

Polyhydroxybutyrat-Synthese

Quantifizierungsmethoden für die Produktion von PHB mittels *Halomonas halophila*

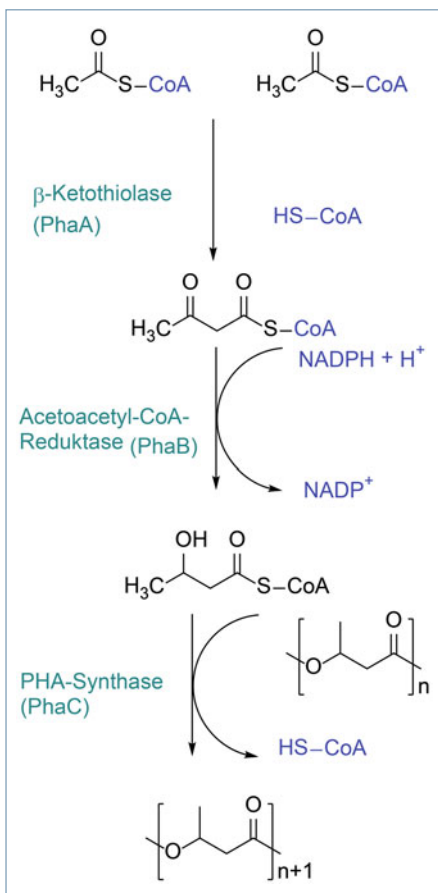
RAPHAELA SÜSS¹, VIKTORIA LEITNER¹, CHRISTIAN PAULIK², ROBERT PUTZ¹, BIRGIT KAMM¹

¹ WOOD K PLUS KOMPETENZZENTRUM HOLZ GMBH, LINZ, ÖSTERREICH

² JOHANNES KEPLER UNIVERSITÄT, LINZ, ÖSTERREICH

The quantification of polyhydroxybutyrate (PHB) in biomass of *Halomonas halophila* was compared using different methods (TGA, GC-FID, GC-MS, HPLC). The determined PHB contents were similar in all applied methods. The observed differences between washed and unwashed samples are discussed. Basically, the time required to determine the final results is significantly different by the methods used. With regard to the total analysis time, the application of the TGA is the method of choice.

DOI: 10.1007/s12268-019-1031-0
© Springer-Verlag 2019



▲ **Abb. 1:** Dreistufiger Biosyntheseweg von Polyhydroxybutyrat (PHB) aus Acetyl-CoA (in Anlehnung an [8]).

■ In biobasierten Anwendungen, wie der Medizintechnik (Implantate, Depotpräparate, Nähte), ist mikrobielles Polyhydroxybutyrat (PHB, Poly(3HB)) aufgrund des Eigenschaftsprofils, wie Thermoplastizität und/oder Elastizität, einem Schmelzpunkt von 175 °C und einem Glaspunkt zwischen 5 und 10 °C, bereits gut etabliert [1]. Neuere Entwicklungen fokussieren auf Mikrobeads für Anwendungen in der Kosmetik [2]. Aufgrund der interessanten Eigenschaften von PHB gibt es Anstrengungen, höherskalige technische Applikationen wie extrudierbare Folien oder Barrierebeschichtungen für den Lebensmittelbereich umzusetzen [3].

Herausforderungen auf dem Weg zu höherskaligen technischen Applikationen

Polyhydroxyalkanoate (PHA) sind biobasierte Polymere, die von vielen Mikroorganismen als Energie- und Kohlenstoffspeicher gebildet werden. Die Biosynthese von PHA wird meist durch bestimmte Mangelbedingungen (z. B. Mangel an den Elementen Phosphor, Stickstoff, an Spurenelementen oder Sauerstoffmangel) bei gleichzeitigem Überangebot an Kohlenstoffquellen ausgelöst. Die Polymere werden in Form von Granula als Speicherstoffe in den Zellen der Bakterien abgelagert. Je nach Mikroorganismus und Kultivierungsbedingungen werden Homo- oder Ko-

