

**Aerobe Deproteinierung von *Crustaceaen*-Abfällen zur
Gewinnung von Chitin mittels proteolytischer
Mikroorganismen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Gabriele Daum

Hamburg 2005

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. B. BISPING
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. F. FORTNAGEL
Tag der Disputation: 01. Juli 2005

Hamburg, den 16. Juni 2005



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1	Chitin	1
1.1.1	Natürliches Vorkommen	1
1.1.2	Struktur	2
1.1.3	Eigenschaften und Anwendungsgebiete von Chitin und seinem Derivat Chitosan	4
1.1.4	Qualität von Chitinprodukten	8
1.2	Shrimpproduktion	10
1.3	Extraktion des Chitins aus Garnelenschalen	12
1.3.1	Aufbau der Garnelenschale	12
1.3.2	Chemische Aufarbeitung	14
1.3.3	Biologische Aufarbeitung	16
1.4	Ziel der Arbeit	20
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	<u>22</u>
2.1	Garnelenschalenabfälle	22
2.2	Mikroorganismen	23
2.3	Kulturbedingungen und Nährmedien	24
2.3.1	Kultivierung der Wildisolate	24
2.3.2	Kultivierung der <i>Bacillus</i> -Stämme	24
2.3.3	Bestimmung der Lebendkeimzahl	25
2.3.4	Anlegen einer Gefrierkultur	25
2.4	Anreicherung und Isolation	26
2.4.1	Anreicherung proteolytischer Bakterien aus Shrimpschalenabfall	26
2.4.2	Selektion proteolytischer Bakterien	26
2.5	Bestimmung von Bakterien	27

2.5.1	Morphologische und biochemische Charakterisierung isolierter Bakterien	27
2.5.2	Makroskopische Aufnahmen	27
2.5.3	Phylogenetische Charakterisierung isolierter Bakterien	28
2.6	Screening proteolytischer Stämme	33
2.6.1	Messen der proteolytischen Aktivität mit Azocoll als Substrat	34
2.6.2	Proteaseaktivität mit Azocasein als Substrat	35
2.6.3	Untersuchung des proteolytischen Überstandes	36
2.6.4	Optimierung des Fermentationsmediums	36
2.7	Biotechnologische Aufarbeitung von Garnelenabfällen	38
2.7.1	Vorbereitung des Garnelenabfalls	38
2.7.2	Vorkultivierung der <i>Bacillus</i> -Stämme	38
2.7.3	Durchführung der fermentativen Deproteinierung in Submers-Kultur	38
2.7.4	Demineralisierung des Calcium-Chitins	40
2.8	Analytik	41
2.8.1	Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl	41
2.8.2	Chitingehalt	43
2.8.3	Ammoniumgehalt	43
2.8.4	Restproteingehalt der Garnelenschalen	44
2.8.5	Aschegehalt	45
2.8.6	Viskosität des Endproduktes	46
3	Ergebnisse	48
3.1	Isolation proteolytischer Stämme aus Pulabfällen der Garnelenproduktion	48
3.1.1	Isolation mesophiler Stämme	49
3.1.2	Erstes Screening isolierter proteolytischer Stämme	50
3.1.3	Zweites Screening isolierter Stämme	52
3.1.4	Isolation aerober Sporenbildner	53
3.1.5	Isolation thermophiler aerober Sporenbildner	55
3.2	Charakterisierung der zur Fermentation ausgewählten Stämme	57
3.2.1	Morphologische und biochemische Einordnung	57
3.2.2	Phylogenetische Einordnung der Isolate	59

3.3	Optimierung der Fermentationsbedingungen	60
3.3.1	Ermittlung der idealen Fermentationstemperatur	60
3.3.2	Optimierung des Fermentationsmediums	63
3.4	Fermentation der Schalenabfälle	70
3.4.1	Vergleich von Schalen nach unterschiedlicher Vorbehandlung	71
3.4.2	Vergleich der Fermentationen in Abhängigkeit vom pH-Wert	73
3.4.3	Vergleich frischer Schalenabfälle unterschiedlicher Chargen	76
3.5	Qualitätskontrolle der Schalen	80
3.5.1	Viskosität	80
4	Diskussion	82
4.1	Auswahl eines geeigneten Stamms und geeigneter Prozessparameter	82
4.1.1	Isolation proteolytischer Organismen	82
4.1.2	Charakterisierung zur Fermentation ausgewählter Organismen	85
4.2	Optimierung des Fermentationsmediums	87
4.3	Optimierung des Fermentationsprozesses	90
4.3.1	Einfluss von Qualität und Behandlung des Garnelenabfalls auf die Deproteinierungsleistung	90
4.3.2	Einfluss einer pH-Kontrolle auf die Deproteinierungsleistung	93
4.4	Qualitätskontrolle der Schalen	97
4.5	Ausblick	101
5	Zusammenfassung	106
6	Literatur	108

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) unter dem Förderkennzeichen 0312614C gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Veröffentlichungen

Teile der Arbeit wurden bereits als Posterbeiträge veröffentlicht:

Daum G; Bisping B (2003) *Aerobere proteolytischer Abbau von Shrimpabfällen zur Chitingewinnung*. Forum Life Science; 21. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen; Book of Abstracts (P14), TU München, Garching.

Daum G; Bisping B (2003). *Aerobe protein hydrolization of crustacean waste for chitin extraction*. 11th European Congress on Biotechnology; Convention Center, Abstracts (S. 135), Basel, Schweiz.

Daum G; Bisping B (2004) *Aerobe protein hydrolization of crustacean waste*. Bioperspectives 2004; 22. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen; Tagungshandbuch (S. 486), Rhein-Main-Hallen, Wiesbaden.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	(engl.: „bovine serum albumin“) Rinderserum-Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaCO ₃	Calciumcarbonat
CDA	Chitindeacetylasen
CF	Chitinfraktion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DD	(engl.: „degree of deacetylation“) Deacetylierungsgrad
DMA	N,N-Dimethylacetamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DM	Demineralisiert
DP	Deproteiniert
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Dinatriumsalz
et al.	(lat.: „et alii“) und andere
FAO	(engl.: „Food and Agriculture Organisation“) Organisation für Landwirtschaft und Ernährung
GlcN	D-Glucosamin
GlcNac	N-Acetylglucosamin
GRAS	(engl.: „generally regarded as safe“)
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
kb	Kilobasenpaare
KBE	Koloniebildende Einheiten
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mPas	milli-Pascalsekunden
mt	metrische Tonne
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammonium

NMP	N-Methyl-2-Pyrrolidon
nt	Nukleotide
N-Quelle	Stickstoffquelle
Pas	Pascalsekunden
PCR	(engl.: „polymerase chain reaction“) Polymerase-Kettenreaktion
PF	Proteinfraktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	(engl.: „sodium-dodecylsulfate“) Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
U	(engl.: „Unit“) Einheit
upm	Umdrehungen pro Minute
VF	Verdünnungsfaktor
vvm	Volumetrische Zuluftrate bezogen auf das Reaktorvolumen
w/v	(engl.: „weight per volume“) Gewichtsprozent

Die allgemein gebräuchlichen Maßeinheiten sowie umgangssprachliche Abkürzungen sind nicht aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Chitin

1.1.1 Natürliches Vorkommen

Nach Cellulose ist Chitin das häufigste auf der Erde vorkommende natürliche Polysaccharid. Im Reich der Arthropoden ist es merkmalsbestimmender Bestandteil des Exoskeletts, einer Cutikula aus Chitin-Protein-Fasern. Vertreter dieses Stammes sind unter anderem die *Antennata*, deren größte Klasse die Insekten bilden und die *Mandibulata* mit der Unterklasse der *Crustacea*. Daneben kann Chitin in geringem Maß in einzelnen Klassen der *Protozoa*, *Cnidaria*, *Molluska*, *Annelida* und *Tentacula* sowie wenigen Vertebraten gebildet werden (Wagner et al., 1993).

Chitin ist Zellwandbaustein niederer und höherer Pilze (*Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota*), wo es mit Proteinen und anderen Polysacchariden, wie Glucan, Mannan und Polygalactosamin assoziiert ist. Ein anderer wichtiger Zellwandbestandteil einiger Pilzarten, beispielsweise aus der Ordnung der *Mucorales*, ist ein Derivat des Chitins, das Chitosan. Dieses Polymer kann direkt aus Pilzmycelien gewonnen werden (Kuhlmann et al., 2000).

Schätzungen zufolge werden jährlich um die 100 Billionen Tonnen Chitin als ständig erneuerbare natürliche Ressource produziert (Knorr, 1984). Für eine verfahrenstechnische Aufarbeitung eignen sich speziell industrielle Abfallprodukte, die in großen Mengen beispielsweise bei der Garnelenzucht anfallen. Pilzmycelien, die bei biotechnologischen Prozessen, wie der Zitronensäureproduktion als Abfall verbleiben, stellen ebenfalls ein geeignetes Ausgangsmaterial dar. Die Extraktion aus diesen Mycelien spielt jedoch im Vergleich zur industriellen Chitingewinnung aus Garnelenschalen eine untergeordnete Rolle (Goycoolea et al., 1994).

In den vergangenen Jahren gewann dieses natürliche Biopolymer an beachtlichem Interesse. Viele Forschungszweige beschäftigten sich mit den Möglichkeiten, die aus der Struktur des Chitins und den zahlreichen daraus resultierenden Anwendungsmöglichkeiten erwachsen.

1.1.2 Struktur

Chitin ist ein aminozuckerhaltiges Polysaccharid mit der allgemeinen Formel $(C_6H_{13}NO_5)_n$, welches aus β -(1-4) verknüpften 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose-Einheiten (N-Acetylglucosamin, GlcNac) besteht (Abb. 1.1).

Erstmals entdeckt wurde es 1811 von dem französischen Naturwissenschaftler Henri Braconnot, der eine alkaliresistente Substanz aus einigen höheren Pilzen isolierte und als „Fungine“ bezeichnete. Unabhängig davon extrahierte Odier zwölf Jahre später (1823) einen unlöslichen Rest aus den Elytren des Maikäfers und prägte erstmals den Namen Chitin (griechisch $\chi\tau\iota\omega\nu$: Tunika oder Abdeckung). Die ersten Ergebnisse zur Klärung der Struktur des Chitin-Moleküls publizierte George Ledderhose im Jahr 1876.

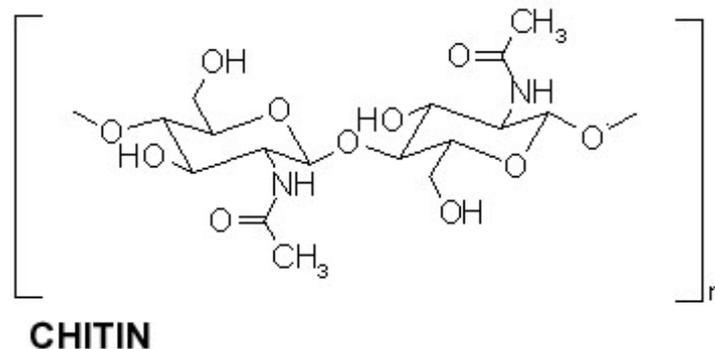


Abbildung 1.1: Strukturformel von Chitin.

In natürlichen Geweben ist Chitin in der Regel mit anderen Stoffen assoziiert, so dass reines Chitin nur durch unterschiedliche Reinigungsschritte erhalten werden kann. Es ist also als ein Abbauprodukt der unterschiedlichen natürlich vorkommenden Komplexe anzusehen (Richards, 1951). Basierend auf dieser Überlegung hat Hackmann 1960 den Begriff des „native chitin“, des natürlichen Chitins, geprägt, um eine Abgrenzung zur isolierten, gereinigten Substanz zu schaffen.

Strukturell können drei polymorphe Formen, das α -, β - und γ -Chitin, unterschieden werden (Hirano et al., 1978). Das α -Chitin ist aus Polymerketten in anti-paralleler Anordnung aufgebaut, wodurch eine kompakte, kristalline und sehr feste Struktur entsteht. Die beiden anderen Formen, das β -Chitin mit einer parallelen Anordnung und das γ -Chitin mit zwei parallelen und einer antiparallelen Kette haben hingegen eine widerstandsfähige und flexible Struktur von polyanionischem Charakter (Abb. 1.2)

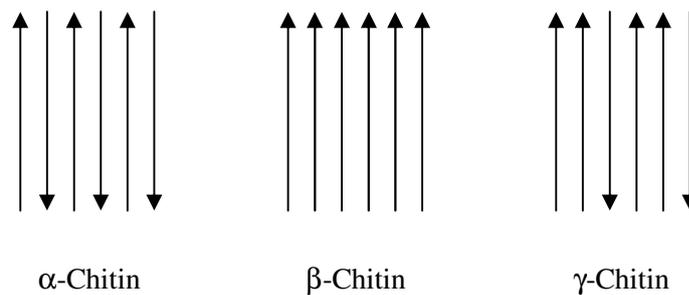


Abbildung 1.2: Aufbau der Polymerketten in den drei Formen des Chitins

Das am weitesten verbreitete α -Chitin ist strukturgebendes Element des Exoskeletts von Arthropoden und wesentlicher Bestandteil der Zellwand vieler Pilzgruppen (*Basidiomycota*, *Ascomycota* und *Zygomycota*). β -Chitin ist ein essentieller Bestandteil des Skeletts von Tintenfischen und wird ansonsten nur in den Tuben seltener Tiefseebewohner gefunden. Das natürliche Vorkommen des dritten Allomorphs, des γ -Chitins, ist nach wie vor umstritten.

Aufgrund seiner kompakten Struktur ist Chitin, ähnlich wie Cellulose, nahezu unlöslich. Es sind nur wenige nicht degradative Lösungsmittelsysteme beschrieben, wobei Amid-LiCl-Systeme, wie N,N-Dimethylacetamid (DMA)-5 % LiCl oder N-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP)-5 % LiCl, die verbreitetsten sind (Rutherford und Austin, 1978). Der genaue Mechanismus dieses Systems ist bis heute nicht verstanden. Studien zeigen jedoch, dass durch Assoziationen zwischen Cl^- Ionen und labilen Protonengruppen der Chitinkette ($-\text{OH}$ und $-\text{NHCOCH}_3$) Wasserstoffbrückenbindungen der kristallinen Struktur des Polymers zerstört werden und dieses so in Lösung gehen kann (Morgenstern und Kammer, 1996).

Ein wichtiger Parameter zur Beschreibung der chemischen Eigenschaften von Chitin ist der Deacetylierungsgrad (DD; „degree of deacetylation“), d. h. das Verhältnis von GlcNac zu D-Glucosamin (GlcN). Ab einem bestimmten DD kann Chitin in wässrigen organischen Säuren, wie Acetat oder Formiat, gelöst werden. Das lösliche Produkt wird in der Literatur in der Regel als Chitosan (α (1 \rightarrow 4) 2-Amino-2-Deoxy- β -D-Glucan) bezeichnet (Abb. 1.3). Da die Deacetylierungsreaktion nie vollständig ausgeführt wird, kann Chitosan allgemein als eine copolymerische Struktur bestehend aus GlcN und GlcNac definiert werden.

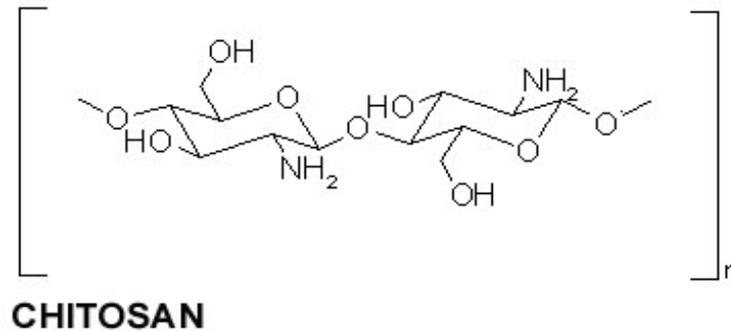


Abbildung 1.3: Strukturformel von Chitosan.

1.1.3 Eigenschaften und Anwendungsgebiete von Chitin und seinem Derivat Chitosan

Chitin und Chitosan besitzen eine Reihe von technisch relevanten Funktionsweisen, die sie für eine Vielzahl von Anwendungsgebieten attraktiv machen (Kumar et al., 2004; Tharanathan und Kittur, 2003; Kumar, 2000). Aufgrund seiner besseren Löslichkeit wird insbesondere Chitosan von unterschiedlichem Deacetylierungsgrad und Molekulargewicht für verschiedene Applikationen eingesetzt.

Chitosan ist haemostatisch, bakterio-statisch, fungistatisch, spermizid, anticancerogen, anticholesteremisch und atoxisch. Weiterhin ist eine hohe biologische Kompatibilität sowohl zu pflanzlichen als auch tierischen Geweben, sowie seine biologische Abbaubarkeit für viele Anwendungen von Vorteil.

Neben diesen biologischen Eigenschaften besitzt Chitosan einige chemische Funktionsweisen, die es zu einem Molekül mit einem weiten Applikationsspektrum machen. Hier ist insbesondere der polykationische Charakter des Polymers mit seiner hohen Ladungsdichte (unterhalb pH 6,5) zu nennen. Aufgrund dessen kann das Molekül an negativ geladene Oberflächen haften und ist in der Lage Gele mit Polyanionen auszubilden (Muzzarelli, 1996). Eine Fülle an Varianten von Mikrokapseln und Gelen als Trägermaterial für verschiedene Moleküle oder zur Immobilisation von Zellen und Enzymen wurden beschrieben (Kas, 1997). Eine weitere interessante Funktion des Chitosans ist seine Fähigkeit Filme mit guten mechanischen Eigenschaften und Permeabilitätsvermögen zu bilden (Chen et al., 1996)

Ferner kann Chitosan Metallionen über einen umfassenden Mechanismus, welcher Chelat-Bildung über Aminosäure-Reste, Ionen-Austausch und Aufnahme beinhaltet, komplexieren (Onsoyen und Skaugrud, 1990).

Eines der ältesten Einsatzgebiete von Chitosan besteht in der Reinigung industrieller Abwässer. So können beispielsweise Aminosäuren (No und Meyers, 1989), Farbstoffe (McKay et al., 1984), Schwermetalle, radioaktive Stoffe (Eiden et al., 1980) und Tannin (Knorr, 1984) aus Abwässern zurückgewonnen werden.

Die hohe Absorptionsfähigkeit des Polymers ist ebenso beim Einsatz zur Klärung und Entsäuerung von Fruchtsäften nützlich (Imeri und Knorr, 1998).

Werden Früchte mit einem Chitosanfilm überzogen, sind diese vor dem durch phenolische Substanzen hervorgerufenen Bräunungsprozess geschützt (Sapers und Douglass, 1987). Ein Vorteil dieser Filme ist die robuste, langlebige, flexible Struktur. Sie zeigen eine moderate Durchlässigkeit für Wasser und sind eine sehr gute Barriere für Sauerstoffpermeation mit einer niedrigen Respirationsrate. Ferner wird durch eine Verminderung der Ethylen- und CO₂-Bildung der Reifungsprozess hinausgezögert. Durch die fungistatische Wirkung wird die Entwicklung von Pilzen inhibiert (Muzzarelli, 1986).

Der beachtlichste Fortschritt in der Applikationsentwicklung von auf Chitosan basierenden Produkten wurde in den letzten Jahren im medizinischen Bereich gemacht.

Insbesondere die Verwendung von Mikrokapseln, Filmen und Hydrogelen auf Basis von Chitosan als Trägermaterialien für die Verabreichung und kontrollierte Abgabe diverser Medikamente ist hier von großem Interesse (Paul und Sharma, 2000). Neben der Möglichkeit an das Trägermaterial gebundene Wirkstoffe durch langsame Diffusion im Körper des Patienten abzugeben, bieten weiterhin die biologische Kompatibilität und Abbaubarkeit des Polymers nützliche Eigenschaften (Uhrich et al., 1999).

Der Einsatz von Chitosan als Wundauflage wird seit vielen Jahren diskutiert. Neben der antibakteriellen Wirkung des Polymers wird die Regeneration des Gewebes gefördert und so eine verbesserte und gleichmäßigere Narbenbildung erzielt. Dieses wird durch eine Anregung der Collagen-Synthese (Kojima et al., 2004) und eine verstärkte Produktion von Makrophagen und Wachstumsfaktoren erreicht (Pierce et al., 1989). Selbst große Wunden, zum Beispiel nach starken Verbrennungen, können mit Chitosanfilmen behandelt werden. Hier sind neben der wundheilenden Wirkung die biologische Kompatibilität sowie die wasserabsorbierenden und sauerstoffdurchlässigen Eigenschaften von Vorteil.

Die Anwendung von Chitosan zur Kultivierung unterschiedlicher Gewebetypen, wie Hepatocyten (Li et al., 2004) oder Knorpelzellen (Xia et al., 2004) hat an Interesse gewonnen. Negativ geladene Zelloberflächen können an den polykationischen Chitosanfilm binden und so eine Matrix ausbilden. Diese kann als künstliche Haut (Kifune, 1992) oder für neue Behandlungsmöglichkeiten der Implantationsmedizin eingesetzt werden (Khor und Lim, 2003). Der kommerziellen Anwendung dieser Produkte stehen nach Meinung von Khor (2002) im Wesentlichen der Mangel an Chitinprodukten von medizinischer Qualität im Weg. Der Zugang zu einem hochreinen Chitosan mit konstanter Zusammensetzung ist jedoch Voraussetzung für eine Weiterentwicklung therapeutischer Anwendungen.

Daneben finden sich in der Lebensmittelindustrie, Biotechnologie, Landwirtschaft, Papier- und Textilindustrie sowie der Kosmetikbranche viele Anwendungsmöglichkeiten für Chitinprodukte. Die Immobilisation von Enzymen oder Zellen birgt sowohl für bio- als auch lebensmitteltechnologische Prozesse viele Möglichkeiten. Beispielsweise kann durch den Einsatz von immobilisiertem Rennin bei der Käseproduktion ein kontinuierlicher Prozessverlauf erreicht werden, was zu einer Ersparnis an eingesetztem Enzym führt (Groboillot et al., 1994).

In Japan, Italien, den USA und Norwegen ist Chitosan als Ballaststoff zur Nahrungsergänzung, insbesondere aufgrund seiner Cholesterin und Triacylglycerin senkenden Wirkung im Körper, sehr beliebt (Hirano, 1989).

Weiterhin werden Projekte verfolgt, die einen Einsatz von Chitosan als Schlichtemittel zur Herstellung von Textilien ermöglichen. Solche Schlichtemittel werden benötigt, um das Garn vor Scheuerbeanspruchung beim Webprozess zu schützen (Stegmeier, 2004).

Bei der Papierherstellung kann Chitosan als Mittel zur Fällung und Flockung von Papierstoffsuspensionen eingesetzt werden. Ferner wäre aufgrund der bakteriostatischen und geruchbindenden Eigenschaften die Entwicklung von Spezialpapieren für Lebensmittelverpackungen oder im Filterbereich denkbar (Borchers, 2004).

Eine Übersicht über die zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten von Chitin und seinen Derivaten ist in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Anwendungsmöglichkeiten von Chitin und Chitosan

Industriezweig	Anwendungsgebiet	Referenz
Landwirtschaft	-Verbesserung des Ernteertrages	(Hadwiger et al., 1984)
Lebensmittelindustrie	-Genießbarer Film bzw. Überzug für Früchte und Gemüse	(Labuza und Breene, 1989)
	-Immobilisation proteolytischer Enzyme (Beispielsweise in der Käseproduktion)	(Groboillot et al., 1994)
	-Konservierungsmittel	(Rhoades und Roller, 2000)
	-Nahrungszusatzstoff, z. B. zur Emulsion von Wasser in Öl-Gemischen	(Rodriguez et al., 2002)
	-Ballaststoff	(Hirano, 1989)
Pharmazeutische Industrie	-Trägermaterial für Medikamente	(Gupta und Kumar, 2000)
	-Zellkulturtechnik	(Risbud et al., 2001)
	-Peridontale Knochen Regeneration	(Ono et al., 2000; Park et al., 2000)
	-Wundauflage	(Scholz, 2004)
	-Künstliche Haut	(Kifune, 1992)
Kosmetikindustrie	-Emulsion	(Kroepke et al., 2003)
Textilindustrie	-Natürliches Schlichtemittel	(Stegmeier, 2004)
Papierindustrie	-Flockungsmittel	(Borchers, 2004)
Biotechnologie	-Immobilisation von Zellen und Enzymen	(Oztop et al., 2002)
	-Chromatographie	(Roberts und Taylor, 1989)
	-Ionentauscher	
Abwasserbehandlung	-Bindung von Proteinen	(No und Meyers, 1989)
	-Bindung von Farbstoffen	(McKay et al., 1984)
	-Bindung von Schwermetallen und radioaktiven Stoffen	(Eiden et al., 1980)

1.1.4 Qualität von Chitinprodukten

Die Qualität eines benötigten Chitinproduktes hängt stark von dem jeweiligen Einsatzgebiet ab. Reicht zur Aufreinigung industrieller Abwässer ein Chitosan von niedriger Qualität aus, sind für medizinische Anwendungen Produkte von hoher Reinheit und definiertem Deacetylierungsgrad und Molekulargewicht notwendig. Diese müssen unter kontrollierten Bedingungen hergestellt und überprüft werden (Khor, 2002). Daraus resultiert eine große Preisspanne, die für die vielfältige Auswahl an Produkten von unterschiedlicher Qualität zwischen 10 \$ und 1000 \$ pro Kilogramm Chitosan liegt (Johnsen et al., 2001).

Wichtige Parameter zur Charakterisierung des Chitosans sind sein Deacetylierungsgrad und Molekulargewicht, sowie der Gehalt an Proteinen, Mineralien und Schwermetallen.

Der DD wird durch das prozentuale Verhältnis der Gesamtheit von GlcNac- zu GlcN-Monomeren definiert. Freie NH_2 -Gruppen bedingen durch ihre Fähigkeit zur Protonenbindung unter anderem die Löslichkeit in wässrigen Medien, die Möglichkeit zur Depolymerisation mit Enzymen und die biologische Aktivität des Chitosans. Beispielsweise verbessert sich mit zunehmenden DD die biologische Kompatibilität einer Chitosanmatrix beim Anbinden von Gewebekulturzellen. Die negativ geladene Oberfläche von Zellen haftet wesentlich besser an eine Matrix mit hohem DD, also mit einer höheren Ladungsdichte (Dhiman et al., 2004; Prasitsilp, 2000). Die üblichen Techniken zur Messung des DD sind, Titration (potentiometrisch, Säure/Base) (Khan et al., 2002), H-NMR (Signini und Campana Filho, 1999), Gaschromatographie (Muzzarelli et al., 1980), IR-Spektroskopie (Baxter et al., 1992) und UV-Spektroskopie (Pedroni et al., 2003).

Untersuchungen zum Einfluss des Molekulargewichts auf die funktionellen Möglichkeiten von Chitin beschränken sich im Wesentlichen auf unterschiedliche Trägermaterialien für Medikamente. Eine Steigerung der Ladungskapazität und eine sukzessive Abgabe einer gebundenen Substanz über einen längeren Zeitraum werden mit Partikeln und Filmen aus einem Chitosan von hohem Molekulargewicht und DD erzielt. Je nach gewünschter Applikation kann so über Variationen des Molekulargewichts und des DD die Ladungsdichte und die Abgabegeschwindigkeit von Medikamenten beeinflusst werden (Alsarra et al., 2002; Puttipipathkhachorn et al., 2001).

Das Molekulargewicht von Polymerlösungen kann über verschiedene Methoden, wie Viskosimetrie, Laserlichtstreuung und chromatographische Methoden ermittelt werden (Terbojevich et al., 1993). Die intrinsische Viskosität einer Polymerlösung steht in direkter Korrelation zum Molekulargewicht, was über die Mark-Houwink-Beziehung ($[\eta] = KM^\alpha$)

ausgedrückt werden kann (Terbojevich und Cosani, 1997). Die empirischen Konstanten K und α gelten für ein spezifisches Polymer-Lösungsmittel-System bei definierter Temperatur. Aufgrund seiner schlechten Löslichkeit haben sich nur wenige Arbeiten mit der Ermittlung des Molekulargewichts von Chitinlösungen beschäftigt, so dass in der Literatur lediglich Konstanten für das System DMA/LiCl zu finden sind (Poirier und Charlet, 2002; Terbojevich und Cosani, 1997). Weitaus mehr Studien haben sich mit der Viskosität von Chitosanlösungen beschäftigt. Diese ist neben dem Molekulargewicht von dem pH-Wert des Lösungsmittels und dem DD abhängig, so dass Konstanten für unterschiedliche Lösungsmittelsysteme und DD gegeben sind (Brugnerotto et al. 2001).

Ein wichtiger Qualitätsfaktor für Chitosanprodukte, die in der Lebensmittelindustrie oder Medizintechnik verwendet werden, ist der Gehalt an anorganischen Bestandteilen, wie Schwermetallen, die schon in geringen Konzentrationen zu einer Reihe von subletalen toxischen Antworten in Organismen führen können (Depledge et al., 1995). Insbesondere in Wildfängen können sich Schwermetalle, die von der Garnele über die Nahrung oder verschmutztes Wasser aufgenommen werden, anreichern. Im Exoskelett bildet das Metall ein Chelat mit dem Chitin des Gewebes aus, so dass bis zu 34 % der aufgenommenen Substanz dort gespeichert werden (Boisson et al., 2003). Bestimmt werden kann der Metallgehalt beispielsweise durch Emissions-Spektroskopie („US Environmental Protection Agency“, 1991).

Die biologische Aktivität von Chitinprodukten stellt ein weiteres Qualitätsmerkmal dar und lässt sich unter anderem nach der Aktivität gegen andere Organismen und der immunogenen Aktivität gegen den eigenen Organismus einteilen. Die antimikrobielle Wirkung ist eingehend untersucht worden, wobei der genaue Wirkmechanismus bis heute nicht aufgedeckt wurde (Rabea et al., 2003). Bestimmt wird in der Regel die minimale Wachstums inhibierende Konzentration einer Chitosanlösung auf Mikroorganismen.

Pyrogentests werden nach dem klassischen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) auf bakterielle Endotoxine durchgeführt (Lam und Khor, 2001).

1.2 Garnelenproduktion

Die zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten von Chitin und Chitosanprodukten, die in den letzten drei Jahrzehnten entwickelt wurden, fordern eine weltweite Steigerung der Produktion von einerseits qualitativ hochwertigen und andererseits kostengünstigen Produkten. Als besonders geeignete Rohstoffquelle gelten Schalentiere, die aufgrund ihrer hohen Beliebtheit in stetig wachsenden Mengen konsumiert werden. Laut Angaben der Organisation für Ernährung und Landwirtschaft (FAO, „Food and Agriculture Organisation“) stieg die weltweite Produktion zwischen den Jahren 1984 und 2002 von 0,8 auf 14,2 Millionen mt an (FISHSTAT (FAO, 2002)) (Abb. 1.4). Insbesondere in Asien und Lateinamerika hat sich Anfang der 90er Jahre die Garnelenzucht in Aquakulturen stark weiterentwickelt. Nahezu der gesamte Weltmarkt wurde in dieser Zeit von diesen beiden Kontinenten versorgt, wobei 80 % der Garnelenproduktion auf den asiatischen Raum fiel. Marktführer sind hier Thailand (23 %), China (21 %) und Indonesien (10 %) (Ling et al., 2001).

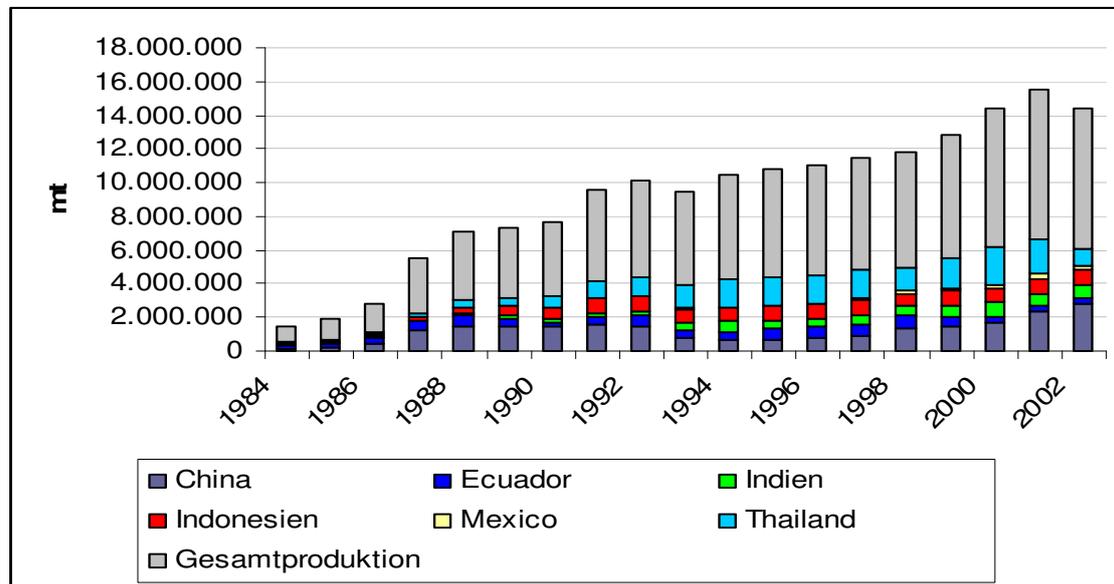


Abbildung 1.4: Entwicklung der weltweiten Produktion an Garnelen in Aquakultur im Vergleich zwischen den Jahren 1984 und 2002 (FISHSTAT (FAO, 2002))

Das schnelle Wachstum asiatischer Garnelenfarmen ist im Wesentlichen auf die passenden Umweltbedingungen, wie Land und Klima, und den technischen Durchbruch in der Garnelenhaltung und Zucht zurückzuführen. Zur Verbreitung der Farmen trugen ein

effektives Management, staatliche Unterstützung des Programms sowie ein intra-regionaler Austausch von Technologie und die Kooperationen in der Finanzierung der Projekte bei. Zu den im asiatischen Raum hauptsächlich kultivierten Arten zählen Organismen aus der Familie *Penaeidae*, wie die Schiffskielgarnele *Penaeus monodon* (Abb. 1.4), die Bananengarnele *Penaeus merguensis*, die Hauptmannsgarnele *Penaeus orientalis* und Vertreter der Gattung *Metapenaeus*. Die verbreitetste Art, *P. monodon*, wird kommerziell in Südostasien und im fernen Osten gezüchtet. Im Jahr 2001 waren nach Angaben der FAO Indien mit 93.830 t und Indonesien mit 31.510 t die Hauptproduzenten dieser Garnelenart.



Abbildung 1.4: Die Schiffskielgarnele (*Penaeus monodon*) (Foto: Dr. J. Lotz)

Da üblicherweise Kopf, Schale und Abdomen, entsprechend 40-45 % des Rohmaterials, vor dem Verkauf von den Tieren entfernt werden fallen große Mengen an Abfall an, die aufgrund unkontrollierter Entsorgung als Gefahrenquelle angesehen werden müssen. Das reiche Nährstoffangebot dieser Reste kann zur Eutrophierung der Küstengewässer führen. Ferner stellen an Land entsorgte Abfälle einen potenziellen Herd für pathogene Keime dar (Islam et al., 2004).

Die erhaltenen Pulabfälle bestehen je nach Spezies und Saison aus 20-40 % Proteinen, 30-60 % Calcium- und Magnesiumsalzen, 20-30 % Chitin und 0-14 % Lipiden (No und Meyers, 1997). Dieses Abfallmaterial besitzt folglich ein großes Potenzial aus dem eine Reihe von wertvollen Produkten, wie Chitin, Protein und Carotinoide gewonnen werden können. Dieses Potenzial wird derzeit nur bedingt genutzt, wobei der Großteil anfallender Abfälle zu Tierfutter weiterverarbeitet oder als Düngemittel in landwirtschaftlichen Betrieben eingesetzt wird. Eine weitaus höhere Wertschöpfung ist hingegen durch den

Verkauf von Chitin und insbesondere seinem Derivat Chitosan zu erreichen, die nach verfahrenstechnischer Aufarbeitung eine wertvolle Ressource für vielseitige Anwendungen darstellen. Eine Etablierung der Chitosanproduktion konnte bisher jedoch nur in Ländern wie Japan, Korea, Indien, Nordamerika und Norwegen realisiert werden.

1.3 Extraktion des Chitins aus Garnelenschalen

1.3.1 Aufbau der Garnelenschale

Feste Gewebe, wie sie in vielen Organismen gefunden werden, besitzen strukturgebende Funktionen, erfassen Gewicht und Balance, dienen der Verteidigung gegen Feinde und als Speicher für Mineralien. Das Außenskelett von *Crustaceaen* ist aus übereinander liegenden Schichten, der Epicuticula, Exocuticula und Endocuticula und einer membranartigen Schicht aufgebaut. Die innen liegende Epicuticula besteht überwiegend aus Proteinen und Lipiden, während die darüber liegenden Schichten, die Exo- und Endocuticula aus einem Netzwerk von Chitin-Protein-Fasern aufgebaut sind, die mit Calciumcarbonat mineralisiert sind (Skinner et al., 1992).

Wie „in situ“ Versuche gezeigt haben, assoziiert Chitin mit freien reaktiven Aminogruppen zu einigen unterschiedlichen Makromolekülen, welche eine Vielzahl von Strukturtypen mit unterschiedlichen physio-chemischen Eigenschaften bilden können (Andrey und Vladimir, 1989). Allgemein kann von vier unterschiedlichen Bindungstypen ausgegangen werden (Abb. 1.6). Zum einen ist die Bildung einer Amidgruppe zwischen einer nicht acetylierten Aminogruppe des Chitins und einer Carboxylgruppe der Proteinkette möglich (Hackman et al., 1960). Weiterhin ist die Bildung einer Schiff'schen Basenstruktur möglich (Hackman et al., 1955). Daneben sind eine N-glykosidische Struktur mit der Amidgruppe von Asparagin und eine O-glykosidische Bindung mit Serin denkbar (Hunt, 1970).

Ein Teil der so genannten Matrix-Proteine wurde in den vergangenen Jahren beschrieben (Andersen, 1991; Kumari und Skinner, 1995; Inoue, 2001). Eine genaue Charakterisierung der Chitin-Protein Interaktion konnte bisher jedoch nicht gegeben werden. Die in den Kutikula-Proteinen einiger Arthropoden konservierte Rebers-Riddiford (RR) Konsensus-Sequenz, wird als verantwortlich für die Chitin-Protein Bindung betrachtet. So postulierten

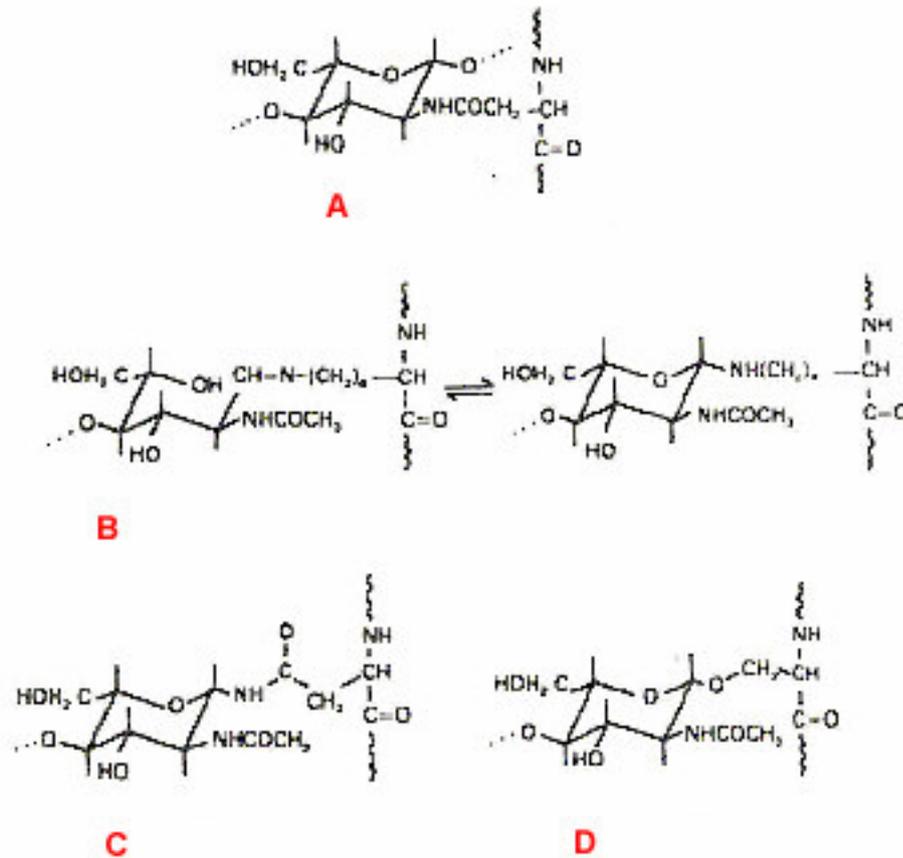


Abbildung 1.6: Denkbare Bindungstypen zwischen Chitin und Protein. **A:** Amidgruppe zwischen einer Aminogruppe des Chitins und einer Carboxylgruppe der Proteinkette. **B:** Schiff'sche Base. **C:** N-glykosidische Bindung mit Asparagin **D:** O-glykosidische Bindung mit Serin (Roberts, 1992)

Iconomidou et al. (1999), dass eine von der RR Konsensus-Region, ausgebildete β -Faltblattstruktur die Formation der helicoidalen Kutikula diktiert.

Neben der strukturgebenden Funktion der organischen Matrices wird weiterhin eine Kontrolle während der Calcifizierung des Exoskeletts diskutiert. Von Inoue et al. (2001, 2004) wurden zwei Proteine des Krebses *Procambarus clarkii*, CAP-1 und CAP-2 beschrieben, die Calcium bindende Eigenschaften aufwiesen.

