

# **Biomediierte Materialsynthese rheotaktisch strukturierter und hierarchisch organisierter Materialien aus bakterieller Cellulose**

Yvonne Alexandra Maria Gmach

Vollständiger Abdruck der vom TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Marc Ledendecker

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Cordt Zollfrank
2. Prof. Dr. Bastian Blombach

Die Dissertation wurde am 27.02.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch den TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit am 09.05.2023 angenommen.

*Für meine Familie*

Die vorgestellten Arbeiten wurden am TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit, am Lehrstuhl für Biogene Polymere, Prof. Dr. Cordt Zollfrank, von Dezember 2018 bis Ende Dezember 2022 unter der Anleitung von Herrn Dr. Daniel Van Opdenbosch durchgeführt.

Die Dissertationsschrift enthält eine allgemeine Einleitung zum Themenfeld der biomediierten Materialsynthese und der rheotaktischen Strukturierung und Ausrichtung von organisierten Materialien aus bakterieller Cellulose. Die gefundenen Forschungslücken im Bereich der 2D- und 3D-Materialsynthese von bakterieller Cellulose mit anisotroper Ausrichtung wurden durchleuchtet und in zwei Hypothesen aufgegriffen. Aus der Forschungsarbeit gingen zwei veröffentlichte Artikel hervor, auf denen diese publikationsbasierte Dissertation aufbaut:

1. GMACH, Yvonne; VAN OPDENBOSCH, Daniel. **Structural and mechanical anisotropy in rheotactically aligned bacterial cellulose.** *Cellulose*, 2022, 29. Jg., Nr. 16, S. 8521-8537.
2. GMACH, Yvonne; VAN OPDENBOSCH, Daniel. **Threedimensionally patterned, hierarchically and anisotropically structured bacterial cellulose.** *Materials Research Express*, 2023, 10. Jg., Nr. 3, S. 035401.

Die entwickelten Methoden, die durchgeführten Experimente und die wichtigsten Ergebnisse wurden in der Dissertationsschrift kurz zusammengefasst. Die eingehende Beschreibung findet sich jeweils in den aufgeführten Publikationen. Der Diskussionsteil setzt sich mit interessanten Aspekten der Forschungsarbeit auseinander und wird durch die Diskussion der Veröffentlichungen ergänzt. Zukünftige Forschungsideen und eine generelle Zusammenfassung aller Punkte runden das Thema ab. Im Anhang finden sich Ergänzungen zum Thema, sowie die Zusammenfassungen der beiden Publikationen.

## Abkürzungen und Erklärungen

2D	Zweidimensional; mit der Methode aus dem 1. Paper hergestellte, sehr flache Biofilme aus Essigsäurebakterien und bakterieller Cellulose; nach der Aufreinigung bestehen sie hauptsächlich aus bakterieller Cellulose.
3D	Dreidimensional; mit der Methode aus dem 2. Paper hergestellte dreidimensionale Körper; nach dem Aufreinigen und Entfernen der PLA-Bewuchsflächen bleiben nur noch die Körper aus bakterieller Cellulose übrig.
AcOH	Essigsäure
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenasen
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Bakterielle Cellulose
CaCO <sub>3</sub>	Kalziumkarbonat
Cel <sup>-</sup>	Cel <sup>-</sup> Mutanten
Cel <sup>+</sup>	Cel <sup>+</sup> Mutanten
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CZ	Citratzyklus
DHA	Dihydroxyaceton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ED	Entner-Doudorouff-Weg
EPS	Exopolysaccharid; Extrapolymere Substanz
EtOH	Ethanol
FDM	Fused Deposition Modeling = Schmelzschiichtung
H <sub>2</sub> O	Wasser
IR	Infrarotspektroskopie
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
ng	Nicht genannt (in der Literatur)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PLA	Poly lactide, Polymilchsäuren
PP	Pentose-Phosphat-Zyklus
REM	Rasterelektronenmikroskop
Sac	Saccharose, meist im Nährmedium der Mikroorganismen
TK	Terminaler Komplex
UDP	Uridindiphosphat
v	variabel
XRD	Röntgenbeugung

## Einheiten, Parameter, Formelzeichen

Å	$1 \text{ Å} = 100 \text{ pm} = 0,1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$
M	Mol
OTR	Sauerstofftransferrate [ $\text{mg O}_2/\text{l} \cdot \text{min}$ ]
OUR	Sauerstoffaufnahme [ $\text{mg O}_2/\text{l} \cdot \text{min}$ ]
$Re$	Reynolds-Zahl
vvm	Volumen Luft pro Volumen Kulturmedium pro Minute
	parallel
⊥	senkrecht

## Mikroorganismen

*K. surcrofermentans*

*K. xylinus*

*Komagataeibacter surcrofermentans*

*Komagataeibacter xylinus*

*„Der Schmerz, den Du verspüren wirst, wird gering sein...“*

Zitat: Daniel Van Opdenbosch (DVO), 2022

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungen und Erklärungen

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	4
Summary.....	1
<b>1. Einleitung und theoretischer Hintergrund .....</b>	<b>1</b>
1.1. Biologische Materialien .....	1
1.2. Biofilme .....	2
1.3. EPS .....	3
1.4. BC produzierende Mikroorganismen.....	3
1.5. <i>Komagataeibacter xylinus</i> und <i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> .....	4
1.6. Kohlenstoffquellen und biochemische Wege für die BC-Produktion .....	5
1.7. BC-Biosynthese .....	6
1.8. Cellulose-Synthase .....	7
1.9. Aufbau der mikrofibrillaren BC-Struktur .....	9
1.10. Eigenschaften der BC .....	10
1.11. Kultivierung der Mikroorganismen .....	11
1.12. Nebenprodukte der BC-Fermentation.....	12
1.13. Rheotaxis.....	13
1.14. Stand der Wissenschaft und Technik zur Herstellung von cellulosebasierten 2D-Materialien .....	14
1.14.1. Methoden zur Herstellung von 2D-Körpern aus cellulosebasierten Materialien.....	14
1.14.2. Methoden für die Ausrichtung der BC.....	16
1.15. Stand der Wissenschaft und Technik zur Herstellung von cellulosebasierten 3D-Körpern .....	17
1.15.1. Herstellung von 3D-Körpern .....	17
1.15.2. Methoden zur Herstellung von 3D-Körpern aus BC .....	18
1.16. Problemstellung und Zielsetzung .....	18
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1. Mikrobielle Stämme und Medien.....	20
2.2. Experimente für die Publikationen .....	21
2.2.1. Strukturelle und mechanische Anisotropie in rheotaktisch ausgerichteter BC (2D) .....	21
2.2.2. Dreidimensional gemusterte, hierarchisch und anisotrop aufgebaute BC (3D) ..	22
2.3. Analytische Methoden .....	23
2.3.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	23

2.3.2. Optische Mikroskopie .....	23
2.3.3. Fourier-Transform-Infrarotspektrometrie .....	23
2.3.4. Rasterelektronenmikroskopie .....	23
2.3.5. Energiedispersive Röntgenspektroskopie .....	24
2.3.6. Röntgenbeugung .....	24
2.3.7. Gasadsorptionsporosimetrie .....	24
2.3.8. Mechanische Prüfung .....	24
3. Zusammenfassung der publizierten Ergebnisse .....	25
3.1. Ergebnisse aus der Publikation über die strukturelle und mechanische Anisotropie in rheotaktisch ausgerichteter BC-Körpern (2D) .....	25
3.2. Ergebnisse aus der Publikation zu den dreidimensional gemusterten, hierarchischen und anisotrop aufgebauten BC-Gyroid-Körpern (3D) .....	26
4. Weitere Ergebnisse und Gesamtdiskussion .....	27
4.1. Begriffsdefinition .....	27
4.1.1. Biomediierte Materialsynthese .....	27
4.1.2. Verwendung der Rheotaxis zur Ausrichtung der BC .....	27
4.2. Biopolymere und EPS .....	28
4.3. Einflussfaktoren auf das Wachstum der <i>Komagataeibacter</i> .....	29
4.3.1. Kohlenstoffquellen .....	29
4.3.2. Temperatur und Stickstoffquellen .....	33
4.3.3. pH-Wert .....	33
4.3.4. Medien .....	33
4.4. Adaption des Versuchsaufbaus auf den Sauerstoffbedarf von <i>K. sucrofermentans</i> . .....	38
4.5. Auswirkungen der Kultivierungsmethode auf den Metabolismus von <i>K. sucrofermentans</i> .....	39
4.5.1. Genetische Instabilität von <i>K. xylinus</i> .....	39
4.5.2. Scherstress .....	40
4.5.3. Überschussmetabolismus, unvollständige Oxidation und Substrathemmung ...	41
4.5.4. Nebenprodukte und Acetan .....	42
4.5.5. Auswirkungen auf die BC Fibrillen .....	44
4.5.6. Wasserbindekapazität .....	45
4.5.7. Aufbau der hierarchischen BC-Struktur .....	45
4.6. Reaktionen der <i>Komagataeibacter</i> auf die Antibiotika Zugabe .....	48
4.7. 2D-BC-Körper .....	52
4.7.1. Konstruktion der Bewuchsflächen für die 2D-BC-Körper .....	52

<b>4.7.2. Auswirkungen der Oberflächenbeschaffenheit der Bewuchsflächen auf die BC-Biofilme</b> .....	54
<b>4.7.3. Mechanische Parameter der BC</b> .....	56
<b>4.7.4. Bioabbaubarkeit und Konservierung</b> .....	58
<b>4.8. 3D-BC-Körper</b> .....	60
<b>4.8.1. Konstruktion des Gyroidkörpers und Anpassung des Versuchsaufbaus</b> .....	60
<b>4.8.2. 3D-Materialien mit Macro- und Nanoporosität</b> .....	61
<b>5. Ausblick</b> .....	64
<b>5.1. Zusätze zum Kultivierungsmedium für die in vitro Veränderung der BC-Struktur</b> .....	64
<b>5.2. Gewebezüchtung (Tissue Engineering) mit BC</b> .....	64
<b>5.3. Alternative Kohlenstoffquellen für die BC produzierenden Mikroorganismen</b> .....	64
<b>5.4. Wundauflagen und Transplantate aus BC</b> .....	65
<b>5.5. Verbundfilme mit BC</b> .....	65
<b>5.6. Rheotaktisch ausgerichtete EPS anderer Mikroorganismen</b> .....	65
<b>5.7. Materialien mit Vorzugsrichtung aus Eukaryoten und Pilzen</b> .....	66
<b>Danksagung</b> .....	67
<b>Übersicht der Veröffentlichungen</b> .....	68
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	69
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	72
<b>Anhang</b> .....	89
<b>Erste Veröffentlichung:</b> .....	89
<b>Zusammenfassung der ersten Publikation</b> .....	89
<b>Zweite Veröffentlichung:</b> .....	90
<b>Zusammenfassung der zweiten Publikation</b> .....	90

## Zusammenfassung

Passend zur Nachfrage nach neuen hierarchischen und porösen Materialien, stellt die hier vorgestellte Dissertationsschrift einen neuartigen Ansatz zur biomediierten Materialsynthese vor, welche das Potential bietet, gezielt die Materialgenese auf einzelnen Längenskalen von der Nanometer-Skala bis hin zur Makro-Skala (größer eines Millimeters) zu kontrollieren.

Ziel der ersten Veröffentlichung war die Herstellung von zweidimensionalen (2D), anisotropen Körpern aus bakterieller Cellulose (BC). Die Biofilmbildung der BC-produzierenden *Komagataeibacter sucrofermentans* (*K. sucrofermentans*) wurde durch die Kombination aus Rheotaxis und einer strukturierten Bewuchsfläche so manipuliert, dass sich eine Vorzugsrichtung im BC-Pellikel bilden konnte. Hierfür wurde ein einfacher und kostengünstiger Versuchsaufbau aus laborüblichen Geräten und Standardlaborkomponenten zusammengestellt. Die Bewuchsfläche wurde durch eine Düse ergänzt und beides durch die Verwendung eines Fused Deposition Modeling (FDM) 3D-Druckers aus Polymilchsäure (PLA) generiert. Es hat sich herausgestellt, dass die Beschaffenheit der Bewuchsfläche, die Strömungsgeschwindigkeit und die Versorgung der Mikroorganismen mit Sauerstoff für die Materialgenese entscheidend sind. Die gewachsenen 2D-Materialien aus orientierter BC enthalten die drei Hauptmerkmale der tragenden biologischen Materialien. Sie verfügen über mehrere Hierarchieebenen, bestehen aus einem weichen Material zur Erleichterung des Stressabbaus und enthalten eine strukturelle Anisotropie.

Die Methode für das rheotaktische Wachstum von 2D BC-Materialien wurde für die zweite Veröffentlichung um eine Flusszelle mit Einbau erweitert. Mit diesem Versuchsaufbau wurde das Ziel verfolgt einen dreidimensionalen (3D) Körper aus BC wachsen zu lassen. Auch hier bestimmte eine Bewuchsfläche aus PLA, mit einem FDM 3D-Drucker erstellt, die Form der endgültigen Struktur. Als Beispiel wurde ein Gyroid, eine unendlich verbundene dreifach periodische Minimalfläche, gewählt. Diese geometrische Sonderform beinhaltet zwei identische Volumen. Für die Wachstumsversuche wurden die gleichen Medien, Mikroorganismen und Parameter wie in der ersten Methode verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass der *K. sucrofermentans* vollständig durch die Gyroidform durchwachsen kann und nach dem Lösen der PLA-Form ein BC-Gyroid zurückbleibt.

Es konnten mit beide Methoden gewachsene BC-Körper, mit ausgerichteten Fibrillen und einer Vorzugsrichtung im Material generiert werden. Die in sich vernetzten und verdrillten Cellulosekörper konnten autoklaviert, gereinigt, getrocknet und rehydriert werden ohne wesentlich ihre Morphologie oder ihre mechanischen Eigenschaften zu verlieren.

## Summary

In this dissertation, we are presenting a new approach towards the biomediated preparation of structured and porous materials. In these processes we are able to adjust the manufacturing parameters, to tailor the material texture from the order of nanometers to millimeters.

Within the first publication, we fabricated two-dimensional (2D) anisotropic samples from bacterial cellulose (BC). By combination of structured growth surfaces and a continuous flow of medium, a rheotactically aligned biofilm was formed, via EPS production of *Komagataeibacter sucrofermentans* (*K. sucrofermentans*), that showed a preferred orientation of cellulose in the material. The experimental setup consisted of a growth surface with a nozzle attachment, and was fabricated with a Fused Deposition Modeling (FDM) 3D-printer using a polylactic acid (PLA) filament. Parameters such as medium flow rate, texture of the growth surface, as well as oxygen supply of the microorganism play a crucial role in the preparation of bacterial cellulosic materials, and can be adjusted for the formation of 2D structures. The materials possess multiple organized structural morphologies on various size scales, are ductile to facilitate stress relieve, and exhibit anisotropic characteristics, which constitutes the three main features of biological materials.

The methodology for the growth of rheotactically aligned anisotropic 2D materials, was adapted for the production of three-dimensional shapes, using a flow cell. The final shape of the 3D structures, e.g. a gyroid, was thereby predetermined via a 3D printed PLA template. In these experiments, *K. sucrofermentans* was used analogous to the 2D shapes, and it was shown, that the microorganism was able to grow through the entire threedimensional PLA mould. After discarding of the PLA template, the rheotactically grown cellulose gyroide retained its shape and structure.

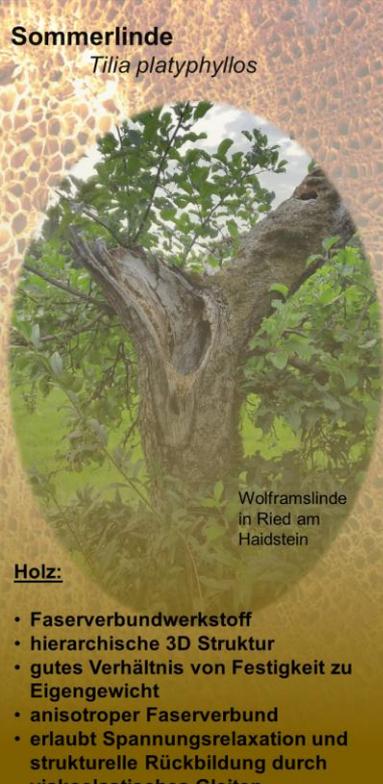
In both 2D and 3D experiments it was shown, that the cellulose fibrils exhibit a preferred orientation and are rheotactically aligned in the material. Autoclaving, as well as purification, drying and rehydration of the samples, while retaining their shape, morphology and physical properties was also possible.

# 1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

## 1.1. Biologische Materialien

Biologische Materialien sind ubiquitär und begegnen uns in der Natur, in Pflanzen und Tieren und an eher unauffälligen Orten, wie beispielsweise in der Matrix der Biofilme. Sie erfüllen vielfältige Funktionen und inspirieren durch ihre außergewöhnlichen Eigenschaften die Herstellung neuartiger Materialien, welche auf eine funktionelle Anpassung der Struktur in allen Hierarchieebenen gründet und nicht nur auf ihren atomaren Aufbau zurückzuführen ist [1]. Eindrucksvolle Beispielen für poröse, hierarchische, anisotrope und zähe Materialien sind Holz, Spinnenseide und Sporopollenin. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht der jeweiligen, besonderen Merkmale.

**Sommerlinde**  
*Tilia platyphyllos*



Wolframslinde in Ried am Haidstein

**Holz:**

- Faserverbundwerkstoff
- hierarchische 3D Struktur
- gutes Verhältnis von Festigkeit zu Eigengewicht
- anisotroper Faserverbund
- erlaubt Spannungsrelaxation und strukturelle Rückbildung durch viskoelastisches Gleiten

**Gartenkreuzspinne**  
*Araneus diadematus*



**Spinnenseide:**

- hohe Zugfestigkeit und Zähigkeit
- Protein-Polypeptid-Kettennetzwerk Struktur

Aufbau der Spinnenseide

Material	Dehnbarkeit (%)	Zugfestigkeit (MPa)	Reißlänge (km)
Gummi	500	25	3
Stahl	8	1500	20
Kevlar	3	3600	250
Polyester	14	2900	210
Schmetterlingsseide	20-30	600	50
Spinnenseide	trocken: 30-40 nass: 300	1000	80

**Asiatischer Wildapfel**  
*Malus sieversii*



**Sporopollenin:**

- chemisch extrem inert
- stark vernetztes Heteropolymer

vereinfachte Strukturformel des Sporopollenins von *Pinus rigida*

Yvonne Gmach

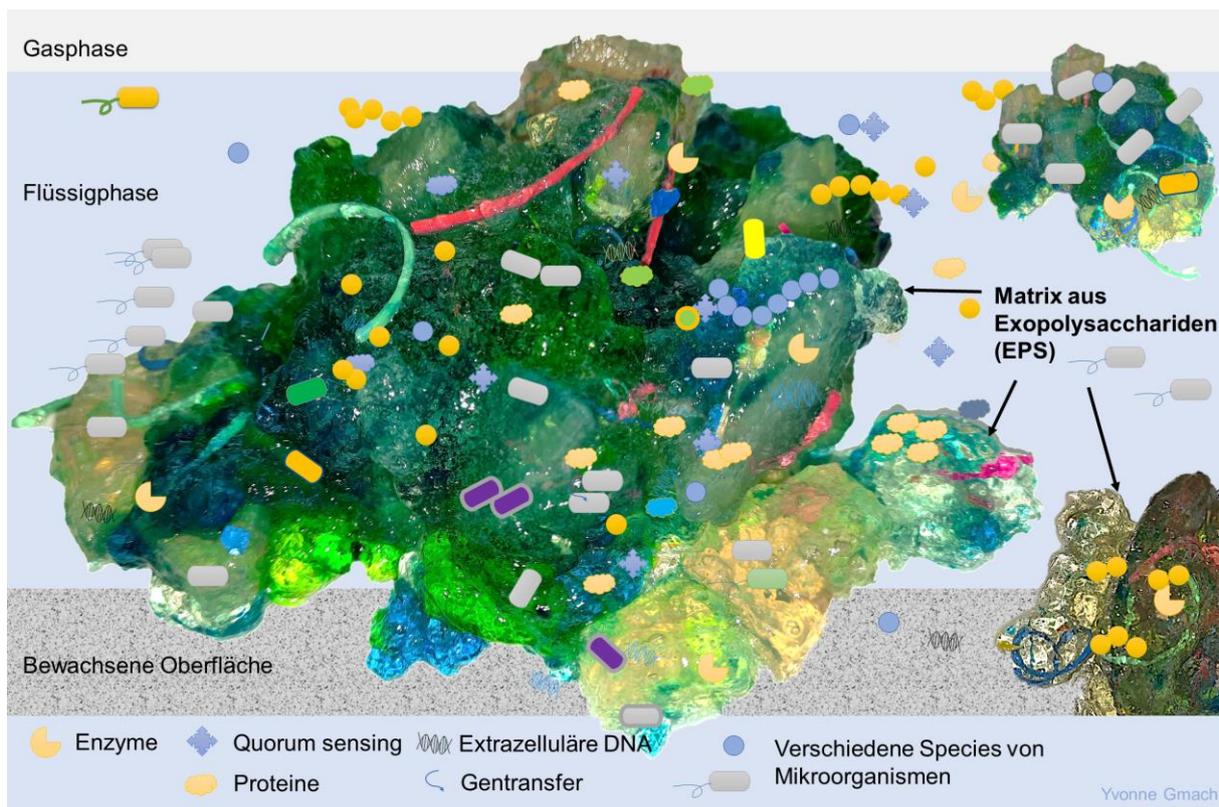
**Abbildung 1:** Paradigmen aus der Natur für 2D- und 3D-Strukturen und besondere mechanische Eigenschaften aus den Quellen [2-7] erstellt.

Die Zellwände der Pflanzen und Bäume bestehen aus einem Faserverbund von eingebetteten Cellulosefibrillen in einer Matrix aus Hemicellulosen und Lignin [1, 8, 9]. Dieser hierarchisch aufgebaute, anisotrope Verbundwerkstoff erlaubt Spannungsrelaxation [10], eine strukturelle Rückbildung durch viskoelastisches Gleiten [11] und ist durch kleinmaßige, typischerweise nanoskalige, harte Komponenten sehr fest, wodurch überkritische Risse vermieden werden können [12]. Spinnenseide hingegen überzeugt durch ihre hohe Zugfestigkeit und die unübertroffene Zähigkeit. Sie kann im nassen Zustand um das Dreifache ihrer Länge gedehnt werden und hält trotzdem dem Aufprall von Insekten in einem Spinnennetz stand. Diese außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften der Seidenfibrillen werden durch ihre Protein-Polypeptid-Kettennetzwerk-Struktur, die Kristallitgröße und –orientierung bestimmt [2, 13-15]. Das 1978 zum widerstandsfähigsten, bekannten organischen Material [16] gekürte Sporopollenin ist für die Morphologie und Mikrostruktur von Pollen, sowie für die geologische Erhaltung von Palynomorphen verantwortlich. Die Strukturaufklärung dieses stark vernetzten,

chemisch extrem inerten Heteropolymers ist für die Entwicklung von neuen widerstandsfähigen biomimetischen Polymeren von hohem Interesse [4]. Zäh, multiskalige, anisotrope und poröse Materialien können für die verschiedensten Forschungsfelder interessant sein, wie der Gewebezüchtung [17], der Engineered Living Materials [18], der Batterieentwicklung [19], der Herstellung von Metamaterialien [20], der Photonik [21] und der Sensorentwicklung [22, 23]. Für die biologische Grundlagenforschung [24], regenerative Medizin [25], biomedizinische Anwendung [26] und Zellforschung [27] sind besonders hierarchische, poröse 3D-Materialien von hohem Interesse, da einige eukaryotische Zellen eine dreidimensionale Struktur als Template zur Entwicklung ihrer Funktion benötigen [26, 28, 29]. Ein Material, in dem alle genannten Vorzüge vereint sind, wäre für die Umsetzung dieser Forschungs idee wünschenswert. Ein bereits existierendes System aus hierarchischer, funktioneller und hydrogelartiger Struktur bietet die Zusammensetzung natürlicher Biofilme.

## 1.2. Biofilme

Biofilme sind poröse, gelartige und dennoch stabile Matrizen aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Sie beherbergen neben einer synthrophen und heterogenen Zusammensetzung an Mikroorganismen noch Wasser, gelöste Nährstoffe, anorganische Partikel, Gasbläschen, Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Enzyme. Der Biofilm als Lebensform, Abbildung 2, ermöglicht den Mikroorganismen trotz dieser Komplexität die chemische Kommunikation, den Austausch von DNA und das Zellwachstum [30, 31].



**Abbildung 2:** Eigene Nachbildung eines natürlichen Biofilms, gewachsen auf einer Oberfläche in einer Flüssigphase. Es werden die verschiedenen Stadien der Biofilmbildung und der Ablösung gezeigt.

Natürliche Biofilme bestehen vor allem aus einem großen Anteil aus verschiedenen Biopolymeren. Das sind Polymere, welche in der Zelle synthetisiert werden. Dazu gehören Polysaccharide, Proteine, Nukleinsäuren, Speicherstoffe wie Glykogen und Stärke, aber auch Lipidmembranen und Cellulosefasern. Sie können die Mikroben vor äußeren Einflüssen

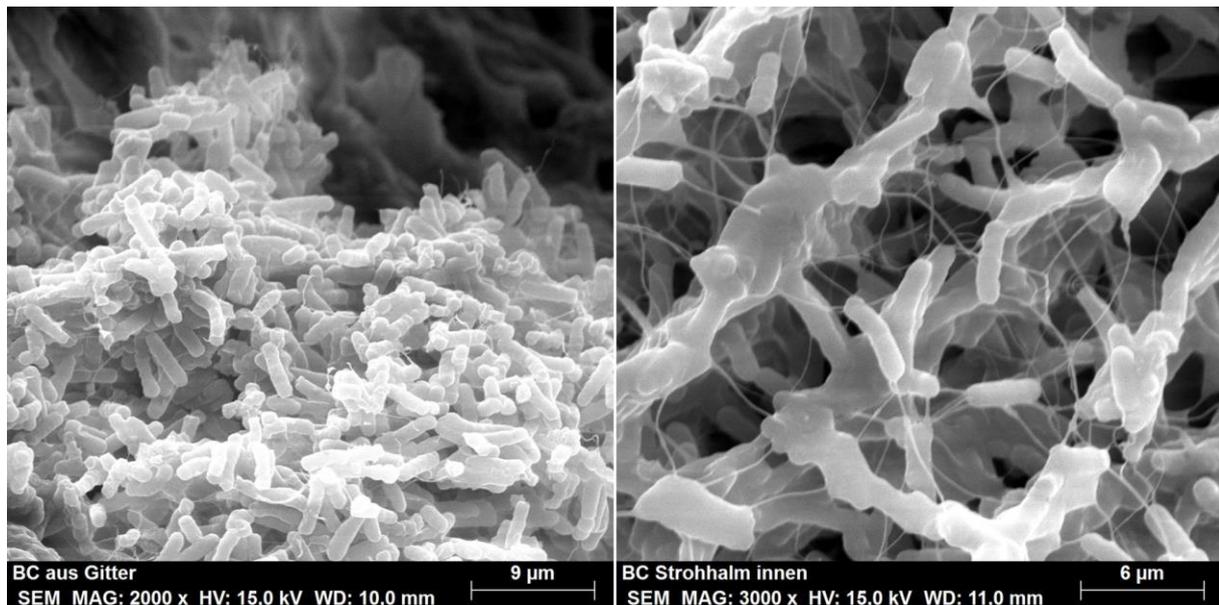
schützen und ermöglichen das Anhaften an Oberflächen [31]. Dieser Vorgang wird auch Induktionsphase genannt. *Bacillus subtilis* verliert beispielsweise nach der Anheftung seine Begeißelung. Bei nachfolgender Zellteilungen entstehen fädige Strukturen, da die Zellwände der Bazillen nicht mehr getrennt werden. Gleichzeitig werden Polymere ausgeschieden, die dem entstehenden Film eine seitliche Festigkeit geben. Solche Veränderungen werden epigenetisch ausgelöst und können sich auch wieder zurückentwickeln. Während der Akkumulationsphase gewinnt der Biofilm an Größe und die Mikroorganismen vermehren sich so lange, bis sie durch Scherströmungen abgerissen werden. Dem geht meist ein Nährstoffmangel im Innern des Biofilms voraus. In der Existenzphase beginnt zudem die Auswanderung durch Sporulation und begeißelte Zellen. Dieser Ablauf wiederholt sich so lange, wie die Mikroorganismen passende Lebensbedingungen vorfinden [32-34]. So entstehen ganze Biofilmrasen, die aufgrund der EPS-Bildung meist als glibberig und glatte Flächen wahrgenommen werden. Die Natur hat damit ein sich selbst replizierendes, anpassungsfähiges und robustes System zur Materialgenese geschaffen, dass direkt für die gezielte Biofilmbildung und EPS-Herstellung im Labor übernommen werden kann.

### **1.3. EPS**

Die Baustoffe der Biofilme, die EPS, sind langkettige Polysaccharide, bestehend aus verzweigten, sich wiederholenden Einheiten von Zuckern oder Zuckerderivaten und einigen nicht-Kohlenhydrat-Substituenten, wie Acetat, Pyruvat, Succinat und Phosphat. Ihre Komposition ist oftmals das Resultat aus aktiver Sekretion, Ablösen von der Zelloberfläche, Zelllyse und der Adsorption aus dem Umfeld und damit eng mit dem Biofilm Auf- und Abbau aus Abbildung 2 verbunden [31, 35]. Mikrobielle EPS-Hydrogele sind bereits mehrskalig und hierarchisch strukturiert. Untersuchungen per Kleinwinkelröntgenstreuung zeigen jeweils charakteristische Strukturmerkmale auf den  $n \cdot 1$  nm,  $n \cdot 10$  nm und  $n \cdot 100$  nm Ebenen [36, 37]. Diese ergeben sich aus den Interaktionen der Molekülketten, den enthaltenen Vernetzungspunkten, Vernetzungsgruppen, sowie räumlichen Domänen hoher Dichte. Es sind bereits viele Arten von Mikroorganismen bekannt, welche in der Lage sind wasserlösliche, gelartige Polysaccharide wie Dextran, Xanthan, Alginate, Levan und Gellan zu synthetisieren [31, 38, 39]. Für die Herstellung von festen Materialien aus Biofilmen sind vor allem wasserunlösliche Polysaccharide interessant, da sie keinen weiteren Stabilisierungs- oder Vernetzungsschritt benötigen. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die bakterielle Cellulose (BC), die für die Methodenentwicklung dieser Dissertationsschrift entscheidend ist.

### **1.4. BC produzierende Mikroorganismen**

Es gibt zahlreiche Bakterien, welche in der Lage sind Zellaggregate, so genannte Flocken aus Mikroorganismen und BC zu produzieren. Hierbei ist jedoch die Art und Qualität der BC unterschiedlich, wie Tabelle 7 (Anhang) zeigt. Die Gattungen *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* und *Rhizobium* sind in der Lage, Cellulosefibrillen zu generieren. Für die *Acetobacter* ist zudem die Synthese von Cellulosebändern und extrazellulären Pellikel beschrieben [40]. Diese Pellikel sind auch als „Essigmutter“ [41] oder „Kombucha“ [42, 43] geläufig und haben eine lange Tradition in der Haltbarmachung von Lebensmitteln und der weltweiten Getränkeherstellung [41-44]. BC-Pellikel oder auch Kahmhäute genannt, bestehen aus einer Ansammlung von Mikroorganismen, die in ihre Cellulosebänder eingebettet und permanent damit verbunden sind. Der BC-Biofilm ähnelt dadurch einem Schwamm, da er hochporös ist und eine große Menge an Flüssigkeit aufnehmen kann. Zudem besitzt er eine lederartigen Konsistenz und stellt ein weiches und zugleich festes Material dar [45], Abbildung 3.



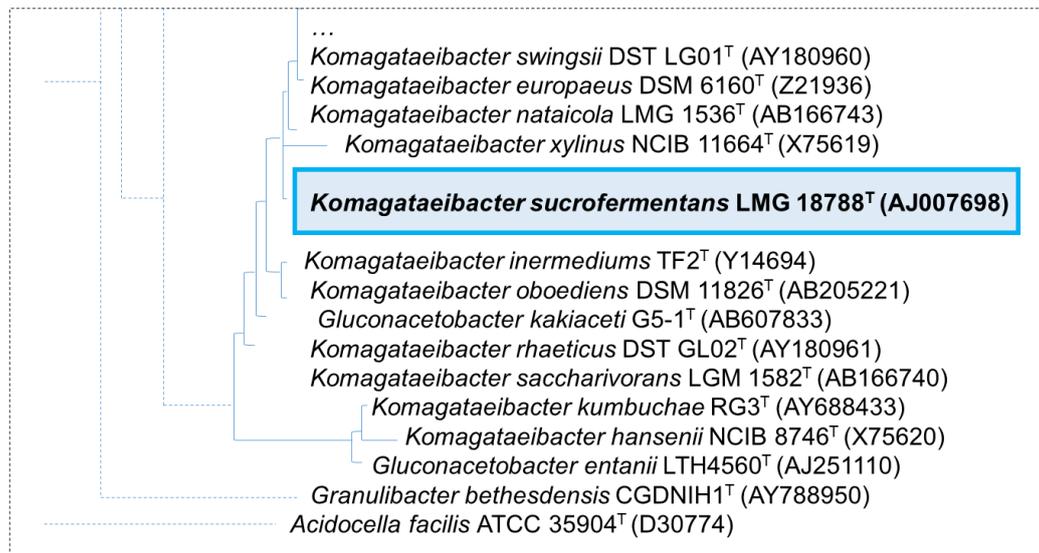
**Abbildung 3:** REM-Aufnahmen von *Komagataeibacter* mit BC-Fibrillen in einem Pellikel.

Seit der Einführung der Gattung *Acetobacter* durch Brown 1898 [46], mit dem Bakterium *Acetobacter aceti*, sind mehr als 100 Jahre vergangen. Dank taxonomischer Studien werden derzeit zehn Gattungen der *Acetobacteraceae*, einer Familie innerhalb der *Alphaproteobacteria*, zugeordnet. Dies sind *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia* und *Granulibacter* [47, 48]. Es handelt sich um Gram-negative, obligat aerobe, stäbchenförmige und oftmals bewegliche Bakterien. Sie betreiben die Essigsäuregärung, eine unvollständige Oxidation von Zuckern und Alkoholen zu den entsprechenden Carbonsäuren. Dadurch wird der pH-Wert bis pH 4 [53-55] gesenkt und Kohlenstoff als spätere Nährstoffquelle in ihrer Umgebung gespeichert. Die meisten anderen Mikroorganismen können weder die oxidierten Substrate metabolisieren, noch in einem solch sauren Umfeld gedeihen. Dieser selektive Vorteil kann auch bei der späteren Materialgenese nützlich sein und Kontaminationen während der Fermentation verhindern [49]. Die aerobe Lebensweise im leicht sauren Milieu ist im Labor leicht umzusetzen. Zudem sind die Mikroorganismen für ihr stabiles Wachstum, deren meist apathogener Charakter und die einfachen Nährstoffanforderungen bekannt. Diese und weitere Beweggründe führten zur Auswahl der Essigsäurebakterien. Laut Lin et al. sind nur die *Gluconacetobacter* in der Lage BC in einem kommerziellen Niveau zu produzieren. Die Menge an BC, die von *Acetobacter spp.* produziert wird variiert laut Lin et al. von 1,0 bis 4,0 % (w/v), abhängig von den verwendeten Medien und den Wachstumsbedingungen [50]. Dank Brown und vielen anderen Wissenschaftlern sind die *Acetobacter* bereits größtenteils erforscht und bieten viele Möglichkeiten zum Abgleich der eigenen Methode mit dem Stand der Wissenschaft und Technik.

### 1.5. *Komagataeibacter xylinus* und *Komagataeibacter sucrofermentans*

Eine Suche mit Google Scholar nach dem prominentesten Essigsäurebakterium, dem *Gluconacetobacter xylinum*, hat in etwa 7.850 Artikel ergeben. Über 6.000 Artikel sind für den Namen *Acetobacter xylinus* erschienen und nochmals ca. 2.340 für *Komagataeibacter xylinus* (*K. xylinus*). Hierbei handelt es sich jeweils um das gleiche Bakterium, nur die Nomenklatur hat sich dank phylogenetischer Studien von Yamada et al. geändert [48, 51, 52]. Nach einem literaturbasierten Screening und Vorversuchen mit den beiden Stämmen *K. xylinus* und *Komagataeibacter sucrofermentans* (*K. sucrofermentans*) [48] wurde letzterer aufgrund seiner

besonderen Eigenschaften für die rheotaktischen Versuche ausgewählt [53, 54]. Es handelt sich um den Typstamm *Komagataeibacter sucrofermentans* LMG 18788 (JMC 9730 = BCC 7227 = DSM 15973), der auch *Gluconacetobacter sucrofermentans* oder *Acetobacter xylinus subsp. sucrofermentans* genannt wird. Toyosaki stellte 1995 zwischen *K. sucrofermentans* und *K. xylinus* eine 58,2 %-ige genetische Übereinstimmung fest und schlug die Bezeichnung *Acetobacter xylinus subsp. sucrofermentans* vor [55]. Der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 4 zeigt die nahe Verwandtschaft zwischen den beiden Stämmen und die Fülle an anderen interessanten BC-Produzenten.



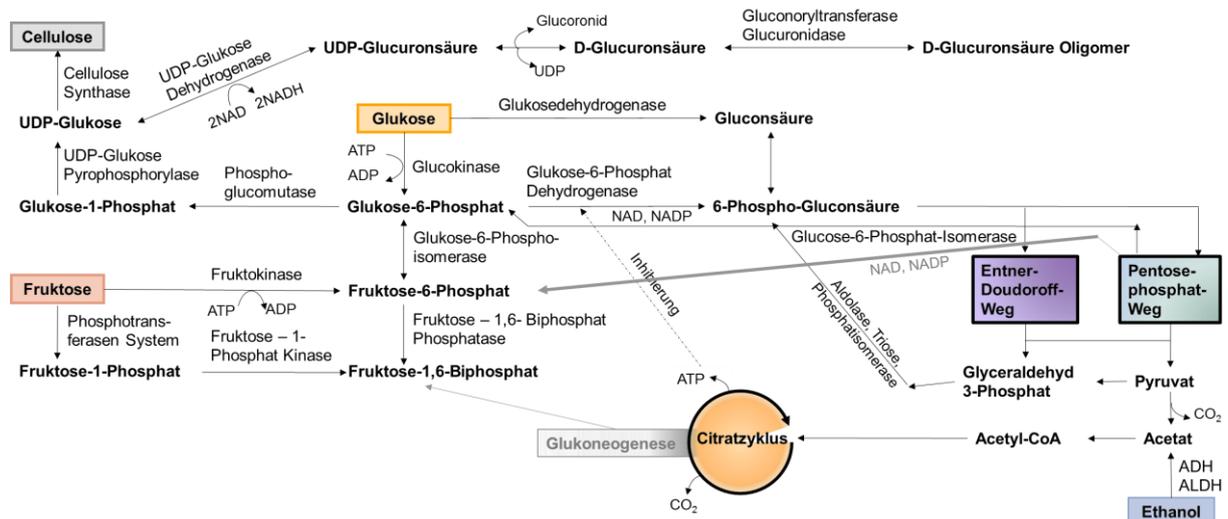
**Abbildung 4:** Ausschnitt des phylogenetischen Stammbaums der *Komagataeibacter* von Yamada et al. Im Fokus stehen hier *K. xylinus* und *K. sucrofermentans* (blau umrandet) [56]. Original im Anhang mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages.

Das einst auf einer Schwarzkirsche isolierte [53, 55] Bakterium *K. sucrofermentans*, zeichnet sich laut Toyosaki et al. vor allem durch ein „sehr gutes Wachstum in bewegten saccharosehaltigen Medien aus, in denen es eine große Menge an Cellulose produziert“ [55]. Neben der Stabilität in bewegten Kulturen ist auch das Wachstum auf saccharosehaltigen Medien ein Vorteil, da einfacher Haushaltszucker oder Ersatzmedien verwendet werden können [54]. Huang et al. haben Studien aufgelistet, welche sich mit Abwässern der Lebensmittelverarbeitung, Säurehydrolysaten aus Weizenstroh, Fruchtsäften und Melasselösungen beschäftigen [57-63]. Diese Rohstoffe sind reichlich vorhanden und entweder industrielle/landwirtschaftliche Abfälle oder relativ preiswerte landwirtschaftliche Produkte. Diese Strategie könnte nicht nur die Umwelt entlasten, sondern auch das Ziel einer Großserienfertigung zu geringen Kosten ermöglichen, da laut Esa et al. die Kosten für Medien bereits 30 % der Produktionskosten verursachen [64].

## 1.6. Kohlenstoffquellen und biochemische Wege für die BC-Produktion

Den Mikroorganismen dienen Hexosen, Glycerin, Dihydroxyaceton, Pyruvat und Dicarbonsäuren als Kohlenstoffquellen, welche mit einer Effizienz von bis zu 50 % in die BC umgewandelt werden [65]. Die Vielfalt der bisher erfolgreich getesteten Kohlenstoffquellen zeigt, dass alternative Substrate auch aus Abfallströmen durchaus eine Option zu den Standardmedien sein können. Generell gilt Glukose für *K. xylinus* als die Hauptkohlenstoffquelle [66, 67]. Laut Wang et al. können theoretisch alle Substrate, welche in Glukose umgewandelt werden können, für die BC-Produktion verfügbar gemacht werden [68],

Diskussionsteil 4.3. Da diese unterschiedliche Molekulargewichte, chemische Strukturen und Bioverfügbarkeiten haben, kann dies zu unterschiedlichen BC-Produktionsraten und sogar zu abweichenden strukturellen Eigenschaften der BC führen [66, 69-73]. Diese Besonderheit ist für die Materialentwicklung aus BC sehr interessant, da hierdurch auf einfache Art und Weise in vivo das spätere BC-Material beeinflusst werden kann. Ha et al. haben die Erkenntnisse über die biochemischen Wege für die Produktion von BC- und Glucuronsäure-Oligomeren aus sieben Berichten zusammengefasst [74]. Diese Arbeit wurde in Abbildung 5 um die Informationen aus anderen Quellen erweitert [65, 74-76].

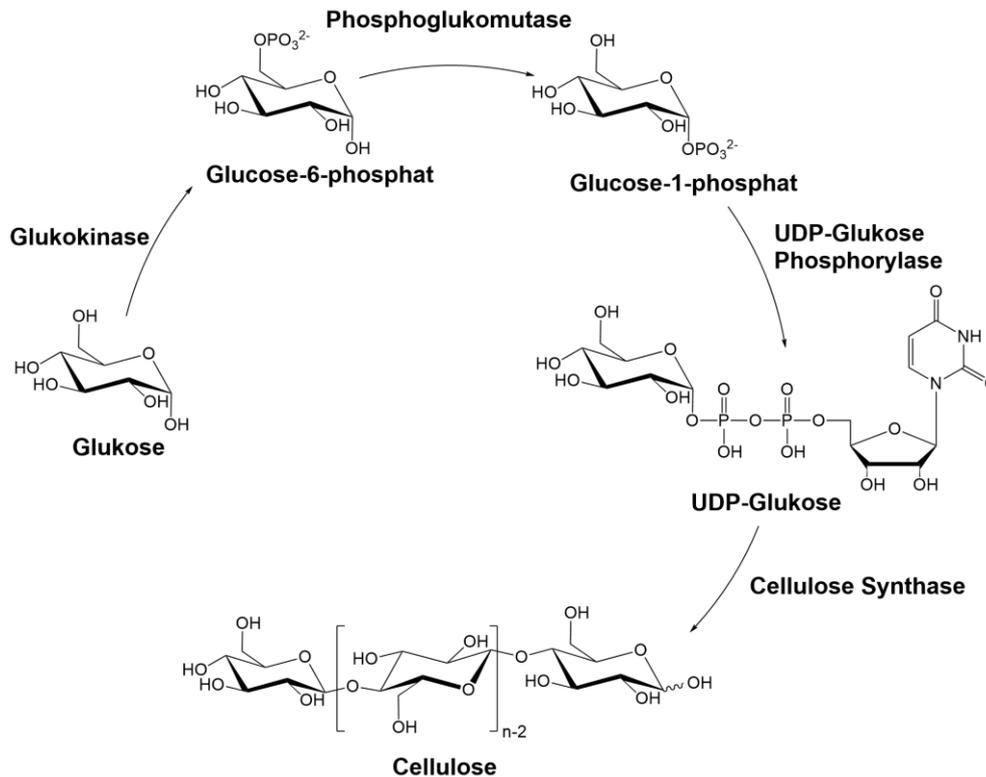


**Abbildung 5:** Verknüpfung vorgeschlagener biochemischer Wege für die BC-Synthese aus den Quellen [65, 74-76] erstellt.

Da Essigsäurebakterien die Phosphofruktokinase (EC 2.7.1.56) nicht synthetisieren können, wird Glukose nicht durch die Glykolyse in Pyruvat umgewandelt [77, 78]. Sie wird aber auch nicht vollständig zu BC umgewandelt. Die BC-Synthese wurde mit dem katabolischen Prozess der Oxidation in Verbindung gebracht, der bis zu 10 % der daraus gewonnenen Energie selbst verbraucht [79]. Es wurde auch festgestellt, dass BC ein Endprodukt des Kohlenstoffmetabolismus für die Mikroben darstellt. Je nach physiologischem Zustand der Zellen hängt dieser vom Pentose-Phosphat-Zyklus (PP) zur Oxidation von Kohlendraten oder dem Citratzyklus (CZ) für die Oxidation organischer Säuren und verwandter Verbindungen, gekoppelt mit der Glukoneogenese ab [74, 75, 77, 80, 81]. Die BC-Synthese ist ein präziser, bakterienartspezifizierter und regulierter Mehrstufenprozess, mit einer großen Anzahl an individuellen Enzymen und komplexen katalytischen und regulatorischen Proteinen [82]. Für die Entwicklung einer stoffwechselbasierten Fermentationsmethode mit Materialsynthese ist es deshalb wichtig die Stellschrauben des Systems zu kennen und zu verstehen.

## 1.7. BC-Biosynthese

Die Biosynthese von Cellulose verläuft in Bakterien und in Pflanzen ähnlich ab. Um die Cellulosebiosynthese auf molekularer Ebene zu untersuchen, war es historisch gesehen sehr wichtig, Zugang zu einem biologischen Modellsystem zu haben, welches einfacher als das der Pflanzen ist. So wurde das *Bacterium xylinum*, später *Gluconacetobacter xylinus* als Modellorganismus für die Analyse der BC-Synthese in Bakterien ausgewählt [45]. Brown veröffentlichte bereits 1886/1887 erste wissenschaftliche Berichte über die Fähigkeit des Mikroorganismus Cellulose zu synthetisieren [46]. In Abbildung 6 ist die BC-Biosynthese ausgehend von Glukose aufgezeigt.

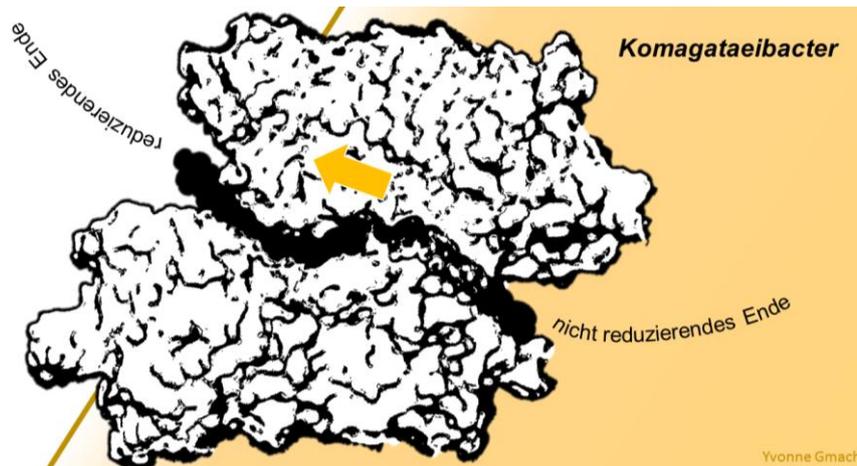


**Abbildung 6:** Vereinfachter Stoffwechselweg zur Produktion von BC mit Glukose als Substrat. Teil der Abbildung 5.

Im ersten Schritt wird die diffusiv über die Zellmembran aufgenommene Glukose über eine Glukokinase und unter Verbrauch eines Moleküls ATP zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Durch eine Phosphoglukomutase (EC 5.4.2.2) wird das Zwischenprodukt zu Glukose-1-Phosphat isomerisiert. Der Glukoserest wird dann durch das Enzym Glukose-1-phosphat-Uridyltransferase (EC 2.7.7.9) durch Reaktion mit UTP auf UDP übertragen, wodurch UDP-Glukose und Pyrophosphat in einer geschwindigkeitsbegrenzenden Reaktion entstehen [83]. Durch das Enzym Pyrophosphatase wird Pyrophosphat anschließend in zwei Moleküle Phosphat gespalten und damit das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite verschoben. Die Umwandlung in UDP-Glukose erfolgt durch die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase in der Zytoplasmamembran [84]. UDP-Glukose ist das Substrat der Cellulose-Synthase (EC 2.4.1.12), das letzte entscheidende Enzym für die Cellulose-Synthase [65]. Sie ist ein oligomeres, membrangebundenes Protein und eng mit der Zytoplasmamembran verbunden [76, 85] und wird auch Terminaler-Komplex (TK) genannt. Laut White et al. führt das Kanalisieren einer großen Menge an UDP-Glukose für die Cellulose-Biosynthese zu einer Veränderung des Zellstoffwechsels, wodurch die Glukoneogenese begünstigt wird [83, 86].

