

Optimierung der anaeroben biologischen
Chitingewinnung aus Abfällen
der krustentierverarbeitenden Industrie

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTOR-INGENIEURS
von der Fakultät für
Bauingenieur-, Geo- und Umweltwissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Biol. Youmei Xu
aus Beijing

Tag der mündlichen
Prüfung: 19.06.2015

Referent: Prof. Dr. rer. nat. habil. Josef Winter

Korreferent: Prof. Dr.-Ing. E.h. Ph.D. Hermann H. Hahn

Karlsruhe (2015)

Meiner Frau und meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Danksagung

Diese Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers am KIT. Das Projekt wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung finanziert und ist eine Kooperation zwischen Deutschland (Universität Hamburg, Universität Karlsruhe (TH) und Firma SeeLab) und Indonesien (BPP Teknologi und PT. Tirta Kreasi Amrita Jakarta). Ich danke all jenen, die zum Gelingen dieser Arbeit und zum Gelingen dieser fast fünf Jahre beigetragen haben, die ich als lebendige, erfüllte und bereichernde Zeit empfunden habe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Josef Winter, der mich an die hier behandelte Fragestellung herangeführt und meine Arbeit stets unterstützt hat. Herrn Prof. H. H. Hahn PhD danke ich für die Übernahme des Korreferates. In diesen Dank beziehe ich Frau Prof. Dr. Claudia Gallert mit ein, die mir stets hilfreich zur Seite stand. Sie hat meine Arbeit mit zahlreichen wertvollen Anregungen und Ratschlägen unterstützt und war immer bereit, meine Fragen und Probleme zu diskutieren.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Institutes, die Zusammenarbeit war für mich stets sehr angenehm.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Ulrich Lankes vom Engler-Bunte-Institut und Herrn Dr. Stephan Grage von Lehrstuhl für Biochemie und Institut für Biologische Grenzflächen am KIT. Sie haben NMR-Tests bei der Produkt-Charakterisierung durchgeführt. Bei Frau Dr. Gabi Jürges

vom botanischen Institut an der KIT für die Herstellung des Präparates für Elektronenmikroskopie und bei Herrn Dr. Reinhard Schneider und Herrn Mohammad Fotouhi vom Laboratorium für Elektronenmikroskopie am KIT bedanke ich mich für die Foto-Aufnahmen und die Calcium- bzw. Stickstoff-Lokalisierung in Shrimp-Schalen bzw. Produkten mit dem Elektronenmikroskop.

Weiter gilt mein Dank meiner Eltern, Guangxiang Xu und Xiaoman Zhou. Ohne ihre Förderung, Unterstützung und Anerkennung meines Studiums und meiner Arbeit über viele Jahre hinweg wäre diese Dissertation nicht denkbar gewesen. Schließlich danke ich meiner Frau Dr. Wei Lao, nicht nur für ihre Geduld und ihre Ermutigung, sondern auch für die Unterstützung bei der Überarbeitung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problematik in der Krustentierindustrie	1
1.2	Chemische Eigenschaften des Chitins	2
1.3	Chitingewinnung aus Shrimp-Schalen	5
1.3.1	Chemische Methoden	5
1.3.2	Biologische Methoden	5
1.4	Qualität und Anwendungsgebiete von Chitin und Chitosan . .	10
1.5	Ziel der Arbeit	15
2	Material, Medien und Methoden	16
2.1	Material	16
2.2	Nährmedium	18
2.2.1	Peptonhaltige Medien	19
2.2.2	Shrimphaltiges Medium	20
2.2.3	Chitinfreies Medium	21
2.2.4	MRS-Medium für Milchsäurebakterien	23

2.2.5	Chinablau-Lactose-Medium	24
2.3	Analytische Methoden	25
2.3.1	Bestimmung des Kjeldahlstickstoffes (TKN) und des organisch gebundenen Stickstoffes	25
2.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes	28
2.3.3	Bestimmung des Chitingehaltes	30
2.3.4	Bestimmung des Wassergehaltes	31
2.3.5	Bestimmung des Calciumgehaltes	31
2.3.6	Bestimmung des pH-Wertes	31
2.3.7	Bestimmung der Glukose	31
2.3.8	Bestimmung des Lactates	33
2.3.9	Bestimmung der Wachstumskurve	36
2.3.10	Bestimmung der Keimzahl	36
2.3.11	Gesamt-Zellzahl	38
2.3.12	Bestimmung der proteolytischen Aktivität	39
2.3.13	Viskosität	39
2.3.14	Elektronenmikroskopie	42
2.3.15	Festkörper-Kernresonanz-Spektroskopie	49
2.3.16	Atom-Absorptions-Spektrometrie	50
2.4	Batch-Ansätze zur biologischen Deproteinierung und Demine- ralisierung von Garnelenschalen für die Chitin und Chitosan- gewinnung	51

3	Ergebnisse	56
3.1	Batch-Ansätze zur biologischen Deproteinierung und Demineralisierung von Garnelenschalen für die Chitin und Chitosan-gewinnung	56
3.1.1	Deproteinierung von Garnelenschalen ohne externes Inokulum	56
3.1.2	Deproteinierung mit Anreicherungskulturen aus Shrimp-Schalen	58
3.1.3	Herstellung von Inokula aus anderen Quellen	61
3.1.4	Deproteinierung mit Inokula aus anderen Quellen	64
3.1.5	Deproteinierung von Exuvien mit der Anreicherungs-kultur HF	65
3.1.6	Vergleich der Deproteinierung von nassen und trockenen Shrimp-Schalen mit Anreicherungskulturen M1, M2, HF und FS	66
3.1.7	Deproteinierung von Shrimp-Schalen aus Büsum mit unterschiedlichen Inokulumsdichten an proteolytischen Bakterien (HF)	73
3.1.8	Untersuchung der Lagerungsfähigkeit von proteolyti-schen Anreicherungskulturen aus Hackfleisch	74
3.1.9	Demineralisierung mit Anreicherungskulturen von Milchsäue-rebakterien aus Bioghurt	78
3.1.10	Isolierung einer Reinkultur von Milchsäurebakterien aus Bioghurt	79

3.1.11	Demineralisierung von Kalkchitin mit unterschiedlichem Bakterien-Feuchtgewicht von <i>Lactobacillus casei</i>	83
3.1.12	Biologische Demineralisierung und Deproteinierung von Garnelenschalen	84
3.1.13	Biologisches Verfahren im 13 Liter- bzw. 300 Liter- Maßstab	86
3.2	Viskosität	92
3.3	Elektronenmikroskopie zur Calcium- und Stickstoff-Lokalisierung	94
3.4	NMR	101
4	Diskussion	103
4.1	Grundlagen des biologischen Verfahrens	103
4.1.1	Biologische Chitingewinnung	104
4.2	Optimierung der Bakterienkulturen	109
4.2.1	Optimierung der proteolytischen Anreicherungskulturen	109
4.2.2	Optimierung der Milchsäurebakterienkulturen	112
4.3	Durchführung in der Industrie	113
4.4	Schlusswort	116
	Literatur	125

Tabellenverzeichnis

1.1	Anwendungsmöglichkeiten von Chitosan	12
2.1	Zusammensetzung von verwendeten Shrimp-Schalen	17
2.2	Schwermetall-Zusammensetzung der verwendeten Shrimp-Schalen (Einheiten: $\mu\text{g/g}$ trockene Schalen)	18
2.3	Peptonhaltiges Medium (M1)	19
2.4	Peptonhaltiges Medium (M2)	19
2.5	Peptonhaltiges Medium (M3)	20
2.6	Shrimphaltiges Medium (M5)	20
2.7	Chitinfreies Medium M6	21
2.8	Chitinfreies Medium M7	22
2.9	MRS-Medium	23
2.10	Chinablau-Lactose-Medium	24
2.11	Lowry-Stammlösungen	28
2.12	Glucose-Reagenz	32
2.13	DEV-Nähragar	37

2.14	Selektivagar	38
2.15	Konzentrationen [mg/l] der verschiedenen Schwermetalle zur Kalibrierung	51
3.1	Vergleich der Stickstoff-Eliminationsgeschwindigkeiten (Ein- heit: mgN/h)	72
3.2	Vergleich des Verhältnisses zwischen Ammonium und gelösten TKN zu verschiedenen Zeitpunkten, Einheit: %	73
3.3	Vergärung verschiedener Kohlenstoffquellen durch die beiden <i>Lactobacillus Isolate</i>	82
4.1	Zusammenstellung unterschiedlicher Mikroorganismen zur De- proteinierung und Demineralisierung von Garnelenabfällen und der erzielten Eliminationsleistung	107
4.2	Vergleich zwischen verschiedenen Anreicherungskulturen	110
4.3	Unterschiede zwischen aerober biologischer Chitingewinnung (Universität Hamburg) und anaerober biologischen Chitinge- winnung (Universität Karlsruhe (TH)	111

Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur von Chitin, Chitosan und Zellulose	3
1.2	Verschiedene Verfahren zur Chitingewinnung	9
2.1	Ammonium-Kalibrier-Kurve 10.07.2003	28
2.2	Lowry-Kalibrier-Kurve 17.10.2006	30
2.3	Glukose-Kalibrier-Kurve 24.05.2006	33
2.4	Viskosimeter Brookfield RVDV-II	42
2.5	Mit Omega-System bestücktes Transmissions-Elektronenmikro- skop der Firma Zeiss	47
3.1	Protein-Umsetzung mit Bakterien aus Shrimp-Schalen ohne Inokulum	57
3.2	Wachstumkurve von proteolytischen Bakterien aus Shrimp- Schalen in den Medien M1, M2 und M3	59
3.3	Protein-Umsetzung mit Anreicherungskulturen aus Shrimp- Schalen	60

3.4	Protein-Umsetzung mit Anreicherungskulturen aus verschiedenen Quellen, gemessen an Hand der Ammoniumfreisetzung.	62
3.5	Wachstumkurve von Anreicherungskulturen aus Faulschlamm oder Hackfleisch (FS=Faulschlamm, HF=Hackfleisch)	64
3.6	Batch-Ansatz mit Exuvien und einer proteolytischen Anreicherungskultur aus Hackfleisch	66
3.7	Behandlung nasser Shrimp-Schalen von <i>P. monodon</i> mit den Anreicherungskulturen M1 und M2 aus Shrimp-Schalen	68
3.8	Behandlung trockener Shrimp-Schalen von <i>P. monodon</i> mit den Anreicherungskulturen M1 und M2 aus Shrimp-Schalen für Deproteinierung mit ausschließlicher Demineralisierung nach Glucose und Lactobacillenzusatz	69
3.9	Behandlung nasser Shrimp-Schalen von <i>P. monodon</i> mit den Anreicherungskulturen FS und HF aus Faulschlamm und Hackfleisch	70
3.10	Behandlung trockener Shrimp-Schalen von <i>P. monodon</i> mit den Anreicherungskulturen FS und HF aus Faulschlamm und Hackfleisch	71
3.11	Protein-Elimination bei unterschiedlichem Bakterien-Feuchtgewicht	74
3.12	Lagerfähigkeit der HF-Kulturen unter aeroben Bedingungen .	76
3.13	Lagerfähigkeit der HF-Kulturen unter anaeroben Bedingungen	77
3.14	Wachstumkurve von Milchsäurebakterien aus Bioghurt	78
3.15	Decalcifizierung von Shrimp-Schalen mit einem <i>Lactobacillus casei</i> Isolat	83

3.16	Demineralisierung der Abdomenfraktion von indonesischen Shrimp-Schalen <i>P. monodon</i> als erster Schritt der Chitinreinigung . . .	85
3.17	Deproteinierung von entkalkten Shrimp-Abdomen von <i>P. monodon</i> aus Indonesien	86
3.18	Viskosität von verschiedenen Chitin-Produkten: 1) käufliches Chitin von der Firma Roth aus chemischem Verfahren, 2) und 3) Chitin von <i>Crangon crangon</i> aus biologischem Verfahren, 4) und 5) Chitin von <i>P. monodon</i> aus biologischem Verfahren.	93
3.19	Rasterelektronenmikroskopische Sekundärelektronen-Abbildung der Oberfläche von Shrimp-Schalen von <i>P. monodon</i> im Bereich des Abdomens	95
3.20	Elektronenmikroskopische Übersichtsabbildung (5000-fache Vergrößerung) einer Probe aus Shrimp-Schalen von <i>P. monodon</i> und mittels energiegefilterter TEM-Abbildung erhaltene Darstellung der Ca- und N-Verteilung im Bereich der Exocuticula.	97
3.21	EELS-Spektren unterschiedlicher Bereiche der Shrimp-Schalen von <i>P. monodon</i> zu unterschiedlichen Stadien der Chitin-Aufbereitung: a) Exocuticula von unbehandeltem <i>P. monodon</i> , b) Endocuticula nach Deproteinierung und c) nach Demineralisierung . . .	100
3.22	NMR-Untersuchung vom gereinigtem Chitin nach Deproteinierung und Demineralisierung	102
4.1	Versuch unter Laborbedingungen	114
4.2	Mechanische Vorbehandlung der Shrimp-Schalen in der Firma SeeLab Büsum (links) und Fermentation (rechts)	115

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AW	Abwasser
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaCO ₃	Calciumcarbonat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DD	(engl.: „degree of deacetylation“) Deacetylierungsgrad
dest. Wasser	destilliertes Wasser
DM	Demineralisiert
DP	Deproteiniert
FAO	(engl.: „Food and Agriculture Organisation“) Organisation für Landwirtschaft und Ernährung
g	Gramm
GlcN	D-Glucosamin
GlcNac	N-Acetylglucosamin
h	Stunde
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
KBE	Koloniebildende Einheiten

KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
MgSO_4	Magnesiumsulfat
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mPas	milli-Pascalsekunden
mmol	Millimol
N	Stickstoff
NH_3	Ammoniak
NH_4^+	Ammonium
NMP	N-Methyl-2-Pyrrolidon
N-Quelle	Stickstoffquelle
PCR	(engl.: „polymerase chain reaction“) Polymerase Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TKN	Gesamt-Stickstoff nach Kjeldahl
TS	Trockenmassenkonzentration
TV	Trockenverlust
U	(engl.: „Unit“) Einheit
upm	Umdrehungen pro Minute
VF	Verdünnungsfaktor
w/v	(engl.: „weight per volume“) Gewichtsprozent

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Problematik in der Krustentierindustrie

Chitin ist neben Zellulose und Stärke eines der am häufigsten vorkommenden Biopolymere auf der Erde und hat vielfältige Anwendungsmöglichkeiten (Tabelle 1.1). Schätzungsweise werden in der Natur jährlich 10^6 bis 10^7 Tonnen Chitin produziert. Die Zunahme der Weltbevölkerung und der damit steigende Rohstoffbedarf erfordern die Suche nach alternativen, regenerierbaren Rohstoffen. So wird Chitin zum Beispiel von Arthropoden oder Pilzen gebildet. Im Gegensatz zu vielen synthetischen Verbindungen ist Chitin biologisch abbaubar. Es sind bereits die unterschiedlichsten Chitinprodukte auf dem Markt und es werden immer neue Anwendungsgebiete gefunden und erforscht.

Shrimp-Schalen sind ein Abfallprodukt der krustentierverarbeitenden Industrie. Im Jahr 2005 wurden beispielsweise in Indonesien 556 639 Tonnen Krustentiere gefangen (im Vergleich: 23 369 Tonnen in Deutschland im gleichen Zeitraum), davon gingen rund $\frac{2}{3}$ in den Export [11]. Da in den meisten

Fällen nur das Shrimp-Fleisch exportiert wird, entstehen große Mengen an Schalenabfällen ($\sim 40\%$ des Fanggewichtes), die in den betreffenden Ländern ein Umweltproblem darstellen, da keine geregelte Entsorgung durchgeführt werden kann. Die meisten Shrimp-Schalen verrotten an Land, werden auf See verklappt oder als Futtermittelzusatz verarbeitet. Um das Problem der Entsorgung zu lösen und gleichzeitig Gewinn damit zu erzielen, wird versucht, Chitin aus den Abfällen zu gewinnen und dabei von den Chitinpanzern mit Hilfe von Mikroorganismen für die Tierindustrie wertvolles Futterprotein zu gewinnen.

1.2 Chemische Eigenschaften des Chitins

Bei Arthropoden, welche 80% der heute auf der Erde lebenden Spezies stellen, ist Chitin ein Bestandteil des Exoskeletts. Dieses Exoskelett, welches aus Chitin-, Protein-Fasern und Calciumcarbonat besteht, besitzt besondere Eigenschaften, die der Cuticula Festigkeit, Biugsamkeit und Wasserundurchlässigkeit verleiht. Diese Art des Exoskeletts hat sich während der Evolution als sehr vorteilhaft bewährt, sodass eine Vielzahl von Tieren, wie z.B. Insekten, Spinnen, Krebstiere, aber auch andere Tiere wie Schnecken und Moostierchen diese Art des stabilisierenden Außenskeletts tragen. Der Chitingehalt variiert allerdings bei den unterschiedlichen Crustaceen je nach Kalkgehalt des Panzers deutlich.

Ein weiteres natürliches Vorkommen von Chitin stellen die Zellwände von niederen und höheren Pilzen (Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota) dar. Dort ist Chitin mit Proteinen und weiteren Polysacchariden wie Mannan, Glucan und Polygalactosamin assoziiert.

Chitin ist ein aminozuckerhaltiges Polysaccharid mit der allgemeinen Formel $(C_6H_{13}NO_5)_n$. Es besteht aus 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose-Einheiten (N-Acetylglucosamin, GlcNac), welche β -(1,4)-glycosidisch verknüpft sind. Das Chitin kommt in Kettenlängen von 6000 - 12000 Monosaccharid-Einheiten in der Natur vor.

Im Jahr 1811 entdeckte der französische Naturwissenschaftler Henri Braconnot eine alkaliresistente Substanz aus einigen höheren Pilzen und bezeichnete diese Substanz als „Fugine“. Den Namen „Chitin“ führte Odier im Jahr 1823 ein, der unabhängig von Braconnot einen unlöslichen Rest aus den Elytren des Maukäfers extrahierte (griechisch $\chi\iota\tau\tau\upsilon$: Tunika oder Abdeckung). Die Struktur des Chitin-Moleküls publizierte er im Jahr 1876.