polyester mit unterschiedlichsten Hydroxycarbonsäuren erzeugt. Polyhydroxyalkanoate, die von Bakterien produziert werden, sind biologisch abbaubare und biokompatible lineare Polyester [4]. Das häufigste Mitglied der PHA-Familie ist Polyhydroxybutyrat (PHB). Polyhydroxybutyrat ist ein kurzkettiges PHA (scPHA) mit vier Kohlenstoffatomen in seinen Monomeren [5]. Um höherskalige technische Anwendungen industriell umzusetzen, ist es notwendig, einfache, schnelle und reproduzierbare Methoden zur Quantifizierung bereitzustellen. Somit war die Zielstellung, Quantifizierungsmethoden für PHB in Biomasse aus *Halomonas halophila* zu evaluieren. Hierfür werden die thermogravimetrische Analyse (TGA), Gaschromatographie (GC-FID, GC-MS) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet und vergleichend betrachtet.

Kultivierung, Waschwirkung sowie Methoden zur Quantifizierung

Zur Kultivierung von *Halomonas halophila* DSMZ 4770 aus Kryostocks wurde das Medium DSMZ 434 der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, verwendet. Für die Fermentationsversuche wurden die gezüchteten Bakterien nach 24 Stunden in Medien mit einer höheren Glucosekonzentration (40 Gramm pro Liter) überführt. Den dreistufigen Biosyntheseweg von PHB zeigt **Abbildung 1**.

Alle Biomasseproben wurden zentrifugiert, um die Zellen vom Medium zu trennen, und anschließend bei 60 °C für 72 Stunden getrocknet. Für die Quantifizierung von PHB in Biomasse wurden nun vier verschiedene Methoden verwendet und miteinander verglichen: die gut etablierte Gaschromatographie-mit-Flammenionisationsdetektor (GC-FID)-Methode von Braunegg, Sonnleitner und Lafferty [6], die Kopplung von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS), die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (*high pressure liquid chromatography*, HPLC) und die thermogravimetrische Analyse (TGA). Außerdem wurden gewaschene und ungewa-

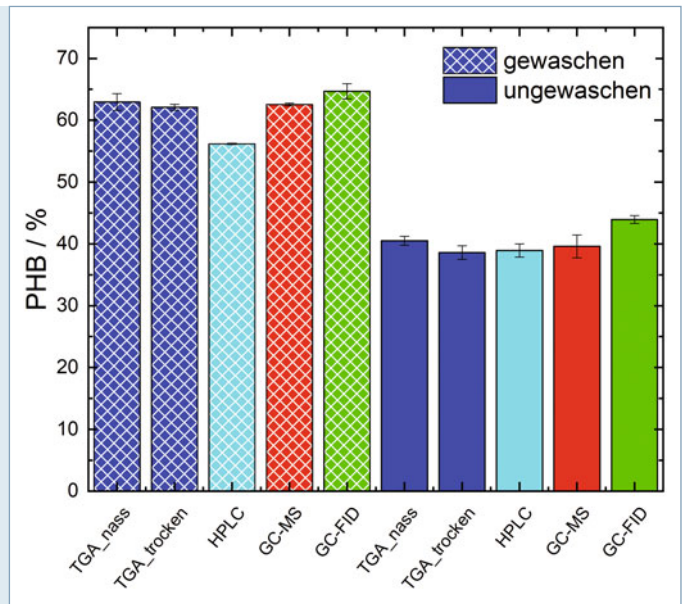
sche Proben unterschieden, um die Wirkung von wiederholtem Waschen mit deionisiertem Wasser auf halophile Zellen zu bestimmen. Die TGA-Messungen wurden parallel für nasse Proben durchgeführt, um zu sehen, ob der Trocknungsschritt notwendig ist (Tab. 1).

Angewandte Methoden

Thermogravimetrische Analyse (TGA): Bei dieser Methode wird die Massenänderung einer Probe in Abhängigkeit von der Temperatur und Zeit gemessen. Dazu wird die Probe in einem kleinen temperaturstabilen Tiegel in einem Ofen mit einem vorgegebenen Temperaturprogramm auf 550 °C erhitzt und der Massenverlust über die Zeit von einer an den Probenhalter gekoppelten Mikrowaage aufgezeichnet. Während der Analyse wird der Probenraum mit Stickstoff gespült, um eine Oxidation zu vermeiden. Mithilfe des aufgezeichneten Masseverlustes über die Zeit kann nach der Messung die Zersetzungstemperatur, der PHB-Gehalt in Prozent der Trockenmasse und der anorganische Rest grafisch ermittelt werden.