## 1.8. Cellulose-Synthase

Der Cellulose-Synthase-Enzymkomplex besteht laut Lin et al. aus den vier verschiedenen Untereinheiten CeSA, CeSB, CeSC und CeSD. Er ist für die Polymerisierung der  $\beta$ -1,4-Glucanketten aus Glukoseeinheiten verantwortlich [85]. CeSA besitzt eine hohe Affinität zur UDP-Glukose [87]. CeSB dient laut Kawano et al. zur Regulation und bindet den Aktivator c-di-GMP. Die Funktion der dritten Untereinheit CeSC ist derzeit noch nicht genau bekannt. Die Untereinheit CeSD ist für die Bildung der Polymerstränge verantwortlich [88]. Uto et al. haben eine computergestützte Modell- und Molekulardynamiksimulation der Cellulosesynthase-Untereinheit D-Octamer (CeSD) aus *Komagataeibacter hansenii* erstellt und auf eindrucksvolle Weise das Kettenwachstum im CeSD-G12-Komplex gezeigt [89], Abbildung 7.



**Abbildung 7:** Vereinfachte Darstellung des CesD-Komplexes mit einer Cellulosekette auf ihrem Weg aus der Zelle. Abgeleitet von der originalen Abbildung 51 (Anhang) von Uto. et al. [89].

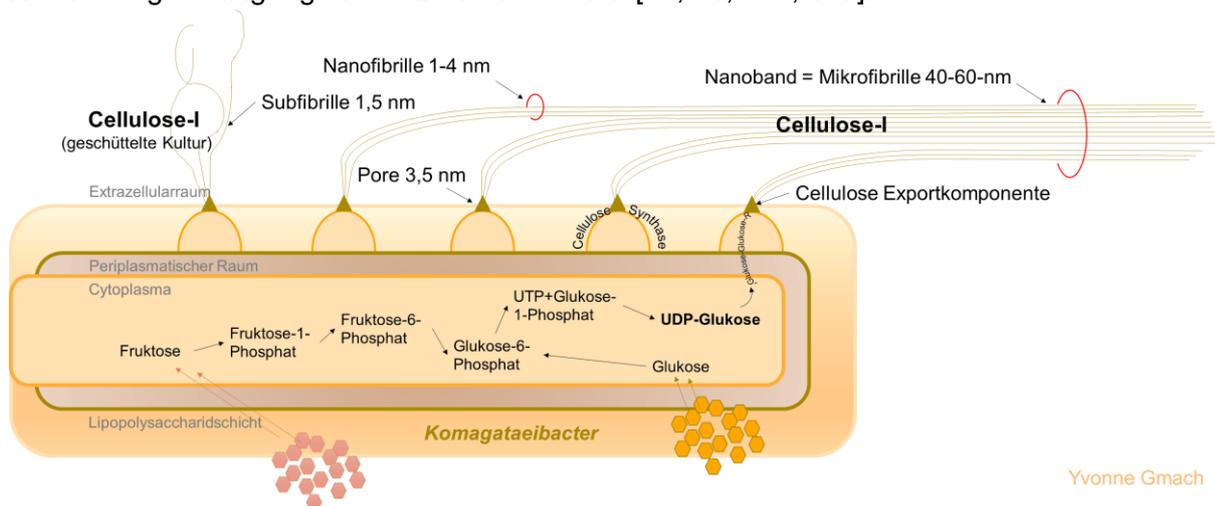
Unter Abspaltung von UDP wird der Glukoserest kovalent mit dem wachsenden Cellulosemolekül verknüpft. Dieser Kettenaufbau erfolgt mit bis zu 200.000 Moleküle Glukose pro Sekunde [77, 90], was einem Kettenwachstum von 2  $\mu\text{m}$  pro Minute und einer Polymerisation von mehr als  $10^8$  Glukose Molekülen pro Stunde und pro einzelner Bakterie entspricht [65, 91].

Es gibt zwei Hypothesen für den Mechanismus des Kettenaufbaus: In der ersten, von Brown und Saxena, wird davon ausgegangen, dass die Glukosereste an das nicht reduzierende Ende der Celluloseketten angefügt werden. Es entstehen Polymerketten, deren reduzierendes Ende von der Zelle abgewandt ist [92, 93]. Mit einer Kombination aus Direktfärbung der reduzierenden Enden der Celluloseketten und der Mikrobeugungsneigung elektronenkristallographischer Analysen konnten Koyama et al. diese Hypothese bestätigen [94]. Uta et al. zeigen in ihrer computergestützten Simulation die katalytische Stelle am C-Terminus von CesA, die von einer UDP-Glukose besetzt wird. Hier wird die Cellulosekette auch am nicht reduzierenden Ende durch eine Glycosyltransferreaktion verlängert, gefolgt durch die Translokation vom Transmembrankanal von CesA zur periplasmatischen Domäne von CesB, Abbildung 7. Die Anordnung der Glukosemoleküle, welche jeweils um einen Torsionswinkel von  $180^\circ$  gedreht sind, spricht nicht für das Binden einzelner Glukose Monomere, sondern für die Verknüpfung des Dimers Cellobiose. Es entsteht eine Cellobiosekette mit einer 2-fachen Schraubenachse. [92, 95].

Bei der zweiten Hypothese von Han und Robyt wird ein Lipid-Zwischenprodukt in die Polymerisation der  $\beta$ -1,4-Glucankette mit einbezogen. Es folgen drei Schritte, welche kontinuierlich durchlaufen werden, wobei schließlich eine  $\beta$ -1,4-Glucankette entsteht. Bei diesem Mechanismus muss die Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms beim Anfügen an die Glukosekette verändert werden [96]. Für diese Theorie spricht vor allem die Tatsache, dass auch die Bakterienart *Agrobacterium tumefaciens* ein Lipid-Zwischenprodukt in der Biosynthese von Cellulose nutzt [97]. Weiterhin spielt dieses Molekül auch in Biosynthesen von Xanthan (*Xanthomonas campestris*) [98] und Acetan eine Rolle. Letzteres wird von vielen *K. xylinus* Stämmen als Nebenprodukt produziert [99]. Andererseits konnte bei einer in vitro Cellulose-Synthese und einer Polymersynthese mittels einer extrahierten Cellulose-Synthase keine Lipidkomponente gefunden werden [100, 101]. Dies spricht für das Modell von Brown und Saxena. Der Mechanismus scheint noch nicht exakt aufgeklärt zu sein. Sobald die Celluloseketten den Mikroorganismus verlassen, beginnt der Aufbau der mikrofibrillaren Struktur der BC.

## 1.9. Aufbau der mikrofibrillaren BC-Struktur

Mühlethaler beschrieb 1949 bereits, dass mit Hilfe des Elektronenmikroskops sich die Fasern der BC leicht erkennen lassen und diese ungefähr den gleichen Durchmesser (ca. 250 Å) wie die Fasern der Zellwände vieler Pflanzen haben [102]. Es wurde aber auch festgestellt, dass sie sehr unterschiedlich in ihrer Struktur höherer Ordnung sind [103]. Die einzigartige mikrofibrillare Struktur und die Eigenschaften von Cellulose resultieren aus dem Extrusionsverlauf der Ketten und ihrem Zusammenbau außerhalb der Zellen, Abbildung 8. Mikroskopische Aufnahmen der Oberfläche der Zellohülle von Zaar et al. weisen auf das Vorhandensein von etwa 50–80 porenähnlichen Stellen entlang der Längsachse der Zellen hin. Diese diskreten Strukturen der Lipopolysaccharidschicht sind die Extrusionsporen für die im Innern der Bakterienzellen synthetisierten Präcellulose-Polymermoleküle. Diese werden aus den organisierten Cellulose-Exportkomponenten extrudiert und schließen sich in Gruppen von ca. 10–15 Ketten zu den sogenannten Subfibrillen zusammen [77, 91, 104]. Diese Subfibrillen haben einen Durchmesser von ca. 1,5 nm und lagern sich weiter zu Nanofibrillen von 1 nm bis 4 nm zusammen. Die schließlich resultierenden Mikrofibrillen, auch Nanobänder genannt, haben ein großes Aspektverhältnis (größer 50) [105], Abmaße von ca. 40-80 x 6-10 nm und eine Länge von 1 µm bis 9 µm. Hier variieren die Angaben je nach Quelle, Medium, Kultivierungsbedingungen und Bakterienstamm [63, 91, 106, 107].

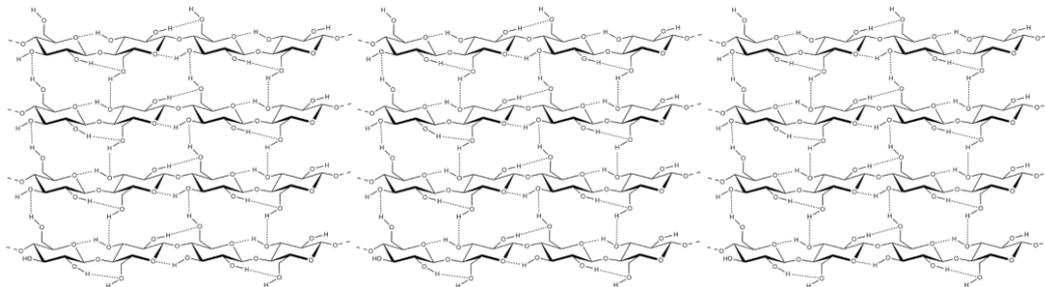


**Abbildung 8:** Vereinfachte Cellulose-Synthese der *Komagataeibacter* aus den Quellen [40, 63, 82, 92, 108-112] erstellt.

Für Bäume und Pflanzen wird angenommen, dass die TK in sechsgliedrigen Rosetten organisiert sind [92], wobei jede Untereinheit eine lineare Schicht aus sechs Celluloseketten erzeugt. Aus einem einzelnen TK hat die resultierende Cellulose-Elementarfibrille 36 Celluloseketten, einen quadratischen Querschnitt von 3 nm bis 5 nm Größe und enthält sowohl kristalline als auch amorphe Regionen. Diese elementaren Fibrillen bauen sich selbst weiter zu einer größeren, steifen Mikrofibrillenstruktur zusammen [105]. Eingebettet in eine hydrophile Matrix aus Lignin und Hemicellulosen in den Zellwänden der Holzzellen erreichen sie E-Module von 138 GPa [113].

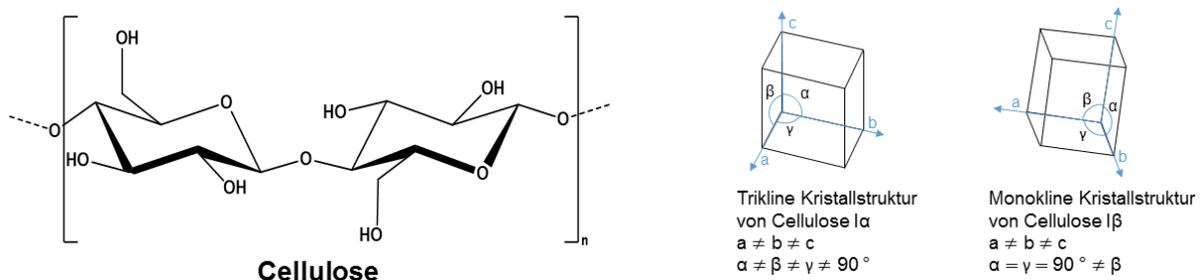
## 1.10. Eigenschaften der BC

Die pflanzlichen Cellulose ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> besteht aus  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpften  $\beta$ -D-Glukose- bzw. Cellobiose-Einheiten. Die einzelnen Celluloseketten sind durch intra- oder intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden [45, 112], Abbildung 9.



**Abbildung 9:** Struktur der BC-Fibrillen mit dem Wasserstoffbrückenbindungsmuster zwischen und innerhalb der Kette in Cellulose I (gestrichelte Linien).

Es handelt sich um eine homogene, polykristalline und makromolekulare Verbindung aus kristallinen (geordnet) und amorphen (weniger geordnete) Regionen [114]. Cellulose-I ist die natürlich am häufigste vorkommende Form von Cellulose. Sie besteht aus parallelen Ketten und kommt in zwei unterschiedlichen Allomorphen vor, der Cellulose-I $\alpha$  im metastabilen Zustand und den Cellulosen-I $\beta$  im stabilen Zustand [115], Abbildung 10.



**Abbildung 10:** Strukturformel in Sesselkonformation von Cellulose bzw. BC-Glukose-dimer - Cellobiose-Einheit (links); Triklone und monokline Kristallstruktur der Cellulose Allomorphen (rechts) [112] aus der Arbeit von van Zyl et al. mit freundlicher Genehmigung von ELSEVIER.

Die chemische Analyse des BC wurde von Hibbert und Barsha 1931-1934 [116, 117] unternommen. Sie stellten fest, dass BC chemisch identisch mit der pflanzlichen Cellulose ist. Zu den wesentlichen Eigenschaften der BC gehören die hohe Reinheit [79], der hohe Grad an Kristallinität, die größere Oberfläche im Vergleich zu pflanzlichen Cellulosefasern [76, 118, 119], die hohe Wasserbindungskapazität [120-122] und das hohe Elastizitätsmodul. Sie ist metabolisch inert, biokompatibel und biologisch abbaubar.

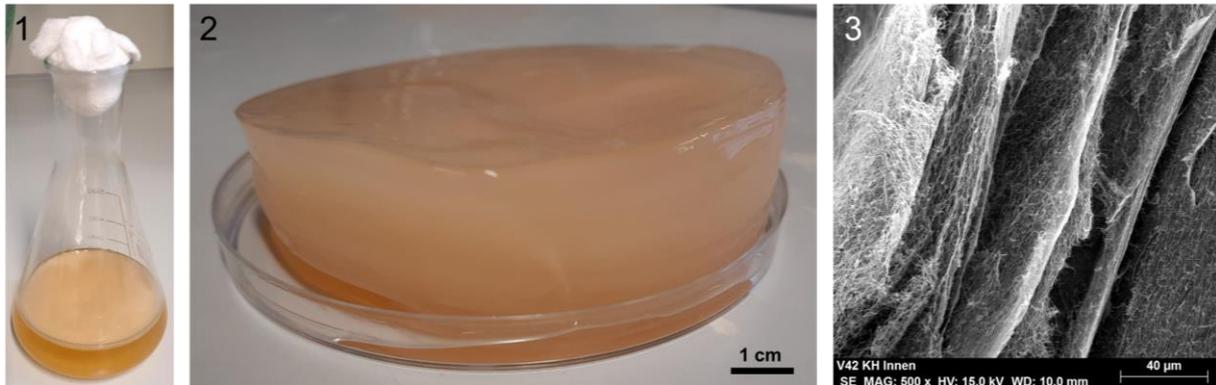
Tabelle 1 zeigt einige mechanische Eigenschaften der BC und der Holzfasern im Vergleich. Obwohl BC Fibrillen und pflanzliche Cellulosefasern chemisch gleich aufgebaut sind, bestehen doch signifikante Unterschiede.

**Tabelle 1:** Zusammenfassung von mechanische Eigenschaften der BC [91, 123-125] und der Holzfasern [40, 113, 126].

Eigenschaften	BC	Holzfasern
Gehalt an Cellulose [%]	73 - 80	46,4
Kristallinitätsindex [%]	71 - 89	40 - 60
Elastizitätsmodul, in Faserrichtung [GPa]	15 - 35	138
Zugfestigkeit [MPa]	200 - 300	45

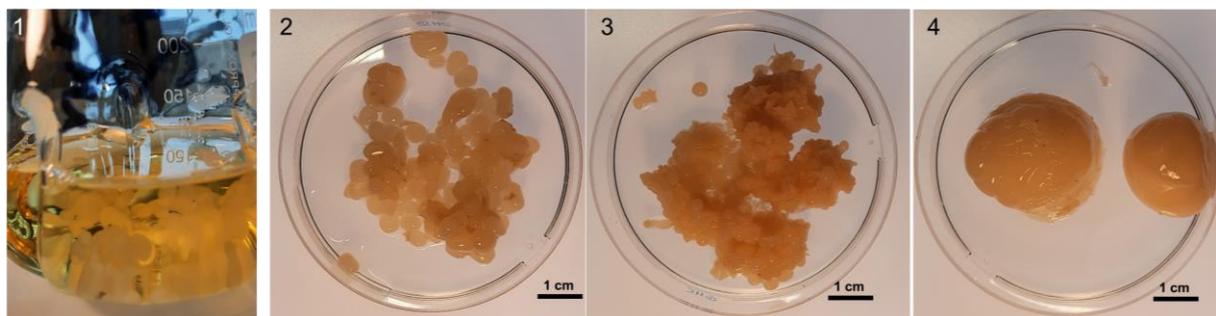
## 1.11. Kultivierung der Mikroorganismen

Die BC-produzierenden Mikroorganismen bilden am Boden des Kultivierungsgefäßes durch die synthetisierten BC-Fibrillen einen dünnen BC-Film, der durch CO<sub>2</sub>-Bläschen mit den darin eingebetteten Mikroorganismen an die Oberfläche der Flüssigkeit steigt [45, 127]. Die BC-Kahmhaut wird mit zunehmender Fermentationszeit immer dicker, Abbildung 11, und kann leicht von der Oberfläche des Mediums abgenommen werden. Die aeroben Mikroben in der Kahmhaut werden durch Diffusion mit ausreichend Sauerstoff [128] und durch die adsorptiven Eigenschaften der BC mit Nährstoffen aus dem Medium [40] versorgt.



**Abbildung 11:** Stehende Kultivierung: (1) Stehkolben mit BC-Pellikel und Nährmedium; (2) BC-Pellikel durch stehende Kultivierung gewachsen (3); REM-Aufnahme der BC-Schichten einer stehend gewachsenen BC-Kahmhaut im Querschnitt.

BC kann durch Kultivierung unter statischen oder bewegten Bedingungen hergestellt werden [120-122, 129]. Abbildung 11 zeigt die statische Kultivierung, welche die am weitesten verbreitete Herstellungsmethode von BC-Pellikeln ist [130]. Hier spielt insbesondere das Verhältnis von Oberfläche zum Volumen des Nährmediums eine entscheidende Rolle, um die Mikroorganismen mit genügend Sauerstoff zu versorgen [131]. Der Aufbau der Cellulose-Pellikel erfolgt in Schichten, die teilweise lose miteinander verbunden sind, aber dennoch einen massiven BC-Pellikel bilden können. Der Sauerstoffeintrag in eine bewegte Kultivierung ist wesentlich höher, als der in statischen Kulturen, weshalb diese Kultivierungsmethode bei aeroben Bakterien oft bevorzugt wird. Durch das Auftreten von Scherkräften entstehen jedoch in der BC-Kultur faserige Suspensionen oder feste Kugeln aus BC [122]. Die äußere Form verändert sich sichtlich, Abbildung 12. Je nach Kolbengröße und Rotationsgeschwindigkeit können kleine Kugeln (Bild 2), faserige Strukturen (Bild 3) oder große Klumpen (Bild 4) erzeugt werden.



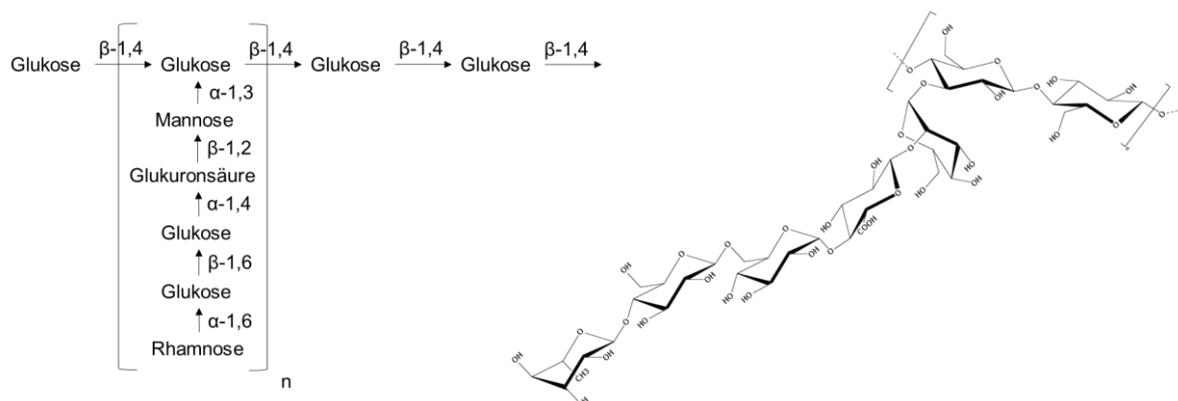
**Abbildung 12:** (1) Schüttelkolben mit kugelförmigen BC-Pellikeln; (2) bis (4) kugelförmige BC-Pellikel kurz nach der Ernte.

Begasung oder der Zusatz von Substanzen, die nicht in die Mikroorganismen eindringen können, aber kompetitiv Wasserstoffbrückenbindungen mit den  $\beta$ -1,4-Glucanketten eingehen

wie z.B. Carboxymethyl-Cellulose oder fluoreszierende Aufheller wie Calcofluor white, können ebenso signifikante Änderungen in die submolekulare Organisation der Celluloseketten bringen [45, 76, 92]. Bedingt durch diese äußeren Einflüsse entstehen unterschiedliche mechanische Eigenschaften der BC-Struktur [69, 132]. Die Manipulation der Cellulosefasern durch die Kultivierungsmethode oder durch Medienzusätze stellt demnach eine der Stellschrauben für die in vitro Manipulation der Materialsynthese dar. Sie zeigt aber auch, dass sich zu viel Scherstress negativ auf die BC-Produktion und die mechanischen Eigenschaften der Materialien auswirken können. Es ist sogar möglich den Stoffwechsel soweit zu beeinflussen, dass vermehrt Nebenprodukte produziert werden [133, 134].

## 1.12. Nebenprodukte der BC-Fermentation

Nebenprodukte der Fermentation sind Stoffwechselprodukte, welche die Mikroorganismen neben dem gewünschten Hauptprodukt herstellen und dafür Energie verbrauchen. Die Optimierung der Fermentationsbedingungen ist daher für die Ausbeute der BC und für das Gelingen der Forschungsarbeit entscheidend. *Komagataeibacter* wandeln einen Teil der Kohlenstoffquelle in Gluconsäure um [63, 74], die intrazellulär eingebaut wird und später als Substrat zur BC-Synthese durch den Entner-Doudorouff-Weg (ED) und den PP-Weg zurückkehrt [135, 136]. Laut Chao et al. sollte eine Minimierung dieser Nebenproduktbildungen die BC-Produktion steigern [134, 137]. *Komagataeibacter* produzieren neben Säuren zudem noch wasserlösliche EPS, wie beispielsweise ein weiteres  $\beta$ -Homoglycan mit einem Rückgrat aus  $\beta$ -1,4-verknüpften Glukosemolekülen. Es unterscheidet sich jedoch von der BC darin, dass jede dritte Glukoseeinheit eine  $\beta$ -1,2-glykosidische Bindung mit einem anderen Glukosemolekül eingeht [138, 139]. Tonouchi et al. beschreiben auch das Vorkommen von Levan als wasserlösliches Nebenprodukt [140]. Zudem kann sogenanntes Acetan nachgewiesen werden. Es ist das häufigste Nebenprodukt der BC-Synthese und wird hauptsächlich von den *Komagataeibacter* gebildet. Es besteht auch aus einer  $\beta$ -1,4-verknüpften Hauptkette, an die ein Tetra- oder Pentasaccharidrest an die 3. Position jedes weiteren  $\beta$ -D-Glucopyranosylrests gebunden ist. Die Seitenketten bestehen aus Glukose, Mannose, Rhamnose und Glukuronsäureresten mit einem molaren Verhältnis von 3-4:1:1:1 [45, 141-144]. Der Aufbau des Moleküls ist in Abbildung 13 dargestellt. Minakami et al. haben ein Polysaccharid mit Seitenketten, deren Bestandteile Glukose, Galactose, Mannose und Glukuronsäureresten sind, in einem molaren Verhältnis von 6:2:1:1, gefunden [145]. Es scheint, dass die Zusammensetzung des Acetans durch die Medienzusammensetzung variiert werden kann.

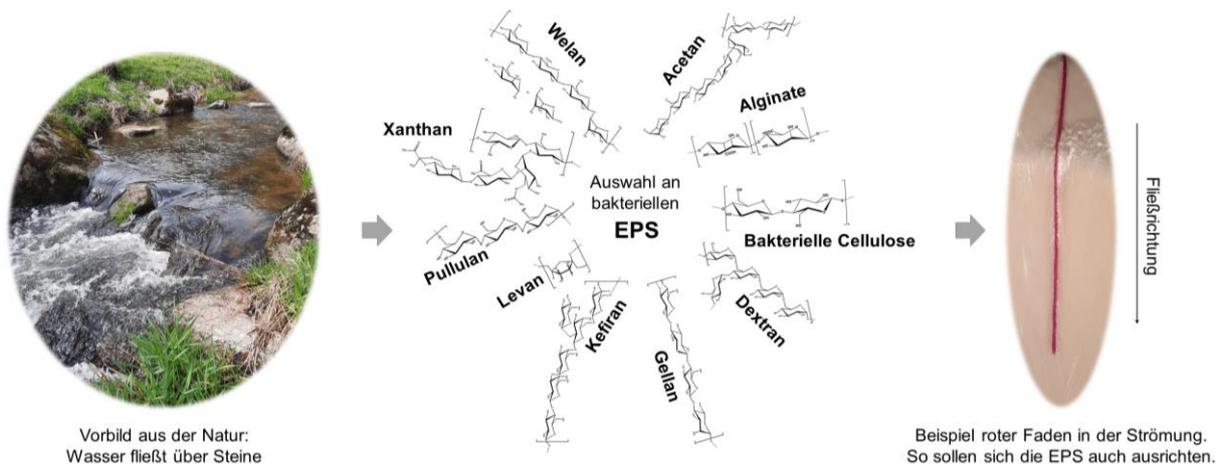


**Abbildung 13:** Struktur des wasserlöslichen EPS Acetan (links), Strukturformel (rechts); basierend auf Quelle [99] erstellt.

Die Enzyme Cellulose-Synthase und UDP-Glukosetransferase produzieren die BC und das Acetan. Die Biosynthesen sind jedoch nicht direkt miteinander verbunden, obwohl UDP-Glukose die Vorstufe für die Synthese beider Produkte ist und sie vermutlich einer ähnlichen Kinetik folgen [146-148]. Die Hemmung der UDP-Glukosetransferase blockiert auch die Acetanproduktion und erhöht somit, laut Watanabe et al., die BC-Produktion [137]. Naritomi et al. berichten, dass mit Ethanol ergänzte Kulturmedien die BC-Produktion deutlich erhöhen. Das Ethanol wird zu Acetat umgewandelt, welches dann im CZ genutzt werden kann, um letztendlich CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und ATP zu produzieren. Durch mehr ATP steigt die Aktivität der beteiligten Enzyme und beeinflusst dadurch den BC-Syntheseweg. Die Autoren postulieren, dass die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase um mehr als 50 % zunahm, was den PP hemmte und dadurch die BC-Produktion erhöhte [149]. Der Einfluss auf die Nebenprodukte wirkt sich demnach direkt auf die BC-Produktion aus und muss im Fermentationsprozess berücksichtigt werden.

### 1.13. Rheotaxis

Inspiration für den späteren Versuchsaufbau war das Vorbild eines fließenden Gewässers, die Strömung über Steine und die sich daran bildenden Biofilme. Darauf aufbauend wurde eine Methode für die Anwendung im Labor entwickelt. Hierfür wurde eine Strömung über eine Fläche benötigt, welche die von Prokaryoten gebildeten EPS, ähnlich eines Fadens in der Fließrichtung eine Flüssigkeitsströmung, ausrichtet, Abbildung 14.



**Abbildung 14:** Fließgewässer mit Strömung (links); Sammlung an bakterieller EPS mit Strukturformeln (Mitte); Roter Faden in einer Flüssigkeitsströmung (rechts) - Vorbild der Ausrichtung von EPS durch Rheotaxis.

Eine Möglichkeit für die natürliche Ausrichtung von Mikroorganismen ist die Rheotaxis. Sie gehört zur Gruppe der „Taxien“. Das sind zielgerichtete Orientierungs- und Bewegungsreaktionen von Lebewesen, die von einem Reiz oder Umweltfaktor ausgelöst werden. Beispiele hierfür sind unter anderem Chemotaxis [150, 151], Thermotaxis [152, 153], Magnetotaxis [154, 155] und Gyrotaxis [156, 157]. Letztere sind passiv und implizieren keine Wahrnehmung, sondern resultieren ausschließlich aus äußeren Kräften. Diese Phänomene können bei freibeweglichen Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen beobachtet werden [158, 159].

Im Falle der strömungsinduzierten Bewegungsreaktion, die aus Fluidgeschwindigkeitsgradienten resultiert, kann zwischen positiver und negativer Rheotaxis unterschieden werden. Bei der positiven Rheotaxis wenden sich die Organismen der Strömungsquelle zu. In einem fließenden Strom führt dieses Verhalten dazu, dass sie ihre Position halten, anstatt von der

Strömung stromabwärts gespült zu werden. Mit sorgfältig kontrollierten, mikrofluidischen Strömungen konnten Marcos et al. zeigen, dass positive bakterielle Rheotaxis ein rein physikalisches Phänomen ist. Sie resultiert aus einem Wechselspiel zwischen Geschwindigkeitsgradienten und der helikalen Form der Flagellen, die zusammen ein Drehmoment erzeugen, welches die Schwimmrichtung eines Bakteriums ändert. Da dieses Drehmoment unabhängig von der Anwesenheit einer nahegelegenen Oberfläche ist, ist die positive bakterielle Rheotaxis nicht auf die unmittelbare Nachbarschaft von Flüssig-Fest-Grenzflächen beschränkt, sondern findet auch in der Flüssigkeit statt [158]. Die positive Rheotaxis kann einen Mikroorganismus in Strömungsrichtung ausrichten. Meist resultiert daraus ein Winkel zur Strömungsrichtung, da der Mikroorganismus versucht die Drift zu kompensieren. Eine gezielte Ausrichtung der Mikroorganismen und ihrer selbst produzierten EPS könnte zu einer Vorzugsrichtung im späteren Material führen. Aus diesem Grund wurde die Rheotaxis als Instrument für die Methodenentwicklung ausgewählt und in die Forschungsarbeit integriert.

#### **1.14. Stand der Wissenschaft und Technik zur Herstellung von cellulosebasierten 2D-Materialien**

Für den besseren Vergleich, der selbst hergestellten rheotaktischen Materialien zu anderen cellulosebasierten Materialien, werden in diesem Unterpunkt cellulosebasierte 2D-Materialien und ihre Herstellung vorgestellt. Dies wird durch eine Zusammenfassung des Stands der Wissenschaft und Technik zur Herstellung von ausgerichteten 2D-Materialien aus BC ergänzt.

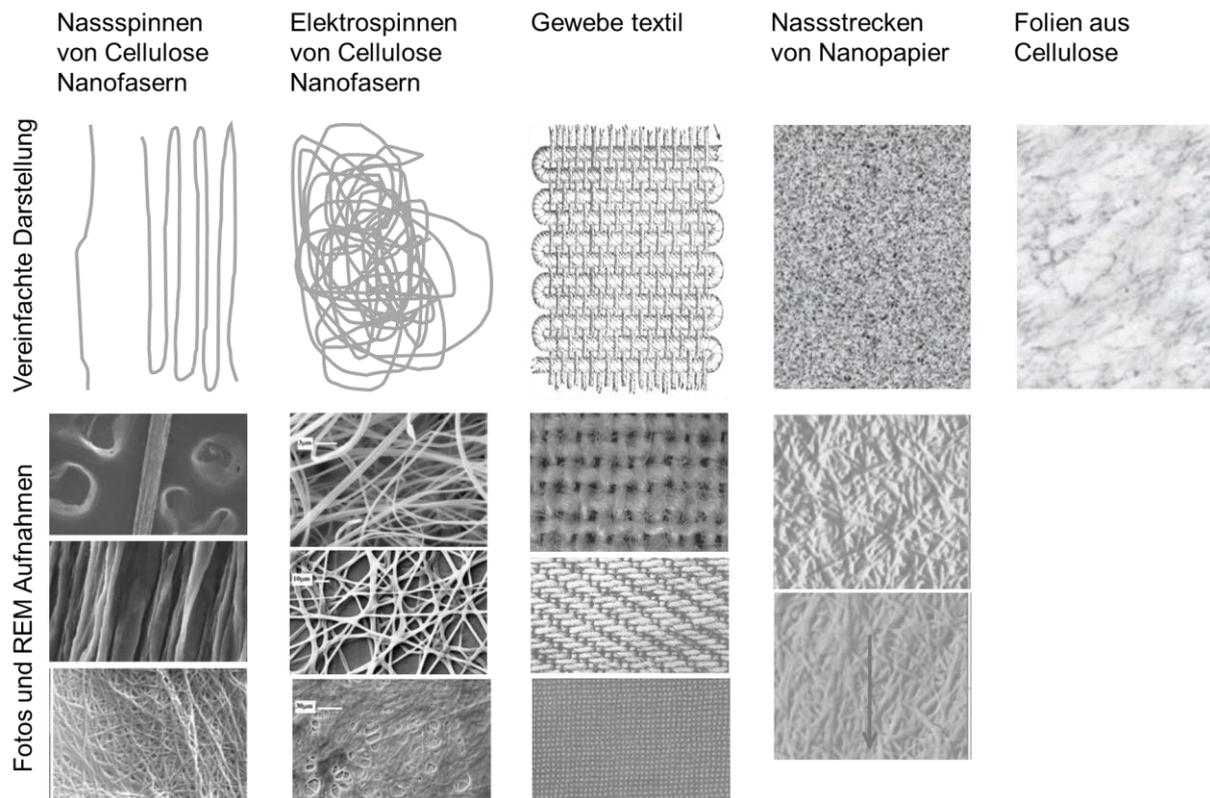
##### **1.14.1. Methoden zur Herstellung von 2D-Körpern aus cellulosebasierten Materialien**

Zu den cellulosebasierten 2D-Körpern zählen Filme, dünne Schichten oder Gewebe aus Cellulosematerialien, die mit den verschiedensten Methoden aus unterschiedlichen Ausgangsstoffen generiert werden. Als Cellulosegrundmaterial stehen je nach Größe, Morphologie, Präparationstechnik und Herkunft verschiedene Stoffe aus pflanzlicher und BC zur Verfügung. Zu unterscheiden sind die freifließende mikrokristalline Cellulose mit unterschiedlichen Körnungen und Kettenlängen und weitere Untergruppen, wie Nanocellulose, Nanofasern und mikrofibrilläre Cellulose:

- Cellulose-Nanokristalle, auch bekannt als nanokristalline Cellulose oder Cellulose-Nanowhisker, sind starre, stäbchenförmige Partikel mit einem Durchmesser von 10-30 nm und weniger als 500 nm Länge. Die Kristallinität liegt im Bereich von 54-88 % [160, 161].
- Cellulose-Nanofibrillen, auch als Nanofibrillen bezeichnete Cellulose oder mikrofibrillierte Cellulose, bestehen sowohl aus einzelnen, als auch aus aggregierten Nanofibrillen. Die Elementarfibrille hat bei diesem Material einen Durchmesser von 3–5 nm und eine Länge von 500–1000 nm, während die Aggregate einen Durchmesser im Bereich von 20–50 nm haben. Sie besteht aus kristallinen und amorphen Bereichen, mit einem großen Seitenverhältnis und einer guten Flexibilität [160, 162, 163].
- Hochkristalline BC und ihre Eigenschaften, Kapitel 1.10.

Diese Benennungen variieren je nach Quelle und Verwendung und müssen für den jeweiligen Einsatz genauer spezifiziert werden. Des Weiteren kommen Celluloseregenerate, künstliche Fasern, organische und anorganische Celluloseester, Methylcellulose, Hydroxyethylcellulose und weitere Derivate zum Einsatz [109]. Besonderes Interesse haben in den letzten Jahren Verbundwerkstoffe aus Naturfasern und BC geweckt [64, 164, 165]. Es hat sich gezeigt, dass

hierdurch neue spezifische Eigenschaften generiert und eine breite Anwendungsmöglichkeit geschaffen werden können. Für den Vergleich der ausgerichteten 2D-Materialien und deren Herstellungsmethoden, wurden diese in Abbildung 15 aufgeführt.



**Abbildung 15:** Übersicht über 2D-Materialien mit einer Vorzugsrichtung im Material.

Cellulosenanofibrillen werden häufig durch Nassspinnen hergestellt. Hierfür werden Polymerlösungen in ein Fällbad mit einem weiteren Lösungsmittel eingedüst und die Cellulosefibrillen dabei ausgerichtet. Das Polymer kann nach weiteren Verarbeitungsschritten als Filament oder als Faser aufgewickelt werden. Das Elastizitätsmodul der gesponnenen Makrofasern nimmt mit der Spinnengeschwindigkeit zu. Die Ergebnisse von Walther et al. und Iwamoto et al. zeigen, dass die mechanischen Eigenschaften direkt von der Ausrichtung der Nanofibrillen beeinflusst werden [166-168]. Endlose Nanofasern, Nanodrähte und Nanoröhren aus Cellulose können durch das Elektrospinnen hergestellt werden [169, 170]. Bei diesem Verfahren können Lösungen, Suspensionen oder Schmelzen unter Ausnutzung eines starken elektrischen Felds zu Fasern gesponnen werden. Kim et al. konnten unverwobene Matten aus Cellulosefasern in Submikrongröße mit Durchmesser von 250–750 nm aus Celluloselösungen herstellen. Das Verweben von einzelnen, cellulosehaltigen, makroskopischen Fäden ist bisher der Textilindustrie vorbehalten. Technologien zum Weben von künstlich hergestellten Fibrillen aus dem Nassspinn- oder Elektrospinnverfahren konnten bei der Literaturrecherche nicht gefunden werden. Die Herstellung von gewebeartigen dünnen Schichten erfolgt bisher durch Verschmelzen, Verkleben oder starke Wechselwirkungen der Celluloseketten über Wasserstoffbrückenbindungen. Einzig die native Form der BC-Pellikel stellt ein verwobenes Netzwerk aus Cellulose-Fibrillen dar.

Liu et al. fassen verschiedenen Verfahren zur Herstellung von Nanopapieren zusammen. Nanopapiere werden meist aus wässrigen Cellulose-Lösungen durch Filtration, Gießen, Schichten oder Sprühen hergestellt [160]. Sie bestehen aus dem porösen Netzwerk von Cellulosefasern. Es können künstlich hergestellte Nanopapiere aus pflanzlicher oder BC und native, verpresste BC-Kahmhäute unterschieden werden [168, 171-173]. Letztere werden

durch eine Kombination aus Verdampfen und Verpressen zu einem dichten Film von  $\sim 1,0 \text{ g cm}^{-3}$  komprimiert. Hierbei kollabiert das Mikrofibrillen-Gelnetzwerk und eine durchgehende Filmdicke mit vielen parallelen Stapeln dünner Cellulosefolien oder –schichten entsteht [105, 106]. Die mechanischen Eigenschaften, wie E-Modul und Endfestigkeit der Nanopapiere, verbessern sich durch das Nassstrecken, auch bekannt als Kaltziehen. Laut Torres-Rendon et al. wird diese Methode am häufigsten zur Orientierung von Nanopartikel in Nanopapieren angewendet [168]. Auf diese Art lassen sich die selbst erzeugten 2D-BC-Materialien auch nachbehandeln.

Eine weitere Möglichkeit für 2D-Materialien aus cellulosebasierten Materialien ist die Herstellung von Folien. Diese sehr dünnen und homogenen Flächengebilde werden, ähnlich wie bei dem Nassspinnverfahren, durch Gießen von gelöster Cellulose und anschließendem Ausfällen in Lösungsmitteln hergestellt [174]. Die mechanischen Eigenschaften reiner BC-Folien resultieren aus ihrer hierarchischen Struktur und den Eigenschaften einzelner BC-Mikrofibrillen [103]. Die mechanischen Eigenschaften der BC-Filme können durch verschiedene Verarbeitungsschritte stark beeinflusst werden [175, 176]. Kombinationen aus Reinigungsbehandlungen mit NaClO und/oder NaOH ermöglichen es, das Elastizitätsmodul von 15 GPa auf 30 GPa zu erhöhen [106, 177]. Es wird angenommen, dass sich hierdurch Verunreinigungen entfernen lassen und stärkere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den BC-Mikrofibrillen ausgebildet werden. Das Trocknen der Filme über Raumtemperatur erhöht die Filmeigenschaften. Trocknen über 100 °C hat jedoch nur einen minimalen Einfluss auf die Eigenschaften [103, 105].

#### **1.14.2. Methoden für die Ausrichtung der BC**

Beispiele aus der Literatur zeigen, dass bisher überwiegend Methoden entwickelt wurden, deren Ziel es war die BC in 2D-Pellikeln auszurichten: Ben-Hayyim und Ohad stellten die chemische Modifikation durch Ausrichtung von Fibrillen in Gegenwart von Na-Carboxymethylcellulose vor [178]. Haigh et al. ergänzte das Wachstumsmedium durch ein extrahiertes Lipid aus *K. xylinus* [179]. Durch die Vorstrukturierung des Wachstumssubstrats mit orientierten Polysaccharidketten konnten Kondo et al. eine Ausrichtung erzielen [180]. Dies gelang ebenso Putra et al. durch die statische Kultivierung in einem sauerstoffdurchlässigen Silikonschlauch [181]. Mechanisch konnte die BC, durch direkte Rollernte aus einer quasistatischen Kultur [182], durch Kultivierung in einem zylindrischen Fermenter, der durch einen rotierenden Flügel [183] oder eine Klinge [184] bewegt wurde oder durch Fixieren mit anschließendem Trocknen [132] oder Nassziehen von statisch gewachsenen Häutchen [185], ausgerichtet werden. Sano et al. stellten eine Methode zur elektromagnetischen Steuerung der Bewegung von *K. xylinus* vor und erreichten damit eine Orientierung der BC-Fibrillen [186]. Die Arbeiten von Kondo et al. und Sano et al. unterscheiden sich von den anderen Methoden dahingehend, dass nicht nur der Ort der BC-Ablagerung festgelegt, sondern direkt die Art und Weise, in der sich die Mikroorganismen während der Materialbildung bewegen, manipuliert wurde. Wan et al. und Luo et al. haben bereits die Möglichkeit gezeigt, ausgerichtete BC durch strömungsförmiges Wachstum zu erhalten [183, 184]. Der Versuchsaufbau unterscheidet sich grundlegend zur eigenen Methode für die rheotaktische Ausrichtung der BC.

## **1.15. Stand der Wissenschaft und Technik zur Herstellung von cellulosebasierten 3D-Körpern**

Die Fertigung von 3D-Körpern und von 3D-Körpern aus Cellulose ist laut Literaturrecherchen auf verschiedene Arten möglich.

### **1.15.1. Herstellung von 3D-Körpern**

Da der 3D-Druck, auch als additive Fertigung bekannt ist und für die Herstellung der PLA-Körper benutzt wurde, wird er in diesem Zusammenhang kurz vorgestellt. Im Wesentlichen umfasst diese Bezeichnung alle Fertigungsverfahren, bei denen Material Schicht für Schicht aufgetragen wird, um 3D-Werkstücke zu erzeugen. Durch physikalische oder chemische Härtungs- oder Schmelzprozesse können Werkstoffe aus Kunststoff, Kunstharz, Keramiken oder auch aus speziell aufbereiteten Metallen aufgebaut werden. Dieses Fertigungsverfahren eignet sich nur für eine geringe Anzahl von Werkstücken, da es im Vergleich zum Schmelzguss, Tiefziehen oder anderen etablierten Verfahren zu aufwendig und teuer ist. Eine neue Verwendung hat der 3D-Druck im Forschungsfeld des Tissue Engineerings, der Gewebezüchtung, gefunden. Hierbei steht der Nachbau von menschlichen Organen und Geweben für die regenerative Medizin im Vordergrund. Computergesteuert können regelmäßige Strukturen, die so genannten Bioarrays, aus Bio-Ink hergestellt werden [168, 187]. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt eindeutig darin, dass die gewünschten Strukturen computergesteuert erstellt werden können und das verwendete Material anschließend sofort von Mikroorganismen oder Zellen bewachsen werden kann. Der große Nachteil aller schichtweise aufgebauten Verfahren ist, dass sie, im Vergleich zu Werkstücken aus einem Guss, weniger Stabilität haben. Die Schichten neigen trotz des Verschmelzens beim Kunststoff oder des Vernetzens des Alginats in der Bio-Ink leichter zum Bruch.

Das Gießen ist ein Fertigungsverfahren, durch welches Werkstücke aus flüssigem Material hergestellt werden können. Auch Hydrogele werden meist einfach nur in eine Form gegossen und erstarren dort, bevor sie weiterverarbeitet werden. Allgemein sind Hydrogele hydrophile Netzwerkstrukturen aus wasserunlöslichen Polymeren, die zwischen 20 % und dem Tausendfachen ihres Trockengewichtes an Wasser aufnehmen können [188]. Die Moleküle, die das Gel aufbauen, sind chemisch, z. B. durch kovalente, supramolekulare oder ionische Bindungen, oder physikalisch, beispielsweise durch Verschlaufen der Polymerketten, zu einem Netzwerk verknüpft. Hydrogele, die ein hohes Quellvermögen haben, werden Superabsorber genannt [189]. Im Vergleich dazu bestehen native BC-Hydrogele aus verwickelten Cellulosemikrofibrillen, die durch die zufällige Bewegung der Bakterien gebildet werden und mehr als 99 % Wasser enthalten [190]. Der BC-Biosyntheseprozess fördert die direkte Bildung von 3D-Objekten. Durch Variation der Kultivierungstechniken, der Geometrie oder Art des Kulturgefäßes ist es möglich, die gewünschte BC-Netzwerkstruktur, das BC/Wasser-Gleichgewicht und die 3D-Massenform des Hydrogels (z. B. Massenmaterialien, Filme, Kugeln und Röhren) herzustellen [191, 192]. Trotz des hohen Wassergehalts haben die Hydrogele aufgrund der BC-Mikrofibrillen-Netzwerkstruktur vernünftige mechanische Eigenschaften und können durch chemische Behandlungen verändert werden, was technische Anwendungen ermöglicht [188, 193, 194]. Diese BC-Hydrogele verfügen aber noch nicht über eine gezielte Orientierung der Cellulosefibrillen im Inneren des Materials, weshalb sich nur durch äußere Einflüsse eine Vorzugsrichtung erzielen lässt.

Oftmals können Aerogele aus gefriergetrockneten oder überkritisch getrockneten Hydrogelen hervorgehen. Durch verschiedenen Trocknungsmethoden können unterschiedliche Porengrößen und Porenverteilungen erzielt werden [195-197]. Diese hochporösen Materialien

haben extrem niedrige Dichten ( $0.01\text{--}0.4\text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ), große Oberflächen ( $30\text{--}600\text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) [198] und meist einen geringen Wärmetransport. Aerogele auf Cellulosebasis wurden in den 1950er Jahren von Stamm und seinen Mitarbeitern entwickelt [105, 199]. BC-Aerogele sind Kahmhäute, denen das Wasser vollständig entzogen wurde. Um die Bakterien aus den Pellicel zu entfernen, werden diese über mehrere Stunden in einem NaOH-Bad mit niedriger Konzentration ( $\sim 2\%$ ) gekocht und abschließend längere Zeit unter fließendem Wasser gespült. Zusätzliche NaOH- und NaClO-Behandlungen helfen bei der weiteren Aufreinigung der BC-Mikrofibrillen [106, 177]. Um die Netzwerkstruktur der BC-Fibrillen innerhalb der Kahmhaut verändern zu können, werden mechanische Behandlungen wie die Defibrillationsbehandlungen verwendet. Hierdurch wird das verwickelten BC-Netzwerk aufgebrochen und während einer Dehnungsbehandlung eine bevorzugte Ausrichtung in das Material induziert [175, 200-202]. Die zerstörten Netzwerkstrukturen können nicht wieder repariert werden.

### **1.15.2. Methoden zur Herstellung von 3D-Körpern aus BC**

Als Beispiel für eine 3D-gemusterte BC-Struktur haben Rühs et al. poröse Strukturen mit *K. xylinus* in Luft-in-Wasser-Schäumen wachsen lassen. Das Medium wurde zunächst durch Cremodan und Xanthan stabilisiert. Die kugelförmigen Luftblasen dienten als Vorlage für die Porenstruktur und den Mikroorganismen während des Wachstums als Sauerstoffquelle [203]. Caro-Astorga et al. produzierten BC-Sphäroide von *Komagataeibacter rhaeticus*, welche im Nachgang in 3D-Formen umgestaltet wurden [204]. Beide Studien fügen der bereits hierarchisch porösen, nativen BC-Struktur ein Niveau an Porengröße hinzu. Torres-Rendon et al. demonstrierten 2015 die Herstellung von bioaktiven Gyroid-Gerüsten durch Templatierung von Nanocellulose-Hydrogelen [205]. Die Ausrichtung der BC-Fibrillen in strukturierten 3D-Körpern konnte bisher in Literaturrecherchen nicht gefunden werden. Solch eine Methode wurde als schwer umsetzbar betitelt [168].

### **1.16. Problemstellung und Zielsetzung**

Die künstliche Nachahmung komplexer, hierarchischer und biologischer Materialien in einem technischen Maßstab, ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten und derzeit noch nicht zufriedenstellend gelöst. Es wird mit den verschiedensten Methoden versucht, die Kontrolle über die Strukturierung auf allen Längenskalen zu erreichen. Neben der Porosität sind besonders die mechanischen Eigenschaften für die verschiedenen Forschungsfelder interessant (Kapitel 1.1). Schwerpunkte liegen hier nicht nur im makroskopischen Aufbau, sondern auch in der Kontrolle des Gefüges der Materialien. Selbstorganisierte Netzwerkmaterialien mit einer hierarchischen Strukturierung, einer strukturellen Anisotropie und einer, das Material dispers durchziehenden Polymerphase, wären vielen bisherigen Materialien in Bezug auf die Elastizität, die Spannungsrelaxation und die strukturelle Rückbildung durch viskoelastisches Gleiten, deutlich überlegen [1, 12, 206, 207]. Ein möglicher Lösungsansatz für dieses Problem ist die Kombination aus technischer Strukturierung mit kontrollierter biologischer Unterstützung. Aus dieser Überlegung entstand die übergeordnete Forschungsidee dieser Dissertation: EPS mittels Rheotaxis, strömungsinduziert, auszurichten und dadurch neuartige Materialien mit besonderen Eigenschaften zu generieren.