Noch eine wichtige Substanz ist das Chitinderivat - Chitosan, ein Polymer aus 2-Amino-2-desoxyglucose (Glucosamin) - Monomeren, der deacetylierten Form des Chitinbausteins, welche ebenfalls β -1,4-glykosidisch miteinander verbunden sind. Beide Polymere sind der Zellulose sehr ähnlich.

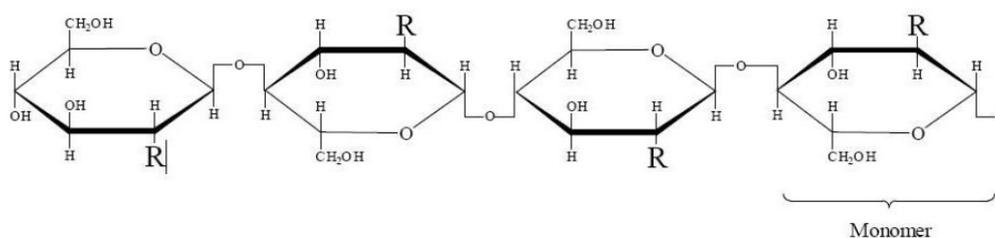


Abb. 1.1: Struktur von Chitin ($R = -NH-CO-CH_3$), Chitosan ($R = -NH_2$) und Zellulose ($R = -CH_2OH$)

Die 3 in Abb 1.1 gezeigten Verbindungen unterscheiden sich bezüglich ihrer Substituenten (R). Bei Cellulose ist ein Hydroxyrest verknüpft. Die monomere Einheit ist Glucose. Chitosan hat einen Aminorest, sodass die monomere Einheit D-Glucosamin (> 50%) ist. Das Monomer von Chitin ist

N-Acetyl-D-Glucosamin (> 50%). Es ist mit einem Acetamidorest verknüpft. In der Darstellung sind 4 verknüpfte Monomere abgebildet [44].

Chitin und Chitosan sind Heteropolymere, die aus den beiden Monomeren Glucosamin und N-Acetyl-Glucosamin bestehen. Bei einem Anteil von über 50% Glucosamin spricht man von Chitosan. Hauptsächlich wird der Deacetylierungsgrad (DD = degree of deacetylation) angegeben. Diese Aussagen über das Molekül geben Aufschluss über die Eigenschaften. Die deacetylierten Einheiten besitzen eine freie Aminogruppe, welche das chemische Verhalten des Moleküls erklärt, z.B. die adsorbierende Eigenschaft von Chitosan.

Die Kettenlänge (Polymerisationsgrad) ist von der Herkunft des Materials abhängig und stark schwankend. Bei Insekten und Crustaceen sind durchschnittlich 6000-12000 Monomereinheiten miteinander verknüpft und entsprechen einer mittleren Molmasse von $1-2 \cdot 10^6$ Dalton. Bei Pilzen wurde dagegen ein geringerer Polymerisationsgrad festgestellt.

Auf Grund der kompakten Struktur ist Chitin fast unlöslich. Mit steigender Kettenlänge nimmt die Löslichkeit des Chitins ab. Chitin mit einem niedrigen Polymerisationsgrad (Chitooligomere) ist in Wasser löslich. Langkettiges Chitin kann durch starke Säuren gelöst werden, wie z.B. 6 M HCl. Dabei wird jedoch die Kettenlänge des Moleküls reduziert (degradative Lösungsmittel). Es wurden bis jetzt nur wenige nicht degradative Lösungsmittelsysteme beschrieben.

Ein Chitinmonomer hat eine molare Masse von 203,19 g/mol.

1.3 Chitingewinnung aus Shrimp-Schalen

Chitin kann nicht industriell synthetisiert werden und wird im industriellen Maßstab bisher meist mit chemischen Verfahren aus Shrimp-Schalen hergestellt. Dieses Verfahren benötigt große Mengen an Salzsäure und Natronlauge und belastet dadurch die Umwelt.

1.3.1 Chemische Methoden

In den Shrimp-Schalen gibt es 3 Hauptbestandteile (über 90%): Chitin, Protein und Calcium. Für die chemische Gewinnung von Chitin und Chitosan werden große Mengen Chemikalien benötigt, welche zum Einen umweltbelastend sind und zum Anderen transportiert und fachgerecht entsorgt werden müssen. Dies sind Kostenfaktoren, die das Produkt so stark verteuern, dass sich der Einsatz für viele Zweige der Anwendung aus wirtschaftlichen Gründen nicht lohnt.

Weiterhin entstehen durch das chemische Verfahren Kettenbrüche, welche wiederum zu einer Qualitätsminderung des Chitin führen.

Zur Herstellung des Chitinderivates Chitosan ist ein Deacetylierungsschritt notwendig, bei dem die Acylgruppen vom Chitin abgetrennt werden. Dies erfordert hohe Temperaturen und konzentrierte Laugen. Dadurch entsteht ein Produkt mit bis zu 90% Deacetylierungsgrad.

1.3.2 Biologische Methoden

Mit biologischen Methoden soll eine Möglichkeit gefunden werden, welche die Umwelt nicht so stark belastet, und gleichzeitig die entstehenden Ketten-

brüche während des chemischen Verfahrens verringert.

Anaerobe Chitingewinnung

Zur Gewinnung des Chitin aus Shrimp-Schalen wird in zwei Schritten vorgegangen: Deproteinierung und Demineralisierung.

Bei der Deproteinierung werden proteolytische Bakterien verwendet, genauer gesagt proteolytische Enzyme. Der größte Anteil der Proteine sind Fleisch-Proteine, die beim Pulen haften bleiben. Der kleinere Teil sind die Proteine, welche zwischen den Schalen-Schichten als Struktur eingelagert sind. In der Phase der Deproteinierung werden die Proteine zu gelösten Proteinen, Peptiden, Aminosäuren und Ammonium umgesetzt. Die Menge des eingesetzten Inokulums bestimmt dabei die Deproteinierungsrate.

Bei der Demineralisierung werden Bakterien nicht direkt auf das Calcium angesetzt, sondern es werden Milchsäurebakterien verwendet. Die Milchsäurebakterien setzen Glukose unter anaeroben Bedingungen über die Milchsäuregärung zu Milchsäure um. Mit dem Calcium der Shrimp-Schalen wird Milchsäure in Calciumlactat umgewandelt. Dadurch wird nicht gelöstes Calcium zu gelöstem Calcium.

Nach einem Trenn- und Waschschrift erhält man Chitin (Poly-N-Acetyl-D-Glucosamin). Die Kettenlänge des Biopolymers und damit der Molmassenmittelwert hängt stark von dem eingesetzten Verfahren ab.

Die grundlegende Fragestellung dieser Arbeit ist, geeignete Bateriaenkulturen zur anaeroben Aufreinigung des Chitins zu isolieren. In dieser Arbeit werden mehrere proteolytischen Anreicherungskulturen und eine Anreicherungskultur bzw. Reinkultur von Milchsäurebakterien untersucht.

Aerobe Chitingewinnung und seine Vor- und Nachteile

An der Universität Hamburg [8] wird ein aerobes Verfahren zur Chitingewinnung erforscht. Dabei wird eine Reinkultur verwendet, welche direkt aus Shrimp-Schalen gewonnen wird, um Protein zu eliminieren.

Das aerobe Verfahren der Universität Hamburg läuft optimal bei 55 °C. Bei 37 °C ist die Aktivität der Bakterien stark vermindert. Es ist technisch aufwendig und es muss viel Energie für die Beheizung und Belüftung aufgewendet werden.

Das anaerobe Verfahren arbeitet kostengünstiger: 33-37 °C Inkubationstemperatur ist nur knapp über der normalen Temperatur in Indonesien und eine Belüftung ist nicht notwendig.

Andere Verfahren

Auf dem Gebiet der biologischen Chitingewinnung wurde in den letzten Jahren sehr viel geforscht. So gibt es z.B. von dem spanischen Wissenschaftler Cremades [7] und seinen Kollegen ein chemisches und biologisches Mischverfahren. In diesem Verfahren werden die Shrimp-Schalen zuerst gemahlen und dann mit dem biologischen Verfahren die meisten Proteine und das gesamte Calcium eliminiert. Danach wird das Zwischenprodukt nochmals mit NaOH behandelt. Damit erhält man endgültig reines Chitin.

Die Vorteile dieses Mischverfahrens liegen in der kurzen Dauer und damit verbunden in der Vermeidung von Kettenbrüchen. Auch werden weniger Chemikalien benötigt. Durch die Laugenbehandlung werden die anhaftenden Bakterien entfernt. Das Endergebnis ist ein hochwertiges Chitin-Produkt.

In folgendem Schema (Abb. 1.2) werden die 3 Verfahren zusammenge-

fasst. In der linken Spalte ist das chemisches Verfahren, in der mittleren Spalte ist das biologisches Verfahren und in der rechten Spalte ist das Combi-Verfahren dargestellt.

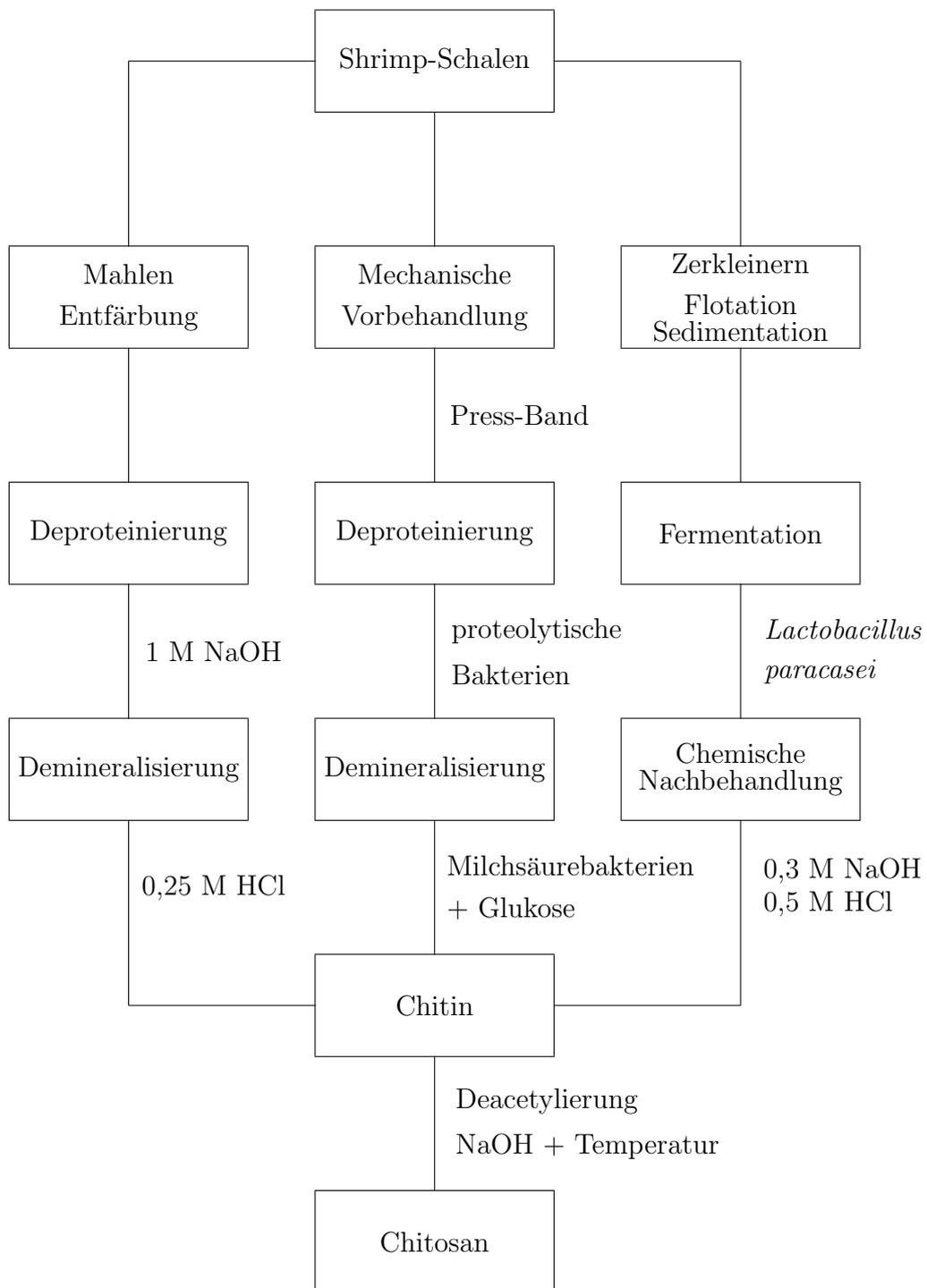


Abb. 1.2: Verschiedene Verfahren zur Chitingewinnung: links: chemisches Verfahren; Mitte: biologisches Verfahren; rechts: Kombi-Verfahren

1.4 Qualität und Anwendungsgebiete von Chitin und Chitosan

Auf dem Weltmarkt ist die Qualität von Chitin und Chitosan sehr entscheidend. Chitosan mit hoher Qualität kann bis zu 2.500 Euro pro Kilogramm kosten, bei niedriger Qualität liegt der Preis unter 10 Euro. Die Qualität wird nicht nur durch die Kettenlänge (Viskosität) von Chitosan bestimmt, sondern auch durch die Reinheit und Stabilität. Z.B. muss Chitosan im medizinischen Bereich nicht nur längere Ketten haben, sondern auch proteinfrei sein, um Allergien zu vermeiden.

Chitin bzw. Chitosan besitzen viele Eigenschaften, die sie für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet machen [24] [25] [49]. Sie gewinnen als nachwachsender Rohstoff immer mehr an Bedeutung. Es werden immer mehr Anwendungsgebiete für Chitosan entdeckt (Medizin, Biotechnologie, Kosmetik, Papier- Textilie-Industrie, Landwirtschaft, Lebensmittelindustrie, Abwassertechnik, usw.).

Es gibt viele Vorteile, die die Verwendung von Chitin und Chitosan rechtfertigen. Zum einen handelt es sich hierbei um natürliche Produkte, die auf einem natürlichen Weg abgebaut werden können. Zum anderen sind sie nicht giftig und als nachwachsender Rohstoff ständig verfügbar. Auf Grund seiner besseren Löslichkeit wird hauptsächlich Chitosan verwendet. In diesem Abschnitt sollen ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten von Chitosan vorgestellt werden.

Chitosan ist haemostatisch, bakteriostatisch, fungistatisch, spermizid, anticancerogen, anticholesteremisch und atoxisch. [8] Ebenfalls besitzt Chitosan eine hohe biologische Kompatibilität zu pflanzlichen und tierischen Ge-

weben. Chitosan kann auf Grund seiner hohen Ladungsdichte an negativ geladenen Oberflächen haften und mit Polyanionen Gele ausbilden. Daher werden viele Anwendungen als Gele oder Mikrokapseln beschrieben, welche als Trägermaterialien für immobilisierte Zellen oder Enzyme dienen.

Eine wichtige Anwendung findet Chitosan als Wundauflage. Durch seine antibakterielle Wirkung, die Wasseraufnahmekapazität, die Sauerstoffdurchlässigkeit, die Anregung der Collagen-Synthese und die Förderung der Makrophagen- und Wachstumsfaktorenbildung fördert Chitosan die schnelle Regeneration der Haut. Hierbei sind die wasserabsorbierenden und sauerstoffdurchlässigen Eigenschaften des Chitosanfilms von Vorteil. Voraussetzung für diese Anwendung ist eine hohe Qualität des Chitins. Diese kann jedoch bis jetzt noch nicht in einem ausreichendem Maße von der Industrie geliefert werden. Das meiste in der Medizin verwendete Chitosan kommt zum jetzigen Zeitpunkt von Insekten und Pilzen.

Chitosan kann beim Aufsprühen auf eine Oberfläche und gleichzeitigem Austrocknen Filme mit guten mechanischen Eigenschaften und Permeabilitätsverhalten ausbilden. Es wird auf Grund seiner Metall-komplexierenden Eigenschaften auch in der Abwasserreinigung eingesetzt. Durch Chitosan können Aminosäuren, Farbstoffe, Schwermetalle, radioaktive Stoffe und Tannin aus Abwässern zurückgewonnen werden.

Ein Teil der Anwendungsmöglichkeiten von Chitosan ist in der Tabelle 1.1 dargestellt.

Tab. 1.1: Anwendungsmöglichkeiten von Chitosan

Bereich	Anwendung	Eigenschaft und Auswirkung
Medizin und Pharmazie	Wundheilung [45], künstliche Haut [22]	Antibakteriell, Matrix bildend, Stimulation des Heilungsprozesses
	Chirurgisches Nahtmaterial	Fasernbildend, im Körper durch Lysozym abbaubar, antibakteriell.
	Wirkstoffträger	Fasern bzw. Folien bildend, abbau- bar.
	Cholesterin senkend	Bindung von Lipiden, weniger Bil- dung von Gallensäure
	Gewichtreduktion	Entzieht die Fette der Nahrung bei der Verdauung durch Komplexbil- dung.
	Gegen Arthritis	Glucosamin als Abbauprodukt wirkt entzündungshemmend.
Biotechno- logie und Umwel- technik	Immobilisation von Zellen und Enzymen [32]	Enzyme für den Abbau schädlicher Stoffe in Abwässern können mit Chitosan immobilisiert werden.
	Chromatographie [39]	Innere Beschichtung der Trennsäule
	Entfernung von Schwerme- tall und radioaktiven Stoffen [10]	selektiver Ionenaustauscher für Schwermetalle wie Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , jedoch nicht Ca^{2+} , Mg^{2+} .
	Entfernung von Proteinen aus AW [30]	Chitosan coaguliert Proteine, die- se können dann leichter abgetrennt werden.

Tab. 1.1: Anwendungsmöglichkeiten von Chitosan (fortgesetzt)

Bereich	Anwendung	Eigenschaft und Auswirkung
	Entfernung von Farbstoffen aus AW [27]	Schwer abbaubare Farbstoffe der Textilindustrie können mit Chitosan aus dem Abwasser entfernt werden.
	Erhöhung der Wirkung von Kläranlagen	Durch Zugabe von Chitosan zum Belebtschlamm von Kläranlagen kann deren Umsatzrate erhöht werden. Bildung von Oberflächen, welche von Bakterien besiedelt werden können.
Kosmetik	Hautcremes	Wasserverlust wird verringert, Haut wird weicher und flexibler; als Polykation bindet Chitosan Parfümöle und pflegende Bestandteile der Cremes. Antibakteriell.
	Haarpflege	Gelöstes Chitosan bildet einen Film ums Haar, welcher das Haar bruchfest und formstabil macht.
	Mundhygiene	Chitin als Putzkörper in Zahnpasta, Chitosan als Gelbasis für Zahncreme verringert die Bildung von Plaque.