Gaschromatographie (GC): Die Gaschromatographie eignet sich nur für Proben, die gasförmig oder unzersetzt verdampfbar sind. Der Trennvorgang beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Substanzen zwischen der mobilen Gasphase und der stationären Phase. Während sich die mobile Phase an der stationären Phase vorbeibewegt, nimmt sie die Stoffe mehr oder weniger schnell mit. Stoffe, die sich stark an die stationäre Phase binden, werden langsam mitwandern, solche mit mehr Affinität zur mobilen Phase wandern schneller. Das PHB muss daher vor der Analyse in einen entsprechenden Methylester umgewandelt werden; die

► **Abb. 2:** Vergleich der verschiedenen Quantifizierungsmethoden. Die gemusterten Balken zeigen die Mittelwerte der gewaschenen Proben, die vollen Balken diejenigen der ungewaschenen Proben, jeweils mit Standardabweichungen (für Details zu den Methoden siehe Text).



Probenvorbereitung ist in **Tabelle 1** beschrieben.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC): Die HPLC ist ein Trennverfahren, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase unter hohem Druck über eine stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird. Sie gehört zur Gruppe der Säulenchromatographien, bei denen die stationäre Phase in eine Stahlsäule gepackt ist. Für die Quantifizierung von PHB muss dieses zuerst in eine detektierbare Crotonsäure überführt werden (Tab. 1).

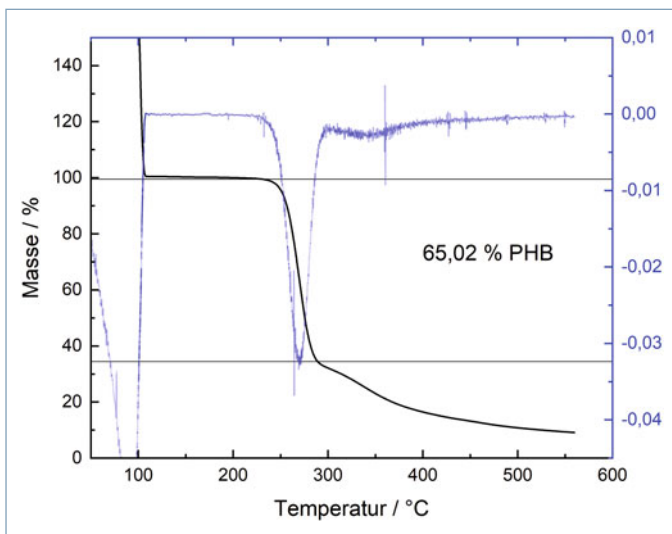
Ergebnisse

Die Quantifizierung von PHB in Biomasse von *H. halophila* wurde mit allen getesteten Methoden erreicht. Ein Vergleich der Methoden ist in **Abbildung 2** gezeigt. Die bestimmten PHB-Gehalte waren in allen angewandten Verfahren ähnlich, auch für die nassen und

getrockneten Proben, die mittels TGA gemessen wurden. Ein Beispiel für die Quantifizierung von PHB für eine feuchte Biomasseprobe mithilfe der thermogravimetrischen Analyse ist in **Abbildung 3** dargestellt. Der Massenverlust durch die Wasserverdunstung kann deutlich vom Massenverlust von PHB unterschieden werden. Beim Vergleich der gewaschenen und ungewaschenen Proben zeigte sich ein Unterschied des PHB-Gehalts (**Abb. 2**). Dieser Unterschied erklärt sich dadurch, dass halophile Zellen beim Waschen mit deionisiertem Wasser aufgrund des fehlenden osmotischen Drucks aufplatzen [7] und ein Teil der Biomasse weggeschwemmt wird. Dadurch ändert sich der Bezugspunkt der Trockenmasse. Ebenfalls hat der zusätzliche Trockensubstanzgehalt des Mediums (11 Prozent) einen Einfluss, wenn ungewaschene Zellen verwendet werden. Folglich wird der PHB-Gehalt für ungewaschene Pro-

Tab. 1: Ausgewählte Methoden zur Quantifizierung von Polyhydroxybutyrat (PHB).