1.3.2 Chemische Aufarbeitung

Garnelenschalen sind ein komplexes Gebilde aus Chitin, Protein, Mineralstoffen und Lipiden. Zu einer erfolgreichen Aufarbeitung solcher Abfälle sind mehrere Strategien denkbar. Die klassische Methode beinhaltet mehrere chemische Aufreinigungsschritte mit Säuren und Laugen.

Wie Separationsversuche von Hackman und Goldberg (1958) zeigten, können die unterschiedlich an die Schalen gebundenen Proteine durch mehrere chemische Reinigungsschritte voneinander getrennt werden (Tab. 1.2). Zur Auflösung schwacher Bindungen reicht eine Behandlung mit 0,17 M Natriumsulfatlösung (Na_2SO_4) aus. Mit zunehmender Stärke der Bindung steigt die Alkalität der benötigten Lösung an. Eine vollständige Hydrolyse der kovalent gebundenen Matrix-Proteine kann nur durch eine Behandlung mit heißen Laugen erfolgen.

Tabelle 1.2: Chemische Aufreinigungsschritte von *Crustaceae*n Panzern (Hackman und Goldberg, 1958)

Lösliches Protein	Kaltes Wasser (48 h)
Schwache Bindung (Van der Waals Kräfte)	0,17 M Na_2SO_4 (48 h)
Wasserstoffbrückenbindung	Harnstoff (48 h)
Elektrostatische Bindungen	0,1 M NaOH (5 h)
Kovalente Bindungen	1 M NaOH bei 50-60 °C (5 h)

Der klassische chemische Aufarbeitungsprozess geht auf ein Patent von Rigby (1934) zurück und wird seither bis auf wenige Optimierungen verfahrenstechnisch angewandt. Die drei wesentlichen Schritte gliedern sich in Demineralisierung, Deproteinierung und der Dekoloration.

Das Entfernen der Mineralstoffe wird im konventionellen chemischen Prozess mit verdünnter Salzsäure (HCl) bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei Calciumcarbonat (CaCO_3) als Calciumchlorid (CaCl) gelöst wird und gasförmiges Kohlenstoffdioxid (CO_2) gebildet wird. Die starke Säurebehandlung kann jedoch zu Modifikationen, wie Depolymerisation und Deacetylierung des Chitins führen. Percot et al. (2003) zeigten, dass es zu einer deutlichen Verminderung des Molekulargewichts mit zunehmender Demineralisierungszeit kommt. Chitin ist ein Säure sensitives Material, welches über mehrere Reaktionswege, wie hydrolytische Depolymerisation, Deacetylierung und Hitze abgebaut werden kann. Eine Inkubationszeit von 15 min ist jedoch ausreichend, um eine

vollständige Demineralisierung der Schale zu erreichen, wobei der Abbau möglichst gering gehalten wird. Der Deproteinierungsschritt greift das Chitin hingegen weit weniger an. Bis zu Temperaturen von 70 °C konnten keine Verminderung in Molekulargewicht und Deacetylierungsgrad festgestellt werden. Zur Hydrolyse der Proteine werden die Schalen in der Regel mit NaOH Lösungen (1-10 %) bei Temperaturen zwischen 65 und 100 °C behandelt (Abb. 1.7).

Nach der Säure und Lauge Behandlung wird ein pigmentiertes Chitinprodukt erhalten. Um dieses bleichen zu können, werden verschiedene Chemikalien, wie Aceton, Hexan oder Sojaöl eingesetzt.

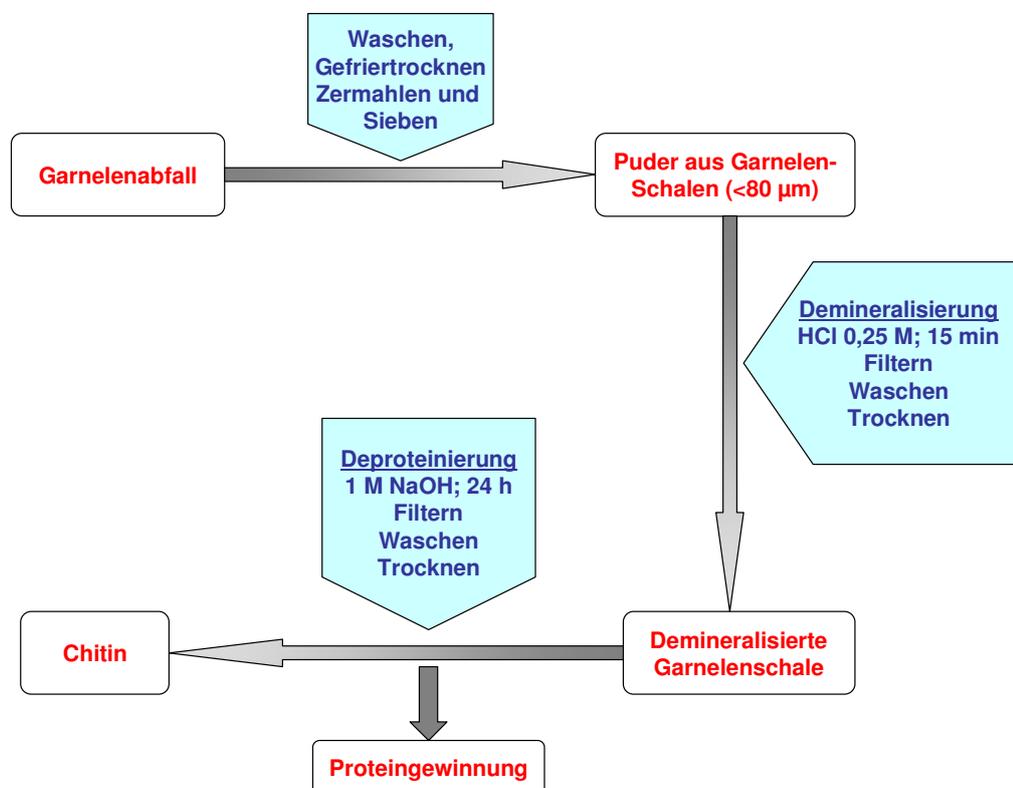


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung eines chemischen Aufarbeitungsprozesses von Garnelenabfällen (Percot et al., 2003)

Zur Deacetylierung des erhaltenen Chitins ist eine Behandlung mit konzentrierten Laugen bei Temperaturen über 100 °C notwendig. Unter diesen Bedingungen werden Acetylgruppen abgespalten und es entsteht je nach gewählten Reaktionsbedingungen ein Produkt mit einem Deacetylierungsgrad bis zu 90 %.

Der Einsatz großer Mengen an Chemikalien ist notwendig, um Chitin aus Schalenabfällen zu isolieren und zu seinem Derivat Chitosan umzusetzen. Schätzungen zur Folge werden

für die Produktion von 1 kg zu 70 % deacetyliertem Chitosans 6,3 kg HCl und 1,8 kg NaOH sowie 0,5 t Prozesswasser und 0,9 t Kühlungswasser benötigt (Kumar, 2000). Sowohl die Mengen als auch die Entsorgungskosten des chemikalienhaltigen Abfallwassers stellen gemeinsam mit den Transportkosten die bedeutendsten Gründe für beträchtliche Preise qualitativ hochwertiger Chitin- und Chitosanprodukte dar (Bustos und Healy, 1994).

Insbesondere die hohen Prozesskosten lassen bisher nur einen Einsatz von Chitin- und Chitosanprodukten in speziellen Anwendungsgebieten zu. Im so genannten „low-value“ Bereich wird hingegen von einem Einsatz bisher abgesehen. Beispielsweise wird auf einen technischen Einsatz von Chitosan in der Papierindustrie als Flockungsmittel verzichtet, da die Preise handelsüblicher Produkte keinen wirtschaftlichen Prozess ermöglichen (Borchers, 2004).

1.3.3 Biologische Aufarbeitung

In den letzten 15 Jahren kamen immer mehr Überlegungen auf, einen alternativen, weniger umweltbelastenden und kostengünstigeren Aufarbeitungsprozess für Chitin im großindustriellen Maßstab zu schaffen. In natürlicher Umgebung wird das Exoskelett von *Crustacean* mittels unterschiedlicher Populationen an Mikroorganismen sequentiell abgebaut. Dabei spielen Demineralisations- und Deproteinierungsschritte analog zum industriellen Prozess eine entscheidende Rolle. Über 90 % des jährlich anfallenden Chitins wird auf diesem Wege innerhalb von 2 Jahren zersetzt (Poulicek und Jeuniaux, 1991).

Basierend auf dieser Überlegung stellten Healy et al. 1994 das Modell für einen kontinuierlichen biotechnologischen Prozess zur Verwertung von Garnelenschalen vor (Abb. 1.8). Bei diesem sollten sowohl Demineralisierung als auch Deproteinierung mit Hilfe von Mikroorganismen vorgenommen werden. Ein Vorteil dieses Prozesses liegt in der Möglichkeit Nebenprodukte wie Calciumlactat, Proteine und Carotinoidproteine sowie GlcNac gewinnen zu können, um diese als Fischfutter oder Substrat für weitere Fermentationen zu verwerten.

Viele Mikroorganismen sind in der Lage Enzyme in ihre Umgebung zu exkretieren. Es werden sowohl Endo- als auch Exopeptidasen der unterschiedlichen Typen (Serinproteasen, Aspartatproteasen, Cysteinproteasen und Metalloproteasen) über die Zellmembranen in das umliegende Milieu abgegeben (Rao et al., 1998). Produziert werden

diese Enzyme vorwiegend während der stationären Wachstumsphase, um bei Nährstofflimitierung die Makromoleküle der Umgebung nutzen zu können (Hagemann et

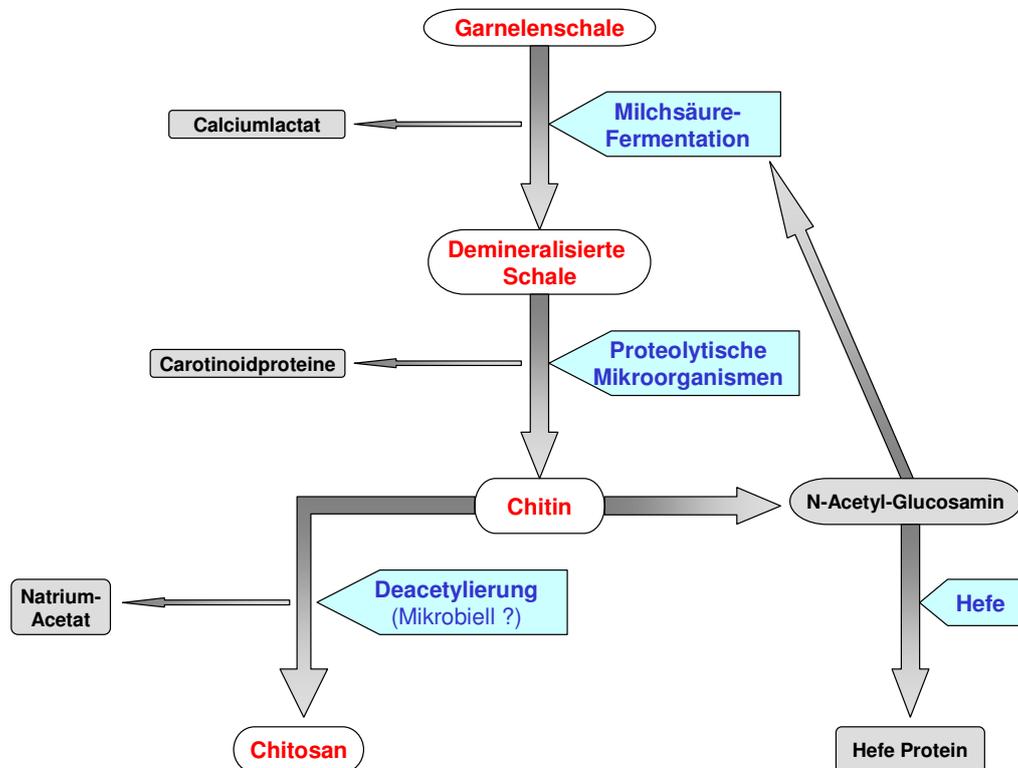


Abbildung 1.8: Biotechnologischer Prozess zur Aufarbeitung von Garnelenschalen (Healy et al., 1994)

al., 1984). Je nach Proteasetyp werden Proteine über unterschiedliche katalytische Mechanismen in für die Zelle verwertbare Moleküle (Peptide und Aminosäuren) hydrolytisch gespalten. Garnelenschalenproteine können in einem biotechnologischen Prozess mittels dieser extrazellulären Proteasen deproteiniert werden.

Ein solcher Fermentationsansatz stellt eine kostengünstigere Alternative zu dem Einsatz aufgereinigter proteolytischer Enzyme dar, die zwar Schalenproteine erfolgreich hydrolysieren, für einen späteren großindustriellen Prozess jedoch einen starken Kostenfaktor darstellen (Cano-Lopez et al., 1987).

Die Demineralisierung der Schalen erfolgt über einen weiteren Fermentationsschritt mit einer Starterkultur aus Lactobacillen. Organismen, die über eine homofermentative Milchsäuregärung verfügen, bilden aus Zuckern wie Glucose oder Lactose reines Lactat. Calcium wird aus der Schale als Calciumlactat ausgefällt und kann so von der Schale abgetrennt werden.

Einen ähnlichen Ansatz stellten Hall und DeSilva bereits 1992 vor. Bei dieser Methode werden Deproteinierung und Demineralisierung in einem Prozessschritt mit Lactobacillen als Starterkultur durchgeführt. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, dass aufgrund des absinkenden pH-Wertes während der Fermentation das Wachstum der natürlichen Verderbsflora und somit von potentiellen pathogenen Mikroorganismen gehemmt wird. Anhaftende Proteine werden hier parallel durch proteolytische Enzyme der zugegebenen Milchsäurebakterien oder Darmbakterien des intestinalen Systems der Garnele hydrolysiert.

Die Silage von Garnelenabfällen wurde seither näher untersucht und Prozessvorschläge, die bis in die Pilotphase gehen, wurden publiziert. Cira et al. stellten 2002 einen Prozess zur Silage von mexikanischen Garnelenabfällen im Säulenreaktor vor. Vorteile dieses Systems sind das Auskommen mit wenig Technologie, sowie der niedrige Energie- und Wasserverbrauch. Probleme zeigen sich hier insbesondere in einer nicht vollständigen Aufarbeitung der Schalen. Sowohl der Gehalt an Mineralstoffen als auch an Proteinen liegt weit über dem des handelsüblichen chemisch hergestellten Chitins, so dass auf den Einsatz von Säuren und Laugen bisher nicht gänzlich verzichtet werden kann (Beaney et al., 2005).

Bessere Erfolge erzielten hier Bautista et al. (2001) über ein kombiniertes Verfahren bestehend aus einem Reinigungsschritt (Flotation/Sedimentation) und einer späteren Silage der chitinhaltigen Phase. Die Reinheit des resultierenden Endproduktes aus einem Aufarbeitungsschritt im Labormaßstab entspricht beinahe dem chemisch hergestellten Chitins. Um ein Produkt von hoher Qualität zu erlangen, kann auch in diesem Verfahren auf den Einsatz von Chemikalien nicht total verzichtet werden. Gegenüber anderen Prozessen ist die eingesetzte Menge jedoch stark reduziert. Außerdem kann aus der im ersten Prozessschritt erhaltenen Proteinfraction (PF1) ein wertvolles Nahrungsmittelsupplement gewonnen werden (Abb. 1.9). Aufgrund des hohen Gehalts an essentiellen Aminosäuren und ω -Fettsäuren sowie des Gehaltes an Carotinoidproteinen erfüllt diese sämtliche von der FAO empfohlenen Bedingungen einer zweckmäßigen Ernährung. Somit gilt sie aufgrund der ernährungsphysiologischen und antioxidativen Eigenschaften als ein hochwertiges Nahrungsergänzungsmittel (Cremades et al., 2001).

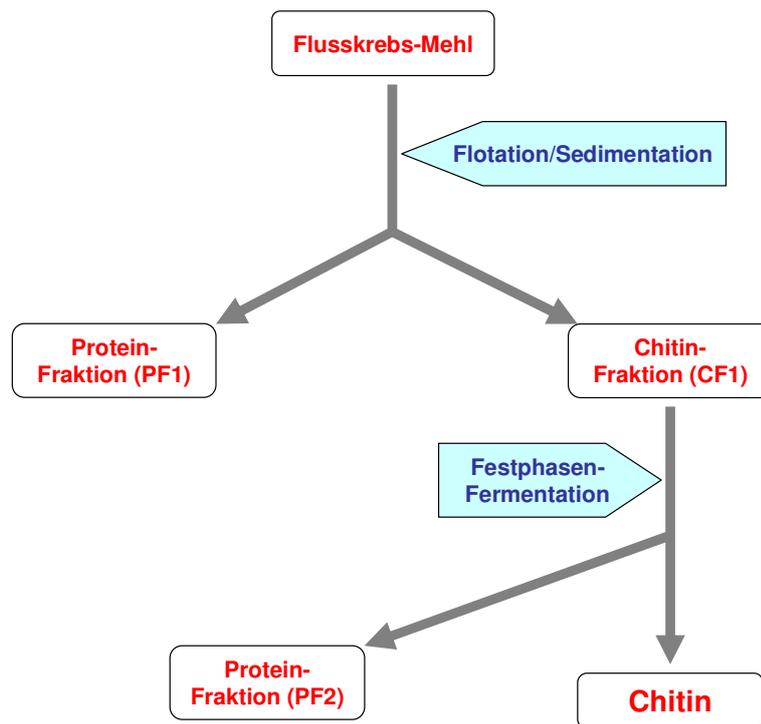


Abbildung 1.9: Schematisches Verlaufsschema der Produktion von Carotinoidproteinen und Chitin aus Schalenabfällen des Flusskrebses (*Procambarus clarkii*) (Cremades et al., 2001).

Eine biotechnologische Umsetzung des Deacetylierungsschrittes, mit der das energieaufwendige thermochemische Verfahren ersetzt werden soll, wurde in den vergangenen Jahren ebenfalls diskutiert.

In der Natur besitzen einige Organismen, wie Pilze oder einige marine Mikroorganismen, Chitindeacetylasen (CDA). Diese Enzyme katalysieren die Abspaltung der Acetylgruppe vom Chitin zum Chitosan.

Eine Reihe von CDAs wurden aus Pilzmycelien und marinen Mikroorganismen isoliert und auf ihre enzymatische Leistung hin untersucht (Zakaria H, 2004; Win und Stevens, 2001; Tsigos et al., 1995; Kafetzopoulos et al., 1993). Bisher konnten jedoch keine nennenswerten Erfolge erzielt werden, da isolierte CDAs das unlösliche Chitin nur zu einem geringen Prozentsatz deacetylieren. Lediglich lösliche Chito-Oligosaccharide und bereits zu 40 % deacetyliertes lösliches Chitin werden von den Enzymen in einem zufrieden stellenden Maßstab (bis zu 90 % DD) abgebaut (Win und Stevens, 2001; Tsigos et al., 1996).

1.4 Ziel der Arbeit

Chitin und sein Derivat Chitosan sind industriell relevante Wertstoffe, die als Naturstoffe aus Organismen gewonnen werden können und nicht chemisch synthetisiert werden können. Ferner kommt es durch die größer werdende Nachfrage an Krustentieren zu einem nicht zu missachtenden Abfallproblem in Garnelen produzierenden Ländern. Die biotechnologische Aufarbeitung von Pulabfällen aus der Garnelenproduktion trägt zum einen zur Lösung dieses Abfallproblems bei und zum anderen wird Chitin als Wertstoff gewonnen.

Es gibt mehrere Ansätze zur biotechnologischen Aufarbeitung dieser Schalenabfälle. In dieser Arbeit sollen Untersuchungen zu einem Teil eines zweistufigen Fermentationsprozesses durchgeführt werden und ein Verfahren zur Deproteinierung von Garnelenschalenabfällen entwickelt werden. Dazu werden zum einen Mikroorganismen benötigt, die proteolytische Enzyme in ihre Umgebung exkretieren, die zu einem möglichst vollständigen Abbau der Proteine führen. Diese werden aus verschiedenen Schalenabfällen angereichert, isoliert und auf ihre Abbauleistung hin untersucht. Besonders gut geeignete Isolate werden dann mittels biochemischer und phylogenetischer Methoden charakterisiert. Ferner sollen optimale Fermentationsbedingungen für diese Isolate ermittelt werden.

Der Demineralisierungsschritt wird zunächst unter definierten chemischen Bedingungen mit 0,9 %igem Lactat durchgeführt, um bei einer weiteren Prozessentwicklung durch eine „in situ“ Fermentation des Lactats mit Lactobacillen ersetzt zu werden.

Das erhaltene Endprodukt, Chitin, wird dann auf seinen Proteingehalt, Asche- und Chitingehalt sowie seine Viskosität unter definierten Bedingungen untersucht, um Anhaltspunkte über die Qualität des biotechnologisch prozessierten Produktes zu gewinnen.

In Abbildung 1.10 ist ein schematischer Verlauf des geplanten biotechnologischen Prozesses zur Chitingewinnung dargestellt.

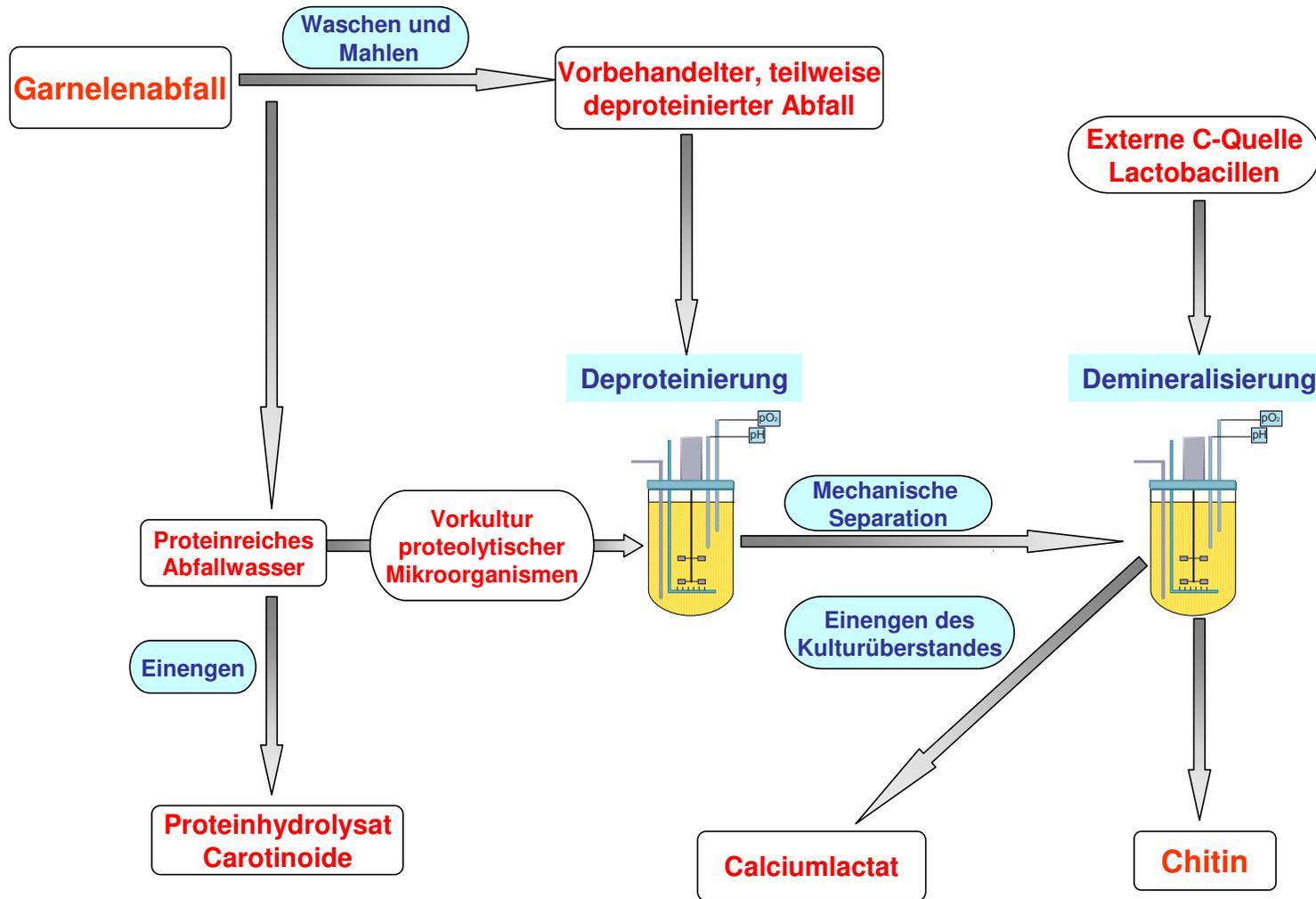


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des geplanten biotechnologischen Prozesses zur Aufarbeitung von Garnelenschalenabfällen zur Chitingewinnung

2 Material und Methoden

2.1 Garnelenschalenabfälle

Zum Erstellen dieser Arbeit wurden Pulabfälle unterschiedlicher Herkunft und unterschiedlicher Qualität verwendet. Zum einen wurden Pulabfälle der Nordseegarnele (*Crangon crangon*) aus verarbeitenden Betrieben in Büsum (BRD) zur Verfügung gestellt. Diese Schalen wurden entweder unbehandelt und bei -20 °C gelagert oder wurden zuvor in der Gesellschaft für Sicherheitstechnik und Recyclingverfahren mbH (GSRmbH Büsum) aufgearbeitet. Zur Aufarbeitung wurde lose anhaftende Proteine über eine Bandpresse abgepresst, die Schalen zermahlen, gewaschen und nach dem Trocknen bei -20 °C gelagert.

Aus der indonesischen Garnelenverarbeitung wurden Schalenabfälle der Riesengarnele (*Penaeus monodon*) genutzt. Es wurde ein aus gemahlene Garnelenschalen produziertes Shrimpmehl, welches ursprünglich für den Verkauf als Tierfutter produziert wurde, von einem indonesischen Hersteller geliefert und bei Raumtemperatur gelagert. Weiterhin wurden zwei Chargen frischer Pulabfälle von Prof. Bisping aus indonesischen Betrieben gekühlt nach Hamburg transportiert und dort weiterverarbeitet (Tab. 2.1).

Tabelle 2.1: Verwendete Garnelenschalenabfälle

Schalenabfall	Aufarbeitung	Herkunft	Signatur
<i>C. crangon</i>	frisch	Büsum	BF
<i>C. crangon</i>	Aufgearbeitet und getrocknet	GSRmbH Büsum	BT
Shrimpmehl	Zermahlen und getrocknet	Bandar Lampung; Indonesien	ISM
<i>P. monodon</i>	frisch	Palembang; Indonesien	IF1
<i>P. monodon</i>	frisch	Palembang; Indonesien	IF2

2.2 Mikroorganismen

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Stämme isoliert, die aus Garnelenabfällen unterschiedlicher Herkunft stammen. Bei den Proben handelte es sich zum einen um Abfälle aus Nordsee-Garnelen (*C. crangon*), die von der GSRmbH Büsum zur Verfügung gestellt wurden. Zum anderen wurden Stämme aus steril entnommenen Proben indonesischer Garnelenabfälle isoliert. Die zur Fermentation verwendeten Stämme wurden identifiziert und charakterisiert (Tab. 2.2). Weiterhin wurden Mikroorganismen der Stammsammlung der Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie der Universität Hamburg und der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie der Universität Münster verwendet (Tab. 2.3).

Tabelle 2.2: Aus Garnelenabfällen isolierte und charakterisierte Mikroorganismen

Stamm	Herkunft
<i>B. sp F5</i>	Garnelenabfall (Palembang, Indonesien)
<i>B. sp F11</i>	Garnelenabfall (Palembang, Indonesien)

Tabelle 2.3: Mikroorganismen der Stammsammlung

Stamm	Herkunft	Nummer
<i>Bacillus megaterium</i>	Stammsammlung Gram-positiv	7
<i>Bacillus megaterium</i> DSM319	Stammsammlung Gram-positiv	8
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Stammsammlung Gram-positiv	9
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Stammsammlung Gram-positiv	10
<i>Bacillus licheniformis</i>	Stammsammlung Gram-positiv	11
<i>Bacillus cereus</i>	Stammsammlung Münster	228
<i>Bacillus subtilis</i>	Stammsammlung Münster	230
<i>Bacillus subtilis</i>	Stammsammlung Münster	231
<i>Bacillus megaterium</i>	Stammsammlung Münster	232
<i>Bacillus</i> „GA04.11.98“	Stammsammlung Münster	234
<i>Bacillus</i> „Johannes“	Stammsammlung Münster	235
<i>Bacillus alvei</i>	Stammsammlung Münster	239
<i>Bacillus</i> „Astrid“	Stammsammlung Münster	242

2.3 Kulturbedingungen und Nährmedien

Zur Herstellung der Festmedien wurde 1,8 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt. Sämtliche Medien wurden im Autoklaven 5075 ELV (Systec, Wettenberg) für 20 min bei 121 °C sterilisiert.

Die Nährmedien und Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt, BRD) bezogen.

2.3.1 Kultivierung der Wildisolate

Wildisolate wurden entsprechend ihrer Isolationstemperatur bei 30, 37 oder 55 °C auf Standard-I-Agar kultiviert. Flüssigkulturen wurden im Schüttelwasserbad Gryotory G76 (New Brunswick Scientific, Edison, USA) oder im Luftschüttler RC-TK (Infors GmbH, Bottmingen, Schweiz) bei 180-200 upm inkubiert.

2.3.2 Kultivierung der *Bacillus*-Stämme

Stämme der Gattung *Bacillus* wurden auf LB-Medium angezogen und je nach Stamm bei 30 oder 55 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden im Schüttelwasserbad bei 180-200 upm inkubiert. Zur Vorbereitung der Fermentation wurden die Stämme auf Shrimp-Protein-Medium überführt.

LB-Medium (Luria-Bertani)

Pepton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Natriumchlorid	0,5 % (w/v)
pH	7,3

Shrimp-Protein-Medium

Hefeextrakt	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
NaCl	5 g
Mg ₂ SO ₄ * 7 H ₂ O	1 g
Shrimp-Protein-Wasser	ad 1000 ml
pH	7,0

2.3.3 Bestimmung der Lebendkeimzahl

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde eine Verdünnungsreihe einer Bakterienkultur in 0,85 %iger Kochsalzlösung hergestellt. 100 µl geeigneter Verdünnungsstufen wurden auf Standard-I-Agar (Wildisolate) oder auf LB-Agar (*Bacillaceae*) ausplattiert und über Nacht bei entsprechender Temperatur kultiviert. Zur Ermittlung der Lebendkeimzahl wurden die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) pro Platte ausgezählt, wobei nur Platten mit einer Anzahl von 30-300 KBE zur Auswertung berücksichtigt wurden, um ein statistisch relevantes Ergebnis zu erhalten.

2.3.4 Anlegen einer Gefrierkultur

Eine Einzelkolonie wurde über Nacht in Flüssigmedium angezogen; 700 µl dieser Kultur wurde im Kryoröhrchen mit 300 µl Glycerin gründlich vermischt und bei -85 °C gelagert. Vor Gebrauch wurden die Kulturen bei 30 °C im Thermoschüttler aufgetaut.

2.4 Anreicherung und Isolation

2.4.1 Anreicherung proteolytischer Bakterien aus Shrimpschalenabfall

Garnelenabfälle wurden in einen sterilen 300 ml Weithals-Kolben gegeben. Die Schalen wurden mit einer sterilen Salzlösung überschichtet und der Kolben mit einem Stopfen verschlossen. Die Ansätze wurden bei 30, 37 und 55 °C inkubiert. Zur Anreicherung von *Bacillus*-Stämmen wurden die Ansätze vor Inkubation für 15 min bei 85 °C pasteurisiert. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurde jeweils 1 ml der Anreicherung bis zu einer Stufe von 10^{-5} in steriler Kochsalzlösung verdünnt. Die einzelnen Verdünnungen wurden auf Shrimp-Protein-Agar (siehe 2.3.2.) ausplattiert und bei 30, 37 bzw. 55 °C bebrütet.

Salzlösung

KH ₂ PO ₄	0,5 % (w/v)
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

2.4.2 Selektion proteolytischer Bakterien

Stämme, die ein zufrieden stellendes Wachstum auf Shrimp-Protein-Agar zeigten, wurden auf Calcium-Caseinat-Agar (nach Frazier und Rupp) überimpft und bei 30, 37 bzw. 55 °C inkubiert. Wurden proteolytische Enzyme von den Bakterien in das Medium exkretiert, bildete sich ein Klärungshof rund um den Impfstrich. Stämme mit einem deutlichen Klärungshof wurden auf Standard-I-Agar überführt und anschließend über mehrere Passagen für weitere Untersuchungen reinkultiviert.

2.5 Bestimmung von Bakterien

2.5.1 Morphologische und biochemische Charakterisierung isolierter Bakterien

Die Bakterienstämme wurden durch gängige Labormethoden in Reinkultur gehalten. Die morphologische Charakterisierung bezog sich auf das makroskopische Erscheinungsbild der Kolonie (Form, Farbe, Beschaffenheit) und das mikroskopische Bild im Nativpräparat (Größe, Gestalt, Zellverband, Beweglichkeit, Sporenbildung).

Das Gram-Verhalten wurde nach Näveke und Tepper (1979) bestimmt. Als Referenzstämme dienten *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*.

Die Oxidaseaktivität wurde mittels Bactident[®] Oxidase-Teststreifen (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Der Katalasenachweis wurde durch Auftropfen einer 3 %igen H₂O₂-Lösung auf eine frisch gewachsene Kolonie durchgeführt.

Die biochemische Einordnung erfolgte mit Hilfe des Api 50 CHB-Tests der Firma Bio-Merieux (Montalieu, Frankreich) zur Identifizierung von aeroben Sporenbildnern. Die Auswertung erfolgte mittels der Software APILAB PLUS 3.3.3 (Bio-Merieux, Montalieu, Frankreich).

2.5.2 Makroskopische Aufnahmen

Um das makroskopische Bild von Kolonien und Schalenmaterial festzuhalten wurden fotografische Aufnahmen am Photomakroskop M400 (Wild, Heerbrugg, Schweiz) gemacht.

2.5.3 Phylogenetische Charakterisierung isolierter Bakterien

Bei diesem Verfahren wird ein Ausschnitt des 16S-rRNA-Gens der zu charakterisierenden Organismen aus chromosomaler DNA amplifiziert, wobei komplementäre Oligonukleotide zu konservierten Bereichen des Gens als Primer eingesetzt werden. Die erhaltenen PCR-Produkte werden sequenziert und die Ergebnisse zur Rekonstruktion phylogenetischer Stammbäume verwendet. Vorteile der 16S rRNA als phylogenetischer Marker liegen in der ubiquitären Verbreitung des Moleküls. Weiterhin enthält die 16S rRNA Spezies-spezifisch hochkonservierte wie auch variable Bereiche, die eine eindeutige Identifizierung einzelner Spezies bzw. 16S-rRNA-Typen (Philotypen) erlauben.

2.5.3.1 Gesamt-DNA-Isolation

Zur Isolation chromosomaler DNA aus *Bacillus* Stämmen wurde eine Übernachtskultur in 10 ml LB-Medium im Schüttelwasserbad angezogen (180 upm; 55 °C). 3 ml der Kultur wurden in einer Biofuge pico (Heareus, Osterode) geerntet (2 min; 13000 upm) und das Pellet in 500 µl TEN-Puffer gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen in 200 µl SET-Puffer resuspendiert. Die Protoplastierung erfolgte nach Zugabe von 50 µl Lysozym-Lösung und Inkubation für 1-2 h im Thermoschüttler bei 37 °C und 300 upm. Die Protoplastierung wurde mikroskopisch überprüft. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 50 µl SDS-Lösung. Nach Zugabe von 50 µl wurde der Ansatz für 2 h bei 37 °C und 300 upm inkubiert.

Um den Ansatz von weiteren Verunreinigungen zu befreien, folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Den Ansätzen wurde ein Volumen Roti[®]-Phenol (Roth, Karlsruhe, BRD) zugegeben, gut durchmischt und zentrifugiert (13000 upm, 5 min, RT). Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und die Extraktion solange wiederholt bis sich kein weißlicher Niederschlag mehr in der Interphase bildete. Zur Entfernung der Protein-Phenolreste wurde die Probe anschließend mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, durchmischt und zentrifugiert (s.o.). Zur Aufkonzentrierung der Nukleinsäuren und zum Entfernen von Salzen wurde die Probe alkoholisch präzipitiert. Zu dem Ansatz wurden 1,5 Vol. Isopropanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat gegeben. Nach Zentrifugation (13000 upm, 15 min, RT) wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13000 upm, 10 min, RT). Nach Trocknung wurde das Pellet in einem angemessenen Volumen Aqua dest. aufgenommen.

Verwendete Lösungen

TEN-Puffer

Tris/HCl	40 mM
EDTA	1 mM
NaCl	15 mM

SET-Puffer

Saccharose	20 %
EDTA	50 mM
Tris/HCl	50 mM
pH	7,5

Lysozym

1 mg/ml in Aqua dest. (bei 4°C aufbewahren)

Proteinase-K-Lösung

20 mg/ml in SET-Puffer (bei 4° C aufbewahren)

<u>SDS</u>	10 %
<u>Na-Acetat</u>	3 M
<u>Chloroform/Isoamylalkohol</u>	24:1

2.5.3.2 Amplifikation der 16S rDNA

Die spezifische Amplifizierung des 16S rRNA Gens erfolgte mittels „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) unter Verwendung der in Tab. 2.4 aufgeführten Primer. Bei den Primern 16S-357f und 16S-1492r handelt es sich um für Prokaryoten universelle Primer, die sich von der 16S-rRNA-Sequenz von *Escherichia coli* ableiten. Der Primer 16S-BAC126f wurde unter zu Hilfenahme des Programms PRIMROSE (Ashelford, 2002) speziell für Stämme der Gattung *Bacillus* erstellt. Als Matrizen-DNA wurden 100 ng chromosomaler DNA der zu untersuchenden Bakterienstämme eingesetzt, als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit Aqua dest. anstatt der Matrizen-DNA mit geführt.

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide für PCR-Reaktionen. Die aufgeführten Primer wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim, BRD) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5`-3`)	Länge [bp]	Zielsequenz
16S-27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	Nt. 27-47 des 16S-rDNA-Gens in <i>E. coli</i>
16S-BAC126f	CCTGTAAGACTGGGATAACTCC	22	Nt. 126-147 des 16S-rDNA-Gens in <i>Bacillus</i> -Stämmen
16S-357f	TACGGGAGGCAGCAGTAG	18	Nt. 357-374 des 16S-rDNA-Gens in <i>E. coli</i>
16S-1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	22	Nt. 1492-1471 des 16S-rDNA-Gens in <i>E. coli</i>

Die Reaktion wurde nach dem 4 minütigen Denaturierungsschritt bei 95 °C durch Zugabe der *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* gestartet („hot start“). Die Amplifikation erfolgte nach dem in Tab. 2.5 zusammengefassten Programmparametern im PCR-Gerät (Mastercycler Personal, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg). Puffer, dNTPs und Polymerase wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

Reaktionsansatz

Polymerase-Puffer (10x)	5 µl
dNTPs (2nM)	5 µl
<i>forward</i> Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl
<i>reverse</i> Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl
Matrizen-DNA	0,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
Aqua dest.	ad 50 µl

Tab. 2.5: Programmparameter zur DNA-Amplifikation

1. Denaturierung	4 min	95 °C
2. Denaturierung	1 min	94 °C
3. Hybridisierung	1 min	59 °C
4. DNA-Synthese	1,5 min	72° C
Die Schritte 2-4 wurden 30 mal wiederholt		

2.5.3.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Diese Standardmethode dient zur Trennung und Identifizierung von DNA- und RNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. Agarose ist ein Algenpolysaccharid, welches aufgrund seiner dreidimensionalen, vernetzten Struktur als Molekularsieb wirkt. In einem elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Fragmente zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Poren- und Molekülgröße abhängt. Innerhalb eines bestimmten Bereichs ist die Wanderungstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentgröße.

Durchführung

Die Agarose (Biozym Diagnostik, Oldendorf) wurde durch aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst und in spezielle Gelträger gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Gelelektrophorese in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen) durchgeführt, wobei das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet wurde. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Gelladepuffer (Fermentas, St.Leon-Rot) versetzt und in die Geltaschen einpipettiert. Als Größenmarker wurde eine 1kb DNA-Leiter (New England Biolabs GmbH, Schwalbach) verwendet. Eine Spannung von 80 Volt wurde für 1 h bei einer Feldstärke zwischen 0,5 und 5 V/cm angelegt.

Um die aufgetrennten DNA-Fragmente im Gel sichtbar zu machen, wurde dieses mit Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml in 1x TAE) angefärbt und unter UV-Licht (302 nm) dokumentiert.

Verwendete Lösungen

50x TAE-Puffer

Tris/HCl	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	100 mM
pH	8,0

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml in Aqua dest., Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C
Arbeitskonzentration: 2 µg/ml

2.5.3.4 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Eine Möglichkeit PCR-Proben von Salzen, Primern und Nukleotiden zu befreien ist die Elution des Amplifikats nach Auftrennung im Agarosegel.

Die Isolation der 16S-rDNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren und die DNA in 50 µl Aqua dest. aufgenommen.

2.5.3.5 Sequenzierung von DNA

Aufgereinigte PCR-Fragmente wurden zur Sequenzierung an die Firma GATC Biotech (Konstanz) gegeben. Diese wurden dort mit entsprechenden Primern auf einem ABI-Sequenzierer analysiert.

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels der vom „Ribosomal Database Project“ RDP-II (Cole et al., 2003) online zur Verfügung gestellten Software. Ein Vergleich homologer Sequenzabschnitte wurden mit dem „Sequence aligner“ ausgeführt. Die Rekonstruktion phylogenetischer Bäume wurde mittels des „Phylip Interface“ durchgeführt. Zur Ermittlung einer Distanzmatrix wurde die Methode der „Maximum Likelihood“ benutzt und phylogenetischen Distanzwerte (Jukes und Cantor, 1969) wurden mit der entsprechenden Programmkomponente erstellt. Phylogenetische Bäume wurden nach dem Prinzip des „Neighbour-Joining“ (Saitou und Nai, 1987), welches Teil des Programms PHYLIP 3c (Felsenstein, 1991) ist, erstellt.

