächenspannung spielen wahrscheinlich nur eine geringe Rolle. Ähnliche Strukturen wurden auch in Verfahren erzielt, die diese Einflüsse weitgehend ausschließen. Bodin *et al.* (2007) beobachteten eine Struktur mit radialen Schichten in einer Celluloseröhre, die im Kulturmedium um einen Silikonschlauch produziert wurde. Zusätzlich stellten sie einen Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) und der Dicke des aus Schichten aufgebauten Bereichs fest. Es könnte sein, dass die Schichtstruktur durch aktive Regulation produziert wird. Mögliche Einflüsse auf die Regulation sind "quorum sensing" und der  $pO_2$ . Es konnte gezeigt werden, dass c-di-GMP beide Signale integriert und die Cellulosesynthese aktiviert [Camilli *et al.*, 2006]. Chang *et al.* (2001) zeigten, dass *Gluconacetobacter xylinus* über eine Phosphodiesterase A1 verfügt, die c-di-GMP inaktiviert. Die Phosphodiesterase ist homolog zu einem Sauer-

stoffsensor *EcDos* aus *Escherichia coli*. Mit gebundenem Sauerstoff ist die Aktivität der Phosphodiesterase reduziert und die Konzentration von c-di-GMP erhöht. Die Synthese von Cellulose scheint direkt an den verfügbaren Sauerstoff gekoppelt zu sein. Auch durch eine Beeinflussung des "quorum sensing" Systems kann die Struktur des Pellikels beeinflussen (persönliche Kommunikation). Dies könnte Ansatzpunkte bieten, um die Struktur der produzierten Cellulose zu beeinflussen. Eventuell, kann es möglich sein den Einfluss verschiedener Verfahren direkt online durch das Signal eines Lasertriangulationssensors zu beobachten. Die dreidimensionale Struktur hat wahrscheinlich starke Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften eines Produkts aus bakterieller Cellulose. Es ist eine starke Anisotropie zu erwarten. Um gewünschte mechanische Eigenschaften zu erreichen ist es wichtig, die Orientierung der Schichten zu berücksichtigen. Die Dichte des Pellikels scheint wenigstens teilweise durch die Produktionsgeschwindigkeit beeinflusst zu werden. Eine schnellere Produktion führt zu einem weniger dichten Pellikel. Diese Annahme gilt jedoch nur unter vergleichbaren Kulturbedingungen, wie Satz- oder Zulaufverfahren im 0,1 L Maßstab mit dem Komplexmedium. Versuche im 20 L Ansatz zeigten in der Regel geringere Produktionsraten, die Dichte ist jedoch geringer als im 0,1 L Satzverfahren. Möglicherweise ist die Konzentration der Glukose entscheidend für die Dichte des Pellikels. In der Literatur ist eine durchschnittliche Dichte von  $8000 \text{ g m}^{-3}$  veröffentlicht [Liebner *et al.*, 2010]. Diese Cellulose wurde im statischen Oberflächenverfahren produziert. Dies bestätigt weiter die Annahme, dass im Membranverfahren generell höhere Dichten erzielt wurden als in der statischen Oberflächenkultivierung.

## 14 Eigenschaften bakterieller Cellulose

### 14.1 Reinigung

*Gluconacetobacter xylinus* ist gram-negativ und verfügt daher über Lipopolysaccharide (LPS) in der äußeren Membran [Bodin *et al.*, 2007]. Diese Moleküle sind als Endotoxine bekannt und aktivieren das angeborene Immunsystem. Sie können starke systemische Reaktionen hervorrufen [Murphy *et al.*, 2007]. Aus diesem Grund ist es erforderlich die bakterielle Cellulose von allen bakteriellen Rückständen zu befreien, wenn sie als Medizinprodukt eingesetzt werden soll [Bodin *et al.*, 2010]. Durch die hohe thermische und chemische Stabilität der Cellulose gegenüber Basen, kann der Pellikel durch Erhitzen in NaOH gereinigt werden [George *et al.*, 2005]. Pellikel wurden für 4 h in 0,1 M NaOH auf 80 °C erhitzt.

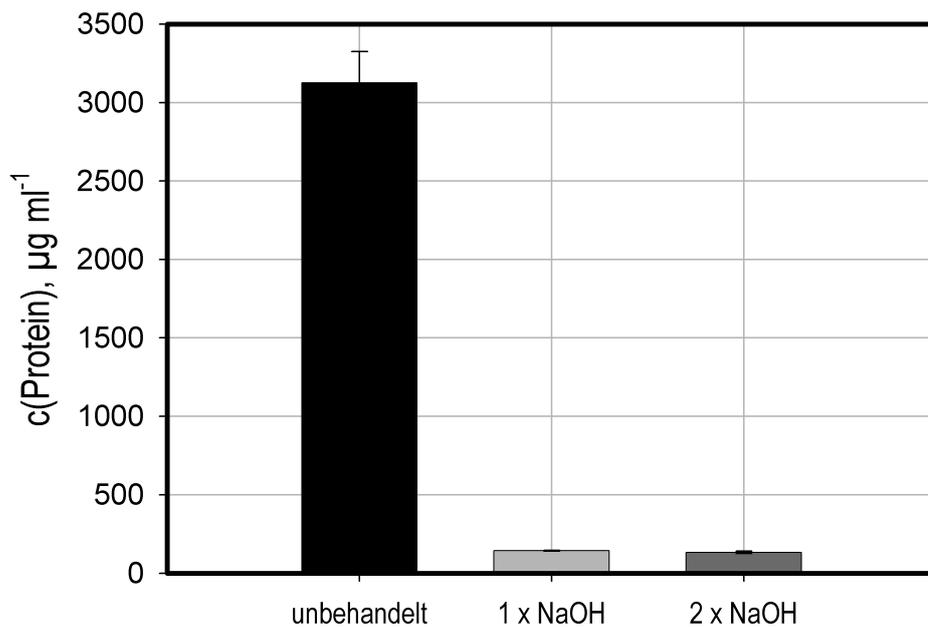


Abbildung 98: Gesamtproteinkonzentration in dem Pellikel nach aufeinanderfolgenden Behandlungen mit NaOH.

Um die Reinigungseffizienz zu ermitteln, wurde die Proteinkonzentration durch einen BCA Test nach den Reinigungsschritten bestimmt (Abb. 98). Ein unbehandelter Pellikel nach der Sterilisation enthielt etwa  $3000 \mu\text{g ml}^{-1}$  Protein. Nach dem ersten Reinigungsschritt war die Proteinkonzentration bereits nahe dem Detektionslimit mit  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Ein

weiterer Reinigungsschritt reduzierte die Proteinkonzentration nicht signifikant.

Der Versuch zeigt, dass die Behandlung mit NaOH effektiv die Proteinkonzentration reduziert.

## 14.2 Biokompatibilität

Biokompatibilität umfasst einen weiten Bereich. Generell ist die Biokompatibilität spezifisch für eine Anwendung [Williams, 1999]. Für die folgenden Untersuchungen wurde hauptsächlich die Anwendung als Implantat mit Blutkontakt berücksichtigt.

### 14.2.1 Blutkompatibilität

Bakterielle Cellulose wird für viele Anwendungen untersucht, bei denen das Material in Kontakt mit Blut kommt. Es ist daher unter anderem wichtig, dass das Material die Blutgerinnung nicht fördert.

Um die Blutkompatibilität zu untersuchen wurde die Aktivierung von zwei Faktoren der Gerinnungskaskade und eines Faktors des Komplementsystems berücksichtigt. Bakterielle Cellulose wurde mit ePTFE (W. L. Gore & Associates, Flagstaff, USA) verglichen. Alle Tests nutzen Blut eines gesunden männlichen Spenders. Blutplasma wurde in einer Polycarbonatplatte mit einem Pellicel und ePTFE gleicher Fläche inkubiert. Als Kontrolle dienten leere Kavitäten der Platte.

Ein zentraler Faktor des Komplementsystems ist C3a. Die Konzentration des Proteins wurde durch einen ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay") bestimmt.

Abbildung 99 zeigt die Konzentrationen von C3a des-Arg, die in den Plasmaproben bestimmt wurden. Plasma aus den leeren Kavitäten wies eine Konzentration von  $95 \text{ ng ml}^{-1}$  C3a auf. Plasma, das zusätzlich in Kontakt mit bakterieller Cellulose war zeigte eine Konzentration von  $105 \text{ ng ml}^{-1}$  C3a. Inkubation mit ePTFE führte zu einer Konzentration von  $115 \text{ ng ml}^{-1}$  C3a.

Gesunde Individuen weisen in der Regel eine Konzentration von weniger als  $150 \text{ ng ml}^{-1}$  C3a in EDTA-Plasma auf. Als erhöht werden erst Konzentration höher als  $200 \text{ ng ml}^{-1}$  betrachtet. Keine der Proben verursachte eine erhöhte Aktivierung. Die Kontrolle verursachte die geringste Aktivierung. C3a ist ständig in geringer Konzentration im Blut vorhanden und stellt so eine schnelle Aktivierung des Komplementsystems sicher. Diese Konzentration entsteht durch spontane Spaltung der C3 Konvertase [Murphy *et al.*, 2007].

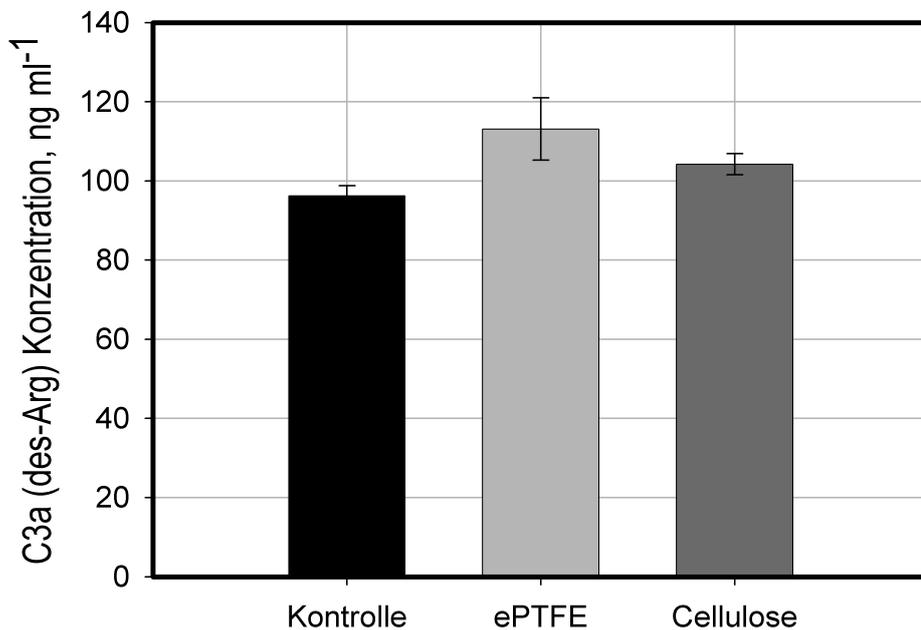


Abbildung 99: Konzentration des Faktors C3a (des-Arg). Bakterielle Cellulose wurde mit einer Kontrolle und ePTFE verglichen.

Um eine Aktivierung der Blutgerinnung zu untersuchen, wurden die Aktivitäten von Faktor 1+2 und Faktor XIIa bestimmt. Faktor 1 steht am Ende der Blutgerinnungskaskade und bildet die Fibrinfilamente, die Blutzellen und Plättchen vernetzen. Faktor XII wird durch Kontakt mit Plättchen und bestimmten Oberflächen aktiviert. Durch den Kontakt mit Cellulose ist eine direkte Aktivierung von Faktor XII möglich. Wird die Blutgerinnung durch einen anderen Weg ausgelöst, ist dies an der Aktivierung von Faktor 1+2 erkennbar.

Abbildung 100 zeigt die Aktivität von Faktor 1(Fibrin)+2. Als Standard wurde eine definierte Plasmaprobe eingesetzt ("low control", LC). Die Aktivierung in der Plasmaprobe, die mit Cellulose inkubiert wurde lag zwischen LC und der Kontrolle. Auffällig, war die ePTFE Probe, bei der eine wesentlich höhere Aktivität von  $4,1 \text{ U L}^{-1}$  bestimmt wurde. Es ist bereits bekannt, dass ePTFE die Blutgerinnung in geringen Maß fördert [Zahedmanesh *et al.* 2011]. Dies begrenzt die Einsatzmöglichkeiten des Materials als Implantat mit Blutkontakt. Es ist daher vielversprechend, dass die Aktivierung, durch Cellulose gering war.