Tab. 1.1: Anwendungsmöglichkeiten von Chitosan (fortgesetzt)

Bereich	Anwendung	Eigenschaft und Auswirkung
Papier- industrie	Verbesserung von Papier	Beimischung von Chitosan erhöht die Reißfestigkeit, eine Beschichtung verbessert die Farbaufnahme des Papiers.
Textil- industrie	Bestandteil von Fasern und Stoffen	Antimikrobielle Eigenschaften der Fasern, mit Chitosan beschichtete Stoffe lassen sich besser bedrucken.
	Saatbeize	Chitosan verringert die Anzahl pflanzenpathogener Pilze, indem es Chitinasen in Bodenorganismen und Pflanzen induziert. Es kann auch als Träger für Pestizide eingesetzt werden.
	Kompost	Chitin als Kompostbestandteil erhöht die Chitinase-Aktivität im Boden. Diese zersetzt pflanzenpathogene Pilze.
	Pflanzenschutz	Chitosan weist antivirale Eigenschaften auf. Es verringert die Vermehrung der Viren.
Nahrungs- mittel	Beschichtung von Früchten	Hemmung von Fäulnispilzen durch Induktion von Chitinasen, Reduzierung des Wasserverlustes durch Filmbildung.

Tab. 1.1: Anwendungsmöglichkeiten von Chitosan (fortgesetzt)

Bereich	Anwendung	Eigenschaft und Auswirkung
	Immobilisation proteolytischer Enzyme [13]	Käseproduktion
	Nahrungszusatzstoff [40]	Emulsion von Wasser in Ölgemischen

1.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen des Verbundprojektes IG-Biotech des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF), an dem die Universität Karlsruhe (TH), die Universität Hamburg (TUHH), Firma SeeLab Wesselburen, BPPT Jakarta und Pt. Windika Utama Semarang beteiligt waren, sollte letztendlich ein umweltfreundlicher und effektiver technischer Prozess zur biologischen Chitinaufreinigung entwickelt werden. Es wurden aerobe bzw. anaerobe Verfahren und Verfahren für die Deacetylierung von Chitin zu Chitosan erforscht und optimiert.

Diese Dissertation dient der Untersuchung der anaeroben biologischen Aufreinigung von Chitin aus Abfällen der Krustentierindustrie durch Mikroorganismen unter unsterilen Bedingungen.

Kapitel 2

Material, Medien und Methoden

2.1 Material

In dieser Arbeit wurden insgesamt 3 verschiedene Arten von Shrimp-Schalen verwendet: Abdomen von *Penaeus monodon* aus Indonesien, *Crangon crangon* aus der Nordsee und Exuvien vom *Penaeus vannamei* aus der Nordsee. Die indonesischen Shrimp-Schalen wurden im Jahr 2001 aus Indonesien geliefert und während des Projektes in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt. Die Shrimp-Schalen aus der Nordsee kamen von unseren Projektpartner Firma SeeLab. Diese Shrimp-Schalen wurden vorher mechanisch behandelt, d.h. mit einer konventionellen Bandpresse gepresst. Die Press-Flüssigkeit enthält sehr viel Protein, welches nach Trocknung als Tier-Zusatzfutter eingesetzt werden kann.

Die Schalen werden bei der mechanischen Aufarbeitung 2-3 mal mit Wasser resuspendiert. Es wird massenmäßig ca. das 10-fache des Naßgewichtes

der Schalen an Wasser benötigt. Dabei ist nicht berücksichtigt, dass das Wasser mehrmals verwendet werden kann. Der Aschewert, also der Calciumanteil, wird nicht reduziert. Der Protein-Gehalt, besser Fleisch-Anteil, wird um mindestens 50% reduziert. Der Verlust an Chitin ist gering. Der Wasser-Anteil (Trocknungsverlust) der Schalen wird von ca. 70-80% auf 50% reduziert.

Exuvien (auch Exuvia; lat.: exuviae - abgelegte (Tier)haut, Hemd) sind die bei der Häutung (Ecdysis) abgeworfenen Schalen der Krustentiere. In diesem Projekt wurden Exuvien von *P. vannamei* untersucht.

Die Zusammensetzung der 3 verwendeten Shrimp-Schalen ist in Tabelle 2.1 gezeigt.

Tab. 2.1: Zusammensetzung von verwendeten Shrimp-Schalen

		Chitin	Protein	Calcium	Sonstiges
<i>P. monodon</i>	Abdomen	36 %	30 %	12 %	22 %
<i>C. crangon</i>	behandelt	46 %	10 %	18 %	26 %
<i>P. vannamei</i>	Exuvien	51 %	15 %	13 %	21 %

Calcium wird in den Shrimp-Schalen meistens als CaCO_3 gebunden. Sonstiges beinhaltet CO_3^{2-} , Fett, Mineralien, usw.

In den indonesischen Shrimp-Schalen gibt es noch viele Proteine, dagegen sind die Protein-Anteile bei den abgepressten Shrimp-Schalen von der Nordsee durch die Vorbehandlung mit der Bandpresse geringer. Bei der Häutung werden die meisten Proteine der Shrimp-Schalen von der Tieren wieder aufgenommen. Somit enthalten die Exuvien einen geringen Protein-Anteil. Interessant hierbei ist, dass der Chitin-Anteil von Exuvien sehr hoch ist. Somit entsteht eine hochwertige Quelle für die biologische Chitingewinnung.

Obwohl die Shrimp-Schalen aus der Nordsee und die Exuvien einen hohen Anteil von Chitin enthalten, muss es sich hierbei aber nicht um die besten Quellen für biologische Chitingewinnung handeln. Allerdings wurde in dieser Untersuchung festgestellt, dass beide für die biologische Chitingewinnung sehr gut geeignet sind.

Während des Projektes wurden die Shrimp-Schalen auch auf Schwermetalle untersucht. Das Ergebnis der Schwermetall-Untersuchungen wird in der Tabelle 2.2 dargestellt. Die Shrimp-Schalen haben sehr geringe Anteile an Schwermetallen. Bei der Abdomen von indonesischen *P. monodon* gibt es einen höheren Anteil an Nickel.

Tab. 2.2: Schwermetall-Zusammensetzung der verwendeten Shrimp-Schalen (Einheiten: $\mu\text{g/g}$ trockene Schalen)

		Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb
<i>P. monodon</i>	Abdomen	2	20	0	130	0	107	404	0
<i>C. crangon</i>	behandelt	0	0	0	62	0	61	0	43
<i>P. vannamei</i>	Exuvien	8	0	0	131	0	36	0	0

2.2 Nährmedium

Für die Isolierung und Kultivierung der Bakterien wurden in dieser Arbeit mehrere Nährmedien verwendet. Die Bakterienkulturen wurden alle 2-3 Tage in ein neues Medium überimpft und unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C inkubiert.

2.2.1 Peptonhaltige Medien

Es wurden insgesamt 3 peptonhaltige Medien verwendet: M1, M2 bzw. M3. Hierbei wurde Pepton für die proteolytischen Bakterien als N-Quelle (Protein) eingesetzt. M1 verwendet Pepton aus Soja, M2 Pepton und Casein und M3 nur Casein. Der Stickstoff-Anteil in allen 3 Medien liegt bei 2200 mgN/l. Die Zusammensetzung der 3 Medien wird in der Tabelle 2.3, 2.4 und 2.5 gezeigt. Alle Medien wurden durch Stickstoff-Austausch anaerob gemacht und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Tab. 2.3: Peptonhaltiges Medium (M1)

Pepton aus Soja, pankreatisch verdaut	5,00 g
Pepton tryptisch verdaut	15,00 g
Natriumchlorid, NaCl	5,00 g
Kalium-di-hydrogenphosphat, KH_2PO_4	6,81 g
di-Kalium-hydrogenphosphat, K_2HPO_4	11,41 g
Wasser, dest.	1,00 l
pH	$7,0 \pm 0,1$

Tab. 2.4: Peptonhaltiges Medium (M2)

Pepton aus Fleisch	5,96 g
Fleischextrakt	2,98 g
Pepton aus Casein	2,98 g
Natriumcaseinat	5,21 g
Calciumchlorid-Dihydrat	0,20 g
Natriumchlorid, NaCl	5,00 g
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	0,32 g
Kalium-di-hydrogenphosphat, KH_2PO_4	0,04 g

di-Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4	0,13 g
Wasser, dest.	1,00 l
pH	$7,0 \pm 0,2$

Tab. 2.5: Peptonhaltiges Medium (M3)

Natriumcaseinat	17,72 g
Calciumchlorid-di-hydrat, $CaCl_2$	0,20 g
tri-Natriumcitrat-di-hydrat, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	0,32 g
Natriumchlorid NaCl,	5,00 g
Wasser, dest.	1,00 l
pH	$7,0 \pm 0,2$

2.2.2 Shrimphaltiges Medium

Es wurde im Laufe der Zeit beobachtet, dass die proteolytische Aktivität der Bakterien abnahm. Evtl. haben die mit Pepton und Casein kultivierten Bakterien nach einiger Zeit die Fähigkeit zur Elimination von Proteinen aus Shrimp-Schalen verloren oder verringert. Daraufhin wurde ein neues Medium M5 (Tabelle 2.6) mit Nordsee-Krabben (*Crangon crangon*) und ähnlichem Stickstoff-Anteil hergestellt, wobei die Shrimp-Schalen vorher luftgetrocknet und zermahlen wurden.

Tab. 2.6: Shrimphaltiges Medium (M5)

Shrimp-Schalen	60,00 g
Natriumchlorid, NaCl	5,00 g
Kalium-di-hydrogenphosphat, KH_2PO_4	6,81 g
di-Kalium-hydrogenphosphat, K_2HPO_4	11,41 g

Wasser, dest.	1,00 l
pH	7,0 ± 0,1

2.2.3 Chitinfreies Medium

Die Anreicherungskultur sollte frei von Chitinase produzierenden Bakterien sein. Wenn man ein chitinfreies Medium herstellen kann, kann man eine Mitzüchtung von Chitin-Abbauern vermeiden. Der Einfluss von Mineralien auf das Wachstum der Bakterien ist teilweise bekannt und es wurde das Zugabe von verschiedenen Mineralien ausprobiert. Es wurden folgende zwei Medien hergestellt, die als M6 und M7 bezeichnet wurden.

In M6 wird KCl zugegeben und in M7 werden MgSO_4 , MnSO_4 und zusätzliche C-Quellen zugegeben.

Die zerkleinerten Shrimpschalen werden zuerst im Autoklaven bei 121 °C und 2 Bar Druck 15 Minuten lang gekocht. Danach werden die Shrimpschalen mit einem Küchensieb filtriert und bei 5000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. In dem Überstand werden die zusätzlichen Stoffe (Tabelle 2.7 und Tabelle 2.8) zugegeben. Anschliessend werden durch Gaswechsel mit Stickstoff anaerobe Bedingungen geschaffen und es wird zum zweiten Mal autoklaviert.

Tab. 2.7: Chitinfreies Medium M6

Shrimp-Schalenextrakt	60 g
Natriumcaseinat	5,21 g
Kaliumchlorid-Dihydrat	0,20 g
Natriumchlorid, NaCl	5,00 g
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	0,32 g
Kalium-di-hydrogenphosphat, KH_2PO_4	0,04 g

di-Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4	0,13 g
Wasser, dest.	1,00 l
pH	$7,0 \pm 0,2$

Tab. 2.8: Chitinfreies Medium M7

Shrimp-Schalenextrakt	60 g
Tween 80	1,00 g
di-Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4	2,00 g
Natriumacetat, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$	8,29 g
Ammoniumcitrat	2,00 g
Magnesiumsulfat-heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,20 g
Mangansulfat-hydrat, $MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05 g
Wasser, dest.	1,00 l
pH	6,2 – 6,5

Das Wachstum der Anreicherungskulturen in diesen beiden Medien wurde überprüft. Als Referenz wurde Medium M5 verwendet. Die Anreicherungskulturen FS und HF und die Reinkultur wurden in diesen 3 Medien inkubiert. Es wurde die Optische Dichte (OD) mit einem Photometer bei 578 nm, die Gesamt-Zellzahl durch Plattieren, der Ammonium-Gehalt und die proteolytische Aktivität mit Azocasein überprüft.

Nach dem Versuch wurden folgende Schlussfolgerungen gezogen:

- 1) Medien mit Mineralien sind besser geeignet sowohl für die Anreicherungskulturen als auch für die Reinkultur. Besonders bei dem Medium M7 mit Magnesium, Mangan und zusätzlichen C-Quellen hat die proteolytische Aktivität von allen 3 Kulturen sehr gute Ergebnisse gezeigt.

Das heißt, dass die proteolytische Aktivität abhängig von Mineralien und zusätzlichen C-Quellen ist.

- 2) Die proteolytische Aktivität erreicht ihr Maximum erst, wenn die Kulturen schon längst in der stationären Phase sind.
- 3) Die proteolytische Aktivität der Reinkultur wird erst später erreicht als bei den Anreicherungskulturen, aber sie zeigt den höchsten Wert von allen 3 Kulturen. Alle Kurven zur Ermittlung der proteolytischen Aktivität begannen erst nach ca. 12 Stunden anzusteigen. Es könnte sein, dass die Bakterien eine gewisse Zeit brauchen, bevor sie Proteasen ausscheiden. Die beiden Anreicherungskulturen sind nach ca. 5 Stunden schon in der stationären Phase, während die Reinkultur viel mehr Zeit (24 Stunden) dafür braucht. Die Kurven der proteolytischen Aktivität der Anreicherungskulturen stiegen früher und sehr steil an, die der Reinkulturen erst später und sehr viel langsamer.

2.2.4 MRS-Medium für Milchsäurebakterien

Das MRS-Medium wird zur Anreicherung, Züchtung und Isolierung sämtlicher *Lactobacillus*-Spezies aus allen Arten von Untersuchungsmaterial verwendet [26]. Das MRS-Medium (Tab. 2,9) enthält die für *Lactobacillen* als spezielle Wachstumsfaktoren bekannten Substanzen Polysorbat, Acetat, Magnesium und Mangan sowie eine reichhaltige Nährgrundlage.

Tab. 2.9: MRS-Medium

Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut.	10,00 g
Fleischextrakt	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g

Glukose $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	22,00 g
Tween 80	1,00 g
di-Kaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4	2,00 g
Natriumacetat $CH_3COONa \cdot 3H_2O$	8,29 g
Ammoniumcitrat	2,00 g
Magnesiumsulfat-heptahydrat $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,20 g
Mangansulfat-hydrat $MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05 g
Wasser, dest.	1,00 l
pH	6,2 – 6,5

2.2.5 Chinablau-Lactose-Medium

Chinablau-Lactose-Agar (Tab. 2,10) ist ein Selektivnährboden zur Unterscheidung Lactose-negativer Mikroorganismen sowie zur Keimzahlbestimmung in Milch [4]. Das Nährmedium wird gelöst und bei 121 °C 15 Minuten lang autoklaviert. Danach wird das Medium bis ca. 50 °C abgekühlt und im Plattengußverfahren beimpft.

Tab. 2.10: Chinablau-Lactose-Medium

Fleischextrakt	3,00 g
Pepton aus Casein	5,00 g
Natriumchlorid, NaCl	5,00 g
Chinablau	0,375 g
Agar-Agar	12,00 g
pH	7,0 ± 0,2

2.3 Analytische Methoden

Die wichtigsten Tests dienen zur Bestimmungen von Proteinen, Chitin und Calcium in den Shrimpabfällen, damit vor weiteren Versuchen die Inhaltsstoffe untersucht werden können.

Im nächsten Schritt werden die Tests wie pH-Wert, TKN, NH_4^+ -Tests und Ca^{2+} -Tests durchgeführt, die für die Untersuchung während der Batch-Ansätze notwendig sind.

Im letzten Schritt werden Tests für die Chitin-Charakterisierung durchgeführt. Hierzu gehören die Bestimmungen des Ca^{2+} -Tests, Protein-, sowie Chitin-Gehaltes, Viskositätstests, NMR, usw.

Dazu kommen noch die Tests für die Anreicherungskultur bzw. Medien, die für die Batch-Ansätze verwendet werden.

2.3.1 Bestimmung des Kjeldahlstickstoffes (TKN) und des organisch gebundenen Stickstoffes

NH_4^+ -Bestimmung durch Aufschluß- und Destillations-Methode

Die Bestimmung erfolgte leicht abgewandelt nach der Methode nach DEV mit einer Gerhardt Destilliereinheit und einer Gerhardt Aufschlussapparatur (Gerhardt GmbH, Göppingen).

In einem Gerhardt-Reaktionskolben wurden 1 ml Probenvolumen mit ca. 10 ml dest. Wasser, 1/2 Kjeldahltablette, Siedesteinchen, 1-2 Tropfen Silikon-Antischaum-Lösung und 15 ml $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{konz.}}$ (95-97%) versetzt. Bei den trockenen Substanzen wie Shrimp-Schalen oder Chitin-Produkten wurde das vorgesehene Gewicht zuerst eingewogen und die für die NH_4^+ Bestimmung

nötigen Chemikalien sodann zugegeben.

Zum Aufschluss wurde die Lösung im Rundkolben auf höchster Stufe 10 gekocht, bis die Lösung klar und leicht grünlich erschien, anschließend wurde noch 30 Minuten auf Stufe 5 weiter gekocht und der Ansatz schließlich auf RT abgekühlt. Der ursprünglich organisch gebundene Stickstoff lag nun überwiegend als NH_4^+ in der Schwefelsäurelösung (pH 1) vor.

Die abgekühlte Probe wurde mit 250 ml H_2O verdünnt und mit 70 ml NaOH (30%) neutralisiert, anschliessend an die Destille angeschlossen. Das NH_4^+ wurde dann durch Wasserdampfdestillation in einer Vorlage aus 25 ml Borsäure (4%) und 5 Tropfen Mischindikator eingesammelt.

Die Menge an NH_4^+ wird durch Rücktitration mit Schwefelsäure (0,05 N) bestimmt. Dies erfolgte am Titrator über den pH-Wert einer Nullprobe (dest. Wasser).