2.6 Screening proteolytischer Stämme

Um Mikroorganismen zu selektieren, die eine optimale proteolytische Abbauleistung der Schalenabfälle zeigen, wurden isolierte Stämme auf Shrimp-Protein-Agar angezogen. Eine Vorkultur wurde in 10 ml Shrimp-Protein-Medium im Schüttelwasserbad (180 upm) über Nacht bei 37 °C für mesophile und 55 °C für thermophile Stämme inkubiert.

Für das erste Screening wurden 50 ml Hauptkultur 10 %ig angeimpft und inkubiert (37 °C; 180 upm). Nach 72 h wurde 1 ml Kulturüberstand entnommen und auf seine proteolytische Aktivität hin untersucht (siehe 2.6.1).

Im 2. Screening wurden 100 ml Hauptkultur 10 %ig angeimpft und für 10 Tage bei 37 bzw. 55 °C inkubiert (180 upm). Nach 5 und 10 Tagen wurde 1 ml des Kulturüberstands entnommen und die proteolytische Aktivität bestimmt (siehe 2.6.1). Nach 10 Tagen wurden weiterhin die Schalenabfälle gewaschen, bei 65 °C getrocknet und anschließend der Gesamtstickstoffgehalt bestimmt (siehe 2.8.1). Als Schalensubstrat wurden zermahlene Pulabfälle aus Büsum und Shrimpmehl aus Indonesien eingesetzt.

Hauptkulturmedium

Garnelenabfall	10% (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,5 % (w/v)
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

2.6.1 Messen der proteolytischen Aktivität mit Azocoll als Substrat

Bei Azocoll handelt es sich um ein unlösliches Protein-Farbstoff Konjugat, welches von einer Reihe Proteasen hydrolysiert werden kann. Durch proteolytische Aktivität wird lösliches, farbiges Peptid erhalten. Die Menge an gelöstem Peptid bei definierter Inkubationszeit ist proportional zur Enzymkonzentration (Chavira et al., 1984).

Durchführung

Azocoll (Sigma, Taufkirchen) wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in Azocoll-Puffer suspendiert und unter Rühren für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Zur Messung wurden 900 µl des Kulturüberstands mit 500 µl Azocoll suspension versetzt und für 30 min bei 37 °C im Thermomixer (350 upm) inkubiert. Als Leerwert wurde ein Ansatz mit 900 µl unbeimpften Mediums angesetzt und auf gleiche Weise behandelt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (7 min; 15000 upm) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Absorption bei 520 nm wurde gemessen. Eine Proteaseunit (U) wird definiert als die Veränderung der Absorption A_{520} von 0,5 unter den beschriebenen Versuchsbedingungen.

Verwendete Lösungen

Azocoll-Puffer

Tris/HCl	0,05 M
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	1,0 mM

Azocoll-Stammlösung

5mg Azocoll pro ml Azocoll-Puffer

2.6.2 Proteaseaktivität mit Azocasein als Substrat

Azocasein oder Sulfanilamid-Azocasein, bestehend aus einem an Casein gebundenen Azo-Farbstoff, stellt ein allgemein übliches Proteasesubstrat dar. Durch enzymatische Hydrolyse des Proteins werden säurelösliche, farblich markierte, Polypeptide frei. Unhydrolysiertes Azocasein kann durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) abgetrennt werden. Die Extinktion kann in 0,1 M Natronlauge bei 440 nm gemessen werden und der Proteaseumsatz quantifiziert werden.

Durchführung

Zunächst wurden 0,5 ml einer Kultur mit proteolytisch aktiven Mikroorganismen entnommen und abzentrifugiert (13000 upm, 1 min). In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 225 µl Reaktionspuffer und 25 µl Kulturüberstand vermischt. Dazu wurden 150 µl einer 1,5 %igen Azocaseinlösung (Azocasein (Sigma, Taufkirchen) in Aqua dest.) gegeben und für 10 min bei 55 °C inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µl einer 6 %igen TCA-Lösung. Der Reaktionsansatz wurde zentrifugiert (13000 upm, 10 min) und 750 µl des Überstandes wurden mit 250 µl 0,5 M NaOH versetzt. Anschließend wurde die Extinktion bei 440 nm im Photometer vermessen.

Ein Proteaseunit (U) wird definiert als der Umsatz von 1 µMol Azocasein pro Minute und wird folgendermaßen berechnet:

$$P(U / ml) = \frac{\left(\left(\frac{A_{440} - LW}{\epsilon \cdot d} \right) \cdot \left(\frac{V_E}{V_P} \right) \cdot 1000 \cdot VF \right)}{Z}$$

LW = Probenleerwert

ϵ = Extinktionskoeffizient Azocasein (38 l/Mol * cm⁻¹)

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

V_E = Gesamtvolumen (1 ml)

V_P = Reaktionsvolumen (0,4 ml)

VF = Verdünnungsfaktor (40)

Z = Inkubationszeit (10 min)

Verwendete Lösungen

Reaktionspuffer

Tris/HCl	0,1 M
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	5 mM
pH	8.0

2.6.3 Untersuchung des proteolytischen Überstandes

Um Temperatur- und pH-Optimum sowie den Einfluss von divalenten Kationen auf die proteolytische Aktivität zu ermitteln wurde der Mikroorganismus in 100 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht inkubiert (55 °C; 180 upm). Die proteolytische Aktivität des Kulturüberstandes mit Azocasein als Substrat (2.6.2) wurde unter unterschiedlichen Bedingungen gemessen.

Temperaturoptimum

Es wurde wie in 2.6.2 verfahren mit folgenden Variationen der Inkubationstemperatur: es wurden jeweils drei Ansätze mit Inkubationstemperaturen bei 20, 30, 40, 50, 55, 60, 70 und 80 °C gemessen.

pH-Optimum

Es wurde wie in 2.6.2 verfahren mit folgenden Variationen des pH-Wertes: der pH-Wert des Reaktionspuffers wurde auf pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 und 9,0 eingestellt und jeweils in Dreifachbestimmung gemessen

Divalente Kationen

Es wurde wie in 2.6.2 verfahren mit folgenden Änderungen: dem Reaktionspuffer (ohne CaCl₂) wurden die Salze CaCl₂, MgSO₄, MnSO₄ und ZnSO₄ in den Konzentrationen 100, 250 und 500 µM zugesetzt.

2.6.4 Optimierung des Fermentationsmediums

Um geeignete Komponenten und deren optimale Konzentration für das spätere Fermentationsmedium zu ermitteln wurden jeweils drei parallele Ansätze in 100 ml Schüttelkulturen angesetzt. Die Vorkultur von *B. sp* F5 und *B. sp* F11 wurde in 10 ml Shrimp-Protein-Medium herangezogen. Die Hauptkultur wurde 10 %ig angesetzt und für 48 h im Luftschüttler inkubiert (55 °C, 180 upm). Die Probennahme erfolgte nach 24 und 48 h. Es wurden Lebendkeimzahl (siehe 2.3.3), Proteaseaktivität (siehe 2.8.6) und Restproteingehalt der Schalen (siehe 2.8.2) bestimmt.

Als Schalensubstrat wurden vorbehandelte Schalenabfälle aus Büsum eingesetzt. Die Nährlösung wurde entsprechend den Versuchsbedingungen angepasst.

Versuchsreihe „KH₂PO₄“

Schalenabfälle	20 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	(0%; 0,1%; 0,5% und 1,0 %) (w/v)

Versuchsreihe „CaCl₂“

Schalenabfälle	20 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,5 % (w/v)
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	(0 %; 0,1 %; 0,5 %; 1,0 %) (w/v)

Versuchsreihe „NaCl“

Schalenabfälle	20 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,5 % (w/v)
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,1 % (w/v)
NaCl	(0 %; 0,1 %; 0,5 %; 1,0 %) (w/v)

Versuchsreihe „Mg₂SO₄“

Schalenabfälle	20 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,1 % (w/v)
Mg ₂ SO ₄ * 7 H ₂ O	(0 %; 0,1 %; 0,5 %; 1,0 %) (w/v)

Versuchsreihe „komplexe Substrate“

Schalenabfälle	20 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,5 % (w/v)
Cassava	2,0 % (w/v)
oder Melasse	2,0 % (w/v)
oder Hefeextrakt	0,5 % (w/v)

2.7 Biotechnologische Aufarbeitung von Garnelenabfällen

2.7.1 Vorbereitung des Garnelenabfalls

Frische, gekühlte Garnelenabfälle mussten vor der Fermentation zunächst von losen Fleischresten, die beim Pulvorgang an den Schalen haften bleiben und Verunreinigungen durch Sand befreit werden. Dazu wurden die Schalen zunächst in einer Ultrazentrifugalmühle (Retsch GmbH, Haan) zermahlen (Siebdurchmesser: 0,5 cm). Anschließend wurden die Schalen mit handwarmem Leitungswasser gewaschen. Dazu wurden die zerkleinerten Schalen für 10 min in Wasser eingeweicht; das Wasser wurde dekantiert und der Vorgang solange wiederholt bis das Wasser klar blieb. Das proteinreiche Waschwasser der beiden ersten Waschschriffe wurde bis zur Herstellung des Shrimp-Protein-Mediums bei 4 °C aufbewahrt. Die Schalen wurden anschließend portioniert und bei -20 °C bis zur späteren Verwendung eingefroren.

2.7.2 Vorkultivierung der *Bacillus*-Stämme

Zur Vorkultivierung wurde eine Einzelkolonie des jeweiligen Stammes auf Shrimp-Protein-Agar überführt. 100 ml Shrimp-Protein-Medium wurden dann mit einer Impföse voll Zellmaterial angeimpft und für 16 h inkubiert (55 °C; 180 upm).

Stand kein frisches proteinreiches Waschwasser zur Herstellung des Shrimp-Protein-Mediums zur Verfügung wurden dem Medium stattdessen 10 % Pepton zugesetzt.

2.7.3 Durchführung der fermentativen Deproteinierung in Submerskultur

Zur Deproteinierung der Schalenabfälle wurden Fermentationen im Kleinfementer „Labfors Master“, der Firma Infors (Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Das Füllvolumen des verwendeten Kulturgefäßes betrug 1,2 l. Zur Vorbereitung des Deproteinierungsansatzes wurden 200 g der aufgearbeiteten feuchten Schalenabfälle mit 1 l Kulturmedium überschichtet. Die Hauptkultur wurde 10 %ig aus der vorbereiteten Vorkultur angeimpft. Der Ansatz wurde, wenn nicht anders aufgeführt, für 48 h bei 55 °C, mit einer Rührleistung von 500 upm und einer Belüftungsrate von 2 vvm inkubiert. Der pH und pO₂ wurde „on-line“ über eine pH-Elektrode (Mettler-Toledo GmbH, Giessen) bzw. pO₂-Elektrode (Mettler-Toledo GmbH, Giessen) dokumentiert. Um ein Übersäumen des

Fermentationsansatzes zu verhindern wurde tropfenweise Silikon-Antischaum SLE (Wacker-Chemie GmbH, Burghausen) zugegeben. Übertragene Daten (Temperatur, Rührleistung, Belüftungsrate, Schaumbildung, pH und pO_2) wurden mittels der Software IRIS (Infors, Bottmingen, Schweiz) während des gesamten Fermentationsverlaufes aufgezeichnet (Abb. 2.1).

Bei pH-kontrollierten Ansätzen wurden Vorlagenflaschen mit 1 M Schwefelsäure bzw. 8 %iger Phosphorsäure über eine Schlauchpumpe and den Fermenter angeschlossen. Die Zugabe wurde automatisch reguliert.

Zur Ernte der Schalenabfälle wurde das Kulturmedium dekantiert. Die Schalen wurden über einem Sieb mit Leitungswasser gewaschen. Eine Probe zur Analyse des Produktes (Calcium-Chitin) wurde entnommen und bei 65 °C getrocknet. Die Aufbewahrung der Probe erfolgte bei Raumtemperatur.

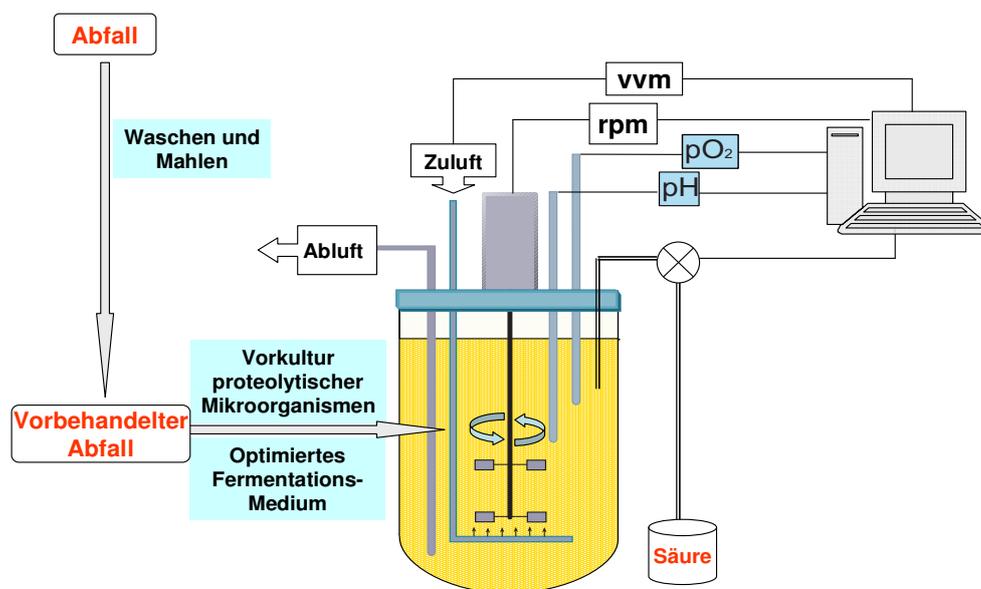


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Deproteinierungsschrittes zur Aufarbeitung von Schrimpabfällen zur Chitingewinnung

Kulturmedium

KH_2PO_4	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
$Mg_2SO_4 \cdot 7 H_2O$	0,1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,1 % (w/v)

2.7.4 Demineralisierung des Calcium-Chitins

Durch die Zugabe von Milchsäure wird das an die Schalen gebundene Calciumcarbonat (CaCO_3) zu Calciumlactat und Hydrogencarbonat umgesetzt. Calciumlactat ist im Gegensatz zu CaCO_3 in Wasser löslich und kann so von den Schalen abgetrennt werden.



Das bei der Fermentation erhaltene Calcium-Chitin wurde direkt decalcifiziert. Dazu wurde 0,9 %ige Milchsäure in doppelstöchiometrischer Menge zu dem Produkt gegeben und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das erhaltene Chitin über ein Sieb abgeschüttet, mit Aqua dest. gewaschen und bei 55 °C getrocknet. Das Endprodukt wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Die Menge der eingesetzten Milchsäure berechnet sich aus dem Aschegehalt des Calcium-Chitins. Dieses besitzt erfahrungsgemäß einen Wassergehalt von 60 % und einen maximalen Aschegehalt von 60 % der Trockenmasse. Bei 100 g eingewogener Feuchtmasse wurde folglich ein Aschegehalt von 24 g erhalten. Der größte Teil der Asche besteht aus Calciumcarbonat. Daher wurde für die Berechnung das Molekulargewicht des Calciumcarbonats herangezogen.

Die Menge an benötigter 0,9 %iger Milchsäure berechnet sich nach folgender Formel:

$$V_L(\text{ml}) = 2 \cdot \frac{\text{Asche}(\text{g})}{M(\text{CaCO}_3)} \cdot M(\text{Lactat}) \cdot \text{VF}$$

$$M(\text{CaCO}_3) = 100 \text{ g/Mol}$$

$$M(\text{Lactat}) = 90 \text{ g/Mol}$$

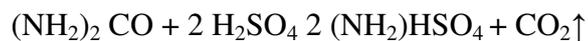
$$\text{VF (Umrechnung von 100% auf 0,9 % Milchsäure)} = 111$$

$$V_L = \text{Volumen an 0,9 %iger Milchsäure}$$

2.8 Analytik

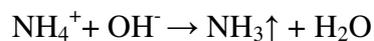
2.8.1 Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl

Beim Kjeldahl-Aufschluss werden stickstoffhaltige organische Verbindungen mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von Reduktionsmitteln und Katalysatoren zerstört und der organisch gebundene Stickstoff in anorganische Ammoniumverbindungen überführt (hier am Beispiel von Harnstoff):

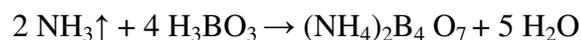


Bei der Oxidation mit Schwefelsäure wird aus dem Kohlenstoff und Wasserstoff der Probe CO_2 und Wasser gebildet. Stickstoff wird durch Hydrolyse als Ammoniak freigesetzt und durch die konzentrierte Schwefelsäure mittels Neutralisationsreaktion als Ammoniumhydrogensulfat gebunden.

Zur Bestimmung des Ammoniumstickstoffs wird die Messlösung nach Alkalisierung mit 32 %iger Natronlauge aufgekocht, um Ammonium (NH_4^+) in gasförmiges Ammoniak (NH_3) zu überführen:



Ammoniak wird mit dem Wasserdampf ausgetrieben und nach Kühlung quantitativ in einer Vorlage aus Borsäure aufgefangen, wodurch der pH-Wert der Borsäure ansteigt. Aus der Neutralisationsreaktion des Ammoniaks mit der Borsäure entsteht Ammoniumtetraborat.



Nach Abschluss der Wasserdampfdestillation wird der ursprüngliche pH-Wert durch Titration mit Schwefelsäure wiederhergestellt. Der Endpunkt der Titration wird dabei durch den Farbumschlag vom zugesetzten Mischindikator von grün nach violett ermittelt. Aus der Menge an verbrauchter Schwefelsäure lässt sich die Menge an aufgefangenem Ammoniak und damit die Ammoniumkonzentration der Messlösung errechnen.

Durchführung

Geräte

Aufschluss-Einheit K-424 (Büchi, Schweiz)
Destillations-Einheit K-314 (Büchi, Schweiz)
Bürette (Brand, Wertheim)

Reaktionsansatz

Probe	0,5 g
Schwefelsäure 98 %	15 ml
Kjeldahl-Tabletten (quecksilber- und selenfrei)	10 g

Die Ansätze wurden für 3 h bei voller Leistung aufgeschlossen und anschließend abgekühlt. Vor der Destillation wurden 30 ml Aqua dest. hinzugegeben. Die Neutralisation erfolgte dann mit 32 %iger Natronlauge in der Destillations-Einheit. Die neutralisierte Lösung wurde für 3 min über Wasserdampf destilliert und das Destillat in 2 %iger Borsäure, welche mit Mischindikator versetzt war, aufgefangen. Titriert wurde mit 0,5 N Schwefelsäure (Titrisol[®]) bis zum Umschlag des Indikators von grün nach violett. Für jede Versuchsreihe wurde ein Blindwert (Reaktionsansatz ohne Probe) angesetzt.

Berechnung

$$N\% = \left(\frac{(V_1 - V_{Bl}) \cdot c \cdot M_N}{E_p \cdot 1000} \right) \cdot 100\%$$

V_1 = Verbrauch an Titrisol (ml)
 V_{Bl} = Verbrauch an Titrisol im Leerwert (ohne Probe)
 c = Konzentration des Titrisols (N)
 M_N = Molekulargewicht Stickstoff (14,007 g/mol)
 E_p = Probeneinwaage (g)

2.8.2 Chitingehalt

Über den Gesamtstickstoffanteil einer Probe kann auf den prozentualen Anteil an Chitin zurück geschlossen werden. Dazu müssen zunächst weitere in der Probe vorhandene Stickstoffquellen, die Proteine, aus der Probe entfernt werden.

Um den Anteil an Chitin zu ermitteln wurde zunächst 0,5 g Probenmaterial, wie in 2.8.2 beschrieben deproteiniert. Nach Zentrifugation (5000*g, 20 min, RT) wurde der mit Protein angereicherte alkalische Überstand entfernt und die Probe bis zur Neutralität mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde eine Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl (siehe 2.8.1) durchgeführt. Um von dem Stickstoffanteil auf den Chitinanteil zurückschließen zu können wurde das Ergebnis mit dem Faktor 14,5 multipliziert (No und Meyer, 1989).

2.8.3 Ammoniumgehalt

Freies Ammonium und Ammoniumhydroxid lassen sich mittels Wasserdampf aus alkalischen Lösungen austreiben. Dieses Verfahren entspricht dem zweiten Teil der Kjeldahl-Methode (siehe 2.8.1).

Zur Bestimmung des Ammoniumgehalts einer Lösung wurde eine Wasserdampf-Destillation mit 20 ml des Fermentationsüberstandes, wie in 2.8.1 beschrieben durchgeführt. Vor der Destillation wurden 10 ml einer 32 %igen Natronlauge der Probe zugefügt. Die Destillation wurde für 5 min durchgeführt und das Destillat in 60 ml 2 %iger Borsäure aufgefangen. Die Titration erfolgte mit 0,1 N H₂SO₄.

Der Gehalt an Ammonium wurde folgendermaßen berechnet:

$$NH_3(\%) = \frac{N_A \cdot V_A \cdot 1,8003}{V_P}$$

N_A = Normalität der Schwefelsäure (0,1 N)

V_A = Volumen an verbrauchtem Titranten (ml)

V_P = Probenvolumen (20 ml)

2.8.4 Restproteingehalt der Garnelenschalen

Bei dieser Methode wurde Protein mittels alkalischer Hydrolyse aus Garnelenschalen herausgelöst, so dass der Proteingehalt des Garnelenschalenabfalls im alkalischen Überstand quantifiziert werden kann. Die Proteinbestimmung nach Lowry dient der quantitativen Bestimmung von Proteinen und beruht auf zwei Reaktionen. In der ersten Reaktion bildet sich ein blau-violetter Komplex zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Im zweiten Schritt bildet sich ein blauer Komplex unter Reduktion von Heteropolysäuren durch aromatische Aminosäuren unter Bindung von Mischoxiden (Lowry et al., 1951).

Durchführung

Die Garnelenschalen wurden zunächst bei 65 °C getrocknet. Anschließend wurden 0,5 g Schalenmaterial mit 15 ml 1 M Natronlauge versetzt und für 24 h bei 65 °C inkubiert. Der Probenüberstand wurden 1/10 verdünnt und der Proteingehalt nach Lowry bestimmt. Der Proteingehalt der Schalen entspricht der Menge an Protein im alkalischen Überstand.

Dieser wurde mittels der Lowry-Methode bestimmt. Dazu wurde zunächst der Reaktionspuffer frisch aus 50 ml Lösung A und je 0,5 ml Lösung B und C hergestellt. 100 µl einer 1:10 Verdünnung der Probe in PBS und 1 ml des Reaktionspuffers wurden vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Lösung D hinzu gegeben und der Ansatz vermischt. Nach weiteren 30 min Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Absorption bei 750 nm gemessen werden. Als Probenleerwert diente ein Ansatz mit 100 µl PBS statt der verdünnten Proteinlösung.

Die erhaltenen Werte wurden durch Interpolation einer Eichkurve aus Standard-Konzentrationen BSA-Lösung (1 µg/ml – 1500 µg/ml) in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

Verwendete Lösungen

PBS

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH	7,4

Lösung A

Na₂CO₃ 2 % (w/v)

NaOH 0,1 M

Lösung B

CuSO₄ 1 % in Aqua dest.

Lösung C

NaKC₄H₄O₆ * 4 H₂O 2 % (w/v)

Folin-Ciocalteu Reagenz (Sigma)

Rinderserumalbumin (BSA) 0,1µ/ml – 1500 µg/ml

2.8.5 Aschegehalt

Der Aschegehalt bezeichnet den Rückstand, bestehend aus Mineralstoffen, in der Garnelenschale bzw. im Chitin, der bei vollständiger Verbrennung der organischen Bestandteile der Probe unter festgelegten Bedingungen entsteht.

Ungefähr 1 g Probe wurde in einen Porzellantiegel bekannter Masse eingewogen. Um den Trocknungsverlust der Probe zu bestimmen wurde diese zunächst für 60 min bei 110 °C getrocknet. Nach dem Abkühlen wurde der Tiegel mit Probe erneut gewogen.

Vor der eigentlichen Veraschung wurde die Probe auf einem Elektrobrenner (Hoffmann GmbH, Ostfildern) verglüht und anschließend für 3 h bei 800 °C im Muffelofen (Kendro, Langenselbold) inkubiert. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde der Tiegel ausgewogen und der Aschegehalt (A) folgendermaßen berechnet:

$$A = \frac{m_2 - m_1}{E} \cdot 100$$

A (%) = Asche

m₁ (g) = Gewicht Tiegel (leer)

m₂ (g) = Gewicht Tiegel + Probe nach der Veraschung

E (g) = Probeneinwaage - Trocknungsverlust

2.8.6 Viskosität des Endproduktes

Viskosimetrie stellt eine der grundlegenden analytischen Methoden zur Untersuchung der Struktur und der Eigenschaften von Polymerlösungen dar. Die Viskosität einer Polymerlösung wird zum einen durch die Molmasse bestimmt, darüber hinaus ist sie abhängig von der Konzentration, dem Lösungsmittel, der Art und Zusammensetzung des polymeren Lösungsanteils und der Temperatur. Linear aufgebaute Polymere sind fadenförmige Moleküle, die in verdünnten Lösungen in der Regel die Form eines statistischen Knäuels einnehmen. Die Wechselwirkungen der Knäuel mit den Lösungsmittelmolekülen und untereinander bewirken einen Anstieg der Viskosität (ein Maß für die innere Reibung) gegenüber dem reinen Lösungsmittel.

Das laminare Fließen von Flüssigkeiten kann durch das "Zwei-Platten-Modell" beschrieben werden. Zwischen einer bewegten und einer ruhenden Platte befindet sich ein Fluid. Die an der bewegten Platte befindliche Grenzschicht des Fluids nimmt die Plattengeschwindigkeit an, während die Geschwindigkeit der Grenzschicht an der ruhenden Platte gleich Null ist. Zwischen diesen Extremwerten stellt man sich das Fluid als Schichtenmodell vor, in dem sich ein Geschwindigkeitsgefälle zwischen den einzelnen Schichten einstellt. Die Geschwindigkeitsänderung über dem Plattenabstand bezeichnet man als Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ (Ableitung der Geschwindigkeit nach dem Abstand). Die Kraft mit der die einzelnen Schichten aufeinander einwirken wird als Schubspannung σ_{12} bezeichnet. Diese Größen sind einander direkt proportional. Der Proportionalitätsfaktor ist die Viskosität η .

Newtonsches Gesetz:
$$\sigma_{12} = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

Für die Viskosimetrie sind diese Größen wichtig, weil Polymersysteme bei kleinen Schergeschwindigkeiten (bzw. Schubspannungen) Newtonsches Fließverhalten zeigen, d.h. die Viskosität ist unabhängig von der Schergeschwindigkeit. Oberhalb einer kritischen Schergeschwindigkeit wird in der Regel eine mit steigender Schergeschwindigkeit abnehmende Viskosität beobachtet (pseudoplastisches Verhalten). In einzelnen Fällen kann aber auch eine Zunahme von $\dot{\gamma}$ auftreten (dilatantes Verhalten). Da sich die Änderung der Viskosität über mehrere Dekaden erstreckt, wird üblicherweise eine doppelt logarithmische Auftragung der Fließkurve gewählt.

Durchführung

Es wurde eine Lösung aus 1-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP) mit 5 % LiCl hergestellt. Da Wasser die Viskosität des Systems beeinflussen kann wurde NMP über einem Molekularsieb und LiCl bei 110 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Lösungsmittelbestandteile wurden für 16 h unter Rühren vermischt.

Zunächst wurde die Chitinprobe in einer Ultrazentrifugalmühle (Retsch GmbH, Haan) fein gemahlen (Sieb: 0,08 mm). Um die Restfeuchtigkeit aus dem Produkt möglichst schonend zu entfernen wurden die Proben Gefriertrockner Alpha 1-4 (Christ GmbH, Osterode) getrocknet (1h, 0,140 mbar). Anschließend wurde eine 0,2 %ige Lösung der Chitinprobe im NMP/LiCl-Lösungsmittelsystem hergestellt und für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Unlösliche Bestandteile wurde durch Zentrifugation (10000* g ; 1 h, RT) abgetrennt und nach dem Trocknen ausgewogen, um auf die tatsächliche Konzentration der Chitinlösung zurückschließen zu können. Anschließend wurde die Lösung mit NMP/LiCl soweit verdünnt, dass eine 0,1 %ige Lösung entstand.

Die Viskosität wurde mit einem Viskotester 7L Plus (Haake, Karlsruhe, BRD) unter Einsatz der Spindel L1 ermittelt. Es wurde eine Fließkurve im Bereich Newtonschen Fließverhaltens erstellt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der dem Gerät beigefügten Software RHEOWIN 3.12.

Um den Newtonschen Fließbereich der Polymerlösung zu ermitteln, wurde eine Fließkurve einer 0,4 %ige Chitinlösung in NMP/LiCl auf einem Kegel-Platte-Rheometer erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Isolation proteolytischer Stämme aus Pulabfällen der Garnelenproduktion

Um zufrieden stellende Hydrolyseergebnisse zu erzielen wurde zunächst ein an Garnelenschalen angepasster zur Proteolyse befähigter Organismus benötigt. Dazu wurden Anreicherungskulturen aus Pulabfällen angesetzt, proteolytische Organismen isoliert und in einem Screening geeignete Stämme ausgewählt und näher charakterisiert. Anschließend wurden in Schüttelkulturen die optimalen Bedingungen zur Chitinextraktion aus Schalenabfällen ermittelt. Eine Übersicht über den Ablauf der Isolation und des anschließenden Screenings ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

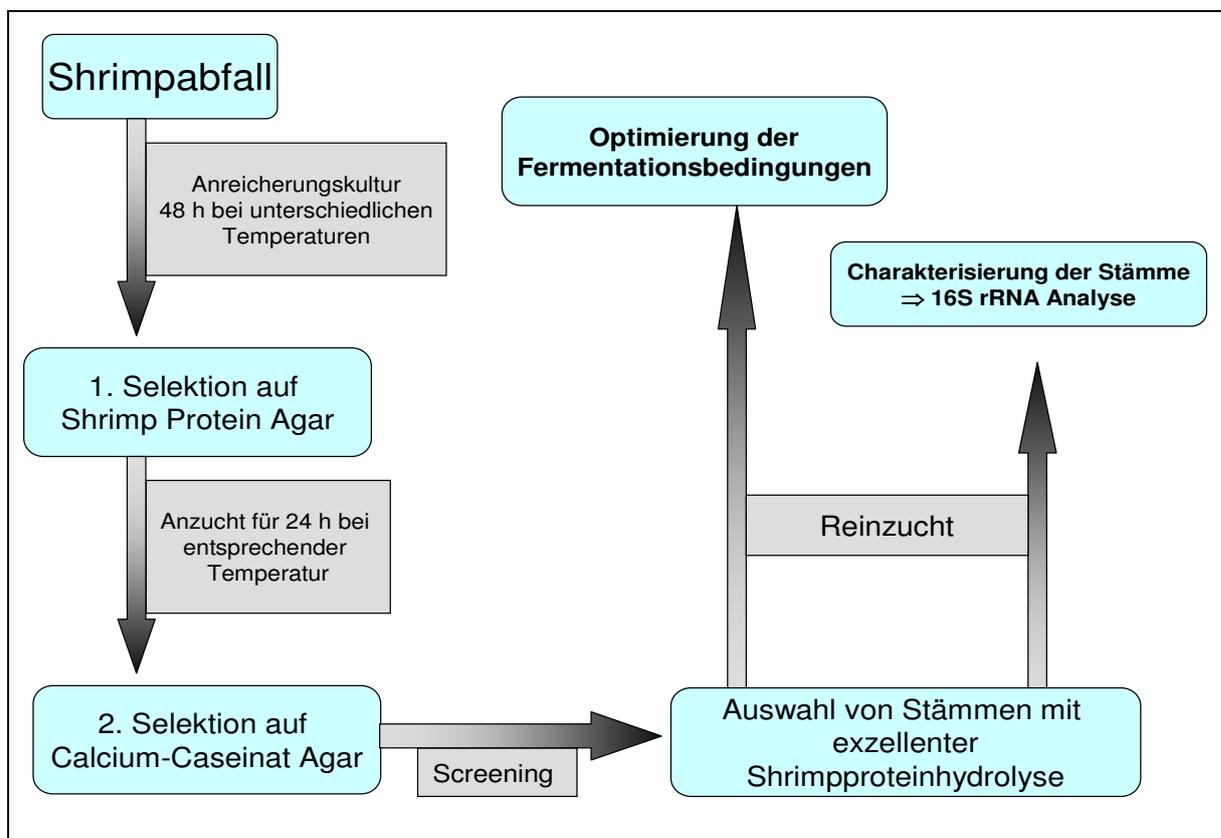


Abbildung 3.1: Isolationsstrategie proteolytischer Stämme zur Entwicklung eines Teilschritts eines biotechnologischen Prozesses zur Extraktion von Chitin aus Pulabfällen der Shrimpproduktion.

3.1.1 Isolation mesophiler Stämme

In einem ersten Isolationsschritt wurden zunächst Stämme von Schalenabfällen der Nordseegarnele *C. crangon* angereichert. Die Schalenabfälle lagerten für mehrere Monate bei -20°C bevor sie für Anreicherungskulturen aufgetaut wurden. Die Inkubation erfolgte bei 20°C in Standkultur und bei 30°C in Stand- und in Schüttelkultur. Proben des Kulturüberstandes wurden nach 1, 2, 3, 7, und 14 Tagen Inkubation entnommen. Geeignete Verdünnungsstufen (10^0 - 10^{-5}) wurden auf Shrimp-Protein-Agar ausplattiert und anschließend in einem weiteren Selektionsschritt auf Calcium-Caseinat-Agar ausgestrichen. Von 103 isolierten Stämmen haben insgesamt 8 Stämme Klärungshöfe auf Calcium-Caseinat-Agar ausgebildet. Davon stammen 6 Kulturen aus Anreicherungen, die bei 30°C inkubiert wurden.

Tabelle 3.1: Proteolytische Stämme aus Nordseekrabbenschalen

Probe	Anreicherungskultur	Anzahl proteolytischer Stämme
1.Tag	20°C Standkultur	-
	30°C Standkultur	-
	30°C Schüttelkultur	2
2.Tag	20°C Standkultur	-
	30°C Standkultur	-
	30°C Schüttelkultur	-
3.Tag	20°C Standkultur	-
	30°C Standkultur	1
	30°C Schüttelkultur	2
7.Tag	20°C Standkultur	1
	30°C Standkultur	-
	30°C Schüttelkultur	-
14.Tag	20°C Standkultur	1
	30°C Standkultur	1
	30°C Schüttelkultur	-

In einem zweiten Isolationsansatz wurden Anreicherungskulturen mit Pulabfällen aus der indonesischen Garnelenproduktion untersucht (siehe 2.4.1). Insgesamt wurden 140 Stämme isoliert, davon bildeten 75 Stämme einen Klärungshof auf Calcium-Caseinat-Agar aus. Bis auf einen Stamm wurden alle proteolytisch aktiven Stämme innerhalb der ersten 48 h isoliert. Davon wurden 37 Stämme bei 20°C und 39 Stämme bei 30°C isoliert.

Tabelle 3.2: Proteolytische Stämme aus indonesischen Shrimpschalen

Probe	Anreicherungskultur	Anzahl proteolytischer Stämme
1.Tag	20°C Standkultur	23
	30°C Standkultur	10
	30°C Schüttelkultur	5
2.Tag	20°C Standkultur	14
	30°C Standkultur	20
	30°C Schüttelkultur	8
3.Tag	20°C Standkultur	-
	30°C Standkultur	1
	30°C Schüttelkultur	-
7.Tag	20°C Standkultur	-
	30°C Standkultur	-
	30°C Schüttelkultur	-
14.Tag	20°C Standkultur	-
	30°C Standkultur	-
	30°C Schüttelkultur	-

3.1.2 Erstes Screening isolierter proteolytischer Stämme

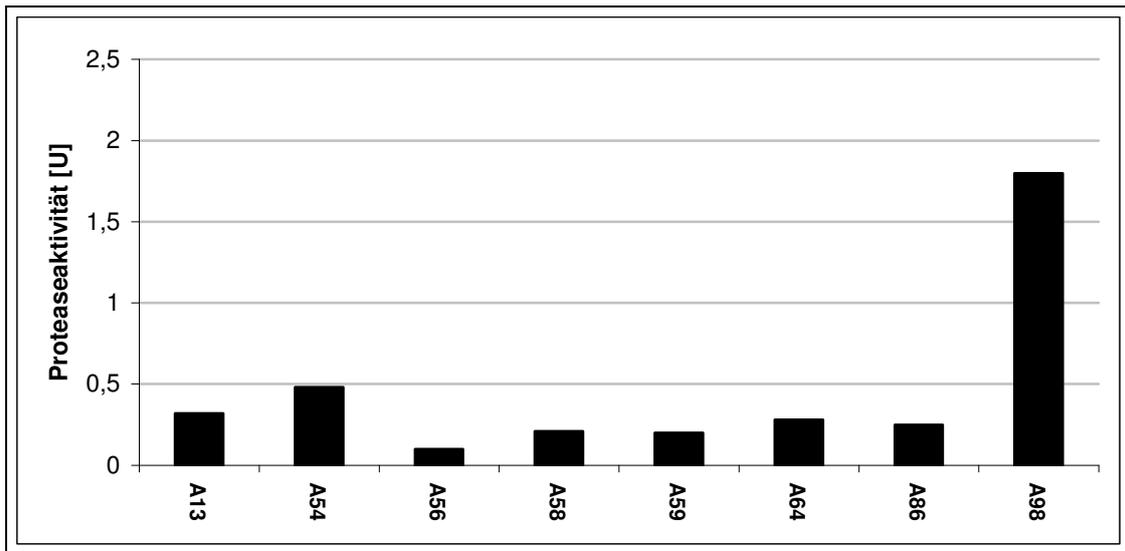
In einem ersten Screening wurden die isolierten Stämme auf ihre proteolytische Aktivität hin untersucht. Als Nährmedium dienten klein gemahlene Schalenabfälle von *C. crangon* (BF). Da proteolytische Enzyme substratspezifisch sind wurde in diesem Screening die proteolytische Aktivität mittels Azocollagen als Proteasesubstrat ermittelt, um sicherzustellen, dass der ausgewählte Organismus Proteasen mit einem breiten proteolytischen Spektrum ausbildet.

Ein Vergleich der proteolytischen Aktivität der Kulturüberstände ist in der Abbildung 3.2 dargestellt. Zur weiteren Untersuchung wurden Stämme mit einer proteolytischen Aktivität oberhalb 1 U ausgewählt.

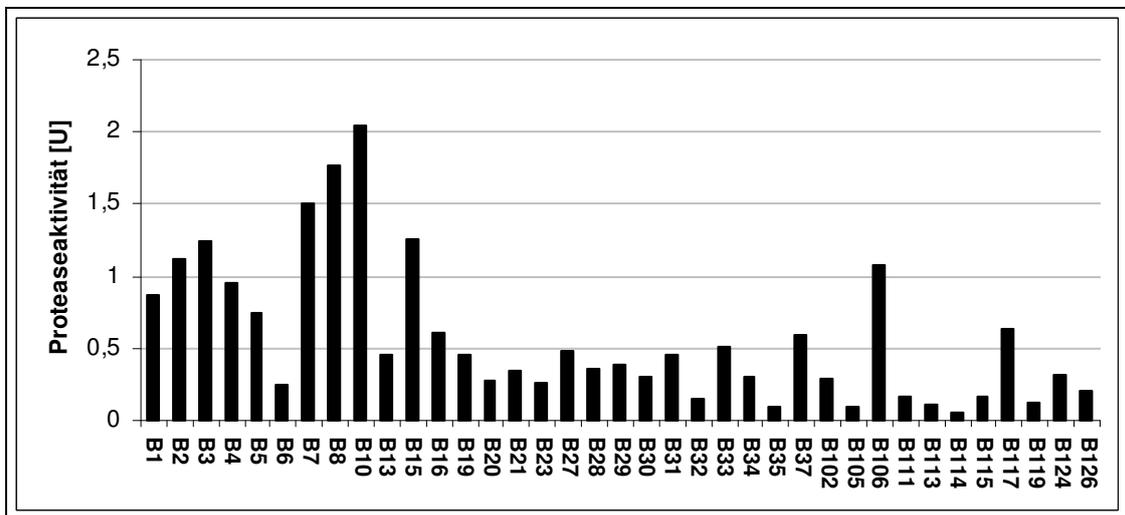
Die aus *C.-crangon*-Schalen angereicherten Isolate wiesen bis auf den Stamm A98 mit einer Aktivität von 1,8 U eine eher geringe Aktivität unterhalb 0,5 U auf (Abb. 3.2 A).

Unter den Isolaten aus Anreicherungskulturen (20°C) von *P. monodon* finden sich 6 Stämme mit einer ordentlichen proteolytischen Aktivität über 1 U. Dieses sind die Stämme B2 mit 1,12 U, B3 mit 1,24 U; B7 mit 1,51 U, B8 mit 1,77 U, B10 mit 2,15 U, B15 mit 1,26 U und B106 mit 1,08 U (Abb. 3.2 B).