### Erste Hypothese:

- 1) Durch die strömungsinduzierte Manipulation der Wachstumsbedingungen können anisotrope Biofilme generiert werden. (2D-Materialien)

Folgende Ziele müssen zur Umsetzung der Forschungs idee erfüllt werden:

- Es gibt viele bekannte Mikroorganismen, die in der Lage sind EPS zu produzieren. Für das rheotaktische Wachstum muss der geeignete Mikroorganismus und das passende Medium gefunden werden.
- Da es keinen kommerziell erhältlichen Versuchsaufbau für die rheotaktische Kultivierung gibt, muss dieser entwickelt und optimiert werden.
- Mit dem entwickelten Versuchsaufbau sollen homogene, anisotrope 2D-Biofilme generiert werden.
- Die Prüfung der hergestellten 2D-Materialien soll evaluiert und etabliert werden.
- Die Methode zur Herstellung von 2D-Materialien soll zur Herstellung von 3D-Materialien weiterentwickelt werden.

### Zweite Hypothese:

- 2) Monolithische Körper aus BC können sowohl hierarchisch, porös, wie auch global anisotrop strukturiert werden. (3D-Materialien)

## 2. Material und Methoden

Die beschriebenen Methoden, Mikroorganismen und Materialien der beiden Publikationen [208, 209] werden nur kurz zusammengefasst und durch weitere Informationen ergänzt, soweit diese für das Verständnis der nicht veröffentlichten Ergebnisse und Methoden notwendig ist.

### 2.1. Mikrobielle Stämme und Medien

Für das Screening wurden beide genannten Stämme verwendet. Für die Veröffentlichungen wurde der Mikroorganismus *K. sucrofermentans* eingesetzt.

***Komagataeibacter xylinus* (*K. xylinus*)** [46]

DSM-2004 = B 4168 = ATCC 23768 = NCIB 7029

***Komagataeibacter sucrofermentans* (*K. sucrofermentans*)** [52, 53]

DSM-15973 = BPR 2001 = JCM 9730 = LMG 18788 = BCC 7227

Es wurden verschiedenen Komplexmedien und ein Mineralmedium getestet. Für die Veröffentlichungen wurde auf das Hestrin-Schramm-Medium (HS-Medium) zurückgegriffen [90]. Die Kohlenstoffquelle wurde mit einer Endkonzentration von 0,1 M im Medium verwendet. Alle Medien, Kohlenstoffquellen und thermisch stabilen Komponenten wurden vor der Verwendung bei feuchter Hitze mindestens 20 Minuten dampfsterilisiert. Die anderen Komponenten wurden sterilfiltriert oder in Ethanol über mehrere Tage eingelegt.

Das **HS-Medium** beinhaltet  $5,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Bactopepton,  $5,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt,  $2,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  wasserfreies Natriumphosphat und  $1,15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Zitronensäure-Monohydrat [90]. Es wurde auf pH 6,5 eingestellt.

Laut der Anleitung von Steinbüchel et al. besteht das **GHC-Medium** aus  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefe-Extrakt und  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$  [210]. Es wird mit einem eingestellten pH-Wert von pH 6,8 verwendet. Das selbe Medium, nur mit einer  $\text{CaCO}_3$ -Konzentration von  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  wird von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) als **M105** für den Mikroorganismus *K. sucrofermentans* empfohlen.

Das Mineralmedium **Susi-Medium** basiert auf dem Minimalkulturmedium von De Souza et al. und beinhaltet  $147,02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $246,48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $58,00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $30,00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $5,00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$  und  $5,00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  [211]. Das Medium wurde auf pH 6,5 eingestellt.

Für die Dauerkultivierung wurden die Mikroorganismen als Agar-Kulturen in Petrischalen bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Den Medien wurde hierfür  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Agar zugesetzt. Für die Vorkultur wurde eine 7 Tage alte Kolonie von einer Agar-Platte in einen Stehkolben mit Flüssigmedium gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vorkulturen wurden je nach Bedarf wenige Tage bis mehrere Wochen inkubiert und den Hauptkulturen mit einem Verhältnis von 1:10 zugegeben.

Den Versuchsansätzen mit 3D gedruckten PLA-Körpern wurde  $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  einer  $34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ethanolische Lösung von Chloramphenicol zugegeben, um Kontaminationen zu verhindern. Die PLA-Körper wurden im Vorfeld mindestens drei Tage in technischem Ethanol zur Desinfektion gelagert.

## 2.2. Experimente für die Publikationen

### 2.2.1. Strukturelle und mechanische Anisotropie in rheotaktisch ausgerichteter BC (2D)

Für den Test der ersten Hypothese wurde ein Versuchsaufbau aus einfachen Laborgeräten und verfügbaren Standardkomponenten zusammengestellt, Abbildung 16, Bild 1: Peristaltische Pumpe (PLP 380 BT 100-2J, Behr Labortechnik, Düsseldorf, Deutschland) mit Schläuchen (TPP 6,35/9,55 mm und 7,45/11,15 mm, Freudenberg, Weinheim, Deutschland), 1 L Weithalsflaschen mit Gewindeschraubverschluss (GLS 80, Carl Roth), Silikonschläuche (6,00/2,00 mm und 3,00/1,50 mm, St. Geyer, Renningen, Deutschland), Sterilfilter für Luftaustritt (ReliaPrep Sterile-EO 0,2 µm, Ahlstrom, Helsinki, Finnland) und Eingang (Vent Filter 65 mm PTFE steril 0,22 µm, GVS Labor, Bologna, Italien), Durchflussmesser (generisch, 0 bis 3 L/min).



**Abbildung 16:** (1) Versuchsaufbau mit allen Komponenten; (2) Düse aus PLA kurz nach der Entnahme aus dem 3D-Drucker; (3) Bewuchsfläche mit sichtbaren Streifen auf der Oberfläche durch das Verschmelzen des PLA-Filaments.

Die eigenen Bauteile wurden mit SolidWorks 2019 konstruiert und teils selbst mit dem FDM 3D-Drucker RepRap X400 Pro V3 (Feldkirchen, Deutschland) oder im Auftrag durch die Firma 3DBAVARIA (Barbing, Deutschland) aus PLA gedruckt, Abbildung 16, Bild 2 und 3. Die Komponenten wurden für den Einsatz in den Weithalsflaschen entworfen und vor der Verwendung mehrere Tage in Ethanol desinfiziert. Die verwendeten Bewuchsflächen setzen sich aus einer flachen Grundfläche mit kleinen Strömungsbrechern und einer Düse zusammen, durch die das kontinuierlich im Kreis gepumpte Medium gleichmäßig auf der Bewuchsfläche verteilt werden kann. Das Wachstum der Biofilme wurde dokumentiert und die erzeugten BC-Materialien wurden gewogen, autoklaviert, gereinigt und getrocknet. Die getrockneten 2D-BC-Proben wurden auf ihre Struktur und Orientierung mittels Rasterelektronenmikroskop (REM), Lichtmikroskopie mit polarisierter Lichterfassung, Histogrammierung, Röntgenbeugung (XRD) und IR überprüft. Ihre physikalischen Eigenschaften wurden durch Zugversuche bestimmt und der Wasserverlust durch Trocknung dokumentiert.

## 2.2.2. Dreidimensional gemusterte, hierarchisch und anisotrop aufgebaute BC (3D)

Die Umsetzung der dreidimensional gemusterten, hierarchisch und anisotrop aufgebauten BC-Körper erfolgte mit dem gleichen Versuchsaufbau, wie für die 2D-BC-Körper. Es wurden die gleichen Standardkomponenten und Laborgeräte verwendet: Peristaltikpumpe PLP 380 BT 100-2J (Behr Labortechnik, Düsseldorf, Deutschland) mit Schläuchen (TPP 6,35/9,55 mm und 7,45/11,15 mm, Freudenberg, Weinheim, Deutschland), 1 L Weithalsflaschen mit Gewinde-schraubverschluss (GLS 80, Carl Roth), Silikonschläuche (6,00/2,00 mm und 3,00/1,50 mm, Th. Geyer, Renningen, Deutschland), Sterilfilter für Luftausgang (ReliaPrep Sterile-EO 0,2 µm, Ahlstrom, Helsinki, Finnland) und Input (Vent Filter 65 mm PTFE steril 0,22 µm, GVS Labor, Bologna, Italien), Durchflussmesser (0 bis 3 L/min). Als Flusszelle wurde ein 8-mm-Kraftstoffleitungsfiter mit transparenter Umhüllung (VS-7353, Biopoel, Alfeld, Deutschland) verwendet.



**Abbildung 17:** (1) Versuchsaufbau mit den Weithalsflaschen und den Flusszellen; (2) FDM-gedruckte Gyroid-Einbauten für die Flusszellen; (3) Gyroid in Hülle in einer Flusszellentülle; (4) Gyroid ohne Hülle in die Flusszelle mit Sichtfenster eingebaut.

Für die Herstellung eines gewachsenen monolithischen Körpers aus BC, der sowohl hierarchisch porös als auch global anisotrop strukturiert werden sollte, wurde ein Einbau für eine Flusszelle mit SolidWorks 2019 konstruiert. Dieser wurde der minimalen Oberfläche eines Gyroids nachempfunden und mittels FDM 3D-Druck aus PLA realisiert. Hierfür wurden drei verschiedene Konstruktionsansätze untersucht. Für den Test der zweiten Hypothese wurde das Medium kontinuierlich im Kreis gepumpt und dadurch die Gyroid-Bewuchsfläche permanent durchströmt und beimpft. Nach dem Durchwachsen des Gyroidkörpers wurde dieser gereinigt und das PLA-Template chemisch gelöst und entfernt. Der verbliebene Gyroid aus BC wurde in vollentsalztem Wasser rehydriert und mittels Gefriertrocknung getrocknet. Zur Überprüfung der Anisotropie im BC-Material wurden Schnitte von Gyroidkörpern untersucht. Für die Polfilter-Analyse wurden die Proben zuerst in Harz gegossen und anschließend mit einer Diamant-Draht-Säge zerteilt. Für die Strukturanalyse durch REM-Aufnahmen, wurden reine BC-Proben und PLA-Template mit BC zersägt und untersucht. Die Wasseraufnahmekapazität der BC wurde durch Quellversuche nach dem Entfernen des Opfertemplats aus PLA und Gefriertrocknung bestimmt.

## **2.3. Analytische Methoden**

### **2.3.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**

Messungen zur Identifizierung und Quantifizierung von Medienbestandteilen wurden zeitweise mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC; Shimadzu System Controller: CBM-20A, Pumpen A & B: LC-20AD, Autosampler: SIL-20AC, Ofen: CTO-20AC, RID-Detektor: RID-10A, Fraction Collector: FRC-10A Säule: Phenomenex, Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%), LC Column 300 x 7,8 mm, Art. 00H-0138-K0) durchgeführt. (Methode 1: 0,005 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, isokratisch, 0,5 mL/Min, 55 °C, 27 Min; Saccharose-Methode 2: 0,05 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, isokratisch, Injektionsvolumen 0,5 mL, 25°C, 27 Minuten).

### **2.3.2. Optische Mikroskopie**

Für die Analyse der Orientierungen innerhalb der Probeneben wurde ein optisches Mikroskop (OM, RMA5, Askania Mikroskop Technik, Rathenow, Deutschland) mit einem Semi-Apochromat-Objektiv 5x/0,15 (MPlan-FLN, Olympus, Tokio, Japan), einer Digitalkamera (EOS 550D, Canon, Tokio, Japan) und einer euzentrischen Rotations-Bühne mit Azimutdrehwinkeln um die Probe, aufgebaut. Es konnte so ein Bereich von 6,7 mm<sup>2</sup> auf Faserorientierungen durch die Analyse der Histogrammierung untersucht werden. Zudem wurden Lichtmikroskopische-Aufnahmen mit polarisiertem Licht und einer  $\Delta\lambda = 525$  nm Verzögerungsplatte aufgenommen, um die Doppelbrechungen der Cellulosekristalle im Material sichtbar zu machen. Nur bei einer Ausrichtung der Kristalle im Material können deutliche Farbwechsel der Interferenz-Farben violett/blau und orange/rot, bei Drehung der Proben unter den Polfiltern, sichtbar gemacht werden. Zur Ermittlung bevorzugter struktureller Orientierungen innerhalb der Streben der Gyroide, wurden die Proben in Harz eingebettet (LRWhite, London Resin, Reading, UK) und auf Dicken von 30  $\mu$ m entlang der Ebenen mit Normalen, senkrecht zu ihren Längsachsen (die frühere Richtung des Flusses), unter Verwendung einer Diamant-Draht-Säge (3032-4, Well, Le Cocle, Schweiz) geschnitten. Die Interferenz-Farben wurden auch hier durch die Polfilteranalyse mit Verzögerungsplatte sichtbar gemacht, fotografiert und ausgewertet.

### **2.3.3. Fourier-Transform-Infrarotspektrometrie**

Für die Analyse der Proben mittels Infrarotspektroskopie (IR) wurde ein Perkin Elmer Universal ATR Sampling Accessory FT-IR Spektrometer Frontier; mit einem Diamant/KRS-5 verwendet. (Wellenzahl: 4000-380 cm<sup>-1</sup>, Anzahl der Scans: 8, Auflösung: 2 cm<sup>-1</sup>, Ordinateneinheit %R bzw. %T). Die IR-Spektroskopie wurde zur Strukturaufklärung der BC genutzt.

### **2.3.4. Rasterelektronenmikroskopie**

Für die Strukturanalyse der Oberflächen und Schnitte der Proben wurden diese mit Gold oder Gold/Palladium gesputtert (SCD050, Bal-tec, Balzers, Lichtenstein) und mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) DSM 940A (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei einer Beschleunigung von 15-20 kV abgebildet und untersucht. Um die innere Topographie der BC-Gyroide sichtbar zu machen, wurden die Proben zuerst gesägt, gesputtert und dann analysiert.

### **2.3.5. Energiedispersive Röntgenspektroskopie**

Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) wurde zur Materialanalyse verwendet. Dafür wurde das Rasterelektronenmikroskop DSM 940A (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und ein EDX-Detektor (XFlash Detector 5010, Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet.

### **2.3.6. Röntgenbeugung**

Die Kristallphaseneigenschaften der getrockneten BC-Proben wurden mittels eines Bragg-Brentano-Pulver-Diffraktometer (XRD) MiniFlex 600 (Rigaku, Tokyo, Japan), mit einer Kupferanode und einem Siliziumstreifendetektor (D/teX Ultra, Rigaku) untersucht.

### **2.3.7. Gasadsorptionsporosimetrie**

Um Gassorptionsanalysen durchzuführen, wurden Gyroidproben in Silica repliziert. So konnte die hierarchische Struktur der komplex porösen Biomasse bis in den Nanometerbereich beibehalten werden. Die Stickstoffadsorptionskurven wurden mit einem Gasadsorptionsmessgerät (Surfer Nano, Thermo Fisher, Waltham, USA) aufgenommen. Aus den Ergebnissen wurden die spezifischen Oberflächen der Materialien und Größenverteilungshistogramme im Bereich  $1 \text{ nm} < d < 100 \text{ nm}$  bestimmt. Es wurde die B.E.T. Methode, nach Brunauer, Emmett und Teller, angewandt.

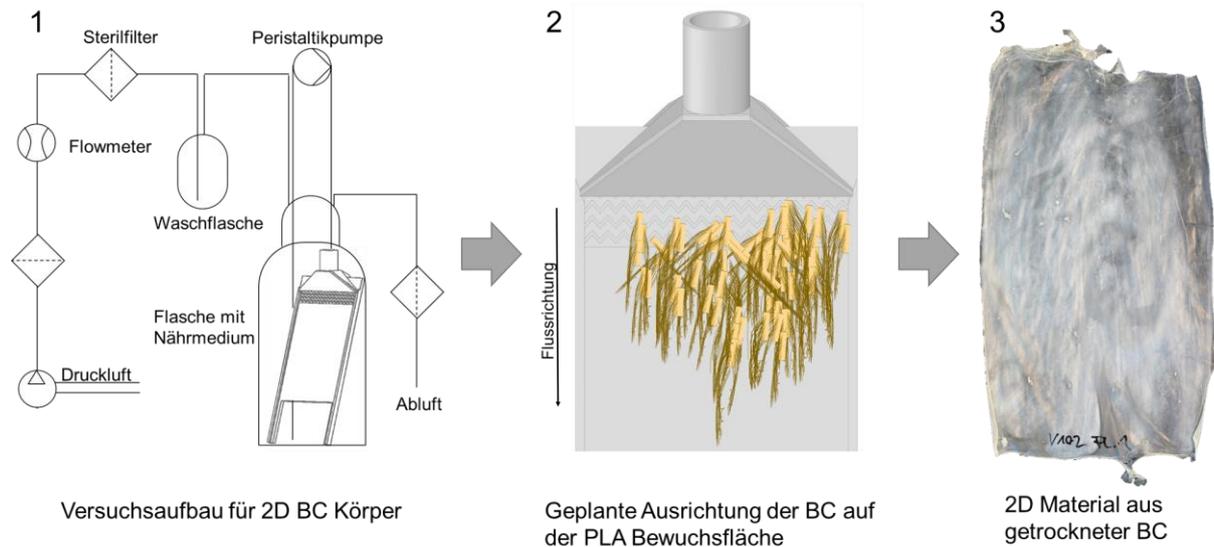
### **2.3.8. Mechanische Prüfung**

Die Zugversuche, der in rechteckige Streifen geschnittenen Proben, wurden mit einer Universalprüfmaschine (SmartTENS 20, Emmeram Karg Industrietechnik, Krailingen, Deutschland) durchgeführt. Für die Prüfung der rheotaktisch kultivierten BC-Kahmhäute wurden diese senkrecht und parallel zur ehemaligen Medienflussrichtung in 4 cm lange und 1 cm breite Prüfkörper geschnitten. Die Messungen wurden bei einer Dehnungsrate von  $5,5 \cdot 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$  durchgeführt. Aus den Daten der Zugversuche konnten die grundlegenden mechanischen Eigenschaften wie Zugfestigkeit, Elastizitätsmodul, Verformungen bei Bruch und Brucharbeiten ermittelt werden.

### 3. Zusammenfassung der publizierten Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse aus der Publikation über die strukturelle und mechanische Anisotropie in rheotaktisch ausgerichteter BC-Körpern (2D)

Durch die entwickelte Methode und den einfachen Versuchsaufbau konnten bereits nach fünf Tagen erste Biofilme aus Essigsäurebakterien, hier *K. sucrofermentans*, und BC rheotaktisch erzeugt werden, Abbildung 18. Die Stabilität der BC-Pellikel nahm mit längerer Kultivierung zu und hat in der vorgestellten Publikation nach 8 bis 10 Tagen als luftgetrocknetes Material geometrische Dichten im Bereich von  $0,45 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  bis  $0,57 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  erreicht. Dies entspricht einem Volumenanteil von 0,28 und 0,36 BC.

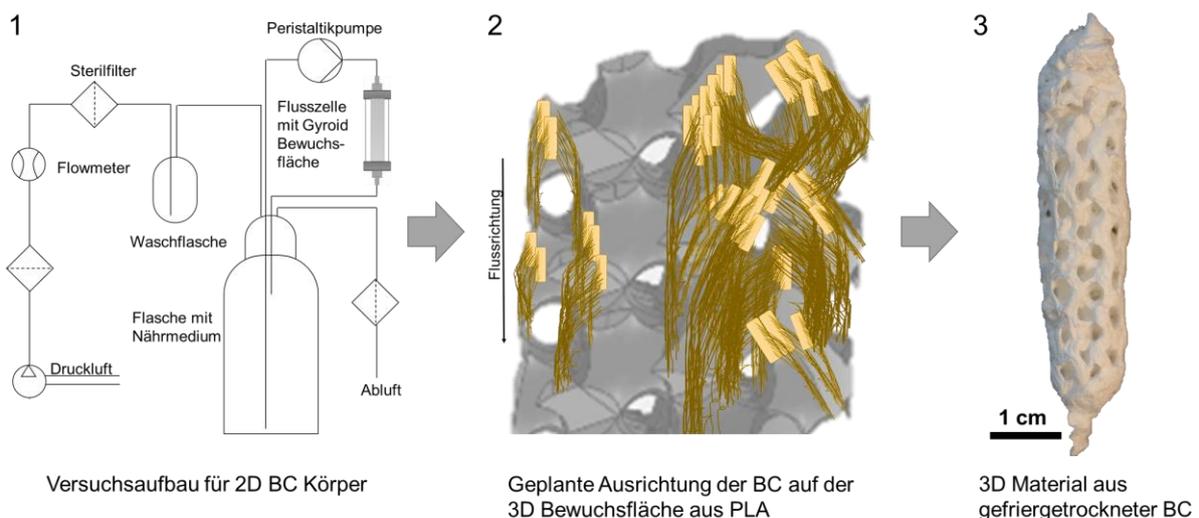


**Abbildung 18:** (1) Flussdiagramm der Methode zur Herstellung von 2D-BC-Körper; (2) skizzierte Darstellung der Besiedelung von *K. sucrofermentans* auf der PLA-Bewuchsfläche mit Düse; (3) luftgetrocknetes 2D-Material aus BC.

Es hat sich gezeigt, dass weder die Dichte der Endmaterialien noch ihre Erträge systematisch durch die Wahl der statischen oder rheotaktischen Kultivierung beeinflusst werden konnten. Einzig die Inkubationszeit der Vorkultur und die Versuchsdauer hatten einen sichtbaren Einfluss auf das Wachstum der Biofilme. Hier wurden Dichteunterschiede der ausgerichteten BC von 30 % und Ausbeuten von 250 % festgestellt. REM-Aufnahmen zeigten, dass alle gewachsenen Materialien aus Fasern aufgebaut waren und dass die rheotaktisch gewachsenen 2D-Materialien eine erkennbare Ausrichtung aufwiesen. Das durch die Strömungsrichtung ausgerichtete Wachstum führte zu strukturellen und mechanischen Anisotropien im BC-Material. Orientierungsanalysen unter dem Lichtmikroskop konnten sowohl mit polarisierter Lichterfassung, als auch durch die Histogrammierung von winkelligen Faserorientierungen Vorzugsorientierungen im Material kenntlich machen. Mehr als die Hälfte der Fibrillen im rheotaktisch gewachsenen Material hatten eine Orientierung von bis zu 77 %. Die Zugprüfung der Proben hat E-Module für stehend gewachsene BC von etwa 3 GPa und für die parallel zur Wachstumsrichtung ausgerichteten Proben (||) von bis zu 11 GPa ergeben. Die Zugfestigkeit der stehend gewachsenen Proben erreichte Werte um die 13 MPa, die der ausgerichteten Proben || maximal 112 MPa. Die plastische Verformung der rheotaktisch gewachsenen Kahmhäute || war doppelt so groß, als die der stehend gewachsenen BC-Pellikel. Die Brucharbeit erreichte bei den ausgerichteten Proben || Werte bis  $0,6 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-3}$ . Die Erhöhungen der Unordnung wurde begleitet von einer erhöhten durchschnittlichen Kristallitgröße [208].

### 3.2. Ergebnisse aus der Publikation zu den dreidimensional gemusterten, hierarchischen und anisotrop aufgebauten BC-Gyroid-Körpern (3D)

Für die Herstellung der monolithischen 3D-Körper aus BC wurde der entwickelte Versuchsaufbau für 2D-Materialien erfolgreich angepasst und um eine Flusszelle mit Einbau erweitert, Abbildung 19. Anstatt einer Überströmung einer geraden Fläche, wurde ein poröses Templat durchspült und die Mikroorganismen trotzdem mit genügend Sauerstoff versorgt, um Wachstum zu ermöglichen. Der Gyroid hat sich als geeignete Geometrie herausgestellt. Er trennt den Raum in zwei gegensätzlich deckungsgleiche Labyrinth von Gängen, die den ganzen Körper wie eine Helix durchziehen. Hierdurch konnte ein exaktes Abbild der ursprünglichen Vorlage ermöglicht werden und die angelegte laminare Strömung den ganzen Körper gleichmäßig durchfluten.



**Abbildung 19:** (1) Flussdiagramm der Methode zur Herstellung von 3D-BC-Körper; (2) skizzierte Darstellung der Besiedelung von *K. sucrofermentans* auf dem PLA Gyroid; (3) Gyroid aus gefriergetrockneter BC.

Durch die entwickelte Methode zum Wachstum von Monolithen aus BC, konnten nach Auflösung der 3D-PLA-Bewuchsflächen Monolithe aus BC gewonnen werden, welche das Negativ der ursprünglichen Form sehr gut wiedergeben, Abbildung 19, Bild 3. Durch die Gefriertrocknung der Proben konnte eine Schrumpfung von 10 % in der Länge und 20 % im Durchmesser beobachtet werden. Die endgültige geometrische Dichte der Gyroidstreben wurde auf  $50 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  festgelegt.

Durch die Polarisations-Fotographie konnte die geplante Ausrichtung der Cellulosefibrillen im Inneren des Gyroids sichtbar gemacht werden. REM-Aufnahmen zeigten eine hierarchisch poröse Struktur bis in den Mikrometerbereich. Mittels Gasadsorptionsmessung einer Silica-Nachbildungen des BC-Gyroids konnte eine durchschnittliche spezifische Oberfläche von  $270 \pm 11 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  festgestellt werden. Das Porengrößenverteilungshistogramm zeigte eine breite Verteilung der Porengrößen im Submikrometerbereich mit einem bemerkenswerten Maximum bei 2 nm, was dem Durchmesser der BC-Fibrillen in der Probe entspricht [212].

## 4. Weitere Ergebnisse und Gesamtdiskussion

Die folgenden Kapitel beschäftigt sich mit fokussierten Diskussionspunkten, die sowohl die Vorarbeiten, die Problemstellungen und Zielsetzungen, als auch die beiden Publikationen betreffen.

### 4.1. Begriffsdefinition

Für die bessere Einordnung der Methode werden die Begriffe biomediierte Materialsynthese und die Rheotaxis definiert und diskutiert.

#### 4.1.1. Biomediierte Materialsynthese

Das Ziel der durchgeführten Arbeiten war es, durch eine biomediierte Materialsynthese rheotaktisch strukturierte und hierarchisch organisierte Materialien aus BC zu erzeugen. Biomediiert wird in dieser Arbeit als „durch die Biologie vermittelte Funktionalität verstanden“. Die biomediierte Materialsynthese ist in diesem Falle, eine von natürlichen Lebenskräften geformte, durch biologische Vorgänge geprägte Materialsynthese, welche der Begriffserklärung der Biomorphie sehr nahe kommt [213].

#### 4.1.2. Verwendung der Rheotaxis zur Ausrichtung der BC

Wie einleitend in Kapitel 1.13 erläutert, ist Rheotaxis die zielgerichtete Orientierungs- und Bewegungsreaktion von Lebewesen, die von einem Reiz oder Umweltfaktor ausgelöst wird. Die positive Rheotaxis, Bewegung der Mikroorganismen zur Strömungsquelle, scheidet für die Erzeugung von Biofilmen aus. Selbst motile Mikroorganismen mit hohen Teilungsraten, wie bei *Escherichia coli* von 20 Minuten [214], und einem darauf folgenden exponentiellen Wachstum, können nicht frei schwimmend einen Biofilm aus EPS und Mikroorganismen bilden. Ebenso unrealistisch für die Materialsynthese ist die negative Rheotaxis einiger Organismen, bei der sie sich von entgegenkommenden Strömungen abwenden und diese vermeiden [215]. Der für die Versuche verwendete Mikroorganismus *K. sucrofermentans* ist unbegeißelt [216] und dadurch nicht motil. Er kann sich aber durch die BC-Synthese schraubenförmig fortbewegen [180, 217]. Dabei werden die BC-Fibrillen miteinander verdrillt und aus den einzelnen Nanofibrillen Nanobänder gesponnen. Da der Mikroorganismus permanent mit seinen BC-Fibrillen verbunden bleibt, kann er durch diese auch auf einem Biofilm verankert werden. Befindet sich ein fixierter *K. sucrofermentans* in einem fließenden Medium, so bewegt er sich schraubenförmig von der Strömung weg. Man könnte also von einer passiven, negativen Rheotaxis sprechen. Die wesentliche Ausrichtung des Mikroorganismus und der BC-Fibrillen wird aber nicht vom Mikroorganismus selbst bestimmt, sondern von der anliegenden Strömung. Rheotaxis bezieht sich in dieser Arbeit weniger auf die Fähigkeit der Mikroorganismen gegen oder mit einer Strömung zu schwimmen, sondern viel mehr auf den Einfluss der Strömung auf die produzierten EPS. Rusconi et al. konnten anschaulich zeigen, dass sich fadenförmige Streamer aus EPS und Mikroorganismen in gewinkelten Kanälen bilden und mit der Strömung ausrichten [218, 219]. Diese Arbeiten weisen darauf hin, dass die Beschaffenheit der Bewuchsfläche für die Entstehung von ausgerichteten Materialien aus EPS entscheidend ist. Dies wurde in den Kapitel 4.7.1 und 4.7.2 durch eigenen Versuche selbst untersucht und die dabei gewonnen Erkenntnisse bei der Entwicklung der Bewuchsflächen genutzt.

## 4.2. Biopolymere und EPS

Die Wahl des passenden Biopolymers, seine Synthese und Lokalisierung im Biofilm, ist für die spätere Beständigkeit und den hierarchischen Aufbau des erzeugten Materials von wesentlicher Bedeutung. Mikroorganismen synthetisieren ein breites Spektrum multifunktionaler Polysaccharide. Sie liegen je nach Spezies, ihrer Position und ihrer Rolle im Metabolismus intrazellulär oder extrazellulär vor [76]. Interessante und geläufige Beispiele für extrazelluläre, amorphe Polysaccharide sind Xanthan und Dextran. Sie kommen als loser, nicht an der Zelle haftender Schleim vor und verleihen den Bakterien eine klebrige Konsistenz, ein festes Medium oder eine erhöhte Viskosität in flüssigen Medien [76]. Das Homopolysaccharid Dextran wird von dem Milchsäurebakterium *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* durch eine sekretierte Hexosyltransferase, die Dextrantransferase (EC 2.4.1.5), gebildet. Diesem Enzym dient Saccharose als Substrat. Es überträgt den Glukoserest auf die wachsende Polysaccharidkette und kann dadurch unabhängig von den Mikroorganismen Molekulargewichte von mehreren Millionen Dalton aufbauen [210]. Dies bedeutet eine rasche und hohe Ausbeute an EPS, was für die Materialherstellung wichtig ist. Das Heteropolysaccharid Xanthan wird in der Zelle synthetisiert und direkt durch das Pflanzenpathogen *Xanthomonas campestris* in die Umgebung sekretiert. Diese EPS-Produktion ist direkt mit dem Mikroorganismus gekoppelt, kann aber auch zu hohen Ausbeuten des strukturell interessanten Polysaccharids führen. Alginat, produziert von *Acetobacter vinelandii*, liegt als kapselförmigen EPS und kovalent gebunden an der Zelloberfläche vor [220]. Es schützt die Zellen und gibt dem Biofilm durch die Alginatekapseln eine einzigartige Struktur [35].

Die Recherche nach EPS bei Eukaryoten und Prokaryoten wurde in Tabelle 6 (Anhang) zusammengefasst. Neben den zahlreich vorkommenden wasserlöslichen EPS, sind nur Curdlan und Mutan schwer in Wasser löslich. Eine Besonderheit in der Welt der Mikroorganismen sind die Essigsäurebakterien. Sie synthetisieren die wasserbeständige und wasserunlösliche BC. Die BC-Pellikel schützen die Mikroorganismen vor äußeren Einflüssen, wie UV-Licht und stellen deren Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen und Feuchtigkeit sicher. Neben diesen besonderen Eigenschaften gibt es einen weiteren, entscheidenden Vorteil dieser Mikroorganismen. Die produzierten BC-Fibrillen bleiben dauerhaft mit den Mikroorganismen verbunden. Für die rheotaktische Ausrichtung dieser Polysaccharide ist dies von großem Nutzen, da wie in Abbildung 14 gezeigt, sich die Cellulosestränge theoretisch wie Wollfäden in strömenden Flüssigkeiten verhalten sollten. Zudem erleichtern wasserbeständige Materialien die Methodenentwicklung in wässrigen Medien, da die Biofilme nicht so leicht durch die Strömung weggespült oder aufgelöst werden können. Wasserlösliche EPS müssten beispielsweise durch Quervernetzung [221] nachbehandelt werden, um schließlich einer Materialprüfung Stand halten zu können. Für die Methodenentwicklung wurde deshalb die BC als EPS ausgewählt und der passende Mikroorganismus *K. sucrofermentans* für die BC-Synthese mittels Literaturrecherche und Vorversuchen ausgewählt (Kapitel 1.5.).

### 4.3. Einflussfaktoren auf das Wachstum der *Komagataeibacter*

Das Wachstum der *Komagataeibacter* kann unter anderem durch Kultivierungsbedingungen, unterschiedliche Medienzusammensetzungen, Kohlenstoffquellen, pH-Puffersysteme, Zuschlagstoffe, Antibiotika und den Sauerstoffeintrag beeinflusst werden. Diese Stellschrauben für die spätere BC-Genese werden in den folgenden Unterpunkten diskutiert.

#### 4.3.1. Kohlenstoffquellen

Die Auswahl der Kohlenstoffsubstrate ist eine der Hauptvoraussetzungen für eine effiziente BC-Produktion [222]. Daher wurde im Vorfeld die Nutzungseffizienz verschiedener Kohlenstoffquellen und die damit verbundene biochemische Umwandlung, Stoffwechselwege und Nebenprodukte von *K. xylinus*, und *K. sucrofermentans* recherchiert und bei einem Screening erprobt. Tabelle 2 zeigt eine Sammlung an Charakteristika der beiden Mikroorganismen und stellt sie denen eigener Ergebnisse gegenüber.

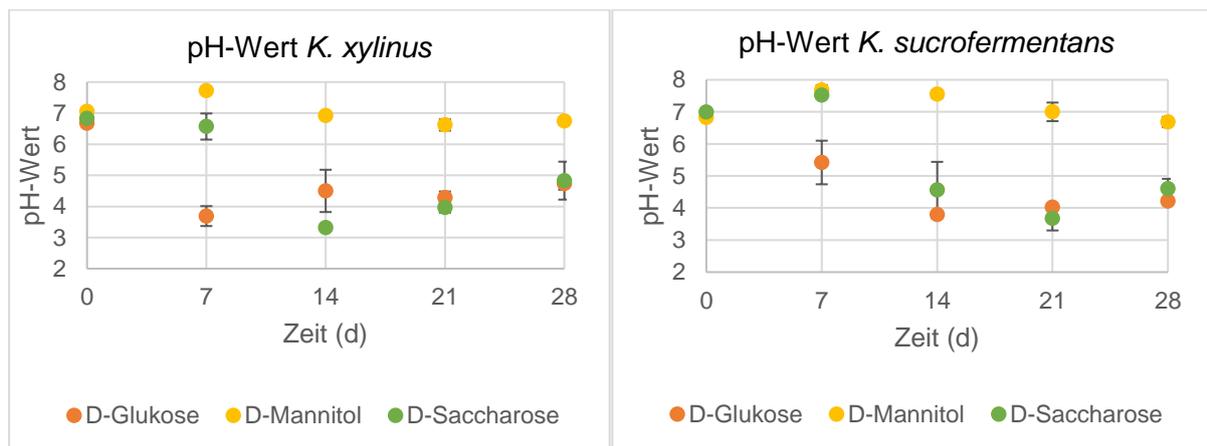
**Tabelle 2:** Zusammenfassung von Kohlenstoffquellen und Stoffwechselprodukten der *Komagataeibacter*, *K. xylinus*, *K. sucrofermentans* aus eigenen Versuchen und verschiedenen Quellen [55, 56, 216, 223].

Charakteristika	<i>Komagataeibacter</i>	<i>K. xylinus</i>		<i>K. sucrofermentans</i>	
	- allgemein - [223]	[55, 56, 216]	*	[55, 56, 216]	*
BC-Produktion	v	+	+	+	+
Produktion von AcOH	+	+	+	+	+
Oxidation von					
Acetat zu CO <sub>2</sub> und H <sub>2</sub> O	+	+	?	+	?
Lactat zu CO <sub>2</sub> und H <sub>2</sub> O	+	+	?	+	?
D-Fruktose	ng	-	?	-	?
D-Glukose	ng	+	+	+	+
Glycerin	ng	-	?	+	?
Meso-Erythritol	ng	v	?	+	?
D-Mannitol	ng	-	?	+	?
Lactose	ng	-	?	+	?
Saccharose	ng	-	?	-	?
Wachstum auf					
AcOH	+	+	+	+	+
EtOH	ng	-	V	+	V
D-Xylose	ng	+	?	V	?
D-Galactose	ng	+	?	V	?
D-Glukose	ng	+	+	+	+
Glycerin	ng	-	-	+	-
Meso-Erythritol	ng	+	?	+	?
Dulcitol	ng	-	?	V	?
Lactose	ng	-	?	-	?
Maltose	ng	-	?	-	+
Saccharose	ng	-	+	+	+
Trehalose	ng	v	?	V	?
Mannitol	ng	ng	+	ng	+
Produktion von					
2,5-diketo-D-Gluconsäure	v	-	?	-	?
5-Keto-D-Gluconsäure	v	+	?	-	?
2-Keto-D-Gluconsäure	v	+	+	+	+
Produktion von DHA aus Glycerin	v	+	?	+	?

Braunes Pigment	v	-	?	-	?
Produktion von $\gamma$ -Pyron aus					
D-Glukose	v	-	?	-	?
D-Fruktose	-	-	?	-	?
Essigproduktion aus					
L-Arabinose	v	ng	?	ng	?
D-Arabinose	-	ng	?	ng	?
D-Xylose	v	+	?	+	?
L-Rhamnose	-	ng	?	ng	?
D-Glukose	+	+	+	+	+
D-Galaktose	+	-	?	+	?
D-Mannose	v	ng	?	ng	?
D-Fruktose	+	ng	?	ng	?
L-Sorbose	v	ng	?	ng	?
Melibiose	-	ng	?	ng	?
Saccharose	-	-	?	+	?
Lactose	ng	-	?	-	?
Maltose	ng	-	?	-	?
Raffinose	-	ng	?	ng	?
Trehalose	ng	-	?	+	?
D-Mannitol	v	ng	?	ng	?
D-Sorbitol	-	ng	?	ng	?
Dulcitol	-	-	?	-	?
Meso-Erythritol	ng	-	?	+	?
Glycerin	+	v	?	+	?
EtOH	+	+	?	+	?

+ = positiv; - = negativ, v = variabel, \*= eigene Ergebnisse, ng = nicht genannt/nicht gefunden, ? = bisher keine Analyse dazu durchgeführt;  
AcOH = Essigsäure, EtOH = Ethanol, DHA = Dihydroxyaceton

Die eigenen Ergebnisse hängen im Wesentlichen von der Dosierung der Kohlenstoffquelle, der Kultivierungsmethode und dem verwendeten Medium ab. Abbildung 20 zeigt den Vergleich der verschiedenen Kohlenstoffquellen: D-Glukose, D-Mannitol und D-Saccharose in Bezug auf die pH-Wert-Änderung im GHC-Medium.



**Abbildung 20:** Fermentationsverlauf von *K. xylinus* und *K. sucrofermentans* in GHC-Medium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Mit freundlicher Genehmigung von P. Wolf; aus ihrer Masterarbeit übernommen [224].

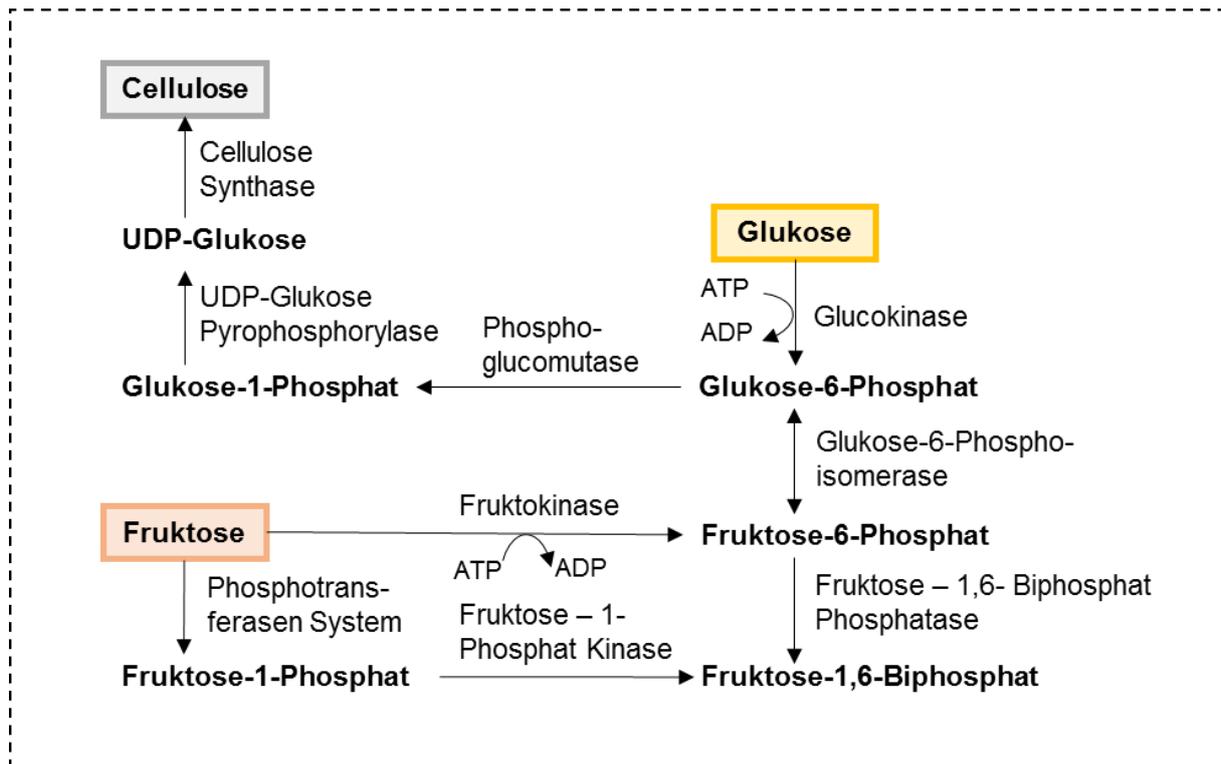
Es ist deutlich erkennbar, dass sowohl *K. xylinus*, also auch *K. sucrofermentans* mit Mannitol zwischen pH 6,6 und 7,7 bleiben, während die Kohlenstoffquellen Glukose und Saccharose pH-Werte unter pH 3 erreichen. Die Fermentation mit D-Arabitol und D-Mannitol steigert laut

Jonas et al. die Celluloseausbeute im Vergleich zur Glukose. Dies liegt vermutlich daran, dass bei der Fermentation mit diesen beiden Zuckeralkoholen keine Gluconsäure gebildet wird und der pH-Wert stabil bleibt [40]. Da manche Autoren das pH-Optimum erst bei pH 5 erreicht haben, scheint dieser Parameter möglicherweise substratspezifisch zu sein (Kapitel 4.3.3.).

Die starke pH-Schwankung mit dem Substrat Glukose ist dadurch zu erklären, dass diese zunächst zu Gluconolacton und anschließend zu Gluconat umgewandelt wird. Beide Intermediate können als zusätzliche Kohlenstoffquelle dienen. Während zu Beginn der Fermentation eine Akkumulation der Gluconsäure beobachtet werden kann, nimmt die Konzentration ab und wird schließlich auch zu Cellulose verstoffwechselt. Somit scheint die Gluconsäure kein Inhibitor für die Celluloseproduktion zu sein [225, 226], senkt aber zwischenzeitlich deutlich den pH-Wert des Mediums.

Laut Ross et al. sind Glukose, Fruktose und Mannitol am besten für die BC-Produktion geeignet. In manchen Fällen bevorzugen jedoch die BC-produzierenden Bakterien Saccharose, Lactose oder eine Mischung aus Xylose und Xylulose, während andere Kohlenstoffquellen im Vergleich nur einen begrenzten Nutzen für die BC-Produktion haben [227, 228]. Ein möglicher Grund ist, dass Strukturisomere von Glukose wie z. B. Fruktose und die Vorläufer von Glukose wie z. B. Glycerol und Mannitol leicht in Glukose umzuwandeln sind. Sie können in die Zyklen der Glukosephosphorylierung, Glukose-6-Phosphat-Isomerisierung, UDP-Glukose-Synthese und in die Verlängerung zur Bildung von BC eintreten [77]. Die Kohlenstoffquellen Glukose, Fruktose und Mannitol haben in eigenen Versuchen gute Ausbeuten an BC geliefert, während die Fermentation mit Glycerol nicht erfolgreich war.

Wird *K. sucrofermentans* mit Fructose als primäre Kohlenstoffquelle inkubiert, ergibt sich laut Vandamme et al. der folgende Stoffwechselweg, Abbildung 21. Fructose wird von den Bakterien aufgenommen und dann entweder über die Fructokinase unter Verbrauch eines Moleküls ATP direkt zu Fructose-6-Phosphat umgesetzt oder über die Phosphotransferase zu Fructose-1-Phosphat umgewandelt. Von diesem Zwischenprodukt aus wird mit Hilfe des Enzyms Fructose-1-Phosphat-Kinase das Molekül Fructose-1,6-Bisphosphat gebildet. Diese Verbindung kann auch als Input in diesen Metabolismus dienen, da es in der Gluconeogenese als Zwischenprodukt gebildet wird. Anschließend wird über die Fructose-1,6-Bisphosphat-Phosphatase wiederum das Molekül Fructose-6-Phosphat gebildet. Auch hier kann ein anderer Stoffwechselweg, nämlich der PP als weitere Inputmöglichkeit dienen [229]. Bei Fructose-6-Phosphat angekommen, werden die beiden Metabolismen mit Fructose bzw. Glukose als Ausgangssubstrat über die Glukose-6-Phosphat-Isomerase miteinander verbunden. Die Aktivität dieses Enzyms ist besonders bei *K. sucrofermentans* und unter Anwesenheit von Fructose hoch. Wird hingegen Glukose als Kohlenstoffquelle verwendet, arbeitet die Glukose-6-Phosphat-Isomerase nur im geringen Maß [228]. Nach der Produktion des Intermediats Glukose-6-Phosphat decken sich die Reaktionen der Stoffwechselwege von *K. xylinus* und *K. sucrofermentans*. Es wird das Molekül Glukose-1-Phosphat gebildet, welches anschließend über die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase zu UDP-Glukose verstoffwechselt wird (Kapitel 1.8). Wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, ist dieser Schritt essenziell für die Produktion von BC, da es hier durch Mutationen schnell zu Aktivitätsverlust kommen kann. Für *K. sucrofermentans* konnte eine 100-mal höhere Aktivität im Vergleich zu anderen BC-produzierenden Essigsäurebakterien festgestellt werden, weshalb der Stamm vermutlich auch als „besonders stabil in bewegten Medien“ gilt. Dies unterstützt wiederum die Hypothese, dass es sich hierbei um den wichtigsten Schritt des Stoffwechselweges handelt [228].



**Abbildung 21:** Vereinfachter Stoffwechselweg von der Fruktose zur BC. Ausschnitt aus Abbildung 5.

Masaoka et al. konnten Citrat als mögliche Kohlenstoffquelle etablieren. Allerdings konnte hier lediglich eine Celluloseausbeute von 20 % im Vergleich zur Nutzung von Glukose erzielt werden [225]. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass es bei Anwesenheit von Glukose und Citrat zur Diauxie kommt. Glukose wird bevorzugt und zuerst verstoffwechselt. Erst in einer zweiten Wachstumsphase wird Citrat verwendet [230]. Das oftmals in der Literatur verwendete HS-Medium beinhaltet ebenfalls Zitronensäure, als Bestandteil der Medienzusammensetzung. Da Citrate die Ester, Salze und das Anion der Zitronensäure sind, ist es denkbar, dass sie zusammen mit den Mineralien des Komplexmediums als Puffer wirken können.

Im Gegensatz zu Zuckern oder ihren Derivaten werden Ethanol und Acetat eher selten als Substrate für die BC-Produktion verwendet [67]. Sie werden den Medien für eine Verbesserung der Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion zugesetzt (siehe auch Kapitel 4.5.1 Genetische Instabilität von *K. xylinus*), die für die Energiebereitstellung im CZ und dem Zuckerstoffwechsel verantwortlich ist. Dies wird durch die Verbesserung der Aktivität von Glucokinase und Fructokinase für die BC-Synthese und einer gleichzeitigen Hemmung der Gluconokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase im PP zur Energieerzeugung erreicht. Ethanol wird laut Yunoki et al. von den meisten *Komagataeibacter* zuerst in Essigsäure umgewandelt [231]. Dennoch konnten Naritomi et al. bei einer Konzentration von  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  von Ethanol Zellwachstum und eine gesteigerte Cellulose-Ausbeute von *K. sucrofermentans* feststellen [149]. Demnach würde die Gabe von Essigsäure vermutlich auch das BC-Wachstum fördern. Eigene Versuche mit Ethanol und Essigsäure als Kohlenstoffquelle konnten keine gesteigerte BC-Produktion feststellen.

### 4.3.2. Temperatur und Stickstoffquellen

Die Temperatur ist ein entscheidender Parameter, der generell das Wachstum aller Mikroorganismen beeinflusst. In der Literatur finden sich Empfehlungen für die optimale Wachstumstemperatur von 25-30 °C [65, 216, 232-236]. Um den Versuchsaufbau einfach zu halten, wurden die meisten Kulturen und Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt, die deutlich unter dem empfohlenen Temperaturbereich liegt. Die Bildung von Kahmhäuten konnte sowohl in den stehend kultivierten Kontrollen, als auch in den Mini-Fermentern beobachtet werden. Es ist nicht auszuschließen, dass eine gezielte Temperierung des Versuchsaufbaus bessere Ausbeuten erzielt hätte. Dies war jedoch zur reinen Methodenentwicklung nicht notwendig.