Die Berechnung der Ammoniummenge bei wässrigen Proben erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{NH}_4^+-\text{N} \text{ (mg/l)} = \frac{\text{H}_2\text{SO}_{4\text{Titrisol}} \text{ (ml)} \times 0,05 \text{ (mol/l)} \times 14010 \text{ (mg/l)}}{\text{Probenvolumen (ml)}}$$

Die Berechnung der Ammoniummenge bei trockenen Proben erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{NH}_4^+-\text{N} \text{ (mg/g)} = \frac{\text{H}_2\text{SO}_{4\text{Titrisol}} \text{ (ml)} \times 0,05 \text{ (mol/l)} \times 14010 \text{ (mg/l)}}{\text{Probengewicht (mg)}}$$

Bei der NH_4^+ -Bestimmung entfiel der Aufschluss. 1 ml Probe wurde mit 225 ml dest. Wasser aufgefüllt, dann 25 ml Phosphat-Puffer (0,5 M; pH 7,4), Siedesteinchen und Antischaum-Lösung zugegeben und ebenfalls destilliert.

NH_4^+ -Bestimmung durch die photometrische Methode

Man kann den NH_4^+ -Gehalt auch durch eine photometrische Methode überprüfen. Bei der angewandten modifizierten Methode lag die Vorschrift nach DEV E5 (ISO 38406) zugrunde. Die NH_4^+ -Konzentration zwischen 0,0-1,0 mg/l konnte mit dieser Methode bestimmt werden. Dabei wurden zwei Reagenzien benötigt. Reagenz A wurde mit 13,0 g Natriumsalicylat, 13,0 g Trinatriumcitrat-Dehydrat und 0,097 g 2-Nitroprussidnatrium-Dihydrat in 100 ml dest. Wasser hergestellt und in einer braunen Flasche im Kühlschrank bis zu einem Monat lang aufbewahrt. 100 ml Reagenz B enthielt 1,6 g NaOH und 0,10 g Dichlorisocyanursäure-Na-Dihydrat und musste täglich frisch hergestellt werden. Die Lösung blieb über 24 Stunden stabil.

Bei dieser Methode bilden NH_4^+ -Ionen mit Salicylat und Hypochloridionen in Gegenwart von 2-Nitroprussidnatrium als Katalysator einen blauen Farbstoff (Indolphenolblau), der zur Quantifizierung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 655$ nm photometrisch gemessen wird. Zur Messung wurden 4 ml zentrifugierte oder verdünnte Probe mit 0,5 ml Lösung A, anschließend mit 0,5 ml Lösung B vermischt und dann bei RT für 60-90 Minuten inkubiert. Für die Kalibrierung wurde Ammoniumsulfat verwendet. Das Erstellen der Kalibrier-Kurve erfolgte mittels einer Verdünnungsreihe unter Zuhilfenahme einer NH_4^+ -Standardlösung (Ammoniumsulfat).

In Abb. 2.1 ist exemplarisch eine Kalibrier-Kurve dargestellt.

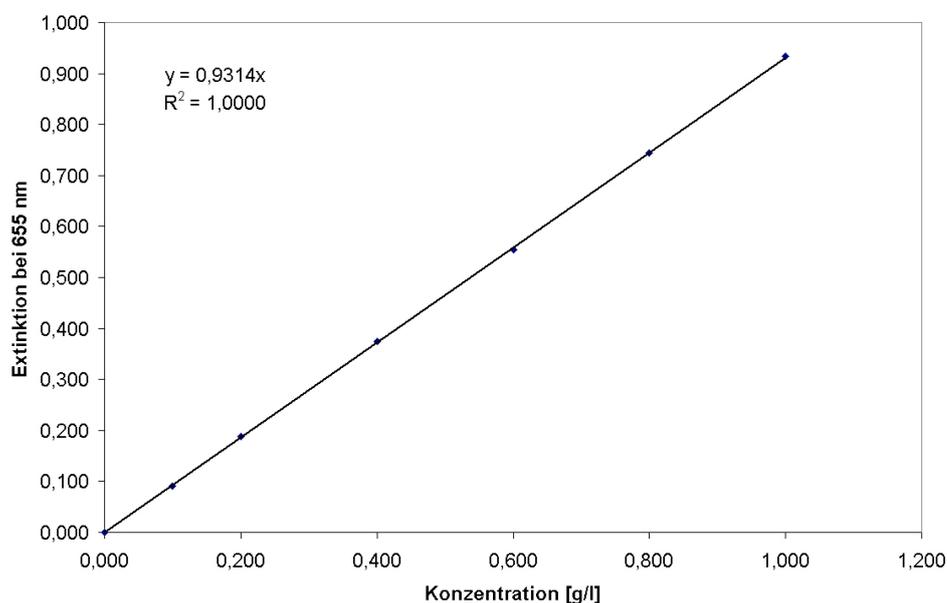


Abb. 2.1: Ammonium-Kalibrier-Kurve 10.07.2003

2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Bei der Protein-Bestimmung ist in erster Linie das Entfernen der Proteine durch Zugabe von NaOH und Erhitzen für die alkalische Hydrolyse von Protein erforderlich. Die Proben (sowohl Anfangsmaterial „Shrimp-Schalen“ als auch Endprodukt „Chitin“) werden eingewogen und 1 M NaOH zugegeben. Die Proben werden dann bei 50 °C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wird die Protein-Lösung via Lowry-Test bestimmt.

Die Lowry-Lösung besteht aus 3 Stamm-Lösungen, die in Tabelle 2.11 dargestellt sind:

Tab. 2.11: Lowry-Stammlösungen

Lowry A	Na_2CO_3	2 %
---------	--------------------------	-----

	NaOH	0,1 M
Lowry B	CuSO ₄	1 %
Lowry C	NaKC ₄ H ₄ O ₆ · 4H ₂ O	2 %

Das Verhältnis für die Lowry-Lösung beträgt Lowry A : Lowry B : Lowry C = 98:1:1. Die Lösung sollte immer frisch angesetzt werden! Das 2. Reagenz ist die Folin-Ciocalteau Reagenz der Firma Sigma.

Der Test wird wie folgt durchgeführt: Zu 100 μ l Probe wird 1 ml Lowry-Stammlösung zugegeben. Es wird unter RT 10 Minuten inkubiert. Nach der ersten Inkubation wird noch 100 μ l Folin-Ciocalteau Reagenz zugegeben und dann nochmals unter RT 30 Minuten inkubiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm im Photometer bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrier-Kurve mit BSA (vorher 2 Stunden lang bei 90 °C getrocknet) im Bereich von 0-750 mg/l verwendet.

In nachfolgender Abb. 2.2 ist exemplarisch eine Kalibrier-Kurve dargestellt.

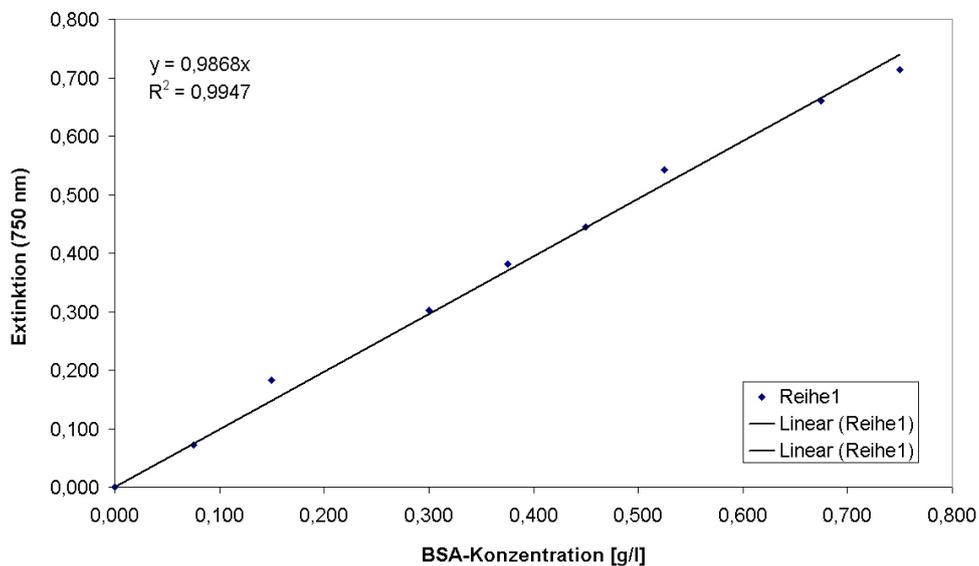


Abb. 2.2: Lowry-Kalibrier-Kurve 17.10.2006

2.3.3 Bestimmung des Chitingehaltes

Nach der Entfernung von Protein wird der Rest von der Probe dreimal mit dest. Wasser gewaschen. Anschließend wird die Probe per TKN-Methode (siehe 2.3.1) auf deren Stickstoffgehalt untersucht.

Der gemessene TKN-Wert wird mit der zugegebenen Menge von Shrimp-Schalen oder Chitin-Produkt auf Trockensubstanz-Basis berechnet. Das Ergebnis hat eine Einheit von mgN/gTS oder mgChitin/gTS (1 mg N entspricht 14,5 mg Chitin).

2.3.4 Bestimmung des Wassergehaltes

Die Methode orientiert sich an der Vorschrift DEV DIN 38409. Dabei wird ein Porzellantiegel im Glühofen (600 °C) mehrere Stunden getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und auf der Analysenwaage ausgewogen. Eine homogenisierte Probe wird in den Tiegel gefüllt und das Gewicht bestimmt. Die Probe wird mehr als 24 Stunden bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann ebenfalls abgewogen. Die Differenz des Gewichtes vor und nach dem Trocknungsvorgang wird als Wassergehalt (oder Trocknungsverlust = TV) bezeichnet.

2.3.5 Bestimmung des Calciumgehaltes

Der Calciumgehalt wird via Flammenphotometer (Eppendorf) bestimmt. Die trockene Probe wird vorher eingewogen, dann wird ein bestimmtes Volumen von 10% HCl zugegeben und mindestens 48 Stunden lang gerührt. Anschließend wird die Probe zentrifugiert und verdünnt, da der Messbereich auf 50 mgCa²⁺/l beschränkt ist. Die fertige Probe wird mit dem Flammenphotometer gemessen.

2.3.6 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert der Proben wird mit dem Gerät inoLab Multi level 1 gemessen.

2.3.7 Bestimmung der Glukose

Reduzierende Zucker werden mit der Methode nach Miller ([28]) bestimmt. Dabei reagieren reduzierende Zucker mit 4-Hydroxybenzoesäure-hydrazid (Glu-

cosereagenz, Tab. 2,12) zu einem intensiv gelb gefärbten Farbstoff.

Tab. 2.12: Glucose-Reagenz

Dinitrosalicylsäure	10,0 g
Phenol	2,0 g
NaOH	10,0 g
Na/K-Tartrat	200,0 g
Na ₂ SO ₃	0,5 g
mit dest. Wasser auf 1,0 l auffüllen	

Zu 0,25 ml Probe werden in ein verschließbares Wheaton-Röhrchen 1,5 ml Reagenz (Tabelle 2.12) und 0,25 ml dest. Wasser gegeben, vermischt und 5 Minuten im Thermoblock bei 100 °C inkubiert.

Nach Abkühlen des Ansatzes werden nochmals 3 ml dest. Wasser zugegeben. Es wird die Extinktion bei 550 nm bestimmt. Zur Quantifizierung wird eine Kalibrierungskurve mit Glucose-Monohydrat p.a. im Bereich von 0-1.000 mg/l verwendet.

In Abb. 2.3 ist exemplarisch eine Eichkurve dargestellt.

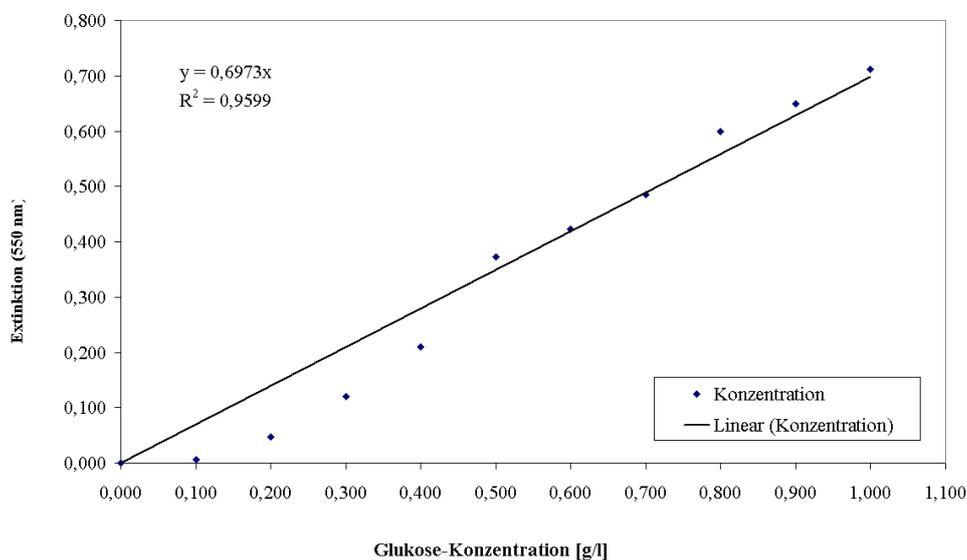
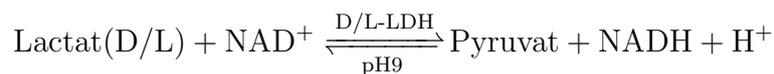


Abb. 2.3: Glukose-Kalibrier-Kurve 24.05.2006

2.3.8 Bestimmung des Lactates

Der quantitative Nachweis von Lactat ([52]) erfolgt durch eine enzymatische Reaktion mit Hilfe des optischen Tests, wobei das D(-) bzw. L(+)-Isomer in getrennten Ansätzen mit stereospezifischen LDHs nachgewiesen werden. Dabei wird Lactat mit Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) unter dem Einfluß von Lactatdehydrogenase zu Pyruvat und NADH umgesetzt. Es wird D- und L-Lactatdehydrogenase (D-/L-LDH) für D- und L-lactat verwendet.



Das Gleichgewicht der Reaktion wird durch NAD^+ -Überschuss, alkalisches Milieu und Abfangen des Pyruvats als Hydrazone auf die rechte Seite verschoben. Die während der Reaktion gebildete Menge an $\text{NADH} + \text{H}^+$ ist

in der Menge des vorhandenen Lactatisomers äquivalent und kann photometrisch bei 366 nm (Photometer Eppendorf) gemessen werden.

Reagenzien:

a) Glycin-Hydrazin-Puffer pH 9,0

22,8 g Glycin (für biochemische Zweck)

50 ml Hydrazinhydrat (25%ig)

550 ml H₂O dest.

pH-Wert überprüfen

Haltbarkeit: 6 Monate im Kühlschrank

b) NAD⁺-Lösung

300 mg NAD⁺ werden in 10 ml H₂O dest. gelöst.

Haltbarkeit: 4 Wochen im Kühlschrank

c) LDH

L-LDH aus Kaninchenmuskel (Boehringer, Mannheim)

Kristallsuspension 5 mg Protein/ml

D-LDH aus *Leuconostoc mesenteroides* (Anreicherung siehe oben ca.

15 mg Protein/ml)

Ansatz:

- 3 ml Puffer pH 9,0
- 0,2 ml NAD (30 mgNAD⁺/ml)
- 0,2 ml Probe (entsprechende Verdünnung)
- Umschütten und Leerwert bei 366 nm messen
- 20 µl D- bzw. L-LDH zugeben

- Umschütteln
- 1 h Inkubation bei 37 °C, falls die Reaktion nicht zu Ende abgelaufen ist (Lactat-Standardlösung als Kontrolle), wird die Inkubationszeit verlängert.
- Umschütteln und Endwert bei 366 nm messen

Es wird eine Nullküvette mitgeführt, welche statt der Probelösung 0,2 ml H₂O dest. enthält. Die Ablesung erfolgt gegen Luft, die Extinktionsdifferenz der Nullküvette wird von der Probe abgezogen (= E_{korrr.}).

Die Probelösung muss so verdünnt werden, dass der Gehalt an dem zu untersuchenden Milchsäureisomer nicht größer als 100 µg/ml (entspricht E_{korrr.} = 0,22) ist, da sonst der Endwert nicht erreicht wird.

Umrechnung

$$\text{Lactatisomer (mg/ml Probelösung)} = \frac{E_{\text{korrr.}} \times V_{\text{küv.}}(\text{ml}) \times \text{Verdünnung} \times 90}{e \times d \times V_{\text{Einsatz}}(\text{ml}) \times 1000}$$

Für den Standardtest gilt:

$$\text{Lactatisomer (mg/ml Probelösung)} = E_{\text{korrr.}} \times \text{Verdünnung} \times 0,467$$

E_{korrr.} = Extinktionsdifferenz Probe - Extinktionsdifferenz Nullküvette

V_{küv.} = Gesamtvolumen in der Küvette (ml) (Standardtest: 3,42 ml)

Verdünnung = Verdünnungsfaktor (z.B. bei Verdünnung 1/10: Faktor = 10)

90 = Molekulargewicht von Milchsäure

e = molarer Extinktionskoeffizient von reduziertem NAD, abhängig von der Wellenlänge

E₃₆₆ = 3,30 cm²/µMol (Standardtest)

E₃₄₀ = 6,60 cm²/µMol

$$E_{334} = 6,00 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$$

D = Schichtdicke (Standardtest 1 cm)

V_{Einsatz} = eingesetzte verdünnte Probelösung (ml) (Standardtest: 0,2 ml)

2.3.9 Bestimmung der Wachstumskurve

Die Wachstumskurve wird durch Trübungsmessung mit einem Photometer (Shimadzu, München) bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen.

2.3.10 Bestimmung der Keimzahl

Die Bestimmung der Keimzahl mit Hilfe des Plattenverdünnungsverfahrens kann einen Überblick über die Größenordnung der Keimzahl geben. Hierzu werden feste Nährböden hergestellt, auf denen verschiedene Verdünnungsstufen der zu untersuchenden Probe ausgespatelt werden. Jede lebende Organismenzelle entwickelt sich zu einer Kolonie (KBE = Kolonie bildende Einheit). Diese werden auf den Agar-Platten nach der Inkubation ausgezählt. Hieraus kann die Lebendzellzahl ermittelt werden.