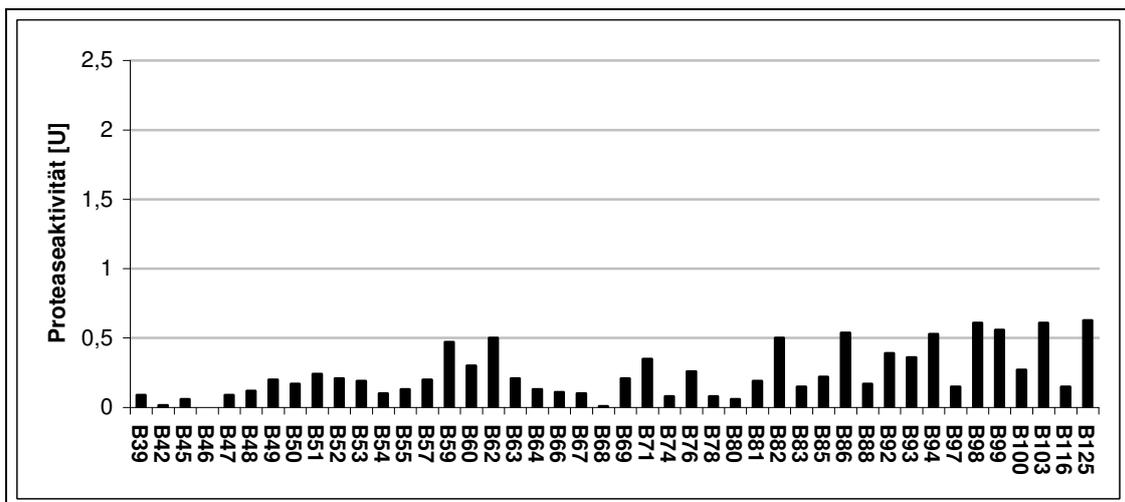
Unter den Isolaten aus Anreicherungskulturen (30°C) von *P. monodon* finden sich keine Stämme mit einer Proteaseaktivität oberhalb 1 U (Abb. 3.2 C). Daher wurde aus dieser Versuchsreihe kein Stamm zu weiteren Untersuchungen herangezogen.



A



B



C

Abbildung 3.4: Proteolytische Aktivität der Kulturüberstände mit Azocoll als Proteasesubstrat **A** Isolate von *C. crangon* **B** Isolate von *P. monodon* (20 °C) **C** Isolate von *P. monodon* (30 °C).

3.1.3 Zweites Screening isolierter Stämme

Von den acht in 3.1.2 ausgewählten Stämmen wurde der Verlauf der Proteaseaktivität bei einer Inkubationsdauer von 10 Tagen untersucht. Als Vergleichsstamm wurde ein Stamm *B. amyloliquefaciens* mit ausgezeichneter proteolytischer Aktivität aus der institutseigenen Stammsammlung eingesetzt. Die proteolytische Aktivität des Kulturüberstandes wird exemplarisch nach 5 Tagen Inkubationsdauer dargestellt. Der Gesamtstickstoffgehalt der Schalen wurde am Ende der Inkubationsperiode von 10 Tagen bestimmt.

Insgesamt hatten zwei der untersuchten Stämme eine Aktivität größer 2 U erreicht (B15 und A98). Die Aktivität beider Stämme lag jedoch deutlich unter der des Vergleichsstamms *B. amyloliquefaciens* mit einer Aktivität von 4,2 U (Abb. 3.3).

Mit einem Gesamtstickstoffgehalt von 2,78 % zeigte der Stamm A98 die deutlich beste Deproteinierungsleistung. Jedoch waren die Schalen nach der Inkubationszeit zersetzt, was auf eine erhöhte Chitinaseaktivität des Stammes A98 unter den Kulturbedingungen hinweist. Der Vergleichsstamm *B. amyloliquefaciens* wies einen im Vergleich zum Gesamtstickstoffgehalt der Negativkontrolle mit 6,2 % deutlich gesunkenen Gesamtstickstoffgehalt von 3,5 % (Abb. 3.4) auf. Weiterhin konnte kein Zersetzen der Schalen beobachtet werden. Daher wurde der Stamm *B. amyloliquefaciens* für weitere Untersuchungen ausgewählt.

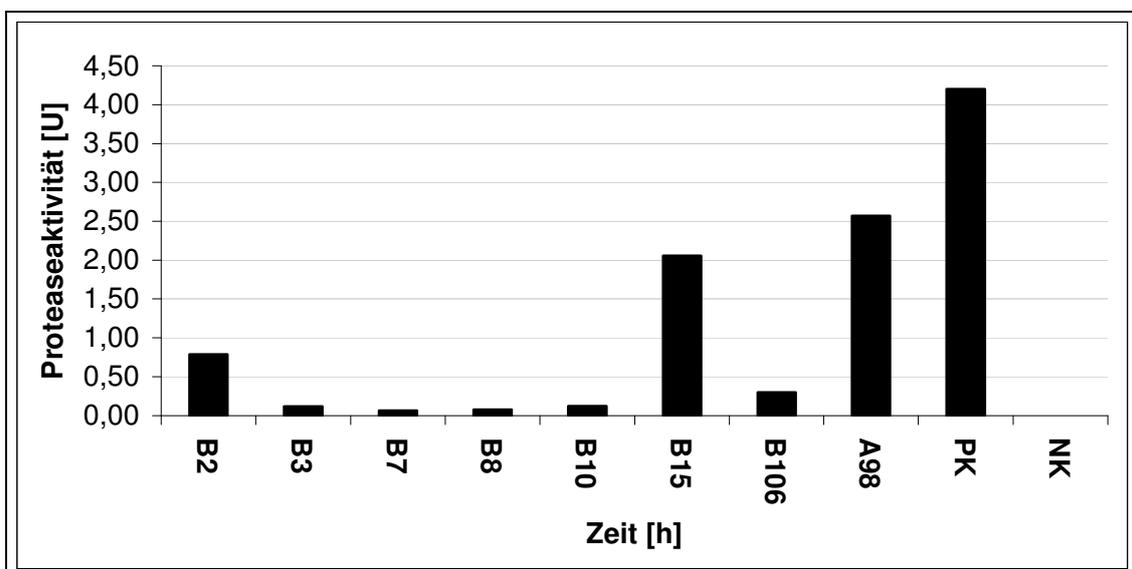


Abbildung 3.3: Proteaseaktivität der Kulturüberstände isolierter Stämme nach 5 Tagen Inkubation (PK: *B. amyloliquefaciens*; NK: Negativ Kontrolle)

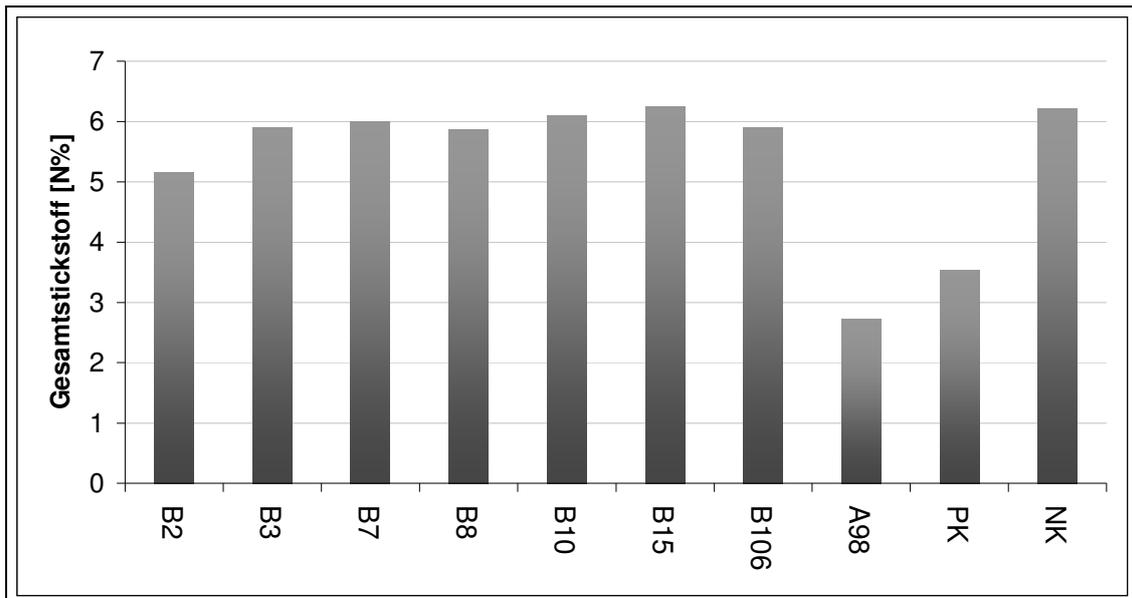


Abbildung 3.4: Gesamtstickstoffgehalt der behandelten Shrimpabfälle nach 10 Tagen Inkubation

3.1.4 Isolation aerober Sporenbildner

Wie sich im ersten Isolationsansatz herausstellte wies der Stamm *B. amyloliquefaciens* die beste Deproteinierungsleistung auf. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Screening auf aerobe Sporenbildner durchgeführt.

Als Schalenmaterial wurden, die bereits zuvor verwendeten indonesischen Pulabfälle von *P. monodon* genutzt. Die Inkubation erfolgte bei 20 und 30°C in Standkultur. Proben wurden möglichst im Bereich der Kahlhaut, welche sich bereits nach 24 h gebildet hatte, entnommen. Proteolytische Stämme wurden ausschließlich nach 48 h isoliert. Als Vergleichsstamm wurde *B. amyloliquefaciens* eingesetzt. Da aus pasteurisierten Ansätzen insgesamt weniger proteolytisch aktive Stämme isoliert wurden, wurde auf ein erstes Screening verzichtet und direkt wie unter 2.6 beschrieben vorgegangen. Zusätzlich zu den Isolaten wurden Stämme aus der institutseigenen Stammsammlung auf ihre proteolytische Leistung untersucht.

Die proteolytische Aktivität isolierter Sporenbildner lag mit Werten bis zu 3,72 U deutlich über der von Isolaten der 1. Isolationsreihe mit Höchstwerten von 2,6 U. Insgesamt wiesen 5 Stämme eine Aktivität größer 2 U auf (C2, C4, C6, D6 und D7). Der Vergleichsstamm *B. amyloliquefaciens* erreicht mit einer Aktivität 4,5 U den höchsten Wert.

Unter den untersuchten Organismen der Stammsammlung zeichnen sich insbesondere die Stämme *B. subtilis*, *B. subtilis* 230, *B. subtilis* 231, *B. licheniformis* und *B. cereus* durch eine hohe proteolytische Leistung aus (Abb. 3.5).

Die Stämme C2, C4, D6 C12, C15, D6 und D10 erreichten im Vergleich zu *B. amyloliquefaciens* eine ähnliche Reduktion des Gesamtstickstoffgehalts von 7,8 % (Negativkontrolle) unter 4 % der Schalentrockenmasse. Außer im Ansatz *B. amyloliquefaciens* wurden die Schalen von den Organismen zersetzt, was auf eine hohe Chitinaseaktivität hinweist. Die Stämme *B. subtilis*, *B. subtilis* 230, *B. subtilis* 231 und *B. licheniformis* erreichten ebenfalls eine Deproteinierungsleistung unterhalb 4 % Restprotein ohne erkennbare Anzeichen einer chitinolytischen Zersetzung des Schalenmaterials (Abb. 3.6). Daher stellen diese Organismen neben *B. amyloliquefaciens* geeignete Kandidaten für einen Fermentationsprozess unter mesophilen Bedingungen dar.

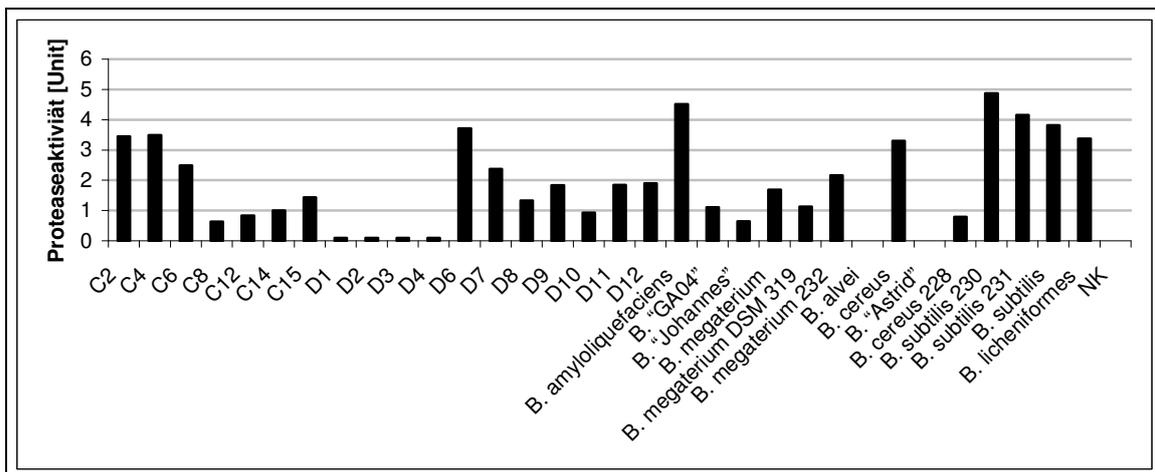


Abbildung 3.5: Proteaseaktivität der Kulturüberstände nach 5 Tagen Inkubation

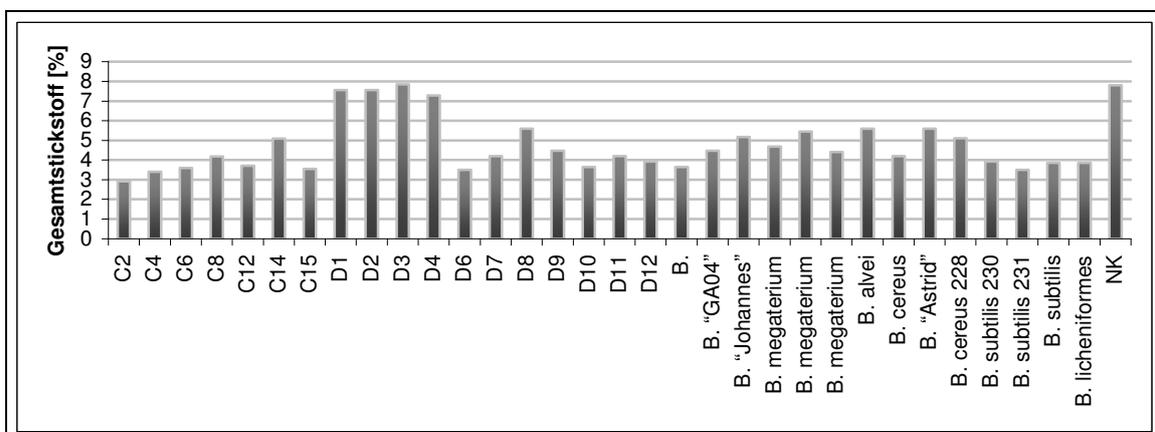


Abbildung 3.6: Gesamtstickstoffgehalt der behandelten Shrimpabfälle nach 10 Tagen Inkubation

3.1.5 Isolation thermophiler aerober Sporenbildner

Neben mesophilen Sporenbildnern wurden in einer weiteren Versuchsreihe thermophile Sporenbildner isoliert. Diese bieten den Vorteil, dass bei dem späteren Prozess auf den energieaufwendigen Sterilisationsschritt des Mediums verzichtet werden kann. Es wurde wie in 2.6 verfahren, wobei die Anreicherungs- und Inkubationstemperatur bei 55 °C gewählt wurde. Die untersuchten Isolate wurden nach 24 h Inkubationszeit aus den Kulturen isoliert und anschließend in einem Screening untersucht. Wie sich im Verlauf der Arbeit herausstellte, handelte es sich bei einem Isolat um eine Mischkultur aus F5 und F11. Als Vergleichsstamm wurde *B. licheniformis* ausgewählt, ein proteolytischer Stamm der Stammsammlung (siehe 3.1.4), der ebenso bei 55 °C ein gutes Wachstum und proteolytische Aktivität zeigt.

Die proteolytische Aktivität isolierter thermophiler Sporenbildner lag mit 6,5 U im Schnitt deutlich über der mesophiler Stämme mit einem Höchstwert von 4,9 U (Abb. 3.5). Die Stämme F5 und der Vergleichsstamm *B. licheniformis* zeigten hier mit 3,2 U bzw. 3,4 U eine Aktivität deutlich unter dem Durchschnitt. Die höchste Aktivität zeigte der Stamm F14 mit 8,3 U (Abb. 3.7).

Der Gesamtstickstoffgehalt war bei allen Versuchsansätzen im Vergleich zur Negativkontrolle mit 7,2 % deutlich gesunken, wobei *B. licheniformis* mit 4,6 % den geringsten und die Mischkultur aus F5/F11 mit 2,7 den höchsten Abbau zeigten (Abb. 3.8). Daher wurde die Mischkultur aus den Stämmen F5 und F11 für weitere Untersuchungen zur Entwicklung eines Fermentationsprozesses unter thermophilen Bedingungen ausgewählt.

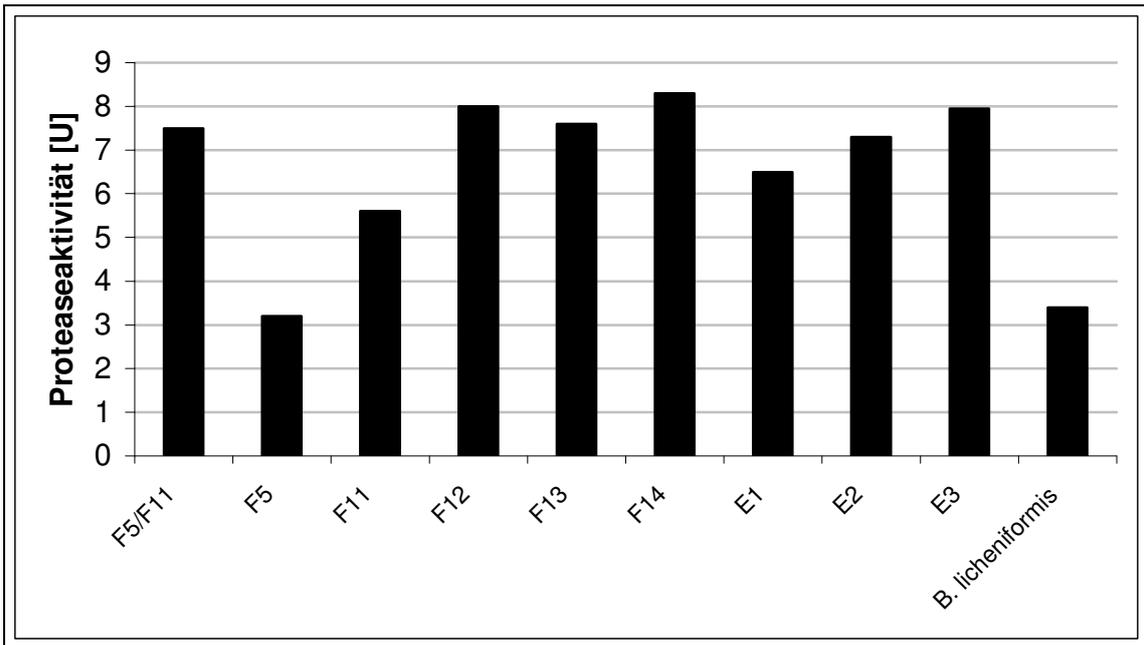


Abbildung 3.7: Proteaseaktivität der Kulturüberstände thermophiler Isolate nach 5 Tagen Inkubation

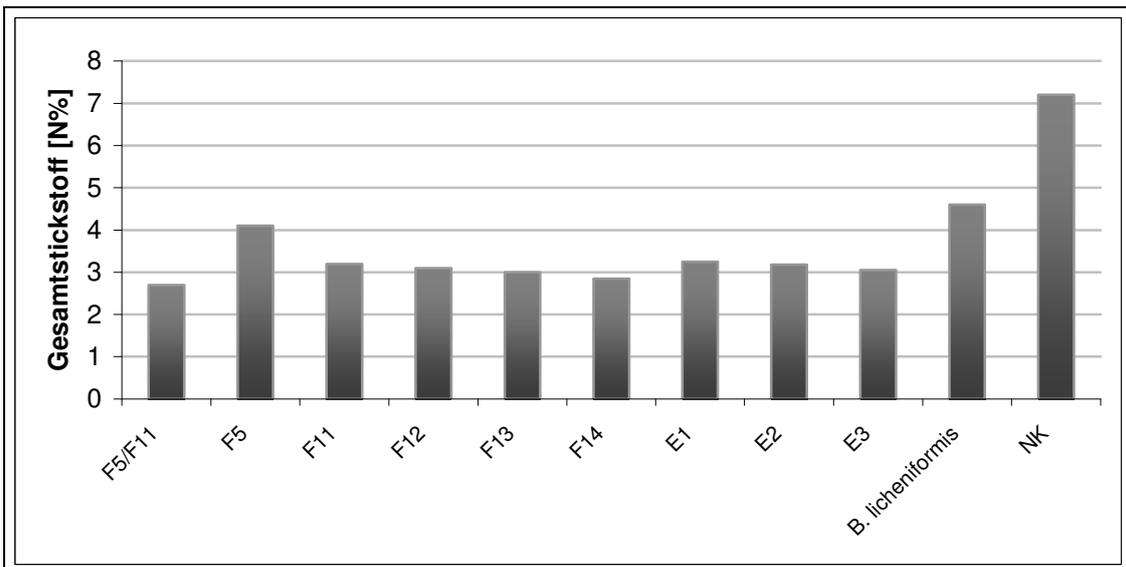


Abbildung 3.8: Gesamtstickstoffgehalt der behandelten Shrimppabfälle nach 10 Tagen Inkubation

3.2 Charakterisierung der zur Fermentation ausgewählten Stämme

3.2.1 Morphologische und biochemische Einordnung

Die zur Fermentation ausgewählten Stämme der Mischkultur aus F5 und F11 wurden nach den in 2.5.1 beschriebenen Methoden identifiziert. In Tabelle 3.3 sind die wichtigsten Reaktionen sowie die Beschreibung der Stämme aufgeführt. Das makroskopische Erscheinungsbild ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Das Isolat F5 bildet eine regelmäßige erhabene Kolonieform mit deutlicher Schleimbildung aus. Kolonien des Stamms F11 hingegen besitzen eine raue Oberfläche mit haarigen Auswüchsen, die fest mit der Agaroberfläche verbunden sind.

Im mikroskopischen Bild zeigten beide Isolate Stäbchen, die Ketten mit bis zu 4 einzelnen Zellen ausbildeten. In älteren Kulturen konnte eine Sporenbildung im terminalen Bereich des Bakteriums beobachtet werden. Aufgrund der morphologischen Beobachtung, des Gram-positiven Färberegebnisses und des aeroben Wachstums konnten die Stämme als aerobe Sporenbildner eingeordnet werden. Zur weiteren Charakterisierung wurde ein biochemisches Profil für die Gruppe der aeroben Sporenbildner erstellt (Tab. 3.3). Eine Auswertung der Daten ergab eine Zugehörigkeit der Stämme *B. sp* F5 und F11 zur Art *B. licheniformis* mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 %.

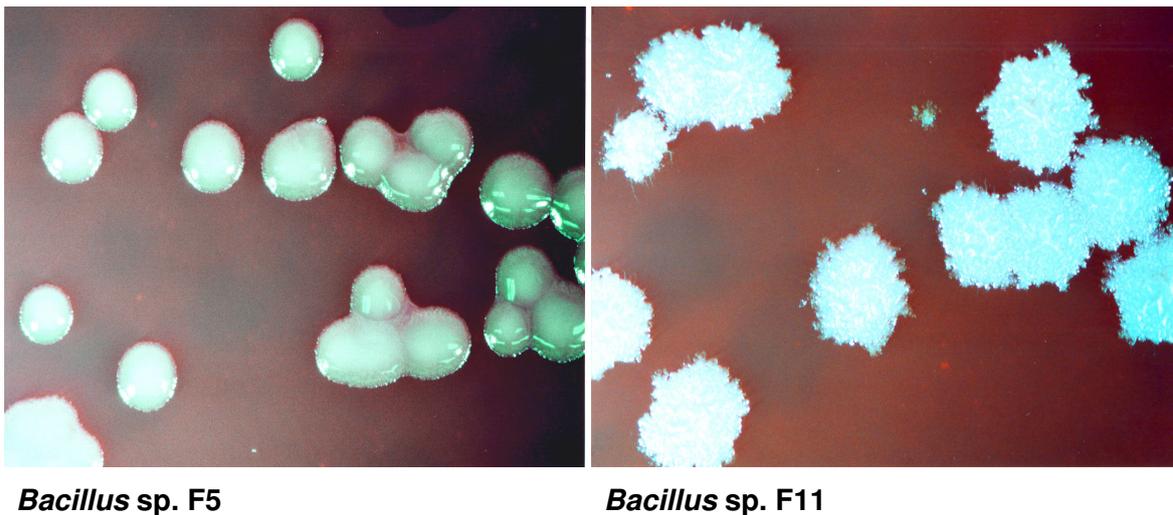


Abbildung 3.9: Makroskopisches Erscheinungsbild von *B. sp* F5 und *B. sp* F11 auf Blutagar (4fache Vergrößerung)

Tabelle 3.3: Morphologisches und biochemisches Profil der Isolate F5 und F11.

	<i>Bacillus</i> sp. F5	<i>Bacillus</i> sp. F11
Form	Stäbchen (in Ketten)	Stäbchen (in Ketten)
Gram	positiv	positiv
Beweglichkeit	beweglich	beweglich
Endosporen	terminal	terminal
Glycerin	+	+
L-Arabinose	+	+
Ribose	+	+
D-Xylose	+	+
Galaktose	+	+
D-Glukose	+	+
D-Fruktose	+	+
D-Mannose	+	+
Rhamnose	-	+
Inosit	+	+
Mannit	+	+
Sorbit	+	+
α -Methyl-D-Glukosid	+	+
N-Acetylglucosamin	+	-
Amygdalin	+	+
Arbutin	+	+
Esculin	+	+
Salicin	+	+
Cellobiose	+	+
Maltose	+	+
Melibiose	-	+
Saccharose	+	+
Trehalose	+	+
D-Raffinose	-	+
Amidon	+	+
Glycogen	+	+
D-Turanose	+	+
D-Tagatose	+	+
ONPG	+	+
Arginin	+	+
Gelatine	-	+
Casein	+	+
Kollagen	+	+
VP	+	+
Oxidase	-	-
Katalase	-	-

3.2.2 Phylogenetische Einordnung der Isolate

Neben der biochemischen Charakterisierung sollten die Isolate phylogenetisch basierend auf einem Sequenzabschnitt der 16S rRNA analysiert werden. Die Ermittlung der 16S-rRNA-Sequenz erfolgte nach den in 2.5.2 beschriebenen Methoden.

Ein Datenbankvergleich beider Sequenzen zeigte eine Homologie von 100 % zu 16S rRNA Sequenzen von *B. licheniformis* Stämmen. Sequenzhomologien wurden zwischen dem Nukleotid 30-600 ermittelt, wobei die hypervariablen Bereiche V1-V3 am 5'-Ende der 16S rRNA Sequenz mit in die Analyse einbezogen waren.

Phylogenetisch ordnen sich die Organismen in die Gruppe *B. subtilis* ein. Eine genaue Klassifizierung, sowie eine Darstellung der phylogenetischen Beziehungen zu artverwandten Bakterienstämmen sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

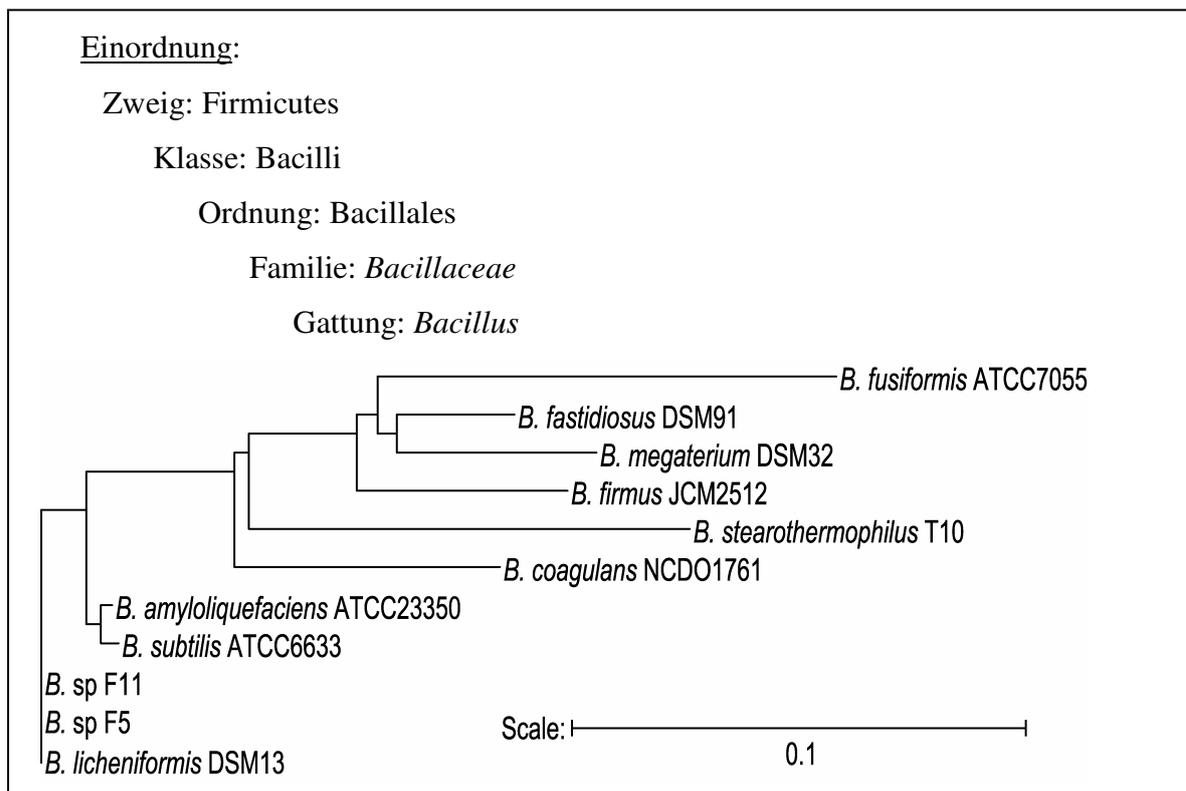


Abbildung 3.10: Einordnung und Phylogenetischer Baum der Isolate F5, F11 und artverwandter Stämme nach der „Neighbour-Joining“ Methode (erstellt mit der Software Phylip 3c).

3.3 Optimierung der Fermentationsbedingungen

3.3.1 Ermittlung der idealen Fermentationstemperatur

Zur Ermittlung einer geeigneten Temperatur zur Deproteinierung der Shrimpabfälle wurden Fermentationsansätze unter mesophilen Bedingungen (42°C) und thermophilen Bedingungen (50°C und 55°C) inkubiert. Der mesophile Ansatz wurde bei 42 °C gewählt, da hier die Gruppe *Enterobacteriaceae*, welche die dominante Flora der Pulabfälle darstellt, unterdrückt wird und somit unter unsterilen Bedingungen gearbeitet werden konnte. Die Fermentation wurde mit einer Starterkultur von *B. amyloliquefaciens* durchgeführt. Die thermophilen Ansätze wurden unter unsterilen Bedingungen mit einer Startermischkultur aus den Isolaten *B. sp* F5 und *B. sp* F11 beimpft. Als Schalensubstrat wurde Shrimpmehl (ISM) welches bei Raumtemperatur gelagert wurde, verwendet. Die Fermentation wurde in einem Zeitraum von 144 h unter Standardbedingungen (2.7.3) durchgeführt.

Die Proteaseaktivität lag bei beiden thermophilen Ansätzen deutlich über der Aktivität des mesophilen Ansatzes. Allgemein zeigten die Kulturüberstände eine recht hohe proteolytische Aktivität, was insbesondere beim Anfangswert mit den unsterilen Reaktionsbedingungen zusammenhängt (Abb. 3.11), wobei die Ausgangsaktivität thermophiler Ansätze deutlich über der des mesophilen Ansatzes lag. Im Verlauf der Fermentation nahm die Proteaseaktivität langsam ab. Aufgrund der hohen proteolytischen Grundaktivität der verwendeten Schalenabfälle konnte in diesem Versuch keine Aussage über die proteolytische Leistung der Stämme getroffen werden. Da die Aktivität jedoch nur schwach abnahm ist davon auszugehen, dass ein Teil der gemessenen Werte auf die von den Starterkulturen gebildeten Proteasen zurückzuführen ist.

Beim Vergleich der Restproteingehalte zeigte sich, dass bei einer Inkubationstemperatur von 55°C nach 48 h mit 5,8 % der niedrigste Proteingehalt erhalten wird und somit die beste Abbauleistung erfolgte (Abb. 3.12).

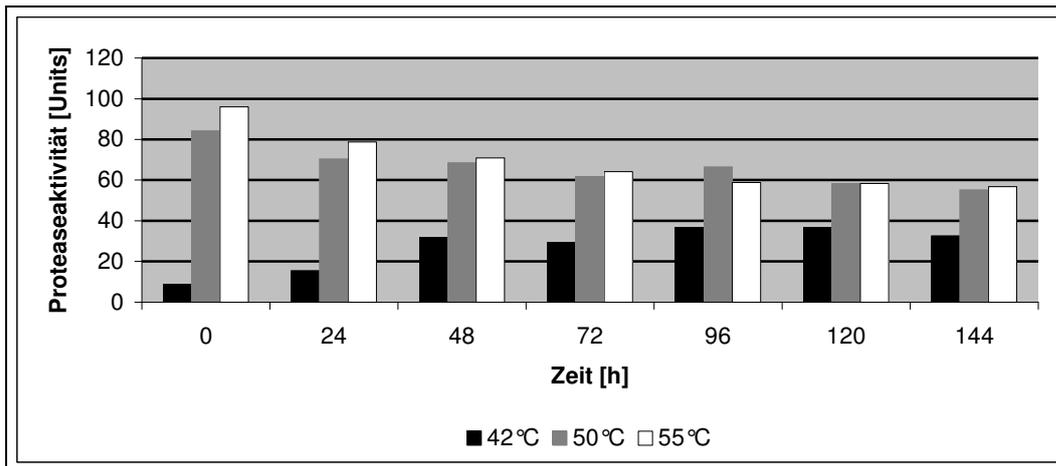


Abbildung 3.11: Proteaseaktivität des Fermentationsüberstands im Verlauf der Fermentation

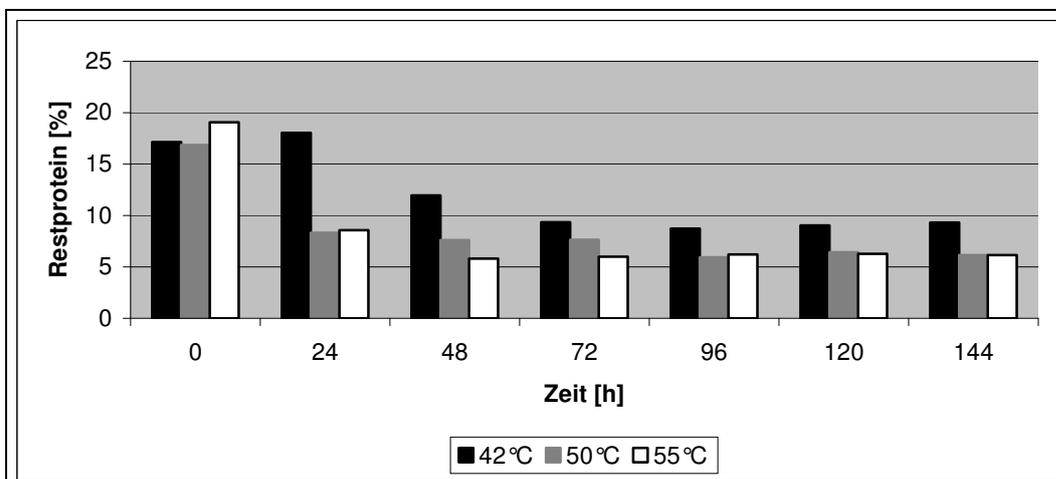


Abbildung 3.12: Restproteingehalt der behandelten Shrimpabfälle im Verlauf der Fermentation

Neben dem hydrolytischen Abbau im Verlauf der Fermentation wurde das Temperatur- und pH-Optimum sowie Einfluss von divalenten Kationen wie Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+} der ins Medium exkretierten Proteasen untersucht.

Wie in Abbildung 3.13 zu sehen, liegt das Temperaturoptimum der von den Stämmen *Bacillus* sp. F5 und F11 gebildeten Proteasen bei 55°C.

Im untersuchten pH-Bereich (pH 5-10) wiesen die gebildeten Proteasen ihre höchste Aktivität im Bereich von pH 6-8 auf. Oberhalb von pH 8 sank die Aktivität der Proteasen kontinuierlich ab (Abb. 3.14).

Im Wesentlichen zeigten Mg^{2+} (250 μ M) mit einer 1,13 fachen Steigerung und Mn^{2+} (500 μ M) mit einer 1,5 fachen Steigerung der proteolytischen Aktivität einen Effekt. Durch die Zugabe von Zn^{2+} wird die Aktivität, sogar um den Faktor 1,14 gehemmt. Ca^{2+}

zeigt nur einen geringen Effekt mit einer 1,05 fachen Steigerung der Aktivität im Vergleich zum Ausgangswert (Abb. 3.15).

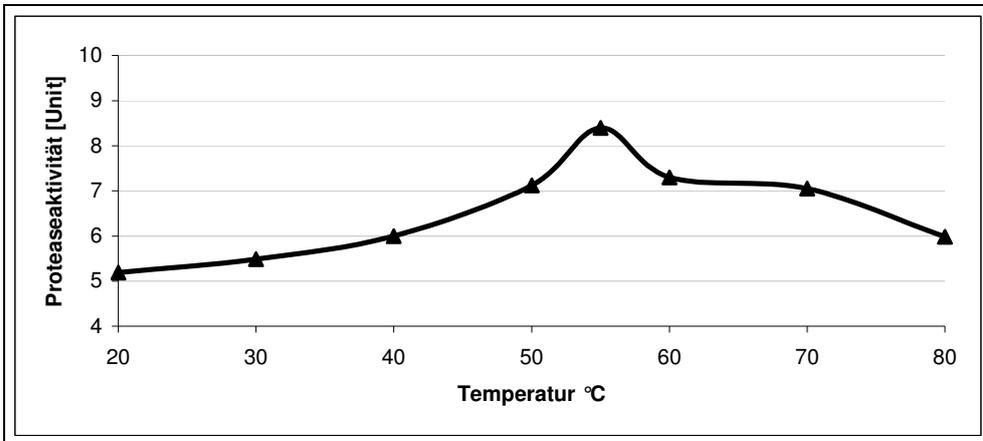


Abbildung 3.13: Temperaturoptimum der Proteasen im Kulturüberstand

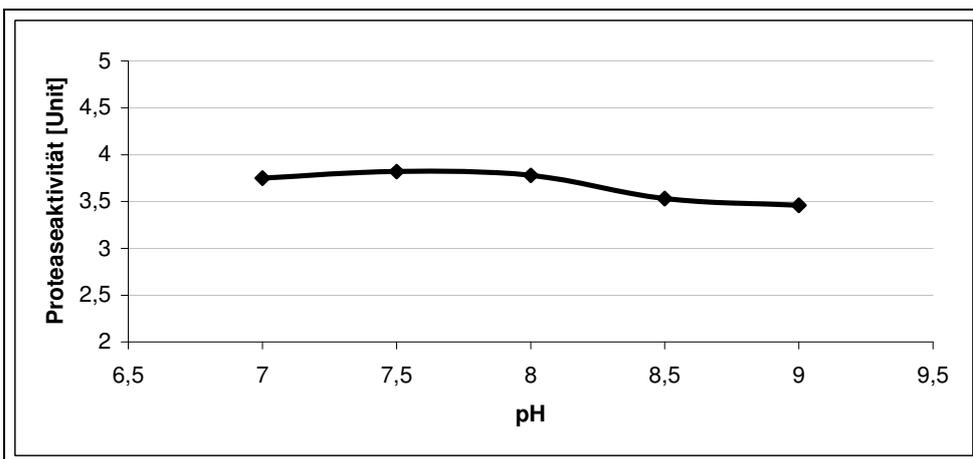


Abbildung 3.14: pH-Optimum der Proteasen im Kulturüberstand

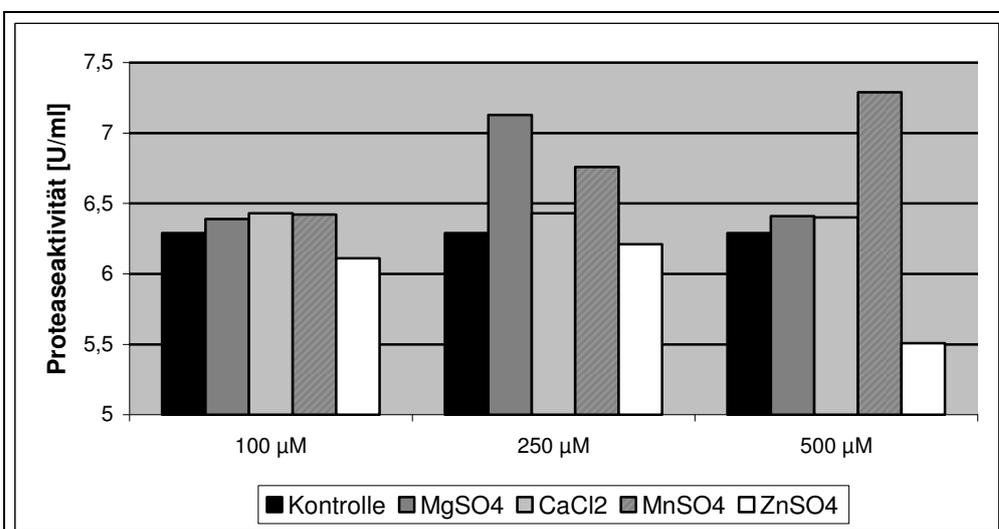


Abbildung 3.15: Einfluss von divalenten Kationen auf die proteolytische Aktivität

3.3.2 Optimierung des Fermentationsmediums

Um ein ausreichendes Wachstum und eine optimale Proteaseproduktion zu erreichen wird ein für die Isolate optimiertes Nährmedium benötigt. Das Schalenmaterial liefert Kohlenstoff- und Stickstoffquelle in Form von Proteinen und Mineralstoffe, wie P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn und Cu (Tab. 3.4). Weitere Nährstoffe, sowie Makro- und Spurenelemente müssen supplementiert werden.