Die Überprüfung der Stickstoffquelle wurde für die Versuche nicht unternommen. Aus den Ausführungen von Rani und Appaiah ist zu entnehmen, dass sich unter Verwendung des HS-Mediums Pepton als die wirksamste Stickstoffquelle darstellte [237]. Für die Versuche der Veröffentlichungen wurde das HS-Medium mit Pepton hergestellt.

### 4.3.3. pH-Wert

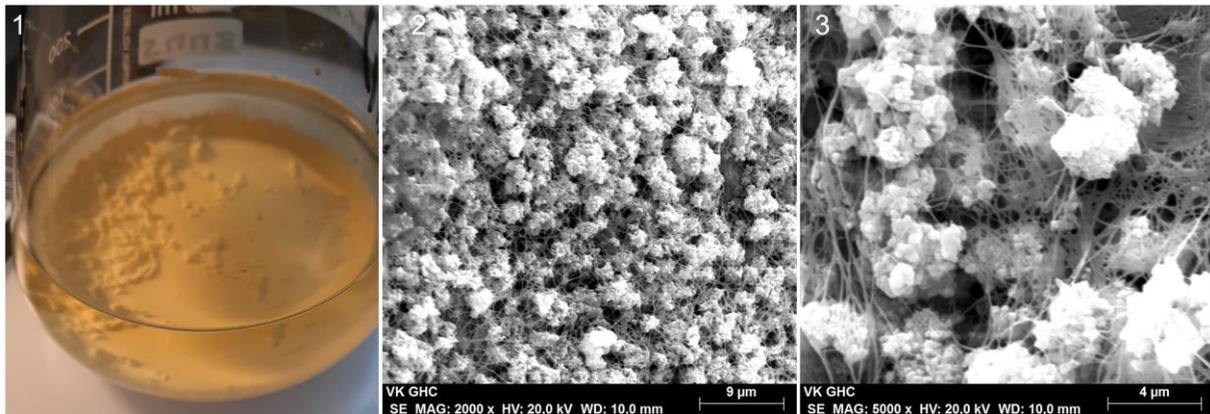
Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass *Komagataeibacter* Stämme maximale BC-Erträge bei pH-Werten zwischen 3,5 und 7 erzielen [232, 238, 239]. Hwang et al. untersuchten die Wirkung des pH-Werts auf das Wachstum der Mikroorganismen und die Celluloseproduktion und fanden heraus, dass eine Erhöhung des pH-Werts von 4 auf 5,5 zu einer erhöhten BC-Produktion führt [240]. Masaoka et al. stellten fest, dass die Ausbeute an Cellulose unter dem pH 4 abnimmt [225]. Ishikawa et al. und Tahara et al. legten ihr Optimum auf pH 5 fest [241, 242]. Während der Diskussion über die Kohlenstoffquellen wurde festgestellt, dass die Art der Kohlenstoffquelle und des Mediums auf den späteren pH-Verlauf Einfluss nehmen. Zudem scheint es auch stammspezifische Unterschiede zu geben [61]. Die Optimierung der BC-Produktion, allein durch die stabile Einstellung des pH-Wertes, wäre wünschenswert und verfahrenstechnisch eigentlich leicht zu lösen. Fermentationsversuche mit automatischer pH-Wertregelung haben jedoch gezeigt, dass die Mikroorganismen die pH-Sensoren bewachsen und das Medium durch die Stoffwechselprodukte immer viskoser wird. Um diese Probleme zu umgehen und den pH-Wert konstant zu halten, haben verschiedene Autoren die Pufferkapazität von Corn Steep Liquor und andere Puffersysteme geprüft [243, 244]. Steinbüchel et al. und die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) empfehlen für die *Komagataeibacter* ein Komplexmedium mit Kalziumkarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) als Puffer [210]. Im Rahmen einer Masterarbeit wurden umfangreiche Versuche mit diesem GHC-Medium/M105 und den beiden Stämmen *K. xylinus* und *K. sucrofermentans* durchgeführt. Die Probleme und Erkenntnisse werden eingehend im nächsten Kapitel diskutiert. Der Einfluss auf den pH-Wert scheint laut Bielecki et al. aber nicht nur Auswirkungen auf die BC-Produktion zu haben. Es wird vermutet, dass die Wasserbindungskapazität, also die adsorptiven Eigenschaften der BC ebenso vom pH-Wert abhängen [75]. Eigene Ergebnisse zeigen Unterschiede in der Wasserbindungskapazität bei unterschiedlichen Medienkompositionen.

### 4.3.4. Medien

Der Einfluss der Medienzusammensetzungen auf die Ausbeute, die Qualität der BC und das Wachstum der Mikroorganismen wurde bereits häufiger angesprochen. In diesem Unterpunkt wird nun genauer auf die Auswirkungen der Medien auf die BC-Materialsynthese und die Qualität der BC-Pellikel eingegangen.

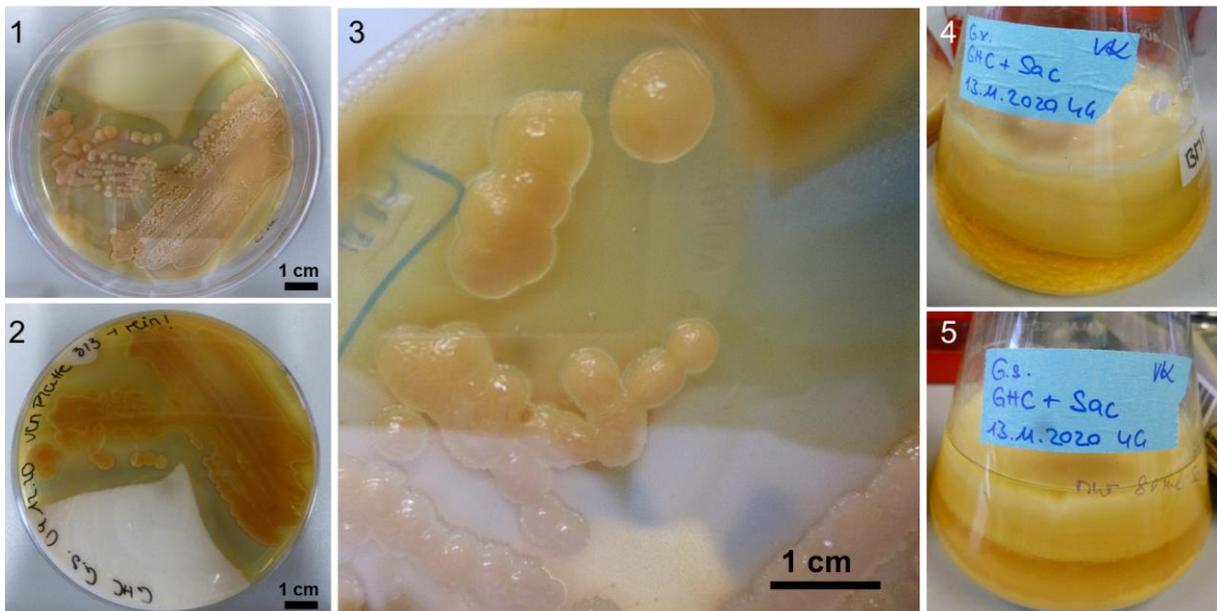
## GHC-Medium

Das GHC-Medium besteht laut Steinbüchel et al. aus Hefeextrakt und  $\text{CaCO}_3$ , sowie einer Kohlenstoffquelle [210]. Nach der Mediumherstellung sinkt das  $\text{CaCO}_3$  auf den Boden des Kulturgefäßes und verbleibt dort so lange, bis es durch die entstehenden Säuren zu Calciumacetat, Kohlenstoffdioxid und Wasser umgesetzt wird. Oftmals ist dies erst nach mehreren Wochen der Fall. Das  $\text{CaCO}_3$  lagert sich bereits zu Beginn der Fermentation zwischen den Celluloseschichten ab und bildet so einen Verbundwerkstoff, Abbildung 22. Die REM-Aufnahmen zeigen, dass das  $\text{CaCO}_3$  die BC-Netzwerkstruktur dadurch teilweise zerstört und somit die Qualität der BC-Materialien schmälert.



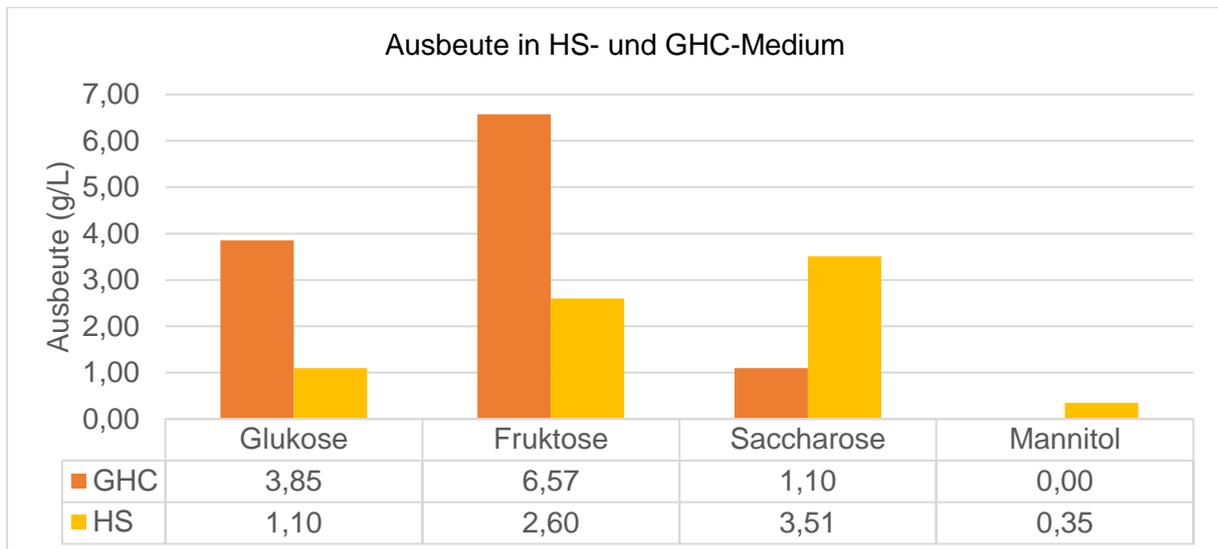
**Abbildung 22:** (1) Bildung der ersten Kahmhaut am Boden des Kulturgefäßes; (2) und (3) REM-Aufnahme des Pellicels mit  $\text{CaCO}_3$ -Resten.

Abbildung 23 zeigt GHC-Agar-Platten und Flüssigkulturen mit *K. xylinus* und *K. sucrofermentans* in einem sehr guten Wachstumszustand. Mit zunehmender Säureproduktion durch die Mikroorganismen, wird der weiße Agar klar. In den Flüssigkulturen, Bild 4 und 5, ist trotz der dicken Pellicel noch eine  $\text{CaCO}_3$ -Schicht am Boden der Gefäße zu sehen.



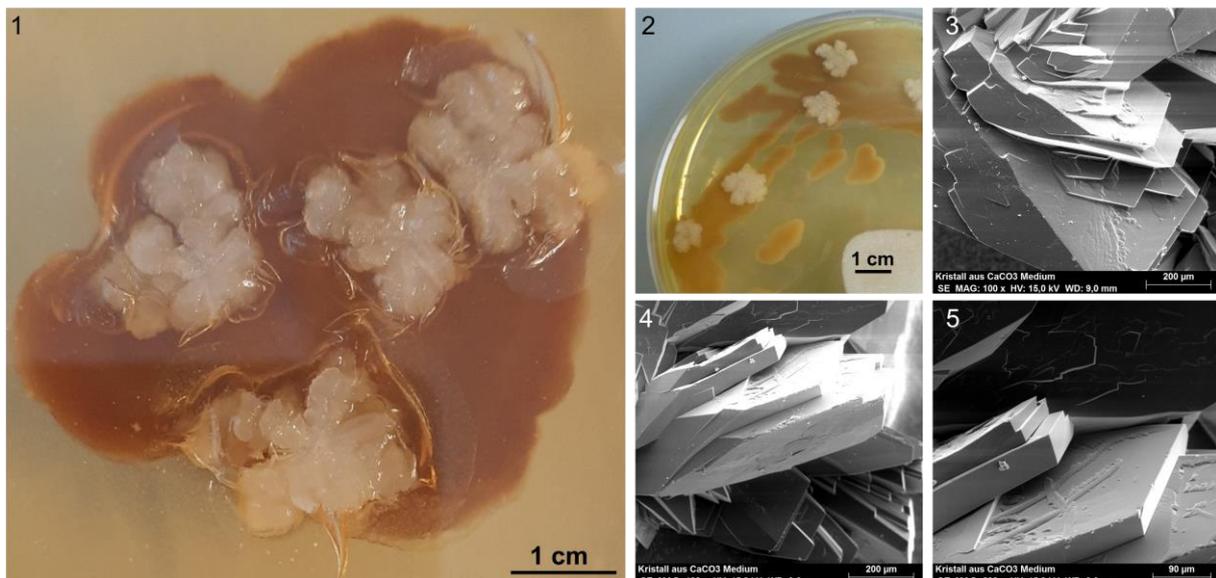
**Abbildung 23:** Agar-Kulturen und Flüssigkulturen mit *K. xylinus* und *K. sucrofermentans* mit dem GHC-Medium: (1) GHC-Platte Draufsicht; (2) GHC-Platte von unten; (3) Vergrößerung der Kolonien; (4) GHC-Flüssigmedium mit *K. xylinus* und (5) mit *K. sucrofermentans*.

Die  $\text{CaCO}_3$  Ablagerung lässt sich von den Pelliceln nicht entfernen und liefert damit ungenaue Ausbeuten. Die Kultivierung mit GHC-Medium erzeugt hohe Ausbeuten an BC, es kann jedoch nicht festgestellt werden, wie viele Gewichtsprozent davon noch aus  $\text{CaCO}_3$  bestehen. Selbst eine Säurebehandlung ermöglicht es nicht, das Mineral zwischen den Celluloseschichten vollständig zu lösen, ohne die BC langfristig zu verändern. Abbildung 24 zeigt den Unterschied zwischen der Ausbeute an BC im GHC- und HS-Medium.



**Abbildung 24:** Produktivität mit GHC- und HS-Medium und *K. sucrofermentans*. Problem  $\text{CaCO}_3$  kann nicht von der BC abgenommen werden. Deshalb sind die HS-Werte verlässlicher.

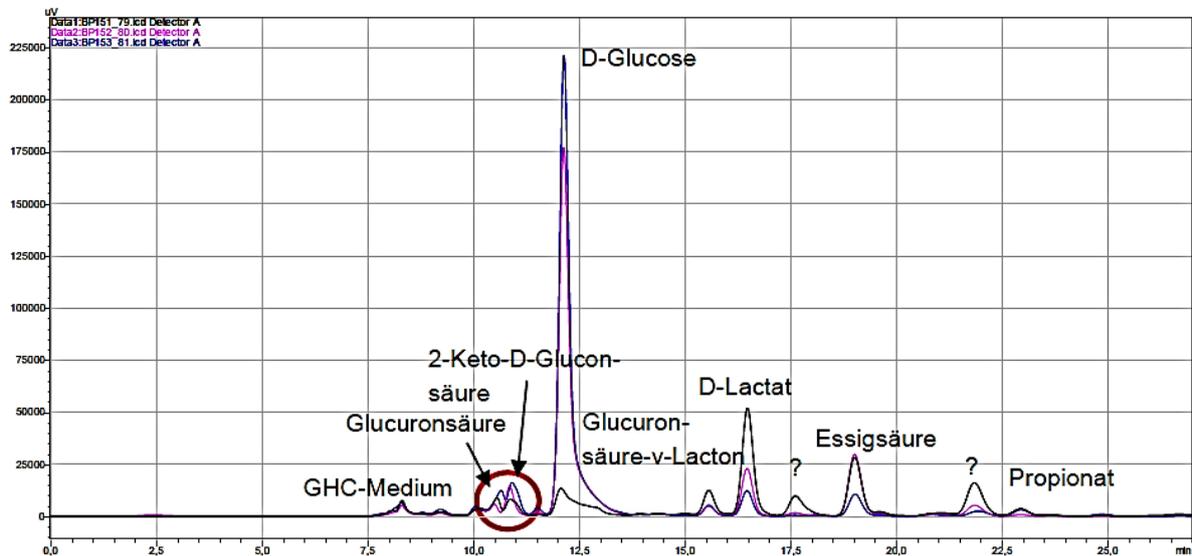
Nach Verbrauch des  $\text{CaCO}_3$  können noch andere Kristalle im Flüssigmedium oder auf der Platte entstehen. Vermutlich fällt durch die Pufferung der Säuren ein Kalziumoxalat aus dem Medium aus und bildet die in Abbildung 25 gezeigten Kristallblumen.



**Abbildung 25:** Wachstum von *K. xylinus* und *K. sucrofermentans* auf  $\text{CaCO}_3$ -haltigen Medien. (1) und (2) Agar-Platten mit etwas älteren Kulturen. Es haben sich Kristalle gebildet. (3) bis (5) zeigen REM-Aufnahmen dieser Kristalle.

Die genaue Zusammensetzung der Mineralien konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Eine Elementaranalyse (Abbildung 52, Anhang) zeigt, dass gut 60 % aus Kalzium besteht. Die Kristalle sind nicht mehr in Wasser und Ethanol löslich und lassen sich nur schwer aus der

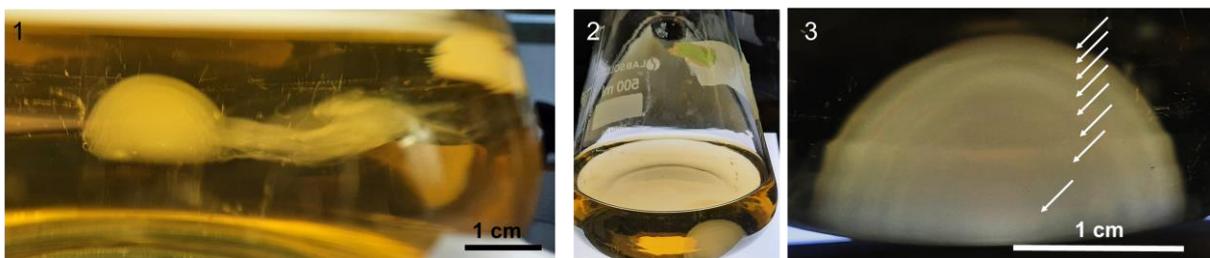
BC-Matrix entfernen. Während der Bildung der Kristalle wird wiederholt die BC-Struktur im Pellikel zerstört. Dies ist für die Bildung von homogenen Materialien ein Ausschlusskriterium und in dieser Arbeit nicht gewünscht. In der Auswertung des HPLC-Chromatogramms, Abbildung 26, konnten nach elf Tagen Inkubationszeit noch verschiedene Säuren nachgewiesen werden. Es ist unklar, mit welchen Bestandteilen des Kulturmediums die Säuren reagieren. Das GHC-Medium wurde aufgrund dieser Nebeneffekte nicht weiter für die rheotaktische Materialgenese verwendet. Es wurde auf das HS-Medium zurückgegriffen.



**Abbildung 26:** Überlappende HPLC-Chromatogramme der rheotaktischen Fermentation im zeitlichen Verlauf, vom Start der Fermentation bis zum Versuchsende nach elf Tagen; GHC-Medium mit D-Glukose als Substrat. Mit freundlicher Genehmigung von P. Wolf; aus ihrer Masterarbeit übernommen [224].

### HS-Medium

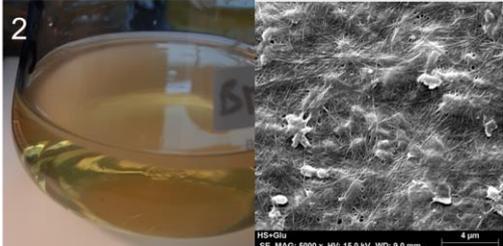
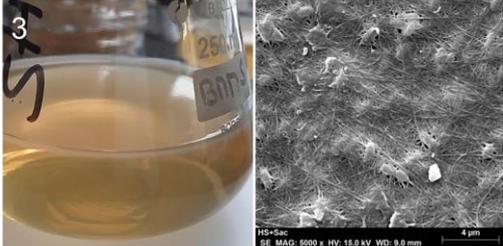
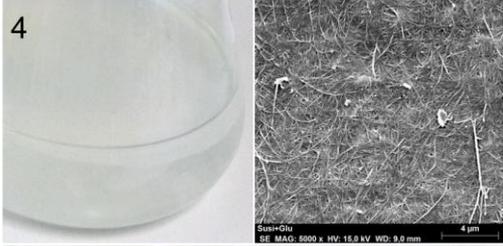
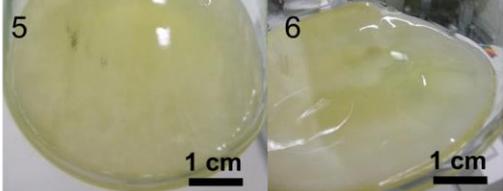
Das am häufigsten verwendete Medium zur Herstellung von BC, ist das HS-Medium. Es wurde erstmals 1954 von Hestrin und Schramm beschrieben [127]. Abbildung 27 zeigt einen stehend kultivierten Vorkulturkolben nach 5 Tagen Wachstum, angeimpft mit einer einzigen Kolonie *K. sacrofermentans* von einer Agar-Platte. Das Wachstum dieses BC-Pellikels startete am Boden des Kultivierungsgefäßes. In Bild 3 sind die gebildeten BC Schichten gut erkennbar. Im Kolben befindet sich HS-Medium mit einer Endkonzentration von 0,1 M Saccharose. Trotz dieser anfangs kugelförmigen Entwicklung der BC-Kultur, erscheint nach ungefähr einer Woche eine Kahlhaut an der Oberfläche der Kultur. Durch die Beimpfung mit einer Flüssigkultur entsteht bereits in der Vorkultur eine gleichmäßige Kahlhaut auf der Oberfläche des Mediums.



**Abbildung 27:** Stehend wachsende Flüssigkultur von *K. sacrofermentans* ausgehend von einer Kolonie. (1) Cellulose-Pellikel am Boden des Kolbens gewachsen; (2) Pellikel am Boden eines stehend kultivierten Kolbens; (3) Vergrößerung von (2) für die Kenntlichmachung der BC-Schichten.

Mit diesem Medium konnte das Wachstum auf den Bewuchsflächen am besten verfolgt werden und die erzielte Ausbeute war ausreichend für die Erzeugung einer ausgerichteten Kahlhaut. Wie auch in Tabelle 3 zu erkennen ist, gibt es Unterschiede in der Farbe und der Oberfläche der produzierten BC-Pellikel. Das HS-Medium lässt sich durch Waschen und Autoklavieren gut entfernen. Es bleibt ein weißlicher BC-Pellikel mit einer intakten BC-Struktur zurück (Abbildung 42 und Abbildung 44).

**Tabelle 3:** Übersicht über die verschiedenen Medien, ihre Besonderheiten und REM-Aufnahmen der Oberflächen der BC-Pellikel.

Nummer	Medium	Eigenschaften	Flüssigkulturen und REM-Aufnahmen
1	GHC	pH-Puffer durch $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$	
	M105	pH-Puffer durch $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$	
2	HS mit Glukose	Komplexmedium	
3	HS mit Saccharose	Komplexmedium	
4	Susi	Synthetisches Medium	
5	GY	Komplexmedium	
6	GYAE	Komplexmedium mit EtOH und AcOH	

Für die Optimierung der Kultivierungsmethode wurden zahlreiche Medien mit verschiedenen Komponenten und Kohlenstoffquellen ausprobiert. Tabelle 3 zeigt eine kleine Übersicht der wesentlichen Ergebnisse. Mit dem Susi-Medium lassen sich beispielsweise nahezu transparente BC-Pellikel herstellen. Dieses Mineralmedium besteht aus verschiedenen Komponenten und wird vollständig synthetisch hergestellt. Es ist für die Studie von bestimmten Stickstoffquellen oder Medienzusätzen geeignet, da bei einer späteren Analyse alle Bestandteile bekannt sind. Der Nachteil dieses Mediums ist, dass die *Komagataeibacter*

wesentlich geringere BC-Ausbeuten erzielen, als in den Komplexmedien. GY und GYAE unterscheiden sich nicht wesentlich von der Zusammensetzung des HS-Mediums. GYAE enthält zusätzlich Ethanol und Essigsäure. Diese Zusätze können auch dem HS-Medium bei Bedarf zugeführt werden. Aus diesem Grund wurde für die weitere Methodenentwicklung das HS-Medium verwendet. Zudem wird es in den meisten Literaturquellen verwendet und bietet einen besseren Abgleich der eigenen Methode zu derer anderer Wissenschaftler.

#### **4.4. Adaption des Versuchsaufbaus auf den Sauerstoffbedarf von *K. sucrofermentans***

Sauerstoff spielt in der aeroben Fermentation, wegen seiner niedrigen Löslichkeit in Flüssigmedien, eine wichtige Rolle [245]. Es ist bekannt, dass *Komagataeibacter* Stämme Sauerstoff als essentielles Substrat benötigen. Für den obligat aeroben [216] *K. sucrofermentans* ist der volumetrische Sauerstofftransferkoeffizient ( $k_{La}$ ) demnach ein limitierender Faktor in der aeroben Fermentation und für die optimale Produktion von BC [50]. Verschiedene Forschungsgruppen haben sich mit der Sauerstoffversorgung beschäftigt. Sie kommen überein, dass eine unzureichende Sauerstoffversorgung zu einer Verringerung der BC-Produktion führt und haben durch Maßnahmen wie die Zuführung von reinem Sauerstoff, höhere Begasungsraten oder Rührergeschwindigkeiten versucht dem entgegenzuwirken [63, 134, 238, 246-250]

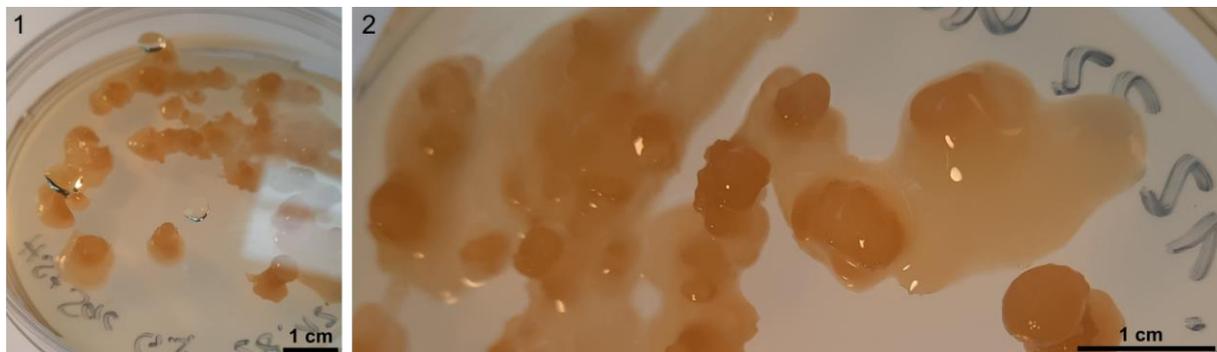
In den beiden vorgestellten Versuchsaufbauten (Kapitel 2.2.1 und 2.2.2) wurde durch eine Zwangsbegasung mit Druckluft versucht eine Sauerstoffunterversorgung zu verhindern. Für die Befeuchtung der Druckluft wurde eine Waschflasche mit eingebunden. Bei einer Begasungsrate von 1 L/min konnte so die Austrocknung des Mediums während der Versuchsdauer verhindert werden. In Vorversuchen wurden Begasungsraten bis zu 3 L/min getestet, hierbei war der Flüssigkeitsaustrag aus dem System jedoch zu hoch. Mit 1 L/min, 1 vvm, steht dem *K. sucrofermentans* im Vergleich mit Begasungsraten aus der Literatur, wie beispielsweise Song et al., genügend Sauerstoff zur Verfügung [251]. Li et al. untersuchten die Sauerstoffaufnahme (OUR) von *K. xylinus* KJ1 während des BC-Produktionsprozesses mit verzuckerten Lebensmittelabfällen. Die OUR in einem modifizierten 50-L-Blasensäulen-Bioreaktor nach 12-stündiger Kultivierung betrug 0,21 mg O<sub>2</sub>/L · min. Um eine Sauerstoffbegrenzung während der BC-Produktion zu verhindern, legten sie eine kritische Konzentration des gelöste Sauerstoffs von 3,10 ppm festlegten [252]. Laut Zong et al. kommen die Unterschiede in der Celluloseproduktion jedoch nicht nur von den unterschiedlichen Sauerstoffversorgungsraten, sondern auch von den hydrodynamische Belastungen auf die Mikroorganismen [253].

Für die bessere Sauerstoffversorgung im eigenen Versuch, wurde durch den flachen Aufbau der Bewuchsfläche in der Flasche eine vergrößerte Oberfläche mit einem Oberflächen/Volumenverhältnis von  $r_{S/V} = 0,7 \text{ cm}^{-1}$  im Gegensatz zur stehenden Kultur von  $r_{S/V} = 0,35 \text{ cm}^{-1}$  geschaffen. Krystynowicz et al postulierten, dass ein Oberflächen-Volumenverhältnis von  $r_{S/V} = 0,71 \text{ cm}^{-1}$  in ihrer Studie zu einem maximalem Wachstum in einer stationären Kultur führte [254]. Joris et al. stellten hingegen ein Verhältnis von  $r_{S/V} = 2,2 \text{ cm}^{-1}$  als optimal fest [255]. Die Begasung mit Druckluft über das Medium und über einen erhöhten Druck in der Flasche müsste zu einer weitaus größeren Begasungsrate geführt haben.

## 4.5. Auswirkungen der Kultivierungsmethode auf den Metabolismus von *K. sucrofermentans*

### 4.5.1. Genetische Instabilität von *K. xylinus*

Schramm und Hestrin [127] haben das Phänomen der spontan auftretenden cellulosefreien Mutanten (Cel<sup>-</sup>) eingehend beschrieben. Sie treten in Suspensionskulturen von *K. xylinus* vermehrt auf, wenn die Kultur bewegt und mit Luftsauerstoff belüftet wird oder bereits überaltert ist. Optisch sind die Cel<sup>-</sup> Mutanten von den Cel<sup>+</sup> Mutanten auf Agarkulturen durch eine veränderte Koloniemorphologie zu unterscheiden. Sie haben mukoides Aussehen, aufgrund der vermehrten Produktion wasserlöslicher EPS [127, 254, 256]. Abbildung 28 zeigt eine überalterte *K. sucrofermentans* Kultur. Hier beginnen die ehemaligen Kolonien sich auf dem Agar aufzulösen und werden deshalb mukoid. Dies hat vermutlich mit Endo- und Exocellulasen der Mikroorganismen selbst zu tun (Kapitel 4.7.4). Echte mukoiden Kulturen bestehen nur aus wasserlöslichem EPS und den Cel<sup>-</sup> Mutanten und besitzen keinen BC-Kern, wie die der abgebildeten Kulturen in Abbildung 28.



**Abbildung 28:** (1) Überalterte *K. sucrofermentans* Kultur auf einer HS-Agarplatte mit 0,1 M Saccharose als Kohlenstoffquelle. Platte von oben mit Tropfen. (2) Vergrößerung der mukoiden, sich auflösenden Kolonien.

Laut Yoshinaga et al. ist die genetische Instabilität der Hauptgrund für die verringerte BC-Produktion in bewegten Kulturen im industriellen Maßstab und deshalb besonders im Fokus der Prozessentwickler und Mikrobiologen [257]. Dieses Phänomen könnte auch in den entwickelten Versuchsaufbauten zur rheotaktischen Ausrichtung der BC problematisch werden, da hier eine Zwangsbelüftung über Druckluft und eine starke Bewegung des Mediums durch die Peristaltikpumpen stattfindet. Krystynowicz et al. stellten fest, dass beide Typen von Mutanten am Anfang einer Kultivierung zu gleichen Teilen auftreten. Die Cel<sup>+</sup> Mutanten haben jedoch durch die Kahlhaut aus Cellulose in unbewegten Flüssigkulturen einen entscheidenden Wettbewerbsvorteil. Sie können an der Flüssigkeits-Luft-Grenzfläche besser mit Sauerstoff versorgt werden, als die Cel<sup>-</sup> Mutanten in der Suspension. Wird der Sauerstoff bei suspendierten Kulturen über einen Gaseintrag geregelt, unterliegen die Cel<sup>+</sup> jedoch den Cel<sup>-</sup> [258]. Die Ausbildung einer Mehrheit scheint durch biologische Selektion geregelt zu sein. Untersuchungen von Valla und Kjosbakken haben gezeigt, dass ein Großteil der Cel<sup>-</sup> Mutanten zur BC-Synthese zurückkehrt, wenn sie wieder in statischen Flüssigkulturen gezüchtet werden [249]. Sie erklären sich ein solches Verhalten dadurch, dass es sich nicht um eine echte genetische Mutation handelt, sondern um Veränderungen in der phänotypischen Expression genetischer Sequenzen, die an der Cellulosesynthese (Kapitel 1.7) beteiligt sind. Als Beispiele hierfür nennen sie die Repression von Cellulosesynthesegenen während des Wachstums unter belüfteten Bedingungen, Veränderungen in den Zellmembrankomponenten, die durch die Kulturbedingungen induziert werden oder andere nichtgenetische Ereignisse. [236, 249].

Für die Ausbildung der Cel<sup>-</sup> Mutanten scheint besonders die Umsetzung von Glukose-1-Phosphat zu der UDP-Glukose mittels der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase entscheidend zu sein. Ist die Aktivität dieses Enzyms zu niedrig, wird keine Cellulose gebildet, obwohl eine Aktivität der Cellulose-Synthase nachgewiesen werden kann [258, 259]. Die Aktivität der UDP-Glukose Pyrophosphorylase variiert stark zwischen verschiedenen Stämmen von *K. xylinus*. Laut Saxena et al. zeigt *K. sucrofermentans* eine deutlich effizientere BC-Produktion [260] trotz des Auftretens der Cel<sup>-</sup> Mutation, weshalb dieser Mikroorganismus für die Entwicklung einer rheotaktischen Methode in Betracht gezogen wurde und sich vermutlich auch deshalb bei den Vorversuchen durchgesetzt hat. Das Phänomen der Cel<sup>-</sup> Mutanten ist weder in der Dauerkultivierung bei stehenden Kulturen, noch im rheotaktischen System merkbar aufgetreten. Trotz der Bewegung und Zwangsbelüftung konnte eine BC-Kahmhaut wachsen. Die Cel<sup>+</sup> Mutanten haben sich durchgesetzt. Dies weist bereits daraufhin, dass es sich bei der entwickelten rheotaktischen Kultivierungsmethode um eine Methode handelt, die für die Mikroorganismen zwischen den Bedingungen der statischen und der geschüttelten Kultivierung liegt.

Eine mögliche Gegenmaßnahme, neben der Empfehlung zur statischen Kultivierung, ist laut Krystynowicz et al. die Zugabe von 1,0 % (v/v) Ethanol zum Kultivierungsmedium. Dadurch soll die Bildung von Cel<sup>-</sup> Mutanten vermindert werden und laut Park et al. wird sogar die BC-Produktivität erhöht [149, 250]. Die Zugabe von Ethanol erfolgte in der rheotaktisch beeinflussten Kultur unabhängig von diesen Erkenntnissen durch die in Ethanol eingelegten Bewuchsflächen, welche zwar abgetropft in die Flaschen gegeben wurden, aber sicher noch Ethanol enthalten haben.

#### 4.5.2. Scherstress

Neben der genetischen Instabilität können verschiedene Mechanismen, Phänomene und auch äußere Einflüsse den Metabolismus der *Komagataeibacter* derart stören, dass die BC-Ausbeute verringert wird oder gänzlich zum Erliegen kommt. Der Einfluss der rheotaktischen Kultivierung auf die BC-Produzenten ist noch nicht erforscht und die gefundenen Stellschrauben noch nicht genutzt. Die aufgeführten Überlegungen zu unerwünschten Effekten und Problemen während der Fermentation gründen auf eigenen Erfahrungen mit den verschiedensten Mikroorganismen und können im Falle der Essigsäurebakterien auch hinfällig sein.

Der kontinuierliche Betrieb des Versuchsaufbaus, in dem das Medium durch den Kreislauf gepumpt wird, setzt die Mikroorganismen einer permanenten Scherbeanspruchung aus. Ein „sehr gutes Wachstum in bewegten Medien“, wie es von Toyosaki et al. beschrieben wird, bietet hier eindeutig einen Vorteil, da von *K. xylinus*-Stämmen bekannt ist, dass sie empfindlich gegenüber Scherkräften sind, vor allem wenn es um die BC-Produktion geht [55, 246, 261]. Fraglich ist, ob dieser genetische Vorteil bereits ausreicht oder ob weitere Anpassungen erfolgen müssen, um eine bessere Ausbeute zu erreichen.

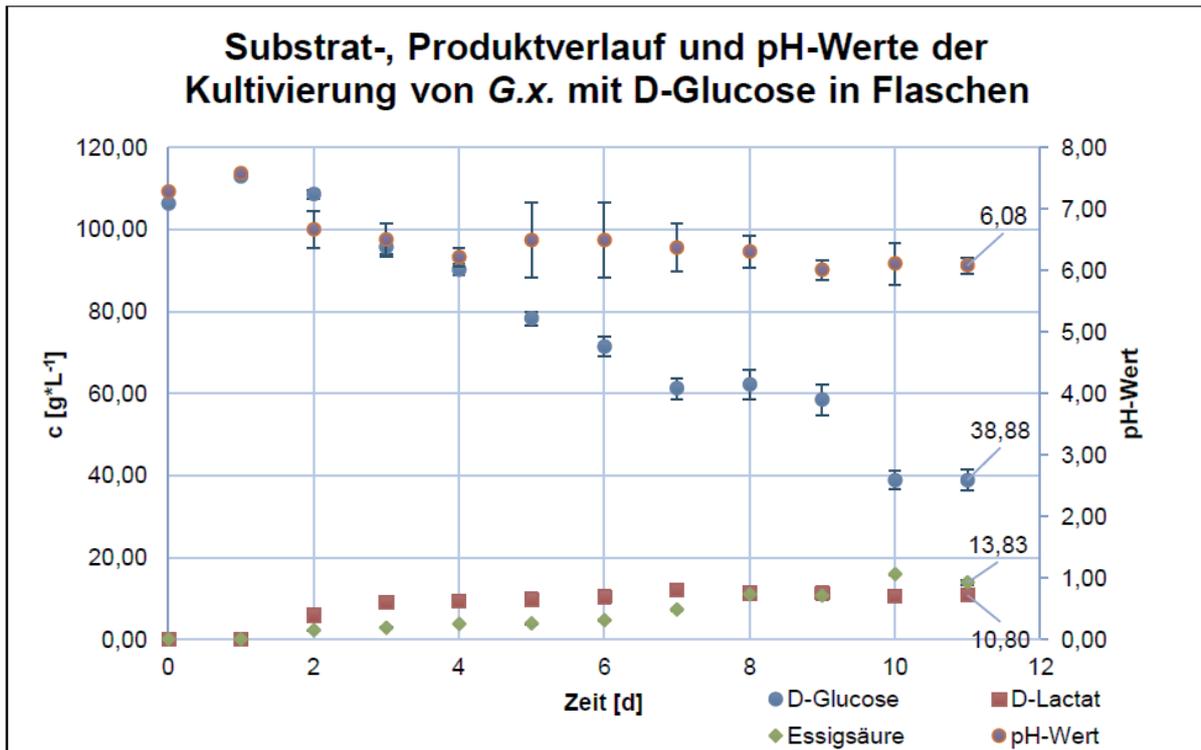
Liu et al. untersuchten die Auswirkungen verschiedener Kultivierungsmethoden auf *K. xylinus* und seine BC-Produktion. Insgesamt wurden in ihrer Arbeit zur metabolischen Profilerstellung von *K. xylinus* (CGMCC 2955) 79 verschiedene Verbindungen identifiziert und quantifiziert. Davon wurden 71 intrazelluläre Metaboliten, hauptsächlich Aminosäuren, Zucker, Alkohole, organische Säuren, Nukleinsäuren sowie Amine, als bekannte Verbindungen identifiziert [262]. Sie stellten fest, dass sich Metabolite, welche am zentralen Kohlenstoffstoffwechsel und am Biosyntheseweg der Aminosäuren beteiligt sind, unter den verschiedenen Kulturmethoden und der Zeit erheblich verändert. Wesentliche Unterschiede gab es bei den Konzentrationen

von Trehalose, Phosphat und Gluconsäure. Hierbei gelten Trehalose und Aminosäuren als Schutz der Mikroorganismen vor extremen Umwelteinflüssen. Liu et al. schließen aufgrund der Erkenntnisse aus einer Publikation über antioxidative Verbindungen in Honig [263], in der auch Gluconsäure beschrieben wird darauf, dass dieses Molekül auch für *K. sucrofermentans* ein Schutz gegen hydrodynamischen Scherstress sein kann. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage, ob die Metaboliten und Nebenprodukte vielleicht doch ihre Berechtigung im System haben und die Mikroorganismen lediglich für sich optimal auf die veränderten Lebensbedingungen reagieren.

Während der Fermentationsversuche wurde von Liu et al. zudem festgestellt, dass die BC-Produktion in bewegter Kultur zwei Stufen unterliegt. In der ersten Stufe wird bei hohen Rotationsgeschwindigkeiten der Rührer mehr Biomasse gebildet und vermehrt Glukose in Gluconsäure umgewandelt, was zu einer niedrigen BC-Produktionsrate führt [238]. In der zweiten Phase fungiert Glukonsäure unter glukoselimitierten Bedingungen, als Kohlenstoffquelle für die BC-Produktion [264]. Zhong et al. postulierten, dass die Überproduktion von Gluconsäure 40,03% der Glukose verbrauchte und nur 19,05% der Glukose für die BC-Biosynthese in *K. xylinus* CGMCC 2955 verwendet wurde [265, 266]. Im Vergleich wurde in der stehenden Kultur Glukose nicht so schnell verbraucht. Die BC-Produktion verlief kontinuierlich und führte trotz verminderter Sauerstoffversorgung schließlich zu einem deutlichen BC-Ertrag.

#### **4.5.3. Überschussmetabolismus, unvollständige Oxidation und Substrathemmung**

Eine Überversorgung mit Substrat könnte eine Substrathemmung oder wie bei *Escherichia coli* einen Überschussmetabolismus erzeugen. In diesem Beispiel übersteigt die Glukoseaufnahme die maximale Kapazität des CZ, als unerwünschtes Nebenprodukt wird Acetat (Kapitel 4.5.4) gebildet, was wiederum das Wachstum und die Produktbildung hemmen kann [267]. Eine solche aerobe Ausscheidung von Metaboliten des Zentralstoffwechsels wird generell als Überflusmetabolismus bezeichnet und tritt auch bei anderen Mikroorganismen auf. Die Essigsäuregärung der Essigsäurebakterien der Familie *Acetobacteraceae*, zu der auch die *Komagataeibacter* gehören, ist eine besondere Form des Stoffwechsels. Die oxidative Fermentation vermittelt die Umwandlung einer Vielzahl von Substraten. Am bekanntesten ist die Oxidation von Ethanol zu Essigsäure. Dieser Vorgang ist jedoch keine Gärung im eigentlichen Sinne, da bei diesem Prozess Sauerstoff verbraucht wird. Vielmehr handelt es sich um eine unvollständige Oxidation, da mit Ausnahme weniger Gattungen, wie *Acetobacter*, andere Essigsäurebakterien nicht über einen vollständigen Enzymsatz zur Umwandlung der Essigsäure in Kohlendioxid und Wasser verfügen. Laut Lynch et al. kann die oxidative Fermentation bereits als Überflusmetabolismus angesehen werden [44]. Es bleibt also die Substrathemmung als möglicher Limitierungsfaktor für die Fermentation und Produktion der BC-Pellikel. Eine Substrathemmung tritt auf, wenn die Rate des mikrobiellen Wachstums aufgrund einer hohen Substratkonzentration abnimmt. Dies kann von einem oder mehreren Substraten ausgehen und betrifft oftmals die für das Produkt entscheidenden Enzyme [31]. Während eigener Versuche ist selbst bei einer Glukose- und Saccharosekonzentration von 100 g/L keine Hemmung eingetreten. Die ausgewerteten HPLC-Messwerte von Abbildung 29 zeigen, dass ein großer Anteil der eingesetzten Kohlenstoffquelle in den elf Tagen der Versuchslaufzeit nicht verwendet werden konnte. Daher wurde der Einsatz der Kohlenstoffquelle im Verlauf der Forschungsarbeit auf eine Endkonzentration von 0,1 M im Medium reduziert.



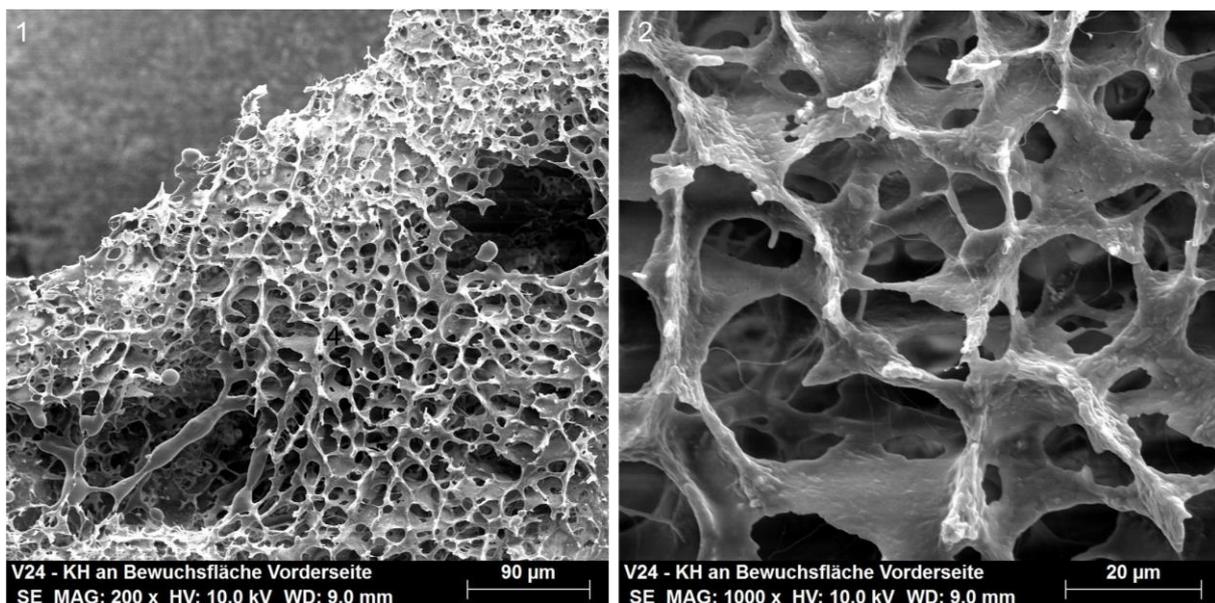
**Abbildung 29:** Substrat-, Produktverlauf und pH-Werte der Kultivierung von *K. xylinus* (*G.x.*) mit  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  D-Glucose; GHC-Medium, rheotaktischer Aufbau. Mit freundlicher Genehmigung von P. Wolf; aus ihrer Masterarbeit übernommen [224].

#### 4.5.4. Nebenprodukte und Acetan

Ein weiteres strukturell interessantes EPS ist das Acetan (siehe Abbildung 13, Kapitel 1.12). Wie bereits erläutert, fällt es als Nebenprodukt bei der Kultivierung der *Komagataeibacter* an. Generell scheint die Synthese von Nebenprodukten zu einer Verminderung der BC-Ausbeute zu führen. Acetan hat jedoch einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung der BC-Ketten. Laut Ishida et al. und Bae et al. soll Cellulose in Gegenwart von Acetan besser dispergieren, die Bindung der Zellen an die Fibrillen soll verhindert werden, dadurch soll sich das Bakterienwachstum erhöhen und die Celluloseproduktion besonders in der Schüttelkultur verbessert werden [268, 269]. Laut Fang et al. moduliert Acetan die Bündelung von Cellulosebändern und somit die Cellulosebildung und –anordnung [270]. Trcek et al. zeigen eine Übersicht über die chemische Zusammensetzung und Synthese von Acetan und acetan-ähnlichen Polysacchariden [271]. Sie führen auch auf, dass sich das Molekulargewicht und die Zusammensetzung dieser EPS je nach Kohlenstoffquelle und Mikroorganismus verändert [272]. Laut Ramana et al. ist die Sekretion von Exopolysacchariden am stärksten, wenn den Bakterien ein reichliches Angebot an einer Kohlenstoffquelle und eine minimale Stickstoffquelle zur Verfügung stehen [76, 273]. Diese Erkenntnisse machen klar, dass durch den Einfluss auf das Medium auch die Acetan-Produktion beeinflusst werden kann. Indirekt lassen sich so die Materialeigenschaften der BC-Matrix, wie beispielsweise die Porosität, das Elastizitätsmodul und die Morphologie, in situ beeinflussen. Durch geeignete Versuche können Voraussagen für das künftige Material gemacht oder gezielt Materialeigenschaften im Medium eingestellt werden [76].