Faktor XII wird durch Kontakt mit Plättchen und negativ geladenen Oberflächen akti-

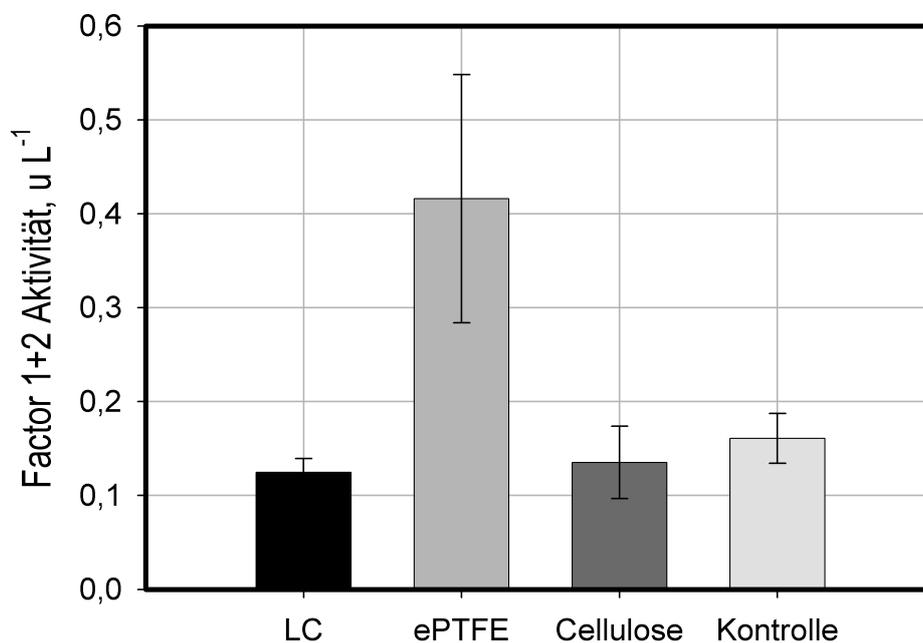


Abbildung 100: Aktivität der Faktoren 1+2. Cellulose wurde mit einer Kontrolle, einer definierten Plasmaprobe ("low control", LC) und ePTFE verglichen.

viert. Es sollte untersucht werden, ob Cellulose hier eine Aktivierung auslöst.

Cellulose wurde mit ePTFE verglichen. Als Standard wurden zwei definierte Plasmaproben eingesetzt ("standard high" (SH), "standard low" (SL)) (Abb. 101). Keine der Proben führte zu einer signifikanten Aktivierung von Faktor XII im Plasma. Kontakt mit bakterieller Cellulose scheint keine direkte Oberflächenreaktion der Blutgerinnungskaskade auszulösen. Ein Faktor hierfür könnte die hohe Kristallinität des Materials sein.

Trotz der generell geringen Aktivierung der Blutgerinnung von Cellulose und ePTFE waren auf dem Material nach der Inkubation mit Blut kleine Gerinnsel zu erkennen (Abb. 102). Erythrozyten wurden von Fibrin auf den Oberflächen verankert. Für die bakterielle Cellulose war es jedoch nicht möglich die Fibrinfasern von den Cellulosefasern zu unterscheiden. Es ist denkbar, dass auch Erythrozyten von Cellulosefasern zurückgehalten wurden. Insgesamt scheint die Menge der Erythrozyten auf Cellulose geringer zu sein, als auf ePTFE.

Faktoren des Komplementsystems und der Gerinnungskaskade werden in der Regel getrennt betrachtet. Beide Systeme interagieren jedoch [Rittirsch *et al.*, 2008]. Eine Oberflächenaktivierung von Faktor XII kann zu einer Aktivierung der C3 Konvertase des Kom-

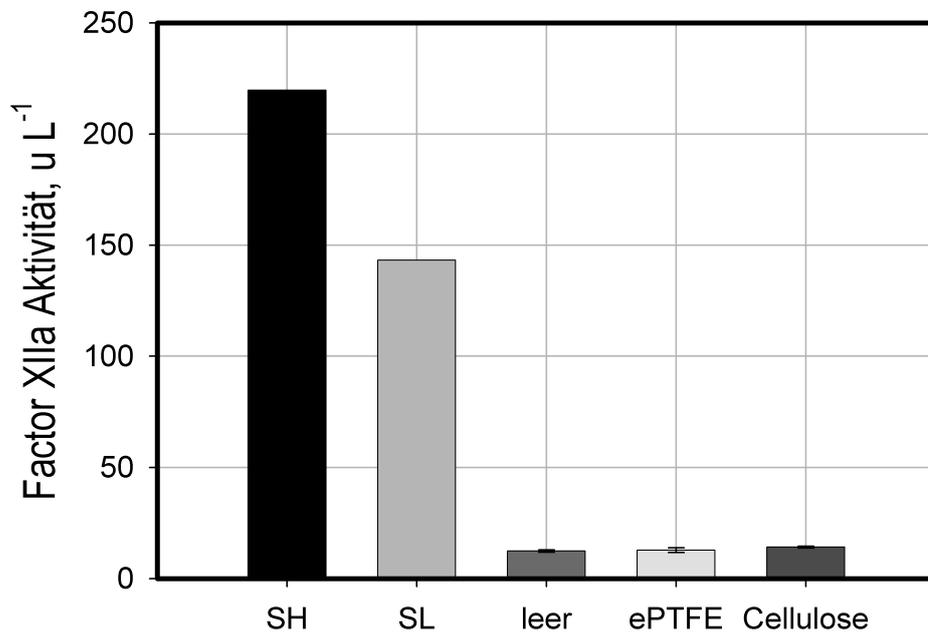


Abbildung 101: Aktivität von Faktor XIIa. Cellulose wurde mit einer Kontrolle, zwei definierten Plasmaproben („standard high“ (SH), „standard low“ (SL)) und ePTFE verglichen.

plementsystems führen und so zusätzlich zur Blutgerinnung eine Entzündungsreaktion auslösen. In den einzelnen Untersuchungen, die zur Blutkompatibilität durchgeführt wurde, konnten Interaktionen nicht erfasst werden. Es werden weiter Untersuchungen nötig sein, bis das Material zu einer Implantation freigegeben werden kann.

### 14.2.2 Besiedlung

Ein weitere Hinweis für die Biokompatibilität eines Materials kann durch die Beobachtung der Interaktion relevanter Zellen mit dem Material erhalten werden. Da eines der interessantesten Anwendungsgebiete bakterieller Cellulose der Blutgefäßersatz ist, wurde das Material mit primären glatten Muskelzellen („smooth muscle cells“, SMC) und Endothelzellen („endothelial cells“, EC) besiedelt. Glatte Muskelzellen kleiden Arterien innen in radialer Anordnung aus und sind für die Kontraktion verantwortlich. Die natürliche Morphologie ist spindelförmig. Endothelzellen bedecken die glatten Muskelzellen und bilden die innere Oberfläche eines Blutgefäßes. Dabei spielen sie eine wichtige Rolle in der Hämostase. Sie sind natürlich flach ausgebreitet.

Glatte Muskelzellen aus einer humanen Nabelschnurvene wurden auf bakterieller Cellu-

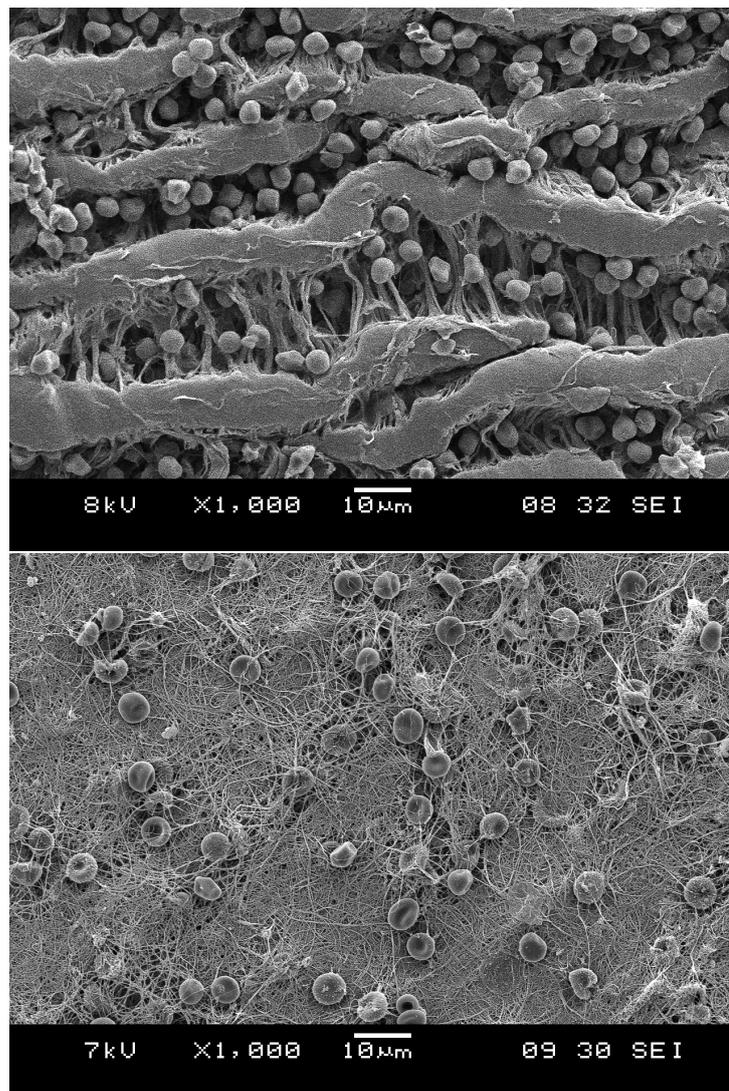


Abbildung 102: Durch Fibrinfasern gebundene Erythrocyten auf ePTFE (oben) und bakterieller Cellulose (unten).

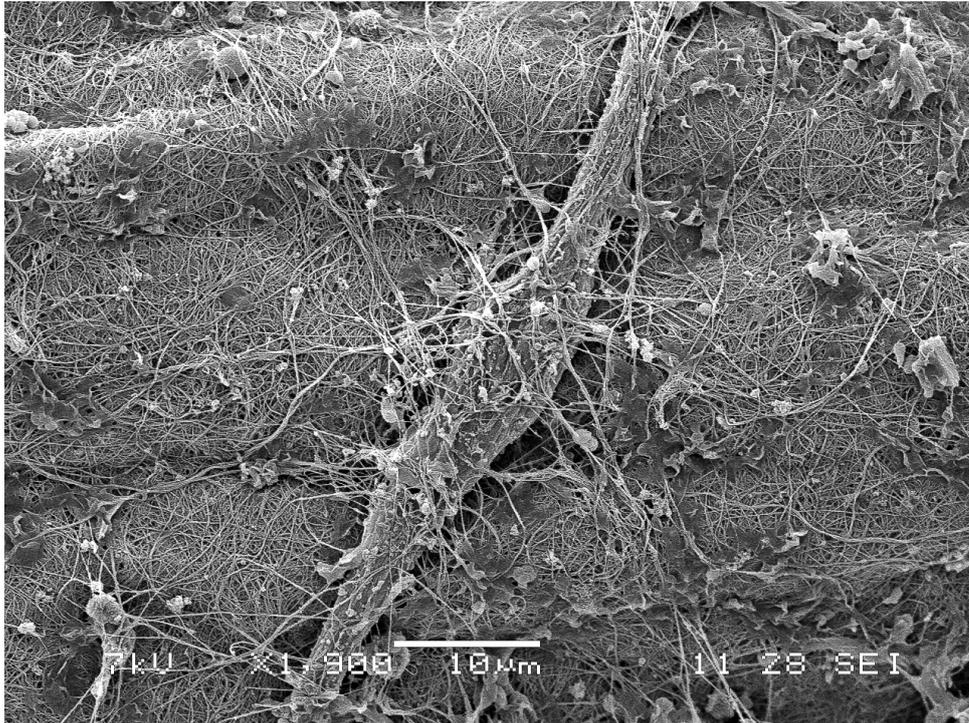


Abbildung 103: Humane arterielle glatte Muskelzelle auf bakterieller Cellulose.

lose als Träger kultiviert. Abbildung 103 zeigt eine Glatte Muskelzelle auf der Oberfläche des Pellikels. Die Zellen weisen die charakteristische Spindelform auf. Dies weist darauf hin, dass die Zellen ihre Differenzierung erhalten und das Material als Ersatz der Extrazellulären Matrix funktioniert. Einige Cellulosefasern sind sogar über der SMC erkennbar. Die Zelle scheint sich unter die Fasern bewegt zu haben.

In Abbildung 104 sind Endothelzellen flach auf der Cellulose ausgebreitet zu erkennen. Sie zeigen eine gute Adhäsion an die Oberfläche des Materials. Die Faserstruktur der Cellulose ist teilweise durch die Zellen hindurch erkennbar. Dies entspricht der natürlichen Morphologie der Zellen.