Daher sollte ein Medium entwickelt werden, das zum einen die Proteaseproduktion steigert

und zum anderen einen ausreichenden Abbau des in den Pulabfällen eingelagerten Proteins ermöglicht.

Tabelle 3.4: Chemischer Aufbau von Rückenschild und Schale von *P. monodon* (Benjakul und Sophanodora, 1993)

Zusammensetzung	Rückenschild	Schale
Feuchtigkeit (%)	9,1	9,7
Fettgehalt (%)	0,5	1,2
Rohprotein (%)	26,8	42,8
Chitin (%)	34,9	36,5
Asche (%)	29,3	20,8
Mineralien		
P (%)	0,8	2,1
K (%)	8,2	0,2
Ca (%)	1,7	1,0
Mg (%)	0,8	0,4
Fe (mg/kg)	96,5	110,6
Mn (mg/kg)	15,3	48,6
Zn (mg/kg)	10,0	32,8
Cu (mg/kg)	5,0	14,8

3.3.2.1 Kaliumdihydrogenphosphat

Phosphat stellt ein für das Wachstum wichtiges Makroelement dar. Phosphationen sind an vielen Regelmechanismen von Organismen, sowie am Aufbau wichtiger Zellbausteine, wie Nukleinsäuren und Phospholipiden beteiligt. Kalium wird ebenso von allen Organismen benötigt. Eine Reihe von Enzymen, wie jene, die am Aufbau von Proteinen beteiligt sind, benötigt Kalium für ihre Funktionsweise.

Mit zunehmender Phosphatkonzentration wird eine deutliche Verbesserung des Wachstums erreicht. Ohne die Supplementierung von KH_2PO_4 wird eine Zellzahl von $2,5 \cdot 10^6$ KBE/ml erreicht, durch die Zugabe von mindestens 0,5 % (w/v) KH_2PO_4 kann diese auf eine Zellzahl von $4,5 \cdot 10^8$ KBE/ml gesteigert werden (Abb. 3.16 A).

Die Proteaseproduktion steigert sich erst durch die Beimengung von mindestens 1,0 % (w/v) KH_2PO_4 von 6,1 U/ml auf 11,2 U/ml (Abb. 3.16 B).

Eine deutliche Verbesserung des Proteinabbaus wird lediglich bei einer Zugabe von 0,5 % (w/v) KH_2PO_4 erreicht. Der Restproteingehalt beträgt hier 1,2 % im Vergleich zu 2,2 % ohne den Zusatz von KH_2PO_4 (Abb. 3.16 C). Durch die Zugabe von 1,0 % (w/v)

KH_2PO_4 wird zwar die Proteaseproduktion gesteigert, eine verbesserte Abbauleistung des Schalenproteins wird jedoch nicht erzielt.

Die Konzentration an KH_2PO_4 wird daher bei 0,5 % (w/v) festgesetzt.

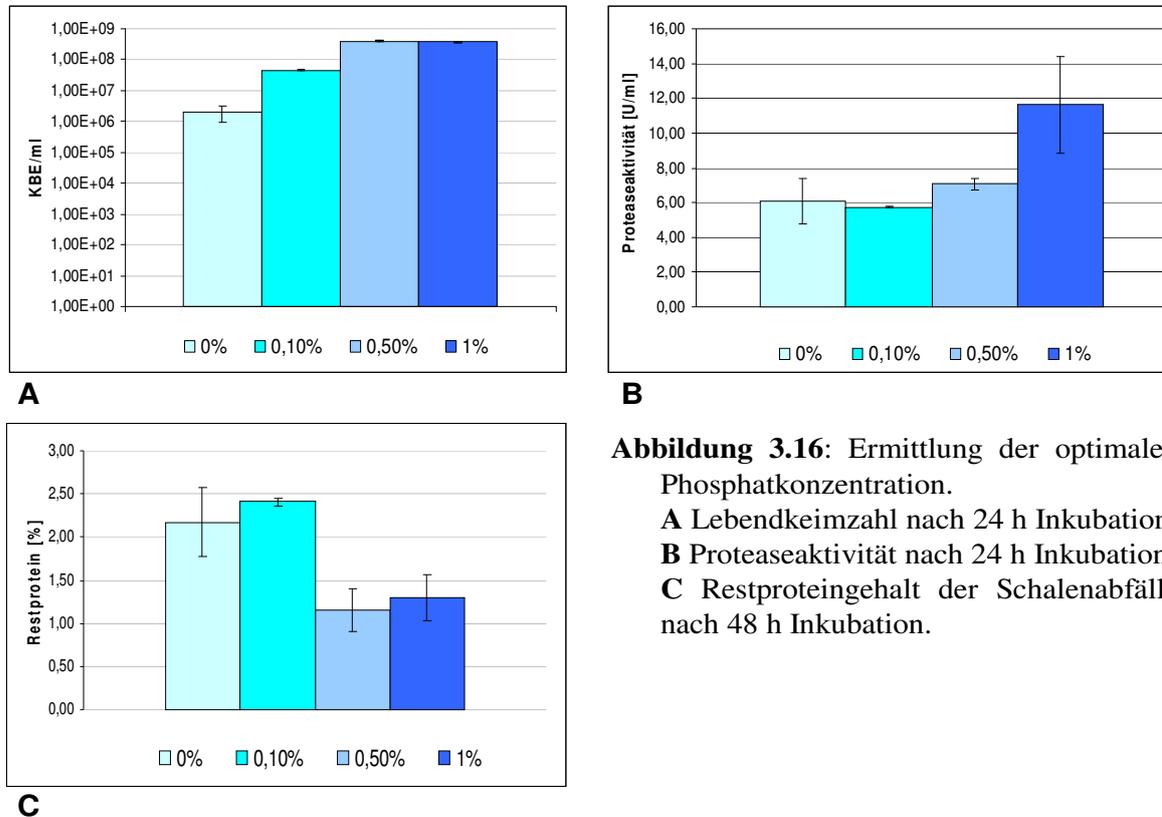


Abbildung 3.16: Ermittlung der optimalen Phosphatkonzentration.

A Lebendkeimzahl nach 24 h Inkubation.

B Proteaseaktivität nach 24 h Inkubation.

C Restproteingehalt der Schalenabfälle nach 48 h Inkubation.

3.3.2.2 Calciumchlorid

Calcium wird zwar nicht als essentieller Wachstumsfaktor benötigt, spielt jedoch eine Rolle bei der Stabilisierung der Zellwand, sowie bei der Stabilität und Aktivität einiger Enzyme.

Das Wachstum konnte durch die Zugabe von Calciumchlorid nur gering von $3 \cdot 10^8$ auf $6,3 \cdot 10^8$ KBE/ml gesteigert werden. Durch die Zugabe von 1 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ist eine Hemmung des Bakterienwachstums zu beobachten und es wird lediglich eine Zellzahl von $7,5 \cdot 10^2$ KBE/ml erreicht (Abb. 3.17 A9).

Die proteolytische Aktivität stieg durch die Zugabe von $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ leicht von 34 U/ml auf 40 U/ml an. Bei Zugabe von 1 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ verringerte sich die Aktivität des Kulturüberstandes auf einen Wert von 10 U/ml (Abb. 3.17 B).

Der Proteinabbau konnte durch die Zugabe von $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ um den Faktor 1,9 von 3,1 % im Kontrollansatz auf 1,6 % im Ansatz 0,1 % gesteigert werden. Durch die Zugabe von 1 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ wurde der Abbau des Rohproteins gehemmt und die Schalen wiesen einen Restproteingehalt von 8 % auf (Abb. 3.17 C).

Für den späteren Fermentationsprozess wurde ein CaCl_2 -Gehalt von 0,1 % (w/v) festgelegt.

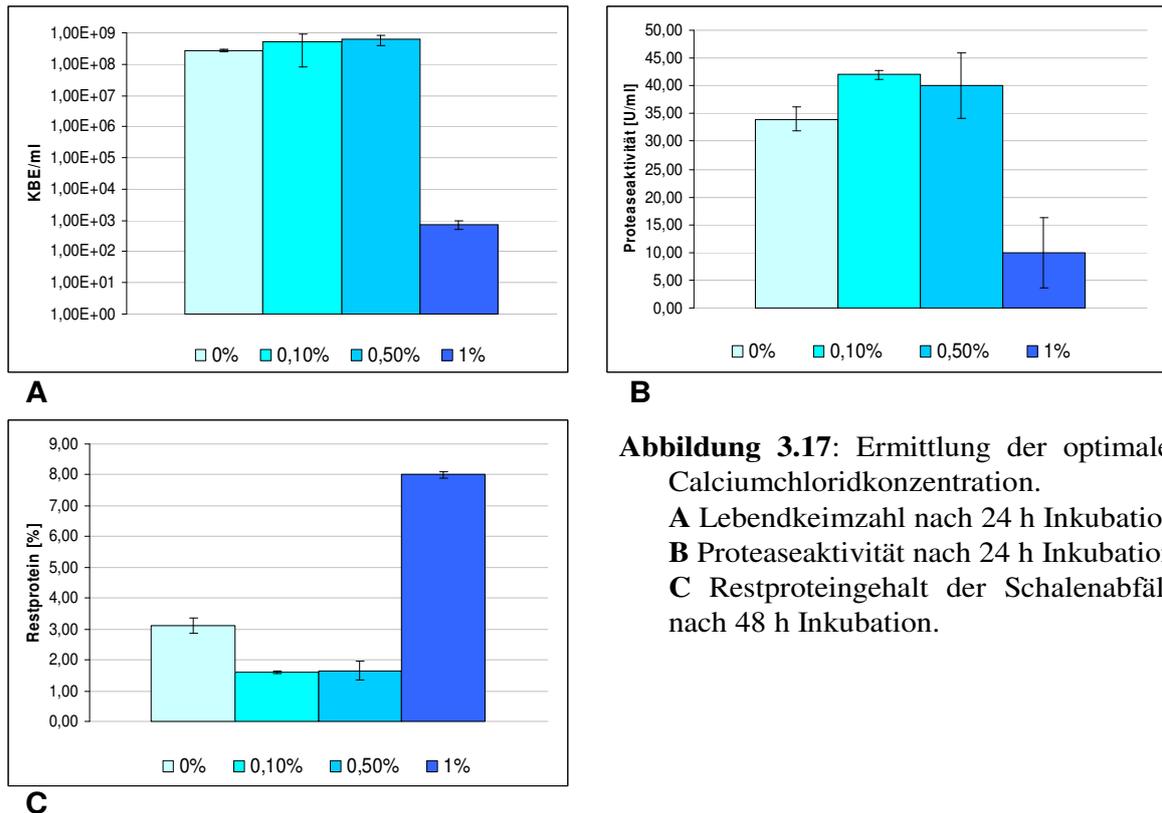


Abbildung 3.17: Ermittlung der optimalen Calciumchloridkonzentration.

A Lebendkeimzahl nach 24 h Inkubation.
B Proteaseaktivität nach 24 h Inkubation.
C Restproteingehalt der Schalenabfälle nach 48 h Inkubation.

3.3.2.3 Natriumchlorid

Natrium wird von einigen Organismen für das Wachstum benötigt, insbesondere bei solchen, die Meerwasser als natürliches Habitat besitzen. Weiterhin kann durch die Zugabe von NaCl die Proteaseproduktion bei *Bacillus* sp. gesteigert werden

Eine deutliche Steigerung des Wachstums konnte durch die Zugabe von NaCl nicht erreicht werden. Die Werte für die Lebendkeimzahl liegen hier zwischen $5,8 \cdot 10^8$ KBE/ml für den Ansatz ohne NaCl und $1,7 \cdot 10^9$ KBE/ml für die Ansätze 0,5 % bzw. 1,0 % NaCl (Abb. 3.18 A).

Die Proteaseproduktion konnte deutlich gesteigert werden. Die Aktivität verbessert sich von 37 U/ml im Kontrollansatz ohne NaCl auf 161 U/ml im Ansatz 1,0 % NaCl (Abb. 3.18 B).

Für eine Verbesserung des Proteinabbaus war eine Supplementierung von 0,1% (w/v) NaCl ausreichend. Der Abbau verbesserte sich von 2,8 % in der Kontrolle auf 1,96 % im Ansatz 0,1 %. Höhere Konzentrationen an NaCl steigerten den Abbau nicht weiter (Abb. 3.18 C).

Für die weiteren Untersuchungen wurde eine mittlere NaCl-Konzentration von 0,5 % (w/v) gewählt.

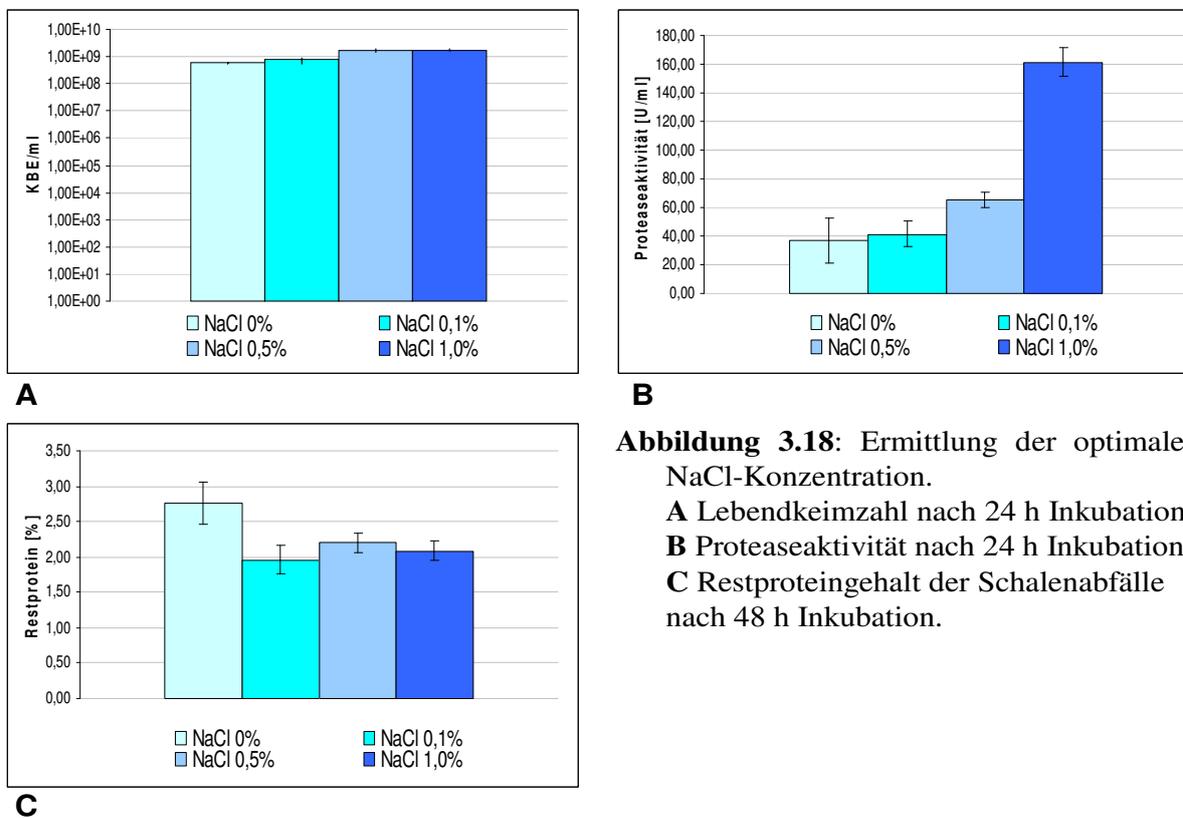


Abbildung 3.18: Ermittlung der optimalen NaCl-Konzentration.

A Lebendkeimzahl nach 24 h Inkubation.

B Proteaseaktivität nach 24 h Inkubation.

C Restproteingehalt der Schalenabfälle nach 48 h Inkubation.

3.3.2.4 Magnesiumsulfat

Schwefel wird von allen Organismen benötigt, da er zum einen für den Aufbau der Aminosäuren Methionin und Cystein unerlässlich ist und zum anderen in einer Reihe von Vitaminen vorhanden ist. Magnesium spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Ribosomen, Zellmembranen und Nukleinsäuren, sowie bei der Aktivität einiger Enzyme.

Durch die Zugabe von MgSO_4 konnte das Wachstum nicht gesteigert werden. Die Werte schwankten zwischen $3 \cdot 10^8$ und $5 \cdot 10^8$ KBE/ml (Abb. 3.19 A).

Die Proteaseaktivität stieg kontinuierlich mit zunehmender MgSO_4 -Konzentration von 23 U/ml im Kontrollansatz auf 215 U/ml im Ansatz 1,0 % MgSO_4 an (Abb. 3.19 B).

Der Proteinabbau wurde lediglich in dem Ansatz 0,1% MgSO_4 mit 1,2 % Restprotein im Vergleich zum Kontrollansatz mit 2,6 % Restprotein verbessert. Eine höhere MgSO_4 -Konzentration führt zu einer Verschlechterung des Abbaus. In den Ansätzen mit 0,5% bzw. 1,0 % MgSO_4 war ein Restproteingehalt von 3,9 % bzw. 4,0 % zu verzeichnen (Abb. 3.19 C).

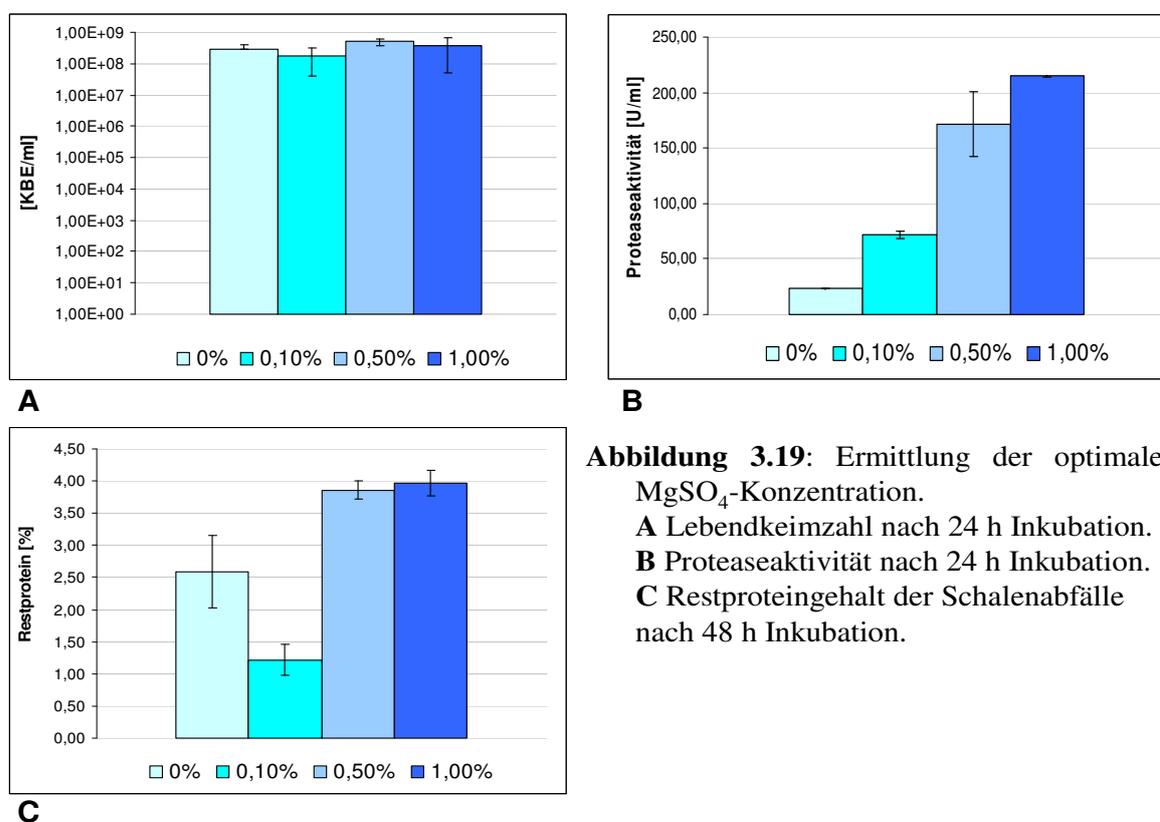


Abbildung 3.19: Ermittlung der optimalen MgSO_4 -Konzentration.
A Lebendkeimzahl nach 24 h Inkubation.
B Proteaseaktivität nach 24 h Inkubation.
C Restproteingehalt der Schalenabfälle nach 48 h Inkubation.

Bei der Fermentation mit MgSO_4 supplementiertem Medium war noch ein weiteres Phänomen zu beobachten. Mit zunehmender Konzentration an MgSO_4 kam es zunehmend zu einer Braunfärbung des Schalenabfalls. In Abbildung 3.20 ist Calcium-Chitin nach der Fermentation mit MgSO_4 supplementiertem Medium dargestellt. Mit zunehmender Konzentration ist eine schwache bräunliche Verfärbung des ansonsten rosa schimmernden Chitins der Shrimpschalen zu erkennen.

Da sich sowohl die Abbauleistung bei Konzentrationen über 0,1 % (w/v) gegenüber

MgSO_4 freiem Medium verschlechterte, als auch eine Verminderung der Qualität des Produktes zur beobachten war, wurde für das Fermentationsmedium eine Konzentration von 0,1 % (w/v) MgSO_4 festgesetzt.

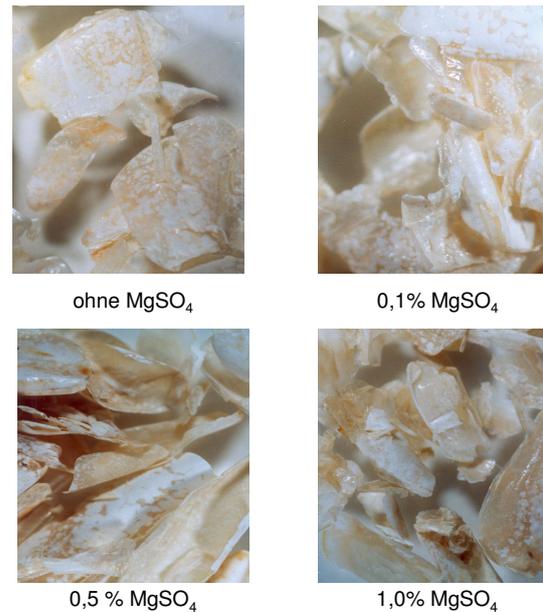


Abbildung 3.20: Calcium-Chitin (8fach vergrößert) nach Fermentation mit MgSO_4 supplementiertem Medium.

3.3.2.5 Komplexe Substrate

Da das in Schalenabfällen zur Verfügung stehende Protein zunächst hydrolysiert werden muss, um als C- und N-Quelle genutzt werden zu können, wurden den Ansätzen Substrate zugefügt, die leichter zugängliche C- und N-Quellen besitzen, um Wachstum und die Expression proteolytischer Enzyme in der Anfangsphase der Fermentation zu fördern. Es wurden Substrate ausgewählt, die in Indonesien preiswert zur Verfügung stehen. Diese sind Melasse, Cassavamehl und Hefeextrakt, die weiterhin noch wichtige Mineralstoffe und Vitamine liefern.

Das Wachstum konnte durch die Zugabe von Cassavamehl und Melasse leicht von $4,5 \cdot 10^8$ KBE/ml auf $1 \cdot 10^9$ KBE/ml gesteigert werden. Hefeextrakt zeigte gegenüber der Kontrolle keine Verbesserung (Abb. 3.21 A)

Die Proteaseproduktion konnte durch die Zugabe der Substrate deutlich gesteigert werden. Im Kontrollansatz lag die Aktivität bei 12 U/ml, durch die Zugabe von Hefeextrakt konnte die Aktivität auf 40 U/ml, durch Melasse auf 84 U/ml und durch Cassavamehl bis auf 130 U/ml gesteigert werden (Abb. 3.21 B).

Der Proteinabbau konnte bei allen Ansätzen im Vergleich zum Kontrollansatz mit einem Restproteingehalt von 4,1 % gesteigert werden. Der beste Abbau wurde durch die Zugabe von Cassavamehl mit einem Restproteingehalt von 1 % erzielt. Der Ansatz mit Hefeextrakt enthielt noch 1,4 % und der mit Melasse 2,1 % Restprotein (Abb. 3.21 C).

Die Zugabe von Cassavamehl stellt insofern ein Problem dar, als dass sich das eingesetzte Mehl nicht vollständig im Medium löst. Reste bleiben nach Beendigung der Fermentation auf dem Schalenmaterial haften. Beim Vergleich des Gesamtstickstoffgehalts der Proben nach zusätzlicher Demineralisierung mit 0,9 %iger Milchsäure liegt der Stickstoffgehalt der mit Cassavamehl im Fermentationsmedium behandelten Schalen mit 4% deutlich unter dem des reinen Chitins von 6,9 %. Dieses weist auf große Verunreinigungen mit Mineralstoffen oder Stärke hin (Abb. 3.22).

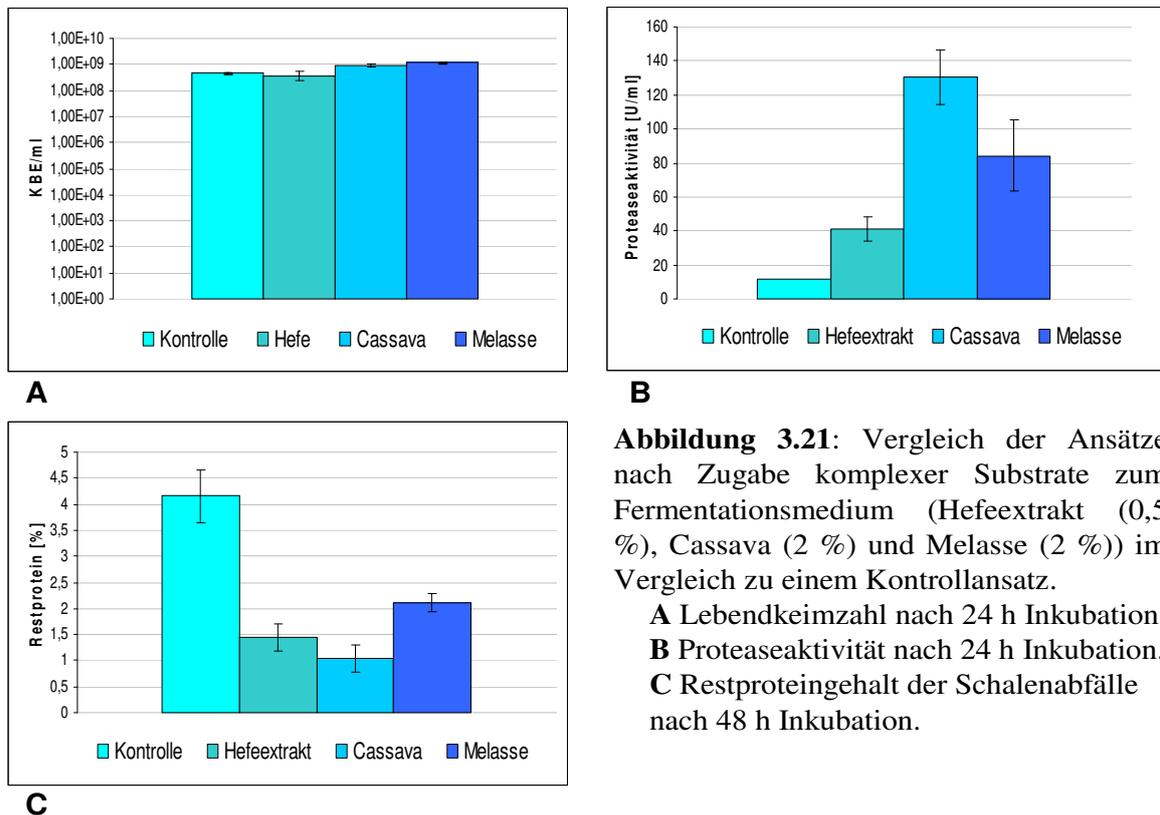


Abbildung 3.21: Vergleich der Ansätze nach Zugabe komplexer Substrate zum Fermentationsmedium (Hefeextrakt (0,5 %), Cassava (2 %) und Melasse (2 %)) im Vergleich zu einem Kontrollansatz.

A Lebendkeimzahl nach 24 h Inkubation.

B Proteaseaktivität nach 24 h Inkubation.

C Restproteingehalt der Schalenabfälle nach 48 h Inkubation.

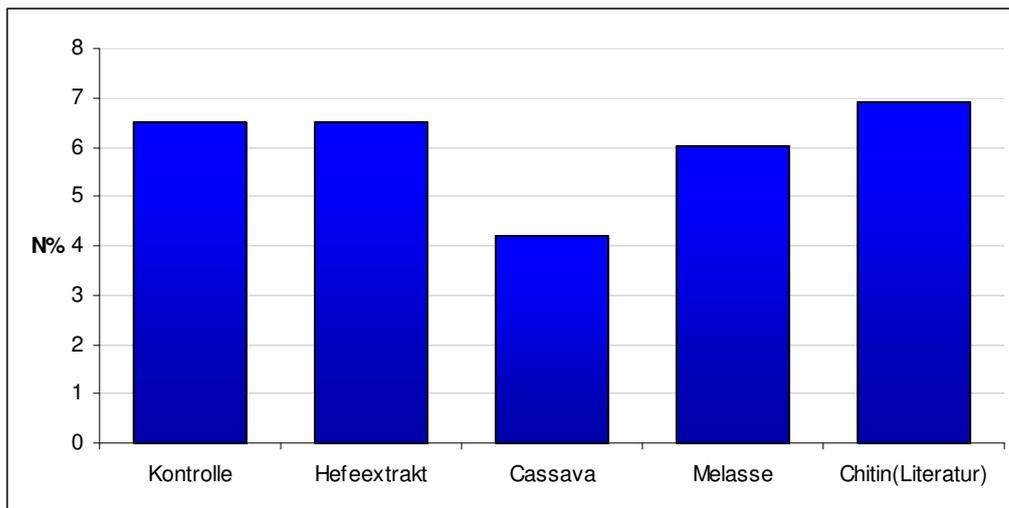


Abbildung 3.22: Gesamtstickstoffgehalt demineralisierter und deproteinierter Garnelenabfälle in unterschiedlichen Fermentationsansätzen im Vergleich zum Literaturwert (No und Meyers, 1987)

Da Cassavamehl zu großen Verunreinigungen des Schalenmaterials führt wurde Hefeextrakt als Substrat ausgewählt.

Die Zusammensetzung des optimierten Fermentationsmediums sieht demnach folgendermaßen aus: KH_2PO_4 0,5% (w/v); $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 % (w/v); NaCl 0,5 % (w/v); $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1% (w/v); Hefeextrakt 0,5 % (w/v)

3.4 Fermentation der Schalenabfälle

Die im Schüttelkolben gewonnenen Daten sollten zunächst auf einen Kleinfermenter mit einem Liter Füllvolumen übertragen werden. Das für die Untersuchungen zur Verfügung stehende Schalenmaterial stammte aus unterschiedlichen Quellen und wurde in unterschiedlicher Form angeliefert. Die Qualität des Materials war aufgrund dessen sehr inhomogen und führte zu abweichenden Qualitäten des Endproduktes. Ein Vergleich der Schalen und der daraus resultierenden Ergebnisse wird im Folgenden dargestellt.

3.4.1 Vergleich von Schalen nach unterschiedlicher Vorbehandlung

Für die Entwicklung des Prozesses standen Krabbenschalen unterschiedlicher Herkunft und Aufarbeitungsform zur Verfügung. Es wurden drei unterschiedliche Aufarbeitungsformen miteinander verglichen. Zum einen Shrimpmehl (ISM), frische unbehandelte Schalen (IF1), welche nach Anlieferung im Labor aufgearbeitet wurden (2.7.1) und bereits aufgearbeitete und getrocknete Pulabfälle aus Büsum (BT). Nach der Aufarbeitung wurden Protein-, Asche- und Chitingehalt des vorbehandelten Schalenmaterials ermittelt (Tab. 3.5)

Der Proteingehalt der Charge IF1(A) liegt mit 11 % unter dem der Büsumer Schalen mit 18 % und deutlich unter dem des Shrimpmehls mit 44 %. Weiterhin liegt der Chitingehalt der frischen indonesischen Schalen mit 32 % über dem der anderen Schalenabfälle.

Die Fermentationen wurden für 48 h im optimierten Medium (siehe 3.2) durchgeführt. Die Probennahme erfolgte zweimal täglich und die Lebendkeimzahl, die Proteaseaktivität des Kulturüberstandes und der Restproteingehalt der Schalen wurden bestimmt. Der pH-Wert wurde während der gesamten Fermentation „on-line“ dokumentiert (Abb. 3.23).

Das beste Wachstum war im Ansatz IF1(A) verzeichnen. Die Kultur hatte nach 8 h die stationäre Phase mit einer Zellzahl von $2 \cdot 10^9$ KBE/ml erreicht. Zwischen 24 und 32 h ging Zellzahl auf $3 \cdot 10^7$ KBE/ml zurück. Shrimpmehl wies einen ähnlichen Wachstumsverlauf mit einer Zellzahl von $4 \cdot 10^7$ KBE/ml nach 24 h Inkubationsdauer auf. Die Zellzahl im Ansatz BT verringerte sich innerhalb der ersten 8 h deutlich von $5 \cdot 10^7$ auf $2 \cdot 10^4$ KBE/ml. Im weiteren Fermentationsverlauf stabilisierte sich das Wachstum und eine Zellzahl von $1,4 \cdot 10^9$ KBE/ml wurde erreicht (Abb. 3.23 A). Nach 24 h Fermentationsdauer konnten in diesem Ansatz keine Kolonien der Starterkultur mehr detektiert werden.

Die Proteaseaktivität erreichte im Ansatz IF1(A) den Höchstwert mit 60 U/ml nach 32 h Inkubation. Nach 48 h fiel die Aktivität auf 7 U/ml ab. In den Shrimpmehl-Ansätzen war ein kontinuierlicher Anstieg der Aktivität von 9 auf 32 U/ml nach 48 h Fermentationszeit zu verzeichnen. Die proteolytische Aktivität in den Ansätzen mit Büsumer Schalenabfällen lag im Vergleich sehr niedrig und erreichte nach 32 h mit 1,4 U/ml ihren Höchstwert (Abb. 3.23 B).

Der pH-Wert stieg in allen Ansätzen kontinuierlich an, wobei Phasen mit gleich bleibendem oder absinkendem pH-Wert zu beobachten waren. Der deutlichste pH-Anstieg war im Ansatz BT zu beobachten. Hier wurde ein Höchstwert von pH 8,9 erreicht. Im

Ansatz IF1(A) lag der Höchstwert bei pH 8,2 und im Ansatz ISM wurde pH-Wert von 8,15 erreicht (Abb. 3.23 C).

Der Proteingehalt nahm in allen Ansätzen ab. Im Shrimpmehl-Ansatz wurde das Rohprotein um 87,5 % reduziert, im Ansatz IF1(A) wurde eine Reduktion des Proteins um 93 % erreicht und im Ansatz BT wurden 84 % des Proteins abgebaut. Bemerkenswert ist weiterhin, dass sich in den Shrimpmehlsansätzen ca. 50 % des Proteins bereits vor Inokulation im Medium gelöst hatten (Abb. 3.23 D).

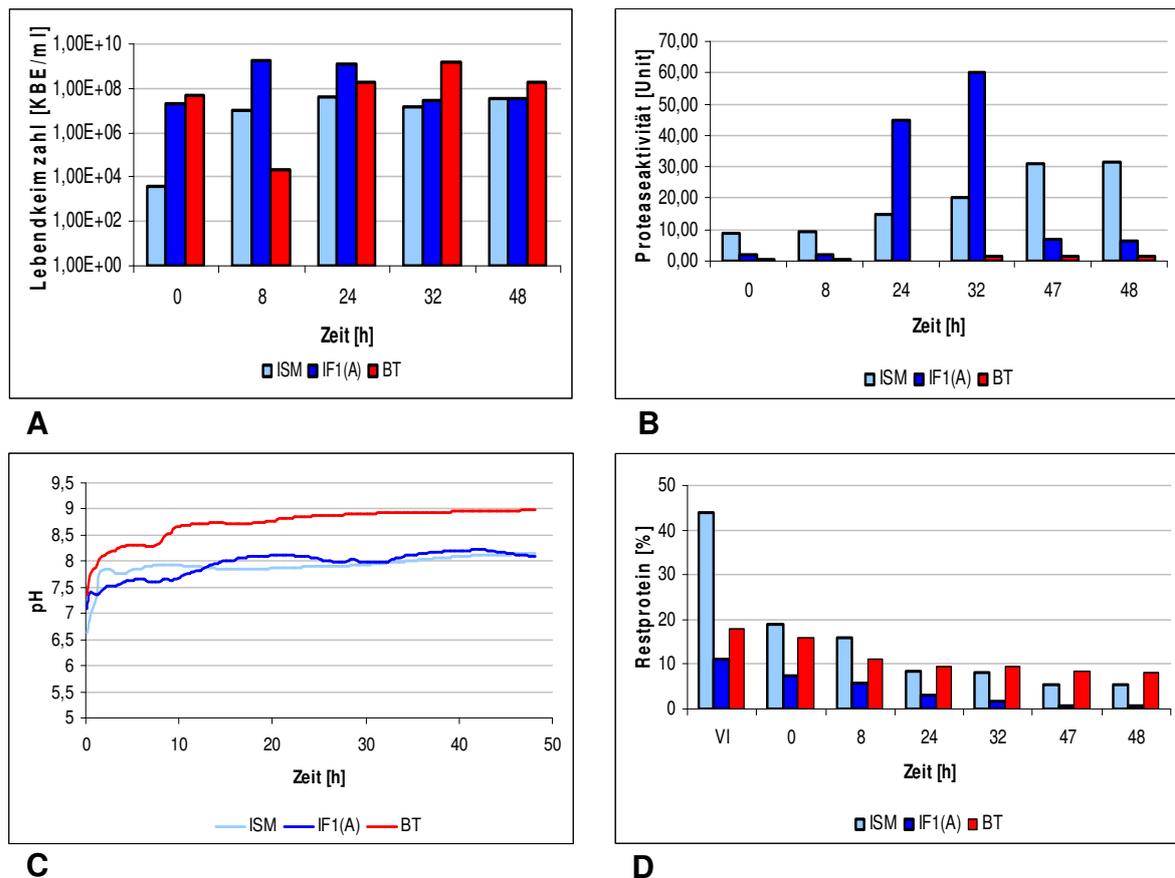


Abbildung 3.23: Verschiedene Fermentationsparameter bei der Aufarbeitung von Shrimpmehl, frischen Schalen und getrockneten Schalen. **A** Lebendkeimzahl der Fermentationsansätze **B** Verlauf der Proteaseaktivität im Fermentationsüberstand. **C** Verlauf des pH-Wertes **D** Verlauf des Restproteingehaltes der Schalenabfälle mit fortlaufender Fermentationsdauer (VI = Vor Inokulation).

In Tabelle 3.5 ist die Zusammensetzung der Schalen vor der Fermentation (A), des Calcium-Chitins nach der Fermentation (DP) und des demineralisierten Chitins (DM) dargestellt. Das reinste Endprodukt wurde im Ansatz IF1(A) mit 2,1 % Protein, 87 % Chitin und 1,2 % Asche erhalten. Den schlechtesten Reinheitsgrad wies der Ansatz ISM mit 10 % Protein, 72 % Chitin und 1,9 % Asche auf, obwohl die Deproteinierungsleistung von 87,5 % über der des Ansatzes BT mit 84 % lag. Da der Ansatz ISM einen vergleichsweise hohen Ausgangsproteinengehalt besaß, war im Endprodukt des Ansatzes BT trotz geringerer Deproteinierungsleistung eine höhere Reinheit mit 6,3 % Protein, 81 % Chitin und 0,6 % Asche zu verzeichnen.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung unterschiedlicher Schalenabfälle bezogen auf das Trockengewicht (A = Ausgangsmaterial; DP = Deproteinisierte Schalenabfälle; DM = Demineralisierte Schalenabfälle).

	ISM			IF1(A)			BT		
	A	DP	DM	A	DP	DM	A	DP	DM
Protein (%)	44	5,5	10	11	0,8	2,1	18	3	6,3
Chitin (%)	16	47	72	32	38	87	28	36	81
Asche (%)	23	32	1,9	42	52	1,2	35	43	0,6

3.4.2 Vergleich der Fermentationen in Abhängigkeit vom pH-Wert

Durch den Lagerungsprozess kommt es zu einem zunehmenden Verderb der Schalenabfälle. Dieser hat eine zunehmende Bildung von Aminen zur Folge, die schon zu Beginn des Prozesses zu einem starken Anstieg des pH-Werts im Fermentationsmedium führen (Abb. 3.24 C). Unter diesen Bedingungen ist zum einen das Wachstum der Kultur eingeschränkt und zum anderen wird der optimale pH-Bereich für die in das Medium exkretierten Proteasen (3.3.1) verlassen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Fermentationen unter Kontrolle des pH-Wertes durchgeführt. Als Schalensubstrat wurden BT-Schalen, die drei Monate bei -20 °C lagerten, eingesetzt. Es wurde zum einen ein Vergleich zwischen einer pH-Kontrolle bei pH 7,5 und pH 8,0, sowie ein Vergleich zweier Titranten (H_2SO_4 und H_3PO_4) durchgeführt. Um einen Eindruck des Gehalts an Aminen zu gewinnen wurde der Ammoniumgehalt im Fermentationsüberstand gemessen. Weiterhin wurden Lebendkeimzahl, Proteaseaktivität, pH-Wert und Restproteinengehalt dokumentiert (Abb. 3.24).