Leppard et al. vermuten, dass sich die wasserlöslichen EPS wie Acetan als amorphe Schicht um die Cellulosefibrillen legen [274]. Laut Valla et al. wird diese These dadurch bekräftigt, dass sich keines der genannten Polymere in der flüssigen Fraktion einer statischen Kultur befindet

[141]. In eigenen Versuchen mit gewachsener Kahmhaut konnten nur wenig wasserlösliche Bestandteile im Medium, die nach dem Fällen mit einer dreifachen Menge an Ethanol abgenommen wurden, festgestellt werden. Die stehend kultivierten Kontrollen hatten deutlich weniger der wasserlöslichen EPS produziert, als die Ansätze der neu entwickelten Methoden für die rheotaktische Ausrichtung der EPS. Abbildung 30 zeigt hierarchische BC-Strukturen ummantelt mit wasserlöslichen EPS. Durch die Gefriertrocknung entstehen poröse Glasierungen. Die EPS scheinen gleichmäßig im Pellicel und um die Mikroorganismen vorzuliegen. Für die Materialherstellung bleiben dadurch mehrere Möglichkeiten. Der fertig gewachsene Biofilm kann mit Mikroorganismen und allen seinen Bestandteilen getrocknet oder auch feucht verwendet werden. Eine Inaktivierung der Mikroorganismen könnte aber generell von Vorteil sein, um Kontaminationen zu verhindern. Mit jedem Wasch- und Autoklavierschritt der Materialien verliert der Biofilm an Komponenten und der Verbundstoffcharakter und seine damit verbundenen Eigenschaften schwinden. Völlig gereinigte BC-Pellicel bestehen nur noch aus dem Cellulosenetzwerk und haben mit den natürlichen Biofilmen nicht mehr viel gemeinsam. Für die Auswertung und Untersuchungen der Materialien für die Publikationen wurden die BC-Pellicel autoklaviert und einmal gewaschen. Der Großteil des Acetans oder auch anderer Nebenprodukte wurde somit entfernt. Die BC-2D-Körper konnten so getrocknet und problemlos aufbewahrt werden (Kapitel 4.7.4).



**Abbildung 30:** REM-Aufnahmen ungereinigter, gefriergetrockneter BC-Proben aus *K. xylinus*: (1) und (2) Kahmhaut (KH) rheotaktisch gewachsen auf einer Bewuchsfläche.

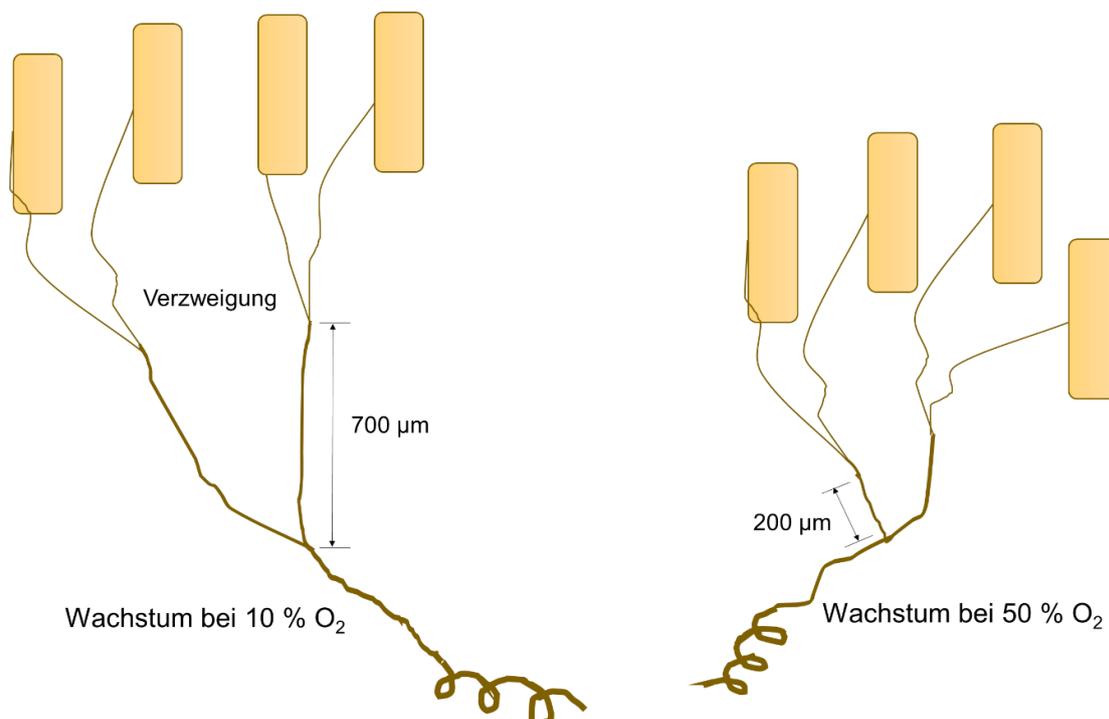
Zur Klärung des Einflusses von Acetan und anderen Medienzusätzen haben Chao et al. durch die Zugabe von Agar versucht die Agglomeration der BC-Fibrillen zu minimieren. Die mit Agar versetzte Kulturbrühe wurde viskoser und die freie Zellzahl erhöhte sich. Hierbei scheint es sich nicht um einen biochemischen Stoffwchselfvorgang, sondern um ein physikalisch-chemisches Phänomen zu handeln [134]. Ähnliche Beobachtungen konnten Zhou et al. nach der Zugabe von Natrium-Alginat zum Kulturmedium machen [275]. Es wurde beobachtet, dass die Bildung großer BC-Pellicel verhindert und dadurch die Celluloseausbeute verbessert wurde. Die Zugabe von exogenen Polymeren wie z. B. Polyhydroxybuttersäure oder Alginat beeinflussten laut Cacicedo et al. nicht nur die BC-Produktion, sondern veränderte auch die Morphologie und Kristallinität der BC [82]. Diese „akzessorischen“ Moleküle werden Teil des BC-Nano- oder Mikrofibrillen-Netzwerks durch Interaktion mit vielen OH-Bindungen der Celluloseketten [276]. Durch neu verbundene Wasserstoffbrückenbindungen können sich die

Eigenschaften der BC wie die Fähigkeit zur Rehydrierung ändern. [82] Es wurden von Huang-Chan et al. sowohl hydrophile, als auch hydrophobe Moleküle wie Tween 80, Harnstoff, Hydroxypropylmethylcellulose und Carboxymethylcellulose ausgewählt. Polymere mit hohem Molekulargewichten können nicht in die kristallinen Bereiche der BC-Fibrillen eindringen, aber sterische Hinderung hervorrufen und dadurch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen unterbinden. Es entstehen größere amorphe Regionen, welche die Aufnahme von Wasser während des Rehydrierungsprozesses erleichtern [277]. Die Anreicherung des Mediums mit akzessorischen Molekülen könnte den BC-Pellikel möglicherweise auch im rheotaktischen Aufbau verändern und neue BC-Fibrillenabstände bewirken. Dieses Thema ist auch dahingehend interessant, da in den durchgeführten Versuchen größere Mengen an Acetan gebildet wurden und die Frage offen bleibt, ob sich dies positiv oder negativ auf das spätere Material auswirkt, Abbildung 30.

In Anlehnung zu diesen Überlegungen gibt es Studien zum Thema In-situ-Verfahren zur Herstellung von BC-Verbundwerkstoffe. Sie beschäftigen sich intensiv mit den intermolekularen Beziehungen zwischen den sich bildenden BC-Ketten und exogenen Molekülen. Die Beschreibung der Interaktion zwischen zwei Polymeren, die eine neuartige Matrix bilden, wurde als „Interpenetrated Polymer Network“ benannt und wird bereits als eigenes Forschungsfeld verfolgt [82]. Handelt es sich bei einem der beiden Polymere um die BC, können auf einfache Weise BC-Komposite hergestellt werden. Die Materialien werden von den Mikroorganismen zusammengesponnen und bieten neue interessante Anwendungen.

#### 4.5.5. Auswirkungen auf die BC Fibrillen

Watanabe et al. haben bei Versuchen mit stehend gewachsenen Kulturen und einer erhöhten Sauerstoffversorgung festgestellt, dass sich ein dichteres Cellulosenetzwerk gebildet hat. Sie konnten zeigen, dass die Länge der Fibrillen zwischen den Verzweigungen mit erhöhter O<sub>2</sub>-Versorgung kürzer angelegt wurden und die Dichte des Netzes mit steigender BC-Produktion abnimmt [278]. Abbildung 31 zeigt die Verkürzung der Cellulosefibrillen.



**Abbildung 31:** Verkürzte Cellulosefibrillen durch erhöhte Sauerstoffversorgung im stehenden System [278].

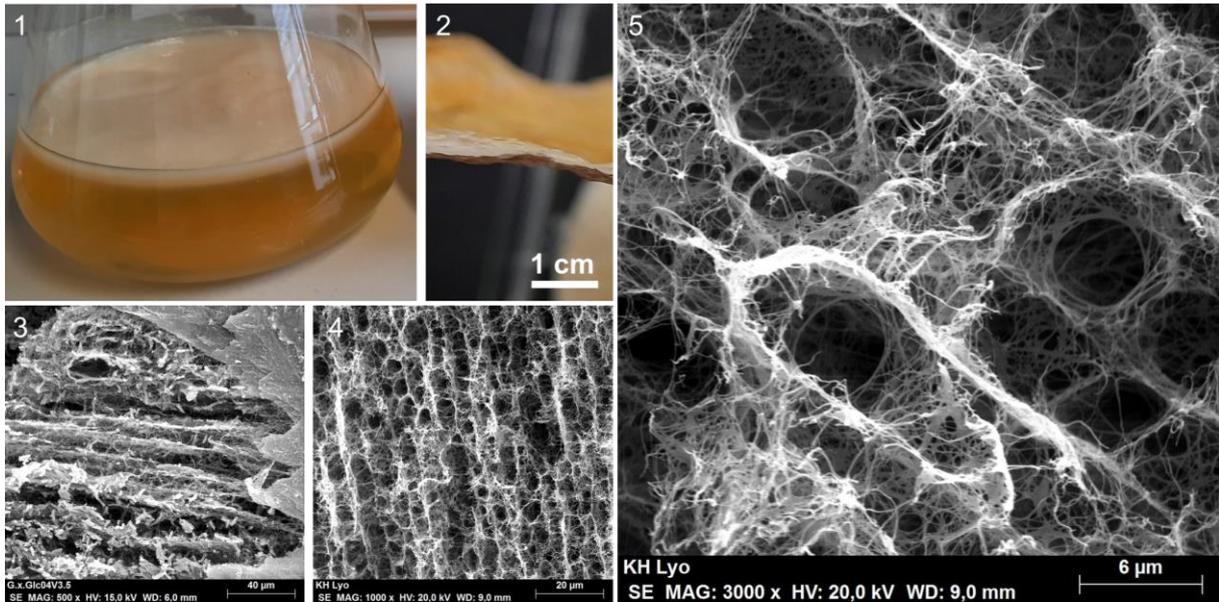
Dieser Effekt konnte bisher in eigenen Versuchen nicht beobachtet werden. Es wäre aber denkbar, dass dieses Verhalten eine Reaktion auf die vermehrte Sauerstoffversorgung sein könnte. Da den Mikroorganismen mehr Sauerstoff zur Verfügung steht, könnten die Versorgungswege für die Diffusion des Sauerstoffs aus der Umgebung theoretisch kleiner angelegt werden.

#### **4.5.6. Wasserbindekapazität**

Die Verkleinerung der Poren im Netzwerk müsste sich auch auf die Wasserbindekapazität der BC-Pellikel auswirken, da der extrem hohe Wassergehalt von 98-99% [45] auf die native Hydrophilie von Cellulose, sowie das Vorhandensein von Porenstrukturen und „Tunneln“ zurückgeführt wird, Abbildung 30. Die Festphasendichte der BC im nassen Zustand beträgt typischerweise  $\approx 0,01 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  und es können etwa 1 g Wasser pro Zentigramm Cellulose gespeichert werden. [120, 122] Laut Strobin et al. können die höchsten Werte der Wasserbindungskapazität zwischen pH 4,8 und pH 6 erreicht werden [279]. Durch eigene Versuche konnte vor allem in Hinsicht auf die Wasserbindekapazität der Bezug zur Kohlenstoffquelle festgestellt werden. Stehende Versuche mit verschiedenen Kohlenstoffquellen haben Wasserbindungskapazitäten von D-Glukose 16,5 gH<sub>2</sub>O/gBC, D-Mannitol 20,0 gH<sub>2</sub>O/gBC und D-Saccharose 5,4 gH<sub>2</sub>O/gBC ergeben [224]. Bei schüttelnden Kulturen oder durch die Zugabe von Substanzen, welche Wasserstoffbrückenbindungen mit der Cellulose ausbilden können, wie beispielsweise Carboxymethylcellulose kann sich die Struktur der gebildeten Cellulose verändern. In diesem Fall wird statt der metastabilen Cellulose I die thermodynamisch stabilere Cellulose II gebildet. Das bedeutet für das spätere Material, dass die Struktur des Polymers von den Bedingungen der Kultivierung abhängig ist [92] und somit auch die Wasserbindekapazität beeinflusst werden kann.

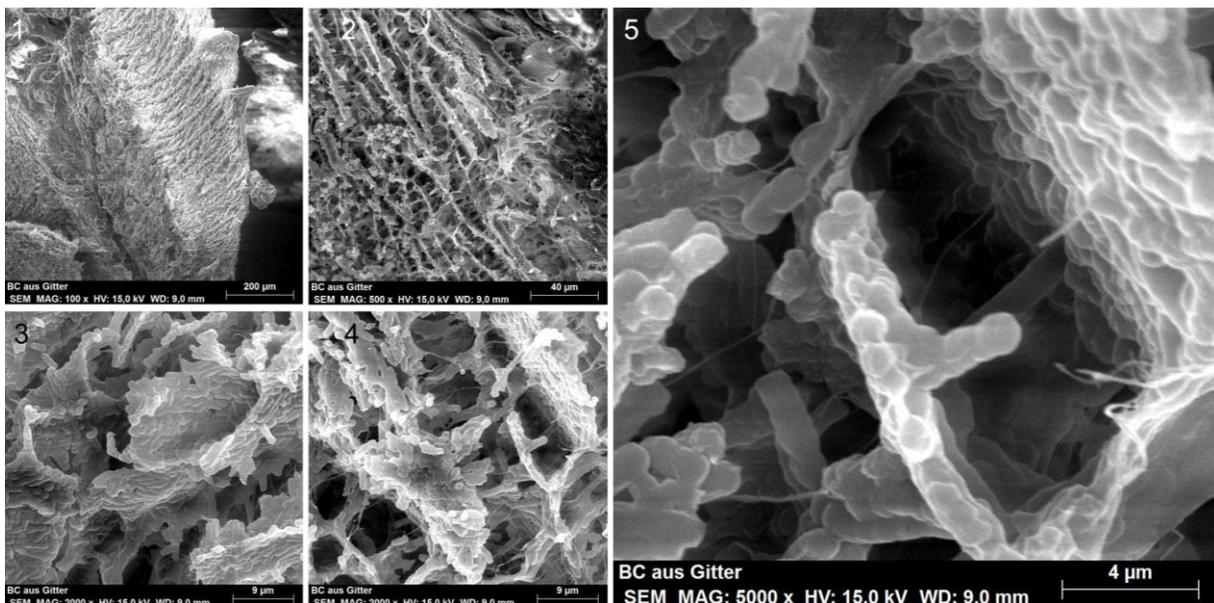
#### **4.5.7. Aufbau der hierarchischen BC-Struktur**

*K. sucrofermentans* wird als nicht motil, nicht sporulierendes, stäbchenförmige Bakterium mit Abmaßen von etwa  $0,6\text{--}0,8 \times 1,0\text{--}1,2 \mu\text{m}$  beschrieben, welches einzeln, paarweise oder in Ketten auftritt [216]. Für das gewachsene Material aus BC und die Mikroorganismen bedeutet dies, dass Poren mit den Abmaßen der Mikroorganismen erwartet werden können, da wie einleitend beschrieben, die Mikroorganismen in den Cellulosematten eingebettet sind. Nach dem Autoklavieren und entfernen der *K. sucrofermentans* müssten je nach Auftreten der Bakterien lange Kanäle oder einzelne Hohlräume im stehend gewachsenen Material vorliegen. Abbildung 32 zeigt den hierarchischen Aufbau einer stehend gewachsenen Kahmhaut aus BC. Bild Nr. 3 zeigt den schichtweisen Aufbau der Pellikel, die teilweise miteinander verbunden sind. Hier sind zudem die Essigsäurebakterien *K. xylinus* zu erkennen. Sie liegen ohne Ausrichtung in der Cellulosematrix vor und sind durch ihre BC-Fibrillen mit dem Pellikel verbunden. Die Kahmhaut für die REM-Aufnahmen Nr. 4 und 5 wurde in vollentsalztem Wasser gereinigt und von den Mikroorganismen befreit. Es bleibt eine poröse Struktur. Es scheint, also ob die großen Poren die ehemaligen „Kokons“ der Mikroorganismen sind. Der Durchmesser der in Bild 5 gezeigten Hohlräume beträgt ca.  $4 \mu\text{m}$ . Dies ist ein Vielfaches der beschriebenen Durchmesser der Mikroorganismen.



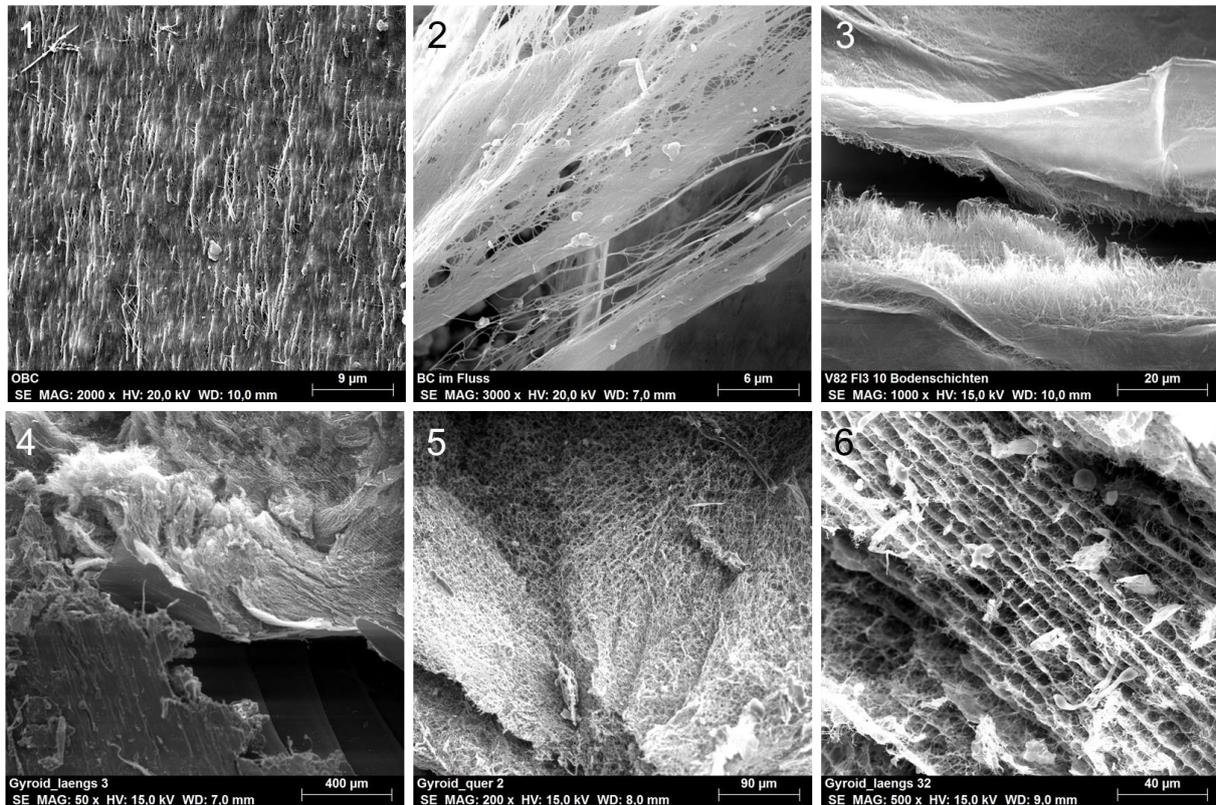
**Abbildung 32:** Stehend gewachsene Kahlmhaut: (1) Wachstum im Kolben; (2) Schnitt einer luftgetrocknete Kahlmhaut (KH); (3) REM-Aufnahme der BC-Schichten einer gefriergetrockneten Kahlmhaut; (4) REM-Aufnahme einer stehend gewachsenen, lyophilisierten, hierarchisch aufgebaute BC Matrix mit Hohlräumen; (5) vergrößerte Aufnahme von Nr. (4).

Die in Abbildung 33 gezeigten REM-Aufnahmen zeigen die Essigsäurebakterien eingebettet in ihrer Cellulosematrix und dem wasserlöslichen EPS Acetan [141, 271, 280], dass während des Aufbaus der Pellikel als Nebenprodukt gebildet wird. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Mikroorganismen die Stege und Wände der porösen Struktur bilden und die Hohlräume für die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff offen lassen. Die erwartete Porengröße hängt aufgrund dieser Beobachtung nicht mit den Abmaßen der Mikroorganismen selbst, sondern mit ihrer Anordnung im BC-Material zusammen.



**Abbildung 33:** REM-Aufnahmen einer nicht gereinigten, gefriergetrockneten Kahlmhaut: (1) Wachstum der Pellikel auf einem Gitter; (2-5) Vergrößerte Aufnahmen der gleichen Kahlmhaut.

Da die rheotaktische Kultivierung eine maximale Ausrichtung der BC-Fibrillen von 80 % erreichen kann [208], müssten die Poren und Hohlräume in diesen Materialien geordneter und ausgerichtet sein. In Abbildung 34 werden 2D- und 3D-gewachsene Kahmhäute gezeigt.



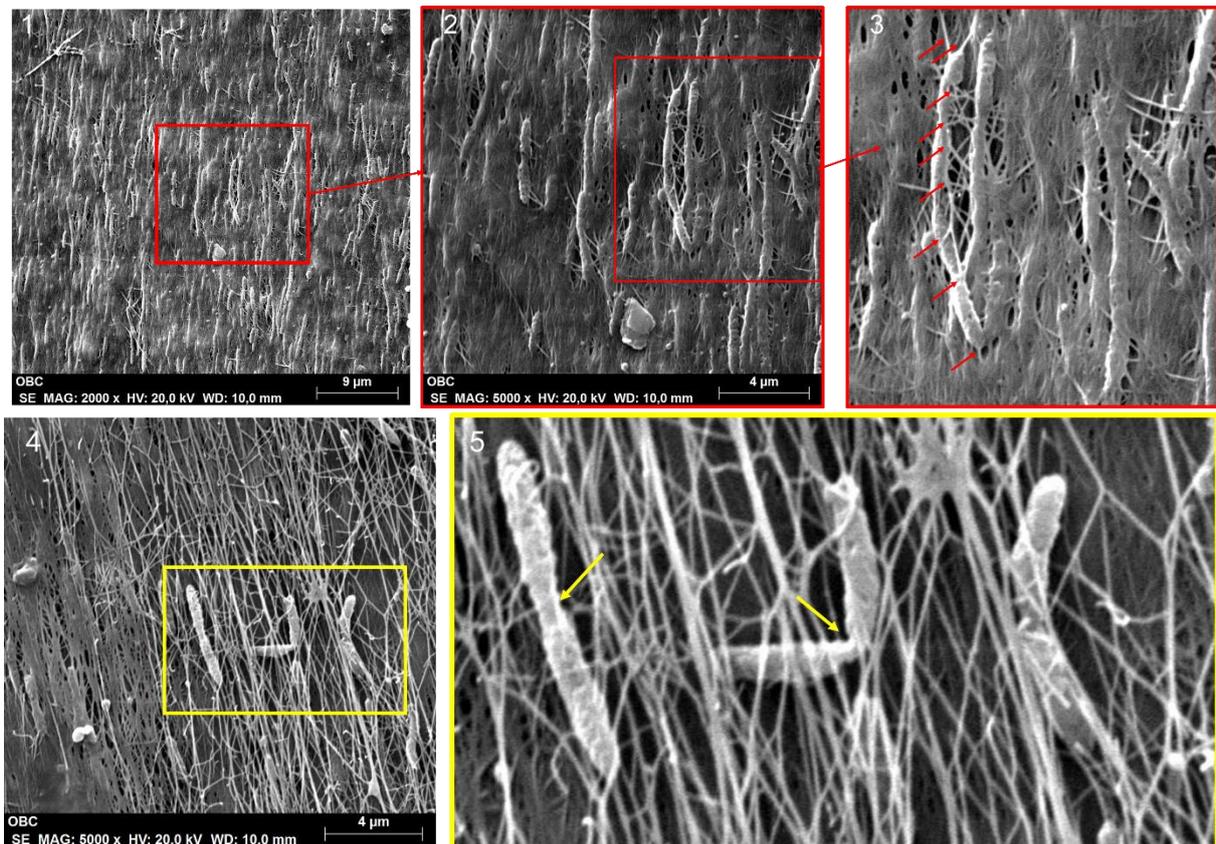
**Abbildung 34:** (1-3) REM-Aufnahmen von 2D-rheotaktisch gewachsenen Kahmhäuten. (1) Oberfläche einer luftgetrockneten Kahmhaut, (2) eine dünne Schicht einer Kahmhaut, (3) Aufgetrennte Kahmhaut mit Cellulosefibrillen; (4-6) REM-Aufnahmen von 3D-rheotaktisch-gewachsenen Kahmhäuten: (4) Bruch eines Gyroid-Steges, (5) hierarchischer Aufbau eines Gyroid-Steges, (6) ausgerichtete BC-Schichten im Gyroid.

Die 2D-Kahmhäute sind, wie die stehend gewachsenen Pellikel, in Schichten aufgebaut. Die Bilder 1 bis 3 von Abbildung 34 zeigen deutlich, dass sich die Mikroorganismen und die Cellulose-Fibrillen ausgerichtet haben. Die Bildung von Poren ist in diesen Aufnahmen nicht zu erkennen. Das dünne Material hat eher einen papierähnlichen Charakter. Dicke Cellulose-Matten wurden mit dieser Methode noch nicht generiert. Die Bilder 4 bis 6 zeigen Einblicke in einen lyophilisierten Gyroid-Körper aus BC. Die BC in den Stegen zeigt eine hierarchische und anisotrope Ausrichtung der Strömung folgend. Der Volumenstrom war in diesem Versuch mit 305-350 mL/min wesentlich geringer, als bei den 2D-Versuchen mit bis zu 450 mL/min. Daraus kann geschlossen werden, dass verminderte Scherströmung den porösen, hierarchischen Aufbau fördert.

#### 4.6. Reaktionen der *Komagataeibacter* auf die Antibiotika Zugabe

Für die Kultivierung mit 3D-gedruckten PLA-Körpern war es notwendig das Medium zusätzlich mit einem Antibiotikum zu versetzen, um Kontaminationen vorbeugen zu können. Die Verwendung von Antibiotika ist aber immer mit Nebeneffekten wie beispielsweise den bereits diskutierten Cel<sup>-</sup> Mutanten (Kapitel 4.5.1) und dem Phänomen der Filamentierung verbunden. Valla und Kjosbakken haben beispielsweise zur Aufklärung der spontanen Zellmutation nach einem definierten Weg zur Induktion der Aggregatbildung geforscht. Die Zugabe des Antibiotika Tetracyclin bei exponentiell wachsenden Zellen des *K. xylinus* (ATCC 10245) führte zu einer ausgedehnten Aggregatbildung. Die gebildeten Kolonien waren schleimig und nicht von den ursprünglichen Cel<sup>-</sup> Mutanten zu unterscheiden. Auch das Wachstum in Schüttelkolben erzeugte keine Celluloseaggregate. Die Tetracyclin-Induktion hatte einen pleiotropen Effekt auf die Mikroorganismen. Diese Mutanten konnten eine große Menge eines extrazellulären löslichen Polysaccharids [81], möglicherweise des Xylinan oder Acetan, herstellen [45, 141, 249, 281]. Ähnliche Ergebnisse konnten mit Chloramphenicol oder Rifamycin erzielt werden. Die Zellen scheinen durch Mutationen in den Strukturgenen für die Cellulosebiosynthese oder durch Mutationen an Genen, die indirekt an deren Entstehung der Polysaccharide beteiligt sind, verändert worden zu sein. Die genaue Natur der Gene, die einen solchen Effekt bewirken, ist schwer zu identifizieren. Wie eingehend in Kapitel 1.8 erklärt, sind die Enzyme für die Bildung der Cellulose-Mikrofibrillen an die Zellhülle gebunden und die Polyglucosanketten werden durch die Hülle in die extrazelluläre Umgebung extrudiert. Mutationen in mehreren Genen, die für die Struktur der Zellhülle bestimmt sind, könnten daher indirekt die Cellulosebildung stören. Versuche von Valla et al. mit hohen Konzentrationen in Ampicillin-Agarmedien haben die meisten Zellen abgetötet. Unter den überlebenden Zellen gab es eine viel höhere Häufigkeit von Cel<sup>-</sup> Mutanten als in der gesamten Population. Da Ampicillin die Zellwandsynthese hemmt, sind die überlebende Mikroorganismen wahrscheinlich Zellhüllenmutanten. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung von Gayda et al. unterstützt. Sie haben festgestellt, dass Mutationen in den Genen, die für die Proteine der äußeren Membran kodieren, bei *Escherichia coli* die Polysaccharid-Biosynthese stören [282].

Für die Methodenentwicklung wurden selbst einige Antibiotika auf ihre Verträglichkeit mit den Stämmen *K. xylinus* und *K. sucrofermentans* getestet. Wachstumsversuche bei stehender Kultivierung wurden mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Kanamycin gegen aerobe Gram-negative Bakterien, dem  $\beta$ -Lactam-Antibiotika Ampicillin gegen Gram-positive Erreger und dem Translationshemmer Chloramphenicol unternommen [283]. Bakteriostatische Medikamente wie Chloramphenicol sind dafür bekannt, die Ribosomenfunktion zu hemmen. Insbesondere Chloramphenicol bindet an Proteine L16 die ribosomale 50S-Untereinheit. Diese Untereinheit ist wesentlich für die Struktur und Funktion von Peptidyl-Transferasen, die Peptidbindungen zwischen benachbarten Aminosäuren während der Proteinbiosynthese bilden [284-286]. Das Antibiotikum induziert die Filamentbildung und hat dadurch direkten Einfluss auf die Morphologie des Mikroorganismus [287]. Trotz dieses Effektes konnten annehmbare Ergebnisse mit einer Endkonzentration von  $34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Chloramphenicol im Medium erreicht werden. Abbildung 35 zeigt REM-Aufnahmen der gefriergetrockneten Kahmhäute mit ausgerichteter BC. Die parallel angeordneten *K. sucrofermentans* sind trotz der Behandlung durch die Lyophilie noch gut zu erkennen.

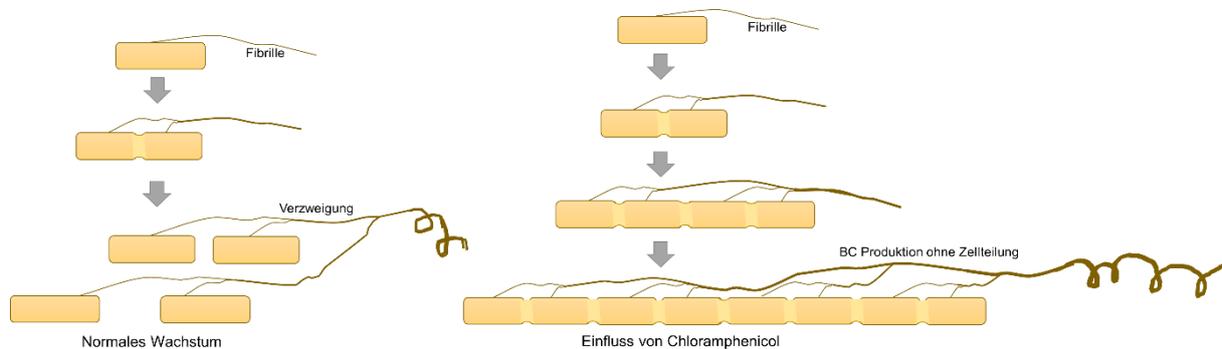


**Abbildung 35:** REM-Aufnahmen der gefriergetrockneten Kahmhäute mit ausgerichteter BC: Aufnahme (1–3) zeigt abnorme Morphologien der Mikroorganismen. Aufnahme (4) und (5) zeigen möglicherweise eine Zellteilung.

Bild 1 bis 4 der REM-Aufnahmen zeigen sehr lange Mikroorganismen. Diese Form, erzeugt durch anormales Wachstum, ist unter dem Begriff Filamentierung bekannt. Die betroffenen Zellen verlängern sich ohne Zellteilung. Die Zellen, welche daraus resultieren haben mehrere chromosomale Kopien. Dieses Phänomen kann durch verschiedene Umweltbedingungen wie beispielsweise Temperaturschocks, geringe Wasserverfügbarkeit, hoher osmotischer Druck, extremer pH-Wert oder UV-Exposition verursacht werden. Aus der Literatur ist auch bekannt, dass Chemikalien wie Antibiotika diesen Effekt hervorrufen können. Laut Chung et al. verdickt Chloramphenicol die Zellwand bei *Bacillus cereus* [288]. Es wurde festgestellt, dass die Antibiotika Nalidixinsäure und Chloramphenicol deutlich verlängerte Zellen bei Konzentrationen von 0,10 mM bzw. 0,30 mM entstehen lassen.

Da eine Veränderung der Morphologie auch die Bildung der Cellulose Fibrillen beeinflussen kann, werden die möglichen Auswirkungen hier diskutiert. Wie bereits eingehend beschrieben, werden die Cellulose-Fibrillen durch die TK aus den *Komagataeibacter* Zellen extrudiert und bündeln sich zu Mikrofibrillen. Diese Poren sind entlang der Längsachse auf der Oberfläche der Zellen in einer Reihe ausgerichtet. Wenn die BC-Produktion über die Zellgeneration hinaus fortgesetzt wird, werden die Mikrofibrillen von den Elternzellen jeweils zur Hälfte vererbt. Die Tochterzellen bilden einen Verzweigungspunkt auf der Fibrille. In diesem Fall kann der Fibrillen-Durchmesser nach der Zellteilung schmaler sein. Eine alternative Version von Brown et al. ist, dass die normale Porenanzahl im Stadium der Teilung den neuen Zellen bereitgestellt werden [91]. In jedem Fall führt diese Wiederholung der Zellteilung zu einer Kaskade der Verzweigungen [103]. Bei genauer Beobachtung der REM-Aufnahmen erscheinen auch diese Fibrillen nicht unbedingt linear zu sein. Sie enthalten einige "Dreiweg-Verzweigungspunkte" entlang ihre Länge. Diese Art der Verzweigung wird mit den einzigartigen Eigenschaften

dieses Materials in Zusammenhang gebracht. Brown et al. und Zaar et al. [91, 104] haben bereits ein vorläufiges Verzweigungsbild beschrieben. Abbildung 36 spiegelt diese Theorie auf der linken Seite wieder. Der Mechanismus der Zellteilung ist hier als normales Wachstum beschrieben. Auf der rechten Seite sind Zellen ohne Zellteilung zu sehen.



**Abbildung 36:** Normales Wachstum der *Komagataeibacter* (links) und erwartetes Wachstum unter Einfluss von Chloramphenicol (rechts).

Es wird vermutet, dass sich durch den Mechanismus der Zellteilung die Cellulosenetzwerke bilden [103, 278, 287]. Bei jeder Zellteilung teilt sich ein Band in Längsrichtung auf. Dieser Vorgang wird mit jeder Teilung und mit jeder Trennung von Zellen wiederholt, und diese Wiederholungen führen zu Netzwerken aus Cellulosebändern [103]. Wenn Antibiotika eingesetzt werden, welche die Zellteilung hemmen, werden die Bänder nicht gespalten und benachbarte Bänder verschmelzen vermutlich zu breiteren Bändern oder Aggregaten von Bändern. In der Studie von Yamanaka et al. wurde die Breite der Bänder oder ihrer Aggregate durch längere Zellen (nicht getrennte Zellen) auf etwa das 1,2–2 mal fache der Breite der Kontrollbänder festgelegt [287]. Laut Yamanaka et al ist für *Acetobacter aceti* AJ 12368 eine Verdopplungszeit von 1,5 bis 8 Stunden bekannt [103]. Mit einer Fibrillen Bildungsrate von 2 µm pro Minute konnte so für isolierten Zellen während der Anfangsphase eine Fibrillenlänge zwischen den Verzweigungspunkten von 180 bis 960 µm berechnet werden. Dieser Wert erscheint den Autoren als viel zu groß und wird mit verschiedenen Faktoren wie beispielsweise der Verzögerung der Nährstoffzufuhr durch die Entwicklung von Netzwerken und einer Abnahme der Aktivität von Enzymen mit der Alterung der Zelle erklärt [103]. Durch die Verwendung von Chloramphenicol ergab sich ein um 34–42 % höherer Elastizitätsmodul. Dies bedeutet, dass je breiter das Band oder das Aggregat der Bänder war, desto höher war auch das Elastizitätsmodul. Diese Zunahme wird durch die Vergrößerung der effektiven Querschnittsfläche, der Zunahme des Querschnittsimpulses und einer besseren uniplanaren Orientierung erklärt [103].

Henning et al. setzten dem Medium 100 mg/L Chloramphenicol zu. Sie konnten eine Beeinflussung der Zellmorphologie, der Biomasse- und Celluloseproduktion, eine Erhöhung des I-α-Allomorph-Gehalts und die Induktion der Filamentbildung beobachten. Mängel an der Peptidoglykanschicht und bei der Proteinproduktion haben in ihrer Studie die Celluloseausbeute verringert. Zudem scheint Antibiotika-Stress die EPS-Produktion angeregt zu haben. Es konnte auch eine verstärkte Aggregation der Glucankette in eine höhere Ordnung der Strukturebene beobachtet werden [289]. Yamanaka et al. stellten bei dieser Konzentration von Chloramphenicol inhomogene Wachstumsformen des Cellulose-Pellikels fest. Das Antibiotika wird in dieser Studie mit Zelldehnung, Zellkrümmung und Filamentation in Zusammenhang gebracht [287]. Diese Beobachtungen wurden auch bei den Versuchen zur rheotaktischen Ausrichtung (2D) der Cellulosefibrillen gemacht. Diese morphologischen Veränderungen sind auch in den REM-Aufnahmen von Abbildung 35 zu erkennen. Im

Vergleich dazu konnte González-García et al. bei Versuchen mit *K. xylinus* DSM 2004 beobachten, dass die Zugabe von 0,1 mM oder 0,25 mM bei einer stehenden Kultivierung eine 1,7-fache Steigerung der BC-Produktion im Vergleich zur Kontrolle bewirkt hat. Dieser chemische Stimulus veränderte die mikroporöse BC-Struktur in vivo, ohne seine Ausbeute negativ zu beeinflussen. Es wurde eine Änderung des Membranporenvolumens, der spezifische Fläche des Porendurchmessers und der Kristallinität beobachtet. [290]. In geringer Konzentration könnte Chloramphenicol bei diesen Versuchen die Biosynthese stimuliert haben, da BC als Schutzbarriere gegen diese Verbindung von den Mikroorganismen produziert wird [291].

Das Antibiotikum Bacitracin ist ein Polypeptid-Antibiotikum und wird von bestimmten *Bacillus* Stämmen produziert. Es hemmt die Zellwandsynthese einiger Gram-positiver Bakterien und *Neisserien* [292]. Laut verschiedenen Quellen scheint es selbst bei hohen Konzentrationen keine negative Wirkung auf das In-vivo- und In-vitro-Cellulose-synthetisierende System von *K. xylinus* zu haben [81, 137, 254]. Versuche mit Bacitracin könnten Klarheit darüber verschaffen, ob nur das verwendete Antibiotika Chloramphenicol die Morphologie der Mikroorganismen verändert oder ob auch der rheotaktische Aufbau dazu beigetragen hat.

## 4.7. 2D-BC-Körper

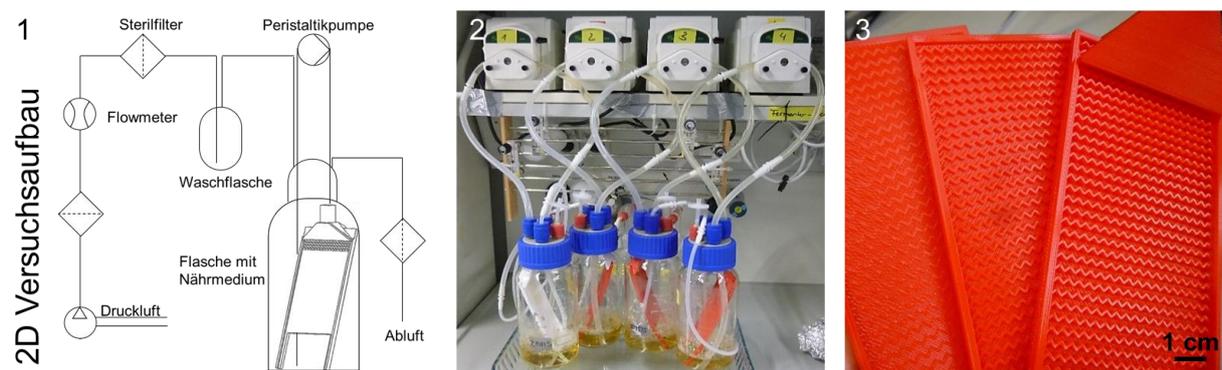
### 4.7.1. Konstruktion der Bewuchsflächen für die 2D-BC-Körper

In der Biofilmbioscience werden Biofilme im Labor mit Stehkolben oder mit kleinen statischen Biofilmreaktoren erzeugt. Diese sind meist dadurch gekennzeichnet, dass ein Medium durch eine liegende Konstruktion geleitet wird, wie auch die stilistische Darstellung eines kontinuierlichen Biofilmreaktors in Abbildung 39 zeigt. [31]

Für die Umsetzung der rheotaktischen Ausrichtung von EPS wurden jedoch die generischen Merkmale für das Wachstum der Biofilme in der Natur aufgegriffen. Hierzu zählen:

- Bewuchsfläche mit einem Winkel von 10-90 ° zur Bodenfläche
- Breitflächige Überströmung der Bewuchsfläche mit einer Flüssigkeit z.B. über eine Düse
- Oberfläche der Bewuchsfläche mit Hindernissen oder einer gewissen Oberflächenbeschaffenheit zur Anbindung der Mikroorganismen
- Ausreichende Versorgung des Biofilms mit Luft/Sauerstoff
- Versorgung des Biofilms mit Nährstoffen z.B. über ein Nährmedium

Diese Herangehensweise führte bei der Entwicklung eines Versuchsaufbaus und der späteren Bewuchsfläche zu einem anderen Ergebnis, als die liegende Bauweise der statischen Biofilmreaktoren. Abbildung 37 zeigt die spätere Umsetzung der Forschungs idee im Labor. Es wurde versucht einen einfachen, variierbaren und kostengünstigen Versuchsaufbau zu entwickeln.



**Abbildung 37:** (1) Flussdiagramm für den 2D-Versuchsaufbau; (2) Versuchsaufbau im Labor mit verschiedenen Einbauten; (3) verschiedene 3D-gedruckte Bewuchsflächen mit unterschiedlich tiefen Rillen und einer aufgesetzten Düse.

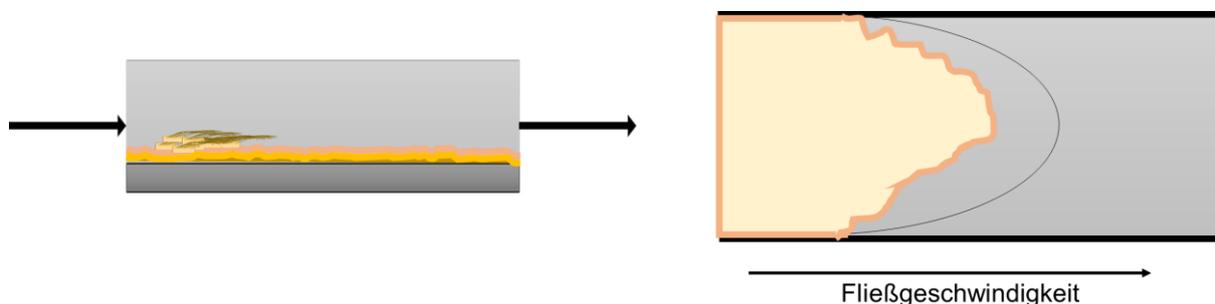
Als Bioreaktoren wurden Weithalsflaschen (Flaschenöffnung von 65 mm) verwendet. Für die gleichmäßige und laminare Überströmung der Bewuchsfläche mit Medium wurde eine Breitstrahldüse mit Führung für den Peristaltikschlauch konstruiert, Abbildung 38. Es wurden verschiedene Geometrien der Düsen getestet, wobei durch unterschiedliche Breiten der Düsenschlitze versucht wurde Einfluss auf den Medienfluss zu nehmen. Die gepulste Zufuhr des Mediums, über die Peristaltikpumpen, lässt sich durch die zusätzliche Geometrie etwas ausgleichen und das Medium gleichmäßiger über die Fläche strömen. Berechnungen der Reynolds-Zahl ( $Re$ ) nach den Vorgaben von Lewandowski et al. mit einem Düsenschlitz von 0,5 mm, 0,75 mm und 1 mm bei maximaler Leistung der Peristaltikpumpe von 450 mL/min haben gezeigt, dass sich durch die Breite der Düsenöffnung das Fließverhalten des Mediums nur geringfügig verändern lässt. Die maximal erreichte  $Re$  von 500 wurde bei einem Düsenschlitz von 1 mm auf  $Re$  492 gesenkt.



**Abbildung 38:** Verschiedene Düsengeometrien für die gleichmäßige Überströmung der Bewuchsflächen: (1) Breiter Düsenschlitz (0,75 mm) mit Stegen für ein besseres 3D-Druck-Ergebnis; (2) ähnliche Düse wie links (Schlitz 0,5 mm) nur ohne Stege; (3) Düse mit dünnerer Öffnung (0,3 mm).

Ähnlich der Medienführung in einem kontinuierlich betriebenen Biofilmreaktor von Lewandowski et al., soll auch über die Bewuchsfläche eine Strömung mit der  $Re$  kleiner 2000 für laminare Strömung fließen [31]. Strömungsversuche und Berechnungen haben gezeigt, dass der Einfluss auf die  $Re$  vor allem durch den Volumenstrom gelingt. Das Verhältnis von Volumenstrom zur  $Re$  verläuft direkt proportional. Bei einem Volumenstrom von 250 mL/min liegt die  $Re$  beispielsweise nur noch bei 278. Bei dieser Strömungsgeschwindigkeit breitet sich keine gleichmäßige Strömungsfront über die Bewuchsfläche aus und deshalb kann auch kein Biofilm über die ganze Breite wachsen. Die aufgestellten Berechnungen (Ergebnisse nicht gezeigt) wurden ohne Biofilm und unter der Annahme, dass das wässrige Medium einer kinematischen Viskosität von Wasser bei 20 °C entspricht, berechnet. Der Aufwuchs von Mikroorganismen, die Bildung von BC und wasserlöslichen EPS wurde nicht berücksichtigt, da diese permanent die strömungsdynamischen Gegebenheiten verändern. Beispielsweise wachsen BC-Pellikel im Laufe der Fermentation in Schläuchen und in der Düse, wasserlösliche EPS erzeugen Viskositätsveränderungen des Mediums und die Begasung mit Druckluft erzeugt bei wenig verbleibendem Medium Blasen und Leerlaufzeiten im Peristaltikschlauch.

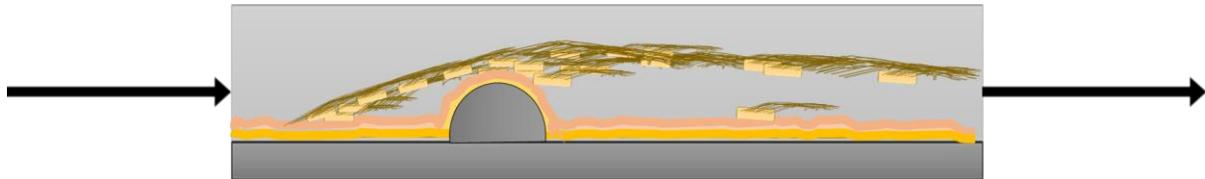
Die gewünschte laminare Strömung etabliert sich auf der Bewuchsfläche erst nach 6 cm, nach dem Austritt des Mediums aus der Düse, wie auch das Strömungsmuster von Abbildung 39 durch die bogenförmige Linie zeigt. Je geringer die Pumpenleistung wird, desto schneller verkürzt sich diese Eintrittslänge [31]. Durch den Biofilmbewuchs verändern sich die Strömungsgeschwindigkeiten über die Fläche. Die gezackte Fläche des Strömungsmusters zeigt, wie sich die laminare Strömung zu einer teils turbulenten Strömung verändert.



**Abbildung 39:** Stilistisch dargestellter, kontinuierlich betriebener Biofilmreaktor (links) mit Biofilm; Muster der Strömungsgeschwindigkeit in einer laminaren Strömungsregion mit (gelbe Fläche) und ohne Biofilm (Bogenlinie) (rechts).

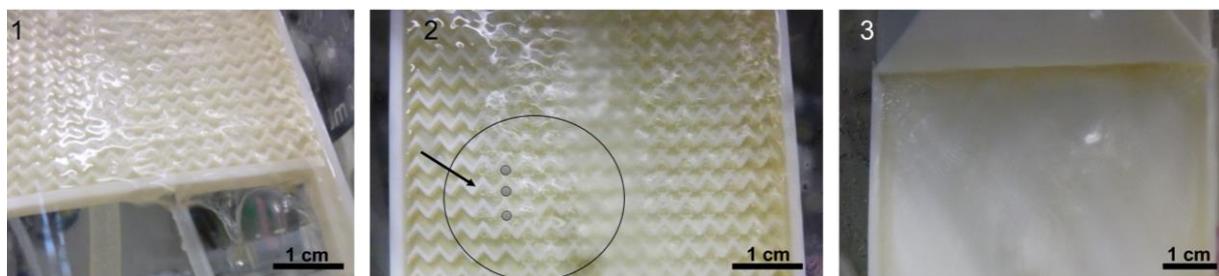
#### 4.7.2. Auswirkungen der Oberflächenbeschaffenheit der Bewuchsflächen auf die BC-Biofilme

Versuche mit den *Komagataeibacter* haben gezeigt, dass die Bildung von BC über eine komplett gerillte Bewuchsfläche sehr gut gelingt. Die eigenen Beobachtungen werden durch die Studien von Rusconi et al. und Stoodley et al. unterstützt. Sie haben beobachtet, dass Biofilmschleppen in einer fluidischen Strömung an Punkten mit erhöhter Scherspannung entstehen [218, 219, 293]. Untersuchungen mit verschiedenen Strömungssituationen konnten zeigen, dass freischwimmende Streamer, also fadenförmige Biofilme, aufgrund von Erhebungen in wasserführenden Kanälen entstehen können [218, 219]. In den Ecken sammeln sich Polysaccharide und bilden die Vorstufe der Biofilme. Abbildung 40 zeigt schematisch die Entwicklung eines fadenförmigen Biofilms aus *Komagataeibacter* und BC.