Die Zellzahl wird auf 1 ml der zu untersuchenden Probe bezogen. Die Zellzahlen in der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Gleichung (2.1) berechnet:

$$m = \frac{10^x}{V} \cdot \frac{\Sigma c_x + \Sigma c_{x+1}}{n_x + 0,1 n_{x+1}} \quad (2.1)$$

- m: gewogener Mittelwert der Lebendzellzahl in 1 ml der Probe
- 10^x : Verdünnungsfaktor für die niedrigste ausgewertete Verdünnungsstufe
- V: Volumen der Zellsuspension in ml (pro Platte)
- Σc_x : Gesamtzahl der Kolonien auf allen Platten der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe
- Σc_{x+1} : Gesamtzahl der Kolonien auf allen Platten der nächst höheren ausgewerteten Verdünnungsstufe
- n_x : Verdünnungsfaktor bei der Stufe x
- n_{x+1} : Verdünnungsfaktor bei der Stufe x+1

- Verdünnungslösung: 0,9% NaCl-Lösung
- DEV-Nähragar zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl der anaeroben Bakterien (Tab. 2,13)

Tab. 2.13: DEV-Nähragar

Pepton aus Fleisch	10,0 g
Fleischextrakt	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar-Agar	18,0 g
dest. H ₂ O	1,0 l
pH bei 25 °C	7,3 ± 0,2

Die Nährlösung wird hergestellt und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Beimpfung im Plattengussverfahren, Bebrütung: 120 Stunden für anaerobe Bakterien bei 37 °C.

- DEV Endo-Agar

Endo-Agar ist ein Selektivagar zur Isolierung und Differenzierung von *E.coli* und coliformen Keimen bei der Wasseruntersuchung. Die Zusammensetzung zeigt die Tabelle 2,14.

Tab. 2.14: Selektivagar

Pepton aus Fleisch	10,0 g
Fleischextrakt	10,0 g
NaCl	5,0 g
Lactose	10,0 g
Fuchsin	0,5 g
Natriumsulfit Na ₂ SO ₃	2,5 g
Agar-Agar	20,0 g
dest. H ₂ O	1,0 l
pH bei 25 °C	7,4 ± 0,2

Die Nährlösung wird 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Beimpfung im Plattengussverfahren, Bebrütung: 24 Stunden bei 37 °C.

2.3.11 Gesamt-Zellzahl

Bei vielen Medien ist es schwierig, über die optische Dichte das Wachstum von Bakterien zu bestimmen, da die Medien viele kleine Partikelchen beinhalten, die eine Trübung verursachen und als Störfaktoren bei der Messung der optischen Dichte wirken. Hier hilft ein Test zur Bestimmung der Gesamt-

Zellzahl.

Die Gesamtzellzahl ist die Anzahl der gesamten vorhandenen Organismen, unabhängig davon, ob sie schon tot sind oder als Sporen vorliegen. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl verwendet man ein mikroskopisches Auszählungsverfahren, bei welchem eine Neubauer-Zählkammer zur Hilfe genommen wird.

2.3.12 Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Zur quantitativen Bestimmung der proteolytischen Aktivität sowohl der Anreicherungs- als auch der Reinkulturen sollte ein Testsystem etabliert werden. Hierzu wurde im Weiteren der Azocaseintest [2] wie folgt durchgeführt: 100 μl Azocaseinlösung (5 mg/ml in 100 mM TrisCl, pH 8,0) wurden mit 100 μl Kulturüberstand 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Abbau des Protease-substrates Azocasein wurde durch die Zugabe von 400 μl 10%iger Trichloressigsäure gestoppt und Substrat und Produkt durch 5-minütige Zentrifugation bei 800 rpm getrennt. 500 μl Überstand wurde mit 700 μl 0,5 M NaOH gemischt und die Absorption bei 442 nm gemessen. Als Blindwert wurden 100 μl H₂O mit 100 μl Azocaseinlösung gemischt und ohne Inkubationszeit mit 400 μl Trichloressigsäure versetzt. Eine Aktivitätseinheit (U) entspricht dem Anstieg der Absorption um 0,01 Einheiten.

2.3.13 Viskosität

Die Viskosität ist ein Maß für die innere Reibung eines Fluids. Sie resultiert aus der Verschiebung zweier Schichten der Flüssigkeit gegeneinander. Man spricht auch von Scherung. Mit zunehmender Reibung der Teilchen wird mehr Kraft

für die Scherung erforderlich. Eine Scherung des Fluids erfolgt immer dann, wenn sich die Flüssigkeit bewegt (z.B. Rühren, Ausgießen, Versprühen, usw.). Je viskoser ein Fluid desto zähflüssiger ist es. Es wird mehr Kraft benötigt, um die Teilchen in der Flüssigkeit gegeneinander zu bewegen. Beispielsweise ist Wasser mit einer Viskosität von 1 mPa*s als niedrigviskos einzustufen. Hingegen ist z.B. Honig mit ca. 10.000 mPa*s hochviskos.

Die Viskosität ist ein wichtiges Merkmal für die Qualität von Chitin oder daraus hergestelltem Chitosan. Für das in der Medizin verwendete Chitosan muss eine hohe Qualität von Chitin verwendet werden, d.h. Chitin mit langen Ketten. Diese lange Ketten bewirken eine hohe Viskosität. Das Problem bei der Messung der Chitin-Viskosität ist die Löslichkeit, da Chitin fast unlöslich ist.

Zu Verbesserung der Löslichkeit von Chitin zählen die Amid-LiCl-Systeme als Lösemittel, wie z.B. N,N-Di-Methylacetamid (DMA)-5% LiCl oder N-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP)-5% LiCl. Es ist davon auszugehen, dass die Cl-Ionen mit den labilen Protonengruppen (-OH und -NHC(O)CH₃) des Chitinmoleküls interagieren und so die Wasserstoffbrückenbindungen der kristallinen Struktur zerstört werden, wodurch Chitin in Lösung gehen kann. Bis jetzt wurden auf diesem Gebiet jedoch nur sehr wenige Erfahrungen gesammelt. Chitosan dagegen ist in verdünnten organischen Säuren löslich, wie z.B. in verdünnter Essigsäure.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das N-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP)-5% LiCl System als Lösemittel verwendet. Da die Viskosität auch abhängig von der Konzentration ist, bleibt die Konzentration im Rahmen dieser Arbeit bei 0,1%. Da Chitin sehr schwer löslich ist und auch nach 2-3 Tagen keine Lösung eintritt, wird zuerst 0,2 % Chitin eingesetzt, somit entsteht später nach dem

Lösen eine Chitin-Konzentration von 0,1%.

Das Viskositätslösemittel wird auf einem Magnetrührer in einer braunen Flasche für mindestens 4 Stunden gerührt, bis sich das LiCl vollständig aufgelöst hat. Die Aufbewahrung erfolgt im Kühlschrank in einer braunen Flasche, da N-Methyl- 2-Pyrrolidon fotosensitiv ist.

Es wird eine 0,2%ige Lösung hergestellt und 29 Stunden gerührt. Da sich das Chitin nie vollständig lösen kann, entsteht am Ende eine 0,1%ige Lösung.

Die Viskosität ist auch abhängig von der Temperatur. In dieser Arbeit werden alle Viskositätstests bei 25 °C gemessen.

In diesem Projekt wird das Rotationsviskosimeter der Firma Brookfield (RVDV-II, BROOKFIELD Engineering Laboratories Vertrieb GmbH, Lorch, Abb: 2.4) mit einem Kegel/Platte-System zur Viskositätsbestimmung verwendet. Es stehen 2 Messkörper zur Verfügung: CP40 (groß) und CP52 (klein). Die Verwendung des Messkörpers ist abhängig von der jeweiligen Viskosität der Probe, da sich die Messbereiche der beiden Messkörper unterscheiden (CP40: 1,7-32,7 mPa*s, 0-1500 1/s; CP52: 49,2-983,0 mPa*s, 0 - 400 1/s). Bei hohen Viskositätswerten wird der kleinere Messkörper CP52 verwendet. CP40 kommt bei niedrigen Viskositätswerten zum Einsatz.



Abb. 2.4: Viskosimeter Brookfield RVDV-II

2.3.14 Elektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Ein Rasterelektronenmikroskop (REM) (englisch "Scanning Electron Microscope" (SEM)) besteht aus dem Strahlerzeuersystem einschließlich Beschleunigungsstrecke, der Beleuchtungsoptik und der Probenkammer mit verschiedenen Detektoren. Um Streuprozesse der Elektronen an Luftmolekülen auszuschließen, werden die gesamte elektronenmikroskopische Säule und auch die Probenkammer durch den Einsatz geeigneter Vakuumpumpen evakuiert. Die aus Kondensorenlinse und Objektiv bestehende Beleuchtungsoptik verkleinert den ersten Kreuzungspunkt des von der Elektronenquelle erzeugten Strahls,

so dass dieser fokussiert - man spricht auch von einer Elektronensonde - in einem bestimmten Muster über das abzubildende Objekt geführt (gerastert) wird. Die Primärenergie der Elektronen liegt typischerweise im Bereich von 1 bis 30 keV. Zur Abbildung des Objektes können unterschiedliche zwischen den Primärelektronen und dem Material auftretende Wechselwirkungsprozesse genutzt werden. Generell unterscheidet man zwei grundsätzliche Abbildungstechniken, nämlich die Sekundärelektronen(SE)-Abbildung und die Abbildung mittels rückgestreuter Elektronen (RE). Die Bildentstehung erfolgt beim REM auf rein elektronischem Weg, d.h. ohne die Hilfe abbildender Linsen. Synchron zur Rasterung der Elektronensonde auf der Probe wird beispielsweise ein Elektronenstrahl in einer Kathodenstrahlröhre gescannt und dessen Helligkeit wird durch das Ausgangssignal eines Elektronendetektors, also z.B. SE- oder RE-Detektor, gesteuert. Da das Ausgangssignal des jeweiligen Detektors in der Regel lokal vom Ort der Elektronensonde auf der Probe abhängt, entstehen auf diese Weise Hell/Dunkel-Kontraste in der rasterelektronenmikroskopischen Abbildung. Die Sekundärelektronen haben definitionsgemäß eine Energie bis maximal 50 eV; bei ca. 5 eV liegt das Maximum der Emission von Sekundärelektronen. Aufgrund ihrer geringen Energie können Sekundärelektronen lediglich aus den obersten Schichten der Probe entweichen. Deshalb geben sie Information über die Beschaffenheit der Probenoberfläche, d.h., die SE-Abbildung ermöglicht sogenannten Topographie-Kontrast. Im Unterschied dazu spricht man in der Rasterelektronenmikroskopie von rückgestreuten Elektronen, wenn die detektierten Elektronen eine Energie von mehr als 50 eV besitzen. Die maximale Energie eines rückgestreuten Elektrons kann der Primärelektronenenergie entsprechen, in diesem Falle erfolgte die Rückstreuung des in die Probe eindringenden Primärelektrons an den Atomen im Probeninneren ohne Energie-

verluste (elastische Streuung). Die mittels Rückstreuelektronen erhältlichen Bildkontraste werden wesentlich durch die auftretenden Streuprozesse bei der Wechselwirkung mit den Atomen bestimmt. Die Intensität der Elektronenstreuung hängt vornehmlich von der Primärelektronenenergie, der mittleren Ordnungszahl des Probenmaterials und der Materialdichte ab. Aus diesem Grund zeigen REM-Abbildungen unter Verwendung rückgestreuter Elektronen einen sogenannten Materialkontrast. Die mit einem Rasterelektronenmikroskop erhältliche laterale Auflösung wird hauptsächlich vom Durchmesser der Primärelektronensonde bestimmt. Typische Auflösungswerte bei der Abbildung mit Sekundärelektronen liegen im Bereich von 1 bis 5 nm. Eine Besonderheit der SE-Abbildung ist, dass sich die Bilder im Allgemeinen durch eine sehr hohe Tiefenschärfe auszeichnen, so dass ein plastischer Eindruck von der Objektoberfläche entsteht. Da die Probenkammer eines REM auch im Inneren sehr viel freien Raum aufweist, können die zu untersuchenden Proben durchaus Abmessungen von mehreren Zentimetern haben. Eine wesentliche Anforderung an das Probenmaterial besteht darin, dass zumindest dessen Oberfläche elektrisch leitend sein muss, um Störungen infolge Probenaufladung bei der rasterelektronischen Abbildung zu vermeiden. Weiterführende Ausführungen zu den Grundlagen der Wechselwirkungsprozesse in der Rasterelektronenmikroskopie, zur Gerätetechnik, Probenpräparation und Anwendungen sind in entsprechenden Lehrbüchern zu finden (siehe z.B. L. Reimer: *Scanning Electron Microscopy*, Springer, 1983 [35] und P. F. Schmidt, *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*, Expert-Verlag, Renningen-Malmsheim, 1994 [43]).

Transmission-Elektronenmikroskopie (TEM)

Im Vergleich zum Rasterelektronenmikroskop sind der Aufbau, die Funktionsweise und die Bildentstehung eines Transmissionselektronenmikroskops viel komplexer. Es besitzt neben dem Strahlerzeuersystem und der Beleuchtungsoptik noch zusätzliche abbildende Linsen, da diese eine Grundvoraussetzung für die Bildentstehung in der TEM sind. Wie beim Lichtmikroskop wird das Objekt, welches eine Dicke von maximal nur einigen 100 nm haben darf, mit Hilfe der letzten Kondensorlinse von einem parallelen Elektronenstrahl beleuchtet. Da typische Primärelektronenenergien in der Transmissionselektronenmikroskopie im Bereich von 100 bis 300 keV liegen, dringen die Elektronen durch die dünne Objektfolie und in der Bildebene des im Strahlengang darunter befindlichen Objektivs entsteht das vergrößerte Bild des durchstrahlten Probenbereiches. Dieses erste Zwischenbild des Objektes wird durch die Wirkung weiterer, auf der optischen Achse folgender Elektronenlinsen (Zwischenlinsen und Projektiv) mehrfach nachvergrößert, so dass Vergrößerungen bis zu einmillionenfach und damit einhergehend Auflösungswerte von typischerweise 0,25 nm erzielt werden. In der Regel kann das mehrfach vergrößerte Endbild auf einem elektronenempfindlichen Leuchtschirm beobachtet werden; Fotos werden durch die Verwendung von geeigneten Filmen, elektronischen Bildplatten bzw. digital durch die Kombination von Szintillator und CCD-Kamera aufgenommen. Im Falle amorpher Objekte, und dazu zählen auch im Allgemeinen alle biologischen Proben, entstehen die Bildkontraste in der transmissionselektronenmikroskopischen Abbildung durch die lokalen Unterschiede der elastischen Streuung (Intensität, Winkeländerung) der Elektronen beim Durchlaufen des dünnen Objektes. Im Falle der TEM-Hellfeldabbildung werden die Bildkontraste durch Positionieren einer sehr kleinen Objektivapertur (10 - 20 μm Durchmesser) auf der optischen Ach-

se in der rückwärtigen Brennebene des Objektivs verstärkt (vgl. Abb: 2.5). Auf diese Weise sind also im konventionellen TEM-Modus Informationen über die Probenmorphologie durch den sogenannten Massen-Dicken-Kontrast erhältlich. Das bedeutet, je größer die mittlere Ordnungszahl und die Dicke des durchstrahlten Probenvolumens, umso größer ist auch die Wahrscheinlichkeit und damit Intensität der Elektronenstreuung. Probengebiete, die dicker sind oder die im Mittel mehr schwere Atome enthalten als die umliegenden Bereiche, erscheinen durch in der TEM-Hellfeldabbildung dunkler. Dies hat für die TEM-Probenpräparation zur Folge, dass, je höher die zu erwartende mittlere Ordnungszahl bzw. vorliegende Probendicke, desto dünner muss bei gegebener Beschleunigungsspannung das Objekt sein. Weitere Einzelheiten zu den Grundlagen der TEM sind z.B. in dem Buch „Transmission Electron Microscopy - A Textbook for Materials Science“ von D.B. Williams und C.B. Carter [Springer, 2009] [51] oder auch „Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation“ von L. Reimer und H. Kohl [Springer, 2008] [36] nachzulesen.