Die Lebendkeimzahl blieb nur im Ansatz pH 8,0 (H_3PO_4) über den gesamten Fermentationszeitraum von 48 h stabil bei $1 \cdot 10^9$ KBE/ml mit einem leichten Abfall nach 32 h Inkubation auf $4 \cdot 10^8$ KBE/ml. In den übrigen Ansätzen war bereits nach 24 h Inkubation ein deutlicher Rückgang der Zellzahl auf 10^6 KBE/ml zu verzeichnen (Abb. 3.24 A). Weiterhin ist zu bemerken, dass in diesen Ansätzen nur noch wenige Kolonien der Starterkultur auszumachen waren und im mikroskopischen Bild eine starke Sporenbildung zu beobachten war.

Die proteolytische Aktivität schwankte bei allen Fermentationsansätzen, wobei der Ansatz pH 7,5 (H_2SO_4) auf den Gesamtzeitraum betrachtet die höchste Aktivität mit Werten bis zu 13 U/ml erreichte. Der Ansatz pH 8,0 (H_3PO_4) wies über den gesamten Fermentationszeitraum eine kontinuierliche proteolytische Aktivität um die 8 U/ml auf. Die Aktivität der Ansätze ohne pH-Kontrolle bzw. pH 7,5 (H_3PO_4) lag im gesamten Fermentationsverlauf bei Werten unter 5 U/ml, gegen Ende der Fermentation stieg die Aktivität auf 8 bzw. 17,5 U/ml an (Abb. 3.24 B).

Der Ammoniumgehalt des Kontrollansatzes blieb während der gesamten Fermentation konstant bei Werten um 50 mg/l, es war jedoch ein deutlicher Ammoniakgeruch der Abluft nach 24 h Inkubationszeit wahrzunehmen. In den drei pH-kontrollierten Ansätzen stieg der Ammoniumgehalt im Laufe der Fermentation an. Der schnellste Anstieg von 60 auf 290 mg/l war im Ansatz pH 8,0 (H_3PO_4) zu beobachten. Der Ansatz pH 7,5 (H_2SO_4) erreichte nach 28 h eine Ammoniumkonzentration von 500 mg/l und der Ansatz pH 7,5 (H_3PO_4) erreichte nach 48 h eine Ammoniumkonzentration von 400 mg/l. Im Ansatz pH 8,0 (H_3PO_4) war eine langsame Abnahme des Ammoniumgehalts im Laufe der Fermentation auf 160 mg/l zu beobachten. Parallel fiel der pH-Wert des Kulturüberstandes gegen Ende der Fermentation auf pH 7,7 ab (Abb. 3.24 D/C).

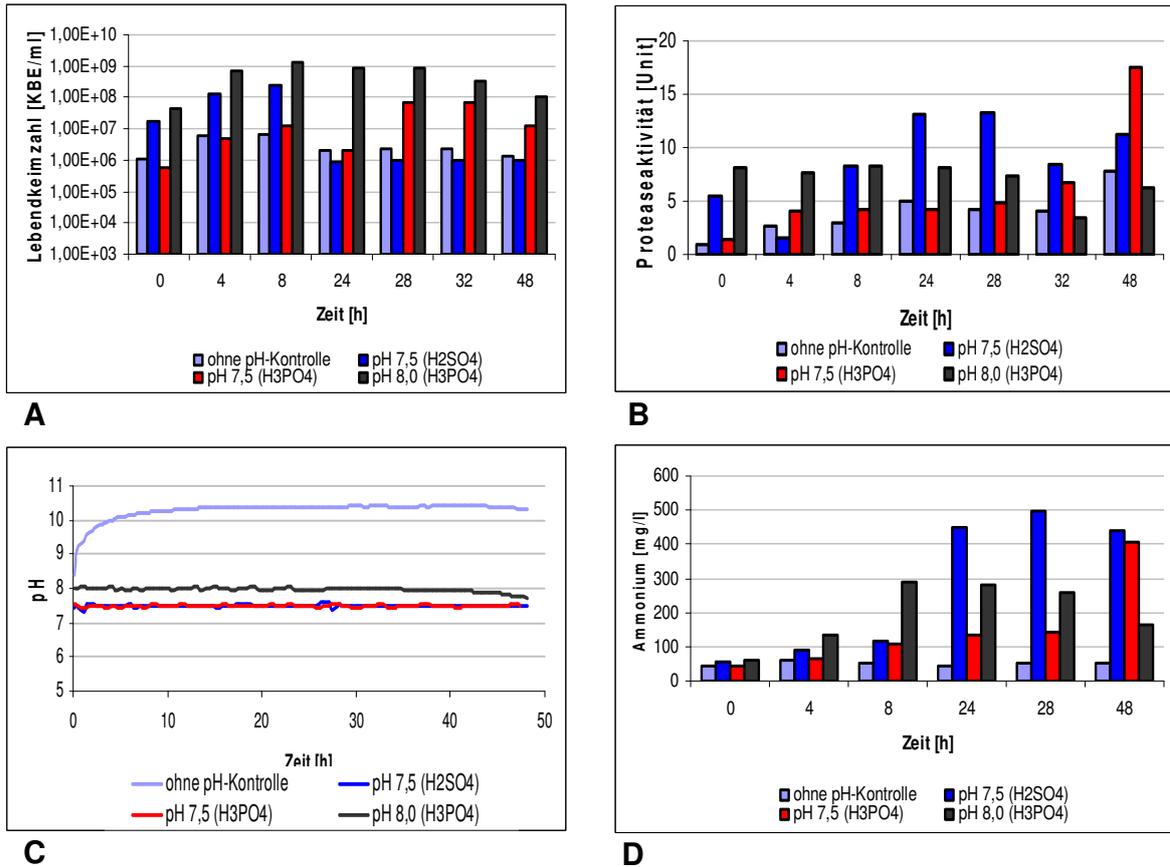


Abbildung 3.24: Verschiedene Fermentationsparameter bei unterschiedlichen pH-Profilen. **A** Lebendkeimzahl der Fermentationsansätze **B** Verlauf der Proteaseaktivität im Fermentationsüberstand. **C** Verlauf des pH-Wertes **D** Verlauf der Konzentration an NH_4^+ -Ionen im Fermentationsüberstand mit fortlaufender Fermentationsdauer.

In Tabelle 3.6 ist die Schalenzusammensetzung der einzelnen Schalenabfallprodukte (Aufgearbeitet, Calcium-Chitin (DP) und Chitin (DM)) dargestellt. Die geringste Deproteinierungsleistung nach 48 h wurde im Kontrollansatz mit 8,3 % (DP) bzw. 14,6 % (DM) Restprotein bezogen auf die Trockenmasse erreicht. Die höchste Deproteinierungsleistung war im Ansatz pH 8,0 (H₃PO₄) mit 3,1 % (DP) bzw. 8,2 % (DM) zu verzeichnen.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Schalenabfalls (BT) vor und nach 48 h Fermentation (DP), sowie nach der Demineralisierung (DM).

	Schalen (BT)	Ohne pH-Kontrolle		pH 7,5 (H ₂ SO ₄)		pH 7,5 (H ₃ PO ₄)		pH 8,0 (H ₃ PO ₄)	
		DP	DM	DP	DM	DP	DM	DP	DM
Protein (%)	18	8,3	14,6	4,4	9	6,05	14	3,1	8,2
Chitin (%)	28	35	70	38	81	30	69	26	82
Asche (%)	35	44	3	48	0,3	56	3,5	63	1,3



Abbildung 3.23: Bräunlich gefärbtes Calcium-Chitin nach Fermentation mit H₂SO₄ als titrierender Säure

Weiterhin konnte im Ansatz pH 7,5 (H₂SO₄) noch eine Abweichung zu den anderen Ansätzen beobachtet werden.

Wie in Abbildung 3.25 deutlich zu erkennen ist hat sich das Fermentationsprodukt, wie auch schon in den Schüttelkulturen mit zugesetztem MgSO₄ zu beobachten, bräunlich verfärbt. Neben dieser bräunlichen Verfärbung wurde eine lila Pigmentierung des Fermentationsmediums beobachtet, welche auf freigesetzt Carotinoide zurückzuführen ist.

3.4.3 Vergleich frischer Schalenabfälle unterschiedlicher Chargen

Wie in 3.4.1 bereits beschrieben hat die Aufarbeitung der Schalen einen wichtigen Einfluss auf den Proteingehalt des Endproduktes. Da sich frische Schalen als das für einen Aufarbeitungsprozess geeignetste Substrat herausstellten, wurden unterschiedliche Chargen frischer Schalen aus der indonesischen Shrimpverarbeitung unter verschiedenen Fermentationsbedingungen miteinander verglichen. Zur Gegenüberstellung wurden frische gekühlte Schalen direkt nach dem Zermahlen (IF1) eingesetzt. Dann wurden aufgearbeitete Schalenabfälle, zum einen aus einer frischen Charge (IF1(A)), zum anderen aus einer bereits leicht verdorbenen Charge (IF2(A)), miteinander verglichen. Um den Einfluss von Hefeextrakt auf die hydrolytische Leistung zu zeigen wurde ein Ansatz ohne den Zusatz des Substrats fermentiert (IF1(A)-Hefe). Um zu zeigen, dass durch eine pH-Kontrolle eine

Verbesserung der Hydrolyse in bereits verdorbenen Ansätzen eintritt, wurde ein Ansatz mit pH-Kontrolle fermentiert (IF2(A)pH8).

Die Zusammensetzung der eingesetzten Schalenabfälle ist in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung indonesischer Schalenabfälle unterschiedlicher Chargen vor (IF1) und nach der Aufarbeitung (IF1(A) und IF2(A))

	IF1/IF2	IF1(A)	IF2(A)
Protein (%)	32	11	7
Chitin (%)	22	32	40
Asche (%)	31,5	42	41

Durch die Aufarbeitung der Schalen wurde der Proteingehalt von 32 % auf 11 % bzw. 7 % deutlich gesenkt. Schalen, die bereits dem Verderb ausgesetzt waren ließen sich besser von Proteinresten befreien als Schalen, die direkt frisch aufgearbeitet wurden.

Fermentationen wurden für 48 h unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Probenahmen erfolgten tagsüber im 2 h Rhythmus. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 3.26 nur die Werte für 0, 12, 24, 36 und 48 h dargestellt.

Im Ansatz mit unbehandelten Schalenabfällen zeigte sich das beste Wachstum mit $5 \cdot 10^9$ KBE/ml über den Fermentationszeitraum. In allen anderen Ansätzen nahm die Zellzahl nach 24 h langsam, bis auf Werte unter 10^7 KBE/ml, ab (Abb. 3.26 A).

Die beste Proteaseproduktion mit einem Höchstwert von 60 U/ml wurde im Ansatz IF1(A) erreicht. Die übrigen Ansätze zeigten eine vergleichsweise geringe Proteaseproduktion. Der Ansatz IF2(A) pH 8 wies hier mit einem Maximum von 12 U/ml nach 36 h Inkubationszeit die beste proteolytische Leistung auf (Abb. 3.26 B). Der Ansatz IF2(A) blieb in seiner proteolytischen Aktivität mit Werten um 1 U/ml deutlich hinter den anderen Ansätzen zurück.

Im pH-Verlauf zeigten sich deutliche Unterschiede. Im Ansatz IF2(A) kam es zu einem starken Anstieg des pH-Wertes auf Werte bis zu pH 9,7. Weiterhin hatte die Zugabe von Hefeextrakt einen deutlichen Einfluss auf den pH-Wert. Es konnten deutliche Schwankungen des pH-Wertes im Verlauf der Fermentation beobachtet werden, wobei zum Ende der Fermentation ein Anstieg auf einen Höchstwert von pH 8,7 zu verzeichnen war. Dieser lag deutlich über dem der Ansätze ohne Hefeextrakt mit Werten bis zu pH 7,7 (Abb. 3.26 C).

Eine Aufarbeitung der Schalen führte zu einer deutlichen Senkung des Restproteingehalts von 6,7 % auf 3 % nach 48 h Inkubation. Einen weiteren Effekt zeigte die Zugabe von

Hefeextrakt, was zu einer Senkung auf 0,8 % führte. Hier ist zu bemerken, dass nur ein geringer Unterschied im Restproteingehalt von den Ansätzen IF1(A) mit 0,8 % und IF2(A) mit 1 % bestand. Durch eine pH-Kontrolle während der Fermentation konnte der Restproteingehalt auf 0,01 % nach 48 h Fermentationsdauer gesenkt werden (Abb. 3.26 D).

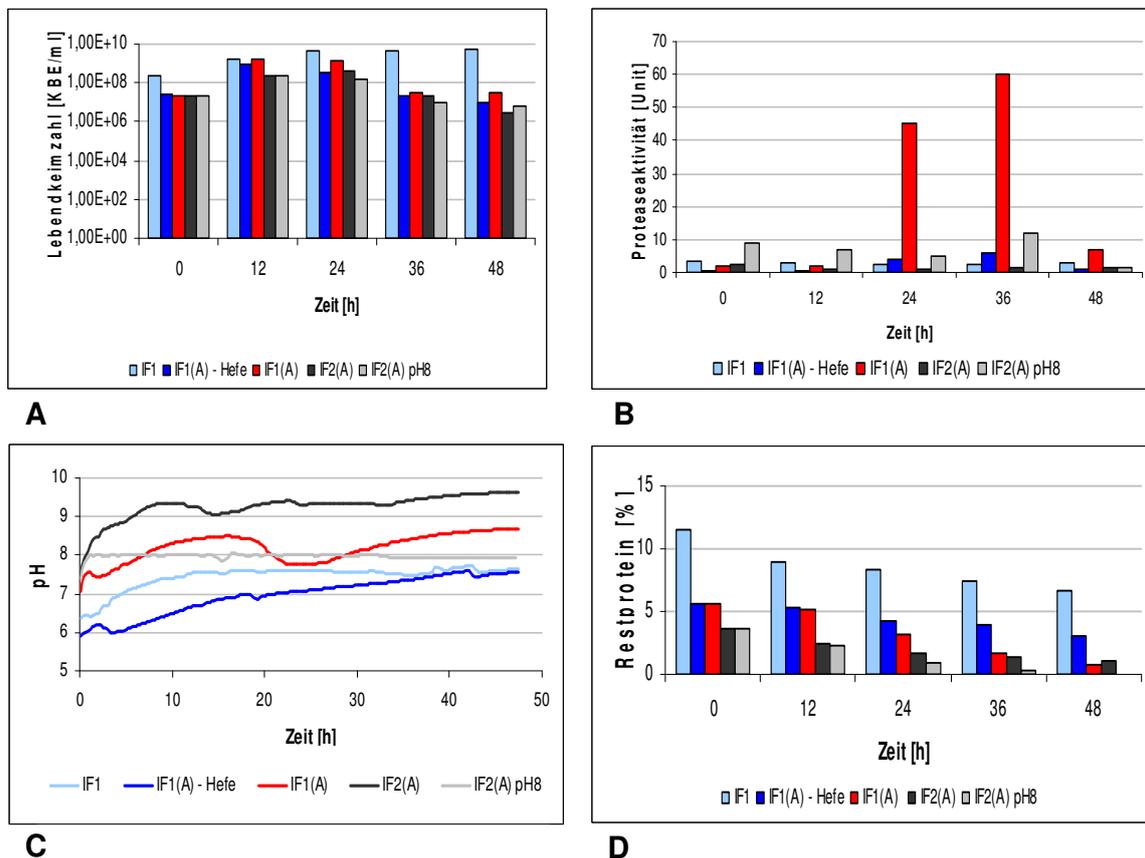


Abbildung 3.26: Verschiedene Fermentationsparameter bei unterschiedlichen Aufarbeitungsformen und Schalenqualitäten. **A** Lebendkeimzahl der Fermentationsansätze **B** Verlauf der Proteaseaktivität im Fermentationsüberstand. **C** Verlauf des pH-Wertes **D** Restproteingehalt der Schalenabfälle mit fortschreitender Fermentationsdauer.

In Tabelle 3.8 ist die Schalenzusammensetzung der einzelnen Schalenabfallprodukte (Calcium-Chitin (DP) und Chitin (DM)) dargestellt. Die geringste Deproteinierungsleistung wurde im Kontrollansatz IF1 mit 79 % Abbau und die höchste Deproteinierungsleistung wurde im Ansatz IF2(A) pH 8,0 mit 98,8 % erreicht. Dieser Ansatz wies weiterhin mit 92 % den höchsten Chitinanteil und den geringsten Aschegehalt (0,2 %) bezogen auf die Trockenmasse auf.

Tabelle 3.8 Zusammensetzung des Schalenabfalls nach der Fermentation (DP), sowie nach der Demineralisierung (DM) bezogen auf das Trockengewicht.

	IF1		IF1(A) -Hefe		IF1(A)		IF2(A)		IF2(A) pH8	
	DP	DM	DP	DM	DP	DM	DP	DM	DP	DM
Protein (%)	6,7	10	3	6,3	0,8	2,1	1	2,4	0,01	1,5
Chitin (%)	29	75	32	81	38	87	36	83	41	92
Asche (%)	44	3,2	48	2,9	52	1,2	50	0,6	58	0,2

Eine Möglichkeit eine schnelle Aussage über die Qualität des Chitinendproduktes zu gewinnen ist die Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts. Der Gesamtstickstoffgehalt von reinem Chitin beträgt 6,9 %. Durch Verunreinigungen mit stickstoffhaltigen Verbindungen, wie Proteinen wird dieser Wert erhöht. Andere Substanzen, wie zum Beispiel Mineralstoffe und Carotinoide bewirken ein Absinken des Wertes.

In Abbildung 3.27 ist der Gesamtstickstoffgehalt unterschiedlicher Chitin-Chargen nach Demineralisierung im Vergleich zum Literaturwert dargestellt.

Die Chitin-Chargen IF1 und IF1(A)-Hefe wiesen einen deutlich erhöhten Gesamtstickstoffgehalt von 7,56 bzw. 7,14 % auf, was auf die Verunreinigung von Proteinen zurückzuführen war. Die Chargen IF1(A), IF2(A) mit jeweils 6,44 % und IF2(A) pH 8 mit 6,51 % hatten im Vergleich zum Literaturwert erniedrigte Gesamtstickstoffwerte, was auf die Restasche und Carotinoide zurückzuführen war (Abb. 3.27).

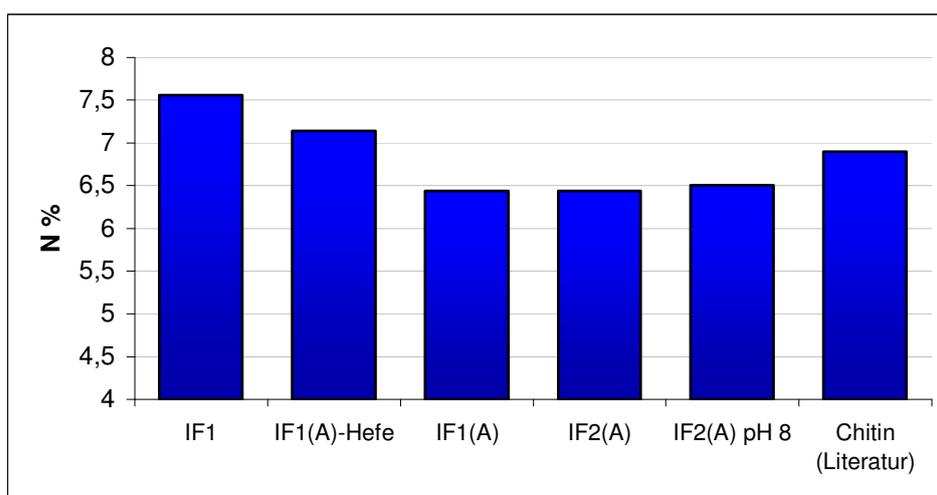


Abbildung 3.27: Gesamtstickstoffgehalt (N %) aufgearbeiteter Chitinproben gewonnen aus indonesischem Garnelenabfall im Vergleich zu reinem Chitin (No und Meyers, 1987)

3.5 Qualitätskontrolle der Schalen

3.5.1 Viskosität

Neben dem Gehalt an Protein und Asche stellt das Molekulargewicht des Chitins einen entscheidenden Faktor bei der Beurteilung der Qualität des Endproduktes dar. Eine Möglichkeit einen Anhaltspunkt über das Molekulargewicht des Chitins zu gewinnen ist die Viskositätsmessung von Chitinlösungen. Diese wurden im Labor an einem Rotationsviskosimeter (2.8.5) unter Standardbedingungen durchgeführt. Um den Messbereich festzulegen wurde zunächst eine Chitinlösung in einem Rotationsrheometer gemessen (Abb. 3.27). Hier zeigt sich deutlich, dass bei Schergeschwindigkeiten oberhalb 100/s die Viskosität der Lösung abnimmt, diese also ein pseudoplastisches Verhalten aufweist. Unterhalb einer Schergeschwindigkeit von 100/s bleibt die Viskosität konstant, die Lösung zeigt ein Newtonsches Fließverhalten. Für die Standardmessung wurde daher eine Schergeschwindigkeit von 50/s ausgewählt.

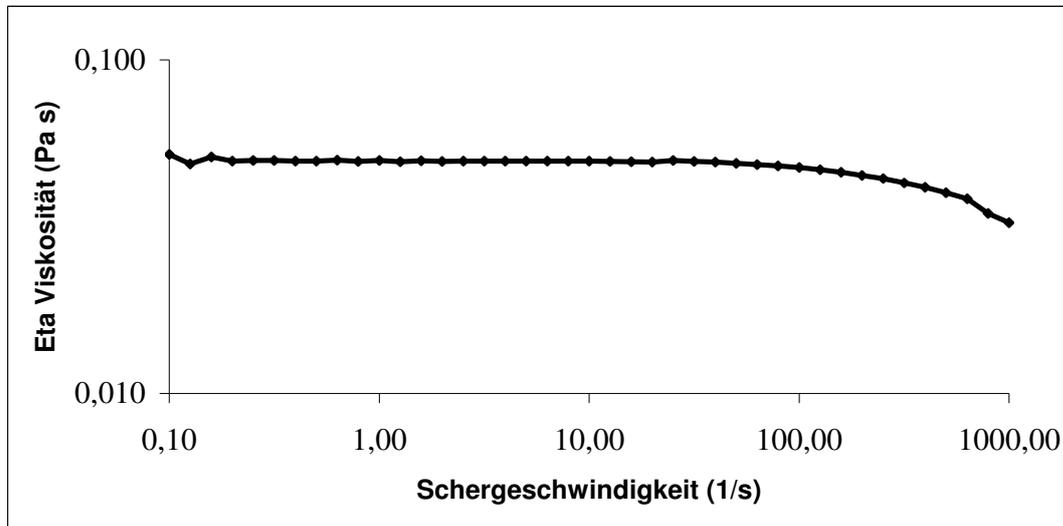


Abbildung 3.27: Fließkurve einer 0,3 %igen Chitinlösung erstellt an einem Kegel-Platte-Rheometer mit einer Schergeschwindigkeit von 0-1000/s.

Die Viskosität von 4 unterschiedlichen Chitinprodukten wurde miteinander verglichen. Es wurde ein chemisch aufgearbeitetes käuflich erworbenes Chitin (Roth) mit dem aus der biotechnologischen Aufarbeitung verglichen. In Abbildung 3.28 ist die Viskosität der Chargen IF1(A), IF2(A)pH8 und BT und des chemisch aufgearbeiteten Chitins in 0,1 %iger Lösung dargestellt.

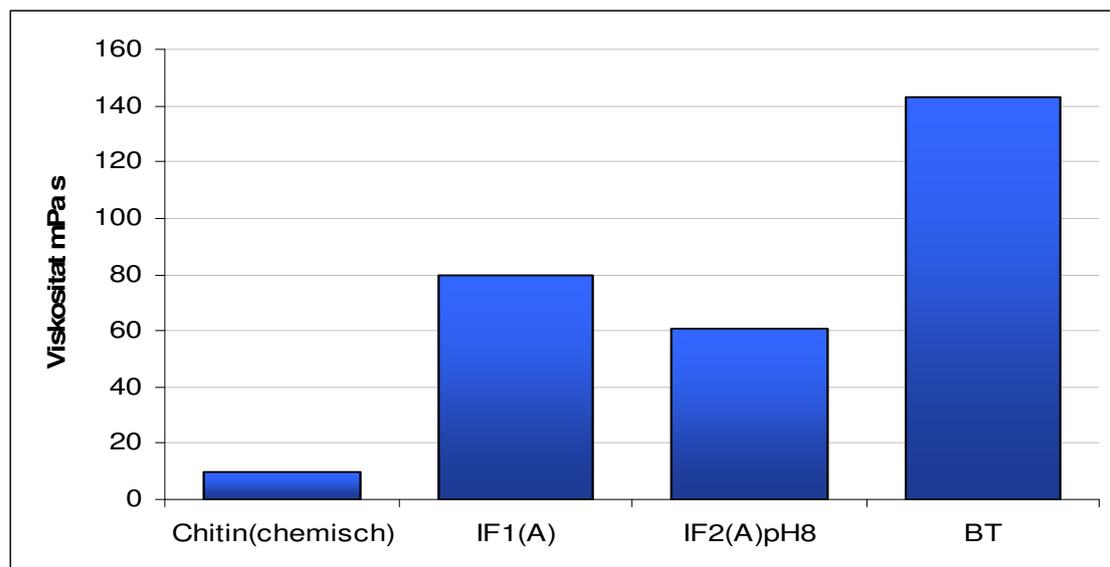


Abbildung 3.28: Viskosität unterschiedlicher Chitin-Chargen nach biotechnologischer bzw. chemischer Aufarbeitung in 0,1 %iger Lösung aus Chitin und NMP/LiCl

Eine biotechnologische Aufarbeitung führte im Vergleich zur chemischen Aufarbeitung zu einer wesentlich höheren Viskosität der Chitin-Lösung. Es wurde eine bis zu 14fache Steigerung der Viskosität von 10 mPas des chemisch extrahierten Chitins auf 143 mPas der biotechnologisch aufgearbeiteten Garnelenschalen aus Büsum erreicht. Das Chitin der Riesengarnele (*P. monodon*) hatte im Vergleich zu dem Chitin der Nordseegarnele (*C. crangon*) eine um den Faktor 1,8 geringere Viskosität von 80 mPas. Der Verfallsprozess hatte ebenfalls einen leichten Einfluss auf die Viskosität des Endproduktes. So sank der Wert für Chitin aus einer Aufarbeitung bereits leicht verdorbener Schalenabfälle um den Faktor 1,3 auf 60 mPas.

Anhand der gewonnenen Daten konnte lediglich eine qualitative Aussage über das Molekulargewicht der Produkte getroffen werden, wobei Chitin aus chemischer Aufarbeitung das niedrigste und Chitin aus BT-Schalen das höchste Molekulargewicht aufwies.

4 Diskussion

4.1 Auswahl eines geeigneten Stamms und geeigneter Prozessparameter

4.1.1 Isolation proteolytischer Organismen

Es wurden zwei grundlegende Prinzipien zu biotechnologischen Aufarbeitungsverfahren von Garnelenschalenabfällen in der Literatur beschrieben. Zur Entwicklung eines Prozesses mit getrenntem Deproteinierungs- und Demineralisierungsschritt wurden verschiedene alternative Ansätze zur Hydrolyse des Schalenproteins vorgestellt. Eine Möglichkeit besteht im Einsatz aufgereinigter, kommerziell erwerblicher proteolytischer Enzyme, wie Actinase E (Santoso et al., 1993) oder Chymotrypsin und Papain (Gagne und Simpson, 1993) zur hydrolytischen Spaltung der Schalenproteine. Im Labormaßstab konnten hier sehr gute Deproteinierungsleistungen erzielt werden, so dass die umweltschädliche Laugebehandlung mit diesem Verfahren ersetzt werden kann. Ein Nachteil ist hier im hohen Kostenaufwand für einen Prozess im großindustriellen Maßstab, aufgrund der Preise für aufgereinigte Enzyme, zu sehen. Viele Betriebe sehen daher von einem Einsatz dieser umweltschonenderen Methode ab.

Eine kostengünstigere Alternative wurde erstmals von Shimahara et al. (1982) publiziert, die mit Stämmen von *Pseudomonas maltophilia* eine Deproteinierungsleistung von 95 % des Gesamtproteins innerhalb von 3 Tagen bei 30 °C erzielten. Dieser Ansatz wurde im Jahr 1994 von Bustos und Healy wieder aufgegriffen. Sie setzten unterschiedliche Inokuli, unter anderem *Pseudomonas maltophilia*, *Enterococcus faecium* und *B. subtilis*, ein, konnten eine Deproteinierungsleistung von 95 % jedoch nicht bestätigen. Eine ähnliche Strategie wurde wenige Jahre später mit dem Einsatz von *P. aeruginosa* K-187 (Wang und Chio, 1998) und *B. subtilis* CCRC 10029 (Yang et al., 2000) als Starterkultur verfolgt. Es wurde jedoch nur eine mäßige Deproteinierungsleistung von bis zu 80 % des Proteins innerhalb von 5 Tagen in Schüttelkulturen erreicht. Insbesondere der energieaufwändige Sterilisationsschritt bei einer optimalen Prozesstemperatur von 30 bzw. 37 °C ist von Nachteil, da ansonsten neben der Starterkultur die Verderbsflora der Schalenabfälle und somit mögliche pathogene Keime kultiviert werden.

Bessere Erfolge mit einem Abbau von 87 % des Garnelenproteins innerhalb von 5 Tagen in Schüttelkultur wurden mit dem Hefestamm *Candida parapsilosis* CCRC 20515 erzielt (Chen et al., 2001). Dieser bietet den Vorteil, dass unter mesophilen Bedingungen aufgrund des niedrigen pH-Wertes (pH 3 bei Prozessbeginn) auf einen Sterilisationsschritt verzichtet werden kann, da die Bakterienflora unterdrückt wird. Allerdings gilt *C. parapsilosis* als opportunistisch pathogen, was für einen späteren industriellen Prozess von Nachteil ist. Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Deproteinierungsansätze ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Zusammenstellung unterschiedlicher Mikroorganismen und Proteasen zur Deproteinierung von Garnelenabfällen und ihre Leistung

Organismus/Protease	Deproteinierungsleistung	Referenz
<i>Candida parapsilosis</i> CCRC 20515	87 %	Chen et al., 2001
<i>Bacillus subtilis</i> CCRC 10029	80 %	Yang et al., 2000
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	95 %	Shimahara et al., 1982
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	78 %	Wang und Chio., 1998
<i>Pseudomonas maltophilia</i> 4201	71.5 %	Bustos und Healy, 1994
Mischkultur	81.7 %	Bustos und Healy, 1994
Chymotrypsin; Papain	94 %	Gagne und Simpson, 1993

In dieser Arbeit sollte ein Stamm mit möglichst optimaler Deproteinierungsleistung isoliert werden. Ferner sollte dieser Stamm keinerlei chitinolytische Eigenschaften unter optimierten Prozessbedingungen zeigen. Als geeignetes Material zur Isolation wurden Shrimpabfälle zum einen von Nordseegarnelen *C. crangon* und zum anderen von der in tropischen Gewässern beheimateten Schiffskeelgarnele *P. monodon* ausgewählt. Die auf diese Weise erhaltenen Isolate sind an Garnelenschalen angepasst und eine Vielzahl proteolytischer Organismen, die zu einer optimalen Hydrolyse der Garnelenproteine führen, konnten von diesem proteinreichen Substrat isoliert werden.

Der Vergleichsstamm *B. amyloliquefaciens* zeigte im Vergleich zu den übrigen nicht chitinolytischen Isolaten eine deutlich höhere proteolytische Aktivität und eine um durchschnittlich 40 % verbesserte Deproteinierungsleistung.

Unter den zunächst ausgewählten Anreicherungsbedingungen wurden aerobe Sporenbildner von der übrigen Verderbsflora verdrängt, so dass im ersten Screening keine Vertreter aus der Familie der *Bacillaceae* isoliert werden konnten. Für ein weiteres Screening wurden Anreicherungskulturen daher zuvor pasteurisiert.

Eine weitere Überlegung bestand in einer thermophilen Fermentationsstrategie. Die erhöhte Prozesstemperatur sollte zum einen zu einer verbesserten Deproteinierungsleistung führen und zum anderen kann im neutralen bis alkalischen pH-Bereich auf einen energieaufwendigen Sterilisationsschritt verzichtet werden. Das Wachstum der natürlichen Verderbsflora bestehend aus Vertretern der Gram-negativen Kokken, wie *Moraxella* und *Acinetobacter*, Gram-negativen Stäbchen wie *Pseudomonas* sp. Arten und *Enterobacteriaceae*, sowie einiger *Bacillus*-Arten (Heinsz et al., 1988) wird unter diesen Bedingungen weitestgehend unterdrückt.

Ein Vergleich der Deproteinierungsleistung zeigte sowohl in Schüttelkultur als auch im ein Liter Fermentationsansatz eine deutliche Verbesserung der unter thermophilen Prozessbedingungen isolierten aeroben Sporenbildner gegenüber Isolaten mesophiler Kulturen (Abb. 3.14). In Schüttelkultur zeigte der thermophile Ansatz F5/F11 einen um 23 % erniedrigten Gesamtstickstoffgehalt gegenüber den besten mesophilen Fermentationsansätzen. Eine Erklärung liegt im Temperatur-Optimum der exkretierten Proteasen, das im Kulturüberstand der Isolate F5/F11 bei 55 °C liegt (Abb. 3.13). Unter diesen Bedingungen ist ein verbesserter Abbau der Schalenproteine möglich. Die Vermutung liegt nahe, dass die pH-Optima der extrazellulären Proteasen mesophiler Isolate ebenfalls in diesem Bereich zu finden sind. Eine deutlich höhere proteolytische Aktivität von bis zu 8,2 U bei 55 °C gegenüber einem Maximum von 5 U bei 37 °C spricht für diese Vermutung.

Diese Ergebnisse konnten im ein Liter Fermentationsansatz bestätigt werden: eine Verbesserung der Deproteinierungsleistung und somit eine Erniedrigung des Restproteingehalts des Shrimpmehls von 9,3 auf 6,13 % konnte erreicht werden. Ein direkter Vergleich der proteolytischen Aktivität konnte nicht vorgenommen werden. Das trocken und bei Raumtemperatur gelagerte Shrimpmehl besitzt eine hohe Grundaktivität von über 80 U/ml, die auf proteolytische Organismen im Shrimpmehl zurückzuführen ist. Der Ansatz bei 42 °C zeigte hingegen eine deutlich niedrigere Grundaktivität unter 10 U/ml (Abb. 3.11). Ein Grund hierfür ist in der niedrigeren Inkubationstemperatur zu sehen. Weiterhin haben die Dauer der Lagerung und die genutzte Charge einen Einfluss auf die Menge an proteolytischen Organismen, die bereits vor Fermentationsbeginn im Shrimpmehl angewachsen sind.

Die Deproteinierungsleistung verbessert sich hingegen deutlich bei einer Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 50 °C. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 55 °C beschleunigt den hydrolytischen Prozess, so dass das Optimum der

Deproteinierungsleistung, im Gegensatz zu 96 h im Ansatz bei 50 °C, bereits nach 48 h erreicht ist (Abb. 3.12).

4.1.2 Charakterisierung der zur Fermentation ausgewählten Organismen

Eine Charakterisierung der Mischkultur aus den Isolaten F5 und F11 zeigte sowohl im biochemischen als auch im phylogenetischen Profil eine eindeutige Verwandtschaft zu der Art *Bacillus licheniformis* (Weigmann, 1898). Das biochemische Profil hat mit 99,8 % Wahrscheinlichkeit, eine exzellente Einordnung der Stämme F5 und F11 zu Vertretern dieser Art ergeben.

Das morphologische Erscheinungsbild (Abb. 3.9) stimmt mit den Angaben im *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986) überein; hier wird der Organismus als häufig in Ketten angeordnete Stäbchen beschrieben. Kolonien, die meist fest am Nährboden anhaften, sind milchig trüb mit einer stumpfen bis rauen Oberfläche. Häufig sind haarige Auswüchse zu beobachten sowie Ansammlungen von Schleim an der Kolonieoberfläche.

Die phylogenetische Charakterisierung ergab für beide Organismen, mit einer Übereinstimmung von 100 % im Bereich von Nukleotid 30-600 mit anderen Vertretern der Art *B. licheniformis*, ein ebenso eindeutiges Ergebnis. Somit konnte anhand der biochemischen als auch phylogenetischen Daten eine genaue Einordnung der beiden Wildisolate vorgenommen werden.

Allgemein stellt die Art *B. licheniformis* eine recht inhomogene Gruppe dar. So konnten Manachini et al. (1998) drei sehr distinkte Gruppen auf Basis von DNA-DNA Reassoziationsstudien unterscheiden. Eine Einordnung anhand von *rpoB* und *gyrA* Sequenzen ergab speziesinterne Unterschiede für *B. licheniformis* Stämme innerhalb der Basenfolge untersuchter Bereiche, so dass eine Einteilung in zwei Untergruppen erfolgte. Vergleiche eines Teils der hypervariablen 5'Region der 16S rDNA zeigte dieselbe Einteilung in die beiden Untergruppen (De Clerck und De Vos, 2004). Da für diese Arbeit eine genauere Differenzierung der Stämme nicht notwendig war, wurde von einer weiteren Charakterisierung abgesehen.

B. licheniformis ist ein Gram-positives, sporenbildendes Bakterium, welches als saprophytischer Organismus in der Umwelt weit verbreitet ist. Seine nächsten Verwandten sind *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens*. Das Genom mit einer Größe von 4222 kb der beiden isogenen *B. licheniformis* Stämme ATCC 14580 und DSM 13 wurde unabhängig voneinander sequenziert (Rey et al., 2004; Veith et al., 2004), womit für die Zukunft Mittel

für die Entwicklung neuer Strategien einer möglichen Stammoptimierung offen stehen. Das Sekretom von *B. licheniformis* codiert für eine Reihe von Enzymen, die für die Hydrolyse von Polysacchariden, Proteinen und Lipiden verantwortlich sind. Unter anderem wurden bei unterschiedlichen Stämmen Gene zur Codierung einer Chitinase (EC 3.2.1.14) gefunden. Für die Isolate *B. sp* F5 und *B. sp* F11 konnte nach 10 Tagen Inkubation mit Garnelenschalenabfällen jedoch kein Abbau des Chitins beobachtet werden. Eine Erklärung hierfür wäre eine Inaktivierung der Chitinasen aufgrund von Mutationen des codierenden Gens. Eine andere Möglichkeit besteht in einer Repression der Chitinase codierenden Gene aufgrund des ausreichenden Nährstoffangebotes im Kulturmedium, so dass es zu keiner bzw. nur zu einer geringen Expression der Chitinase codierenden Gene kommt. Weiterhin ist das Chitin zu Beginn des Prozesses durch gebundene Proteine und Calciumcarbonat vor dem Angriff chitinolytischer Enzyme geschützt. Erst mit zunehmendem Abbau des Schalenproteins wird ein enzymatischer Abbau des Chitins möglich. Der ermittelte Zeitrahmen der Fermentation von 48 h lässt einem potentiellen Angriff auf die Schalenabfälle mit Chitinasen wenig Raum und konnte daher für die Untersuchungen außer Acht gelassen werden.

Wie die gewonnenen Sequenzdaten zeigen, kann der Stamm *B. licheniformis* ATCC 14580 eine Reihe von Stickstoffquellen, wie exogene Proteine, Peptide, Aminosäuren, Ammonium, Nitrat und Nitrit nutzen. Dieses wird durch eine Reihe von Enzymen katalysiert, die den Abbau von Proteinen und Aminosäuren ermöglichen. Der untersuchte Stamm produziert ein großes Repertoire an extrazellulären Proteasen, wie Serinproteasen (*aprE*, *epr*, *vpr*), eine Metalloprotease (*mpr*) und ein Sortiment an Endo- und Exopeptidasen, die auch im *B. subtilis* Genom zu finden sind. Darüber hinaus besitzt der Organismus eine Reihe von Genen, die für Proteasen und Peptidasen codieren, welche im Genom von *B. subtilis* nicht vorhanden sind (Rey et al., 2004).

Aufgrund seines weiten Spektrums unterschiedlicher in die Umgebung exkretierter Metabolite und Enzyme wird *B. licheniformis* schon seit Jahren industriell zur Produktion von Enzymen und Antibiotika eingesetzt. Der Organismus besitzt den GRAS (*generally regarded as safe*) Status und wurde in den letzten Jahren eingehend charakterisiert.

Die ausgewählten Isolate *B. sp* F5 und *B. sp* F11 sind für einen späteren industriellen Prozess zur biotechnologischen Aufarbeitung von Pulabfällen aus der Garnelenproduktion sehr gut geeignet, da *B. licheniformis* ein bereits in vielen Industriezweigen erprobter Organismus ist, als nicht pathogen gilt, ein breites Spektrum an Proteasen exkretiert und sehr gut charakterisiert ist.

4.2 Optimierung des Fermentationsmediums

Für einen optimalen Prozessverlauf sind neben einem geeigneten Stamm eine Reihe anderer Faktoren von Bedeutung. Es müssen Kulturbedingungen gewählt werden, die dem Organismus gute Wachstumsbedingungen bieten, die Produktion einer angemessenen Menge an proteolytischen Enzymen gewährleisten und diesen optimale Bedingungen zur Hydrolyse des Garnelenproteins liefern. Garnelenschalenabfälle besitzen zwar eine Reihe von Nährstoffen wie Proteine, Fette und Mineralstoffe (Benjakul und Sophanodora, 1993), jedoch stehen nicht alle essentiellen Wachstumsfaktoren in ausreichender Menge zur Verfügung bzw. sind als Mineralstoffe in der Schale gebunden und somit dem Mikroorganismus nicht direkt zugänglich.