### 14.3 Diskussion

Für medizinische Anwendungen ist ein großer Vorteil der bakteriellen Cellulose, dass das Material autoklaviert werden kann und dank der chemischen Beständigkeit eine Reinigung durch NaOH möglich ist. Für Proteine konnte eine effektive Reinigung bereits mit einem Waschschrift gezeigt werden. Dies ist für medizinische Anwendungen jedoch nicht ausreichend. Hierzu sind spezielle Untersuchungen notwendig. Regulatorische Vorschriften verlangen unter anderem einen Nachweis, dass die Menge an Endotoxinen bei unter

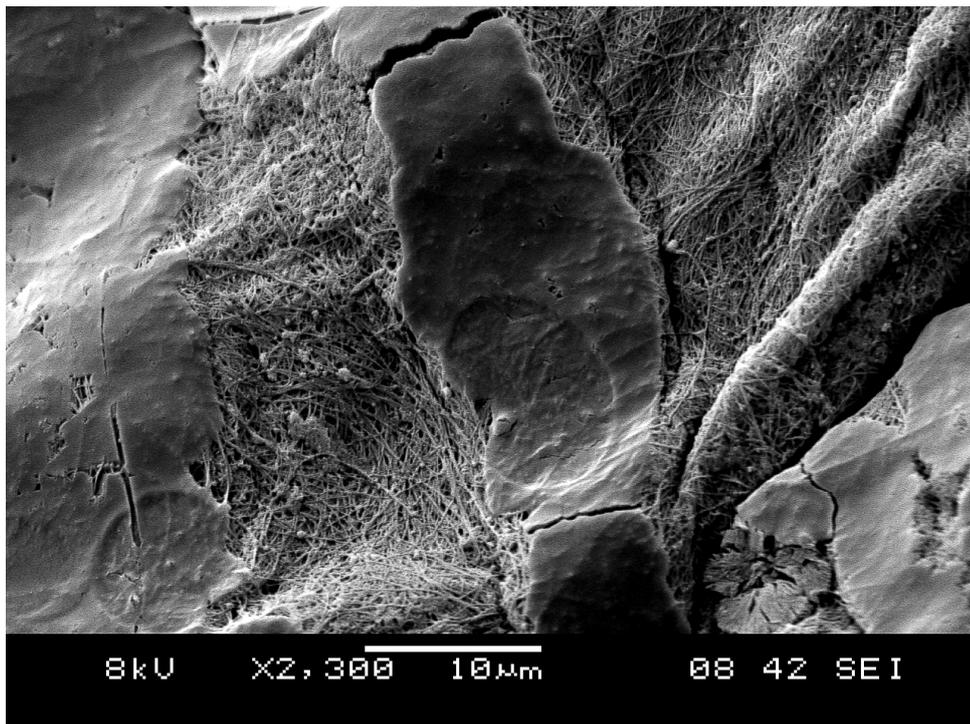


Abbildung 104: Endothelzellen auf bakterieller Cellulose.

20 EU ("endotoxin unit", EU) pro Produkt bei Produkten mit Blutkontakt liegt. Dies kann durch einen LAL (Limulus-Amöbozyten-Lysat) Test nachgewiesen werden. Ein weitere wichtiger Faktor für medizinische Produkte ist die Blutkompatibilität. Hierzu wurden erste Untersuchungen durchgeführt. Die geringe Aktivierung des Komplementsystems ist ebenfalls ein Hinweis auf eine erfolgreiche Reinigung. Verbleibende Endotoxine hätten wahrscheinlich eine Pathogenantwort ausgelöst. Bezüglich der Blutgerinnung ist es vielversprechend, dass bakterielle Cellulose eine geringere Aktivierung auslöste als ePTFE. ePTFE ist ein zugelassenes Material für Gefäßprothesen. Da bekannt ist, dass das Material in gewissem Maß die Blutgerinnung fördert, muss ein bestimmter Fluss in Gefäßen aus ePTFE gewährleistet werden. Es können daher keine Gefäße mit einem Innendurchmesser kleiner 5 mm ersetzt werden [Wang *et al.*, 2007; Teebken und Haverich, 2002]. Die eventuell geringere Thrombogenität von bakterieller Cellulose könnte Anwendungen im Ersatz von kleinlumigen Gefäßen eröffnen. Für den Langzeiteinsatz im Körper ist es in der Regel vorteilhaft, wenn das Material möglichst gut in das Gewebe integriert wird. Blutgefäße sind im Körper mit radial angeordneten glatten Muskelzellen und darüber mit einer Schicht Endothelzellen ausgekleidet. Es konnte gezeigt werden, dass beide Zellarten gut auf bakterieller Cellulose haften und ihre charakteristische Form behalten. Ob auch *in vivo* eine Besiedlung mit diesen Zellen erfolgt muss noch gezeigt werden.

## 15 Zusammenfassung und Ausblick

### Zusammenfassung

Obwohl bakterielle Cellulose durch Brown (1886) schon lange Zeit bekannt war, sind erst in den letzten Jahren interessante Anwendungen, vor allem als Biomaterial, entdeckt worden. Bakterielle Cellulose hat sich als sehr gut biokompatibel erwiesen [Helenius *et al.*, 2005]. Es werden Anwendungen als Implantat in vielen Funktionen im Körper und besonders als Blutgefäßersatz untersucht [Wippermann *et al.*, 2009]. Die effiziente biotechnologische Produktion von bakterieller Cellulose ist daher von großem Interesse.

Im bisher häufigsten Verfahren wird bakterielle Cellulose in Form eines Hydrogels ("Pellikel") in statischer Oberflächenkultivierung produziert. Dieses Verfahren erschwert die Kontrolle der Reaktionsbedingungen in der Flüssigphase und es kann zur Ausbildung eines inhomogenen Pellikels kommen.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines membrangestützten Verfahrens zur definierten Herstellung von bakterieller Cellulose unter kontrollierten Reaktionsbedingungen. Das Konzept sah vor den Celluloseproduzenten *Gluconacetobacter xylinus* durch eine Mikrofiltrationsmembran vom Kulturmedium zu trennen und gleichzeitig die auf der Membran produzierte Cellulose durch die Membran mechanisch zu stabilisieren.

Es konnten organische und keramische hydrophile Mikrofiltrationsmembranen identifiziert werden, die für das Verfahren geeignet sind. Unter Berücksichtigung der Handhabung und unter ökonomischen Gesichtspunkten wurde eine Polyethersulfonmembran ausgewählt.

Das Verfahren wurde modular konzipiert. Membranmodule wurden mit einem zentralem Bypassgefäß verbunden, in dem das Medium homogenisiert und kontrolliert wurde. Hierfür wurden zwei Labormuster eines Membranmoduls entwickelt. Mit beiden Modulen konnte erfolgreich membrangestützt Cellulose produziert werden.

Zentral für die Bestimmung der Kinetik der Celluloseproduktion war die Anwendung eines laserbasierten Messsystems zur online-Messung der gebildeten Cellulosemenge. Die Höhe des Pellikels auf der Membran wurde durch Lasertriangulation online gemessen. Dies war einfach möglich, aufgrund der definierten Starthöhe der Cellulose, die durch die Membran vorgegeben wurde. Zusätzlich konnte die Höhe der Pellikel auf der Membran mit dem Trockengewicht gereinigter Pellikel korreliert werden.

Abbildung 105 zeigt einen typischen Verlauf des Trockengewichts der produzierten bakteriellen Cellulose im Membranmodul im 0,1 L Ansatz im Satzverfahren mit 20 g L<sup>-1</sup> Glu-

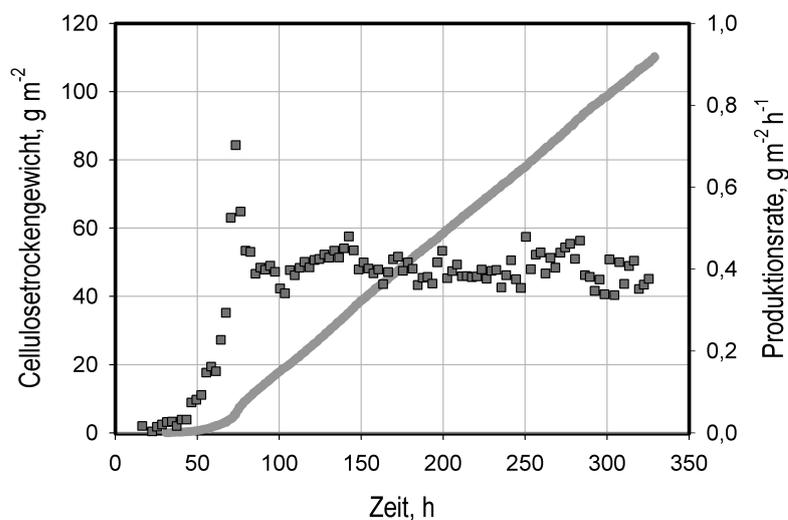


Abbildung 105: Kinetik der membrangestützten Celluloseproduktion mit *Gluconacetobacter xylinus* im 0,1 L Satzverfahren. Cellulose-trockengewicht (—), Produktionsrate (■).

kose. Die Quantifizierung des Biofilms durch Lasertriangulation erlaubte eine sehr hohe Auflösung der Kinetik der Celluloseproduktion für reaktionstechnische Untersuchungen. In 330 h wurden bei diesem Versuch  $118 \text{ g m}^{-2}$  Cellulose-trockengewicht erreicht. Dies entspricht einer Höhe des Pellicels von  $5,8 \text{ mm}$ . Die Celluloseproduktionsraten sind über einen langen Zeitraum nahezu konstant. Dies ermöglicht es die Höhe des Pellicels über die Prozesszeit genau einzustellen.

Das Verfahren wurde bei gleicher Membranfläche auf ein Gesamtvolumen von  $20 \text{ L}$  übertragen. Hierfür wurde ein Standard Rührkesselreaktor im Bypass eingesetzt. Reaktionstechnische Untersuchungen zeigten, dass die Celluloseproduktion nicht nur von der Substratkonzentration (Glukose) und dem optimalen pH abhängt. Die Celluloseproduktion wird zusätzlich durch Stressfaktoren für *Gluconacetobacter xylinus* induziert, wie einen pH Sprung oder einen Abfall der Sauerstoffsättigung.

Da viele Anwendungen bakterieller Cellulose im medizinischen Bereich liegen, war im Hinblick auf eine möglichst definierte Herstellung ein komplett definiertes Medium wünschenswert. Es wurde ein komplett definiertes Medium entwickelt, dass die Produktion von Cellulose erlaubt. Die Menge der produzierten Cellulose erreichte jedoch nur etwa ein Drittel der Menge, die mit dem Komplexmedium produziert wurde.

Die Verfügbarkeit von Substrat begrenzt die Celluloseproduktion. *Gluconacetobacter xylinus* ist obligat aerob [Deppenmeier und Ehrenreich, 2009]. Sauerstoff wird nur über die

Oberfläche des Pellikels bereitgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass Sauerstoff bei Be- gasung mit Luft nur bis etwa  $200\ \mu\text{m}$  in den wachsenden Pellikel eindringt. Dies begrenzt die Schicht metabolisch aktiver Zellen auf die oberste Schicht des Pellikels. Glukose als wichtigstes Substrat diffundiert aus dem Medium durch den wachsenden Pellikel.

Eine Erhöhung der Glukosekonzentration im Medium und damit der Stoffstromdichte von Glukose war jedoch nicht ausreichend um die Menge der im Membranverfahren produ- zierten Cellulose zu erhöhen. Vielmehr reduzierte eine erhöhte Glukosekonzentration die Dichte des produzierten Pellikels.

Dies konnte durch eine Untersuchung der durchschnittlichen Porengrößen bestätigt wer- den. Kultivierungen im Satzverfahren führten zu einer durchschnittlichen Porengröße von  $23\ \mu\text{m}$ , während im Zulaufverfahren eine Porengröße von  $35\ \mu\text{m}$  erreicht wurde.

Ein Vorteil der membrangestützten Celluloseproduktion war die Produktion von beson- ders homogenen Pellikeln durch den Schutz des Pellikels vor mechanischen Einwirkungen durch die Membran.

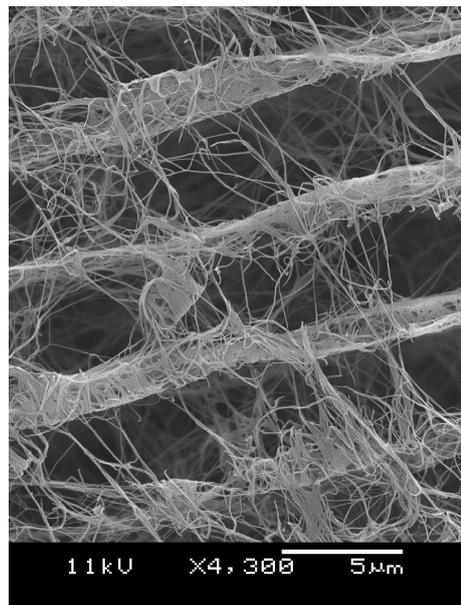


Abbildung 106: Querschnitt eines Cellulosepellikels, das von *Gluconacetobacter xylinus* im Membranverfahren produziert wurde. Die Schichten im Abstand von  $5\ \mu\text{m}$  sind parallel zur Membran angeordnet.

Pellikel aus dem Membranverfahren wurden durch Rasterelektronenmikroskopie und kon- fokale Laser Scanning Mikroskopie analysiert. Die Struktur des Pellikels war sehr homogen und bestand aus Schichten in gleichmäßigem Abstand zueinander, die parallel zur Mem-

bran verliefen (Abb. 106). Der Grund für das Auftreten dieser Struktur konnte nicht geklärt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine aktive Regulation der Cellulosesynthese von *Gluconacetobacter xylinus* zugrundeliegt.

Abschließend wurde im Hinblick auf medizinische Anwendungen die Blutkompatibilität der produzierten bakteriellen Cellulose untersucht. Hierzu wurde die Aktivierung von der Protease C3 aus dem Komplementsystem und der Faktoren 1+2 und XIIa der Blutgerinnungskaskade untersucht. Bakterielle Cellulose verursachte generelle eine geringere Aktivierung als expandiertes Polytetrafluorethylen. Besonders positiv war die geringe Aktivierung von Fibrin. Dies kann bakterieller Cellulose eine Vielzahl medizinische Anwendungen, wie den Ersatz kleinlumiger Blutgefäße eröffnen.