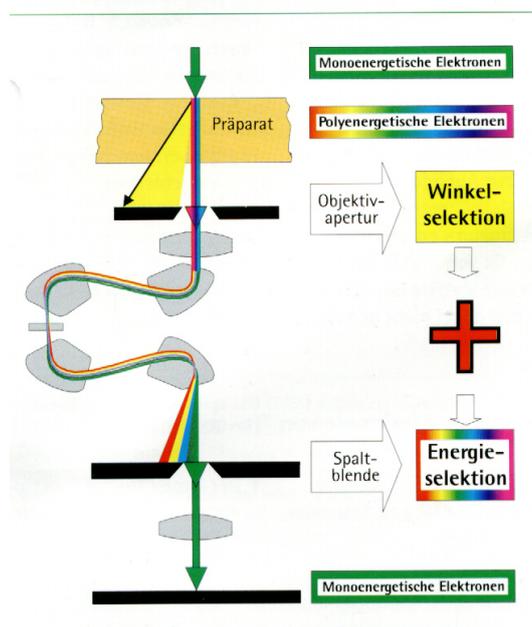


Abb. 2.5: Mit Omega-System bestücktes Transmissions-Elektronenmikroskop der Firma Zeiss

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersuchten Shrimp-Schalen wurden an einem LEO 912 Omega der Firma Zeiss bei 120 kV Beschleunigungsspannung charakterisiert. Bei diesem Mikroskop wird der Elektronenstrahl durch die Verwendung einer thermischen Lanthanhexaborid-Kathode erzeugt. Für die digitale Bildaufzeichnung wurde eine 1K-CCD-Kamera der Firma Proscan verwendet, Übersichtsbilder wurden mittels elektronischer Filmplatten (Ditabis) erhalten. Eine Besonderheit dieses Transmissionselektronenmikroskops ist das innerhalb der Mikroskopsäule eingebaute abbildende Energiefilter vom Omega-Typ (siehe Abb: 2.5). Das Omega-Filter befindet sich im elektronenoptischen Strahlengang unterhalb der Objektivlinse und besteht aus vier einzelnen magnetischen Sektorfeldern, die auch Magnetprismen genannt werden. Wie beim

Glasprisma in der Lichtoptik tritt auch beim Omega-Filtersystem eine Dispersion der Elektronen – anhand verschieden farbiger Anteile in Abb: 2.5 veranschaulicht – im Strahl entsprechend ihrer Energie auf. Da im TEM die Elektronen beim Durchlaufen des Objektes auch unelastische Streuprozesse erfahren können, d.h., sie geben Energie an die Atome im Inneren der Probe ab, kann ihre Energie um einige 10 eV bis zu einigen keV kleiner sein als die ursprüngliche Primärelektronenenergie. Solch ein Omega-Filter ermöglicht sowohl die chemische Analyse von Nanometer-Regionen durch eine Energieanalyse der transmittierten Elektronen in Form der Elektronen-Energieverlust-Spektroskopie (EELS) als auch eine zweidimensionale Darstellung der Elementverteilung mittels energiegefilterter TEM (EFTEM) (siehe z.B. [Egerton, Brydson]). Bei der elementspezifischen EFTEM-Abbildung werden die TEM-Aufnahmen lediglich mit Elektronen registriert, die einen charakteristischen Energieverlust durch die Anregung einer Ionisationskante erlitten haben. Die entsprechende Energieselektion erfolgt durch die Verwendung einer Spaltblende (Abb: 2.5). Die in Kapitel 3.3 dargestellten Ergebnisse zur Lokalisierung von Calcium und Stickstoff wurden auf diese Weise erhalten, wobei die EFTEM-Abbildungen unter Nutzung der N-K-Ionisationskante (Energie ca. 402 eV) und der Ca-L23-Kante (ca. 346 eV) durchgeführt wurden. Dabei wurden eine Spaltbreite von etwa 25 eV und Messzeiten von 10 bis 40 s verwendet. Für EFTEM müssen neben den eigentlichen Aufnahmen im Energiebereich oberhalb der jeweiligen Ionisationskante auch Bilder im zugehörigen Untergrundbereich registriert werden, so dass danach die zweidimensionale Elementverteilung mit Hilfe der Drei-Fenster-Methode oder auch mittels Zwei-Fenster-Verhältnis-Technik (siehe [9]) berechnet werden kann. Die TEM-Proben wurden aus den zu untersuchenden Shrimp-Schalen mittels Ultramikrotomie hergestellt. Die Präparation der Ultradünnschnitt-

te (60-90 nm Dicke) erfolgte mit dem Leica Ultracut Ultramikrotom, welches mit einem Diamantmesser (Diatome AG, Biel / Schweiz) ausgerüstet ist. TEM-Netze (100 mesh) aus Kupfer bedeckt mit 1,4%igen PIOLOFORM (Polyvinylbutyral)-Folien wurden als Träger für Stichprobenabschnitte eingesetzt. Zur Erhöhung ihres Kontrastes wurden die Ultradünnschnitte mit einer 8 mM Bleicitrat-Lösung (Reynolds, 1963) für 5 min lang gefärbt und unter Ausschluss von Luft-CO₂ inkubiert.

2.3.15 Festkörper-Kernresonanz-Spektroskopie

Etwa 10 mg der trockenen Shrimpschalen bzw. aus biologischem Verfahren gewonnenen Chitin-Produkten wurden zermahlt und in einen ZnO₂ Rotor mit 4 mm Außendurchmesser für NMR-Experimente gefüllt. Festkörper-¹³C-NMR-Spektren der Chitin-Proben wurden unter Magic-Angle-Spinning bei einer Frequenz von 10 kHz mit einem Bruker-DMX-Spektrometer bei einer ¹³C-Resonanzfrequenz von 75MHz (entsprechend einer ¹H-Resonanzfrequenz von 300 MHz) gewonnen. Eine Kreuz-Polarisationssequenz, welche eine B1 Feldstärke von 50kHz mit Rampe (80-100%) auf dem ¹H-Kanal und einer Einwirkzeit von 5 ms wurde verwendet. Das Signal wurde für 20 ms unter gleichzeitiger ¹H heteronuklearer Entkopplung von 80kHz erworben. Um Artefakte zu vermeiden wurde ein rotorsynchronisiertes Echo verwendet. Etwa 1000 Scans wurden gemittelt, mit einer Recyclingzeit von 10 Sekunden zwischen aufeinanderfolgenden Scans. Spektren wurden mit 10Hz Linienverbreiterung verarbeitet.

Die Reinheit des Chitins ist genauso wichtig wie seine Kettenlänge, da die Restproteine bei medizinischen Anwendungen Allergien verursachen können.

2.3.16 Atom-Absorptions-Spektrometrie

Die Grundlage der Atom-Absorptions-Spektrometrie (Abkürzung: AAS) ist die Fähigkeit von Atomen, im Grundzustand elektromagnetische Strahlung ganz bestimmter Wellenlänge zu absorbieren und dadurch in einen angeregten Zustand überzugehen. Zur analytischen Nutzung dieses Prinzips werden bei der AAS die Atome meist durch thermische Spaltung der entsprechenden Verbindungen erzeugt. Im Rahmen dieser Arbeit wird zur Atomisierung ein Zerstäuber- Brennersystem mit Luft/Acetylen-Flamme ($T \approx 1800 \text{ }^\circ\text{C}$) eingesetzt. Die durch Atomisierung entstandene „Atomwolke“ wird in der Regel mit charakteristischem Licht desjenigen Elementes bestrahlt, welches analysiert werden soll. Als Lichtquelle werden deshalb Hohlkathodenlampen für das zu bestimmende Element eingesetzt. Mit dem Gerät SpectrAA 220 FS der Firma Varian werden im Rahmen dieser Arbeit die Schwermetalle Cu (327,4 nm), Cr (425,4 nm), Cd (326,1 nm), Mn (403,1 nm), Fe (372,0 nm), Co (345,4 nm), Ni (341,5 nm), Pb (363,5 nm) und Zn (213,9 nm) bestimmt.

Für die Kalibrierung werden 4 Konzentrationen der 9 Schwermetalle verwendet: Null, niedrige, mittlere und hohe Konzentration. Für die Nullprobe wurde Milliporewasser benutzt (Milliporewasser ist ein Wasser, welches zweimal entionisiert wird. Es wird bei der AAS-Messung nur Milliporewasser verwendet!) . Die anderen drei Konzentrationen sind je nach Art des Metalls unterschiedlich. Die Bereiche hierfür sind in der Tabelle 2.15 angegeben.

Tab. 2.15: Konzentrationen [mg/l] der verschiedenen Schwermetalle zur Kalibrierung

Konzentration	Co	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn	Cd	Mn
Null	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Niedrige	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	0,2	0,2	1,0
Mittlere	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	5,0	0,5	0,5	2,0
Höhere	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	10,0	1,0	1,0	3,0

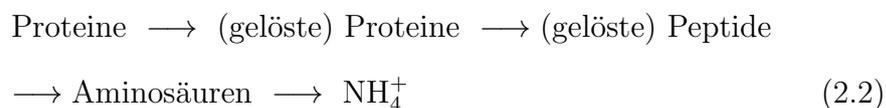
Die abzentrifugierte Probe wird in Röhrchen gegeben und mit 1% HNO_3 angesäuert. Die Röhrchen werden auf die Messstelle gestellt. Um eine Kalibrierkurve für die Schwermetalle zu erstellen, werden die großen Röhrchen mit 4 Kalibrierlösungen ebenfalls darauf gestellt. Das Gerät misst die Proben und die Auswertung der Messergebnisse wird von einem Computer automatisch durchgeführt. Die Einheit der Werte ist mg/l. Die neun einzelnen Stammlösungen (1 g/l) wurden von der Firma Varian bezogen.

2.4 Batch-Ansätze zur biologischen Deproteinerung und Demineralisierung von Garnelenschalen für die Chitin und Chitosan-gewinnung

Es wurden zahlreiche Batch-Ansätze unter Labor-Bedingungen durchgeführt. Unter Labor-Bedingungen muss nicht viel Anfangsmaterial verwendet wer-

den, das von der Nordsee geholt oder aus Indonesien importiert werden musste. Die eingesetzte Menge der Shrimp-Schalen in den durchgeführten Batch-Ansätzen betrug in der Regel 15 g pro Ansatz (6% w/v). Da die biologische Deproteinierung und Demineralisierung sehr unterschiedliche Reaktionsbedingungen (neutraler bis alkalischer pH-Wert für die Deproteinierung, saurerer pH-Wert für die Demineralisierung) erfordert, wurde ein Zweischrittverfahren wie bei dem chemischem Verfahren eingesetzt: Der erste Schritt war eine Deproteinierung mit proteolytischen Bakterien und danach wurde eine Demineralisierung mit Milchsäurebakterien unter Zugabe von Glukose als Substrat für die Milchsäurebildung vorgenommen

Ziel der Deproteinierung ist es, die Proteine (Fleischreste der Shrimp-Schalen) komplett in gelöste Proteine, Peptide, Aminosäuren und Ammoniak Schritt für Schritt (2.2) umzuwandeln. Das Verhältnis von diesen vier Abbauprodukten der Proteine hängt von der Inkubationszeit ab. Je länger die Inkubationszeit ist, desto größer ist der Anteil von Ammoniak (3.1). Es müssen jedoch nicht alle Proteine zu Ammonium umgewandelt werden. Es ist ausreichend, alle Proteine in eine gelöste Form umzuwandeln, da die Dauer der Deproteinierung so kurz wie möglich sein sollte, um die Selektion von chitin-abbauenden Bakterien weitgehend zu verhindern, die umso weiter fortschreitet, je länger die Inkubationszeit anhält. Eine längere Inkubationszeit ist nicht nur unwirtschaftlich für die Industrie, sondern kann auch zu Kettenbrüchen im Chitin führen. Das Chitin ist qualitativ umso höherwertiger, je länger die Polymere sind, weil dann bei der Deacetylierung ein viskoseres Chitosan erhalten wird, das sich z.B. zur Herstellung einer künstlichen Haut in der Medizin einsetzen lässt.



Die Deproteinierung der Garnelenschalen wurde mit drei verschiedenen proteolytischen Bakterienquellen vorgenommen:

- 1) Ohne Inokulum, Verwendung der autochthonen proteolytischen Bakterien, die auf den Shrimp-Schalen vorhanden waren
- 2) Herstellung von spezifisch mit Protein angereicherten Kulturen aus der autochthonen Population der Shrimp-Schalen
- 3) Herstellung von proteolytischen Anreicherungskulturen aus anderen Quellen
- 4) Herstellung von proteolytischen Reinkulturen aus Anreicherungskulturen

Durchführung von Batch-Versuchen zur Deproteinierung und Demineralisierung

Deproteinierung von Garnelenschalen:

Mit Ausnahme der Versuche ohne externes Inoculum wurden für jeden Batch-Ansatz zur Deproteinierung 250 ml Inokulum der gewünschten proteolytischen Anreicherungskultur in einer Schottflasche (1000 ml Gesamtvolumen, 250 ml Flüssigkeitsvolumen) 12-24 Stunden vor Beginn des Versuches angezogen. Es wurden 5-10% Vorkultur in einer Schott-Flasche mit 250 ml neuem Medium (demselben Medium wie in der Vorkultur) überimpft und

unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelschrank bei 110 Umdrehungen pro Minute Schüttelfrequenz als Inokulum vorgezogen.

Die angezogenen Bakterien wurden abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Die Zentrifugation erfolgte bei ca. 5000 Umdrehungen pro Minute (Rotordurchmesser 60 cm). Das Feucht-Gewicht des Bakterien-Pellets wurde bestimmt. Die Bakterien wurden mit 250 ml Leitungswasser in einer Schottflasche mit entsprechendem vorgewogenem Anteil Shrimp-Schalen überführt. Um anaerobe Bedingungen zu schaffen, wurde ein Gasaustausch mit Stickstoff durchgeführt und anschließend bei 37 °C im Schüttelschrank (Schüttelgeschwindigkeit bei 110 Umdrehungen pro Minute) inkubiert.

Während der Inkubation wird der gelöste TKN, NH_4^+ , pH-Wert und die Calcium-Konzentration 2 Mal pro Tag gemessen. Nach der Deproteinierung wird das Produkt „Kalkchitin“ mit einem Nylon-Beutel oder Küchensieb gesammelt und mit Leitungswasser mehrmals gewaschen. Am Schluß wird das Kalkchitin unter dem Labor-Abzug luftgetrocknet.

Demineralisierung von Garnelenschalen

Für jeden Batch-Ansatz zur Demineralisierung werden ebenfalls 250 ml Inokulum von Milchsäurebakterien 24 Stunden vor der Demineralisierung angezogen. Es wurde mit 10% Inokulum in 250 ml neues MRS-Medium überimpft und bei 37 °C im Schüttelschrank (Die Schüttelgeschwindigkeit lag bei 110 Umdrehungen pro Minute) inkubiert. Die angezogenen Milchsäurebakterien werden abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Die Geschwindigkeit der Zentrifugation beträgt ca. 5000 Umdrehungen pro Minute. Das Feucht-Gewicht des Bakterien-Pellets wird bestimmt. Die Bakterien werden mit 250 ml Leitungswasser und entsprechender Menge von Glukose in eine Schottflasche überführt. Das zuvor durch Deproteinierung erzeugte Kalkchi-

tin wird in diese Schottflasche zugegeben. Ein Gasaustausch mit Stickstoff wird durchgeführt und der Ansatz anschließend bei 37 °C im Schüttelschrank bei 110 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

Es wurde der pH-Wert und die gelöste Calcium-Konzentration während der Inkubation gemessen.

Nach der Demineralisierung wurde das Chitin mit dest. Wasser mehrmals gewaschen. Nach dem Waschen wird das Chitin in einem Nylon-Beutel unter dem Abzug luftgetrocknet.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Batch-Ansätze zur biologischen Deproteinierung und Demineralisierung von Garnelenschalen für die Chitin und Chitosan-gewinnung

3.1.1 Deproteinierung von Garnelenschalen ohne externes Inokulum

Der erste Gedanke war, die Deproteinierung mit autochthonen Bakterien der Garnelenschalen vorzunehmen. In der Natur gilt, wo es organische Stoffe gibt, gibt es auch passende Bakterien, die diesen Stoff abbauen können.

Es wurden 15 g nasse Shrimp-Schalen (*C. crangon* und Abdomen von *P. monodon* mit 66% Wassergehalt) in 250 ml Leitungswasser eingesetzt. Die Shrimp-Schalen waren in einer Tiefkühltruhe eingelagert, so dass die auto-

chthone Flora überlebte. Durch Inkubation unter anaeroben Bedingungen konnten die Bakterien reaktiviert werden und sich vermehren. Der Versuch wurde unter anaeroben Bedingungen bei 37°C im Schüttelschrank (Schüttelgeschwindigkeit: 110 Umdrehungen pro Minute) durchgeführt.

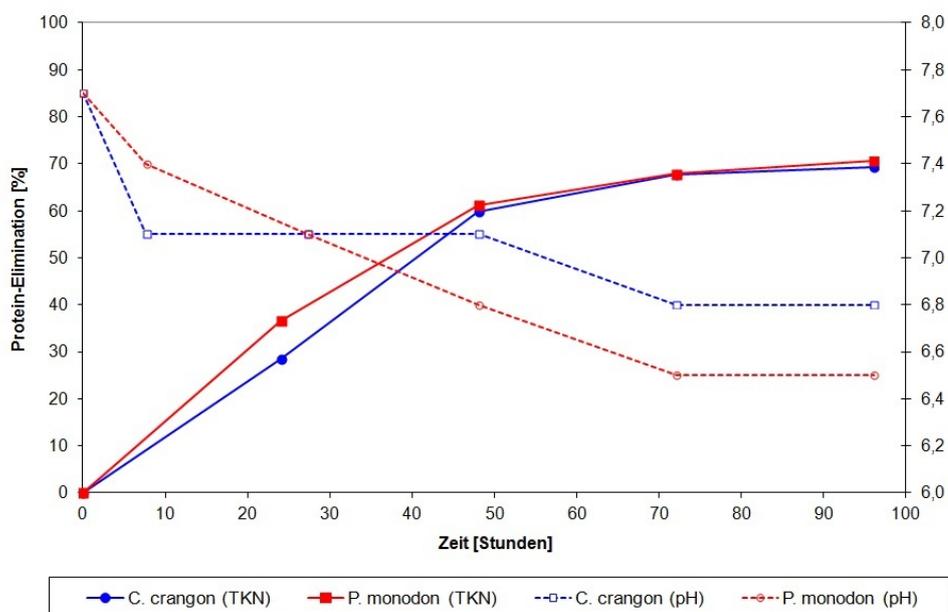


Abb. 3.1: Protein-Umsetzung mit Bakterien aus Shrimp-Schalen ohne Inokulum

Wie aus Abb. 3.1 ersichtlich, lag die Protein-Elimination von *P. monodon*- bzw. *Crangon crangon*-Schalen nach 48 h bei 60% und erreichte Werte von über 70% nach 96 h. Der pH-Wert sank leicht ab. Durch diesem Versuch wurde nachgewiesen, dass die autochthone Flora proteolytische Aktivität besitzt, aber die Effektivität weit entfernt von dem gewünschten Ziel ist.

3.1.2 Deproteinierung mit Anreicherungskulturen aus Shrimp-Schalen

Um die proteolytische Aktivität zu verbessern, wurde in den nächsten Versuchen mit einer Anreicherungskultur gearbeitet. Eine Anreicherungskultur hat u.a. den Vorteil der konstanten Verfügbarkeit einer großen Menge von Bakterien.

Zur Herstellung von Anreicherungskulturen wurden die autochthonen Bakterien auf den Garnelenschalen in 3 verschiedenen peptonhaltigen Medien (2.2.1) angezogen. Da Peptone sehr viele Proteine und kleinmolekulare Abbauprodukte enthalten, sind solche Medien sehr gut geeignet für die Anreicherung von proteolytischen Bakterien. Unterschiede zwischen den Medien M1, M2 und M3 sind die unterschiedlichen Anteile von Pepton und Casein und auch von unterschiedlichen zusätzlichen Stoffen. Die TKN-Werte liegen für alle 3 Medien bei ca. 2,2 g N/l. In den 3 Medien wuchsen nach der Beimpfung mit Shrimp-Schalen 3 unterschiedliche Anreicherungskulturen bis zu optischen Dichten von 1,7 bis 2,5 heran. Die Wachstumskurven werden in der Abb. 3.2 gezeigt. Der größte Teil des Wachstums erfolgt in den ersten 8 h nach der Beimpfung. Danach steigt die optische Dichte zwar stetig aber nur noch langsam an.