**Abbildung 40:** Entwicklung eines fadenförmigen BC-Biofilms mit *Komagataeibacter* und BC.

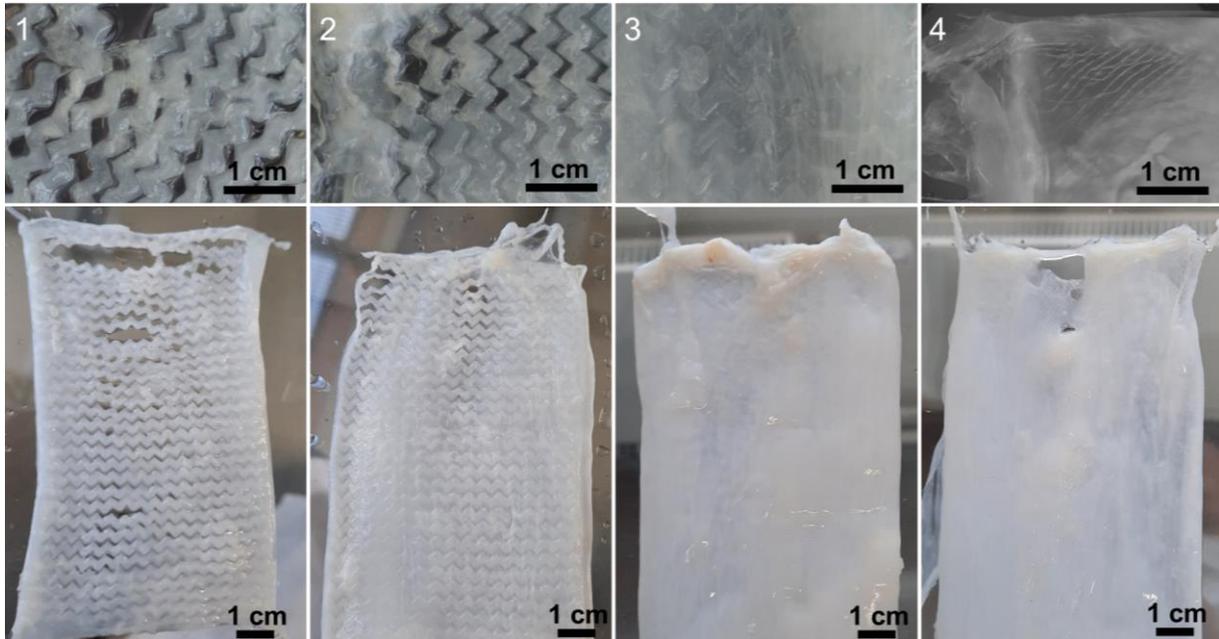
Eigene Versuche mit verschiedenen Oberflächenbeschaffenheiten und Tiefen der Strömungsbrecher, führten zu folgenden Beobachtungen. Abbildung 41, Bild 1, zeigt die Strömung des Mediums über eine gerillte Oberfläche. Auf Bild 2 sind Blasen zwischen den geriffelten Strömungsbrechern erkennbar. Es scheint, als ob in der Mitte der Bewuchsfläche die Strömung über die Erhebungen und die eingeschlossenen Luftblasen hinwegfließt. Bild 3 zeigt eine glatte Bewuchsfläche. Hier ist deutlich zu erkennen, dass das Medium am Anfang der Fermentation vor allem an den Rändern, der Begrenzung der Bewuchsfläche zu erkennen ist. Hier ist die Strömungsgeschwindigkeit gleich null und die Mikroorganismen besiedeln oftmals zuerst diese Flächen. Die Strömung des Mediums verteilt sich dennoch über die ganze Fläche, auch wenn sie kaum zu sehen ist. Die hydrophobe Oberfläche der PLA-Drucke fördert dieses Phänomen. Nach mehreren Stunden Wachstum der Mikroorganismen in diesem System, scheinen sich die Viskosität des Mediums und die Eigenschaften der Oberfläche verändert zu haben. In den meisten Versuchen konnte dann eine flächenüberspannende Strömung des Mediums beobachtet werden und der Bewuchs des Biofilms erfolgte gleichmäßig über die gesamte Fläche.



**Abbildung 41:** (1) Strömung über gerillte Oberfläche; (2) Bildung von Blasen zwischen den Strömungsbrechern (graue Punkte); (3) Strömung über eine glatte Oberfläche der Bewuchsfläche.

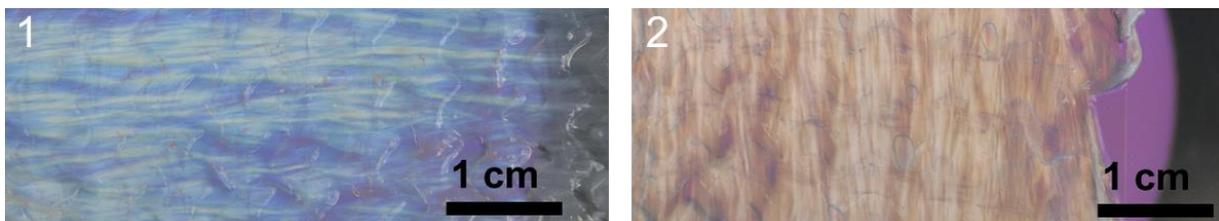
Wachstumsversuche auf diesen Bewuchsflächen erzielten die Biofilme aus Abbildung 42. Hier ist ein deutlicher Unterschied in der Qualität des BC-Materials erkennbar. Für eine anisotrope Ausrichtung der BC-Fibrillen eignet sich eine glatte Bewuchsfläche besser. Starke Vertiefungen ermöglichen eine schnellere Besiedelung, führen aber zu einem unterbrochenen Material mit eher isotroper BC-Verteilung. Hier ist allenfalls die oberste Schicht ausgerichtet.

Die Kahmhaut aus Bild 1 war im Vergleich zur Kahmhaut von Bild 4 eher schwer aus der Bewuchsfläche zu entfernen. Die Mikroorganismen sind mit ihrem BC-Netzwerk in die Vertiefungen eingewachsen. Dieser Bewuchsflächentyp eignet sich für eine dauerhafte Besiedelung der Mikroorganismen auf einer Oberfläche, wenn damit beispielsweise Metabolite oder das EPS Acetan kontinuierlich produziert werden sollen.



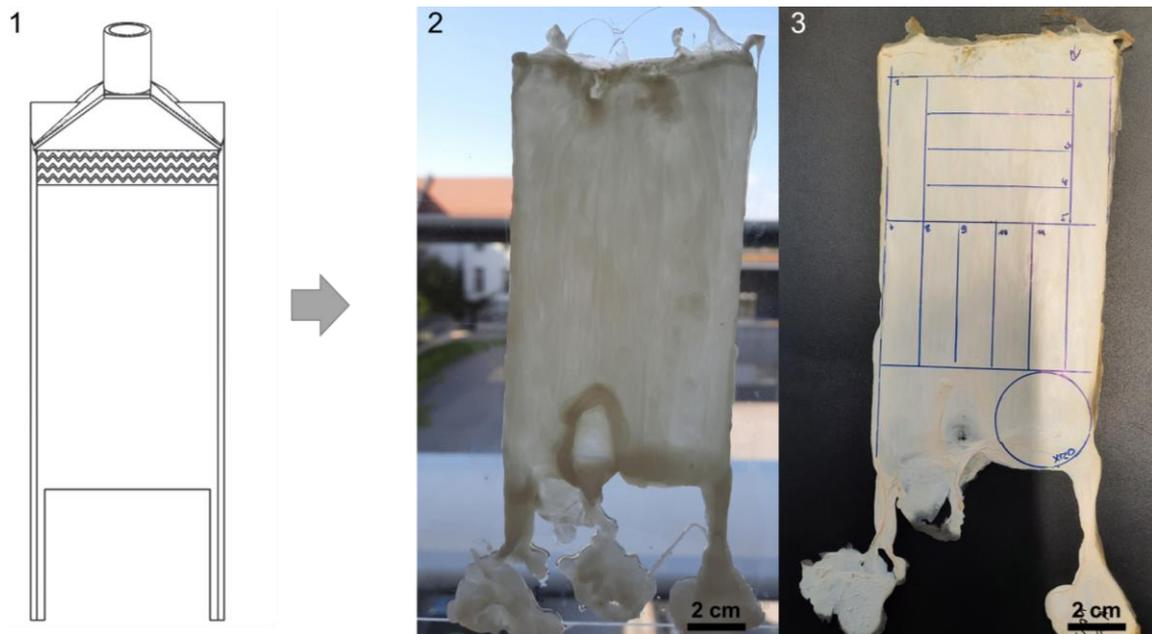
**Abbildung 42:** Autoklavierte und gereinigte Kahmhäute nach dem Wachstum auf den unterschiedlich tief gerillten Bewuchsflächen: (1) 15 mm tiefe Rillen; (2) 10 mm tiefe Rillen; (3) 5 mm tiefe Rillen; (4) glatte Oberfläche.

Die Bilder von Abbildung 43 zeigen trotz der gerillten Struktur, auf der Unterseite der gezeigten Proben, eine Ausrichtung der BC. Je nach Drehung der Proben zur Phase erscheint die BC blau oder orange. Diese Interferenzfarben sind nur bei einer Ausrichtung der Cellulosekristalle in den kristallinen Zonen der BC zu erkennen. Ungerichtete Proben zeigen sich opal und ohne definierte Farbe. Die oberste Schicht über den eingewachsenen BC-Körpern scheint sich demnach makroskopisch gut nach der Strömung ausgerichtet zu haben und stromlinienförmig weitergewachsen zu sein.



**Abbildung 43:** Lichtmikroskopische Aufnahmen, mit polarisiertem Licht und einer  $\Delta\lambda = 525$  nm Verzögerungsplatte, eines in die Bewuchsfläche eingewachsenen BC-Pellikels. (1) Interferenzfarbe Blau; (2) Interferenzfarbe Orange, da die Probe um  $90^\circ$  gedreht wurde.

Aufbauend auf diese Ergebnisse wurde schließlich eine Bewuchsfläche konstruiert, die kurz nach dem Auftreffen des Volumenstroms aus der Düse, eine leicht geriffelte Oberfläche aufweist. Durch diese Erhebungen werden leichte Verwirbelungen erzeugt, die Strömung etwas gebrochen. Dadurch können sich die *K. sacrofermentans* leichter ansiedeln. Durch die Ausbildung eines Sekundärflusses werden sie schließlich dazu angeregt sich auszurichten und Streamer zu bilden. Es konnten Großteils homogene 2D-BC-Biofilme generiert werden, Abbildung 44.



**Abbildung 44:** (1) Bewuchsfläche mit Strömungsbrechern am Anfang der Wachstumsfläche; (2) nasser BC-Biofilm; (3) trockenes BC-Material mit aufgezeichneten Prüfkörpern.

Das weitere Verhalten der sich bildenden Biofilme wurde von Hohne et al. und Shaw et al. mit dem von viskoelastischen Polymermaterialien, mit Relaxationszeiten in der Größenordnung von Sekunden oder Minuten verglichen [294, 295] und lässt sich nur schwer vorhersagen. Den eigenen Ergebnissen mit *K. sucrofermentans* zu folge, kann der größte Einfluss auf die Biofilmbildung durch die vorgegebene Geometrie, die Strömungsgeschwindigkeit, das Medium und die Begasung genommen werden.

#### 4.7.3. Mechanische Parameter der BC

Die mechanischen Eigenschaften der rheotaktisch hergestellten 2D-BC-Proben werden zunächst mit Holz und Papier in Tabelle 4 verglichen. Obwohl alle Materialien aus Cellulose bestehen, sind die Eigenschaften doch sehr unterschiedlich. Generell kann festgestellt werden, dass die eigenen 2D-BC-Proben in Bezug auf das E-Modul, die geometrische Dichte und die Zugfestigkeit im Bereich der Holzwerkstoffe liegt [105, 109]. Da die plastische Verformung die Fähigkeit von Feststoffen beschreibt, sich unter einer Kraftereinwirkung nach Überschreiten einer Elastizitätsgrenze irreversibel zu verformen, kann sie als Indikator für die Vorzugsrichtung im Material betrachtet werden. Die rheotaktisch gewachsenen Kahmhäute || hatten eine doppelt so große Plastizität, als die der stehend gewachsenen BC-Pellikel. Die durch Mikroskopie und Histogrammierung festgestellte Orientierung im Material scheint auf die Materialeigenschaften einen direkten Einfluss zu haben. Laut Moon et al. werden die Brucheigenschaften von Cellulose-Nanopartikelstrukturen und Verbundwerkstoffen in geringerem Umfang als das Elastizitätsmodul untersucht und oftmals in der Literatur nur die Arbeit-bis-Bruch- und SEM-Bilder von Bruchflächen angegeben [105]. Generell hängt die Brucharbeit qualitativ mit der Zähigkeit zusammen. Sie wird durch Messen der Fläche unter der Spannungs-Dehnungs-Kurve bestimmt und stellt die Energie dar, die einem Material bis zum Bruch verliehen wird. Zäh Materialien haben eine hohe Brucharbeit, während spröde Materialien niedrigere Werte haben. Damit ein Material zäh ist, muss es sowohl eine hohe Festigkeit als auch eine große Bruchdehnung aufweisen, Tabelle 4.

**Tabelle 4:** Fundamentale Eigenschaften von Papier und Holz [109] im Vergleich zu den eigenen 2D-BC-Proben [208].

Eigenschaft	Holz [109]	Papier [109]	Stehend gewachsene BC	BC $\perp$	BC $\parallel$
Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	0,3-0,5	0,5-1,5	0,45	0,45-0,57	
E-Modul [GPa]	1,3	1,8-4,3	3	1,8-5	5-12
Zugfestigkeit [MPa]	90-200	20-200	13	12-50	40-112
Bruchlänge [km]	7-30	1-8	3	2-11	7-25
Bruchdehnung [%]	0,6-0,8	0,8-4	0,5	0,75-1,25	1,1
Faserorientierung	orientiert	unorientiert	unorientiert	orientiert	orientiert

Cellulose-Nanostrukturen und Verbundwerkstoffe haben Arbeit-bis-Bruch-Werte, die im Bereich von 0,4–150 MJ · m<sup>-3</sup> liegen. Es wurde gezeigt, dass die Bruchfestigkeit stark vom Volumenanteil und der Bindungsstärke der Partikel beeinflusst wird [105, 296]. Mit einem Wert von 0,6 MJ · m<sup>-3</sup> für die ausgerichteten Proben  $\parallel$ , haben die hergestellten Materialien eher einen spröden Charakter, im Vergleich zu den angegebenen Werten für Verbundwerkstoffen von Moon et al. Das zeigen auch die Bruchflächen der Prüfkörper, mit ihrer gestapelten Struktur aus vielen parallelen Schichten, die aus einem Netzwerk an Fibrillen besteht. Die Spannungs-Dehnungs-Kurven der BC-Materialien zeigten kein Auftreten von Einschnürungen an. Beim Zugversuch tritt nach dem Erreichen der Zugfestigkeit bei duktilen Werkstoffen eine örtliche Einschnürung auf, in deren Bereich dann auch der Bruch erfolgt. Die erzeugten BC-Materialien haben demnach keinen duktilen Charakter.

Die Orientierung von Cellulosefibrillen in einem BC-Pellikel wurde von Franz und Schiebold als „verworrenes, durcheinandergebrachtes Netzwerk von Strängen“ beschrieben [297]. Dennoch beobachteten sie Regionen mit einheitlichen Pfadunterschieden unter gekreuzten Polfiltern, was darauf hindeutet, dass Fibrillen lokal parallel ausgerichtet sein können. Einflüsse auf die Kristallinität der Cellulosenanofibrillen erfolgen bereits bei der Biosynthese. Der anfänglich hohe amorphe Gehalt kann durch den Extrusionsprozess aus dem Mikroorganismus zu Änderungen in der Cellulosekettenordnung führen. Im Allgemeinen bestehen Cellulose-Elementar fibrillen entweder entlang ihrer Länge oder in Querrichtung aus abwechselnd kristallinen und amorphen Bereichen. Die Koexistenz von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Polymorphen, deren Verhältnis zueinander und damit der Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften sind unklar. Störungen der Bandanordnung führen zu einer  $\beta$ -Kristallstruktur [298-300]. Diese Veränderung der Morphologie wurde mit der Abnahme des Anteils von  $\alpha$  in der Mikro fibrille in Verbindung gebracht [301].  $\beta$  bildet sich vorzugsweise in den isolierten Elementar fibrillen, die frei von Zwängen sind, wenn sie in der normalen Bandanordnung aggregiert sind [299]. Folglich können die Eigenschaften der späteren BC-Materialien durch die Variationen dieser Variablen beeinflusst werden [69]. Die Steuerung der axialen Orientierung von Strukturelementen bietet in jedem Material die Möglichkeit, die Anisotropie seiner Eigenschaften zu bestimmen. Die hierarchische Struktur von BC macht sie daher für ein breites Anwendungsspektrum attraktiv. Singhsa et al. haben mit ihren Versuchen herausgefunden, dass die Kristallgröße und der  $\alpha$ -Gehalt kaum durch verschiedenen Kohlenstoffquellen beeinflusst werden kann. Die Kristallinität zeigte jedoch erhebliche Unterschiede [69]. Die Analyse ihrer Arbeit zeigt, dass die Reflexe (im XRD) der geschüttelten Proben zu weiteren Winkeln verschoben wurden. Die d-Abstandsänderungen weisen darauf hin, dass sich der Anteil an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cellulose verändert hat [123, 302]. Laut Bi et al. ist der Cellulose- $\alpha$ -Gehalt in einem Sternchen-ähnlichen BC höher, als in den festen kugelförmigen BC Sphären. Dieser Befund legte nahe, dass die Kristallisation von Cellulose-Mikro fibrillenstrukturen durch ihre Morphologie beeinflusst werden kann [114].

Tabelle 5 stellt Ergebnisse für die Kristallinität und Kristallitgröße von Watanabe et al. den eigenen Ergebnissen für stehend gewachsene und rheotaktisch gewachsene BC gegenüber [303]. Die prozentuale Kristallinität von Cellulose unter bewegter Kultur ist niedriger, als unter statischen Bedingungen. Es scheint, als ob die Bewegung die Aggregation der BC-Mikrofibrillen stören könnte und dadurch eine geringere Kristallinität verursacht [299, 304].

**Tabelle 5:** Mechanische Parameter bewegter und stehend kultivierter BC [303], ergänzt mit den eigenen Ergebnissen aus der ersten Veröffentlichung für rheotaktisch gewachsenen 2D-BC-Körper [208].

<b>Mechanische Parameter</b>	<b>Bewegte Kultur [303]</b>	<b>Stehende Kultur [303]</b>	<b>Stehend gewachsene BC</b>	<b>Rheotaktisch gewachsene BC</b>
Kristallinität (%)	72	80	83	85-87
Kristallitgröße (nm)	6.9	7,4	8,3	8,1-9,0

Die rheotaktisch gewachsenen BC-Proben liegen über den Werten der stehend gewachsenen Parameter. Der Einfluss der Rheotaxis scheint sich also nicht negativ auf diesen Faktor auszuwirken. Die entwickelte Methode kann grundlegend nicht mit einer bewegten Kultivierung verglichen werden. Die Summe aller bisher festgestellten mechanischen Eigenschaften der Materialien, die Erkenntnisse aus der Literaturrecherche und die diskutierten eigenen Erfahrungen mit dem Versuchsaufbau und den 2D-BC-Körpern, weisen darauf hin, dass es sich um eine neue Fermentationsmethode handelt, die nicht mit der bisher verbreiteten bewegten oder stehenden Kultivierung von BC verglichen werden kann.

#### 4.7.4. Bioabbaubarkeit und Konservierung

Unabhängig von ihrer Herkunft kann Cellulose in der Natur vollständig biologisch abgebaut werden und ist somit nachhaltig und schonend für die Umwelt. Im Vergleich zur pflanzlichen Hemicellulose ist BC ein reines Homopolymer. Mikroorganismen können Makromoleküle wie Cellulose nicht einfach in ihren Metabolismus aufnehmen, sie müssen zuerst hydrolysiert werden. Der Abbau wird durch Wasserstoffbrückenbindungen und mikrokristalline Bereiche erschwert. Deshalb wird Cellulose vorzugsweise in amorphen Bereichen angegriffen. Der Abbau erfolgt durch extrazelluläre Enzyme. Diese werden von Bakterien, Pilzen und Algen gebildet und sind daher allgegenwärtig. [65, 305] Aerobe Bakterien, die Cellulose abbauen können, sind zum Beispiel *Cellulomonas*-, *Cytophaga*- und *Streptomyces*-Arten. Wichtige Vertreter unter den Anaerobiern sind *Bacteroides*-, *Clostridium*- und *Ruminococcus*-Arten. Unter den Pilzen ist die Fähigkeit bei drei ökologischen Gruppen vorhanden, den Schimmelpilzen des Bodens, einigen phytopathogenen Pilzen und den holzerstörenden Basidiomyceten und Ascomyceten [306, 307], Abbildung 45.



Im Hinblick auf die Enzymatik gibt es Analogien zum Abbau von Stärke. Auch hier gibt es Hydrolasen, so genannte Endocellulasen, welche die glykosidische Bindung der Cellulose eher im Inneren des Moleküls schneiden, wobei verkürzte Celluloseketten entstehen. Andere Enzyme, so genannte Exocellulasen, spalten an den entstandenen freien, nicht-reduzierenden Enden. Es findet eine schrittweise Depolymerisierung der Cellulose statt [109]. Die unverzweigten Cellobiose-Einheiten können leicht von Cellulasen und Cellobiohydrolasen, aus dem Cellulosom-Multienzymkomplex [308], aufgebrochen werden [65].

**Abbildung 45:** Schimmelnder BC-Pellikel aus einer eigenen Kombucha Kultur.

Neben dem biologischen Abbau der Cellulose ist auch der Abbau durch starke Säuren und Basen möglich [309]. Somit ist die reine BC ein umweltfreundliches Produkt, welches nachhaltig biologisch Abbaubar ist und dem natürlichen Kreislauf wieder vollständig zurückgeführt werden kann.

Zudem besitzen die *Komagataeibacter* selbst Endo- und Exocellulasen. Okamoto et al und Standal et al. konnten dies in den Genen der Mikroorganismen nachweisen [310, 311]. Es konnten Endo-1,4- $\beta$ -glucanase und Exo-1,4- $\beta$ -glucosidase gefunden und eine Verkürzung der Celluloseketten festgestellt werden [312, 313]. In wie weit die Mikroorganismen die in der Cellulose gespeicherte Glukose in substratarmen Zeiten wieder verfügbar machen können, wurde von Okamoto et al. untersucht [65, 310]. Aus eigenen Erfahrung mit älteren Kulturplatten konnte festgestellt werden, dass sich manche Cellulosepellikel scheinbar verflüssigen. Dies könnte auf die Aktivität dieser Enzyme hinweisen.

Für die Konservierung der BC-Proben wurden verschiedene Methoden getestet. Das Kritisch-Punkt-Trocknen (KPT), wie auch die Gefriertrocknung erhalten die Struktur der BC-Proben und sind für Strukturanalysen unter dem REM geeignet. KPT-Proben erhalten durch diese Behandlung einen „taschentuchartigen“ Charakter. Sie werden weicher, sehr weiß und sind im Gegensatz zu den gefriergetrockneten Proben nicht brüchig. Die Konservierung mit Salz, zum Entzug der Feuchtigkeit, ergab sehr starre und lederartige Materialien. Die Materialien konnten durch das Trocknen an der Luft am besten für die Materialprüfungen vorbereitet werden. Sie verlieren dabei ihren 3D-Charakter, da die Netzwerkstruktur durch die Trocknung kollabiert, enthalten aber nach wie vor ihre Vorzugsrichtung und mechanische Stabilität.

### **Beantwortung der ersten Hypothese:**

- 1) Anisotrope Biofilme aus BC können durch Manipulation der Wachstumsbedingungen generiert werden.

## 4.8. 3D-BC-Körper

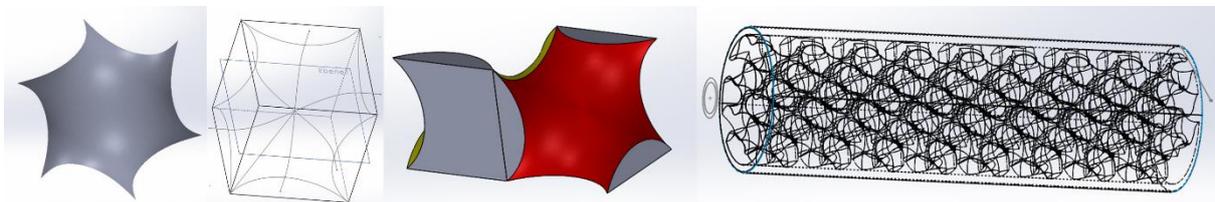
### 4.8.1. Konstruktion des Gyroidkörpers und Anpassung des Versuchsaufbaus

Der ursprüngliche Versuchsaufbau, für das Wachstum der 2D-BC-Biofilme mit Vorzugsrichtung im Material, wurde um eine Flusszelle erweitert. In diese Flusszelle wurden die 3D-gedruckten PLA-Körper eingeführt und so lange inkubiert, bis sie durchwachsen waren. Nach der Entfernung des PLA-Templates konnten BC-Gyroidkörper erhalten werden. Bild 3 der Abbildung 46 zeigt einen fertigen BC-Gyroid nach dem Trocknen.



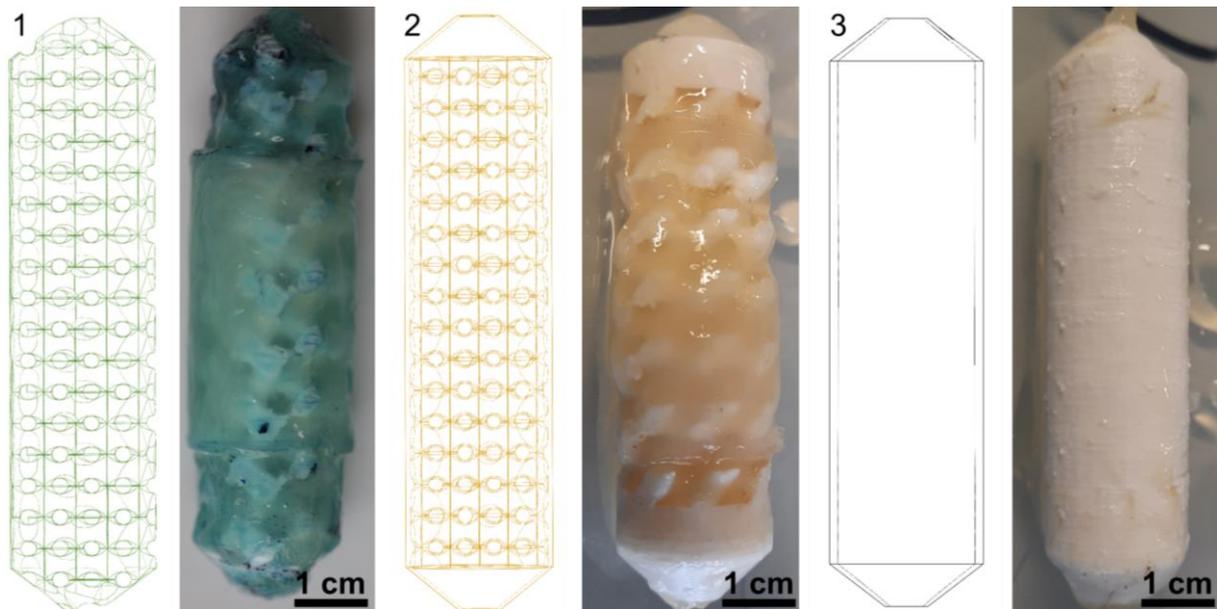
**Abbildung 46:** Flussdiagramm für den 3D-Versuchsaufbau (links); (1) 3D-gedruckte Gyroidkörper; (2) Flusszelle in der Flasche mit Einbau; (3) trockener Gyroid-Körper aus BC.

Die Konstruktionen der späteren Bewuchsflächen für die Gyroidkörper wurden mit SolidWorks konstruiert. Zuerst wurde eine Gyroid-Oberfläche in einen Würfel konstruiert und anschließend die Hälfte des Würfels gefüllt. Mit diesem Baustein wurden die Einbauten in die Flusszellen zusammgebaut. Abbildung 47 zeigt die einzelnen Schritte bis zum fertigen Gyroid-Körper.



**Abbildung 47:** Konstruktion der Gyroid-Körper mit SolidWorks.

Aus dem Grundkörper wurden drei verschiedene Varianten entwickelt. Abbildung 48 zeigt die verschiedenen Template als Konstruktionszeichnung und als durchwachsene Körper mit Biofilm, kurz nach der Ernte. Es hat sich herausgestellt, dass sich durch die verschiedenen Geometrien unterschiedliche BC-Körper generieren lassen. Der BC-Körper des ersten Gyroids aus Abbildung 48 ist nach außen hin geschlossen. Zwischen dem PLA-Templat und der Flusszelle ist BC gewachsen und hat die Lücke ausgefüllt. Bei den offenen Konstruktionen wächst der Mikroorganismus über den Gyroid hinaus und das Medium fließt am Rand der Flusszelle zum Ausgang der Flusszelle. Hier können Teilströme des Mediums den Gyroid Körper verlassen. Die Ausrichtung der BC-Fibrillen wird nicht so gleichmäßig, wie im geschlossenen Körper. Es hat sich herausgestellt, dass das Entfernen der PLA-Struktur bei Form 1 und 2 schwerer zu bewerkstelligen ist, als bei Form 3. Mit dieser ummantelten Gyroid-Struktur lassen sich schönere Gyroide erzeugen, da die Mikroorganismen und die BC-Produktion auf einen Raum begrenzt sind und das eingebrachte Medium durch den ganzen Körper fließt. Diese Abgrenzung zur Flusszelle erzeugt klarere Strukturen und keine Ummantelung der Struktur mit BC, wie bei Form 1 und 2.



**Abbildung 48:** Konstruktionszeichnungen und gewachsene Biofilme auf den PLA-Templaten: (1) Komplette Gyroidstruktur für die Flusszelle; (2) Gyroid-Säule mit konischen Zuläufen an den Enden; (3) Gyroid-Säule wie bei Bild (2) nur mit einer PLA-Schicht ummantelt.

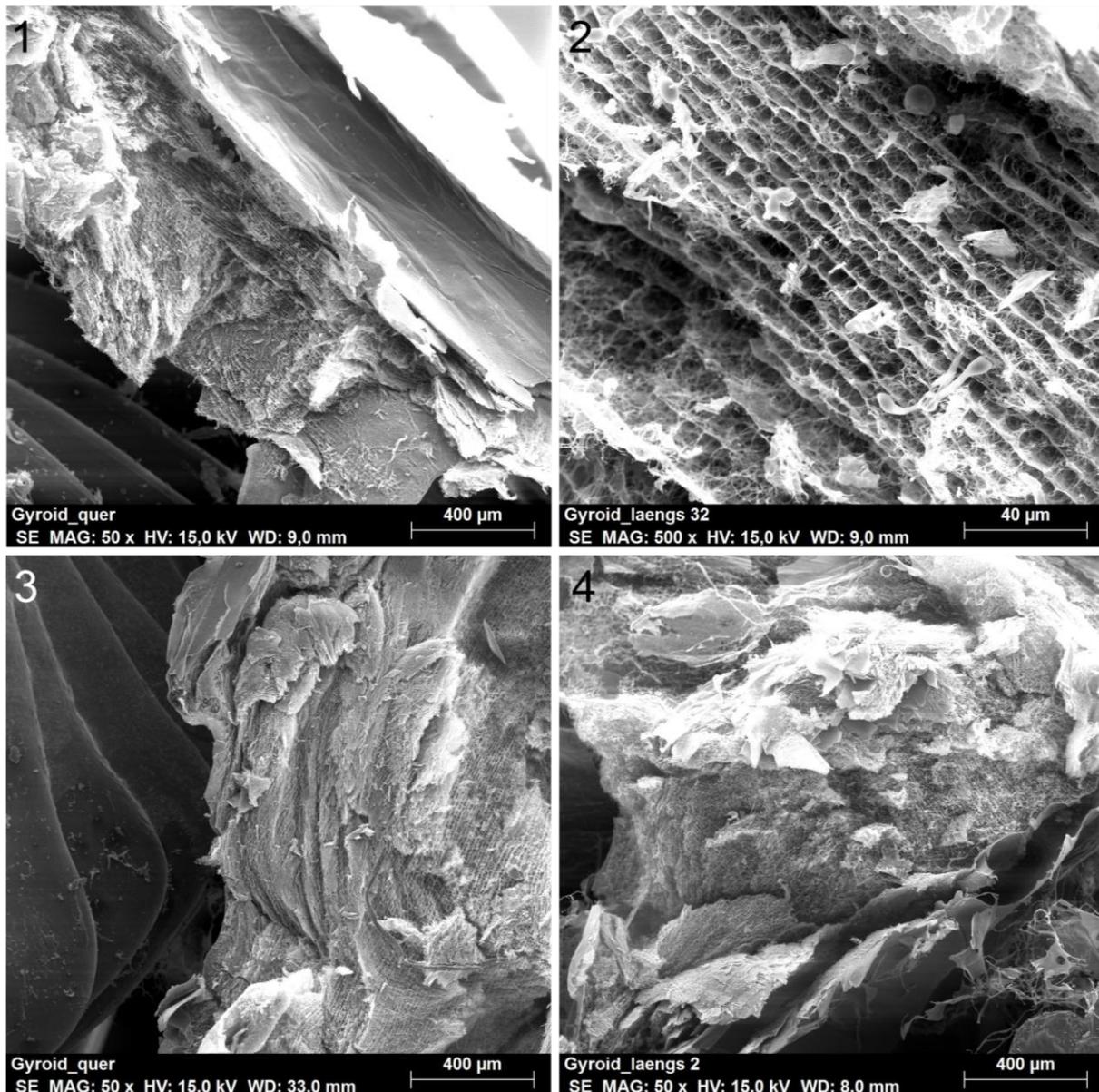
#### 4.8.2. 3D-Materialien mit Macro- und Nanoporosität

Die Entwicklung von hierarchisch geordneten Materialien mit maßgeschneiderter Macro- und Nanoporosität stellt auch weiterhin eine Herausforderung im Bereich der Materialentwicklung dar. Derartige Materialien sind essentiell für eine große Zahl von Technologien, insbesondere im Bereich des „Tissue Engineering“. Die topographische Kontrolle ist beispielsweise für die Zellausrichtung (oder -migration) von eukaryotischen Zellen innerhalb der ausgerichteten Poren im Knochen wichtig [314]. Torres et al. haben hierfür eine einfache Inverse-Template-Strategie entwickelt, welche die Herstellung von nanofibrillären Hydrogel-Gerüsten mit definierter Macro- und Nanoporosität ermöglicht. Das auflösbare Gyroid-Gerüst auf Basis eines basenlöslichen Harzes ermöglicht es nach der Infiltration mit Hydrogelen aus hochkristallinen und steifen Cellulose Nano Fibrillen die Template einfach in schwach alkalischen Lösungen aufzulösen. Auf diese Weise werden Hydrogel-Kopien des Gerüstes erzeugt.

Für die Herstellung gewachsener BC 3D-Körper in der zweiten Veröffentlichung wurde auch eine Opferschablone verwendet. Der Ansatz ist im Prinzip ähnlich. Für die BC-Gyroide wurden PLA-Drucke verwendet und mit Dichlormethan gelöst. Es konnten vollkommen durchgewachsene BC-Gyroide aus dem Lösungsmittel entnommen werden. Durch Waschen und Quellen in vollentsalztem Wasser konnte die ursprüngliche BC-Struktur annähernd wiederhergestellt werden. Während des Gefriertrocknens sind die Proben um 10 % in der Länge und 20 % im Durchmesser geschrumpft. Unter der Annahme, dass der Füllfaktor des Gyroids von 0,5 beibehalten wurde, wurde die endgültige geometrische Dichte der getrockneten Materialien im Inneren der Gyroidstreben auf  $50 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  geschätzt. Dieser Wert liegt etwas über den publizierten Werten für Aerogele aus Siliziumoxid, Aluminiumoxid, Zinnoxid, Chromoxid, Kohlenstoff oder Kieselsäure [198]. Diese Aerogele zeigen typischerweise Porositäten bis zu 99 %, Schüttdichten im Bereich von  $0,004\text{--}0,500 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$  und Oberflächen zwischen  $100$  und  $1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  [315, 316]. Laut Heath et al. wurden mesoporöse BC-Aerogele aus stehend gewachsener BC mit einer durchschnittlichen Dichte von  $8,25 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  und einer spezifischen Oberfläche von  $200 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  durch Lösungsmittel-

austausch und KPT von *K. xylinus* Pelliceln hergestellt. Eigene Messung stehend gewachsener, gereinigter und lyophilisierte BC-Proben haben ähnliche spezifische Oberflächen von ca.  $230 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  ergeben.

Bei den Messungen der eigenen Silica-Nachbildungen der rheotaktisch gewachsenen Gyroid BC-Körper konnten durchschnittliche spezifische Oberflächen von  $A = 270 \pm 11 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  gemessen werden. Die proportionalen Porengrößenverteilungshistogramme zeigten eine breite Verteilung der Porengrößen im Submikronbereich, mit einem bemerkenswerten Maximum bei 20 nm. Durch das rheotaktische Wachstum durch den Gyroidkörper konnte eine höhere Dichte und eine größere Oberfläche, als für stehend gewachsene BC-Körper aus der Literatur erzielt werden. Dies gründet auf dem kompakten Wachstum der *K. sacrofermentans* unter den gegebenen strömungsdynamischen Gegebenheiten in der Gyroidform. Abbildung 49 zeigt eine Auswahl an Schnitten durch einen gefriergetrockneten Gyroid mit seiner PLA-Vorlage.



**Abbildung 49:** REM-Aufnahmen von Schnitten durch einen gefriergetrockneten Gyroid in der PLA-Vorlage: (1) und (3) sind Querschnitte und (2) und (4) sind Längsschnitte aus der Probe.

In allen REM-Aufnahmen sind hierarchische BC-Strukturen erkennbar. Wie bei den stehend gewachsenen Pelliceln wurde der BC-Körper auch hier in Schichten aufgebaut, die sich trotz

permanently verändernder Strömungsgeschwindigkeiten und Querschnitten gleichmäßig entwickelt haben. Der BC-Biofilm scheint die PLA-Form auf den vorhandenen Oberflächen besiedelt zu haben und dann schichtweise, bis zum vollständigen Verschluss der Gyroidkanäle, gewachsen zu sein. Auf den Bildern sind die Stufen des 3D-Druck-Filaments deutlich zu erkennen. Das weist ebenfalls darauf hin, dass sich auch ohne das Lösen des PLAs der BC-Körper beim Gefriertrocknen zusammenzieht.

Im Gegensatz zum Ansatz von Torres et al. und den anderen Methoden ziehen sich die Cellulosefibrillen wie ein Netzwerk durch den ganzen 3D-Körper. Der Gyroid erleidet weder bei der Behandlung mit Lösungsmittel noch durch das Autoklavieren einen Strukturverlust. Laut Moon et al. wechselt Cellulose I ( $E_{\text{Cellulose I}} = 138 \text{ GPa}$  [317]) durch das Auflösen und Regenerieren seine native kristalline Struktur zur mechanisch viel schwächeren Kristallstruktur der Cellulose II (Cellulose II,  $E_{\text{Cellulose II}} = 88 \text{ GPa}$  [318]). Die für die Zähigkeit wichtigen nativen kristallinen Abmessungen können nicht regeneriert werden. Dieser Nachteil motivierte die Forscher, native Cellulose zu isolieren [105]. Durch die bakterielle Herstellung der BC-Fibrillen, an der gewünschten Stelle im Material, bleibt die Cellulose I Struktur erhalten. Dies müsste zu einem höheren Elastizitätsmodul des 3D-Körpers führen. Zugversuche wurden bisher mit den rheotaktisch gewachsenen BC-Gyroid-Körpern noch nicht unternommen.

Das Einsatzgebiet der 3D-gewachsenen BC-Körper ist wie das der 2D-BC-Pellikel vielversprechend. Theoretisch können die meisten der publizierten Verfahren der BC-Kultivierung, des Pellikel-Managements, der Wasserentfernung und der chemischen Modifikation auch auf die 3D-Körper angewandt werden.

### **Beantwortung der zweiten Hypothese:**

- 2) Monolithische Körper aus BC können sowohl hierarchisch, porös, wie auch global anisotrop strukturiert werden.

## **5. Ausblick**

Im Forschungsfeld der BC gibt es zahlreiche Möglichkeiten die eigene Arbeit mit den Erkenntnissen anderer Forschungsgruppen zu vereinen und daraus neue Materialien oder Anwendungsgebiete zu generieren. In den folgenden Abschnitten werden nur einige wenige Ansätze beschrieben.

### **5.1. Zusätze zum Kultivierungsmedium für die in vitro Veränderung der BC-Struktur**

BC ist ziemlich einzigartig im Vergleich zu anderen Cellulose-Mikrofibrillenquellen, da es einen zugänglichen Weg gibt, um den BC-Mikrofibrillen-Biosyntheseprozess und die anfängliche Mikrofibrillenkonfiguration innerhalb des Pellicels während der Entstehung zu verändern [105]. Ibrahim et al. haben Wachstumsversuche mit den Farbstoffen: Fluorescent Brightener, Direct Blue und Direct Red im Medium von *K. xylinus* durchgeführt. Sie konnten mittels XRD feststellen, dass die Farbstoffe die Cellulose direkt beeinflussen haben [319].

Die Zugabe von verschiedenen Chemikalien zum Medium ist verfahrenstechnisch eine einfache Möglichkeit, um in einem bestehenden System Änderungen zu implementieren. Daher ist es naheliegend, auch für die beiden entwickelten Methoden zur rheotaktischen Ausrichtung der BC, solche Stoffe zu testen und die Veränderungen in der BC-Struktur zu analysieren. Der Einfluss der Kristallinität auf die Wasserbindekapazität und Porenstruktur wurde bereits diskutiert. Diese Veränderungen können die erzeugten Materialien für neue Anwendungen, wie beispielsweise die Gewebezüchtung, interessant machen.

### **5.2. Gewebezüchtung (Tissue Engineering) mit BC**

Eines der Hauptziele des Tissue Engineering ist die Herstellung dreidimensionaler Gerüste mit untereinander verbundenen Poren, um beschädigte oder deformierte Gewebe und Organe zu rekonstruieren oder zu regenerieren [320]. Cellulosebasierte Materialien werden hier bereits verwendet [17]. Die porösen 3D-Körper aus BC können beispielsweise als Coatingsatz für Kollagen für die Entwicklung von Nervenzellen verwendet werden [321]. Da bisher nur stehend gewachsene BC verwendet wurden, wäre es interessant zu sehen, wie die Zellen auf die ausgerichteten Cellulosefibrillen reagieren und ob sich dadurch Veränderungen in der Zellbeschaffenheit, wie beispielsweise der Bildung von Neuronalen Netzwerken bei Nervenzellen hervorrufen lassen [322]. Es wäre wünschenswert, dass die ausgerichteten Cellulosefibrillen den Zellen als Template dienen können und sich so langgestreckte Nervenfasern ausbilden lassen.

### **5.3. Alternative Kohlenstoffquellen für die BC produzierenden Mikroorganismen**

Die Verwendung von alternativen Kohlenstoffquellen für *K. sucrofermentans* wäre die am einfachsten und schnellsten zu bewerkstellende Arbeit, um neue Materialien zu erhalten. Revin et al. postulieren, dass ca. 30 % der Produktionskosten von BC über die Medien entsteht [323]. Somit wäre dies ein interessanter Ansatz, um das rheotaktische Verfahren zur Ausrichtung der BC zukünftig rentabel zu machen. Wie bereits erwähnt, könnten sich hierdurch auch neue Materialeigenschaften ergeben, da jedes Substrat einen Einfluss auf die BC-Synthese und die BC-Fibrillen haben kann.

#### **5.4. Wundauflagen und Transplantate aus BC**

Aus zahlreichen Publikationen ist die BC bereits als Wundauflage und Transplantat nach Verbrennungen bekannt. Hier wird die hohe Wasserbindungskapazität der Cellulosepellikel und ihre Reinheit geschätzt [26, 324]. Es werden bisweilen stehend gewachsene BC-Pellikel oder Hydrogele aus gelöster Cellulose verwendet. Im Vordergrund steht primär die Versorgung der Hautstellen mit Feuchtigkeit und Medikamenten, sowie das schnelle Schließen der Wunde, um Infektionen zu verhindern. Wird wie von Sajjad et al. und anderen Autoren die BC als Hautersatz zur Gewebegeneration verwendet [325], wäre es für die Patienten angenehmer, wenn diese Komposite auf die Bewegungsfreiheit und Dehnbarkeit der jeweiligen Hautstellen abgestimmt werden könnten. Mit der rheotaktischen Ausrichtung der BC könnte je nach Bedarf eine Vorzugsrichtung in das BC Material eingebaut werden. In Anlehnung an die Idee von Kapitel 5.2 könnten so auch Hautzellen mit Vorzugsrichtung erzeugt werden und die Hautersatzauflagen auf den Patienten und die betroffene Hautstelle abgestimmt werden.

#### **5.5. Verbundfilme mit BC**

Für die Verbundfilme mit BC, wird auf die Arbeiten von Nakagaito et al. zurückgegriffen. Hier wurden während des Wachstums der BC-Filme bereits andere Partikel in das Medium der Mikroorganismen gegeben. Durch das Cellulosenetzwerk wurden diese fest in das Material eingebunden und neue Materialien mit besonderen Eigenschaften generiert [175]. Direkte Vergleiche zwischen BC-Verbundfolien und reinen BC-Filmen sind schwierig, da die Verbundfolien typischerweise einen geringeren Volumenanteil an BC-Mikrofibrillen aufweisen und es eine Änderung in der Fibrillenmorphologie gibt [105]. Diese Idee kann dennoch für die Erzeugung verschiedenster Verbundfolien verwendet werden. Ob dies auch bei einem rheotaktischen Aufbau möglich ist, könnte überprüft werden. Sollte dies möglich sein, so hätten diese Materialien eine Vorzugsrichtung und dadurch wären sie in die ehemalige Flussrichtung des Mediums elastischer, was zu neuen Einsatzmöglichkeiten dieser Verbundwerkstoffe führen könnte.

#### **5.6. Rheotaktisch ausgerichtete EPS anderer Mikroorganismen**

Mit den beiden entwickelten Methoden für das Wachstum von 2D- und 3D-Strukturen aus bakterieller EPS können generell auch andere Bakterienarten kultiviert werden. Tabelle 7 führt weitere BC-produzierende Mikroorganismen auf, deren Tauglichkeit getestet werden könnte. Möglicherweise ließen sich Kahmhäute aus BC mit anderen Eigenschaften herstellen, da die Physiologie der Bakterien und deren BC-Synthese unterschiedlich sind.

Neben der BC sind noch weitere EPS bekannt, wie in Tabelle 6 aufgeführt wurde. Die wasserlöslichen EPS könnten durch Quervernetzung stabilisiert und die Eigenschaften der neu entstandenen Materialien getestet werden. So wäre es auch möglich andere EPS-produzierende Mikroorganismen zu verwenden. Vermutlich müsste der Versuchsaufbau auf die jeweiligen Besonderheiten der Mikroorganismen, wie aerobe oder anaerobe Lebensweise, Nährstoffbedarf, Viskosität der EPS usw. angepasst werden. Durch den Einsatz einer 3D-gedruckten Bewuchsfläche ist dies aber relativ leicht zu bewerkstelligen.

## 5.7. Materialien mit Vorzugsrichtung aus Eukaryoten und Pilzen

Die wasserbeständigen Polysaccharide Chitin und Chitosan werden nur von Pilzen der Ordnung *Mucorales* [307] zur Stabilisierung der Zellwand produziert. Ihre Hyphen können bei günstiger Nährstoffversorgung theoretisch unbegrenzt weiterwachsen. Das Myzel wächst dabei jedoch nicht gerade, sondern gleichzeitig in alle Richtungen. Diese Eigenschaft ist für die Abformung und Füllung von Strukturen interessant, scheint bisher aber nicht für einen rheotaktischen Versuchsaufbau geeignet zu sein. Möglicherweise lassen sich diese Lebewesen durch Taxien manipulieren und somit Feststoffe mit gewachsener Vorzugsrichtung aus Chitin und Chitosan generieren.

Hefen können auch verschiedene EPS wie beispielsweise Phosphomannan, bilden [326]. Da Hefen den Mikroorganismen in ihrer Größe und Kultivierung ähnlich sind, könnte der bestehende Versuchsaufbau vermutlich auch dafür verwendet werden.