### Ausblick

Mit den Ergebnissen aus dem Labormaßstab konnten Voraussetzungen erfüllt werden, um die membrangestützte Celluloseproduktion auf einen kommerziellen Maßstab übertragen zu können. Zu diesem Zweck muss ein hierfür geeignetes Membranmodul konstruiert werden. Die Form der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase bestimmt weitgehend die Form der produzierten Cellulose und damit des finalen Produkts. Dies muss bei der Konstruktion eines solchen Membranmoduls berücksichtigt werden. Das Membranverfahren in seiner gegenwärtigen Ausführung ist hauptsächlich geeignet, um Pellicel in hoher Qualität für medizinische Anwendungen kommerziell herzustellen. Die Raum-Zeit-Ausbeute könnte jedoch durch ein engeres Stapeln der Membranmodule gesteigert werden.

Das definierte Medium sollte weiter verbessert werden. Dies kann zunächst durch eine Suche nach eventuell fehlenden Komponenten erfolgen.

Die dargestellten Untersuchungen zur Blut- und Biokompatibilität des Materials waren nur vorläufig. Um eine Zulassung des Materials in einem Medizinprodukt zu erreichen, sind weitere Tests notwendig. Es ist besonders wichtig, die Reinigung bakterieller Cellulose von Endotoxinen sicherzustellen, da *Gluconacetobacter xylinus* Gram negativ ist und Endotoxine in der Zellhülle besitzt.

## 16 Literaturverzeichnis

### Literatur

E. Arkhangelsky, D. Kuzmenko, and V. Gitis. Impact of chemical cleaning on properties and functioning of polyethersulfone membranes. *Journal of Membrane Science*, 305(1-2):176–184, Nov 2007.

H. Bäckdahl, M. Esguerra, D. Delbro, B. Risberg, and P. Gatenholm. Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*, 2(6):320–30, Aug 2008.

H. Backdahl, G. Helenius, A. Bodin, U. Nannmark, B. Johansson, B. Risberg, and P. Gatenholm. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27(9):2141–2149, Mar 2006.

S. Bae and M. Shoda. Bacterial cellulose production by fed-batch cultivation in molasses medium. *Biotechnology Progress*, Jan 2004.

S. Bae and M. Shoda. Production of bacterial cellulose by acetobacter xylinum bpr2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67(1):45–51, Apr 2005.

T. J. Battin, W. T. Sloan, S. Kjelleberg, H. Daims, I. M. Head, T. P. Curtis, and L. Eberl. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nature Reviews Microbiology*, 5(1):76–81, jan 2007.

J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer. *Biochemistry, Fifth Edition & Lecture Notebook*. W. H. Freeman, fifth edition edition, jun 2002.

E. E. Beuling, J. C. van den Heuvel, and S. P. Ottengraf. Diffusion coefficients of metabolites in active biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(1):53–60, jan 2000.

E. Beuling, van Dusschoten D, P. Lens, van den Heuvel JC, van As H, and S. Ottengraf. Characterization of the diffusive properties of biofilms using pulsed field gradient-nuclear magnetic resonance . *Biotechnology and Bioengineering*, 60(3):283–291, nov 1998.

P. Bishop and J. Lawson. Recombinant biologics for treatment of bleeding disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 3(8):684–694, 2004.

- A. Bodin, H. Bäckdahl, H. Fink, L. Gustafsson, B. Risberg, and P. Gatenholm. Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes. *Biotechnol. Bioeng.*, 97(2):425–434, Jun 2007.
- A. Bodin, S. Concaro, M. Brittberg, and P. Gatenholm. Bacterial cellulose as a potential meniscus implant. *J Tissue Eng Regen Med*, 1(5):406–8, Jan 2007.
- C. Brackmann, A. Bodin, M. Åkeson, P. Gatenholm, and A. Enejder. Visualization of the cellulose biosynthesis and cell integration into cellulose scaffolds. *Biomacromolecules*, 11(3):542–548, 2010.
- S. Branda, A. Vik, L. Friedman, and R. Kolter. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1):20–26, Jan 2005.
- A. J. Brown. On an acetic ferment which forms cellulose. *J. Chem. Soc.*, 49, 432–439 (1886)
- E. Brown and M. Laborie. Bioengineering bacterial cellulose/poly (ethylene oxide) nanocomposites. *Biomacromolecules*, Jan 2007.
- A. Camilli and B. L. B.. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, Jan 2006.
- A. L. Chang, J. R. Tuckerman, G. Gonzalez, R. Mayer, H. Weinhouse, G. Volman, D. Amikam, M. Benziman, and M. A. Gilles-Gonzalez. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry*, 40(12):3420–3426, mar 2001.
- Y. Chao, Y. Sugano, and M. Shoda. Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(6):673–679, Jun 2001.
- J. Chavez-Pacheco, S. Martinez-Yee, M. Contreras, S. Gomez-Manzo, J. Membrillo-Hernandez, and J. Escamilla. Partial bioenergetic characterization of gluconacetobacter xylinum cells released from cellulose pellicles by a novel methodology. *J Appl Microbiol*, 99(5):1130–1140, Nov 2005.
- J. L. Chávez-Pacheco, M. Contreras-Zentella, J. Membrillo-Hernández, R. Arreguín-Espinoza, G. Mendoza-Hernández, S. Gómez-Manzo, and J. E. Escamilla. The quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from gluconacetobacter xylinus: molecular and catalytic properties. *Arch Microbiol*, 192(9):703–13, Sep 2010.

K.-C. Cheng, A. Demirci, and J. M. Catchmark. Advances in biofilm reactors for production of value-added products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2):445–456, may 2010.

W. Czaja, A. Krystynowicz, S. Bielecki, and R. Brownjr. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2):145–151, Jan 2006.

W. Czaja, D. Romanovicz, and R. M. Brown. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, Jan 2004.

U. Deppenmeier and A. Ehrenreich. Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of gluconobacter oxydans. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 16(1-2):69–80, 2008.

B. Evans, H. O'Neill, V. Malyvanh, I. Lee, J. Woodward. Palladium- bacterial cellulose membranes for fuel cells. *Biosens. Bioelectron.*, 2003;18:917–23.

H.-C. Flemming and J. Wingender. The biofilm matrix. *Nat Rev Micro*, 8(9):623–33, Sep 2010.

E. Forng, S. Anderson, and R. Cannon. Synthetic medium for acetobacter xylinum that can be used for isolation of auxotrophic mutants and study of cellulose biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(5):1317–1319, May 1989.

J. George, K. Ramana, S. Sabapathy, J. Jagannath, and A. Bawa. Characterization of chemically treated bacterial (acetobacter xylinum) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37(4):189–194, Dec 2005.

S. Grzegorzczyn, K. Michalska-Małecka, and A. Slezak. Time evolution of NaCl flux through the microbial cellulose membrane with concentration polarization. *Polim Med*, jan 2008.

A. Hagiwara, N. Imai, M. Sano, M. Kawabe, S. Tamano, S. Kitamura, T. Omoto, I. Asai, K. Yasuhara, and S. Hayashi. A 28-day oral toxicity study of cultivation-derived cellulose, produced by acetobacter aceti subspecies xylinum, in f344 rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 35(3):317–325, 2010.

L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Micro*, 2(2):95–108, Feb 2004.

- R. Hartikainen. Diffusion of KCl in an amylose film. *Carbohydrate Polymers*, 52(4):375–380, jun 2003.
- G. Helenius, H. Bäckdahl, A. Bodin, U. Nannmark, P. Gatenholm, and B. Risberg. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J. Biomed. Mater. Res.*, 76A(2):431–438, Feb 2005.
- R. Hengge. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4):263–273, apr 2009.
- A. Hille, T. R. Neu, D. C. Hempel, and H. Horn. Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(5):614–623, 2005.
- A. Hille, T. R. Neu, D. C. Hempel, and H. Horn. Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(6):1202–1213, aug 2009.
- H. Horn and E. Morgenroth. Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms. *Chemical Engineering Science*, 61(5):1347–1356, mar 2006.
- H. Horn and D. C. Hempel. Substrate utilization and mass transfer in an autotrophic biofilm system: Experimental results and numerical simulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 53(4):363–371, feb 1997.
- M. Hornung, M. Ludwig, and H. P. Schmauder. Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: A Novel Aerosol Bioreactor Working on a Fed Batch Principle (Part 3). *Engineering in Life Sciences*, 7(1):35–41, feb 2007.
- S.-Q. Hu, Y.-G. Gao, K. Tajima, N. Sunagawa, Y. Zhou, S. Kawano, T. Fujiwara, T. Yoda, D. Shimura, Y. Satoh, M. Munekata, I. Tanaka, and M. Yao. Structure of bacterial cellulose synthase subunit d octamer with four inner passageways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(42):17957–61, Oct 2010.
- Y. Hu and J. Catchmark. Formation and characterization of spherelike bacterial cellulose particles produced by *acetobacter xylinum* jcm 9730 strain. *Biomacromolecules*, pages 219–224, 2010.
- J. W. Hwang, Y. K. Yang, J. K. Hwang, Y. R. Pyun, and Y. S. Kim. Effects of ph and dissolved oxygen on cellulose production by *acetobacter xylinum* brc5 in agitated culture. *J. Biosci. Bioeng.*, 88(2):183–8, Jan 1999.

- A. Iida, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi. Control of acetic acid cultivation by "quorum sensing" via n-acylhomoserine lactones in *gluconacetobacter intermedius*. *Journal of Bacteriology*, 190(7):2546–2555, Jan 2008.
- T. Itoh, S. Kimura, and R. Brown. Theoretical considerations of immunogold labeling of cellulose synthesizing terminal complexes. *Cellulose*, 11(3):385–394, 2004.
- T. Itoh, S. Kimura, and R. B. JR. Immunogold labeling of cellulose-synthesizing terminal complexes. *Springer*.
- R. Jonas and L. Farah. Production and application of microbial cellulose. *Polymer degradation and stability*, Jan 1998.
- J. Kakisis, C. Liapis, C. Breuer, and B. Sumpio. Artificial blood vessel: The holy grail of peripheral vascular surgery. *Journal of Vascular Surgery*, 41(2):349–354, Feb 2005.
- R. Kaushal, T. Walker, and D. Drummond. Observations on the formation and structure of bacterial cellulose. *Biochemical Journal*, Jan 1951.
- S. Kawano, K. Tajima, Y. Uemori, H. Yamashita, T. Erata, M. Munekata, and M. Takai. Cloning of cellulose synthesis related genes from *acetobacter xylinum* atcc23769 and atcc53582: comparison of cellulose synthetic ability between strains. *DNA Res*, 9(5):149–56, Oct 2002.
- L. Keller and M. G. Surette. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 4(4):249–258, feb 2006.
- C. Kemper and J. Atkinson. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 7(1):9–18, 2006.
- D. Klemm, D. Schumann, U. Udhardt, and S. Marsch. Bacterial synthesized cellulose artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, Jan 2001.
- D. Kralisch, N. Hessler, D. Klemm, R. Erdmann, and W. Schmidt. White biotechnology for cellulose manufacturing—the holir concept. *Biotechnol. Bioeng.*, 105(4):740–747, 2010.
- F. Kramer, D. Klemm, D. Schumann, N. Heßler, F. Wesarg, W. Fried, and D. Stadermann. Nanocellulose polymer composites as innovative pool for (bio)material development. *Macromol. Symp.*, 244(1):136–148, Dec 2006.

- A. Krystynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jeziarska, M. Goncalves-Mikiewicz, M. Turkiewicz, and S. Bielecki. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4):189–195, Oct 2002.
- A. Krystynowicz, M. Koziolkiewicz, A. Wiktorowska-Jeziarska, S. Bielecki, E. Klemenska, A. Masny, and A. Plucienniczak. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of acetobacter xylinum. *Acta Biochim Pol*, 52(3):691–8, Jan 2005.
- Q. Li, R. He, J. O. Jensen, and N. J. Bjerrum. Approaches and Recent Development of Polymer Electrolyte Membranes for Fuel Cells Operating above 100 °C. *Chemistry of Materials*, 15(26):4896–4915, dec 2003.
- F. Liebner, E. Haimer, M. Wendland, M. Neouze, K. Schlufte, P. Miethe, T. Heinze, A. Potthast, and T. Rosenau. Aerogels from unaltered bacterial cellulose: Application of scco2 drying for the preparation of shaped, ultra-lightweight cellulosic aerogels. *Macromol. Biosci.*, 10(4):349–352, 2010.
- H. Link and D. Weuster-Botz. Genetic algorithm for multi-objective experimental optimization. *Bioprocess Biosyst Eng*, 29(5-6):385–390, Nov 2006.
- T. Mah. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 2001.
- T. Melin, R. Rautenbach. *Membranverfahren: Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*. Springer-Verlag, 3. Auflage, 2007.
- D. Mikkelsen, B. Flanagan, G. Dykes, and M. Gidley. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by gluconacetobacter xylinus strain atcc 53524. *J Appl Microbiol*, Mar 2009.
- R. Mormino and H. Bungay. Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(5-6):503–506, Oct 2003.
- K. M. Murphy, P. Travers, and M. Walport. *Janeway's Immunobiology (Immunobiology: The Immune System (Janeway))*. Garland Science, 7 edition, Nov 2007.
- Y. Nishi, M. Uryu, S. Yamanaka, K. Watanabe, N. Kitamura and M. Iguchi. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. Part 2: improvement of the mechanical properties of sheets and their applicability to diaphragms of electroacoustic transducers. *J. Mater. Sci.*, 1990; 25: 2997–3001.