Zur Wachstumssteigerung ist im Wesentlichen das Vorhandensein einer Phosphatquelle und von Kalium, dem vorherrschenden intrazellulären Kation, von Bedeutung. Sowohl Kalium- als auch Phosphorlimitierung führen in der Regel zu einer strengen Entkopplung von anabolischen und katabolischen Prozessen der Zelle, was geringe Biomasseerträge zur Folge hat. Dauner et al. (2001) konnten in definierten *B. subtilis* Kulturen unter Phosphatlimitierung einen deutlichen Rückgang der Biomasseproduktion gegenüber stickstoff- und kohlenstofflimitierten Kulturen zeigen.

Durch die Supplementierung von 0,5 % KH_2PO_4 zu Kulturmedien mit Garnelenabfall konnte das Wachstum um das 180fache auf $4,5 \cdot 10^8$ KBE/ml gesteigert werden. Auf die proteolytische Aktivität hatte die Zugabe von Kaliumphosphat jedoch nur geringe Auswirkungen, wobei die Steigerung der Aktivität von 6 U/ml auf 12 U/ml im Wesentlichen auf die erhöhte Biomasseproduktion zurückzuführen ist (Abb. 3.16).

Die Expression der Proteasegene von *Bacillus* Arten unterliegt der Kontrolle globaler Regulationsmechanismen, wie der Katabolitrepression, einem Zwei-Komponenten-Regulationssystemen und der *spoOA* Kontrolle (Doi, 1991). Beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase wird SpoOA durch Phosphorylierung aktiviert, was zu einer Repression von *abrB* führt. Dieses Gen kodiert für einen globalen Transkriptionsfaktor, der die Synthese vieler Zielgene reguliert (Strauch et al., 1990). Durch eine Derepression dieser Zielgene wird unter anderem die Expression extrazellulärer Proteasegene und weiterer Protein codierender Gene ermöglicht.

Eine positive Regulation der extrazellulären Proteasen erfolgt über das Zwei-Komponenten-Regulationssystem, DegS-DegU. Durch bestimmte äußere Stimuli wird DegS autophosphoryliert und überträgt seinen Phosphatrest auf DegU. Phosphoryliertes

DegU ist neben anderen Regulationsfaktoren für die Expression extrazellulärer degradativer Enzyme verantwortlich (Dahl et al., 1992).

Die Produktion proteolytischer Enzyme von Stämmen der Gattung *Bacillus* im industriellen Maßstab wurde insbesondere an alkalischen Proteasen des Serintyps untersucht (Gupta et al., 2002, Calik et al., 2001; Kumar und Takagi, 1999). Üblicherweise erfolgt die Produktion in Submerskultur, wobei Medienkomponenten, wie Carbon- und Stickstoffquelle sowie das Vorhandensein von divalenten Kationen den Ertrag beeinflussen. Weiterhin nehmen noch physikalische Parameter, wie pH, Temperatur, Belüftung und Rührleistung Einfluss auf die Enzymproduktion.

Divalente Kationen, wie Calcium-, Kupfer-, Bor-, Eisen-, Magnesium-, Mangan- oder Molybdän-Ionen steigern die Produktion alkalischer Proteasen (Varela et al., 1996).

Neben einer verbesserten Expression an Enzym beeinflussen Kationen die Stabilität der Proteasestruktur. Zum Beispiel wird die Haltbarkeit des von *B. amyloliquefaciens* exprimierten Subtilisin BPN^ˆ durch die Zugabe von Ca²⁺-Ionen deutlich gesteigert (Alexander et al., 2001). Die Metall-Ionen binden an spezielle Bereiche der tertiären Struktur des Enzyms und stabilisieren durch eine Erhöhung der für die Entfaltung des Proteins benötigten Aktivierungsenergie das native Stadium des Enzyms (Pantoliano et al., 1988).

Ferner benötigen Enzyme aus der Klasse der Metalloproteasen divalente Kationen in ihrem aktiven Zentrum für ihre hydrolytische Aktivität und können durch die Zugabe von Chelatbildnern wie EDTA inaktiviert werden. Das Kation (häufig Zn²⁺) aktiviert ein Wassermolekül, welches eine Carbonylgruppe nukleophil angreift und so die Peptidbindung spaltet (Holmes und Matthews, 1981).

Die proteolytische Aktivität der im Kulturüberstand vorhandenen Enzyme wird durch Ca²⁺-, Mg²⁺- und Mn²⁺-Ionen verbessert. Zn²⁺ hingegen wirkt inhibierend im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Metallionen (Abb. 3.15).

In 100 ml Schüttelkulturansätzen konnte durch die Zugabe der Kationen Ca²⁺, Mg²⁺ und Na⁺ sowohl die proteolytische Aktivität als auch die Deproteinierungsleistung gesteigert werden. Hier ist jedoch die Menge der zugefügten Salze von Bedeutung. Liegt die Konzentration an CaCl₂ * 2 H₂O bei 1 % (w/v) kommt es aufgrund einer Repression des Wachstums zu einer deutlichen Verminderung der Deproteinierungsleistung der Kulturen (Abb. 3.17).

Weitere wichtige Faktoren zur Steigerung des Proteaseertrages sind Stickstoff- und Kohlenstoffquelle. Die Zugabe von hohen Konzentrationen an Glucose führt aufgrund

einer Katabolitrepression zu einer Reduktion der Proteaseproduktion. Daher ist es wichtig die Menge an zugeführtem Zucker gering zu halten, um eine gute Ausbeute zu erhalten (Zamost et al., 1990). Organische Stickstoffquellen, wie Sojabohnen-Mehl oder Hefeextrakt führen zu einer deutlichen Verbesserung des Ertrages (Kumar und Takagi, 1999). Garnelenschalenabfälle besitzen aufgrund ihres hohen Proteinanteils eine ausreichende Menge an Proteinen, Polypeptiden und Aminosäuren. Der Anteil an Vitaminen und Zuckern, die sowohl für Wachstum als auch für die Produktion an proteolytischen Enzymen von Bedeutung sind, ist hingegen sehr gering. Durch die Zugabe preiswerter, komplexer Substrate können diese Stoffe ergänzt werden.

Sowohl die Deproteinierungsleistung als auch die proteolytische Aktivität konnte durch die Zugabe von Hefeextrakt, der neben einem hohen Proteinanteil aus Vitaminen, Mineralstoffen und Polysacchariden besteht, gesteigert werden. Dieses ist unter anderem auf den Vitaminanteil des Hefeextrakts zurückzuführen, da die Vitamine als Cofaktoren einiger Enzyme im bakteriellen Stoffwechsel benötigt werden und so das Wachstum der Organismen sowie die Expression und Aktivität wichtiger Enzyme verbessern.

Durch die Zugabe von Cassavamehl und Melasse wird die proteolytische Aktivität des Kulturüberstandes im Vergleich zur Zugabe von Hefeextrakt deutlich gesteigert. Diese preiswerten Substrate haben jedoch den Nachteil, dass unlösliche Bestandteile im späteren Chitinprodukt verbleiben. Cassavamehl besteht neben Proteinen überwiegend aus Stärke und Mineralstoffen, die nach der Fermentation in den Schalen verbleiben und so zu einer deutlichen Erniedrigung des Gesamtstickstoffgehalts führen. Melasse, ein Abfallprodukt aus der Zuckerproduktion, ist aus verschiedenen Zuckern, wie Saccharose und Raffinose sowie Proteinen, Mineralstoffen und Vitaminen zusammengesetzt. Auch hier ist der Gesamtstickstoffgehalt vergleichsweise niedrig, da insbesondere Schwebeteilchen der Rohmelasse und Mineralstoffe im Chitin zurückbleiben.

Die Menge an produziertem Enzym spielt für einen erfolgreichen proteolytischen Prozess jedoch nur eine untergeordnete Rolle. So reichte eine kontinuierliche Aktivität von 1 U/ml über den Fermentationszeitraum aus um 88 % des Schalenproteins zu hydrolysieren (3.4.3). Entscheidender für den Erfolg des Prozesses sind viel mehr die Stabilität und das produzierte Spektrum an proteolytischen Enzymen. Wie bereits beschrieben, sind Stämme von *B. licheniformis* in der Lage eine Vielfalt an proteolytischen Enzymen in das Medium zu exkretieren. Je nach Typ besitzen diese Proteasen eine unterschiedliche Substratspezifität, mit unterschiedlichen Temperatur- und pH-Optima. Bekannte Vertreter

sind hier zum einen die Serinprotease Subtilisin, sowie die neutrale Metalloprotease und Elastase. Subtilisin, eine alkalische Protease, zeigt in einem optimalen pH Bereich um pH 10 eine Spezifität für aromatische oder hydrophobe Reste, wie Tyrosin, Phenylalanin oder Leucin. Eine Spezifität für hydrophobe oder große Aminosäurereste weisen neutrale Metalloproteasen auf, die eine optimale Aktivität um pH 7 zeigen. Alkalische Metalloproteasen hingegen besitzen ein breites Substratspektrum mit einem optimalen pH-Bereich zwischen pH 7-9 (Kalisz, 1988).

Proteomanalysen an *B. subtilis* haben gezeigt, dass der höchste Level an Proteinsekretion in komplexen Medien während der postexponentiellen Wachstumsphase erreicht wird (Antelmann et al., 2001). Unter Mangelbedingungen werden weitaus weniger Proteine in das Medium exkretiert (Hirose et al., 2000).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Spektrum an in das Medium exkretierten proteolytischen Enzymen von den Wachstumsbedingungen der Organismen abhängt. Eine hohe Konzentration an Ammonium und freien Aminosäuren reprimiert beispielsweise die Expression proteolytischer Enzyme (Frankena et al., 1986).

4.3 Optimierung des Fermentationsprozesses

4.3.1 Einfluss von Qualität und Behandlung des Garnelenabfalls auf die Deproteinierungsleistung

Einen wichtigen Faktor bei der Aufarbeitung von Garnelenschalen zu Chitin stellt die Qualität des eingesetzten Schalenmaterials dar. Das sehr proteinreiche, getrocknete Shrimpmehl sowie die bereits durch einen Aufarbeitungsprozess von Proteinen befreiten und getrockneten Schalen (BT) werden wesentlich schlechter deproteiniert als frische aufgearbeitete Schalen (IF1(A)). Die Deproteinierungsleistung in den Ansätzen ISM mit 87,5 % und BT mit 84 % liegen deutlich unter der im Ansatz IF1(A) erreichten Leistung von 93 %.

Durch den Trocknungsprozess wird eine Konformationsänderung des Proteins herbeigeführt, wodurch das Protein von extrazellulären Proteasen nicht mehr bzw. schlechter hydrolysiert werden kann. Dieses Phänomen beobachteten bereits Healy et al. (2003) in einem einstufigen Prozess zur Aufarbeitung von *Nephrops norvegicus* Abfällen

mit einer *Lactobacillen*-Starterkultur. Ein weiterer Vorteil der Aufarbeitung frischer Schalen liegt in einer besseren Rückgewinnung von Pigmenten (Hall et al., 1994), die bei einem Trocknungsprozess durch den Luftsauerstoff oxidiert werden.

Weiterhin wirkt sich eine Aufarbeitung des Garnelenabfalls positiv auf die Qualität des Endproduktes aus. Durch einfaches Waschen des frischen Schalenmaterials wird der Proteingehalt schon vor dem eigentlichen Prozessbeginn gesenkt. Üblicherweise enthalten die Abfälle 30-40 % Rohprotein (No und Meyers, 1997), nach dem Waschen hat sich der Gehalt auf 11 % (IF1(A)) bzw. 18 % (BT) deutlich reduziert. Das proteinreiche Waschwasser kann neben einer Grundsubstanz zur Vorkultivierung der Starterkultur zu einem Proteinhydrolysat weiterverarbeitet werden (2.7.1). Der Vorteil einer Aufarbeitung des Schalenmaterials wurde 2001 bereits von Cremades et al. beschrieben. Über ein Flotations/Sedimentations Verfahren (Bautista et al., 1990) wurden getrocknete Abfälle in eine Protein-Fraktion (PF) und eine Chitin-Fraktion (CF) getrennt, was zu einem Absinken des Proteingehalts auf 17,8 % in der CF führte. Die spätere Fermentation mit *Lactobacillus paracasei* 4023 erreichte mit einem Restproteingehalt von 2,07 % im Rohchitin gegenüber anderen einstufigen Prozessen eine deutliche Verbesserung des Restproteingehaltes, der ansonsten bei diesem Verfahren um die 10 % liegt. Dieses bestätigen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, bei denen in einem optimierten Prozess ein Restproteingehalt von 1,5 % erhalten wurde. Der Vorteil des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens liegt im Einsatz frischer Abfälle, die neben den bereits diskutierten Vorteilen eine bessere Ablösung des Rohproteins beim Aufarbeitungsprozess zulassen (bis zu 8 % in der CF).

Ohne einen Aufarbeitungsschritt lösen sich 57 % des Schalenproteins (ISM) schon vor Inokulation des Fermentationsansatzes im Medium (Abb. 3.23). Dieses entspricht dann 50,16 g/l an gelöstem Garnelenprotein im Fermentationsmedium. Das Medium in den Ansätzen IF1(A) und BT besitzt im Vergleich dazu einen deutlichen niedrigeren Gehalt an Garnelenprotein zu Beginn der Fermentation von 6,2 g/l bzw. 3,12 g/l. Das gelöste Protein wird bevorzugt hydrolysiert, da es für die proteolytischen Enzyme einfacher zu erreichen ist. Fest in der Schalenstruktur eingebundene Proteine werden so nicht abgebaut. Dieses zeigt sich im höheren Restproteingehalt von 5,5 % im Ansatz ISM gegenüber 0,8 % (IF1(A)) und 3 % (BT). Dieser Effekt kann auch beim Vergleich unterschiedlich behandelter frischer Schalen beobachtet werden (Abb. 3.26). Beim Einsatz unbehandelter Schalen (IF1) haben sich bereits 60 % des Proteins entsprechend 38,4 g/l vor Inokulation im Medium gelöst und es wird ein relativ hoher Restproteingehalt des Calcium-Chitins von 6,6 % erzielt. Durch einen vorherigen Aufarbeitungsschritt wird dieser auf 3 % (IF1(A))-

Hefe) bzw. 0,8 % (IF1(A)) abgesenkt. Zwar liegt die Deproteinierungsleistung qualitativ im Ansatz IF1(A) – Hefe mit 73 % unter der des Ansatzes IF1 mit 79 %, durch den hohen Ausgangsproteinengehalt wurde im Endeffekt jedoch ein qualitativ schlechteres Endprodukt produziert. Eine Verschlechterung der Abbauleistung wird hervorgerufen, da durch das gründliche Waschen der Schalen neben Proteinen wichtige Nährstoffe, wie Vitamine verloren gehen. Dieses Problem wurde durch die Zugabe von Hefeextrakt umgangen und die Abbaurate konnte auf 93 % im Ansatz IF1(A) gesteigert werden.

Hier wird die positive Wirkung der Zugabe von Hefeextrakt zu den Fermentationsansätzen noch einmal deutlich. Zum einen wird die proteolytische Aktivität deutlich von Werten bis zu 6 U/ml auf 60 U/ml gesteigert, zum anderen ist eine deutlich verbesserte Stoffwechselaktivität zu verzeichnen. Dieses äußert sich im pH-Verlauf der Kulturen. Im Ansatz IF1(A)-Hefe steigt der pH kontinuierlich mit leichten Schwankungen an. Dieses ist auf die bei Stoffwechselprozessen entstandenen Amine zurückzuführen. Werden diese Amine vom Organismus in einem höheren Maße verbraucht als neu produziert werden, sinkt der pH-Wert wie im Ansatz IF1(A) zu beobachten ist. Oligopeptide und Aminosäuren werden von der Zelle aufgenommen, wo sie entweder in Zellproteine eingebaut werden oder nach Desaminierung in den Intermediärstoffwechsel eingeschleust werden und somit als Energiequelle dienen. Ein hoher Verbrauch der durch Proteinhydrolyse entstandenen Amine deutet demnach auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität der Kultur hin.

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Deproteinierungsleistung der Kultur hat, ist die Frische des verwendeten Abfallmaterials. Durch mangelnde Kühlung oder eine ausgedehnte Lagerung auf Eis werden Amine und andere Komponenten von Vertretern der Verderbsflora gebildet. In eisgekühlten Chargen tropischer Garnelenarten wurde ein starker Verderb durch *Shewanella putrefaciens* beschrieben, wobei verschiedene Amine, Sulfide und Ester schon innerhalb der ersten 8 Tage der Lagerung gebildet wurden (Chinivasagam et al., 1998).

Dieses äußert sich im Wesentlichen durch einen starken Anstieg des pH-Wertes der Kultur, was auf einen erhöhten Gehalt an Aminen schließen lässt. Im Ansatz BT und IF2(A) steigt der pH-Wert zum einen deutlich schneller an als in den Ansätzen IF1(A) und ISM und zum anderen werden deutlich höhere Werte erreicht (Abb. 3.23 C und Abb. 3.26 C). Weiterhin ist die proteolytische Aktivität des Fermentationsmediums in diesen Ansätzen auf Werte um 1,5 U/ml deutlich verringert. Regulationssysteme, die in die Expression extrazellulärer Proteine eingreifen werden durch bestimmte Stimuli ihrer Umgebung beeinflusst, die

überwiegend beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase greifen. Beispielsweise werden für die Phosphorylierung von SpoOA speziell Nahrungslimitierung und eine erhöhte Zelldichte gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase verantwortlich gemacht (Phillips und Strauch, 2002). Ein Überangebot an Stickstoffquellen reguliert die Expression der Proteasegene hingegen herab, so dass wie bereits erwähnt die Produktion der extrazellulären proteolytischen Enzyme inhibiert wird (Frankena et al., 1986).

Einen weiteren Einfluss auf die Deproteinierungsleistung hat der pH-Wert der Kulturen sowohl auf die Expression an Proteasen als auch auf die Aktivität der Enzyme. Die proteolytische Aktivität des Fermentationsüberstandes nimmt bei Werten oberhalb pH 8,0 deutlich ab (Abb. 3.14). Das bedeutet, dass bei einem starken Anstieg des pH-Wertes im Fermentationsmedium die Enzyme nicht ihre volle katalytische Leistung entfalten können. Einige der typischen extrazellulären Proteasen, wie zum Beispiel neutrale Metalloproteasen arbeiten überwiegend im neutralen pH-Bereich. Das spiegelt sich deutlich in einer Verminderung der Deproteinierungsleistung wieder, die bei 84 % im Ansatz BT, bei 86 % im Ansatz IF2(A) im Vergleich zu einer Leistung von 93 % im Ansatz IF1(A) lag.

4.3.2 Einfluss einer pH-Kontrolle auf die Deproteinierungsleistung

Da bei einem industriellen Prozess davon auszugehen ist, dass eingesetzte Schalenabfälle nicht immer frisch zur Aufarbeitung zur Verfügung stehen bzw. für eine längere Zeit gekühlt gelagert werden müssen, wurden pH-kontrollierte Ansätze von gekühlt gelagerten BT Schalen miteinander verglichen.

Beim Einsatz von Abfällen, die über einen längeren Zeitraum gelagert wurden, führten die gebildeten Amine schon zu Beginn des Fermentationsprozesses zu einem starken Anstieg des pH-Wertes auf Werte bis zu pH 10,5. Das Wachstum in diesen Kulturen war inhibiert und lag über den gesamten Fermentationszeitraum bei 10^6 - 10^7 KBE/ml (Abb. 3.24). Ferner nahm die Deproteinierungsleistung deutlich auf einen Wert von 54 % ab. Dieses stellt eine wesentlich deutlichere Verschlechterung der proteolytischen Leistung gegenüber leicht verdorbenen Schalen um den Faktor 1,6 dar. Als Ursache für den Rückgang des hydrolytischen Abbaus ist hier insbesondere die Wachstumsinhibition der Kulturen und die eingeschränkte proteolytische Aktivität der Enzyme bei erhöhtem pH-Wert zu sehen.

Interessant ist der Rückgang der Lebendkeimzahl in Ansätzen mit verdorbenen BT-Schalen. Sowohl in den Ansätzen bei pH 7,5 als auch im Kontrollansatz ohne pH-Kontrolle war ein deutlicher Abfall der Lebendkeimzahl nach 24 h Fermentationsdauer auf Werte um die 10^6 KBE/ml zu beobachten. Lediglich im Ansatz pH 8,0 (H_3PO_4) wurde eine Zellzahl von 10^9 KBE/ml in der stationären Wachstumsphase mit einem leichten Rückgang nach 32 h Inkubation gehalten. Dieser Ansatz war ebenso der einzige, in dem auch am Ende der Fermentation im Wesentlichen nur Zellen der Starterkultur auszumachen waren. In den übrigen Ansätzen konnte sich die autochthone Bakterienflora durchsetzen und das Wachstum der zugeimpften *B. licheniformis* Stämme nach 24 h Fermentationsdauer nahezu komplett reprimieren. Im Kontrollansatz war dieses wie bereits beschrieben auf den schnellen Anstieg des Wertes auf pH 10 zurückzuführen. Unter diesen Bedingungen zeigte die Starterkultur kein Wachstum mehr und alkalophile Stämme des Schalenabfalls konnten sich durchsetzen. Die Wachstumsreprimierung in den Ansätzen pH 7,5 muss hingegen andere Ursachen haben, da pH 7,5 einen optimalen Wachstumsbereich für die eingesetzte Starterkultur darstellt. Bei einer Erhöhung des Wertes auf pH 8 war kein Rückgang des Wachstums mehr zu beobachten. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt ist, dass entweder bei pH 7,5, jedoch nicht bei pH 8,0 das Wachstum von Organismen gefördert wird, die so genannte Bacteriocide bilden und so das Wachstum der Starterkultur hemmen oder dass gebildete Bacteriocide bei höheren pH-Werten nicht mehr wirksam sind. Zum Beispiel wird in Milch durch die von *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* gebildeten Stoffe Nisin und Monolaurin sowohl das vegetative Wachstum als auch das Auskeimen der Endsporen von *B. licheniformis* in saurem nicht aber in alkalischem Milieu gehemmt (Mansour et al., 1999).

Weiterhin bestand die Überlegung, dass die Wachstumsrepression auf einen erhöhten Ammoniumgehalt der Fermentationsansätze zurückzuführen ist. Bei hohen Konzentrationen an NH_4^+ -Ionen im Medium kann das Wachstum je nach Toleranz des Organismus gehemmt werden. Untersuchungen an *Bacillus* Stämmen, die von alkalisch fermentierten Nahrungsmitteln wie Natto, Thai thua-nuo, nepalesisches Kinema u.a., isoliert wurden zeigten ohne Ausnahme eine Toleranz gegenüber NH_4^+ bis zu einer Konzentration von 930 mM (16,74 g/l) bei pH 7,0 und 8,0 (Leejeerajumnean et al., 2000). Die Ausgangskonzentration an Ammonium lag mit durchschnittlich 50 mg/l deutlich unterhalb des kritischen Bereichs. Durch die Oxidation von Aminosäuren wird im Fermentationsverlauf Ammonium gebildet. Durch einen Anstieg des pH-Wertes wird aus löslichem NH_4^+ flüchtiges NH_3 , welches aus dem Medium ausgetrieben wird und so

konnte im Ansatz ohne pH-Kontrolle oberhalb von pH 9 ein deutlicher ammoniakhaltiger Geruch der Abluft wahrgenommen werden. Bei niedrigeren pH-Werten verbleibt NH_4^+ im Medium und Konzentrationen bis zu 500 mg/l wurden im Ansatz pH 7,5 (H_2SO_4) erreicht. Dieser Wert lag ebenso weit unter der kritischen Konzentration von 16,74 g/l.

Der schnellste Anstieg des Ammoniumgehalts war im Ansatz pH 8,0 (H_3PO_4) zu beobachten. Dieses weist auf eine hohe Stoffwechselrate der Kultur hin, da hier im Medium bereits vorhandene, so wie durch proteolytische Prozesse gelöste Aminosäuren am effektivsten durch oxidative Desaminierung umgesetzt wurden. Ist die stationäre Wachstumsphase erreicht, bleibt die Konzentration an Ammonium auf demselben Niveau. Bildung und Assimilation von NH_4^+ stehen also in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander. Gegen Ende des Fermentationsprozesses wurde sowohl im Ansatz pH 7,5 (H_2SO_4) als auch im Ansatz pH 8,0 (H_3PO_4) ein Absinken des Ammoniumgehalts beobachtet. Somit lag gegen Ende des Fermentationsprozesses die Assimilationsrate über der Bildungsrate von Ammonium.

In diesem Zusammenhang war interessant zu beobachten, dass in den Ansätzen pH 7,5, insbesondere unter Zugabe von H_2SO_4 , das Medium nach 24 h Inkubation eine lila Verfärbung annahm. Dieses ist auf im Medium befindliche Pigmente zurückzuführen, die entweder von einem Mikroorganismus gebildet wurden oder enzymatisch aus den Schalenabfällen extrahiert wurden. Die typische rötliche bis violette Färbung vieler *Crustaceaen*-Panzer ist auf eine Reihe von Pigmenten zurückzuführen. Beispielsweise ist das Carotinoidprotein α -Crustacyanin für die violette Farbe des Hummers (*Homarus gammarus*) verantwortlich. Dieses 360 kDa schwere Makromolekül besteht aus einer Reihe von Untereinheiten an die das Carotinoid Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy- β,β -Carotin-4,4'-Dion) gebunden ist (Chayen et al., 2003).

Für ein Herauslösen der Carotinoidproteine im Verlauf des Prozesses spricht insbesondere die deutlich bräunliche Verfärbung des Chitins gegen Ende der Fermentation. Diese Färbung ist vermutlich auf Maillard-Reaktionen zurückzuführen. Hier werden durch Reaktionen von Aminosäuren oder Proteinen mit einem reduzierenden Zucker eine Reihe von Maillard-Produkten, wie das dunkel-braune Melanoidin (Wijewickreme et al., 1997) gebildet. Solange Carotinoide an die Schalen gebunden sind könnte diese Reaktion, aufgrund der oxidativen Wirkung der Pigmente, gehemmt werden. Weiterhin scheint die Zugabe von Sulfat-Ionen diese Reaktion zu begünstigen. In Schüttelkulturen konnte mit steigender Konzentration an MgSO_4 eine zunehmende bräunliche Verfärbung der Schalen beobachtet werden. Im Ansatz pH 7,5 (H_3PO_4) war ebenso eine lila Pigmentierung des

Mediums zu beobachten, die bräunliche Verfärbung der Schalen fiel jedoch wesentlich geringer aus. Prinzipiell ist das Herauslösen der Carotinoidproteine ein erwünschter Effekt, da eine zusätzliche Aufreinigung der Schalen beispielsweise durch Sojaöl wegfallen würde. Jedoch müssten hier Prozessbedingungen geschaffen werden, die nicht zu einer Qualitätsminderung des Chitins führen und eine spätere Extraktion der Carotinoidproteine aus dem Fermentationsüberstand ermöglichen, da diese ein wirtschaftlich interessantes Supplement für Tiernahrung darstellen (Gobantes et al., 1998).

Die Deproteinierungsleistung war bei vergleichbarer proteolytischer Leistung in den Ansätzen pH 7,5 (H_2SO_4) mit 76 % und pH 7,5 (H_3PO_4) mit 67 % deutlich geringer als im Ansatz pH 8,0 (H_3PO_4) mit 83 %. Dieses ist zum einen auf die diskutierten Maillard-Reaktionen zurückzuführen, die zu einer Erhöhung des Restproteingehalts führen. Zum anderen wurden in den Ansätzen pH 7,5 proteolytische Enzyme im Wesentlichen nicht von der Starterkultur gebildet und deckten somit ein anderes Substratspektrum ab (s. o.).

Allgemein kann gesagt werden, dass eine pH-kontrollierte Fermentation das Problem des hohen Anteils an von der Verderbnisflora gebildeten Aminen umgeht und somit Schalenabfälle unterschiedlicher Frische zur Fermentation eingesetzt werden können.

Diese Beobachtung wird beim Vergleich indonesischer Schalen (IF) unterschiedlicher Aufarbeitungsform, Herkunft und Frische bestätigt. Hier wurde im pH kontrollierten Ansatz eine Verbesserung der Deproteinierungsleistung von 93 % im Ansatz IF1(A) bzw. 88 % im Ansatz IF2(A) auf 98,8 % erzielt.

Dieses Ergebnis zeigt deutlich Vorteile eines pH kontrollierten Fermentationsverlaufes. Aufgrund der Stoffwechselaktivität werden während des Prozesses wie bereits beschrieben Aminosäuren, Oligopeptide sowie Ammonium gebildet. Je nach Bildung und Verbrauch dieser Moleküle kommt es zu Schwankungen des pH-Wertes, wie in den Ansätzen IF1(A) und IF2(A) zu beobachten war. Im Prozessverlauf wurden über einen längeren Zeitraum Werte oberhalb pH 8,5 erreicht. Dieses liegt offenbar außerhalb des pH-Optimums einiger für den Abbau wichtiger Proteasen was zu einer verminderten Deproteinierungsleistung führte. Wird der pH-Wert in einem optimalen pH-Bereich reguliert, können die gebildeten extrazellulären Enzyme der Garnelenproteine während des gesamten Fermentationszeitraums unter idealen Bedingungen hydrolysieren. Interessant in diesem Zusammenhang wäre es zu Entschlüsseln welche der extrazellulären Enzyme am Abbau des Schalenproteins beteiligt sind, um weitere Optimierungsschritte vornehmen zu können. Beispielsweise kann durch Proteomanalysen des Kulturüberstandes eine relativ genaues Bild extrazellulärer Enzyme gewonnen werden (Tjalsma et al., 2004).

4.4 Qualitätskontrolle der Schalen

Für eine spätere Vermarktung ist die Qualität des Chitins von entscheidender Bedeutung. Insbesondere als Zusatzstoff für Nahrungsmittel und im medizinischen Anwendungsbereich sind besondere Qualitätsstandards erforderlich. Diese müssen nach GMP („good manufacturing practice“) kontrollierten Methoden produziert werden. Es werden Prozessschritte benötigt, die Kontaminationen, wie Proteine, bakterielle Endotoxine und toxische Metalle nach anerkannten Richtlinien eliminieren. Bisher bieten nur wenige Hersteller Chitinprodukte von entsprechender Qualität an (Khor, 2002). Aufgrund der in den letzten Jahren steigenden Zahl an Anwendungsmöglichkeiten - insbesondere im medizinischen Bereich - wächst jedoch der Bedarf an Produkten von konstanter und gehobener Qualität. Um entsprechende Produktqualitäten zu erhalten, ist es wichtig ein möglichst hochwertiges Chitin in einem umweltverträglichen Prozess zu gewinnen.

Für einen thermochemischen Deacetylierungsprozess ist ein möglichst reines Chitin von Vorteil, da an das Polymer gebundene Proteine die Reaktion stören und so ein Chitosan minderer Qualität entsteht (Thomsen, persönliche Mitteilung). Einen weiteren wichtigen Qualitätsmaßstab stellt neben dem DD das Molekulargewicht des Chitins und Chitosans dar, wobei hier der Wert des Ausgangsproduktes entscheidend für die Qualität des späteren Endproduktes ist.

In dieser Arbeit wurden der Gehalt an Protein, Asche und Stickstoff sowie die Viskosität des produzierten Chitins bestimmt. Über den Gesamtstickstoffgehalt können Aussagen über stickstoffhaltige Verunreinigungen wie Proteine, die zu einer Erhöhung des Gesamtstickstoffgehaltes führen und andere Verunreinigungen, wie Mineralstoffe und Carotinoide, die zu einer Erniedrigung des Wertes führen, gemacht werden. Reines Chitin besitzt im Vergleich dazu einen Stickstoffgehalt von 6,9 % (Black und Schwarz, 1950). Die Qualität der in dieser Arbeit gewonnen Chitinprodukte weist deutliche Unterschiede auf. In den nach Aufarbeitung noch sehr proteinreichen Chargen IF1 und IF1(A)-Hefe war eine deutliche Erhöhung des Gesamtstickstoffgehalts 7,56 bzw. 7,16 % gegenüber reinem Chitin zu beobachten. Produkte mit einem Restproteingehalt unter 1 % wiesen einen erniedrigten Gesamtstickstoffgehalt auf. Dieses ist zum einen auf die Restasche des Chitins zurückzuführen, zum anderen führt die Pigmentierung des Chitins zu einer Erniedrigung des Wertes. Der Ansatz IF2(A) pH 8,0 liegt hier mit 6,51 % dem Literaturwert am

nächsten. In diesem Ansatz war weiterhin der geringste Restaschegehalt und höchste Chitingehalt zu verzeichnen (Tab. 3.8).

Der Vergleich der Viskosität des Chitins als Anhaltspunkt auf das Molekulargewicht zeigt eine deutliche Verbesserung biotechnologisch aufgereinigter Produkte gegenüber chemisch prozessiertem Chitin. Dabei war ein deutlicher Unterschied der Viskositätswerte von Schalen unterschiedlicher Herkunft zu beobachten. Führten aufgearbeitete Schalen von *P. monodon* zu durchschnittlichen Werten von 70 mPas, konnte in Chitinlösungen aus *C. crangon* Schalen eine Viskosität von 142 mPas erzielt werden. Da es sich hier um Naturprodukte handelt liegt die Vermutung nahe, dass Schalen unterschiedlicher Herkunft, bzw. von unterschiedlichen Garnelenarten auch zu unterschiedlichen Qualitäten des Endproduktes führen, da in dem Organismus selbst schon variierende Kettenlängen des Polymers vorlagen. Dieses stellten Rhazi et al. (2000) ebenfalls fest, als sie chemisch produzierte Chitosanprodukte unterschiedlicher *Crustaceae*n Gattungen auf ihre physikochemischen Eigenschaften untersuchten. Beim Vergleich des Molekulargewichts der Chitinproben waren Werte zwischen 125000 g/mol für Garnelenarten und 45000 g/mol für die Spinnenkrabbe zu verzeichnen.

Eine weitere wichtige Beobachtung war der leichte Rückgang der Viskosität von 80 mPas auf 60 mPas in Chitinlösungen, die aus bereits leicht verdorbenem Ausgangsmaterial resultieren. Beim Verderbsprozess laufen neben proteolytischen auch chitinolytische Prozesse ab. Viele Organismen sind in der Lage Chitinasen in ihre Umgebung auszuscheiden, um so N-Acetylglucosamin als Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Je weiter der Verderb vorangeschritten ist, umso mehr Chitin wurde bereits von Chitinasen angegriffen, was zu einer Erniedrigung des Molekulargewichts und somit der Viskosität in Lösungen des späteren Endproduktes Chitin führt.

Die Beobachtung eines Viskositätsanstiegs von Chitin bzw. Chitosan aus biotechnologischer Produktion gegenüber chemisch prozessierten Produkten steht im Kontrast zu den Messungen von Beaney et al. (2005), bei denen ein Vergleich zwischen aufgearbeiteten Chargen von *N. norvegicus* aus einer Silage mit Lactobacillen (Cnbl) und einem chemischen Prozess (Cnc) gezogen wurde. Hier fiel insbesondere der sehr hohe Restproteingehalt von 13,2 % und ein Restaschegehalt von 14,2 % des Cnbl gegenüber 2,1 % und 2,0 % des Cnc auf. Nach dem Deacetylierungsschritt wurde das Molekulargewicht des Chitosans ermittelt, wobei hier Cnc mit 99200 g/mol einen deutlich höheren Wert erzielte als Cnbl mit 48400 g/mol. Das verminderte Molekulargewicht biotechnologisch prozessierten Chitosans ist allerdings weniger auf die Prozessführung als

auf die starken Verunreinigungen der Chitincharge zurückzuführen, die den Deacetylierungsprozess behindern und so zu einer Verkürzung der Polymerketten führen. In dieser Arbeit wurde mit einem Restproteingehalt von 1,5 % und einem Restaschegehalt von 0,2 % der Trockenmasse ein gutes Ausgangsmaterial für den späteren Deacetylierungsprozess geschaffen. Der Demineralisierungsschritt wurde hier noch unter chemischen Bedingungen mit 0,9 %iger Milchsäure durchgeführt, soll jedoch beim späteren Prozess durch einen biotechnologischen Verfahrensschritt ersetzt werden (siehe 4.5).

Die Qualität von Chitin- und Chitosanprodukten ist entscheidend für die Funktionalität der späteren Anwendung. Neben dem Vermögen unterschiedliche Stoffe zu binden sind die physikochemischen Eigenschaften für zahlreiche andere Anwendungen von Bedeutung. Hier sind Kettenlänge, Deacetylierungsgrad des Chitosans sowie die Modifikation von Seitenketten von entscheidender Bedeutung.

Cho et al. haben 1998 unterschiedliche kommerzielle Chitinprodukte auf ihre physikochemischen Eigenschaften und ihre Funktionalität hin verglichen. Es wurden 5 unterschiedliche Chitinprodukte auf ihren Gesamtstickstoffgehalt, Restasche und Viskosität sowie auf ihr Vermögen Farbstoffe, Wasser und Fett zu binden hin untersucht. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Bindekapazität des untersuchten Chitins je nach Qualität und Herkunft. Beispielsweise zeigte die Charge von bester Viskosität und dem niedrigsten Aschegehalt der koreanischen Firma Chungmu die beste Farbstoff- und Fettbindekapazität.

In Tabelle 4.1 sind die einzelnen Parameter dargestellt. Beim Vergleich von Gesamtstickstoff und Asche zeigt sich, dass das biotechnologisch aufgereinigte Chitin vergleichbar mit kommerziell erwerblichen Chitinprodukten ist. Die Viskosität der Produkte schwankte je nach Herkunft sehr stark, ein direkter Vergleich zu in dieser Arbeit gemessenen Viskositätswerten ist nicht möglich, da hier mit einer 0,25 %igen Lösung in DMA/LiCl gearbeitet wurde.

Tabelle 4.1: Charakteristika verschiedener Chitinprodukte, sowie die Farbstoffbindekapazität (DBC), Wasserbindekapazität (WBC) und Fettbindekapazität (FBC) (Cho et al., 1998)

Chitinprodukt	N (%)	Asche (%)	Viskosität (mPas)	DBC (%)	WBC (%)	FBC (%)
Keumho Chemical Co. (Seoul, Korea)	5,97	0,4	700	94,4	407	320
Sigma (St. Louis, USA)	6,21	2,0	4	44,4	381	319
Pronova Biopolymer (Raymond, USA)	7,01	1,8	18	6,8	555	320
Chungmu Co. (Chungmu, Korea)	6,31	0,3	1152	100	559	563
Pronova Biopolymer (Raymond, USA)	6,52	0,5	610	25,2	673	316

Eine konstante Qualität des Chitosans stellt nach wie vor das größte Hindernis bei der Applikationsentwicklung dar. Derzeit sind auf dem Markt die unterschiedlichsten Chitosanprodukte mit variabler Reinheit und Löslichkeit, von schlecht definierter chemischer Struktur, unbekanntem Polymerisationsgrad und wenig beschriebenen biologischen Effekten erhältlich (Moerschbacher, 2004). Um für die Zukunft eine bessere Attraktivität für die Einsatzmöglichkeit von Chitin und insbesondere Chitosan zu schaffen, wird ein einfaches Qualitätskontrollsystem benötigt, das mit geringem Aufwand eine Routinekontrolle von Chitin- und Chitosanchargen ermöglicht und dem Anwender so ein gut beschriebenes Produkt liefert. Ein Schritt auf dem Weg zu einer konstanten Qualität von Chitosan zu gelangen, ist es ein Chitinausgangsprodukt zu erzeugen, das von homogener Struktur ist, um daraus mit definierten Verfahren die gewünschten Chitosanprodukte von gleich bleibender Reinheit, mit definiertem Molekulargewicht, Deacetylierungsgrad und Wirkungsgrad zu produzieren.

Durch die biotechnologische Aufreinigung konnte in dieser Arbeit ein Produkt mit einem erhöhtem Molekulargewicht gegenüber chemisch prozessiertem Chitin und vergleichbarer Reinheit geliefert werden. Für die Zukunft sind hier weitere Schritte in der Erforschung der Qualität in Abhängigkeit von gelieferten Schalenabfällen notwendig. Wie gezeigt werden konnte stellt sowohl der Organismus, aus dem das Chitin gewonnen wurde, als auch der Frischegrad des Abfallmaterials, ein Kriterium für das erzielte Molekulargewicht dar. Um eine konstante Qualität zu erzielen, wird es für einen industriellen Prozess von Bedeutung

sein, Schalenmaterial gleicher Herkunft und Frische für ein bestimmtes definiertes Produkt zu verwenden.

4.5 Ausblick

Eine biotechnologische Aufreinigung von Garnelenschalenabfällen zur Chitinproduktion ist generell möglich. Im ein Liter Labormaßstab konnte ein Chitin mit marktfähiger Qualität hergestellt werden. Der Demineralisierungsschritt wurde bisher noch rein chemisch mit 0,9 %iger Milchsäure durchgeführt. Für den späteren Prozess soll dieser Schritt ebenfalls durch eine „in situ“ Produktion von Lactat aus preiswerten Nebenprodukten wie Melasse, Stärke oder Glucose gewonnen werden. Bereits 2001 konnten Bautista et al. den Aschegehalt auf 4,1 % der Trockenmasse allein durch einen Fermentationsschritt mit immobilisierten Zellen von *Lactobacillus pentosus*-4023 in einem gepackten Säulenreaktor reduzieren. Eine Silage von Shrimpabfällen im Pilotmaßstab mit einer Startermischkultur verschiedener *Lactobacillus* Stämme über 6 Tage führte zu einer Verminderung des Aschegehalts auf 8,1 % der Trockenmasse (Cira et al., 2002). Wie die bisher bekannten Ergebnisse zeigen, wird auf einen abschließenden Reinigungsschritt der Schalen mit Säure nicht verzichtet werden können. Jedoch wird die Menge an Säuren, die benötigt wird, erheblich reduziert, was eine deutliche Minderung der Prozesskosten zur Folge hat. Lediglich der bereits erwähnte Prozess von Cremades et al. (2001) konnte eine ausreichende Demineralisierung auf 1,34 % erzielen. Dieses Ergebnis ist viel versprechend und lässt auf einen zukünftigen Prozess hoffen, bei dem auf den Einsatz von umweltschädlichen Säuren und Laugen komplett verzichtet werden kann. Lediglich die Umsetzung vom Chitin zum Chitosan wird weiterhin rein chemisch durchgeführt werden müssen. Wie in 1.6.3 beschrieben gibt es zwar Bemühungen eine biotechnologische Deacetylierung mittels Deacetylasen durchzuführen, jedoch scheitern die Vorhaben daran, dass bisher isolierte Enzyme nur bis zu 10 % der Acetylgruppen des Chitins abbauen; lediglich bei kürzeren Chitinoligomeren werden bessere Abbauraten erreicht (Win und Stevens, 2001).