Neben den Pilzen könnten EPS-produzierende Algen für den Aufbau von gerichteten Materialien eingesetzt werden. Es ist bekannt, dass Algen, ebenso wie die Bakterien, Biofilme generieren können. Xiao et al. beschreiben eine Reihe von interessanten Algenarten und deren EPS [326, 327]. Da Algen Photosynthese betreiben, müsste der Versuchsaufbau eine Lichtquelle beinhalten und auf weitere Besonderheiten der jeweiligen Spezies abgestimmt werden.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Cordt Zollfrank dafür, dass er mich in sein Team aufgenommen hat, mich über die Jahre hinweg beschäftigt und mir dadurch die Promotion ermöglicht hat. Gemeinsam mit meinem Gruppenleiter und Betreuer Herrn Dr. Daniel Van Opdenbosch, dem ich ebenfalls zu größtem Dank verpflichtet bin, konnten wir das Spektrum der Biomediierten Materialsynthese um ein kleines Stück erweitern.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Betreuer für die Forschungsidee an der ich arbeiten durfte, für seine wissenschaftliche Begleitung, für die vielen hilfreichen Ratschläge, für seine Geduld, für die Hilfe bei der Auswertung der materialwissenschaftlichen Daten und für das große Vertrauen in mich und meine Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Jochen Schmid möchte ich für seine Funktion als Mentor, für die vielen hilfreichen biotechnologischen Tipps und die Option auf eine zukünftige Zusammenarbeit danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Bastian Blombach möchte ich mich für die Korrektur der Arbeit bedanken und Herr Prof. Dr. Marc Ledendecker danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ein herzlicher Dank gilt auch Frau Sabine Witzel, Frau Nicole Nowak und Herrn Christian Babut für die technische Unterstützung in den BGP Laboren, die Labororganisation und die vielen kleinen Hilfen im wissenschaftlichen Alltag. Für die organisatorische Betreuung und Koordination der bürokratischen Belange danke ich Frau Petra Peklo. Bei der Fraunhofer IGB und Frau Melanie Speck möchte ich mich für die HPLC-Messungen und die vielen tollen Tipps und Hilfen im mikrobiologischen Labor und bei der Analytik bedanken. Frau Dr. Corinna Urmann danke ich für die kleinen Tipps, den Freiraum und die Unterstützung in der finalen Phase der Dissertation und bis zum Abschluss des Promotionsverfahrens.

Dank gebührt auch meinen ehemaligen Masterandinnen Frau Patricia Wolf und Frau Siqi Wang und meinen Forschungspraktikantinnen Frau Daniela Fröschl und Frau Judith Schorell, die meine Forschungsarbeiten im Rahmen ihrer studentischen Abschlussarbeiten unterstützt haben. Außerdem möchte ich mich beim gesamten „BioPoly-Team“ für das nette Arbeitsklima, die anregenden wissenschaftlichen Gespräche und die vielen kleinen „Motivasen“ bedanken, die im Laufe einer Doktorarbeit durchaus notwendig sind.

Ein riesen großes Danke geht auch an meine Freunde, die mich seit vielen Jahren auf meinem Lebensweg begleiten und mich in meinem Wunsch zur Promotion unterstützt und immer wieder motiviert haben.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie für die große Unterstützung und Motivation danken, die ich nicht nur während der Promotionszeit erfahren durfte. Und ganz besonders möchte ich mich bei meinem absoluten Lieblings-Chemiker bedanken, der mich in allen Lebenslagen unterstützt, bedingungslos zur Seite steht und aushält.

## Übersicht der Veröffentlichungen

### Publikationen als Erstautor:

- GMACH, Yvonne; VAN OPDENBOSCH, Daniel. Threedimensionally patterned, hierarchically and anisotropically structured bacterial cellulose. *Materials Research Express*, 2023, 10. Jg., Nr. 3, S. 035401.
- GMACH, Yvonne; VAN OPDENBOSCH, Daniel. Structural and mechanical anisotropy in rheotactically aligned bacterial cellulose. *Cellulose*, 2022, 29. Jg., Nr. 16, S. 8521-8537.

### Publikationen in Co-Autorenschaft:

- ATOINI, Youssef, et al. From Blue to White: Sustainable Luminescent Metal Organic Framework for Hybrid Light-Emitting Diodes. *Advanced Optical Materials*, 2022, S. 2202643.
- KARL, Florian, et al. Spatio-temporal modelling of electrical supply systems to optimize the site planning process for renewable energies—the case study Power-to-Mobility. *Energy Procedia*, 2016, 97. Jg., S. 92-99.

### Konferenzpräsentation:

- ZOLLFRANK, Cordt, et al. Bio-mediated materials manufacturing (Conference Presentation). In: *Bioinspiration, Biomimetics, and Bioreplication X*. SPIE, 2020. S. 1137404.

### Poster Präsentationen

#### **1<sup>st</sup> Molecular Systems Engineering for Bioapplications 2022, 19.-21. Oktober, Heidelberg**

Poster Titel: "Rheotactic structuring of 3D bio-scaffolds"

#### **3<sup>rd</sup> Living Materials 2022, 21.-23. Juni 2022, Saarbrücken**

Poster Titel: "Biofilms are diverse, hierarchically ordered multipurpose matrices"

#### **1<sup>st</sup> Living Materials 2020, 12.-14. Februar 2020, Saarbrücken**

Poster Titel: "Biomediated Synthesis of Materials"

#### **6. Statuskonferenz des BMWi-Förderprogramms "Energetische Biomassennutzung", 11. - 12. November 2015 in Leipzig**

**Poster Titel:** "AsH<sub>2</sub>Gas: Microbiological methanation of thermocatalytic reforming gases from biological raw and waste materials"

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Paradigmen aus der Natur für 2D- und 3D-Strukturen und besondere mechanische Eigenschaften aus den Quellen [2-7] erstellt. ....	1
<b>Abbildung 2:</b> Eigene Nachbildung eines natürlichen Biofilms, gewachsen auf einer Oberfläche in einer Flüssigphase. Es werden die verschiedenen Stadien der Biofilmbildung und der Ablösung gezeigt.....	2
<b>Abbildung 3:</b> REM-Aufnahmen von <i>Komagataeibacter</i> mit BC-Fibrillen in einem Pellicel. ....	4
<b>Abbildung 4:</b> Ausschnitt des phylogenetischen Stammbaums der <i>Komagataeibacter</i> von Yamada et al. Im Fokus stehen hier <i>K. xylinus</i> und <i>K. sucrofermentans</i> (blau umrandet) [56]. Original im Anhang mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages.....	5
<b>Abbildung 5:</b> Verknüpfung vorgeschlagener biochemischer Wege für die BC-Synthese aus den Quellen [65, 74-76] erstellt. ....	6
<b>Abbildung 6:</b> Vereinfachter Stoffwechselweg zur Produktion von BC mit Glukose als Substrat. Teil der Abbildung 5. ....	7
<b>Abbildung 7:</b> Vereinfachte Darstellung des CesD-Komplexes mit einer Cellulosekette auf ihrem Weg aus der Zelle. Abgeleitet von der originalen Abbildung 51 (Anhang) von Uto. et al. [89]. ....	8
<b>Abbildung 8:</b> Vereinfachte Cellulose-Synthese der <i>Komagataeibacter</i> aus den Quellen [40, 63, 82, 92, 108-112] erstellt. ....	9
<b>Abbildung 9:</b> Struktur der BC-Fibrillen mit dem Wasserstoffbrückenbindungsmuster zwischen und innerhalb der Kette in Cellulose I (gestrichelte Linien). ....	10
<b>Abbildung 10:</b> Strukturformel in Sesselkonformation von Cellulose bzw. BC–Glukose-dimer - Cellobiose-Einheit (links); Triklone und monokline Kristallstruktur der Cellulose Allomorphen (rechts) [112] aus der Arbeit von van Zyl et al. mit freundlicher Genehmigung von ELSEVIER. ....	10
<b>Abbildung 11:</b> Stehende Kultivierung: (1) Stehkolben mit BC-Pellicel und Nährmedium; (2) BC-Pellicel durch stehende Kultivierung gewachsen (3); REM-Aufnahme der BC-Schichten einer stehend gewachsenen BC-Kahmhaut im Querschnitt. ....	11
<b>Abbildung 12:</b> (1) Schüttelkolben mit kugelförmigen BC-Pelliceln; (2) bis (4) kugelförmige BC-Pellicel kurz nach der Ernte. ....	11
<b>Abbildung 13:</b> Struktur des wasserlöslichen EPS Acetan (links), Strukturformel (rechts); basierend auf Quelle [99] erstellt. ....	12
<b>Abbildung 14:</b> Fließgewässer mit Strömung (links); Sammlung an bakterieller EPS mit Strukturformeln (Mitte); Roter Faden in einer Flüssigkeitsströmung (rechts) - Vorbild der Ausrichtung von EPS durch Rheotaxis. ....	13
<b>Abbildung 15:</b> Übersicht über 2D-Materialien mit einer Vorzugsrichtung im Material. ....	15
<b>Abbildung 16:</b> (1) Versuchsaufbau mit allen Komponenten; (2) Düse aus PLA kurz nach der Entnahme aus dem 3D-Drucker; (3) Bewuchsfläche mit sichtbaren Streifen auf der Oberfläche durch das Verschmelzen des PLA-Filaments. ....	21
<b>Abbildung 17:</b> (1) Versuchsaufbau mit den Weithalsflaschen und den Flusszellen; (2) FDM-gedruckte Gyroid-Einbauten für die Flusszellen; (3) Gyroid in Hülle in einer Flusszellentülle; (4) Gyroid ohne Hülle in die Flusszelle mit Sichtfenster eingebaut. ....	22
<b>Abbildung 18:</b> (1) Flussdiagramm der Methode zur Herstellung von 2D-BC-Körper; (2) skizzierte Darstellung der Besiedelung von <i>K. sucrofermentans</i> auf der PLA-Bewuchsfläche mit Düse; (3) luftgetrocknetes 2D-Material aus BC.....	25
<b>Abbildung 19:</b> (1) Flussdiagramm der Methode zur Herstellung von 3D-BC-Körper; (2) skizzierte Darstellung der Besiedelung von <i>K. sucrofermentans</i> auf dem PLA Gyroid; (3) Gyroid aus gefriergetrockneter BC. ....	26

<b>Abbildung 20:</b> Fermentationsverlauf von <i>K. xylinus</i> und <i>K. sucrofermentans</i> in GHC-Medium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Mit freundlicher Genehmigung von P. Wolf; aus ihrer Masterarbeit übernommen [224].	30
<b>Abbildung 21:</b> Vereinfachter Stoffwechselweg von der Fruktose zur BC. Ausschnitt aus Abbildung 5.	32
<b>Abbildung 22:</b> (1) Bildung der ersten Kahmhaut am Boden des Kulturgefäßes; (2) und (3) REM-Aufnahme des Pellikels mit CaCO <sub>3</sub> -Resten.	34
<b>Abbildung 23:</b> Agar-Kulturen und Flüssigkulturen mit <i>K. xylinus</i> und <i>K. sucrofermentans</i> mit dem GHC-Medium: (1) GHC-Platte Draufsicht; (2) GHC-Platte von unten; (3) Vergrößerung der Kolonien; (4) GHC-Flüssigmedium mit <i>K. xylinus</i> und (5) mit <i>K. sucrofermentans</i> .	34
<b>Abbildung 24:</b> Produktivität mit GHC- und HS-Medium und <i>K. sucrofermentans</i> . Problem CaCO <sub>3</sub> kann nicht von der BC abgenommen werden. Deshalb sind die HS-Werte verlässlicher.	35
<b>Abbildung 25:</b> Wachstum von <i>K. xylinus</i> und <i>K. sucrofermentans</i> auf CaCO <sub>3</sub> -haltigen Medien. (1) und (2) Agar-Platten mit etwas älteren Kulturen. Es haben sich Kristalle gebildet. (3) bis (5) zeigen REM-Aufnahmen dieser Kristalle.	35
<b>Abbildung 26:</b> Überlappende HPLC-Chromatogramme der rheotaktischen Fermentation im zeitlichen Verlauf, vom Start der Fermentation bis zum Versuchsende nach elf Tagen; GHC-Medium mit D-Glukose als Substrat. Mit freundlicher Genehmigung von P. Wolf; aus ihrer Masterarbeit übernommen [224].	36
<b>Abbildung 27:</b> Stehend wachsende Flüssigkultur von <i>K. sucrofermentans</i> ausgehend von einer Kolonie. (1) Cellulose-Pellikel am Boden des Kolbens gewachsen; (2) Pellikel am Boden eines stehend kultivierten Kolbens; (3) Vergrößerung von (2) für die Kenntlichmachung der BC-Schichten.	36
<b>Abbildung 28:</b> (1) Überalterte <i>K. sucrofermentans</i> Kultur auf einer HS-Agarplatte mit 0,1 M Saccharose als Kohlenstoffquelle. Platte von oben mit Tropfen. (2) Vergrößerung der mukoiden, sich auflösende Kolonien.	39
<b>Abbildung 29:</b> Substrat-, Produktverlauf und pH-Werte der Kultivierung von <i>K. xylinus</i> (G.x.) mit 100 g · L <sup>-1</sup> D-Glukose; GHC-Medium, rheotaktischer Aufbau. Mit freundlicher Genehmigung von P. Wolf; aus ihrer Masterarbeit übernommen [224].	42
<b>Abbildung 30:</b> REM-Aufnahmen ungereinigter, gefriergetrockneter BC-Proben aus <i>K. xylinus</i> : (1) und (2) Kahmhaut (KH) rheotaktisch gewachsen auf einer Bewuchsfläche.	43
<b>Abbildung 31:</b> Verkürzte Cellulosefibrillen durch erhöhte Sauerstoffversorgung im stehenden System [278].	44
<b>Abbildung 32:</b> Stehend gewachsene Kahmhaut: (1) Wachstum im Kolben; (2) Schnitt einer luftgetrocknete Kahmhaut (KH); (3) REM-Aufnahme der BC-Schichten einer gefriergetrockneten Kahmhaut; (4) REM-Aufnahme einer stehend gewachsenen, lyophilisierten, hierarchisch aufgebaute BC Matrix mit Hohlräumen; (5) vergrößerte Aufnahme von Nr. (4).	46
<b>Abbildung 33:</b> REM-Aufnahmen einer nicht gereinigten, gefriergetrockneten Kahmhaut: (1) Wachstum der Pellikel auf einem Gitter; (2-5) Vergrößerte Aufnahmen der gleichen Kahmhaut.	46
<b>Abbildung 34:</b> (1-3) REM-Aufnahmen von 2D-rheotaktisch gewachsenen Kahmhäuten. (1) Oberfläche einer luftgetrockneten Kahmhaut, (2) eine dünne Schicht einer Kahmhaut, (3) Aufgetrennte Kahmhaut mit Cellulosefibrillen; (4-6) REM-Aufnahmen von 3D-rheotaktisch-gewachsenen Kahmhäuten: (4) Bruch eines Gyroid-Steges, (5) hierarchischer Aufbau eines Gyroid-Steges, (6) ausgerichtete BC-Schichten im Gyroid.	47
<b>Abbildung 35:</b> REM-Aufnahmen der gefriergetrockneten Kahmhäute mit ausgerichteter BC: Aufnahme (1–3) zeigt abnorme Morphologien der Mikroorganismen. Aufnahme (4) und (5) zeigen möglicherweise eine Zellteilung.	49
<b>Abbildung 36:</b> Normales Wachstum der <i>Komagataeibacter</i> (links) und erwartetes Wachstum unter Einfluss von Chloramphenicol (rechts).	50

<b>Abbildung 37:</b> (1) Flussdiagramm für den 2D-Versuchsaufbau; (2) Versuchsaufbau im Labor mit verschiedenen Einbauten; (3) verschiedene 3D-gedruckte Bewuchsflächen mit unterschiedlich tiefen Rillen und einer aufgesetzten Düse. ....	52
<b>Abbildung 38:</b> Verschiedene Düsengeometrien für die gleichmäßige Überströmung der Bewuchsflächen: (1) Breiter Düsenschlitz (0,75 mm) mit Stegen für ein besseres 3D-Druck-Ergebnis; (2) ähnliche Düse wie links (Schlitz 0,5 mm) nur ohne Stege; (3) Düse mit dünnerer Öffnung (0,3 mm). ....	53
<b>Abbildung 39:</b> Stilistisch dargestellter, kontinuierlich betriebener Biofilmreaktor (links) mit Biofilm; Muster der Strömungsgeschwindigkeit in einer laminaren Strömungsregion mit (gelbe Fläche) und ohne Biofilm (Bogenlinie) (rechts). ....	53
<b>Abbildung 40:</b> Entwicklung eines fadenförmigen BC-Biofilms mit <i>Komagataeibacter</i> und BC. ....	54
<b>Abbildung 41:</b> (1) Strömung über gerillte Oberfläche; (2) Bildung von Blasen zwischen den Strömungsbrechern (graue Punkte); (3) Strömung über eine glatte Oberfläche der Bewuchsfläche. ....	54
<b>Abbildung 42:</b> Autoklavierte und gereinigte Kahmhäute nach dem Wachstum auf den unterschiedlich tief gerillten Bewuchsflächen: (1) 15 mm tiefe Rillen; (2) 10 mm tiefe Rillen; (3) 5 mm tiefe Rillen; (4) glatte Oberfläche. ....	55
<b>Abbildung 43:</b> Lichtmikroskopische Aufnahmen, mit polarisiertem Licht und einer $\Delta\lambda = 525$ nm Verzögerungsplatte, eines in die Bewuchsfläche eingewachsenen BC-Pellikels. (1) Interferenzfarbe Blau; (2) Interferenzfarbe Orange, da die Probe um 90 ° gedreht wurde. ....	55
<b>Abbildung 44:</b> (1) Bewuchsfläche mit Strömungsbrechern am Anfang der Wachstumsfläche; (2) nasser BC-Biofilm; (3) trockenes BC-Material mit aufgezeichneten Prüfkörpern. ....	56
<b>Abbildung 45:</b> Schimmelnder BC-Pellikel aus einer eigenen Kombucha Kultur. ....	59
<b>Abbildung 46:</b> Flussdiagramm für den 3D-Versuchsaufbau (links); (1) 3D-gedruckte Gyroidkörper; (2) Flusszelle in der Flasche mit Einbau; (3) trockener Gyroid-Körper aus BC. ....	60
<b>Abbildung 47:</b> Konstruktion der Gyroid-Körper mit SolidWorks. ....	60
<b>Abbildung 48:</b> Konstruktionszeichnungen und gewachsene Biofilme auf den PLA-Templaten: (1) Komplette Gyroidstruktur für die Flusszelle; (2) Gyroid-Säule mit konischen Zuläufen an den Enden; (3) Gyroid-Säule wie bei Bild (2) nur mit einer PLA-Schicht ummantelt. ....	61
<b>Abbildung 49:</b> REM-Aufnahmen von Schnitten durch einen gefriergetrockneten Gyroid in der PLA-Vorlage: (1) und (3) sind Querschnitte und (2) und (4) sind Längsschnitte aus der Probe. ....	62
<b>Abbildung 50:</b> Original Abbildung von Yamada, Hoshino und Ishikawa 1998 [52]: Vorschlag von <i>Komagataeibacter</i> gen. nov., für Stämme, die der <i>Gluconacetobacter xylinus</i> -Gruppe in den $\alpha$ -Proteobakterien angehören. Mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages... 95	95
<b>Abbildung 51:</b> Computergestütztes Modell und Molekulardynamik (MD)-Simulation der Cellulosesynthase-Untereinheit D-Octamer (CesD) aus <i>Komagataeibacter hansenii</i> ; Nachdruck aus Uto et al. [89] mit freundlicher Genehmigung von Copyright © 2021, American Chemical Society. ....	96
<b>Abbildung 52:</b> EDX-Spektrum von einem der Kristalle aus dem GHC-Medium nach der Kultivierung mit <i>Komagataeibacter</i> . Mit 13,39 Gew.-% Kohlenstoff, 19,34 Gew.-% Sauerstoff, <b>60,95 Gew.-% Kalzium</b> und 6,25 Gew.-% Gold vom Sputtern. ....	96

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zusammenfassung von mechanische Eigenschaften der BC [91, 123-125] und der Holzfasern [40, 113, 126]. .....	10
<b>Tabelle 2:</b> Zusammenfassung von Kohlenstoffquellen und Stoffwechselprodukten der Komagataeibacter, K. xylinus, K. sucrofermentans aus eigenen Versuchen und verschiedenen Quellen [55, 56, 216, 223]. .....	29
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht über die verschiedenen Medien, ihre Besonderheiten und REM-Aufnahmen der Oberflächen der BC-Pellikel. ....	37
<b>Tabelle 4:</b> Fundamentale Eigenschaften von Papier und Holz [109] im Vergleich zu den eigenen 2D-BC-Proben [208]. ....	57
<b>Tabelle 5:</b> Mechanische Parameter bewegter und stehend kultivierter BC [303], ergänzt mit den eigenen Ergebnissen aus der ersten Veröffentlichung für rheotaktisch gewachsenen 2D-BC-Körper [208]. .....	58
<b>Tabelle 6:</b> Auswahl an möglichen Biopolymeren für die Dissertation, deren Löslichkeit in Wasser und Besonderheiten. ....	91
<b>Tabelle 7:</b> BC produzierende Mikroorganismen, deren Zellwandstruktur und Art der BC [40, 76, 78, 222, 236, 347]. .....	94

## Literaturverzeichnis

1. Fratzl, P. and R. Weinkamer, *Nature's hierarchical materials*. Progress in materials Science, 2007. **52**(8): p. 1263-1334.
2. Nentwig, W., et al., *Spinnen-Alles was man wissen muss*. 2021: Springer.
3. Wagenführ, R. and A. Wagenführ, *Holzatlas*. 2021: Carl Hanser Verlag GmbH Co KG.
4. Li, F.-S., et al., *The molecular structure of plant sporopollenin*. Nature plants, 2019. **5**(1): p. 41-46.
5. Zhang, W., et al., *An Illustrated Electron Microscopic Study of Crabapple Pollen*. 2019: Springer.
6. Broll, B., *REISE DURCH DEN MIKROKOSMOS*. National Geographic, 2007.
7. Weinold-Leipold, H., *Wunder der Welt-Bäume*. 2006: Parragon.
8. Zürcher, E. and P. Niemz, *Holz: Struktur und Eigenschaften:(Skript zur Vorlesung)*. 2011.
9. Khatib, J., *Sustainability of construction materials*. 2016: Woodhead Publishing.
10. Lara-Bocanegra, A.J., et al., *Long-term bending stress relaxation in timber laths for the structural design of lattice shells*. Construction and Building Materials, 2018. **193**: p. 565-575.
11. Assor, C., et al., *Concomitant changes in viscoelastic properties and amorphous polymers during the hydrothermal treatment of hardwood and softwood*. Journal of agricultural and food chemistry, 2009. **57**(15): p. 6830-6837.
12. Gao, H., et al., *Materials become insensitive to flaws at nanoscale: lessons from nature*. Proceedings of the national Academy of Sciences, 2003. **100**(10): p. 5597-5600.
13. Du, N., et al., *Design of superior spider silk: from nanostructure to mechanical properties*. Biophysical journal, 2006. **91**(12): p. 4528-4535.
14. Blackledge, T.A. and C.Y. Hayashi, *Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider *Argiope argentata* (Fabricius 1775)*. Journal of experimental biology, 2006. **209**(13): p. 2452-2461.
15. Eberhard, W., *Spider webs*, in *Spider Webs*. 2020, University of Chicago Press.
16. Brooks, J. and G. Shaw, *Sporopollenin: a review of its chemistry, palaeochemistry and geochemistry*. Grana, 1978. **17**(2): p. 91-97.
17. Ma, Z., et al., *Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds*. Tissue engineering, 2005. **11**(1-2): p. 101-109.
18. Rodrigo-Navarro, A., et al., *Engineered living biomaterials*. Nature Reviews Materials, 2021. **6**(12): p. 1175-1190.
19. Li, N., et al., *Flexible graphene-based lithium ion batteries with ultrafast charge and discharge rates*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(43): p. 17360-17365.
20. Lee, J.H., J.P. Singer, and E.L. Thomas, *Micro-/nanostructured mechanical metamaterials*. Advanced materials, 2012. **24**(36): p. 4782-4810.
21. Aguirre, C.I., E. Reguera, and A. Stein, *Tunable colors in opals and inverse opal photonic crystals*. Advanced Functional Materials, 2010. **20**(16): p. 2565-2578.
22. Davis, M.E., *Ordered porous materials for emerging applications*. Nature, 2002. **417**(6891): p. 813-821.
23. Kreno, L.E., et al., *Metal-organic framework materials as chemical sensors*. Chemical reviews, 2012. **112**(2): p. 1105-1125.
24. Drury, J.L. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4337-4351.
25. Hollister, S.J., *Porous scaffold design for tissue engineering*. Nature materials, 2005. **4**(7): p. 518-524.
26. Picheth, G.F., et al., *Bacterial cellulose in biomedical applications: A review*. International journal of biological macromolecules, 2017. **104**: p. 97-106.

27. Pértile, R., et al., *Bacterial cellulose modified using recombinant proteins to improve neuronal and mesenchymal cell adhesion*. Biotechnology progress, 2012. **28**(2): p. 526-532.
28. Kim, M. and G. Kim, *Physical and biological activities of newly designed, macro-pore-structure-controlled 3D fibrous poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite composite scaffolds*. RSC Advances, 2015. **5**(34): p. 26954-26964.
29. Ma, L., et al., *Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering*. Biomaterials, 2003. **24**(26): p. 4833-4841.
30. Wolfaardt, G.M., J.R. Lawrence, and D.R. Korber, *Function of EPS*, in *Microbial extracellular polymeric substances*. 1999, Springer. p. 171-200.
31. Lewandowski, Z. and H. Beyenal, *Fundamentals of biofilm research*. 2013: CRC press.
32. Lear, G. and G.D. Lewis, *Microbial biofilms: current research and applications*. 2012.
33. Vlamakis, H., et al., *Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way*. Nature Reviews Microbiology, 2013. **11**(3): p. 157-168.
34. Chai, Y., et al., *An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis**. Genes & development, 2010. **24**(8): p. 754-765.
35. Limoli, D.H., C.J. Jones, and D.J. Wozniak, *Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function*. Microbiol Spectr, 2015. **3**(3).
36. Dogsa, I., et al., *Structure of bacterial extracellular polymeric substances at different pH values as determined by SAXS*. Biophysical journal, 2005. **89**(4): p. 2711-2720.
37. Coviello, T., et al., *Static and dynamic light scattering by a thermoreversible gel from *Rhizobium leguminosarum* 8002 exopolysaccharide*. Macromolecules, 1997. **30**(7): p. 2008-2015.
38. Ates, O., *Systems biology of microbial exopolysaccharides production*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2015. **3**: p. 200.
39. Freitas, F., V.D. Alves, and M.A. Reis, *Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications*. Trends in biotechnology, 2011. **29**(8): p. 388-398.
40. Jonas, R. and L.F. Farah, *Production and application of microbial cellulose*. Polymer degradation and stability, 1998. **59**(1-3): p. 101-106.
41. Tan, S.C., *Vinegar fermentation*. 2005.
42. Villarreal-Soto, S.A., et al., *Understanding kombucha tea fermentation: a review*. Journal of food science, 2018. **83**(3): p. 580-588.
43. Aykın, E., N.H. Budak, and Z.B. Güzel-Seydim, *Bioactive components of mother vinegar*. Journal of the American College of Nutrition, 2015. **34**(1): p. 80-89.
44. Lynch, K.M., et al., *Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019. **18**(3): p. 587-625.
45. Rehm, B., *Microbial production of biopolymers and polymer precursors*. 2009: Caister Academic.
46. Brown, A.J., *XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1886. **49**: p. 432-439.
47. Yamada, Y. and P. Yukphan, *Genera and species in acetic acid bacteria*. International journal of food microbiology, 2008. **125**(1): p. 15-24.
48. He, Y., et al., *Oxidative fermentation of acetic acid bacteria and its products*. Frontiers in Microbiology, 2022. **13**.
49. Deppenmeier, U. and A. Ehrenreich, *Physiology of Acetic Acid Bacteria in Light of the Genome Sequence of *Gluconobacter oxydans**. Microbial Physiology, 2009. **16**(1-2): p. 69-80.
50. Lin, S.-P., et al., *Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose*. Cellulose, 2013. **20**(5): p. 2191-2219.
51. Yamada, Y., K.-i. Hoshino, and T. Ishikawa, *The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1997. **61**(8): p. 1244-1251.

52. Yamada, Y., et al., *Subdivision of the genus Gluconacetobacter Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of Komagatabacter gen. nov., for strains accommodated to the Gluconacetobacter xylinus group in the  $\alpha$ -Proteobacteria*. Annals of microbiology, 2012. **62**(2): p. 849-859.
53. Toyosaki, H., et al., *Screening of bacterial cellulose-producing Acetobacter strains suitable for agitated culture*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1995. **59**(8): p. 1498-1502.
54. Seto, A., et al., *Screening of bacterial cellulose-producing Acetobacter strains suitable for sucrose as a carbon source*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1997. **61**(4): p. 735-736.
55. Toyosaki, H., et al., *The characterization of an acetic acid bacterium useful for producing bacterial cellulose in agitation cultures: the proposal of Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans subsp. nov.* The Journal of General and Applied Microbiology, 1995. **41**(4): p. 307-314.
56. Yamada, Y., et al., *Description of Komagataeibacter gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae)*. The Journal of general and applied microbiology, 2012. **58**(5): p. 397-404.
57. Tsouko, E., et al., *Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams*. International journal of molecular sciences, 2015. **16**(7): p. 14832-14849.
58. Carreira, P., et al., *Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose*. Bioresource technology, 2011. **102**(15): p. 7354-7360.
59. El-Saied, H., et al., *Production and characterization of economical bacterial cellulose*. BioResources, 2008. **3**(4): p. 1196-1217.
60. Hong, F., et al., *Wheat straw acid hydrolysate as a potential cost-effective feedstock for production of bacterial cellulose*. Journal of chemical technology & biotechnology, 2011. **86**(5): p. 675-680.
61. Kongruang, S., *Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum strains from agricultural waste products*, in *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. 2007, Springer. p. 763-774.
62. Kurosumi, A., et al., *Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by Acetobacter xylinum NBRC 13693*. Carbohydrate Polymers, 2009. **76**(2): p. 333-335.
63. Huang, Y., et al., *Recent advances in bacterial cellulose*. Cellulose, 2014. **21**(1): p. 1-30.
64. Esa, F., S.M. Tasirin, and N. Abd Rahman, *Overview of bacterial cellulose production and application*. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2014. **2**: p. 113-119.
65. Vandamme, E., S. De Baets, and A. Steinbuchel, *Polysaccharides I: polysaccharides and prokaryotes (biopolymers series)*, in *Biopolymers Vol. 5: Polysaccharides I, Vol. 5 10 vols/Vandamme, EJ, De Baets, S. and Steinbüchel, A.(eds), Wiley & Sons, 2002, p. 532.-. 2002*.
66. Keshk, S. and K. Sameshima, *Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production*. African Journal of Biotechnology, 2005. **4**(6): p. 478-482.
67. Çoban, E.P. and H. Biyik, *Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by Acetobacter lovaniensis HBB5*. African Journal of Biotechnology, 2011. **10**(27): p. 5346-5354.
68. Wang, S.-S., et al., *Insights into bacterial cellulose biosynthesis from different carbon sources and the associated biochemical transformation pathways in Komagataeibacter sp. W1*. Polymers, 2018. **10**(9): p. 963.
69. Singhsa, P., R. Narain, and H. Manuspiya, *Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different Komagataeibacter xylinus strains and carbon sources in static and agitated conditions*. Cellulose, 2018. **25**(3): p. 1571-1581.
70. Kiziltas, E.E., A. Kiziltas, and D.J. Gardner, *Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars*. Carbohydrate Polymers, 2015. **124**: p. 131-138.
71. Jung, H.-I., et al., *Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from Acetobacter sp. V6 cultured in shake flasks*. Bioresource Technology, 2010. **101**(10): p. 3602-3608.

72. Chen, S.-Q., et al., *Mechanical properties of bacterial cellulose synthesised by diverse strains of the genus Komagataeibacter*. Food Hydrocolloids, 2018. **81**: p. 87-95.
73. Chen, S.-Q., et al., *Characterisation of bacterial cellulose from diverse Komagataeibacter strains and their application to construct plant cell wall analogues*. Cellulose, 2017. **24**(3): p. 1211-1226.
74. Ha, J.H., et al., *Bacterial cellulose production from a single sugar  $\alpha$ -linked glucuronic acid-based oligosaccharide*. Process Biochemistry, 2011. **46**(9): p. 1717-1723.
75. Bielecki, S., et al., *Bacterial cellulose*. Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production, and patents, 2005: p. 31-84.
76. Chawla, P.R., et al., *Microbial cellulose: fermentative production and applications*. Food Technology & Biotechnology, 2009. **47**(2).
77. Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman, *Cellulose biosynthesis and function in bacteria*. Microbiological reviews, 1991. **55**(1): p. 35-58.
78. J., V.E., D.B. S., and S. A., *Biopolymers - Polysaccharides I - Polysaccharides from Prokaryotes*. 2002: Wiley-VCH. 532.
79. Weinhouse, H., *Regulation of carbohydrate metabolism in Acetobacter xylinum*. Ph. D. thesis, 1977.
80. Sutherland, I.W., *Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria*. International Dairy Journal, 2001. **11**(9): p. 663-674.
81. Aloni, Y. and M. Benziman, *Intermediates of cellulose synthesis in Acetobacter*, in *Cellulose and Other Natural Polymer Systems*. 1982, Springer. p. 341-361.
82. Cacicedo, M.L., et al., *Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications*. Bioresource technology, 2016. **213**: p. 172-180.
83. Römling, U. and M.Y. Galperin, *Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions*. Trends in microbiology, 2015. **23 9**: p. 545-57.
84. Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman, *Cellulose biosynthesis and function in bacteria*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1991. **55**(1): p. 35-58.
85. Lin, F. and R. Brown Jr, *Purification of cellulose synthase from Acetobacter xylinum*. Cellulose and wood: Chemistry and technology, 1989: p. 473-492.
86. Aaron P. White, A.M.W., Dmitry Apel, Ping Zhang, Rustem Shaykhutdinov, Hans J. Vogel, Michael G. Surette *A Global Metabolic Shift Is Linked to Salmonella Multicellular Development*. PLoS One, 2010. **5**(7).
87. Lin, F.C., et al., *Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glc) binding subunit of cellulose synthase in Acetobacter xylinum using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-Glc*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(9): p. 4782-4784.
88. Kawano, S., et al., *Cloning of cellulose synthesis related genes from Acetobacter xylinum ATCC23769 and ATCC53582: comparison of cellulose synthetic ability between strains*. DNA research, 2002. **9**(5): p. 149-156.
89. Uto, T., et al., *Molecular dynamics simulation of cellulose synthase subunit D octamer with cellulose chains from acetic acid bacteria: insight into dynamic behaviors and thermodynamics on substrate recognition*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2020. **17**(1): p. 488-496.
90. Hestrin, S. and M. Schramm, *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*. Biochemical Journal, 1954. **58**(2): p. 345.
91. Brown Jr, R.M., J. Willison, and C.L. Richardson, *Cellulose biosynthesis in Acetobacter xylinum: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1976. **73**(12): p. 4565-4569.
92. Brown Jr, R.M. and I.M. Saxena, *Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers*. Plant Physiology and Biochemistry, 2000. **38**(1-2): p. 57-67.
93. Koyama, M., et al., *Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(17): p. 9091-9095.

94. Koyama, M., et al., *Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94** **17**: p. 9091-5.
95. Brown Jr, R.M., *The biosynthesis of cellulose*. Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry, 1996. **33**(10): p. 1345-1373.
96. Han, N.S. and J.F. Robyt, *The mechanism of Acetobacter xylinum cellulose biosynthesis: direction of chain elongation and the role of lipid pyrophosphate intermediates in the cell membrane*. Carbohydrate research, 1998. **313**(2): p. 125-133.
97. Matthyse, A.G., D.L. Thomas, and A.R. White, *Mechanism of cellulose synthesis in Agrobacterium tumefaciens*. Journal of bacteriology, 1995. **177**(4): p. 1076-1081.
98. Ielpi, L., R. Couso, and M. Dankert, *Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum*. FEBS letters, 1981. **130**(2): p. 253-256.
99. De Iannino, N.I., R.O. Couso, and M.A. Dankert, *Lipid-linked intermediates and the synthesis of acetan in Acetobacter xylinum*. Microbiology, 1988. **134**(6): p. 1731-1736.
100. Lin, F.C., et al., *Synthesis of fibrils in vitro by a solubilized cellulose synthase from Acetobacter xylinum*. Science, 1985. **230**(4727): p. 822-825.
101. Lin, F.C. and R.M. Brown Jr, *Purification of cellulose synthase from Acetobacter xylinum*. Cellulose and wood: Chemistry and technology, 1989: p. 473-492.
102. Mühlethaler, K., *The structure of bacterial cellulose*. Biochimica et Biophysica Acta, 1949. **3**: p. 527-535.
103. Yamanaka, S., et al., *The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose*. Journal of materials science, 1989. **24**(9): p. 3141-3145.
104. Zaar, K., *Visualization of pores (export sites) correlated with cellulose production in the envelope of the gram-negative bacterium Acetobacter xylinum*. The Journal of cell biology, 1979. **80**(3): p. 773-777.
105. Moon, R.J., et al., *Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites*. Chemical Society Reviews, 2011. **40**(7): p. 3941-3994.
106. Iguchi, M., S. Yamanaka, and A. Budhiono, *Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts*. Journal of materials science, 2000. **35**(2): p. 261-270.
107. Brown, R.M., J. Willison, and C.L. Richardson, *Cellulose biosynthesis in Acetobacter xylinum: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1976. **73**(12): p. 4565-4569.
108. Kudlicka, K., *Terminal complexes in cellulose synthesis*. Postrpy biologii komórki, 1989. **16**: p. 197-212.
109. Türk, O., *Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe*. 2014: Springer.
110. Lahiri, D., et al., *Bacterial cellulose: Production, characterization, and application as antimicrobial agent*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(23): p. 12984.
111. Tajima, K., et al., *Cellulose-synthesizing machinery in bacteria*. Cellulose, 2021: p. 1-23.
112. van Zyl, E.M. and J.M. Coburn, *Hierarchical structure of bacterial-derived cellulose and its impact on biomedical applications*. Current Opinion in Chemical Engineering, 2019. **24**: p. 122-130.
113. Chen, W., et al., *Isolation and characterization of cellulose nanofibers from four plant cellulose fibers using a chemical-ultrasonic process*. Cellulose, 2011. **18**(2): p. 433-442.
114. Bi, J.C., et al., *Morphology and structure characterization of bacterial celluloses produced by different strains in agitated culture*. Journal of Applied Microbiology, 2014. **117**(5): p. 1305-1311.
115. Delmer, D.P. and Y. Amor, *Cellulose biosynthesis*. The plant cell, 1995. **7**(7): p. 987.
116. Hibbert, H. and J. Barsha, *Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides: xxxix. Structure of the cellulose synthesized by the action of Acetobacter xylinus on glucose*. Canadian Journal of Research, 1931. **5**(5): p. 580-591.

117. Barsha, J. and H. Hibbert, *Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides: xlvii. Structure of the cellulose synthesized by the action of acetobacter xylinus on fructose and glycerol*. Canadian Journal of Research, 1934. **10**(2): p. 170-179.
118. Czaja, W., et al., *Microbial cellulose—the natural power to heal wounds*. Biomaterials, 2006. **27**(2): p. 145-151.
119. Vitta, S. and V. Thiruvengadam, *Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites*. Current science, 2012: p. 1398-1405.
120. Campano, C., et al., *Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review*. Cellulose, 2016. **23**(1): p. 57-91.
121. Andriani, D., A.Y. Apriyana, and M. Karina, *The optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review*. Cellulose, 2020. **27**(12): p. 6747-6766.
122. Pandit, A. and R. Kumar, *A review on production, characterization and application of bacterial cellulose and its biocomposites*. Journal of Polymers and the Environment, 2021. **29**(9): p. 2738-2755.
123. Czaja, W. and D. Romanovicz, *Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture*. Cellulose, 2004. **11**(3): p. 403-411.
124. Sugiyama, J., et al., *Lattice images from ultrathin sections of cellulose microfibrils in the cell wall of Valonia macrophysa Kütz*. Planta, 1985. **166**(2): p. 161-168.
125. Sun, D., et al., *Preliminary research on structure and properties of nano-cellulose*. Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed., 2007. **22**(4): p. 677-680.
126. Kim, S.-J., et al., *Mechanical properties of polypropylene/natural fiber composites: Comparison of wood fiber and cotton fiber*. Polymer testing, 2008. **27**(7): p. 801-806.
127. Schramm, M. and S. Hestrin, *Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of Acetobacter xylinum*. Microbiology, 1954. **11**(1): p. 123-129.
128. Williams, W.S. and R.E. Cannon, *Alternative environmental roles for cellulose produced by Acetobacter xylinum*. Appl. Environ. Microbiol., 1989. **55**(10): p. 2448-2452.
129. Ul-Islam, M., et al., *Bacterial cellulose composites: Synthetic strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields*. Biotechnology journal, 2015. **10**(12): p. 1847-1861.
130. Hornung, M., et al., *Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of product movement influences on the bioreaction (Part 2)*. Engineering in Life Sciences, 2006. **6**(6): p. 546-551.
131. Krystynowicz, A., A. Galas, and E. Pawlak, *Method of bacterial cellulose production*. Polish Patent P, 1997. **299907**.
132. Sisson, W.A., *X-ray studies of crystallite orientation in cellulose fibers natural fibers*. Industrial & Engineering Chemistry, 1935. **27**(1): p. 51-56.
133. Chao, Y., et al., *Effect of Addition of Water-Soluble Polysaccharides on Bacterial Cellulose Production in a 50-L Airlift Reactor*. Biotechnology Progress, 2001. **17**(4): p. 781-785.
134. Chao, Y., 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, 2001. **55**(6): p. 673-679.
135. White, G. and C. Wang, *The dissimilation of glucose and gluconate by Acetobacter xylinum. 1. The origin and the fate of triose phosphate*. Biochemical Journal, 1964. **90**(2): p. 408.
136. White, G. and C. Wang, *The dissimilation of glucose and gluconate by Acetobacter xylinum. 2. Pathway evaluation*. Biochemical Journal, 1964. **90**(2): p. 424.
137. Watanabe, K., et al., *Acetobacter xylinum mutant with high cellulose productivity and an ordered structure*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1998. **62**(7): p. 1290-1292.
138. Colvin, J.R. and G.G. Leppard, *The biosynthesis of cellulose by Acetobacter xylinum and Acetobacter acetigenus*. Canadian Journal of Microbiology, 1977. **23**(6): p. 701-709.

139. Colvin, J.R., et al., *Additional properties of a soluble polymer of glucose from cultures of Acetobacter xylinum*. Canadian journal of biochemistry, 1979. **57**(11): p. 1284-1288.
140. Tonouchi, N., et al., *Increased cellulose production from sucrose with reduced levan accumulation by an Acetobacter strain harboring a recombinant plasmid*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1998. **62**(5): p. 833-836.
141. Valla, S. and J. Kjosbakken, *Isolation and characterization of a new extracellular polysaccharide from a cellulose-negative strain of Acetobacter xylinum*. Canadian journal of microbiology, 1981. **27**(6): p. 599-603.
142. COUSO, R.O., L. IELPI, and M.A. DANKERT, *A xanthan-gum-like polysaccharide from Acetobacter xylinum*. Microbiology, 1987. **133**(8): p. 2123-2135.
143. Abdian, P.L., et al., *Identification of essential amino acids in the bacterial  $\alpha$ -mannosyltransferase AceA*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(51): p. 40568-40575.
144. Jansson, P.-E., et al., *Structural studies of acetan, an exopolysaccharide elaborated by Acetobacter xylinum*. Carbohydrate research, 1993. **245**(2): p. 303-310.
145. Minakami, H., et al., *Isolation and characterization of a new polysaccharide-producing Acetobacter sp.* Agricultural and biological chemistry, 1984. **48**(10): p. 2405-2414.
146. Delmer, D.P., *Biosynthesis of cellulose*, in *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. 1983, Elsevier. p. 105-153.
147. ISHIDA, T., et al., *Effects of acetan on production of bacterial cellulose by Acetobacter xylinum*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2002. **66**(8): p. 1677-1681.
148. Marx-Figini, M. and B. Pion, *Kinetic investigations on biosynthesis of bacterial cellulose, 2. Distribution of the degree of polymerization for different numbers of bacterial generations*. Die Makromolekulare Chemie, 1976. **177**(4): p. 1013-1020.
149. Naritomi, T., et al., *Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998. **85**(6): p. 598-603.
150. Adler, J., *Chemotaxis in bacteria*. Annual review of biochemistry, 1975. **44**(1): p. 341-356.
151. Berg, H.C., *E. coli in Motion*. 2004: Springer.
152. Demir, M. and H. Salman, *Bacterial thermotaxis by speed modulation*. Biophysical journal, 2012. **103**(8): p. 1683-1690.
153. Paster, E. and W.S. Ryu, *The thermal impulse response of Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(14): p. 5373-5377.
154. Lahme, S., *Physiological and molecular investigation of the anaerobic 4-methylbenzoate and benzoate degradation in Magnetospirillum sp. strain pMbN1*. 2014, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg Oldenburg, Germany.
155. Frankel, R.B., et al., *Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria*. Biophysical journal, 1997. **73**(2): p. 994-1000.
156. Timm, U. and A. Okubo, *Gyrotaxis: A plume model for self-focusing micro-organisms*. Bulletin of mathematical biology, 1994. **56**(2): p. 187-206.
157. Durham, W.M., J.O. Kessler, and R. Stocker, *Disruption of vertical motility by shear triggers formation of thin phytoplankton layers*. science, 2009. **323**(5917): p. 1067-1070.
158. Marcos, et al., *Bacterial rheotaxis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(13): p. 4780-4785.
159. Deuerling, S., et al., *A Perspective on Bio-Mediated Material Structuring*. Advanced Materials, 2018. **30**(19): p. 1703656.
160. Liu, W., et al., *Cellulose nanopaper: fabrication, functionalization, and applications*. Nano-Micro Letters, 2022. **14**(1): p. 1-27.
161. Habibi, Y., L.A. Lucia, and O.J. Rojas, *Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications*. Chemical reviews, 2010. **110**(6): p. 3479-3500.
162. Du, H., et al., *Cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils based hydrogels for biomedical applications*. Carbohydrate polymers, 2019. **209**: p. 130-144.

163. Nechyporchuk, O., M.N. Belgacem, and J. Bras, *Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances*. Industrial Crops and Products, 2016. **93**: p. 2-25.
164. Hodzic, A. and R. Shanks, *Natural fibre composites: materials, processes and properties*. 2014: Woodhead Publishing.
165. Shah, N., et al., *Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material*. Carbohydrate polymers, 2013. **98**(2): p. 1585-1598.
166. Walther, A., et al., *Multifunctional high-performance biofibers based on wet-extrusion of renewable native cellulose nanofibrils*. Advanced materials, 2011. **23**(26): p. 2924-2928.
167. Iwamoto, S., A. Isogai, and T. Iwata, *Structure and mechanical properties of wet-spun fibers made from natural cellulose nanofibers*. Biomacromolecules, 2011. **12**(3): p. 831-836.
168. Torres Rendon, J.G., *Cellulose nanofibril-and chitin nanofibril-based materials: fibers, scaffolds and tubes*. 2016, Dissertation, RWTH Aachen University, 2016.
169. Kim, C.-W., et al., *Structural studies of electrospun cellulose nanofibers*. Polymer, 2006. **47**(14): p. 5097-5107.
170. Dizge, N., E. Shaulsky, and V. Karanikola, *Electrospun cellulose nanofibers for superhydrophobic and oleophobic membranes*. Journal of Membrane Science, 2019. **590**: p. 117271.
171. Sehaqui, H., et al., *Cellulose nanofiber orientation in nanopaper and nanocomposites by cold drawing*. ACS applied materials & interfaces, 2012. **4**(2): p. 1043-1049.
172. Tang, H., N. Butchosa, and Q. Zhou, *A transparent, hazy, and strong macroscopic ribbon of oriented cellulose nanofibrils bearing poly (ethylene glycol)*. Advanced materials, 2015. **27**(12): p. 2070-2076.
173. Wang, B., et al., *Aligned bioinspired cellulose nanocrystal-based nanocomposites with synergetic mechanical properties and improved hygromechanical performance*. ACS applied materials & interfaces, 2015. **7**(8): p. 4595-4607.
174. Acharya, S., et al., *Preparation and characterization of transparent cellulose films using an improved cellulose dissolution process*. Journal of Applied Polymer Science, 2017. **134**(21).
175. Nakagaito, A., S. Iwamoto, and H. Yano, *Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites*. Applied Physics A, 2005. **80**(1): p. 93-97.
176. Gea, S., et al., *Biocomposites based on bacterial cellulose and apple and radish pulp*. International Polymer Processing, 2007. **22**(5): p. 497-501.
177. Nishi, Y., et al., *The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose*. Journal of Materials Science, 1990. **25**(6): p. 2997-3001.
178. Ben-Hayyim, G. and I. Ohad, *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum: VIII. On the formation and orientation of bacterial cellulose fibrils in the presence of acidic polysaccharides*. The Journal of Cell Biology, 1965. **25**(2): p. 191-207.
179. Haigh, W.G., et al., *Induction of orientation of bacterial cellulose microfibrils by a novel terpenoid from Acetobacter xylinum*. Biochemical Journal, 1973. **135**(1): p. 145-149.
180. Kondo, T., et al., *Biodirected epitaxial nanodeposition of polymers on oriented macromolecular templates*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(22): p. 14008-14013.
181. Putra, A., et al., *Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface*. Polymer, 2008. **49**(7): p. 1885-1891.
182. Sakairi, N., et al., *A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of Acetobacter xylinum*. Carbohydrate polymers, 1998. **35**(3-4): p. 233-237.
183. Wan, Y., et al., *Directional fluid induced self-assembly of oriented bacterial cellulose nanofibers for potential biomimetic tissue engineering scaffolds*. Materials Chemistry and Physics, 2015. **149**: p. 7-11.
184. Luo, H., et al., *Preparation of oriented bacterial cellulose nanofibers by flowing medium-assisted biosynthesis and influence of flowing velocity*. Journal of Polymer Engineering, 2018. **38**(3): p. 299-305.