- W. J. Okkerse, S. P. Ottengraf, and B. Osinga-Kuipers. Biofilm thickness variability investigated with a laser triangulation sensor. *Biotechnol. Bioeng.*, 70(6):619–29, Dec 2000.
- E. Peeters. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2):157–165, Feb 2008.
- J. P. Peterson and R. B. Peterson. Laser triangulation for liquid film thickness measurements through multiple interfaces. *Applied optics*, 45(20):4916–4926, jul 2006.
- B. Rauch, J. Pahlke, P. Schweiger, and U. Deppenmeier. Characterization of enzymes involved in the central metabolism of gluconobacter oxydans. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(3):711–718, Oct 2010.
- B. Rehm. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Micro*, 8(8):578–592, 2010.
- D. Rittirsch, M. Flierl, and P. Ward. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 8(10):776–787, 2008.
- K. Rodríguez, S. Renneckar, and P. Gatenholm. Biomimetic Calcium Phosphate Crystal Mineralization on Electrospun Cellulose-Based Scaffolds. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(3):681–689, mar 2011.
- P. Ross, R. Mayer, and M. Benziman. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Jan 1991.
- N. Sakairi, H. Asano, M. Ogawa, N. Nishi, and S. Tokura. A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of acetobacter xylinum. *Carbohydrate Polymers*, 35(3-4):233–237, 1998.
- I. M. Saxena, K. Kudlicka, K. Okuda, and R. M. Brown. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of acetobacter xylinum: implications for cellulose crystallization. *Journal of Bacteriology*, 176(18):5735–52, Sep 1994.
- A. I. Schäfer, I. Akanyeti, and A. J. C. Semião. Micropollutant sorption to membrane polymers: A review of mechanisms for estrogens. *Advances in Colloid and Interface Science*, pages 1–18, dec 2010.
- J. Shah, Jr. RM Brown. Towards electronic displays made from microbial cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005;66(4):352–5.

- T. Shigematsu, K. Takamine, M. Kitazato, T. Morita, T. Naritomi, S. Morimura, and K. Kida. Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (gdh)-deficient mutant of *gluconacetobacter xylinus* and its use for bioconversion of sweet potato pulp. *J. Biosci. Bioeng.*, 99(4):415–422, Jan 2005.
- A. Svensson. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26(4):419–431, Feb 2005.
- R. Tal, H. C. Wong, R. Calhoon, D. Gelfand, A. L. Fear, G. Volman, R. Mayer, P. Ross, D. Amikam, H. Weinhouse, A. Cohen, S. Sapir, P. Ohana, and M. Benziman. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-gmp in *acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *Journal of Bacteriology*, 180(17):4416–25, Sep 1998.
- A. Teoh. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2):119–126, sep 2004.
- D.F. Williams. *The Williams dictionary of Biomaterials*, 1999, ISBN 0-85323-921-5
- D. U., H. M., and P. C. Biochemistry and biotechnological applications of *gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3):233–242, Nov 2002.
- M. Ulbricht. Advanced functional polymer membranes. *Polymer*, 47(7):2217–2262, mar 2006.
- Z.-W. Wang and S. Chen. Potential of biofilm-based biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(1):1–18, mar 2009.
- J. Wippermann, D. Schumann, D. Klemm, H. Kosmehl, S. Salehi-Gelani, and T. Wahlers. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 37(5):592–596, 2009.
- H. Zahedmanesh, J. N. Mackle, A. Sellborn, K. Drotz, A. Bodin, P. Gatenholm, and C. Lally. Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 97B(1):105–113, feb 2011.

## 17 Abkürzungen

Abkürzung	Beschreibung
AHL	N-acyl Homoserin Lakton
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchonsäure
BTM	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> Biotrockenmasse
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
CMC	Carboxy Methyl Cellulose
CSL	Corn Steep Liquor
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EPS	Extrazelluläre polymerische Substanz.
ePTFE	expandiertes Polytetrafluoroethylen
FDA	Fluorescein Diacetat
FDA	Food and Drug Administration
GA	Genetischer Algorithmus
HS <sup>+</sup>	Hestrin und Schramm Medium
HUASMC	Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cell
KBE	Koloniebildende Einheit
LAL	Limulus Amoebocyt Lysat
LTS	Laser Triangulations Sensor
MBR	Membran Bioreaktor
MOPS	Morpholino Propionsäure
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Polykarbonat
PES	Polyethersulfon
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluoroethylen
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
TC	Terminaler Komplex

## A Anhang

### A.1 Zeichnungen der Membranmodule

#### Glasmodul

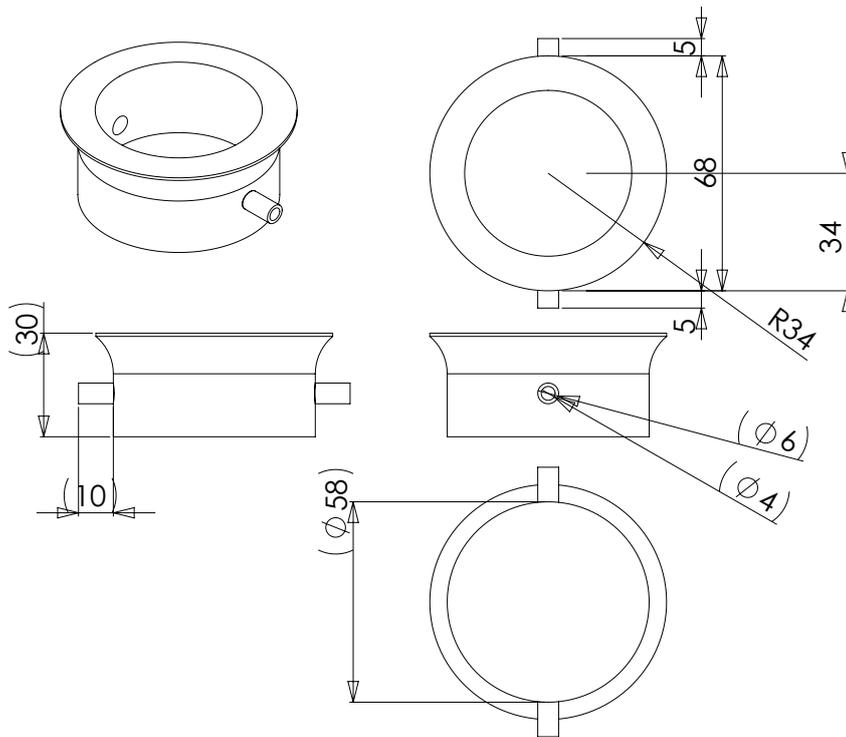


Abbildung 107: Glasschliffflansch für den oberen und unteren Körper des Moduls.

Abbildungen 107 und 108 zeigen die Konstruktionszeichnungen, die für die Herstellung des Flansches und des Einsatzes des Glasmoduls verwendet wurden.

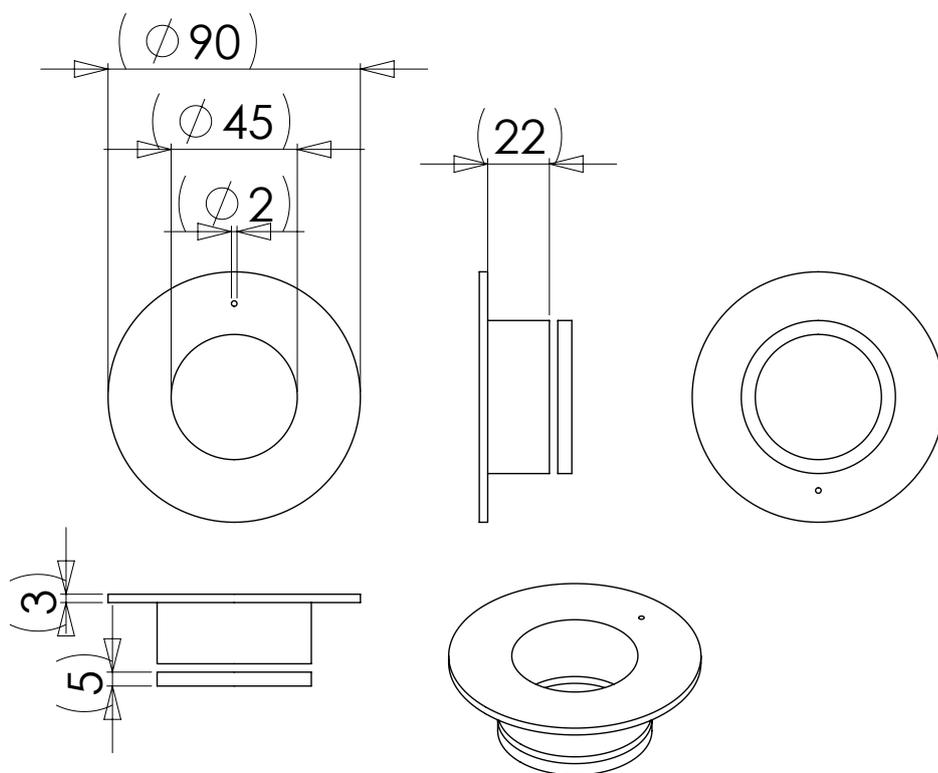


Abbildung 108: Polypropylen Einsatz.

## Polypropylenmodul

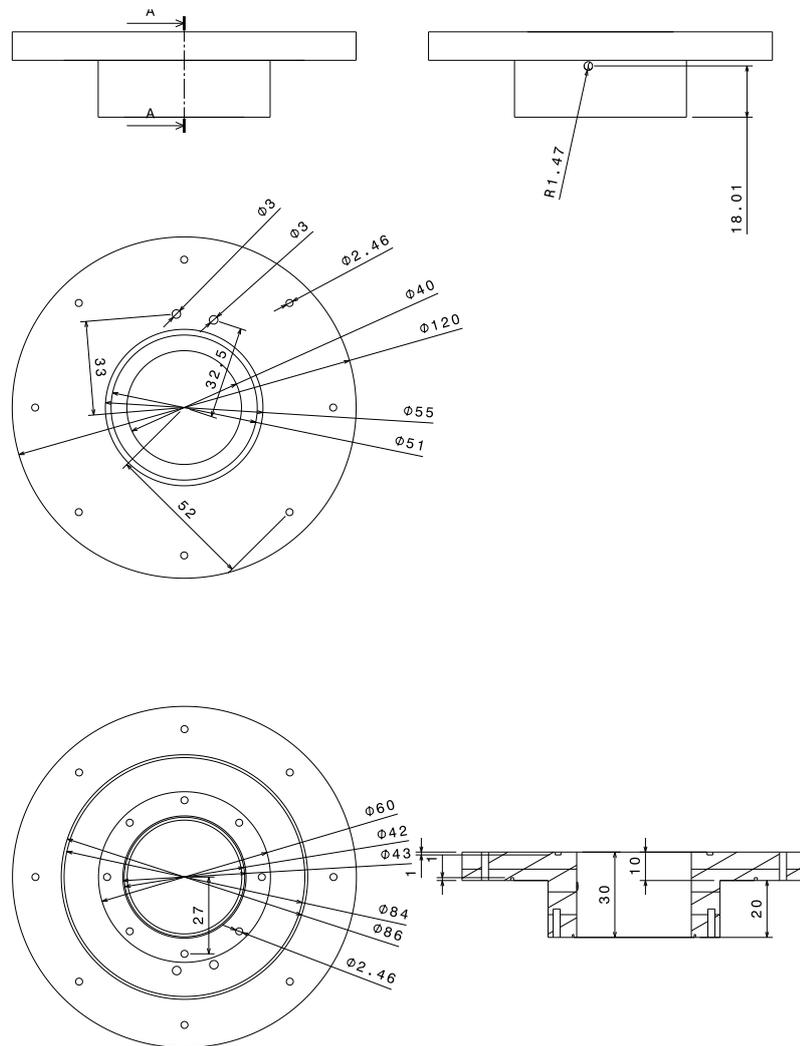


Abbildung 109: Oberer Teil des Polypropylenmoduls.

Abbildung 109 zeigt die Konstruktionszeichnungen des oberen Körpers des Polypropylenmoduls.

Abbildung 110 zeigt die Konstruktionszeichnungen des unteren Körpers des Polypropylenmoduls.