Methodik	TGA (Perkin Elmer TGA 4000 Thermogravimetric Analyzer)	GC-Analyse (GC-FID [HP 5890 Series II] und GC-MS [Shimadzu QP 2020])	HPLC (Shimadzu HPLC)
Geeignete Proben	Nasse und getrocknete Proben	Getrocknete Proben	Getrocknete Proben
Probenvorbereitung	Direkte Messung nach dem Abzentrifugieren	In angesäuertem Methanol (5 % (v/v) H ₂ SO ₄) und Chloroform lösen, Benzoessäure als internen Standard zugabe, erhitzen (100 °C, 4 h), abkühlen auf Raumtemperatur, mit deionisiertem Wasser versetzen, ausschütteln	H ₂ SO ₄ zugeben, erhitzen (90 °C, 30 min), auf Raumtemperatur abkühlen, mit deionisiertem Wasser versetzen, homo- genisieren, abfiltrieren
Auswertung	Stufenhöhe = PHB-Anteil (%)	Messung der Konzentration des resultierenden Methylesters in der organischen Phase	Messung der Konzentration der resultierenden Crotonsäure



◀ **Abb. 3:** TGA-Kurve einer gewaschenen, feuchten Probe. Der PHB-Gehalt kann direkt über die charakteristische Stufe (Zersetzung) ermittelt werden. In Schwarz ist der Massenverlust in Prozent in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Die blaue Kurve beschreibt die differenzierte thermogravimetrische Kurve (DTG; Ableitung des Messsignals $dm(T)/dT$), bei der jede Stufe als Peak erscheint.

mit definierten Salzlösungen durchgeführt werden.

Danksagung

Die Arbeiten wurden im Rahmen eines FEMtech-Projektes für Studentinnen 2017 (FFG-Projekt-

nummer: 862566) durchgeführt. ■

ben unterschätzt und bei gewaschenen Zellen überschätzt (**Abb. 2**).

Schlussfolgerungen

Für die Quantifizierung von PHB in halophilen Zellen zeigten die untersuchten Methoden HPLC, GC-MS und TGA vergleichbare Ergebnisse zu der gut etablierten GC-FID-Methode nach [6]. Hinsichtlich der Gesamtanalysezeit ist die TGA den anderen Methoden überlegen, da es bereits etwa zwei Stunden nach der Probennahme möglich ist, Ergebnisse zu erhalten. Um den Einfluss des Waschens auf die Quantifizierungsergebnisse zu reduzieren, müssen weitere Experimente

Literatur

- [1] Künkel A, Becker J, Börger L et al. (2016) Polymers, Biodegradable. Ullmann's Encyclopedia Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim
- [2] Bioplastics Magazine.com, Bio-on (Bologna, Italy) inaugurates its first plant for the production of special PHA bioplastics, 21.06.2018, www.bioplasticsmagazine.com/en/news/meldungen/20180621_bio-on.php
- [3] Detzel A, Bodrogi F, Kauertz B et al. (2018) Biobasierte Kunststoffe als Verpackung von Lebensmitteln. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, https://www.ifeu.de/wp-content/uploads/Zusammenfassung_Endbericht_bbKV_20180612.pdf
- [4] Sudesh K, Abe H (2010) Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates. ISmithers, Shawbury
- [5] Quillaguamán J, Guzmán H, Van-Thuoc D et al. (2010) Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. Appl Microbiol Biotechnol 85:1687–1696

- [6] Braunegg G, Sonnleitner B, Lafferty RM (1978) A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass. Appl Microbiol Biotechnol 6:29–37
- [7] Vreeland RH (Hrsg) (2012) Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms. Springer, Dordrecht
- [8] Antranikian G (Hrsg) (2006) Angewandte Mikrobiologie. Springer, Berlin



Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Birgit Kamm
Geschäftsbereich Holzchemie und Biotechnologie
Wood K plus Kompetenzzentrum Holz GmbH
Science Park 2
Altenberger Straße 69
A-4040 Linz
Tel.: +43-(0)732-2468-6773
b.kamm@kplus-wood.at
<http://www.kplus-wood.at>