185. Wang, S., et al., *Transparent, anisotropic biofilm with aligned bacterial cellulose nanofibers*. *Advanced Functional Materials*, 2018. **28**(24): p. 1707491.
186. Sano, M.B., et al., *Electromagnetically controlled biological assembly of aligned bacterial cellulose nanofibers*. *Annals of biomedical engineering*, 2010. **38**(8): p. 2475-2484.
187. Murphy, S.V. and A. Atala, *3D bioprinting of tissues and organs*. *Nature biotechnology*, 2014. **32**(8): p. 773-785.
188. Millon, L. and W. Wan, *The polyvinyl alcohol–bacterial cellulose system as a new nanocomposite for biomedical applications*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2006. **79**(2): p. 245-253.
189. Ahmed, E.M., *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review*. *Journal of advanced research*, 2015. **6**(2): p. 105-121.
190. Nogi, M., et al., *Fiber-content dependency of the optical transparency and thermal expansion of bacterial nanofiber reinforced composites*. *Applied Physics Letters*, 2006. **88**(13): p. 133124.
191. Klemm, D., et al., *Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material*. *Angewandte chemie international edition*, 2005. **44**(22): p. 3358-3393.
192. Gatenholm, P. and D. Klemm, *Bacterial nanocellulose as a renewable material for biomedical applications*. *MRS bulletin*, 2010. **35**(3): p. 208-213.
193. Astley, O.M., et al., *Tensile deformation of bacterial cellulose composites*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2003. **32**(1-2): p. 28-35.
194. Chanliaud, E. and M.J. Gidley, *In vitro synthesis and properties of pectin/Acetobacter xylinus cellulose composites*. *The plant journal*, 1999. **20**(1): p. 25-35.
195. Jin, H., et al., *Nanofibrillar cellulose aerogels*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2004. **240**(1-3): p. 63-67.
196. Hoepfner, S., L. Ratke, and B. Milow, *Synthesis and characterisation of nanofibrillar cellulose aerogels*. *Cellulose*, 2008. **15**(1): p. 121-129.
197. Pääkkö, M., et al., *Long and entangled native cellulose I nanofibers allow flexible aerogels and hierarchically porous templates for functionalities*. *Soft matter*, 2008. **4**(12): p. 2492-2499.
198. Heath, L. and W. Thielemans, *Cellulose nanowhisker aerogels*. *Green Chemistry*, 2010. **12**(8): p. 1448-1453.
199. Stamm, A.J. and H. Tarkow, *The Penetration of Cellulose Fibers*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1950. **54**(6): p. 745-753.
200. Bohn, A., et al., *X-ray texture investigations of bacterial cellulose*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2000. **201**(15): p. 1913-1921.
201. Dubief, D., E. Samain, and A. Dufresne, *Polysaccharide microcrystals reinforced amorphous poly ( $\beta$ -hydroxyoctanoate) nanocomposite materials*. *Macromolecules*, 1999. **32**(18): p. 5765-5771.
202. Heux, L., E. Dinand, and M. Vignon, *Structural aspects in ultrathin cellulose microfibrils followed by  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR*. *Carbohydrate Polymers*, 1999. **40**(2): p. 115-124.
203. Rühls, P.A., et al., *3D bacterial cellulose biofilms formed by foam templating*. *npj Biofilms and Microbiomes*, 2018. **4**(1): p. 1-6.
204. Caro-Astorga, J., et al., *Bacterial cellulose spheroids as building blocks for 3D and patterned living materials and for regeneration*. *Nature communications*, 2021. **12**(1): p. 1-9.
205. Torres-Rendon, J.G., et al., *Bioactive gyroid scaffolds formed by sacrificial templating of nanocellulose and nanochitin hydrogels as instructive platforms for biomimetic tissue engineering*. *Advanced materials*, 2015. **27**(19): p. 2989-2995.
206. Bhushan, B., *Biomimetics: lessons from nature—an overview*. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2009. **367**(1893): p. 1445-1486.

207. Fantner, G.E., et al., *Sacrificial bonds and hidden length: unraveling molecular mesostructures in tough materials*. Biophysical journal, 2006. **90**(4): p. 1411-1418.
208. Gmach, Y. and D. Van Opdenbosch, *Structural and mechanical anisotropy in rheotactically aligned bacterial cellulose*. Cellulose, 2022. **29**(16): p. 8521-8537.
209. Gmach, Y.V.O., Daniel, *Threedimensionally patterned, hierarchically and anisotropically structured bacterial cellulose*.

Materials Research Express 2023.

210. Steinbüchel, A., et al., *Mikrobiologisches Praktikum*. 2003: Springer.
211. de Souza, S.S., et al., *Nanocellulose biosynthesis by Komagataeibacter hansenii in a defined minimal culture medium*. Cellulose, 2019. **26**(3): p. 1641-1655.
212. Gmach, Y. and D. Van Opdenbosch, *Threedimensionally patterned, hierarchically and anisotropically structured bacterial cellulose*. Materials Research Express, 2023. **10**(3): p. 035401.
213. Thakoor, S. *Biomorphic systems and biomorphic missions*. in *Nanobiotechnology*. 2000. National Aeronautics and Space Administration.
214. Dewar, S.J. and R. Dorazi, *Control of division gene expression in Escherichia coli*. FEMS microbiology letters, 2000. **187**(1): p. 1-7.
215. Mathijssen, A.J., et al., *Oscillatory surface rheotaxis of swimming E. coli bacteria*. Nature communications, 2019. **10**(1): p. 1-12.
216. Cleenwerck, I., P. De Vos, and L. De Vuyst, *Phylogeny and differentiation of species of the genus Gluconacetobacter and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of Acetobacter xylinus subsp. sucrofermentans as Gluconacetobacter sucrofermentans (Toyosaki et al. 1996) sp. nov., comb. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010. **60**(10): p. 2277-2283.
217. Uraki, Y., et al., *Honeycomb-like architecture produced by living bacteria, Gluconacetobacter xylinus*. Carbohydrate polymers, 2007. **69**(1): p. 1-6.
218. Rusconi, R., et al., *Secondary flow as a mechanism for the formation of biofilm streamers*. Biophysical journal, 2011. **100**(6): p. 1392-1399.
219. Rusconi, R., et al., *Laminar flow around corners triggers the formation of biofilm streamers*. Journal of The Royal Society Interface, 2010. **7**(50): p. 1293-1299.
220. Nielsen, P.H. and A. Jahn, *Extraction of EPS*, in *Microbial extracellular polymeric substances*. 1999, Springer. p. 49-72.
221. Riaz, T., et al., *A review of the enzymatic, physical, and chemical modification techniques of xanthan gum*. International Journal of Biological Macromolecules, 2021. **186**: p. 472-489.
222. Gullo, M., et al., *Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018. **102**(16): p. 6885-6898.
223. Mamlouk, D. and M. Gullo, *Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation*. Indian journal of microbiology, 2013. **53**(4): p. 377-384.
224. Wolf, P., *Optimierung einer fermentativen Methode zur Herstellung orientierter Bakterieller Cellulose für die biomediierte Materialsynthese*. 2021.
225. Masaoka, S., T. Ohe, and N. Sakota, *Production of cellulose from glucose by Acetobacter xylinum*. Journal of fermentation and bioengineering, 1993. **75**(1): p. 18-22.
226. Schramm, M., Z. Gromet, and S. Hestrin, *Synthesis of cellulose by Acetobacter Xylinum. 3. Substrates and inhibitors*. Biochemical Journal, 1957. **67**(4): p. 669.
227. Matsuoka, M., et al., *A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996. **60**(4): p. 575-579.
228. Tonouchi, N., et al., *Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in Acetobacter xylinum*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1996. **60**(8): p. 1377-1379.
229. Vandamme, E., S. De Baets, and A. Steinbuchel, *Polysaccharides I: Polysaccharides of Prokaryotes*. 2004: Chemical Industry Press.

230. Geyer, U., D. Klemm, and H.P. Schmauder, *Kinetics of the utilization of different C sources and the cellulose formation by Acetobacter xylinum*. Acta biotechnologica, 1994. **14**(3): p. 261-266.
231. Yunoki, S., et al., *Role of ethanol in improvement of bacterial cellulose production: analysis using <sup>13</sup>C-labeled carbon sources*. Food science and technology research, 2007. **10**(3): p. 307-313.
232. Johnson, D.C. and A.N. Neogi, *Sheeted products formed from reticulated microbial cellulose*. 1989, Google Patents.
233. Benziman, M., et al., *Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in Acetobacter xylinum*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1980. **77**(11): p. 6678-6682.
234. Gromet-Elhanan, Z. and S. Hestrin, *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum VI: growth on citric acid-cycle intermediates*. Journal of Bacteriology, 1963. **85**(2): p. 284-292.
235. Oikawa, T., T. Morino, and M. Ameyama, *Production of cellulose from D-arabitol by Acetobacter xylinum KU-1*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1995. **59**(8): p. 1564-1565.
236. Cannon, R.E. and S.M. Anderson, *Biogenesis of bacterial cellulose*. Critical reviews in microbiology, 1991. **17**(6): p. 435-447.
237. Rani, M.U. and A. Appaiah, *Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from Gluconacetobacter hansenii UAC09*. Annals of microbiology, 2011. **61**(4): p. 781-787.
238. Tantratian, S., et al., *Effect of dissolved oxygen on cellulose production by Acetobacter sp.* J Sci Res Chula Univ, 2005. **30**(2): p. 179-186.
239. Galas, E., et al., *Optimization of the production of bacterial cellulose using multivariable linear regression analysis*. Acta biotechnologica, 1999. **19**(3): p. 251-260.
240. Hwang, J.W., et al., *Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by Acetobacter xylinum BRC5 in agitated culture*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999. **88**(2): p. 183-188.
241. Ishikawa, A., T. Tsuchida, and F. Yoshinaga, *Production of bacterial cellulose using microbial strain resistant to inhibitor of DHO-dehydrogenase*. Japanese patent A, 1996. **8009965**.
242. Tahara, N., et al., *Degree of polymerization of cellulose from Acetobacter xylinum BPR2001 decreased by cellulase produced by the strain*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1997. **61**(11): p. 1862-1865.
243. Shoda, M. and Y. Sugano, *Recent advances in bacterial cellulose production*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2005. **10**(1): p. 1-8.
244. Noro, N., Y. Sugano, and M. Shoda, *Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum*. Applied microbiology and biotechnology, 2004. **64**(2): p. 199-205.
245. Schiefelbein, S., et al., *Oxygen supply in disposable shake-flasks: prediction of oxygen transfer rate, oxygen saturation and maximum cell concentration during aerobic growth*. Biotechnology letters, 2013. **35**(8): p. 1223-1230.
246. Mohite, B.V., B.K. Salunke, and S.V. Patil, *Enhanced production of bacterial cellulose by using Gluconacetobacter hansenii NCIM 2529 strain under shaking conditions*. Applied biochemistry and biotechnology, 2013. **169**(5): p. 1497-1511.
247. Maier, U. and J. Büchs, *Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors*. Biochemical Engineering Journal, 2001. **7**(2): p. 99-106.
248. Jung, J.Y., J.K. Park, and H.N. Chang, *Bacterial cellulose production by Gluconacetobacter hansenii in an agitated culture without living non-cellulose producing cells*. Enzyme and Microbial Technology, 2005. **37**(3): p. 347-354.
249. Valla, S. and J. Kjosbakken, *Cellulose-negative mutants of Acetobacter xylinum*. Microbiology, 1982. **128**(7): p. 1401-1408.
250. Park, J.K., J.Y. Jung, and Y.H. Park, *Cellulose production by Gluconacetobacter hansenii in a medium containing ethanol*. Biotechnology letters, 2003. **25**(24): p. 2055-2059.

251. Song, H.-J., et al., *Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2009. **26**(1): p. 141-146.
252. Li, H.X., et al., *Determination of the stoichiometry and critical oxygen tension in the production culture of bacterial cellulose using saccharified food wastes*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2011. **28**(12): p. 2306-2311.
253. Zhong, C. and Y.-J. Yuan, *Responses of Taxus cuspidata to hydrodynamics in bubble column bioreactors with different sparging nozzle sizes*. Biochemical engineering journal, 2009. **45**(2): p. 100-106.
254. Krystynowicz, A., et al., *Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2002. **29**(4): p. 189-95.
255. Joris, K., et al., *Microbial production of  $\beta$ -1, 4-Glucan*. Meded Fac Landbouwwet-Rijksuniv Gent, 1990. **55**: p. 1563-1566.
256. Ross, P., et al., *Regulation of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum by cyclic diguanylic acid*. Nature, 1987. **325**(6101): p. 279-281.
257. Yoshinaga, F., N. Tonouchi, and K. Watanabe, *Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1997. **61**(2): p. 219-224.
258. Krystynowicz, A., et al., *Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002. **29**(4): p. 189-195.
259. Valla, S., et al., *Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in Acetobacter xylinum: complementation of cellulose-negative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene*. Molecular and General Genetics MGG, 1989. **217**(1): p. 26-30.
260. Saxena, I.M., E.M. Roberts, and R.M. Brown Jr, *Modification of cellulose normally synthesized by cellulose-producing microorganisms*. 1990, Google Patents.
261. Azuma, Y., et al., *Whole-genome analyses reveal genetic instability of Acetobacter pasteurianus*. Nucleic Acids Research, 2009. **37**(17): p. 5768-5783.
262. Liu, M., et al., *Metabolomic profiling coupled with metabolic network reveals differences in Gluconacetobacter xylinus from static and agitated cultures*. Biochemical Engineering Journal, 2015. **101**: p. 85-98.
263. Gheldof, N., X.-H. Wang, and N.J. Engeseth, *Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources*. Journal of agricultural and food chemistry, 2002. **50**(21): p. 5870-5877.
264. Cheng, H.P., et al., *Cultivation of Acetobacter xylinum for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2002. **35**(2): p. 125-132.
265. Zhong, C., et al., *Metabolic flux analysis of Gluconacetobacter xylinus for bacterial cellulose production*. Applied microbiology and biotechnology, 2013. **97**(14): p. 6189-6199.
266. Zhong, C., et al., *Revealing differences in metabolic flux distributions between a mutant strain and its parent strain Gluconacetobacter xylinus CGMCC 2955*. PloS one, 2014. **9**(6): p. e98772.
267. Chmiel, H., *Bioreaktoren*, in *Bioprozesstechnik*. 2011, Springer. p. 197-236.
268. Ishida, T., et al., *Role of water-soluble polysaccharides in bacterial cellulose production*. Biotechnology and bioengineering, 2003. **83**(4): p. 474-478.
269. Bae, S.O., Y. Sugano, and M. Shoda, *Comparison of bacterial cellulose production in a jar fermentor between Acetobacter xylinum BPR2001 and its mutant, acetan-nonproducing strain EP1*. Journal of microbiology and biotechnology, 2005. **15**(2): p. 247-253.
270. Fang, L. and J.M. Catchmark, *Characterization of water-soluble exopolysaccharides from Gluconacetobacter xylinus and their impacts on bacterial cellulose crystallization and ribbon assembly*. Cellulose, 2014. **21**(6): p. 3965-3978.
271. Trček, J., et al., *Acetan and acetan-like polysaccharides: Genetics, biosynthesis, structure, and viscoelasticity*. Polymers, 2021. **13**(5): p. 815.

272. Zeidan, A.A., et al., *Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications*. FEMS microbiology reviews, 2017. **41**(Supp\_1): p. S168-S200.
273. Ramana, K., A. Tomar, and L. Singh, *Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by Acetobacter xylinum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000. **16**(3): p. 245-248.
274. Leppard, G.G., *Nascent stage of cellulose biosynthesis*. Science, 1975. **189**(4208): p. 1094-1095.
275. Zhou, L., et al., *Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum*. Journal of industrial Microbiology and Biotechnology, 2007. **34**(7): p. 483.
276. Jozala, A.F., et al., *Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview*. Applied microbiology and biotechnology, 2016. **100**(5): p. 2063-2072.
277. Huang, H.-C., et al., *In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation*. Bioresource Technology, 2010. **101**(15): p. 6084-6091.
278. Watanabe, K. and S. Yamanaka, *Effects of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1995. **59**(1): p. 65-68.
279. Strobin, G., et al., *Molecular parameters of bacterial cellulose. Effect of temperature and pH biosynthesis medium*. Polimery, 2003. **48**(11-12): p. 779-783.
280. Fang, L. and J.M. Catchmark, *Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from Gluconacetobacter strains*. Carbohydrate polymers, 2015. **115**: p. 663-669.
281. Griffin, A.M., V.J. Morris, and M.J. Gasson, *Genetic analysis of the acetan biosynthetic pathway in Acetobacter xylinum: Nucleotide sequence analysis of the aceB aceC aceD and aceE genes*. DNA Sequence, 1996. **6**(5): p. 275-284.
282. Gayda, R.C., et al., *Outer membrane protein a and other polypeptides regulate capsular polysaccharide synthesis in E. coli K-12*. Molecular and General Genetics MGG, 1979. **175**(3): p. 325-332.
283. Ehrlich, J., et al., *Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete*. Science, 1947. **106**(2757): p. 417-417.
284. Harvey, R. and A. Koch, *How partially inhibitory concentrations of chloramphenicol affect the growth of Escherichia coli*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1980. **18**(2): p. 323-337.
285. Stefan Schwarz, J.S., Kristina Kadlec, Yang Wang, Geovana Brenner Michael, Andrea T Feßler, Birte Vester, *Lincosamides, Streptogramins, Phenicol, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance* Cold Spring Harb Perspect Med., 2016. **6**(11).
286. Singhal, K.K., et al., *An Updated Review on Pharmacology and Toxicities Related to Chloramphenicol*. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development, 2020. **8**(4): p. 104-109.
287. Yamanaka, S. and J. Sugiyama, *Structural modification of bacterial cellulose*. Cellulose, 2000. **7**(3): p. 213-225.
288. Chung, K., *Thickened cell walls of Bacillus cereus grown in the presence of chloramphenicol: their fate during cell growth*. Canadian Journal of Microbiology, 1971. **17**(12): p. 1561-1565.
289. Henning, A.L. and J.M. Catchmark, *The impact of antibiotics on bacterial cellulose in vivo*. Cellulose, 2017. **24**(3): p. 1261-1285.
290. González-García, Y., et al., *In Vivo Modification of Microporous Structure in Bacterial Cellulose by Exposing Komagataeibacter xylinus Culture to Physical and Chemical Stimuli*. Polymers, 2022. **14**(20): p. 4388.
291. Nguyen, P.-T., et al., *Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications*. AIMS microbiology, 2020. **6**(4): p. 451.
292. Siewert, G. and J.L. Strominger, *Bacitracin: an inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in the biosynthesis of the peptidoglycan of*

- bacterial cell walls*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1967. **57**(3): p. 767-773.
293. Stoodley, P., et al., *Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop*. Biotechnology and bioengineering, 1998. **57**(5): p. 536-544.
  294. Hohne, D.N., J.G. Younger, and M.J. Solomon, *Flexible microfluidic device for mechanical property characterization of soft viscoelastic solids such as bacterial biofilms*. Langmuir, 2009. **25**(13): p. 7743-7751.
  295. Shaw, T., et al., *Commonality of elastic relaxation times in biofilms*. Physical review letters, 2004. **93**(9): p. 098102.
  296. Svagan, A.J., M.A. Azizi Samir, and L.A. Berglund, *Biomimetic polysaccharide nanocomposites of high cellulose content and high toughness*. Biomacromolecules, 2007. **8**(8): p. 2556-2563.
  297. Franz, E. and E. Schiebold, *Beiträge zur Struktur der Bakteriencellulose*. Journal für Praktische Chemie, 1943. **1**(1-6): p. 4-16.
  298. Haigler, C.H., et al., *Alteration of in vivo cellulose ribbon assembly by carboxymethylcellulose and other cellulose derivatives*. The Journal of cell biology, 1982. **94**(1): p. 64-69.
  299. Yamamoto, H., F. Horii, and A. Hirai, *In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses Ia and Ib at the early stage of incubation*. Cellulose, 1996. **3**(1): p. 229-242.
  300. Brown, E.E. and M.-P.G. Laborie, *Bioengineering bacterial cellulose/poly (ethylene oxide) nanocomposites*. Biomacromolecules, 2007. **8**(10): p. 3074-3081.
  301. Hirai, A., et al., *In situ crystallization of bacterial cellulose III. Influences of different polymeric additives on the formation of microfibrils as revealed by transmission electron microscopy*. Cellulose, 1998. **5**(3): p. 201-213.
  302. Tokoh, C., et al., *Cellulose synthesized by Acetobacter xylinum in the presence of acetyl glucomannan*. Cellulose, 1998. **5**(4): p. 249-261.
  303. Watanabe, K., et al., *Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture*. Cellulose, 1998. **5**(3): p. 187-200.
  304. Ruka, D.R., G.P. Simon, and K.M. Dean, *Altering the growth conditions of Gluconacetobacter xylinus to maximize the yield of bacterial cellulose*. Carbohydrate polymers, 2012. **89**(2): p. 613-622.
  305. Palonen, H., M. Tenkanen, and M. Linder, *Dynamic interaction of Trichoderma reesei cellobiohydrolases Cel6A and Cel7A and cellulose at equilibrium and during hydrolysis*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(12): p. 5229-5233.
  306. Reineke, W. and M. Schlömann, *Umweltmikrobiologie*. 2007: Springer.
  307. Carlile, M.J., S.C. Watkinson, and G.W. Gooday, *The fungi*. 2001: Gulf Professional Publishing.
  308. Ottow, J.C., *Mikrobiologie und Biochemie des Kohlenstoffkreislaufes*, in *Mikrobiologie von Böden*. 2011, Springer. p. 247-276.
  309. Wüstenberg, T., *Cellulose und Cellulosederivate: Grundlagen, Wirkungen und Applikationen*. 2013: Behr's Verlag DE.
  310. Okamoto, T., et al., *Cloning of the Acetobacter xylinum cellulase gene and its expression in Escherichia coli and Zymomonas mobilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994. **42**: p. 563-568.
  311. Standal, R., et al., *A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in Acetobacter xylinum are colocalized with the bcs operon*. Journal of bacteriology, 1994. **176**(3): p. 665-672.
  312. Tonouchi, N., et al., *A beta-glucosidase gene downstream of the cellulose synthase operon in cellulose-producing Acetobacter*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1997. **61**(10): p. 1789-1790.
  313. Tahara, N., et al., *Purification and characterization of exo-1, 4-β-glucosidase from Acetobacter xylinum BPR2001*. Journal of fermentation and bioengineering, 1998. **85**(6): p. 589-594.
  314. Nectow, A.R., M.E. Kilmer, and D.L. Kaplan, *Quantifying cellular alignment on anisotropic biomaterial platforms*. Journal of Biomedical Materials Research Part A:

- An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2014. **102**(2): p. 420-428.
315. Mukhopadhyay, M. and B.S. Rao, *Modeling of supercritical drying of ethanol-Soaked silica aerogels with carbon dioxide*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 2008. **83**(8): p. 1101-1109.
  316. Choi, J. and D.J. Suh, *Catalytic applications of aerogels*. Catalysis surveys from Asia, 2007. **11**(3): p. 123-133.
  317. Sakurada, I., Y. Nukushina, and T. Ito, *Experimental determination of the elastic modulus of crystalline regions in oriented polymers*. Journal of Polymer Science, 1962. **57**(165): p. 651-660.
  318. Nishina, T., K. Takano, K. Nakame. J. Pol. Sci. B, 1995. **33**: p. 1647.
  319. Mondal, M. and H. Ibrahim, *Mechanism of structure formation of microbial cellulose during nascent stage*. Cellulose, 2013. **20**(3): p. 1073-1088.
  320. Shirzad, M., et al., *Design, evaluation, and optimization of 3D printed truss scaffolds for bone tissue engineering*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2021. **120**: p. 104594.
  321. Wiatrak, B., et al., *PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions*. Cells, 2020. **9**(4): p. 958.
  322. Novotna, K., et al., *Cellulose-based materials as scaffolds for tissue engineering*. Cellulose, 2013. **20**(5): p. 2263-2278.
  323. Revin, V., et al., *Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products*. Brazilian journal of microbiology, 2018. **49**: p. 151-159.
  324. Naomi, R., R. Bt Hj Idrus, and M.B. Fauzi, *Plant-vs. Bacterial-derived cellulose for wound healing: A review*. International journal of environmental research and public health, 2020. **17**(18): p. 6803.
  325. Sajjad, W., et al., *Development of modified montmorillonite-bacterial cellulose nanocomposites as a novel substitute for burn skin and tissue regeneration*. Carbohydrate polymers, 2019. **206**: p. 548-556.
  326. Vandamme, E.J., S. Baets, and A. Steinbüchel, *Biopolymers: Polysaccharides II, Polysaccharides from Eukaryotes*. 2002: Wiley-Vch.
  327. Xiao, W., et al., *Controllable mineralization of calcium carbonate on regenerated cellulose fibers*. Crystal Research and Technology, 2011. **46**(10): p. 1071-1078.
  328. Becker, A., et al., *Microbial production of biopolymers and polymer precursors. Xanthan Biosynthesis by Xanthomonas Bacteria: an Overview of the Current Biochemical and Genomic Data*. Caister Academic Press: UK, 2009: p. 1-13.
  329. Doi, Y., *Biotechnology of biopolymers*. 2005.
  330. Jumel, K., K. Geider, and S.E. Harding, *The solution molecular weight and shape of the bacterial exopolysaccharides amylovoran and stewartan*. International journal of biological macromolecules, 1997. **20**(4): p. 251-258.
  331. Rosenberg, E., et al., *Purification and chemical properties of Acinetobacter calcoaceticus A2 biodispersan*. Applied and environmental microbiology, 1988. **54**(2): p. 323-326.
  332. Ron, E.Z. and E. Rosenberg, *Natural roles of biosurfactants: Minireview*. Environmental microbiology, 2001. **3**(4): p. 229-236.
  333. THERKELSEN, G.H., *Carrageenan*, in *Industrial gums*. 1993, Elsevier. p. 145-180.
  334. Ullah, H., H.A. Santos, and T. Khan, *Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery*. Cellulose, 2016. **23**(4): p. 2291-2314.
  335. Zhang, R. and K.J. Edgar, *Properties, chemistry, and applications of the bioactive polysaccharide curdlan*. Biomacromolecules, 2014. **15**(4): p. 1079-1096.
  336. Morris, V., *Biotechnically produced carbohydrates with functional properties for use in food systems*. Food Biotechnology, 1990. **4**(1): p. 45-57.
  337. Padmanabhan, P.A., et al., *Rheology and gelation of water-insoluble dextran from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-523*. Carbohydrate Polymers, 2003. **53**(4): p. 459-468.

338. Szejtli, J., *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*. Chemical reviews, 1998. **98**(5): p. 1743-1754.
339. Szejtli, J., *Past, present and future of cyclodextrin research*. Pure and Applied Chemistry, 2004. **76**(10): p. 1825-1845.
340. Prajapati, V.D., et al., *An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer*. Carbohydrate Polymers, 2013. **93**(2): p. 670-678.
341. Heyraud, A., et al., *Structural characterization and rheological properties of an extracellular glucuronan produced by a Rhizobium meliloti M5N1 mutant strain*. Carbohydrate research, 1993. **240**: p. 71-78.
342. Arias, S., et al., *Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium Halomonas maura, with a novel composition and interesting properties for biotechnology*. Extremophiles, 2003. **7**(4): p. 319-326.
343. Birkhed, D., K.-G. Rosell, and K. Granath, *Structure of extracellular water-soluble polysaccharides synthesized from sucrose by oral strains of Streptococcus mutans, Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguis and Actinomyces viscosus*. Archives of oral biology, 1979. **24**(1): p. 53-61.
344. Yang, B.Y., J.S. Gray, and R. Montgomery, *The structure of stewartan, a capsular polysaccharide produced by Erwinia stewartii strain DC283*. Carbohydrate research, 1996. **296**(1-4): p. 183-201.
345. Sworn, G., *Xanthan gum*, in *Handbook of hydrocolloids*. 2021, Elsevier. p. 833-853.
346. Kaur, V., et al., *Welan gum: microbial production, characterization, and applications*. International journal of biological macromolecules, 2014. **65**: p. 454-461.
347. Deinema, M.H. and L. Zevenhuizen, *Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation*. Archiv für Mikrobiologie, 1971. **78**(1): p. 42-57.

## Anhang

### Erste Veröffentlichung:

GMACH, Yvonne; VAN OPDENBOSCH, Daniel. **Structural and mechanical anisotropy in rheotactically aligned bacterial cellulose**. Cellulose, 2022, 29. Jg., Nr. 16, S. 8521-8537.

### Zusammenfassung der ersten Publikation

In dieser ersten Veröffentlichung wird der Versuchsaufbau und das rheotaktische Wachstum der Essigsäurebakterien *K. sucrofermentans* auf flachen Oberflächen beschrieben. Der eigens hierfür konstruierte Einbau in einen Weithalsflaschen-Fermenter ist eine Weiterentwicklung des Bioreaktors mit geneigter Ebene. In der verwendeten Version verteilt eine Düse den Volumenstrom des Mediums über eine Bewuchsfläche, welche mit wachstumsinduzierenden Hindernissen versehen ist. Im Laufe der Inkubationszeit bildet sich ein Biofilm auf der Oberfläche der Bewuchsfläche. Durch verschiedene Reinigungsschritte und die Trocknung an der Luft entsteht aus dem Hydrogel ein festes, papierartiges Material. Die Cellulosematrix besteht aus ausgerichteten, verdrillten und verwobenen Cellulose-Nanofibrillen, welche zu einer Vorzugsrichtung im Material führen und dadurch besondere physikalische Eigenschaften generieren. Diese wurden durch Röntgenbeugung, Rasterelektronenmikroskopie, optischer Mikroskopie und mechanischer Prüfung charakterisiert. Das Biomaterial weist große Unterschiede in der Zähigkeit auf. Diese resultieren aus Unterschieden in der Bruchdehnung und der stark anisotropen Stärken der Prüfkörper. Es werden rheotaktische Wachstumsmerkmale der Essigsäurebakterien, die Ausrichtung der Cellulosefibrillen, die richtungsmechanischen Eigenschaften, strukturelle und mechanische Anisotropien und kristalline Phaseneigenschaften diskutiert und mit stehend gewachsenen Cellulosepelikeln und Beispielen aus der Literatur verglichen. Die mechanische und strukturelle Anisotropie wird in nativen bakteriellen Cellulosehäutchen bewertet und eine vorläufige Grenze der erreichbaren strukturellen Ausrichtung in BC, sowie eine Korrelation zwischen Kristallinität und Unordnung in der kristallinen Phase von BC vorgestellt.

## Zweite Veröffentlichung:

GMACH, Yvonne; VAN OPDENBOSCH, Daniel. **Threedimensionally patterned, hierarchically and anisotropically structured bacterial cellulose.** *Materials Research Express*, 2023, 10. Jg., Nr. 3, S. 035401.

## Zusammenfassung der zweiten Publikation

In der zweiten Veröffentlichung wird gezeigt, dass neben 2D-Materialien aus bakterieller Cellulose auch 3D-Cellulosemonolithe, mithilfe eines rheotaktisch beeinflussten Wachstums der Essigsäurebakterien *K. sucrofermentans* generiert werden können. Der entwickelte Versuchsaufbau der ersten Publikation wird um eine Flusszelle erweitert. Als Beispiel für einen 3D-Körper, wird ein FDM-3D-Druck gefertigter Gyroid aus PLA als Wachstumsvorlage für die Essigsäurebakterien eingebaut und nach dem vollständigen Durchwachsen mit Lösungsmittel entfernt. Es bleibt ein Negativ der Gyroidstruktur aus bakterieller Cellulose zurück, welche durch Gefriertrocknung ihre makroskopisch monolithische und hierarchisch anisotrop organisierte Struktur behält. Das strömungsgerichtete Wachstum der Essigsäurebakterien durch die Gyroid-Struktur wird durch die Analyse der bakteriellen Cellulose mittels Rasterelektronenmikroskop überprüft. Polarisationsfotografien von Schnitten durch den 3D-Körper geben Aufschluss über die Ausrichtung der Cellulosefibrillen im Inneren des Gyroids. Durch die B.E.T.-Messung wird die innere Oberfläche des Materials sowie die Porengrößenverteilung der nanoskaligen Präzisions-Silica-Nachbildungen bestimmt. Schließlich werden die strukturelle Anisotropie auf der Cellulosefaserebene, die auftretende Schrumpfung bei der Verarbeitung und die daraus resultierenden Eigenschaften der Cellulosemonolithe diskutiert. Die erzielte Strebendichte mit  $50 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  und die bevorzugte Orientierung der Cellulose innerhalb der Streben sind wesentliche Erkenntnisse der Arbeit und sind ebenso Teil der Diskussion.

**Tabelle 6:** Auswahl an möglichen Biopolymeren für die Dissertation, deren Löslichkeit in Wasser und Besonderheiten.

EPS	Produzent	Domäne	Löslichkeit in Wasser	Besonderheiten/Verwendung	Quellen
Acetan	<i>Acetobacter xylinum</i>	Prokaryot	ja		[268]
Alginat	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prokaryot, Eukaryot → Alge	Schlecht löslich in kaltem Wasser	In Anwesenheit von mono- und divalenten Kationen bilden sie viskose Lösungen oder Gele.	[210, 328, 329]
Amylovoran	<i>Erwinia amylovora</i>	Prokaryot	ja	Kapsel EPS	[330]
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Prokaryot	ja	Tensid, bindet Schwermetalle	[331, 332]
Carrageenan	<i>Chondrus crispus</i>	Eukaryot → Alge	ja	temperaturbeständiges Geliermittel und Emulgator für Light-Produkte	[333]
<b>Cellulose</b>	<i>Acetobacter xylinum</i>	Prokaryot, Eukaryot → Pflanze	<b>nein</b>	Wundaufgaben, veganes Fleisch, veganes Leder	[210, 328, 329, 334]
<b>Chitosan</b>	<i>Mucorales spp.</i>	Eukaryot → Pilz	<b>nein</b>	Fettbindung, Bindung von Schwermetallen	[326]
<b>Chitin</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	Eukaryot → Pilz	<b>nein</b>	Strukturgebend, durchscheinend, biegsam, elastisch und ziemlich zäh	[326]
Curdlan	<i>Alcaligenes faecalis var. myxogenes</i> , <i>Rhizobium meliloti</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Prokaryot, Eukaryot → Alge	Schlecht löslich	Geliermittel, Immobilisierungsmatrix, in anti-AIDS Medikamenten	[328, 329, 335]
Cyclophoran	<i>Agrobacterium spp.</i> , <i>Rhizobium spp.</i> , <i>Xanthomonas spp</i>	Prokaryot	-	-	[336]
Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum</i> ; <i>Lactobacillus hilgardii</i>	Prokaryot	Ja, abhängig von der Verzweigung	Dient <i>L. mesenteroides</i> nicht als Speicherstoff. Medizin als Blutplasmaersatz	[210, 329, 337-339]
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Prokaryot	ja	Verwendung wie Alginat z.B. für die Immobilisierung von Zellen und Enzymen, technischer Emulgator für Öl-in-Wasser Emulsionen	[328]
Galactoglucan	<i>Achromobacter spp.</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Pseudomonas marginalis</i> , <i>Rhizobium spp.</i> , <i>Zooglea' spp.</i>	Prokaryot	-	-	[328]
Gellan	<i>Aureomonas elodea</i> ; <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Prokaryot	ja	Deacetyliert als Verfestigung von Kulturmedien, nativ ein elastisches Gel, als Agar-Ersatz verwendbar bei Temperaturen bis 120 °C.	[340]

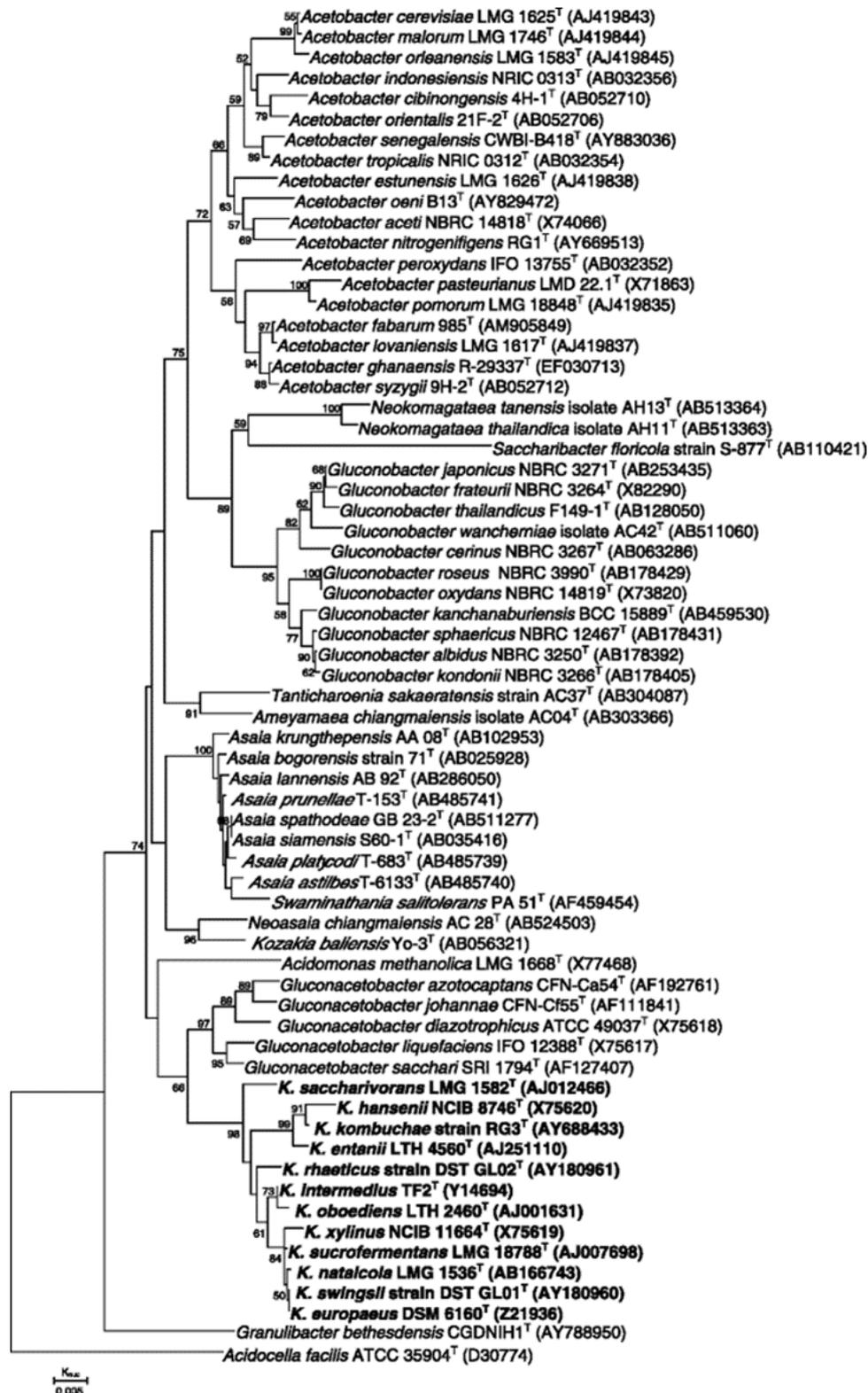
Glucuronan – modifiziertes Succinoglycan	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Prokaryot	ja	-	[341]
Hyaluronsäure	<i>Streptococcus equi, Streptococcus zooepidemicus</i>	Prokaryot	ja	Kommt als Kapsel um die Bakterien vor. Viskoelastischer und pseudo-plastischer Charakter.	[328]
Indican	<i>Beijerinckia indica</i>	<i>Beijerinckia indica</i>	-	-	-
Kefiran	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Beijerinckia indica</i>	ja	Kefir Körner bestehen aus 45 % des EPS.	[328]
Laminarin	<i>Laminaria sp.</i>	Eukaryot → Alge	-	-	-
Lentinan	<i>Lentinus edodes</i>	Eukaryot → Pilz	-	-	[328]
Leucosin	<i>Laminaria sp.</i>	Eukaryot → Alge	-	-	-
Levan	<i>Alcaligenes viscosus, Zymomonas mobilis, Bacillus subtilis</i>	Prokaryot	ja	Levan gehört zu den Fruktanen. Schlechte chemische Stabilität, hitzestabil, bildet kein Gel.	[328, 329]
Mauran	<i>Halomonas maura</i>	Prokaryot	ja	EPS aus der antarktischen See. Bindet eine Reihe von Schermetall-Kationen, stabil unter hohen Salzkonzentrationen, Gefrieren, ...	[328, 342, 343]
Mutan	<i>Streptococcus mutans</i>	Prokaryot	Überwiegend unlöslich	-	-
N-acetyl- glucosamine	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Prokaryot	-	-	-
N-acetyl- heparosan	<i>Escherichia coli</i>	Prokaryot	-	-	-
Pleuran	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Eukaryot → Pilz	-	-	-
Pullulan	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Eukaryot → Pilz	ja	Stabilität und Speicher der Pilze, für Menschen unverdaulich.	[326, 328]
Rhamsan	<i>Sphingomonas spp.</i>	Prokaryot	ja	Erhöht mit zunehmender Konzentration die Viskosität in der wässrigen Lösung stark, birgt eigenartige rheologische Eigenschaften.	[328]
Scleroglucan	<i>Sclerotium rolfsii, Sclerotium delfinii, Sclerotium gluconicum</i>	Eukaryot → Pilz	ja	Viskosität für Ölrückgewinnung, thermostabiler als Xanthan.	[326]
Schizophyllan	<i>Schizophyllum commune</i>	Eukaryot → Pilz	ja	Arrangiert sich zu einer Triple-Helix in wässrigen Lösungen.	[326]
Stewartan	<i>Pantoea stewartii subsp. stewartii, Erwinia stewartii</i>	Prokaryot	ja	Kapsel EPS	[330, 344]

Succinoglycan	<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i>	Prokaryot	ja	Temperaturabhängiges pseudoplastisches Verhalten, selbstheilend und selbstnivellierend, bildet keine Gele sondern Lösungen	[328, 329]
Xanthan	<i>Xanthomonas campestris</i>	Prokaryot	ja	Hoch viskose wässrige Lösungen;	[210, 329, 345]
Welan	<i>Alcaligenes</i> spp., <i>Sphingomonas</i> spp.	Prokaryot	ja	Thermostabil, pH-stabil, stabil in Salzlösungen, behält seine Viskosität bei höheren Temperaturen bei.	[328, 346]
Zyмосan	<i>Hefen</i>	Eukaryot → Pilz	-	-	-

**Tabelle 7:** BC produzierende Mikroorganismen, deren Zellwandstruktur und Art der BC [40, 76, 78, 222, 236, 347].

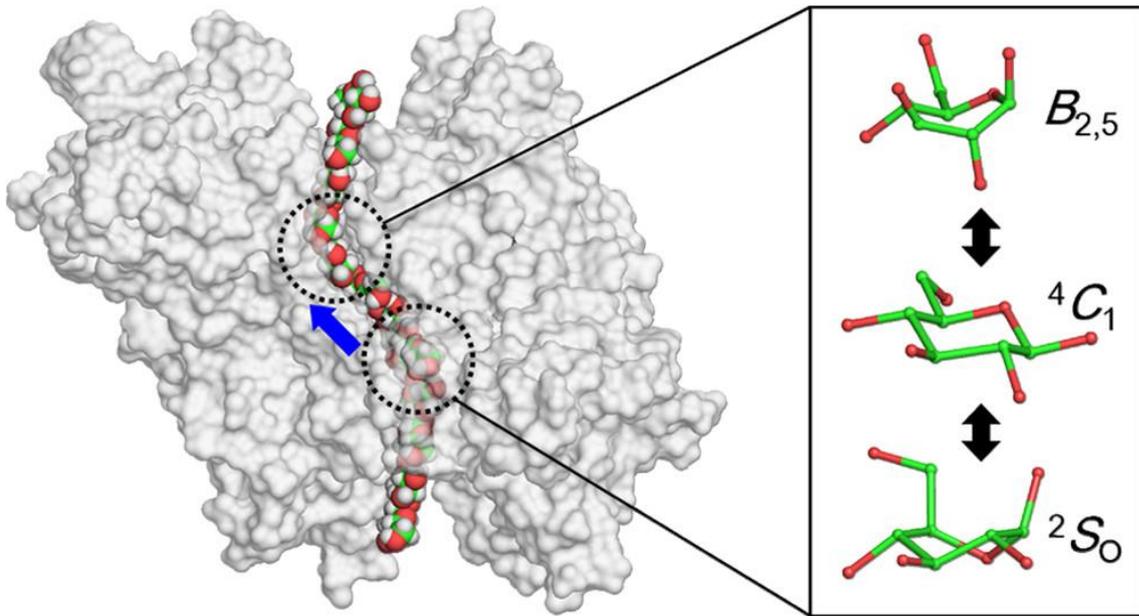
<b>Organismus (Genus)</b>	<b>Zellwandstruktur</b>	<b>Art der produzierten BC</b>	<b>Gefährdungsklasse*</b>
<i>Acetobacter</i>	Gram-negativ	Extrazelluläre Pellikel, Cellulose Bänder	R1 (65 von 65)
<i>Achromobacter</i>	Gram-negativ	Cellulose Fibrillen	R1 (11 von 21)
<i>Aerobacter</i>	Gram-negativ	Cellulose Fibrillen	R1 (54 von 54)
<i>Agrobacterium</i>	Gram-negativ	Kurze Fibrillen	R1 (13 von 13)
<i>Alcaligenes</i>	Gram-negativ	Cellulose Fibrillen	R1 (20 von 26)
<i>Burkholderia</i>	Gram-negativ	-	R1 (103 von 123)
<i>Dickeya</i>	Gram-negativ	-	R1 (9 von 9)
<i>Erwinia</i>	Gram-negativ	-	R1 (39 von 41)
<i>Escherichia</i>	Gram-negativ	-	R1 (2 von 10)
<i>Pseudomonas</i>	Gram-negativ	Keine deutlichen Fibrillen	R1 (256 von 272)
<i>Rhizobium</i>	Gram-negativ	Kurze Fibrillen	R1 (208 von 208)
<i>Salmonella</i>	Gram-negativ	-	R1 (1 von 13)
<i>Sarcina</i>	<b>Gram-positiv</b>	Amorphe Cellulose	R1 (46 von 47)
<i>Zoogloea</i>	Gram-negativ	Schlecht definierte Cellulose	R1 (5 von 5)

\* Suche mit: <https://biostoffe.dguv.de> am 09.12.2022



**Abbildung 50:** Original Abbildung von Yamada, Hoshino und Ishikawa 1998 [52]: Vorschlag von *Komagatabacter* gen. nov., für Stämme, die der *Gluconacetobacter xylinus*-Gruppe in den  $\alpha$ -Proteobakterien angehören. Mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages.

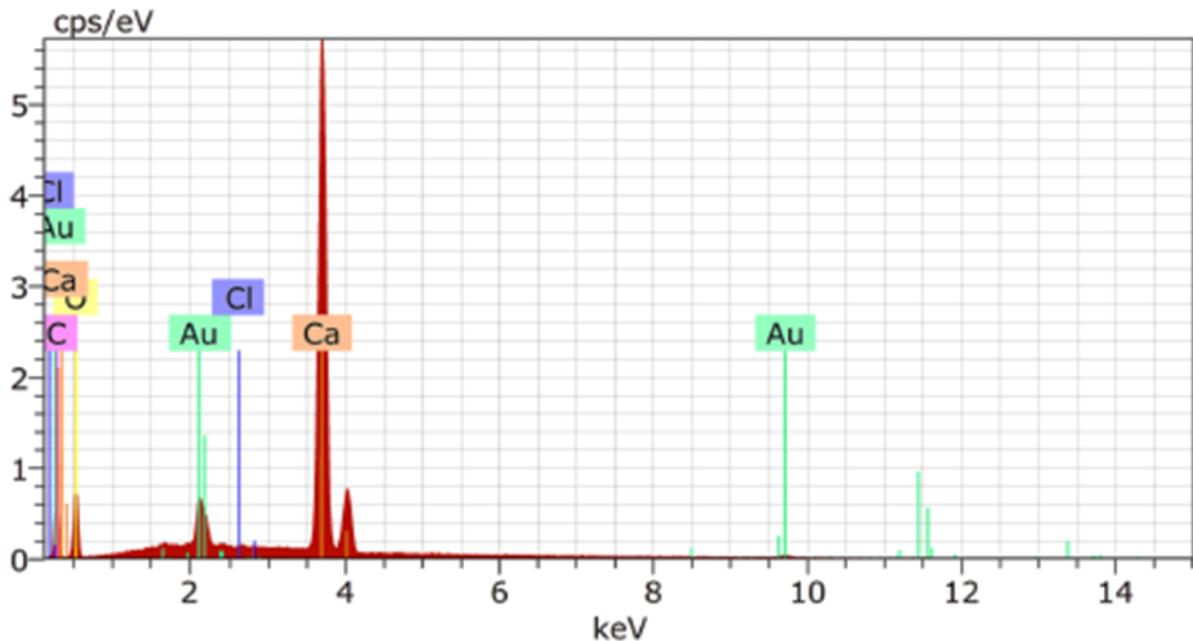
Es ist die phylogenetische Beziehung der Gattungen *Gluconacetobacter* und *Komagatabacter* zu sehen. Der phylogenetische Baum wurde auf der Grundlage von 16S-rRNA-Gensequenzen durch das Neighbour-Joining-Verfahren konstruiert. Als Außengruppe wurde der Typstamm *Acidocella facillis* verwendet. Die Zahlen an den Knoten geben Bootstrap-Werte (%) an, die von 1.000 Replikationen abgeleitet wurden.



**Abbildung 51:** Computergestütztes Modell und Molekulardynamik (MD)-Simulation der Cellulosesynthese-Untereinheit D-Octamer (CesD) aus *Komagataeibacter hansenii*; Nachdruck aus Uto et al. [89] mit freundlicher Genehmigung von Copyright © 2021, American Chemical Society.

Hier ist im Original zu sehen, wie sich die Autoren die Bildung der Celluloseketten in der Cellulosesynthese-Untereinheit vorstellen. Sie postulieren, dass sich die die Konformationen der Glukosemoleküle ( $B_{2,5}$ ,  ${}^4C_1$  und  ${}^2S_0$ ) verändern.

EDX-Spektrum der Kristalle aus dem GHC-Medium:



**Abbildung 52:** EDX-Spektrum von einem der Kristalle aus dem GHC-Medium nach der Kultivierung mit *Komagataeibacter*. Mit 13,39 Gew.-% Kohlenstoff, 19,34 Gew.-% Sauerstoff, **60,95 Gew.-% Kalzium** und 6,25 Gew.-% Gold vom Sputtern.