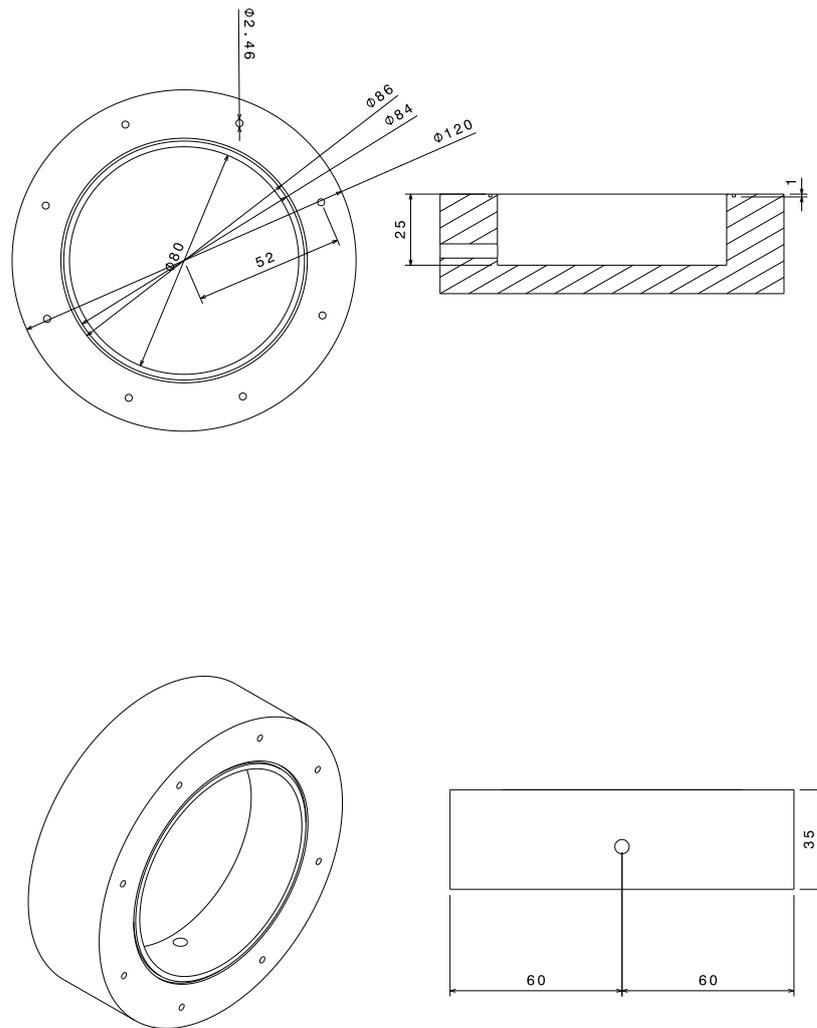


Abbildung 110: Unterer Teil des Polypropylenmoduls.

## A.2 Leitfähigkeitsmessung

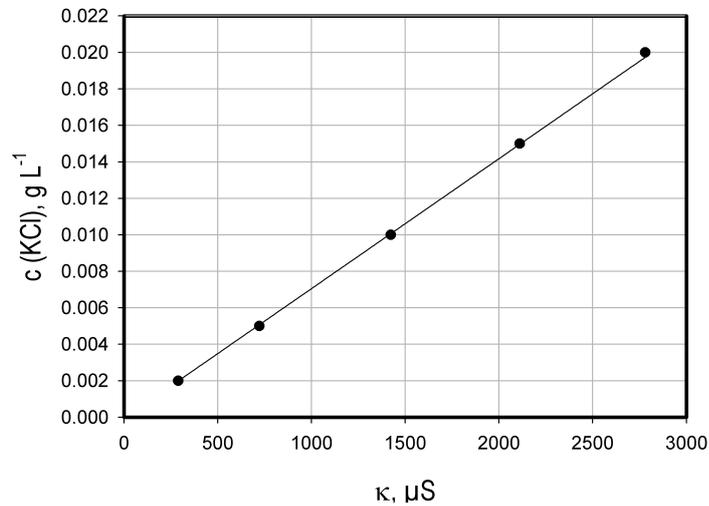


Abbildung 111: Kalibrationskurve für die KCl Konzentration  $\kappa$ .

Durch eine Kalibrierkurve wurde die Leitfähigkeit  $\kappa$  mit der Konzentration von KCl korreliert (Figure 111).

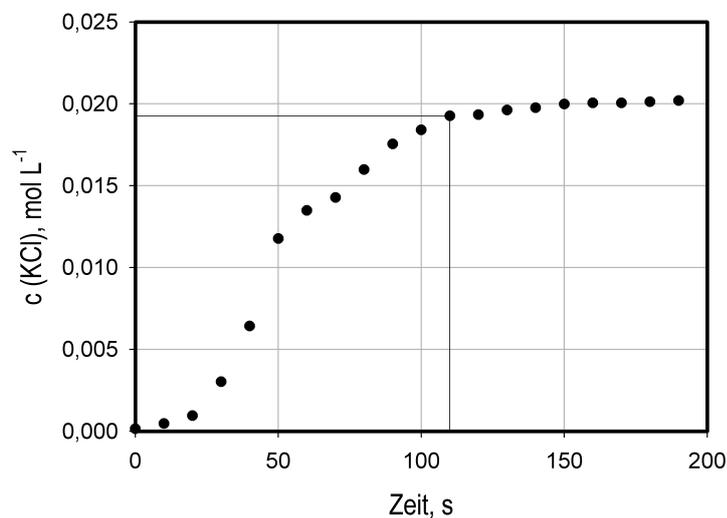


Abbildung 112: Mischzeit in der Diffusionszelle.

Abbildung 112 zeigt die notwendige Zeit ( $\Theta_{95}$ ), um 95 % der Endkonzentration von KCl in der Diffusionszelle zu erreichen. Die Konzentration wurde in 110 s erreicht. Aus diesem Grund wurde die Mischzeit in den Diffusionsexperimenten vernachlässigt.

### A.3 Optimierung

Die Ergebnisse der Optimierung im Mikrotiterplattenformat sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Ergebnisse der Optimierung

Indivisnum	Generation 1		Generation 2		Generation 3		Generation 4		Generation 5		Generation 6	
	Kosten [EUR]	DW [g]										
1	0,9662	0	1,5874	$5,00 \cdot 10^{-5}$	1,3041	$9,60 \cdot 10^{-4}$	1,2727	$1,95 \cdot 10^{-3}$	0,5119	$4,33 \cdot 10^{-4}$	1,2455	$6,50 \cdot 10^{-4}$
2	1,4014	0	1,025	0	0,6745	$1,16 \cdot 10^{-3}$	1,39	$1,06 \cdot 10^{-3}$	0,6547	$5,17 \cdot 10^{-4}$	1,2641	$1,33 \cdot 10^{-3}$
3	1,9766	0	1,398	0	1,3776	0	0,5353	$1,09 \cdot 10^{-3}$	0,6783	$5,67 \cdot 10^{-4}$	1,345	$1,57 \cdot 10^{-3}$
4	1,3225	$1,10 \cdot 10^{-3}$	1,9705	0	0,8508	$8,58 \cdot 10^{-4}$	0,6176	$9,85 \cdot 10^{-4}$	1,309	$3,00 \cdot 10^{-4}$	0,4851	$7,80 \cdot 10^{-4}$
5	1,1261	0	1,2668	$1,48 \cdot 10^{-3}$	0,8726	$8,99 \cdot 10^{-4}$	0,9825	0	1,5932	$3,33 \cdot 10^{-4}$	1,2994	$2,50 \cdot 10^{-4}$
6	1,1797	0	1,3074	$1,17 \cdot 10^{-4}$	1,237	$7,15 \cdot 10^{-4}$	1,2886	$5,16 \cdot 10^{-4}$	1,4372	0	0,6228	$2,33 \cdot 10^{-4}$
7	1,3015	0	1,1965	0	1,4017	$1,37 \cdot 10^{-3}$	1,396	$1,36 \cdot 10^{-3}$	1,1743	$1,28 \cdot 10^{-3}$	1,4014	$1,20 \cdot 10^{-3}$
8	1,157	0	1,3012	$8,17 \cdot 10^{-4}$	1,1705	0	1,5451	$9,06 \cdot 10^{-4}$	1,0959	$1,32 \cdot 10^{-3}$	1,3289	$1,48 \cdot 10^{-3}$
9	1,4013	0	1,2922	$9,50 \cdot 10^{-4}$	0,6659	$5,39 \cdot 10^{-4}$	1,2699	$1,31 \cdot 10^{-3}$	1,4886	$5,00 \cdot 10^{-4}$	0,6343	$5,17 \cdot 10^{-4}$
10	1,0277	0	1,1034	$8,33 \cdot 10^{-5}$	1,2847	$7,15 \cdot 10^{-4}$	1,4229	0	1,3743	$1,25 \cdot 10^{-3}$	0,584	$8,67 \cdot 10^{-4}$
11	1,5496	$3,00 \cdot 10^{-4}$	1,2219	$1,18 \cdot 10^{-3}$	0,9095	$1,84 \cdot 10^{-4}$	1,3533	$6,80 \cdot 10^{-4}$	1,3957	$1,20 \cdot 10^{-3}$	1,4059	$1,67 \cdot 10^{-5}$
12	1,2695	$8,67 \cdot 10^{-4}$	0,7759	$2,33 \cdot 10^{-4}$	0,691	$2,04 \cdot 10^{-4}$	1,3128	$8,61 \cdot 10^{-4}$	1,5158	$4,67 \cdot 10^{-4}$	1,7662	0
13	1,5766	$2,26 \cdot 10^{-3}$	1,2666	0	1,0723	$2,45 \cdot 10^{-4}$	1,5666	$1,20 \cdot 10^{-3}$	1,3544	$1,08 \cdot 10^{-3}$	1,4063	$6,17 \cdot 10^{-4}$
14	1,9465	0	1,5815	0	1,2392	$5,92 \cdot 10^{-4}$	0,6214	$7,02 \cdot 10^{-4}$	0,6165	$4,83 \cdot 10^{-4}$	1,3449	$1,33 \cdot 10^{-3}$
15	0,7484	0	0,9104	$5,00 \cdot 10^{-5}$	0,9118	$3,88 \cdot 10^{-4}$	1,4237	$4,08 \cdot 10^{-4}$	0,695	$4,83 \cdot 10^{-4}$	1,5495	$3,83 \cdot 10^{-4}$

## A.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

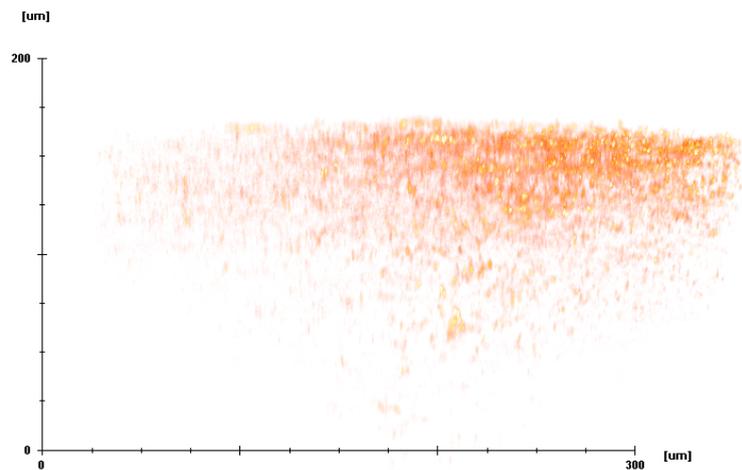


Abbildung 113: Dreidimensionale Rekonstruktion eines mit Syto60 (DNA Farbstoff) gefärbten Pellikels.

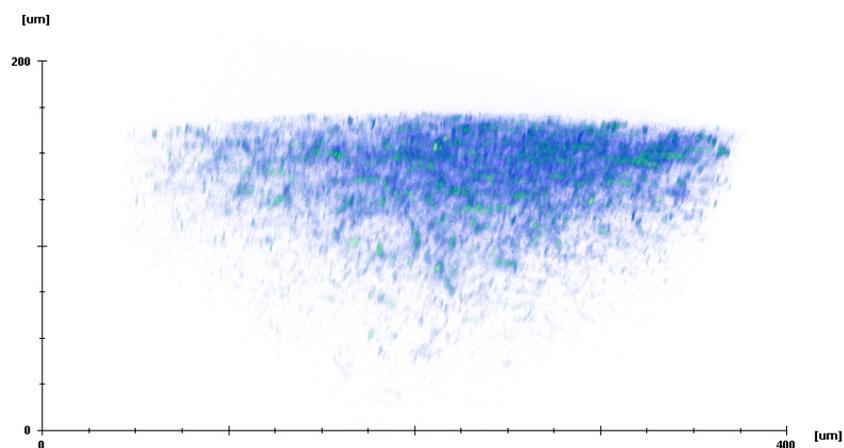


Abbildung 114: Dreidimensionale Rekonstruktion eines mit AAL488 (Lektin) gefärbten Pellikels.

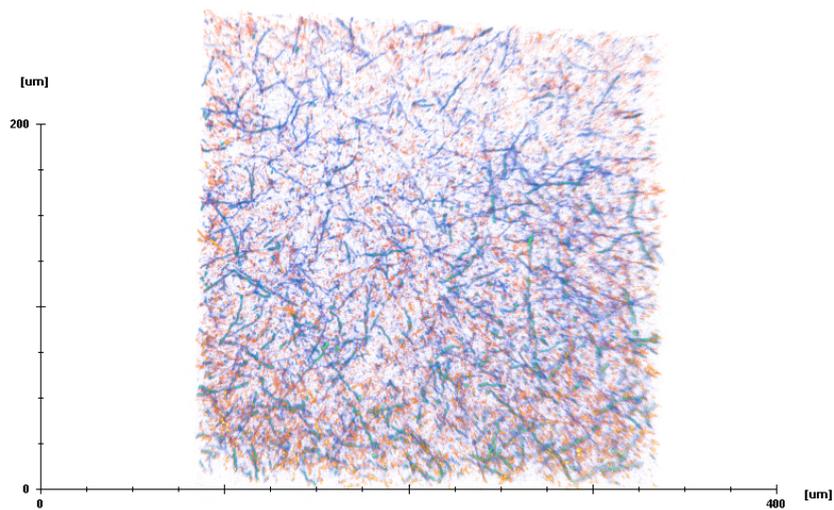


Abbildung 115: Kombination der dreidimensionalen Rekonstruktionen der Färbungen mit Syto60 und AAL488.