Wirtschaftlichkeitsberechnungen am Beispiel zweier Prozesse der dänischen Chitinproduktion haben ergeben, dass, ohne den Verkauf von Nebenprodukten in Betracht zu ziehen, eine alternative Aufarbeitung der Pulabfälle im Vergleich zur traditionellen Methode um den Faktor 3,5 günstiger ist. Hier wurde der Deproteinierungsschritt mit einem Enzymextrakt aus dem Fischdarm und die Demineralisierung mit Schwefelsäure vollzogen. Der Hauptfaktor liegt hier in der Einsparung teurer Chemikalien, sowie einem deutlich geringeren Wasserverbrauch. Weiterhin konnte ein hoher Gewinn aus dem Verkauf des Nebenprodukts Astaxanthinöl erzielt werden (Joensen und Villadsen, 1994).

In dem in dieser Arbeit vorgeschlagenen Aufarbeitungsprozess besteht die Möglichkeit eine Reihe von Nebenprodukten wie Proteine, Calciumlactat und Carotinoide zu gewinnen. Proteine und Proteinhydrolysate können aus dem beim Aufarbeitungsprozess anfallenden Waschwasser, sowie aus dem Kulturüberstand des Deproteinierungsschrittes, der reich an Peptiden und Aminosäuren ist, gewonnen werden. Verwendung finden solche Proteine bzw. Proteinhydrolysate als Supplemente für Fisch- und Tierfutter. Untersuchungen einzelner Proteinchargen nach Aufarbeitung des Abfallmaterials von *Procambarus clarkii* durch das bereits erwähnte Flotations/Sedimentations-Verfahren zeigten, dass die Proteinfraktion sämtliche essentiellen Aminosäuren sowie ω -Fettsäuren und Carotinoide enthielt und so sämtliche Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für hochwertige Nahrungssupplemente erfüllt. Das aus dem Fermentationsüberstand gewonnene Proteinhydrolysat ist gegenüber der PF von minderer Qualität, kann jedoch als Proteinquelle für Tiernahrung verwendet werden (Cremades et al., 2001).

Carotinoide wie Astaxanthin, ein Vorläufer des Vitamin A, besitzen eine Bedeutung bei einer Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmitteltechnologie und Ernährung. Beispielsweise werden sie als Nahrungssupplemente in der Forellen- und Lachszucht eingesetzt, um die vom Konsumenten erwünschte Pigmentierung des Fleisches zu erreichen (Gobantes et al., 1998). Weiterhin dienen sie als Nahrungszusatz für die Geflügelzucht um die Färbung von Fleisch und Eigelb zu verbessern (Johnsen et al., 1980). Die Pigmente können zum einen gemeinsam mit den Proteinfractionen als Carotinoidprotein gewonnen werden, zum anderen können sie aus dem Schalenmaterial extrahiert werden. Hierzu eignen sich Hexan, Petrolether oder Sojaöl (Healy et al., 2003). Calciumlactat, eine bedeutende Komponente in Mineralsupplementen für die menschliche Ernährung, kann über Präzipitation von dem Fermentationsüberstand des Demineralisierungsschrittes getrennt werden.

Um die genannten Nebenprodukte als Wertstoffe nutzen zu können, wird ein gewisser Forschungsbedarf notwendig sein, um die einzelnen Schritte optimal auf den entwickelten Prozess abzustimmen. Weiterhin muss durch eine genaue Analyse der Inhaltsstoffe der gewonnenen Produkte geklärt werden, inwieweit sie als Futtermittel bzw. als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden können, um eine spätere Vermarktung zu ermöglichen.

Neben der Weiterführung der einzelnen Aufarbeitungsschritte in den Pilotmaßstab muss eine Anlage für einen Prozess am Ort der jeweiligen Garnelenproduktionen konzipiert werden. Als idealer Standort für eine spätere Produktion eignen sich insbesondere Regionen mit einer hohen Produktion an *Crustaceae*n. Länder tropischer Regionen sind dabei aufgrund ihrer ganzjährlichen Zucht in Aquakulturen von besonderem Interesse. Abfälle stehen so über das gesamte Jahr für eine kontinuierliche Weiterverarbeitung zu Chitin zur Verfügung. Die Aufarbeitung dieser Abfälle hat neben der wirtschaftlichen Komponente durch die Aufwertung zu einem Wertstoff auch noch ökologische Vorteile, da eine unzulängliche Entsorgung der Pulabfälle zu einer starken Verschmutzung des Abfallwassers mit hohen Mengen an organischen Stoffen, kleinen Fleischpartikeln, löslichen Proteinen und Kohlenwasserstoffen der Produktionsbetriebe führt (Islam et al., 2004).

Für den späteren Prozess wären Fermentationsschritte in großen Containern vorstellbar, die direkt neben garnelenproduzierenden Betrieben aufgestellt werden könnten. Das Containersystem sollte möglichst einfach gehalten sein, um die Kosten des Prozesses so gering wie möglich zu gestalten. Neben einem guten Belüftungs- und Rührsystem wird als einzige Regeltechnik eine Temperatur- und pH-Kontrolle benötigt, um die Fermentation unter kontrollierten Bedingungen ablaufen lassen zu können. Eine Abtrennung der Schalen vom Medium kann ganz einfach über ein Sieb vollzogen werden. Nach der Aufarbeitung durch Mahlen, Abpressen und Waschen könnten anfallende Pulabfälle direkt und frisch vor Ort weiterverarbeitet werden, so dass kostenintensive Kühlung und Transportwege entfallen. Eine spätere Verschiffung des Chitins zu weiterverarbeitenden Betrieben in Deutschland würde aufgrund der Gewichtsreduzierung und der wegfallenden Kühlung, wesentlich preiswerter ausfallen. In Deutschland kann das Chitin dann zu hochwertigem Chitosan für die unterschiedlichsten Applikationen weiterverarbeitet werden. Eine schematische Darstellung der zukünftig geplanten Prozessführung ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

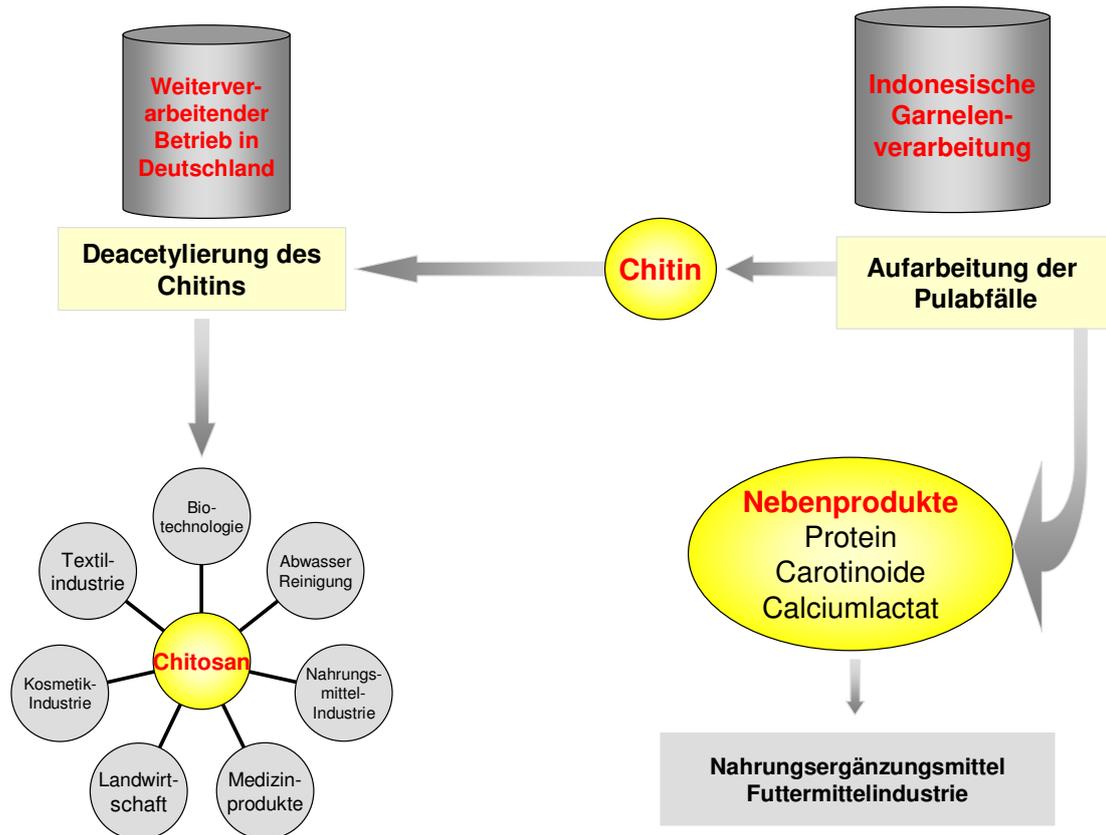


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der geplanten Prozessführung und möglichen Wertschöpfung eines biotechnologischen Aufarbeitungsprozesses von Pulabfällen aus der indonesischen Garnelenproduktion.

Abschließend kann gesagt werden, dass die biotechnologische Aufarbeitung von Garnelenschalenabfällen eine viel versprechende Alternative zur bisherigen klassischen chemischen Chitingewinnung darstellt. Zum einen wird eine höhere Wertschöpfung durch beim Prozess anfallende Nebenprodukte erzielt, zum anderen stellt die biotechnologische Aufarbeitung eine wesentlich umweltschonendere Methode dar, da auf schädliche Chemikalien weitestgehend verzichtet werden kann. Ein weiterer entscheidender Vorteil der biotechnologischen Aufarbeitung ist der Erhalt eines Produktes von höherem Molekulargewicht gegenüber Produkten aus chemischen Prozessen. Dieses verspricht ein weites Anwendungsspektrum des Chitosans von nieder- bis hochmolekularen Produkten, je nach gewünschtem Einsatzgebiet.

Für Indonesien, einem der Hauptproduzenten von Garnelen, bedeutet dieses, dass einerseits das Problem der Entsorgung der hohen Mengen an Pulabfällen gelöst wird und andererseits aufgrund der hohen potenziellen Wertschöpfung aus den Schalen ein Industriezweig mit neuen Vermarktungsmöglichkeiten eröffnet werden kann. Sollte

weiterhin eine verbesserte, konstantere und günstigere Qualität der Chitosanprodukte geschaffen werden, eröffnen sich neue Möglichkeiten im Anwendungsbereich, wo bisher insbesondere der hohe Preis und die inhomogene Qualität des Chitosans viele Industriezweige von einem Einsatz der Produkte abschrecken.

5 Zusammenfassung

Garnelenschalenabfälle stellen in den produzierenden Länder aufgrund ihres hohen biologischen Sauerstoffbedarfs und potenzieller pathogener Keime, welche die Schalen als Substrat nutzen ein Umweltproblem dar (Islam et al., 2004). Auf der anderen Seite wächst der Bedarf an Chitinprodukten aufgrund der stetig voranschreitenden Entwicklung an Anwendungsmöglichkeiten dieses Biopolymers. Für ein Land wie Indonesien, einer der Hauptproduzenten von Garnelen in Aquakultur, bedeutet eine wertschöpfende Aufarbeitung dieser Abfälle die Eröffnung eines neuen lukrativen Industriezweiges.

Garnelenschalenabfälle bestehen neben Chitin überwiegend aus Proteinen, Mineralstoffen und Carotinoiden, welche entfernt werden müssen. Das klassische chemische Aufbereitungsverfahren beinhaltet einen Demineralisierungs- und Deproteinierungsprozess mit Säuren und Laugen sowie die Dekoloration des Endproduktes. Eine kostengünstigere und umweltfreundlichere Alternative besteht in der biotechnologischen Aufarbeitung der Schalen.

In dieser Arbeit wurde ein biotechnologischer Deproteinierungsprozess entwickelt. Dazu wurden zunächst proteolytische Stämme von Garnelenschalen isoliert und in einem Screening auf ihre hydrolytische Leistung hin untersucht. Stämme der Gattung *Bacillus* erwiesen sich hier als besonders geeignet. Weiterhin zeigte sich, dass ein Prozess unter thermophilen Bedingungen (55 °C) Vorteile gegenüber den üblich gewählten Prozessbedingungen bei 30 oder 37 °C bietet. Diese bestehen zum einen darin, dass auf den energieaufwendigen Sterilisationsschritt verzichtet werden kann, da die übliche Verderbsflora der Abfälle überwiegend unterdrückt wird. Weiterhin stellt 55 °C eine optimale Temperatur für die enzymatische Wirkung vieler extrazellulärer Proteasen dar.

Als besonders gut geeignet erwies sich eine Mischkultur aus zwei Stämmen (F5 und F11). Diese konnten nach biochemischer und phylogenetischer Analyse als Vertreter der Art *B. licheniformis* identifiziert werden.

Nach Optimierung des Kulturmediums wurden unterschiedliche Schalensubstrate für den Prozess getestet. Hier zeigten sich frische Schalen als besonders geeignet. Des Weiteren konnte durch eine Aufarbeitung des Abfallmaterials der Proteingehalt schon vor dem

eigentlichen Fermentationsschritt um 70 % reduziert werden. Dieses führte zu einer deutlichen Erniedrigung des Restproteingehalts des Endproduktes von 10 % auf 2,1 %. Eine weitere Verbesserung konnte durch eine pH Kontrolle bei pH 8,0 erreicht werden. Aufgrund der durch den Verderbnisprozess und durch die hydrolytische Spaltung während des Prozesses entstandener Amine steigt der pH-Wert der Kulturen deutlich an. Bei pH-Werten über 8,0 vermindert sich die proteolytische Aktivität des Kulturüberstandes was sich negativ auf die Deproteinierungsleistung auswirkt. Unter optimierten Prozessbedingungen konnte so ein Chitin mit einem Restproteingehalt von 1,5 %, einem Restaschegehalt von 0,2 % und einem Chitingehalt von 92 % der Trockenmasse erhalten werden. Dieses entspricht der Qualität chemisch produzierter Produkte. Weiterhin liegt die Viskosität des biotechnologisch hergestellten Produktes mit durchschnittlich 70 mPas über der eines vergleichbaren chemischen Produktes mit 10 mPas, was auf eine höheres Molekulargewicht schließen lässt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der umweltschädliche chemische Prozess durch ein biotechnologisches Verfahren ersetzt werden kann und dass ein Produkt von gleicher Qualität mit höherem Molekulargewicht erhalten wird.

6 Literatur

Alexander PA; Ruan B; Strausberg SL; Bryan PN (2001). Stabilizing mutations and calcium-dependent stability of subtilisin. *Biochemistry*, **40**, 10640-10644.

Alsarra IA, Zhang H; Evans BA; Neau SH, Evans BA; Neau SH, Neau SH, (2002). Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. *Biomaterials*, **23**, 3637-3644.

Andersen SO (1991). Cuticular proteins from the shrimp, *Pandalus borealis*. *Comp Biochem Physiol B*, **99**, 453-458.

Andrey AK; Vladimir AG (1989). Glycoproteins with a chitin-like carbohydrate moiety in insect cells. *Chitin and Chitosan* (pp. 793-801). New York:Elsevier Applied Science.

Antelmann H; Tjalsma H; Voigt B; Ohlmeier S; Bron S; van Dijl JM; Hecker M (2001). A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res*, **11**, 14984-14502.

Ashelford KE; Weightman AJ; Fry CF (2002). PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Research*, **30**, 3481-3489.

Bautista J; Parrado J; Machado A (1990). Composition and fractionation of sunflower meal: use of lignocellulose fraction as substrate in solid state fermentation. *Biol Wastes*, **32**, 225-233.

Bautista J; Jover M; Gutierrez JF; Corpas R; Cremades O; Fontiveros E; Iglesias F; Vega J (2001). Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production. *Process Biochem*, **37**, 229-234.

- Baxter A; Dillon M; Taylor KD; Roberts GA (1992).** Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int J Biol Macromol*, **14**, 166-169.
- Beaney P; Lizardi-Mendoza J; Healy M (2005).** Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *J Chem Technol Biotechnol*, **80**, 145-150.
- Benjakul S; Sophanodora P (1993).** Chitosan production from carapace and shell of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *ASEAN Food Journal*, **8**, 145-148.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986).** Murray RGE; Brenner DJ; Bryant MP, Holt JG; Krieg NR et al. (Ed.), Baltimore: William & Wilkins.
- Black MM; Schwarz HM (1950).** The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst*, **75**, 185-188.
- Boisson F; Cotret O; Teyssie JL; El-Baradei M; Fowler SW (2003).** Relative importance of dissolved and food pathways for lead contamination in shrimp. *Mar Pollut Bull*, **46**, 1549-1557.
- Borchers B (2004).** *Chitosan in der Papierindustrie*. Symposium zum Stand der Anwendung und Forschung von Chitin und Chitosan, Vortragsabstracts (S. 19); Büsum.
- Braconnot H. (1811).** Sur la nature des champignons. *Ann Chim Phys (Paris)* **79**, 265.
- Brugnerotto J; Desbrieres J; Roberts G; Rinaudo M (2001).** Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer* **42**, 9921-9927
- Bustos RO; Healy MG (1994).** *Microbial extraction of chitin from prawn shell waste*. In Karnicki ZS; Brzeski MM; Bykowski PJ; Wojtasz-Pajak A (Ed.), *Chitin World* (S. 15 - 25). Bremerhaven:Wirtschaftsverlag NW.
- Calik P; Calik G; Özdamar.TH (2001).** Bioprocess development for serine alkaline protease production: a review. *Rev Chem Eng*, **17**, 1-62.

- Cano-Lopez A; Simpson BK; Haard NF (1987).** Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. *J Food Sci*, **52**, 503-506.
- Chavira jr. R; Burnett TJ; Hagemann JH (1984).** Assaying Proteinases with Azocoll. *Anal Biochem*, **136**, 446-450.
- Chayen NE; Cianci M; Grossmann G; Habash J; Helliwell JR et al. (2003).** Unravelling the structural chemistry of the colouration mechanism in lobster shell. *Acta Cryst*, **D59**, 2072-2082.
- Chen HC; Phang KA; Wu SD; Mau WJ (2001).** Isolation of chitin from shrimp shells deproteinized by *Candida parapsilosis* CCRC 20515. *Food Sci Agric Chem*, **3**, 114-120.
- Chen M; Yeh GH; Chiang B (1996).** Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. *J Food Proc Preserv*, **20**, 379-390.
- Chinivasagam HN; Bremner HA; Wood AF; Nottingham SM (1998).** Volatile components associated with bacterial spoilage of tropical prawns. *Int J Food Microbiol*, **42**, 45-55.
- Cho YI; No HK; Meyers SP (1998).** Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *J Agric Food Chem*, **46**, 3839-3843.
- Cira CA; Huerta S; Hall GM; Shirai K (2002).** Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochem*, **37**, 1359-1366.
- Cole JR; Chai B; Marsh TL; Farris RJ; Wang Q; Kulam SA; Chandra S; McGarrell DM; Schmidt TM; Garrity GM; Tiedje JM (2003).** The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res*, **31**, 442-443.

- Cremades O; Ponce E; Corpas R; Gutierrez; Jover M; Alvarez-Ossoria MC; Parrado J; Bautista J (2001).** Processing of crawfish (*Procambarus clarkii*) for the preparation of crotenoproteins and chitin. *J Agric Food Chem*, **49**, 5468-5472.
- Dahl MK; Msadek T; Kunst F; Rapoport G (1992).** The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, **267**, 14509-14514.
- Dauner M; Storni T; Sauer U (2001).** *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *J Bacteriol*, **183**, 7308-7317.
- De Clerk E; De Vos P (2004).** Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various species. *FEMS Microbiol Lett*, **231**, 91-98.
- Depledge MH; Agaard A; Györkös P (1995).** Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural markers. *Mar Pollut Bull*, **31**, 19-27.
- Dhiman HK; Ray AR; Panda AK (2004).** Characterization and evaluation of chitosan matrix for *in vitro* growth of MCF-7 breast cancer cell lines. *Biomaterials*, **25**, 5147-5154.
- Doi RH (1991).** Proteolytic activities in *Bacillus*. *Curr Opin Biotechnol*, **2**, 682-684.
- Eiden CA; Jewell CA; Wightman JO (1980).** Interaction of lead and chromium with chitin and chitosan. *J Appl Polym Sci*, **25**, 1587-1599.
- Felsenstein J (1991).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*, **17**, 368-376.
- Frankena J; Koningstein GM; van Verseveld HW; Stouthammer AH (1986).** Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **24**, 106-112.

- Gagne N; Simpson BK (1993).** Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnol*, **7**, 253-263.
- Gobantes II; Choubert G; Milicua JC; Gomez R (1998).** Serum Carotenoid Concentration Changes during Sexual Maturation in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Agric Food Chem*, **46**, 383-387.
- Goycoolea F.M., Argüelles W.M., Peniche C; Higuera I. (2000).** *Chitin and chitosan*. In: Doxastakis G. and Kiosseoglou V. (Ed.) *Novel Macromolecules in Food Systems (Series Developments in Food Science)* (S. 265-308), London: Elsevier Applied Science.
- Groboillot DK; Poncelot D; Neufeld RJ (1994).** Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit Rev Biotechnol* **14**, 75-107
- Gupta KC; Kumar RMNV (2000).** Drug release behaviour of beads and microgranules of chitosan. *Biomaterials*, 1115-1119.
- Gupta R; Beg QK; Khan S; Chauhan B (2002).** An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, **60**, 381-395.
- Hackman RH (1955).** Studies on chitin. II. Reaction of N-acetyl -D-glucosamine with α -amino acids, peptides, and proteins. *Aust J Biol Sci*, **8**, 83-96.
- Hackman RH; Goldberg M (1958).** Protein of the larval cuticle of *Agrianome spinicollis*. *J Insect Physiol* **2**, 221-231.
- Hackmann RH. (1960).** Chitin. IV. The occurrence of complexes in which chitin and protein are covalently linked. *Aust J Biol Sci* **13**, 568-377.
- Hadwiger LA; Fristensky B; Riggelmann RC (1984).** Chitin Chitosan and related enzymes. In Zikakis JP (Ed.), (S. 291). New York:Academic Press.

- Hageman JH; Shankweiler GW; Wall PR; Franich K; McCowan GW; Cauble SM; Grajeda J; Quinones C (1984).** Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. *J Bacteriol* **160**, 438-441.
- Hall GM; De Silva S (1992).** *Lactic acid fermentation of shrimp (Penaeus monodon) waste for chitin recovery.* In Advances in Chitin and Chitosan, *Proc. Int. Conf. Proc. Int. Conf. 5th* (S. 633-638). London:Elsevier Applied Science.
- Hall GM; Reid CL; Zakaria Z (1994).** Fermentation of prawn waste by lactic acid bacteria. In Karnicki ZS; Brzeski MM; Bykowski PJ; Wojtasz-Pajak A (Ed.), *Chitin World* Bremerhaven:Wirtschaftsverlag NW.
- Healy M; Romo R; Bustos R (1994).** Bioconversion of marine crustacean shell waste. *Resour Conserv Recycl*, **11**, 139-147.
- Healy M; Green A; Healy A (2003).** Bioprocessing of marine crustacean shell waste. *Acta Biotechnol*, **23**, 151-160.
- Heinsz LJ; Harrison MA; Leiting VA (1988).** Microflora of brown shrimp (*Paeneus aztecus*) from Georgia coastal waters. *Food Microbiol*, **5**, 141-145.
- Hirano S; Mizutani C; Yamaguchi R; Miura O (1978).** Formation of the polyelectrolyte complexes of some acidic glycosaminoglycans with partially N-acetylated chitosans. *Biopolymers* **17**, 805-810.
- Hirano S (1989).** Production and application of chitin and chitosan. In Braek GS; Anthosen T; Sandford P (Ed.), *Chitin and Chitosan* (S. 37-43). New York: Elsevier Applied Science.
- Hirose I; Sano K; Shiosa M; Kumano K; Nakamura K; Yamane K (2000).** Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretical study. *Microbiology*, **146**, 65-75.

- Holmes MA; Matthews BW (1981).** Binding of hydroxamic acid inhibitors to crystalline thermolysine suggests a pentacoordinate zinc intermediate in catalysis. *Biochemistry*, **20**, 6912-6920.
- Hunt S (1970).** Polysaccharide-protein complexes in invertebrates. (pp. 129). London: Academic Press.
- Iconomidou VA; Willis JH; Hamodrakas SJ (1999).** Is β -pleated sheet the molecular conformation which dictates formation of helicoidal cuticle? *Insect Biochem Mol Biol* **29**, 285-292.
- Imeri AG; Knorr D (1998).** Effect of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. *J Food Sci*, **53**, 1707-1709.
- Inoue H; Ozaki N; Nagasawa H (2001).** Purification and structural determination of a phosphorylated peptide with anti-calcification and chitin-binding activities in the exoskeleton of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**, 1840-1848.
- Inoue H; Ohira T; Ozaki N; Nagasawa H (2004).** A novel calcium-binding peptide from the cuticle of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biochem Biophys Res Com*, **318**, 649-654.
- Islam MdS; Khan S; Tanaka M (2004).** Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. *Mar Pol Bul*, **49**, 103-110.
- Joensen O, Villadsen A (1994).** Ecological sustainable production of chitin and chitosan. In Karnicki ZS, Brzeski MM, Bykowski PJ, Woitasz-Pajak A (Ed.). *Chitin world* (S 38-47). Bremerhaven: Wirtschaftsverlag NW,.
- Johnsen EA; Lewis MJ; Grau CR. (1980).** Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*.. *Poult Sci*, **59**, 1777-1782.

- Johnsen HM et al. (2002).** *Market outlook in the international fish and seafood sector. Alternative product/uses and food safety issues.* Office of the commissioner for aquaculture development, Canada:.
- Jukes TH; Cantor CR (1969).** Evolution of protein molecules. In Murano NH (Ed.), *Mammalian protein metabolism* (S. 21-132). New York:Academic press.
- Kafetzopoulos D; Martinou A; Bouritos V (1993).** Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Appl Biol Sci*, **90**, 2564-2568.
- Kalisz HM. (1988).** Microbial Proteinases. In Fiechter A (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Vol. 36* (S. 1-65). Berlin; Heidelberg:Springer-Verlag.
- Kas HS (1997).** Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencapsulation*, **14**, 689-711.
- Khan TA; Peh KK; Ch'ng HS (2002).** Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J Pharm Pharm Sci*, **5**, 205-12.
- Khor E (2002).** Chitin: a biomaterial in waiting. *Curr Opin Solid St M*, **6**, 313-317.
- Khor E; Lim LY (2003).** Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, **24**, 2339-2349.
- Kifune K (1992).** Clinical application of chitin artificial skin. In S. P. Brine CJ & Zikakis JP (Ed.), *Advances in Chitin and Chitosan* (S. 9-15). New York:Elsevier Science Publishers Ltd.
- Knorr D. (1984).** Use of chitinous polymers in food-A challenge for food research and development. *Food Tech*, **38**, 85-97.

- Kojima K; Okamoto Y; Kojima K; Miyatake K; Fujise H; Shigemasa Y; Minami S (2004).** Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. *J Vet Med Sci*, **66**, 1595-1598.
- Kroepke R; Knueppel A; Nielsen J; Lindemann W (2003).** *Increase of stability of lecithin-and chitosan-containing cosmetic formulations by addition of iminodisuccinic acid.* Patentnummer: DE 10142932, Ger. Offen..
- Kuhlmann K; Czupala A; Haunhorst J; Weiss A; Prasch T; Schorken U (2000).** Preparation and characterization from chitosan from *Mucorales*. *Advan Chitin Sci*, **4**, 7-14
- Kumar GC; Takagi H (1999).** Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv*, **17**, 561-594.
- Kumar R (2000).** A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*, **46**, 1-27.
- Kumar R, Muzzarelli RAA; Muzzarelli C; Sashiwa H; Domb AJ (2004).** Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev*, **104**, 6017-6084.
- Kumari SS; Skinner DM (1995).** Proteins of crustacean exoskeleton: III. Glycoproteins in the bermuda land crab *Gecarcinus lateralis*. *J Exp Zool*, **271**, 413-424.
- Labuza TP; Breene WM (1989).** Applications of "active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *J Food Proc Preserv* **13**, 1-69.
- Lam LS; Khor E (2001).** Biological evaluation of chitin and chitosan materials. Dep. of Chemistry, National University of Singapore, Applied Chemistry, Honors Year Project, .
- Ledderhose G (1876).** *Ber Deutsch Chem Ges*, **9**, 1200.

- Leejeerajumnean A; Ames JM; Owens JD (2000).** Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria. *Lett Appl Microbiol*, **30**, 385-389.
- Li K; Wang Y; Miao Z; Xu D; Tang Y; Feng M (2004).** Chitosan/gelatin composite microcarrier for hepatocyte culture. *Biotechnol Lett*, **26**, 879-883.
- Ling BH; Leung PS; Shang YC (2001).** Overview of the world shrimp industry. In Liung PS; Sharma KR (Ed.), *Economics of management of shrimp and carp farming in Asia: A collection of research papers* (S. 3-11). Bangkok:NACA.
- Lowry OH; Rosebrough NJ; Farr L; Randall RJ (1951).** Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*, **193**, 267-275.
- Manachini PL; Fortina MG; Levati L; Parini C (1998).** Contribution to phenotypic and genotypic characterization of *Bacillus licheniformis* and description of new genomovars. *Syst Appl Microbiol*, **21**, 520-529.
- Mansour M; Amr, D., Bouttefroy A; Linder M; Milliere JB, Linder M (1999).** Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. *J Appl Microbiol*, **86**, 311-24.
- McKay G; Blair HS; Gardner JR (1984).** The adsorption of dyes onto chitin in fixed bed columns and batch adsorbers. *J Appl Polym Sci*, **29**, 1499-1514
- Moerschbacher B (2004).** *Chitosan activates resistance against pathogens after exposure (CARAPAX)*. Symposium zum Stand der Anwendung und Forschung von Chitin und Chitosan, Vortragsabstracts (S. 4); Büsum.
- Morgenstern B; Kammer HW. (1996).** Solvation in cellulose-LiCl-DMAc solutions. *Trends Polym Sci*, **4**, 87-92.
- Muzzarelli RA; Tanfani F; Scarpini G; Laterza G (1980).** The degree of acetylation of chitins by gas chromatography and infrared spectroscopy. *J Biochem Biophys Meth*, **2**, 299-306.

- Muzzarelli RAA (1986).** Filmogenic properties of chitin/chitosan. In Muzzarelli RAA; Jeuniaux C; Gooday CW (Ed.), *Chitin in nature and technology* (S. 389). New York: Plenum.
- Muzzarelli RAA (1996).** Chitosan-based dietary foods *Carbohydr Polym*, **29**, 309-316.
- No HK; Meyers SP (1989).** Recovery of amino acids from seafood processing wastewater with a chitosan-based ligand-exchange system. *J Food Sci*, **54**, 60-62.
- No HK; Meyers SP (1997).** Preparation of chitin and chitosan. In Muzzarelli RAA; Peter MG (Ed.), *Chitin Handbook* (S. 475-489). Grottamare; Italien:Atec.
- Näveke R; Tepper KP (1979).** *Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden*. Stuttgart: G. Fischer Verlag.
- Odier A. (1823).** Memoire sur le Branchiobdelle nouveau genre d'Annelides de la famille des Hirudiner. *Mem Soc Histoire Nat Paris*, **1**, 69-78.
- Ono K; Saito Y; Yura H; Ishikawa K; Kurita A; Akaike T; Ishihara M (2000).** Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. *J Biomed Mater Res*, 289-295.
- Onsoyen E; Skaugrud O (1990).** Metal recovery using chitosan. *J Chem Technol Biotechnol*, **49**, 395-404.
- Oztop HN; Saraydin D ; Cetinus S (2002).** pH-sensitive chitosan films for baker's yeast immobilisation. *Appl Biochem Biotechnol*, **101**, 239-249.
- Pantoliano MW; Whitlow M; Wood JF; Rollence ML; Finzel BC et al. (1988).** The engineering of binding affinity at metal ion binding sites for the stabilization of proteins: subtilisin as a test case. *Biochemistry*, **27**, 8311-8317.
- Park YJ; Lee YM; Park SN; Sheen SY; Chung CP; Lee SJ (2000).** Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, **21**, 153-159.

- Paul W; Sharma CP (2000).** Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review. *S.T.P. Pharma Sciences*, **10**, 5-22.
- Pedroni VI; Gschaider ME; Schulz PC (2003).** UV spectrophotometry: Improvements in the study of the degree of acetylation of chitosan. *Macromol Biosci*, **3**, 531-534.
- Percot A; Viton C; Domard A (2003).** Characterization of shrimp shell deprotenization. *Biomacromolecules*, **4**, 1380-1385.
- Phillips ZEV; Strauch MA (2002).** *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 392-402.
- Pierce GF; Mustoe TA; Lingelbach J; Masakowski VR; Gramates P; Deuel TF (1989).** Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci*, **86**, 2229-2233.
- Poirier M; Charlet G (2002).** Chitin fractionation and characterization in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride solvent system. *Carbohydr Polym*, **50**, 363-370.
- Poulicek M; Jeuniaux C (1991).** Chitin biodegradation in marine environments: an experimental approach. *Biochem Syst Ecol*, **19**, 385-394.
- Prasitsilp M; Jenwithisuk R; Kongsuwan K; Damrongchai N; Watts P (2000).** Cellular responses to chitosan *in vitro*: The importance of deacetylation. *J Mater Sci*, **11**, 773-779.
- Puttipatkhachorn S; Nunthanid J; Yamamoto K; Peck GE (2001).** Drug physical state and drug-polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. *J Control Release*, **75**, 143-153.
- Rabea EI; Badawy ME-T; Stevens CV; Smaghe G; Steurbaut W (2003).** Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, **4**, 1457-1465.

- Rao MB; Aparna M; Tanksale MS; Ghatge MS; Deshpande VV (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 597-635.
- Rao MS; Munoz J; Aye KN; Nuchnoi P; Stevens W (1998).** Use of lactic acid bacteria and protease enzymes in the deproteinization and demineralization of shrimp biowaste for production of chitin. *Advan Chitin Sci*, **3**, 206-214.
- Rey MW.; Ramaiya P; Nelson BA.; Brody-Karpin SD.; Zaretsky EJ.; Tang M et al. (2004).** Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol*, **5**, R77.
- Rhazi M; Desbrieres J; Tolaimate A; Alagui A; Vottero P (2000).** Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan. *Polym Int*, **49**, 337-344.
- Rhoades J; Roller S (2000).** Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 80-86.
- Richards AG (1951).** *The integument of arthropods..* Minneapolis: University of Minnesota Press.
- Rigby GW (1934).** *Chemical products and a process of preparing the same.* Patentnummer: 2,040,879, *US Patent*. .
- Risbud MV; Bhonde MR; Bhonde RR; (2001).** Effect of chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel on proliferation and cytokine expression of endothelial cells; implications in islet immunoisolation. *J Biomed Mater Res*, 300-305.
- Roberts GAF; Taylor KE (1989).** The preparation and characteristics of chitin beads for use in chromatographie. In Skjak-Braek G; Anthonsen T; Sandford PA (Ed.), *Chitin and Chitosan* London; New York:Elsevier Applied Science.
- Roberts GAF (1992).** *Chitin Chemistry.* London: The Macmillan Press Ltd.

- Rodriguez MS; Albertengo LE; Agullo E (2002).** Emulsification capacity of chitosan. *Cabohyd Polym*, **48**, 271-276.
- Rutherford FA; Austin PR (1978).** Marine chitin properties and solvents. In Muzzarrelli RAA; Austin PR (Eds) *Proceedings of the First International Conference on Chitin /Chitosan* (S.182-192); Cambridge: MIT Sea Grant Program.
- Saitou N; Nei M (1987).** The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, **4**, 406-425.
- Santoso U; Wada M; Koguchi T; Iijima T; Yamada K et al. (1993).** Isolation and purification of chitin from indonesian shrimp (*Penaeus merguensis*) shells using actinase E. *J Agr Sci (Tokio)*, **38**, 27-34.
- Sapers GM; Douglass FW (1987).** Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and in juice of raw apple and pear fruits. *J Food Sci*, **52**, 1258-1262.
- Scholz C (2004).** *The role of chitosan in wound healing.*: Symposium zum Stand der Anwendung von Chitin und Chitosan, Vortragsabstracts (S. 8); Büsum
- Shimahara K; Ohkouchi K; Ikeda M (1982).** A new isolation method of crustacean chitin using a proteolytic bacterium, *Pseudomonas maltophilia*. *Chitin Chitosan, Proceeding Int. Conf, 2nd* ,10-14.
- Signini R; Campana Filho SP (1999).** On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. *Pol Bull*, **42**, 159-166.
- Skinner DM, K.S.O.J. (1992).** Proteins of the crustacean exoskeleton. *Am Zool*, **32**, 470-484.
- Stegmeier T (2004).** *Entwicklung von hocheffizienten, biologisch abbaubaren Schlichtemitteln auf der Basis von Chitosan.* Symposium zum Stand der Anwendung und Forschung von Chitin und Chitosan, Vortragsabstracts (S. 15); Büsum.

- Strauch MV; Webb G; Spiegelmann G; Hoch JA (1990).** The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc Natl Acad Sci*, **87**, 1801-1805.
- Terbojevich M; Cosani A; Focher B; Marsano E (1993).** High-performance gel-permeation chromatography of chitosan samples. *Carbohydr Res*, **250**, 301-314.
- Tharanathan RN; Kittur FS (2003).** Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutri*, **43**, 61-87.
- Thomsen H (2003).** Persönliche Mitteilung
- Tjalsma H; Antelmann H; Jongbloed JDH; Braun PG; Darmon E et al. (2004).** Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the 'secrets' of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 207-233.
- Tsigos I; Varum MK; Kafetzopoulos D; Christodoulidou A; Tzanodaskalaki M; Bouriotis V (1995).** Enzymatic Deacetylation of chitin employing chitin deacetylase. *Advan Chitin Sci*, **4**, 98-107.
- Tsigos I; Martinou A; Varum KM; Bouriotis V (1996).** Enzymic deacetylation of chitinous substrates employing chitin deacetylases. *Advan Chitin Sci*, **1**, 59-69.
- Uhrich KE; Cannizzaro SM; Langer RS; Shakesheff KM (1999).** Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev*, **99**, 3181.
- US EPA; McDaniel W (1991).** Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues. *Method* **300.3**, 23-29.
- Varela H; Ferrari MD; Belobadijic L; Weyrauch R; Loperana ML (1996).** Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. *World J Microbiol Biotechnol*, **12**, 643-645.

- Veith B; Herzberg C; Steckel S; Feesche J; Maurer KH; Ehrenreich P et al. (2004).** The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **7**, 204-211.
- Wagner GP; Lo J; Laine R; Almedes M (1993).** Chitin in the epidermal cuticle of a vertebrate (*Paralipophrys trigloides*, Blenneidae, Teleostei). *Experientia* **49**, 317-319.
- Wang SL; Chio SH (1998).** Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme Microb Technol*, **22**, 629-633.
- Weigmann H (1898).** Ueber zwei an der Käseerifung beteiligte Bakterien. *Zentrbl Baktariol Parasitenkr Infektionskr Hyg Abt II*, **4**, 820-834.
- Wijewickreme AN; Kitts DD; Durance TD (1997).** Reaction Conditions Influence the Elementary Composition and Metal Chelating Affinity of Nondialyzable Model Maillard Reaction Products. *J Agric Food Chem*, **45**, 4577-4583.
- Win NN; Stevens WF (2001).** Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Appl Microbiol Biotechnol*, **57**, 224-341.
- Xia W; Liu W; Cui L; Liu Y; Zhong W; Liu W et al. (2004).** Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, **71B**, 373-380.
- Yang JK; Shih IL; Tzeng YM; Wang SL (2000).** Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that deproteinize crustacean waste. *Enzyme Microb Tech*, **26**, 406-413.
- Zakaria H; Cordes A; Otto B (2004).** *Eine neue marine Chitindeacetylase*. Symposium zum Stand der Anwendung und Forschung von Chitin und Chitosan, Vortragsabstracts (S. 6); Büsum.
- Zamost BL; Brantley QI; Elm DD; Beck CM (1990).** Production and characterization of a thermostable protease produced by an asporogenous mutant of *Bacillus stearothermophilus*. *J Ind Microbiol*, **5**, 303-312.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. Bisping danke ich für die Bereitstellung der interessanten Aufgabenstellung sowie für die nette Betreuung im Verlaufe der Arbeit. Weiterhin danke ich für den Transport des nicht gänzlich geruchlosen Probenmaterials von Indonesien nach Deutschland.

Herrn Prof. Dr. P. Fortnagel danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu lesen und zu bewerten.

Bei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken, die diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Bei den Mitgliedern der IG-Biotech möchte ich mich für den konstruktiven wissenschaftlichen Austausch und die nette Bewirtung in Wesselburen und in Karlsruhe bedanken.

Bei meinem Arbeitskreis möchte ich mich für die schöne Arbeitsatmosphäre und das geduldige Ohr während der Kaffeepausen bedanken. Manchmal tut ein wenig jammern einfach gut.

Frau Dr. Cornelia Koob und Franzis Brüse danke ich für die Durchsicht meiner Arbeit und für die konstruktive Kritik.

Tim Willems danke ich für die Ratschläge und Hilfestellung bei der Aufnahme rheologischer Daten.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester Ulrike bedanken, die mich immer unterstützt haben.