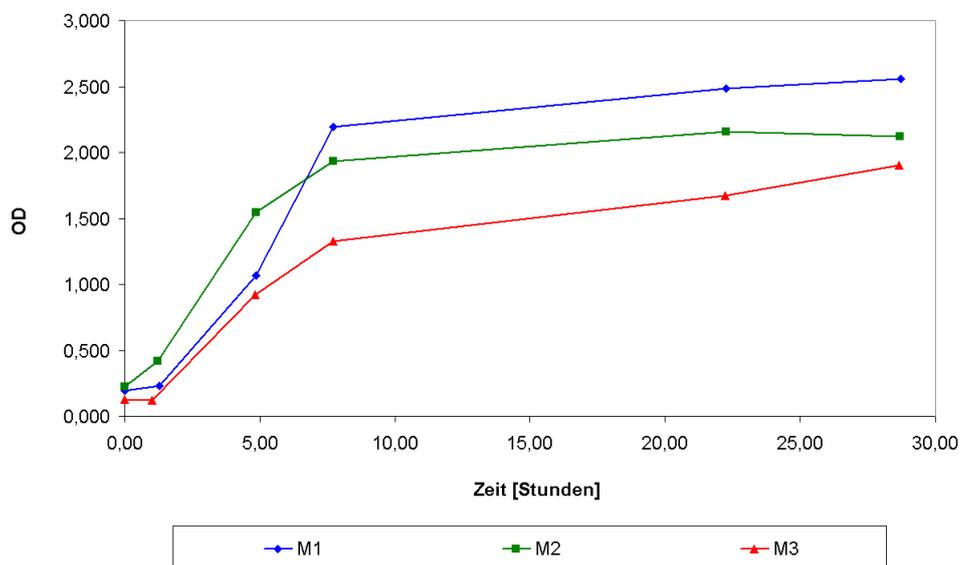


Abb. 3.2: Wachstumskurve von proteolytischen Bakterien aus Shrimp-Schalen in den Medien M1, M2 und M3

Die drei Anreicherungskulturen sind nach einer kurzen lag-Phase von 2 h und einem logarithmischen Wachstum in den folgenden 6 h schon nach ca. 8 Stunden in die stationäre Phase übergegangen (Abbildung 3.2). Es sollte als Nächstes geprüft werden, ob mit diesen Anreicherungskulturen auch Shrimp-Schalen deproteiniert werden konnten. Dazu wurden 10%ige Suspensionen von Shrimp-Schalen mit Leitungswasser hergestellt und mit den Anreicherungskulturen M1 - M3 beimpft. In diesem Versuch wurden 15 g luftgetrocknete Shrimp-Schalen (Abdomen von *P. monodon*) eingesetzt, deren Wassergehalt bei 6% lag. Der Versuch wurde unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelschrank mit 110 Umdrehungen pro Minute durchgeführt

3.3.

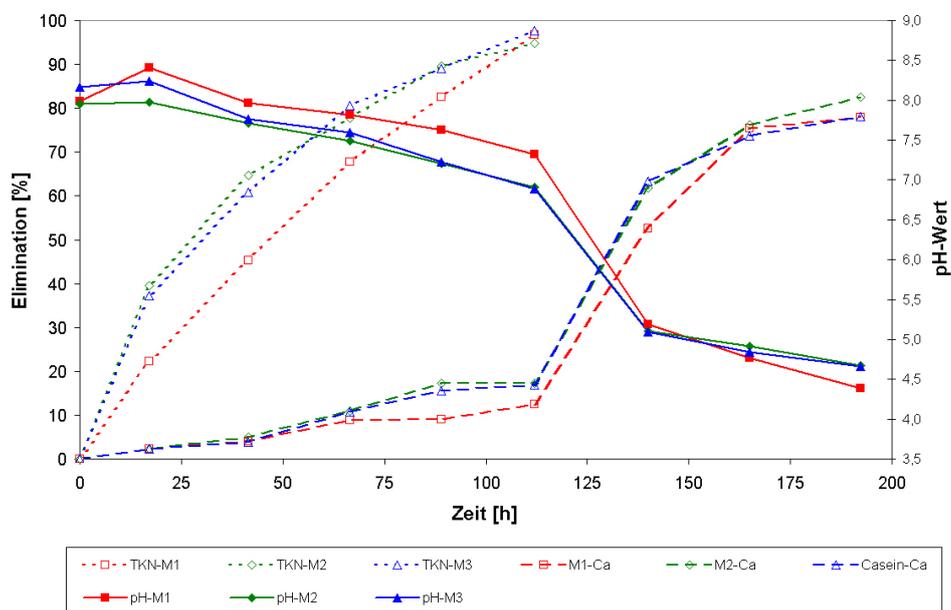


Abb. 3.3: Protein-Umsetzung mit Anreicherungskulturen aus Shrimp-Schalen

Nach 110 Stunden ist eine Protein-Elimination von ca. 96% mit den 3 Anreicherungskulturen erreicht. Gleichzeitig wurde ca. 10% Calcium eliminiert. Die Protein-Elimination bei der Anreicherungskultur M2 und M3 läuft parallel und ergibt fast keinen Unterschied. Die Protein-Elimination der Anreicherungskultur M1 ist am Anfang niedriger als die der Anreicherungskulturen M2 und M3. Am Schluss wurden auch hier ca. 96% des Proteins von den Shrimp-Schalen abgelöst. Nach Ablauf von 110 Stunden konnte festgestellt werden, dass bei allen 3 Anreicherungskulturen die Protein-Elimination fast gleich war. Die Flüssigphase der drei Kulturen wurde nun abgezogen und durch Leitungswasser mit Glucosezusatz ersetzt (Abbildung 3.3). Für die Milchsäurebildung aus der Glucose wurden Lactobacillen zugesetzt. Die Calciumfreisetzung lief in allen drei Ansätzen gleichmässig und erreichte bei einem minimalen pH-Wert von 4.3 etwa 80% (löslicher Calciumgehalt in

der Flüssigphase). Eine Calciumbilanzierung ergab, dass die Garnelenschalen vollständig demineralisiert wurden und der Calciumfehlbetrag aus der Flüssigphase ausgefällt wurde. Die Lösung des Calciumcarbonates aus den Shrimp-Schalen erfolgte durch Reaktion mit Milchsäure, die von den Lactobacillen aus Glucose gebildet und im Medium ausgeschieden wurde. Dort befanden sich offensichtlich auch Carbonate, die mit Calciumlactat reagierten und im lösliches Calciumcarbonat bildeten.

3.1.3 Herstellung von Inokula aus anderen Quellen

Das Vorkommen proteolytischer Bakterien auf Shrimp-Schalen war nicht ungewöhnlich. Da aber Chitin sich in der Natur nicht anreichert, sondern schnell abgebaut wird, bestand die Gefahr, dass mit den proteolytischen Bakterien auch chitinolytische Bakterien angereichert wurden. Die spätere mikrobiologische bzw. molekulare Untersuchung der Anreicherungskulturen M1, M2 und M3 aus Shrimp-Schalen ergab, dass tatsächlich inaktive Gene für die Chitinase gefunden wurden [53]. Es stellte sich daher die Frage, ob man proteolytische Bakterien aus anderen Quellen finden kann, die keine Organismen mit Chitinase-Genen und vielleicht sogar eine bessere proteolytische Aktivität besitzen. Da die Deproteinierung mit Anreicherungskulturen aus Shrimp-Schalen ca. 4-5 Tage dauert, ist dies für die Industrie nicht wirtschaftlich.

Als Alternative zur Anreicherungskultur aus Garnelenschalen wurden proteolytische Bakterien aus folgenden Quellen untergesucht: Pellettschlamm, Erde, Faulschlamm, Sauerkrautsaft und Hackfleisch. Dazu wurden die Proben aus den unterschiedlichen Quellen in einem Shrimp-Schalen-Medium (*Crangon crangon*, 2.2.2) angezogen. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Be-

dingungen bei 37°C im Schüttelschrank bei 110 Umdrehungen pro Minute.

Die angereicherte Bakterien-Flora wurde nochmal im Shrimp-Schalen-Medium weiter geimpft. Während der Inkubation wurde die NH_4^+ -N-Freisetzung nach 0, 24 bzw. 73 Stunden gemessen. Die Ergebnisse gibt die Abbildung 3.4 wieder.

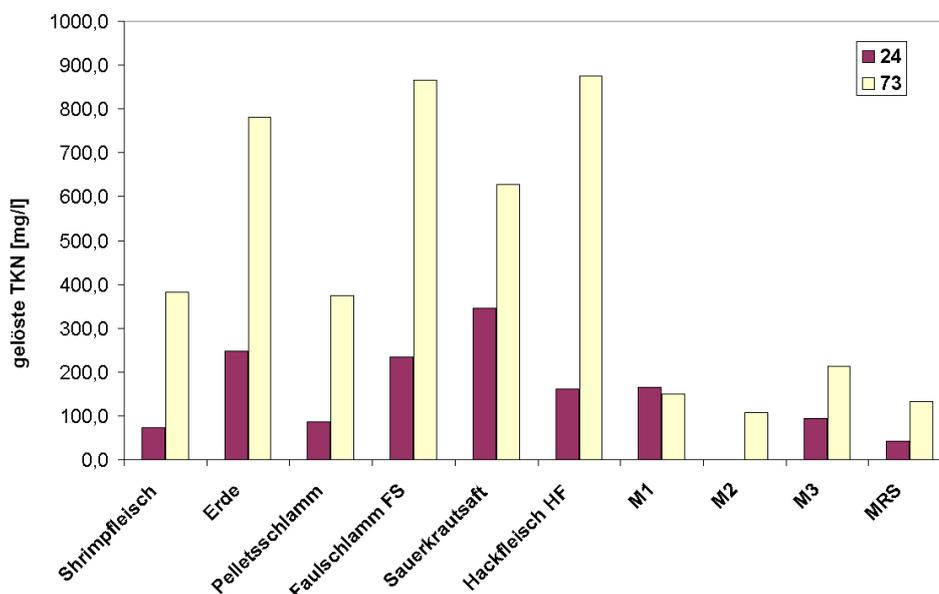


Abb. 3.4: Protein-Umsetzung mit Anreicherungskulturen aus verschiedenen Quellen, gemessen an Hand der Ammoniumfreisetzung.

Die NH_4^+ -N-Freisetzung mit Hackfleisch, Faulschlamm und Erde als Inokulum zur Selektion proteolytischer Bakterien nach 73 Stunden Inkubationszeit ist deutlich besser als mit der Anreicherungskultur aus Shrimp-Schalen. Für weitere Untersuchungen wurden die Anreicherungskulturen aus Faulschlamm und Hackfleisch ausgewählt, da diese beiden Anreicherungskulturen am meisten Ammoniak freigesetzt haben. Sie werden im Folgenden als

Anreicherungskulturen FS und HF benannt. Die proteolytische Aktivität der Anreicherungskultur aus Erde war zwar auch nicht viel schlechter als von FS und HF, aber sie könnte Chitinabbauer enthalten, weil in Erde viele Pilze mit Chitinzellwand enthalten sind.

Charakterisierung der Anreicherungskulturen FS und HF

Die Anreicherungskultur aus Hackfleisch wuchs in Medium mit Shrimpfleischextrakt aus Siebkrabben schneller und zu einer höheren Enddichte als die Anreicherungskultur aus Faulschlamm (Abbildung 3.5). Nach dem logarithmischen Wachstum nahm die optische Dichte beider Kulturen mit zunehmender Inkubation noch langsam weiter zu. Da der pH-Wert bei der Deproteinierung in den schwach alkalischen Bereich ansteigt, ist nicht mit einer Demineralisierung der Garnelenschalen zu rechnen.

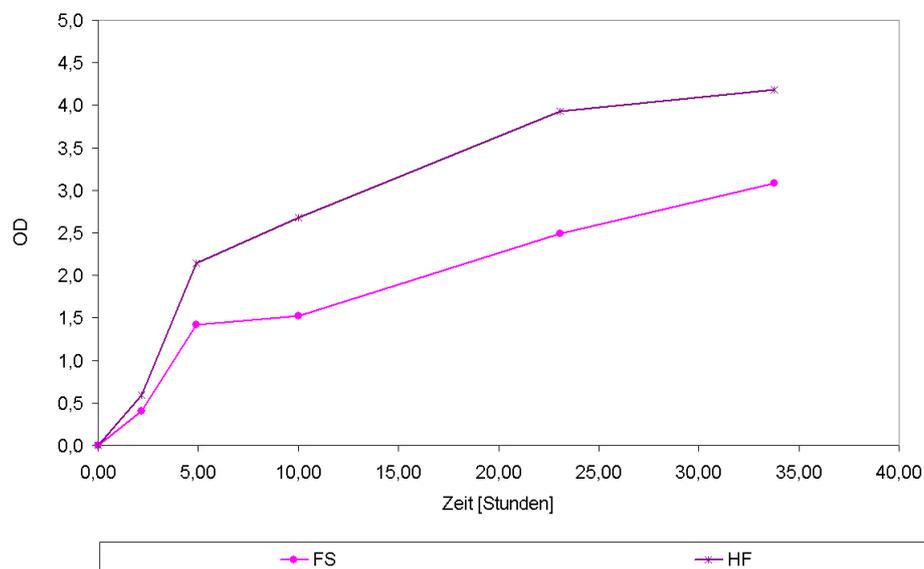


Abb. 3.5: Wachstumskurve von Anreicherungskulturen aus Faulschlamm oder Hackfleisch (FS=Faulschlamm, HF=Hackfleisch)

3.1.4 Deproteinierung mit Inokula aus anderen Quellen

Die beiden Anreicherungskulturen FS und HF haben zwar die besten NH_4^+ -N-Freisetzungen erreicht, es ist aber nicht sicher, ob sie auch spezifische proteolytische Eigenschaften für die biologische Deproteinierung von Shrimpschalen besitzen.

3.1.5 Deproteinierung von Exuvien mit der Anreicherungskultur HF

Exuvien sind abgeworfene Shrimp-Schalen aus der Häutung, besitzen einen sehr hohen Chitin-Anteil und haben wenige Proteine. Das sind hervorragende Voraussetzungen für ein biologisches Verfahren zur Chitingewinnung. Der Nachteil liegt in der Herbeischaffung der benötigten Mengen von Exuvien, da diese aufgefressen und in die wachsenden Chitinschalen eingebaut werden.

Es wurden 15 g trockene Exuvien (Wassergehalt 7,2%) in 250 ml Wasser aufgenommen. Die Exuvien wurden mit der Anreicherungskultur HF beimpft und deproteiniert (Abbildung 3.6). Nach der Lösung von mehr als 97% des Proteines wurde die Wasserphase abgezogen und mit frischem Leitungswasser und einer Anreicherungskultur von Milchsäurebakterien unter Zugabe von Glucose entkalkt (Abbildung 3.6, ab Stunde 40). Es wurde die Anreicherungskultur der Milchsäurebakterien verwendet, in der die meisten Bakterien heterofermentative Milchsäurebakterien waren. Die Glucosedosierung wurde doppelt stöchiometrisch zum Calciumgehalt der Schalen berechnet und zugegeben, d.h. für 15 g trockene Exuvien-Schalen mit einem Calcium-Gehalt von 130 mg/gTS waren 35 g Glucose nötig. Der Versuch wurde unter anaeroben Bedingungen bei 37°C mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 110 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Die Demineralisierung begann mit der Milchsäurebildung bzw. mit dem dadurch hervorgerufenen pH-Abfall. Die Demineralisierung dauerte nur etwa halb so lange wie die Deproteinierung. Die Calcium-Elimination lag nach ca. 24 Stunden scheinbar nur bei ca. 75%. Bei der abschliessenden Produktcharakterisierung wurde jedoch nachgewiesen, dass der Restgehalt von Calcium nur 2,88 mg/gTS (0,3%) betrug. Das bedeutet eine Calcium-Elimination von 97,8%, wobei 22,8% des aus Chitin

herausgelösten Calciums ausgefällt wurden.

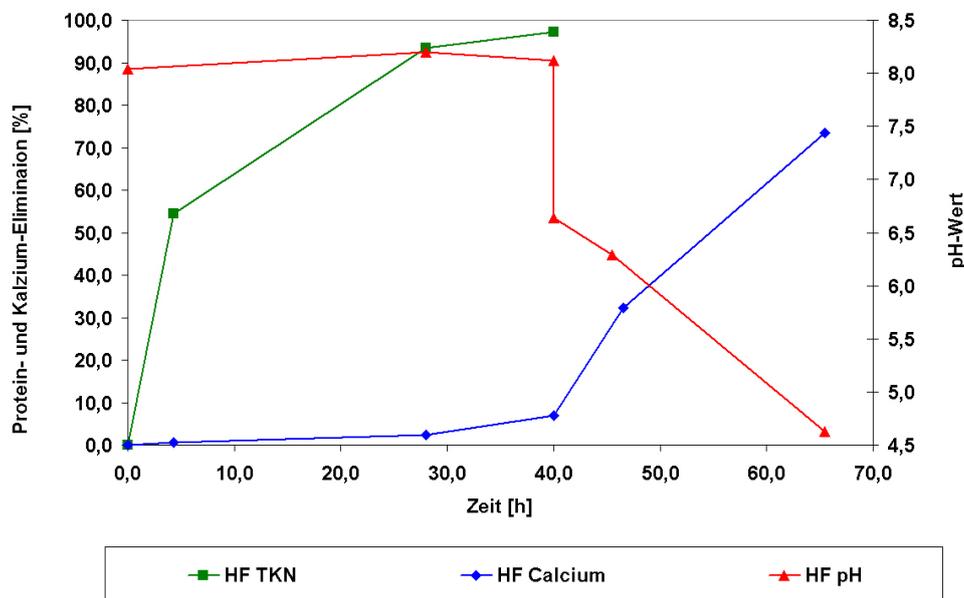


Abb. 3.6: Batch-Ansatz mit Exuvien und einer proteolytischen Anreicherungskultur aus Hackfleisch

3.1.6 Vergleich der Deproteinierung von nassen und trockenen Shrimp-Schalen mit Anreicherungskulturen M1, M2, HF und FS

In diesem Ansatz wurden die Protein-Eliminationsraten zwischen nassen und trockenen Shrimp-Schalen (Abdomen von *P. monodon*) mit den unterschiedlichen Anreicherungskulturen aus Shrimp-Schalen (M1, M2), Faulschlamm (FS) und Hackfleisch (HF) verglichen. Es sollte überprüft werden, ob es relevante Unterschiede der Proteinentfernung aus Shrimp-Schalen zwischen nassen und trockenen Shrimp-Schalen mit den unterschiedlichen Anreicherungskulturen gibt. Das wäre wichtig für den Einsatz von nassen oder trockenen

Schalen in größeren Massstab. In tropischer Ländern wäre eine schnelle Lufttrocknung durch entsprechende Lagerungsmethoden im Freien leicht möglich.