## A.5 Materialien

Tabelle 27: Chemikalien.

Substanz	Formel	Hersteller
Dinatriumhydrogenphosphat	$\text{HNa}_2\text{PO}_4$	Merck
Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck
Bactopepton	-	Difco
Biotin	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	Roth
Borsäure	$\text{H}_3\text{BO}_3$	Merck
Calciumchlorid	$\text{CaCl}_2$	Roth
Calciumpantothenat	$\text{CaC}_9\text{H}_{15}\text{NO}_5$	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat Dodekahydrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Roth
Eisenchlorid	$\text{FeCl}_2$	Merck
Folsäure	$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$	Roth
Natriumglukonat	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$	Sigma-Aldrich
Glukose Monohydrat	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck
Hefeextrakt	-	Deutsche Hefewerke
Kaliumiodid	$\text{KI}$	Merck
Kupfersulfat	$\text{CuSO}_4$	Merck
L-Methionin	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$	Roth
Magnesiumsulfat	$\text{MgSO}_4$	Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck
YNB w/o Amino Acids	-	Difco

Substanz	Formel	Hersteller
Myo-Inositol	$C_6H_{12}O_6$	Fluka Analytical
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumhydroxid	NaOH	Roth
Natriummolybdat	NaMo	Merck
Nicotineamid	$C_6H_6N_2O$	Sigma-Aldrich
P-Aminobenzoessäure	$C_7H_7NO_2$	Merck
Pyridoxin Hydrochlorid	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	Roth
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma
Thiamine Hydrochlorid	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	Sigma-Aldrich
Zinksulfat	$ZnSO_4$	Merck
Zitronensäure Monohydrat	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	$KH_2PO_4$	Merck

Tabelle 28: Geräte.

Gerät	Hersteller
Analysenwaage AG 285	Mettler Toledo, Gießen
Analysenwaage E1M213	Ohaus, Gießen
Analysenwaage E121245	Ohaus, Gießen
Photometer Spectronic Genesys 20	Thermo Electron, Dreieich
Lyophile Alpha 1-2 LD	Martin Christ GmbH, Osterrode
Zentrifuge Biofuge Stratos	Kendro-Heraeus, Langenselbold
pH-Sonde BlueLine	Schott, Mainz
Schüttelinkubator Multitron	Infors, Einsbach
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen

Tabelle 29: Rührkesselreaktoren.

Rührkesselreaktor Labfors	Infors, Einsbach
Gefäßtyp	doppelwandig Glas
Arbeitsvolumen	1,2 L
Rührertyp	2 Rushton Turbinen
Antrieb	oben, Gleitringdichtung
Begasung	Durchflussregler, Einblasrohr
Kontrollsoftware	Iris-NT Pro Version 4.11
pH-Sonde HA405-DPA-SC-S8	Mettler-Toledo, Gießen
DO-Sonde InPro 6000	Mettler-Toledo, Gießen
Probenahmesystem	spezial angefertigt
Rührkesselreaktor Techfors	Infors, Einsbach
Gefäßtyp	doppelwandig Edelstahl
Arbeitsvolumen	30 L
Rührertyp	3 Rushton Turbinen
Antrieb	unten, Gleitringdichtung
Begasung	Durchflussregler, Einblasrohr
Kontrollsoftware	Iris-NT Pro Version 4.11
pH-Sonde HA405-DPA-SC-S8	Mettler-Toledo, Gießen
DO-Sonde InPro 6000	Mettler-Toledo, Gießen
Antischaumsonde Russel	Infors, Einsbach
Drucksensor PR-25HT/8931A	Keller, Winterthur
Peristalische Pumpe Ecoline VC	Ismatech, Wertheim-Mondfeld
Probenahmesystem	spezial angefertigt

## Tabellenverzeichnis

1	Wachstumsphasen. . . . .	6
2	Klassifizierung von Membranen nach Material, Struktur, Herstellung und Form [Ulbricht, 2006]. . . . .	9
3	Klassen der "quorum sensing" Signalmoleküle [Keller und Surette, 2006]. . . . .	27
4	Zusammensetzung von PBS. . . . .	34
5	Zusammensetzung des SDS Probenpuffers. . . . .	34
6	Zusammensetzung des HS <sup>+</sup> Mediums. . . . .	35
7	Bestandteile des Glasmoduls. . . . .	37
8	Bestandteile des Polypropylenmoduls. . . . .	38
9	Parameter der Lasertriangulation . . . . .	47
10	Konzentration der C3a Standard Lösungen. . . . .	52
11	Konzentrationen der F 1+2 Standard Lösungen. . . . .	53
12	Höhe der eingesetzten Pellikel. . . . .	53
13	Konzentrationen in den Diffusionsexperimenten. . . . .	54
14	Konzentration der Glukose Standard Lösungen. . . . .	54
15	Zusammensetzung der Testlösungen. . . . .	55
16	Konzentration der Glukonat Standard Lösungen. . . . .	56
17	Zusammensetzung der Testlösungen. . . . .	56
18	Variablen der Optimierung. . . . .	58
19	Parameter der Optimierung. . . . .	59
20	Vergleich der Membranmodule. . . . .	67
21	Membranmaterialien. . . . .	70
22	Zusammensetzung des Mediums mit dem die maximale Cellulosemenge erreicht wurde. . . . .	104
23	Dicke der eingesetzten Pellikel. . . . .	112
24	Vergleich der effektiven binären Diffusionskoeffizienten mit den binären Diffusionskoeffizienten in Wasser bei 30 °C. . . . .	115

---

25	Lineare Korrelation des Volumens mit dem Trockengewicht für verschiedenen Produktionsverfahren. . . . .	128
26	Ergebnisse der Optimierung . . . . .	166
27	Chemikalien. . . . .	169
28	Geräte. . . . .	170
29	Rührkesselreaktoren. . . . .	171

## Abbildungsverzeichnis

1	In statischer Kultivierung bildet <i>Gluconateobacter xylinus</i> einen Pellikel aus Cellulose an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase produziert. Der Sauerstoffeintrag erfolgt diffusiv über die Gasphase (Luft). . . . .	2
2	Eine Membran an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase soll den Pellikel mechanisch schützen und den konvektiven Transport der Flüssigphase (Medium) und damit die einfache Kontrolle der Reaktionsbedingungen ermöglichen. . . . .	3
3	Schematische Wachstumskurve von Mikroorganismen in Suspensionskultur im Satzverfahren. . . . .	5
4	Einteilung von Membranverfahren nach Partikelgröße und Transmembrandruck. F: Filtration, MF: Mikrofiltration, UF: Ultrafiltration, NF: Nanofiltration und RO: Umkehrosiose. . . . .	8
5	Stäbchenförmige Zelle von <i>Gluconacetobacter xylinus</i> eingebettet in Cellulosefasern. . . . .	12
6	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie Aufnahme einer Kultur von <i>Gluconacetobacter xylinus</i> . . . . .	12
7	Übersicht über den Metabolismus von <i>G. xylinus</i> . 1: Cellulose Synthesekomplex, 2: Alkohol Dehydrogenase, 3: Acetaldehyd Dehydrogenase, 4: PQQ-abhängige Glukose Dehydrogenase, 5: Transhydrogenase, 6: NADH-Dehydrogenase, 7: Chinol Oxidase (cytochrom bd), 8: Chinol Oxidase (cytochrom bo <sub>3</sub> ), 9: lösliche Glukose Dehydrogenase, 10: Phosphoglucomutase, 11: UDPG-Pyrophosphorylase [Shigematsu <i>et al.</i> , 2005; Ross <i>et al.</i> , 1991; Deppenmeier und Ehrenreich, 2008]. . . . .	14
8	Schematische Zeichnung der Cellulosesynthese von <i>G. xylinus</i> . Die Proteine des <i>axces</i> Operons sind gekennzeichnet. . . . .	15
9	Operon der Cellulosesynthese [Kawano <i>et al.</i> , 2002] . . . . .	15
10	Cellulosefibrille, die von einer Zelle von <i>Gluconacetobacter xylinus</i> produziert wird. Elektronenmikroskopische Aufnahme bei 37000 facher Vergrößerung. . . . .	16
11	Struktur von c-di-GMP [Camilli <i>et al.</i> , 2006]. . . . .	17

12	Chemische Struktur von Cellulose [Stryer <i>et al.</i> , 2002]. . . . .	18
13	Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Cellulosesträngen [Ross <i>et al.</i> , 1991]. . . . .	19
14	Pellets aus bakterieller Cellulose, die durch eine Suspensionskultur in Schüttelkolben produziert wurden [Czaja <i>et al.</i> , 2004]. . . . .	20
15	Kontinuierliche Oberflächenkultivierung zur Celluloseproduktion [Sakairi <i>et al.</i> , 1998]. Cellulosepellikel entstehen in einer flachen Vertiefung und werden über Rollen aus dem Gefäß transportiert. . . . .	21
16	"Horizontal Lift Reactor"(Holir) [Kralisch <i>et al.</i> , 2010]. Cellulosepellikel werden kontinuierlich mit einem Förderband aus einem langgestreckten Glastank gefördert . . . . .	22
17	Cellulosescheiben aus einem Tauchtropfkörper [Krystynowicz <i>et al.</i> , 2002].	22
18	Aerosol Bioreaktor [Hornung <i>et al.</i> , 2007]. Der Pellikel entsteht auf dem Boden der Glaskammer. Das Kulturmedium wird als Aerosol über die Oberfläche bereitgestellt. . . . .	23
19	Herstellung von definierten Formen von bakterieller Cellulose durch das Einbringen von Formen an der Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase [Yamanaka, 1996; JP000008126697A]. Kulturgefäße (obere Reihe) definieren den äußeren Umfang des Pellikels und Formkörper (untere Reihe) die Form einer Öffnung des Pellikels. . . . .	24
20	Herstellung von Röhren aus bakterieller Cellulose in einem durch zwei Glasröhren definiertem Zwischenraum [US 2003/0013163 A1]. Die Gasversorgung findet über die Oberfläche statt und Kulturmedium wird durch die untere Öffnung der äußeren Röhre bereitgestellt. . . . .	24
21	Silikonröhre in einer mit Kulturmedium mit <i>Gluconacetobacter xylinus</i> gefüllten Glasröhre [Bodin <i>et al.</i> , 2010; US020100042197A1]. Die Gasphase wird über die Silikonröhre bereitgestellt (Pfeile). Es entsteht eine Celluloseröhre um die Silikonröhre. . . . .	25
22	Paraffin Partikel werden während der Synthese in die Cellulose integriert [Bäckdahl <i>et al.</i> , 2008]. Nach der Synthese werden die Partikel entfernt und bleibt eine poröse Cellulosestruktur. . . . .	26
23	Diffusionskammer. Ein Biofilm bekannter Dicke trennt die Kammern. . . .	30

24	Wege der Komplement Aktivierung [Kemper und Atkinson, 2007]. . . . .	32
25	Die Blutgerinnungskaskade [Bishop und Lawson, 2004]. Pfeile zeigen die Umwandlung in die jeweils aktive Form des Faktors. . . . .	33
26	Zusammenbau des Einsatzes für das Glasmodul. . . . .	38
27	Zusammenbau des oberen Körpers des Polypropylenmoduls. . . . .	39
28	0,1 L Bypassgefäß mit Anbauten. . . . .	40
29	Gereinigter Pellikel. . . . .	43
30	Gefriergetrockneter Pellikel. . . . .	43
31	Fluoresceindiacetat wird von unspezifischen Esterase aktiver <i>Gluconaceto-</i> <i>bacter xylinus</i> Zellen zu Fluorescein gespalten. . . . .	44
32	Freigesetztes Fluorescein. . . . .	45
33	Typischer Verlauf der Fluoresceinfreisetzung. . . . .	46
34	Goldbeschichtete Probe auf einem Aluminiumträger. . . . .	47
35	Informationen in den REM Aufnahmen. . . . .	48
36	Stapel von 2D Aufnahmen mit definiertem Abstand in Z-Richtung können zur Berechnung eines 3D Models genutzt werden. . . . .	49
37	Schematischer Aufbau eines Penetrometers für die Quecksilberporosimetrie.	49
38	Scheiben aus Cellulose (links) und ePTFE (rechts) nach der Inkubation mit Blut. Es sind Blutgerinnsel auf der Oberfläche zu erkennen. . . . .	51
39	Explosionszeichnung des Glasmoduls (links) mit externem Überlauf (rechts). Die Membran ist in einen Polypropyleneinsatz integriert. . . . .	62
40	Foto des Glasmoduls (links) mit externem Überlauf (rechts). Die Mem- bran ist in einen Polypropyleneinsatz integriert. Das Modul wird durch eine Edelstahlklammer verschlossen. . . . .	63
41	Fließschema des Versuchsaufbaus für den Betrieb des Glasmoduls. 1: ge- rührtes Bypassgefäß, 2: Glasmodul, 3: Überlauf, 4: peristaltische Pumpe. . .	64
42	Explosionszeichnung des Polypropylenmoduls. . . . .	65
43	Nachbau des Polypropylenmoduls mit identischen Maßen aus Polymethyl- methacrylat zu Demonstrationszwecken. Die weiße PES Membran ist zu erkennen. . . . .	66

44	Fließschema des Versuchsaufbaus für den Betrieb des Polypropylenmoduls. 1: gerührtes Bypassgefäß; 2: Polypropylenmodul; 3, 4: peristaltische Pumpen; 5: Lasertriangulationssensor. . . . .	67
45	Pellikel aus einem Glasmodul mit einer keramischen Membran (oben) und einer PES Membran (unten). Der Pellikel, der auf der PES Membran entstand wirkt deutlich dichter. . . . .	71
46	Inokulumherstellung in Schüttelkolben mit 0,08 % (v/v) Cellulase im HS <sup>+</sup> Medium. <i>Gluconacetobacter xylinus</i> Biomasse (●), Glukonsäurekonzentration (●), Glukosekonzentration (▲). . . . .	75
47	Koloniebildende Einheiten von Celluloseproduzenten im Schüttelkolben als Funktion der Prozesszeit. . . . .	76
48	Inokulumherstellung im Rührkesselreaktor mit 0,08 % (v/v) Cellulase im HS <sup>+</sup> Medium ( $V=1\text{ L}$ ). <i>Gluconacetobacter xylinus</i> Biotrockenmasse (●), Glukonsäurekonzentration (◆), Glukosekonzentration (▲), pH (–). . . . .	78
49	Logarithmische Darstellung der Koloniebildenden Einheiten von Celluloseproduzenten. Vor dem Einfrieren (A), nach 27 Tagen bei -80 °C (B) und 67 Tagen bei -80 °C (C). . . . .	79
50	Funktionsprinzip der Lasertriangulation. . . . .	81
51	Signal des Lasersensors bei der Erfassung eines Pellikels (Screenshot). . . . .	82
52	Korrelation der Volumen nativer Pellikel mit den Trockengewichten gereinigter Pellikel. Die Anpassung erfolgte durch ein Polynom 2. Ordnung. . . . .	83
53	Celluloseproduktion in statischer Oberflächenkultivierung im 4 ml Maßstab mit HS <sup>+</sup> Medium. Cellulose-trockengewicht (◆), Glukonsäurekonzentration (●), Glukosekonzentration (▲). . . . .	86
54	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> Biotrockenmassebeladung in statischer Oberflächenkultivierung im 4 ml Maßstab. . . . .	87
55	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> Biomasse abgeschätzt über die Proteinkonzentration (■) und die metabolische Aktivität (●) in statischer Oberflächenkultivierung im 4 ml Maßstab. . . . .	88
56	Typischer Verlauf der Celluloseproduktion im Satzverfahren im Membranmodul im 0,1 L Maßstab mit HS <sup>+</sup> Medium. Cellulosehöhe (–), Produktionsrate (■). . . . .	90

57	Typischer Versuchsverlauf im Satzverfahren im Membranmodul im 0,1 L Maßstab mit HS <sup>+</sup> Medium. pH (—), Glukonsäurekonzentration (●), Glukosekonzentration (▲), Cellulose trockengewicht (—), Produktionsrate (■). . . . .	91
58	Celluloseproduktion im Membranmodul im Satzverfahren im 0,1 L Maßstab über 830 h mit HS <sup>+</sup> Medium. Cellulose trockengewicht (—), Produktionsrate (■). . . . .	92
59	Celluloseproduktion im Membranmodul im Satzverfahren im 0,07 L Maßstab mit HS <sup>+</sup> Medium. Cellulose trockengewicht (—), Produktionsrate (■). . . . .	93
60	Einfluss des konstanten pH auf die membrangestützte Celluloseproduktion im 20 L Maßstab mit <i>Gluconacetobacter xylinus</i> im HS <sup>+</sup> Medium. . . . .	94
61	Membrangestützte Celluloseproduktionsrate von <i>Gluconacetobacter xylinus</i> im 20 L Maßstab im pH Bereich von 5,0 - 5,7 (●) und im 0,1 L Maßstab (■) als Funktion der Prozesszeit. . . . .	95
62	Membrangestützte Celluloseproduktion im Satzverfahren im 20 L Maßstab mit <i>Gluconacetobacter xylinus</i> mit aufgeprägter pH Sprungfunktion. pH (—), Produktionsrate (■), Cellulose trockengewicht (—). . . . .	96
63	Wiederholte Absenkung des $pO_2$ im 20 L Satzverfahren. Produktionsrate (■), Cellulose trockengewicht (—), $pO_2$ (—). . . . .	97
64	Auf der Membranoberfläche produzierter Pellikel mit einer Höhe von 5 mm und einem Durchmesser von 45 mm. . . . .	98
65	Ergebnisse der Individuen der 6 Generationen hinsichtlich der Zielfunktionen. Die Pareto Front ist gekennzeichnet. . . . .	101
66	Box Plots der Variablen der Optimierung als Funktion der Generation. . . . .	102
67	Vergleich der Optimierung des synthetischen Mediums mit der Komplexmediumreferenz. . . . .	105
68	Verlauf der Metabolitkonzentrationen und des pH im Membranverfahren zur Herstellung von Cellulose mit <i>Gluconacetobacter xylinus</i> im 0,1 L Maßstab mit dem synthetischen Medium (G1/I13). pH (—), Glukonsäurekonzentration (●), Glukosekonzentration (▲). . . . .	106
69	Celluloseproduktion im Membranmodul mit dem synthetischen Medium (G1/I13) im 0,1 L Maßstab. Cellulose trockengewicht (—), Produktionsrate (■). . . . .	106

70	Celluloseproduktionsraten ( $q_{cell}$ ) des Komplexmediums (■) und des synthetischen Mediums (◆). . . . .	107
71	Morphologie von <i>G. xylinus</i> im synthetischen Medium (REM). . . . .	108
72	Stofftransport und Gradienten im Pellikel. Die Eindringtiefe von Sauerstoff definiert die aktive Schicht von <i>Gluconacetobacter xylinus</i> . . . . .	110
73	Diffusionskammer basierend auf dem Glasmodul. Pellikel wurden in den Polypropylen Einsatz integriert. . . . .	111
74	Gemessene Stoffstromdichte für KCl durch einen Pellikel von 0,7 mm Dicke bei den drei zu erwartenden KCl Endkonzentrationen in der gesamten Flüssigphase. 0,0107 M, 0,015 M, 0,02 M. . . . .	114
75	Anfänglich steigende Stoffstromdichte für KCl bei Diffusion durch einen Pellikel. . . . .	114
76	Gemessene Stoffflussdichte an Glukose durch einen Pellikel von 0,7 mm Dicke bei einer Glukose Endkonzentrationen von 0,0247 M in der gesamten Flüssigphase. . . . .	115
77	Durch eine Mikroelektrode gemessene Sauerstoffkonzentration in einem Cellulose Pellikel von 3 mm Höhe mit aktiven <i>Gluconacetobacter xylinus</i> . . . . .	116
78	Gemessene Glukosekonzentration im Medium (▲) und berechnete Konzentration in der aktiven Schicht (–) in einem Versuch im Satzverfahren im 0,1 L Maßstab. . . . .	119
79	Gemessene Glukonsäurekonzentration im Medium (●) und berechnete Konzentration in der aktiven Schicht (–) in einem Versuch im Satzverfahren im 0,1 L Maßstab. . . . .	119
80	Membrangestützte Celluloseproduktion mit <i>Gluconacetobacter xylinus</i> im Zulaufverfahren im 0,1 L Maßstab mit HS <sup>+</sup> Medium. Cellulose-trockengewicht (–), Produktionsrate (■). . . . .	120
81	Glukosekonzentration im Bypassgefäß mit Zulauf von Glukose im 0,1 L Maßstab als Funktion der Prozesszeit, ohne Verbrauch von Glukose durch <i>Gluconacetobacter xylinus</i> . . . . .	121
82	Membrangestützte Celluloseproduktion mit <i>Gluconacetobacter xylinus</i> im Zulaufverfahren im 0,1 L Maßstab mit HS <sup>+</sup> Medium. Cellulose-trockengewicht (–), Produktionsrate (■). . . . .	122

83	Vergleich der Celluloseproduktionsrate der membrangestützten Celluloseproduktion im 0,1 L Satzverfahren (●) und Zulaufverfahren (■). . . . .	122
84	Vergleich des Verlaufs der Celluloseschichthöhe von Satzverfahren und Zulaufverfahren der membrangestützten Celluloseproduktion mit <i>Gluconacetobacter xylinus</i> im 0,1 L Maßstab. . . . .	123
85	Oberfläche eines gefriergetrockneten Pellikels bei 7000 facher Vergrößerung (REM). Zellen von <i>Gluconacetobacter xylinus</i> stellen ein dichtes Netzwerk aus Cellulosefasern her. . . . .	125
86	Querschnitt eines Pellikels bei Vergrößerungen von 370 fach (oben) und 4300 fach (unten) (REM). Die Struktur besteht aus Schichten die parallel zur Grenzschicht von Flüssig- und Gasphase sind. . . . .	127
87	Dreidimensionale Struktur nativer bakterieller Cellulose (CLSM). . . . .	128
88	Korrelation von Trockengewicht und Volumen der Cellulosepellikel aus verschiedenen Produktionsverfahren. 0,1 L Satzverfahren (●), 0,1 L Zulaufverfahren (■), 20 L Satzverfahren (▲), 0,1 L Satzverfahren mit synthetischem Medium (◆). . . . .	129
89	Dichte der Pellikel aus verschiedenen Verfahren. A: 0,1 L Satzverfahren, B: 0,1 L Zulaufverfahren, C: 20 L Satzverfahren, D: 0,1 L Satzverfahren mit synthetischem Medium. . . . .	130
90	Größenverteilung der Poren in einem typischen Pellikel bestimmt durch Quecksilberporosimetrie. . . . .	131
91	Durchschnittlicher durch Quecksilberporosimetrie bestimmter Porendurchmesser im Satzverfahren (A) und Zulaufverfahren (B). . . . .	132
92	Gesamtes unverarbeitetes Signal des LTS (oben) und Detailausschnitt (unten). Es wurde die Schichthöhe eines Pellikels bei der membrangestützten Celluloseproduktion erfasst. . . . .	133
93	Fouriertransformation des LTS Signals. . . . .	133
94	Tiefpass gefiltertes Signal des LTS. . . . .	134
95	Detail des Tiefpass gefilterten LTS Signals. . . . .	134
96	Querschnitt des Pellikels, der mit dem LTS untersucht wurde, im Detail (REM). Die Schichten haben einen Abstand von 4,8 $\mu\text{m}$ zueinander. . . . .	135

97	Gesamter Querschnitt eines Pellikels (REM). Die Höhe beträgt 2,2 mm. . . . .	136
98	Gesamtproteinkonzentration in dem Pellikel nach aufeinanderfolgenden Behandlungen mit NaOH. . . . .	138
99	Konzentration des Faktors C3a (des-Arg). Bakterielle Cellulose wurde mit einer Kontrolle und ePTFE verglichen. . . . .	140
100	Aktivität der Faktoren 1+2. Cellulose wurde mit einer Kontrolle, einer definierten Plasmaprobe ("low control", LC) und ePTFE verglichen. . . . .	141
101	Aktivität von Faktor XIIa. Cellulose wurde mit einer Kontrolle, zwei definierten Plasmaproben ("standard high" (SH), "standard low" (SL)) und ePTFE verglichen. . . . .	142
102	Durch Fibrinfasern gebundene Erythrocyten auf ePTFE (oben) und bakterieller Cellulose (oben). . . . .	143
103	Humane arterielle glatte Muskelzelle auf bakterieller Cellulose. . . . .	144
104	Endothelzellen auf bakterieller Cellulose. . . . .	145
105	Kinetik der membrangestützten Celluloseproduktion mit <i>Gluconacetobacter xylinus</i> im 0,1 L Satzverfahren. Cellulose trockengewicht (–), Produktionsrate (■). . . . .	147
106	Querschnitt eines Cellulosepellikels, das von <i>Gluconacetobacter xylinus</i> im Membranverfahren produziert wurde. Die Schichten im Abstand von 5 $\mu$ m sind parallel zur Membran angeordnet. . . . .	148
107	Glasschliffflansch für den oberen und unteren Körper des Moduls. . . . .	160
108	Polypropylen Einsatz. . . . .	161
109	Oberer Teil des Polypropylenmoduls. . . . .	162
110	Unterer Teil des Polypropylenmoduls. . . . .	163
111	Kalibrationskurve für die KCl Konzentration $\kappa$ . . . . .	164
112	Mischzeit in der Diffusionszelle. . . . .	164
113	Dreidimensionale Rekonstruktion eines mit Syto60 (DNA Farbstoff) gefärbten Pellikels. . . . .	167
114	Dreidimensionale Rekonstruktion eines mit AAL488 (Lektin) gefärbten Pellikels. . . . .	167

115	Kombination der dreidimensionalen Rekonstruktionen der Färbungen mit Syto60 und AAL488. . . . .	168
-----	---	-----