Je 15 g nasse (Wassergehalt ca. 66%) bzw. trockene (Wassergehalt ca. 6%) Shrimp-Schalen wurden in 250 ml Leitungswasser mit den jeweiligen Anreicherungskulturen M1, M2, FS und HF versetzt. Der Versuch wurde unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 110 Umdrehungen pro Minute durchgeführt.

a) Deproteinierung von nassen Shrimp-Schalen mit M1 und M2

Wie aus Abb. 3.7 ersichtlich ist, lag die Protein-Elimination nach 72 Stunden bei ca. 92% mit der Anreicherungskultur M2 und bei nur 70% mit der Anreicherungskultur M1. Bei der Deproteinierung wurden ca. 80% des Proteines bis zum Ammoniak umgesetzt (Abbildung 3.7). Die Demineralisierung mit Milchsäurebakterien war wie schon vorher festgestellt scheinbar unvollständig. Wenn man das aus den Shrimp-Schalen herausgelöste und nach der Lösung wieder ausgefällte Calcium hinzuzählt, war die Demineralisierung nahezu 100%.

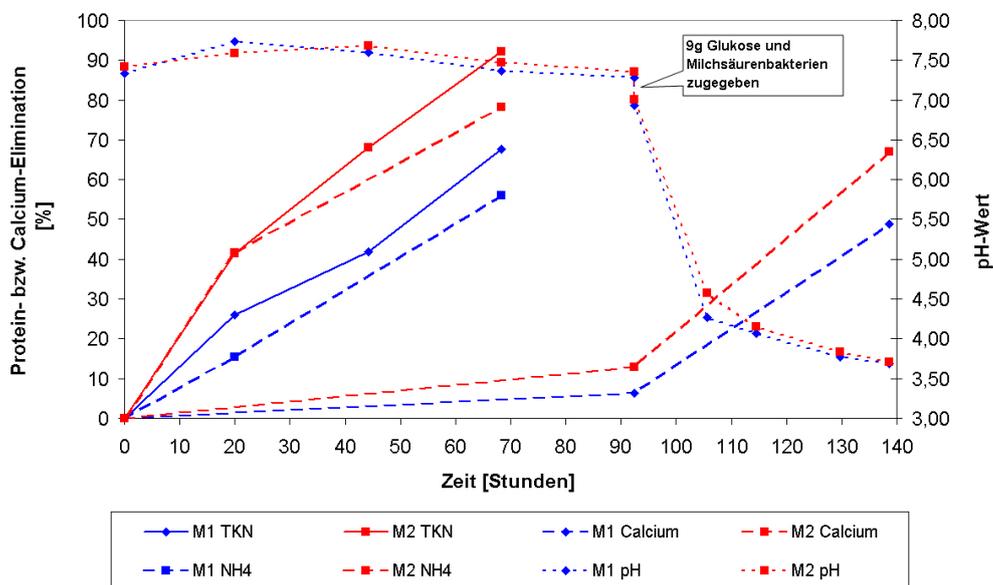


Abb. 3.7: Behandlung nasser Shrimp-Schalen von *P. monodon* mit den Anreicherungskulturen M1 und M2 aus Shrimp-Schalen

b) Deproteinierung von trockenen Schalen mit M1 und M2

Wie aus Abb. 3.8 ersichtlich ist, lag die Deproteinierung von getrockneten *P. monodon*-Schalen aus Indonesien nach ca. 140 Stunden bei ca. 85% mit der Anreicherungskultur M2 und bei ca. 80% mit der Anreicherungskultur M1. Bis zur etwa gleichen Protein-Elimination war die nötige Inkubationszeit für trockene Shrimp-Schalen deutlich länger als für nasse Shrimp-Schalen.

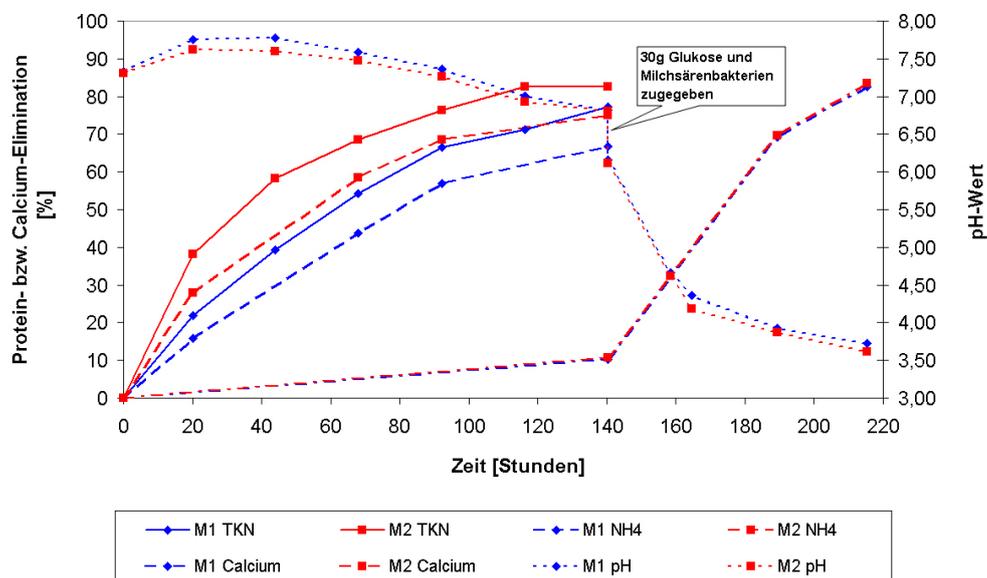


Abb. 3.8: Behandlung trockener Shrimp-Schalen von *P.monodon* mit den Anreicherungskulturen M1 und M2 aus Shrimp-Schalen für Deproteinierung mit ausschließlicher Demineralisierung nach Glucose und Lactobacillenzusatz

c) Deproteinierung von nassen Shrimp-Schalen mit FS und HF

Wie aus Abb. 3.9 ersichtlich, lag die Protein-Elimination nach 90 Stunden bei fast 100% mit der Anreicherungskultur aus Hackfleisch und bei ca. 80% mit der Anreicherungskultur aus Faulschlamm. Die Demineralisierung wurde wie oben beschrieben vorgenommen. Die Demineralisierung bereitet keine Probleme, wenn der pH-Wert auf unter 4,0 absinkt. Die Demineralisierungsdauer hängt von der Dichte und Aktivität des Inoculums und der Wachstumsdauer ab.

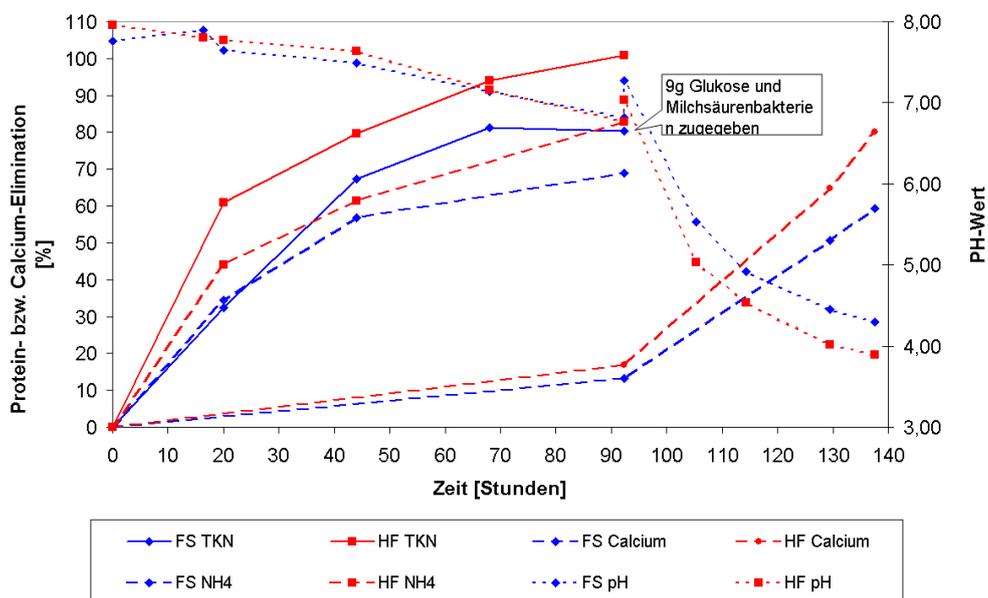


Abb. 3.9: Behandlung nasser Shrimp-Schalen von *P. monodon* mit den Anreicherungskulturen FS und HF aus Faulschlamm und Hackfleisch

d) Deproteinierung von trockenen Shrimp-Schalen mit FS und HF

Wie aus Abb. 3.10 ersichtlich ist, lag die Protein-Elimination nach 110 Stunden bei bis zu 100% sowohl mit der Anreicherungskultur aus Faulschlamm als auch mit der Anreicherungskultur aus Hackfleisch. Die anschließende biologische Demineralisierung verlief wie oben.

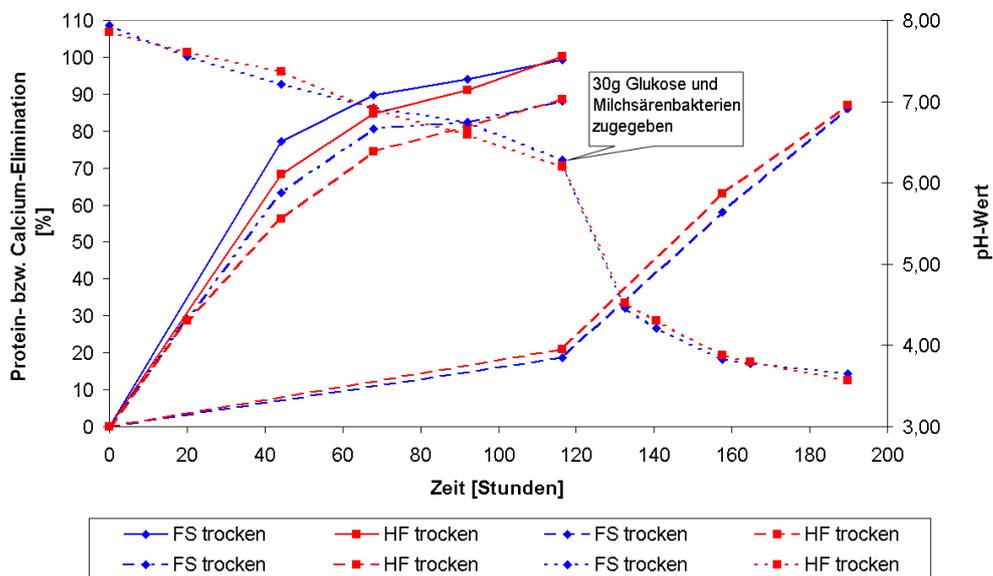


Abb. 3.10: Behandlung trockener Shrimp-Schalen von *P. monodon* mit den Anreicherungskulturen FS und HF aus Faulschlamm und Hackfleisch

Auf ersten Blick kann man feststellen, dass die Deproteinierung bei gleicher Einwaage mit nassen Shrimp-Schalen deutlich schneller läuft als mit trockenen Shrimp-Schalen. Bezieht man die Deproteinierungszeit aber auf das zugegebene Trockengewicht, (Tabelle 3.1) und berechnet die Protein-Eliminationsrate, so kehrt sich das Ergebnis um. Die Eliminationsrate von Protein bei trockenen Shrimp-Schalen war deutlich schneller als bei nassen Shrimp-Schalen. Hier spielt möglicherweise die höhere Konzentration des Proteins eine Rolle.

Tab. 3.1: Vergleich der Stickstoff-Eliminationsgeschwindigkeiten (Einheit: mgN/h)

	M1	M2	FS	HK	M1	M2	FS	HF
	nass	nass	nass	nass	trocken	trocken	trocken	trocken
0-20	0,20	0,33	0,25	0,48	0,49	0,87	0,82	0,89
20-48	0,10	0,17	0,23	0,12	0,32	0,38	0,77	0,54
48-72	0,17	0,17	0,09	0,09	0,28	0,19	0,23	0,30
72-96				0,04	0,22	0,14	0,08	0,11
96-120					0,08	0,11	0,09	0,17

Die Ammonium-Konzentration im Abwasser spielt auch eine sehr große Rolle. Wenn der Ammonium-Anteil bei TKN-Wert sehr gering ist, kann man das Abwasser evtl. für Tier-Futter verwenden, da es noch sehr viel gelöste Proteine und Peptide gibt. Wenn die Desaminierung weit fortgeschritten ist und der Ammonium-Anteil sehr hoch ist, muss das Abwasser extra entsorgt werden. In der Tabelle 3.2 wird gezeigt, zu welchem Zeitpunkt man welchen Ammonium-Anteil im TKN (in Prozent) hat.

Tab. 3.2: Vergleich des Verhältnisses zwischen Ammonium und gelösten TKN zu verschiedenen Zeitpunkten, Einheit: %

	M1	M2	FS	HK	M1	M2	FS	HF
	nass	nass	nass	nass	trocken	trocken	trocken	trocken
0	11	16	45	22	0	0	0	0
20	33	60	63	55	61	61	67	61
44	63	77	63	63	68	75	75	74
68	65	65	65	70	73	77	82	81
92	68	86	68	75	79	82	82	83

Man kann in der Tabelle sehen, dass es bei nassen Shrimp-Schalen schon am Anfang einen relativ hohen Anteil von Ammonium gibt. Dagegen gibt es bei trockenen Shrimp-Schalen kein Ammonium. Nach ca. 20 Stunden liegen die Anteile von Ammonium bei allen Ansätzen bei ca. 60% und zwischen 20 und 68 Stunden ist der Ammonium-Anteil nicht unwesentlich auf 65-75% gestiegen. Erst nach ca. 70-80 Stunden ist der Anteil von Ammonium auf ca. 80% bei trockenen Shrimp-Schalen gestiegen.

3.1.7 Deproteinierung von Shrimp-Schalen aus Büsum mit unterschiedlichen Inokulumsdichten an proteolytischen Bakterien (HF)

Bei mikrobiologischen Deproteinierungsverfahren spielt neben der Aktivität die Menge des Inokulums eine wichtige Rolle. In diesem Versuch wurde untersucht, ob und wie stark die Inokulumsdichten (Bakterienanimpfmengen von

HF) die biologische Deproteinierung von Chitin beeinflussen. Die Ergebnisse wurden in der Abb. 3.11 zusammengestellt. Die Deproteinierung mit mehr Inokulum verläuft deutlich schneller als mit weniger Inokulum (Abbildung 3.11).

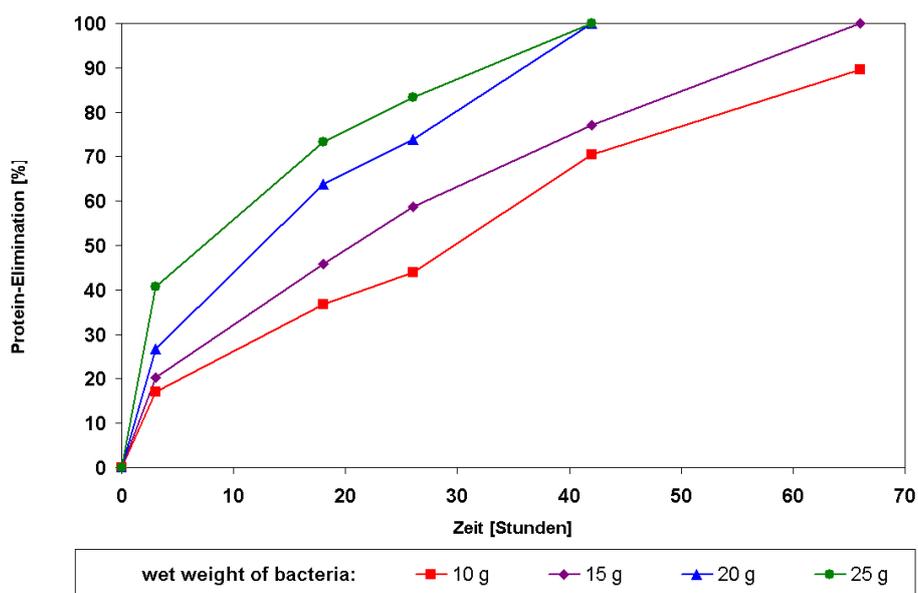


Abb. 3.11: Protein-Elimination bei unterschiedlichem Bakterien-Feuchtgewicht

3.1.8 Untersuchung der Lagerungsfähigkeit von proteolytischen Anreicherungskulturen aus Hackfleisch

Wenn Anreicherungskulturen in der Produktion Verwendung finden sollen, müssen sie unter einfachen Bedingungen ohne deutlichen Aktivitätsverlust lagerbar sein und leicht transportiert werden können. Es wurde eine Untersuchung durchgeführt, bei welcher die Lagerfähigkeit der Anreicherungskultur aus Hackfleisch unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen überprüft

wurde.

12 Flaschen der Anreicherungskulturen mit je 250 ml in Shrimp-Schalen-Medium wurden identisch vorbereitet. Die Bakterien wurden gleichzeitig durch Zentrifugation geerntet (5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute) und in kleine Fläschchen gefüllt. Dabei wurden 6 Fläschchen ohne Deckel (aerobe Bedingungen) und 6 Fläschchen mit Deckel und Ersatz von Luft durch Stickstoff (anaerobe Bedingungen) aufbewahrt. Schliesslich wurden alle 12 Fläschchen in der Kühlkammer bei ca. 12 °C gelagert. Alle 24 Stunden wurde jeweils ein Fläschchen herausgeholt, mit 250 ml Leitungswasser resuspendiert und mit 15 g abgepressten Shrimp-Schalen (*C. crangon*) aus Büsum versetzt, um die Deproteinierung in Gang zu setzen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.12 für die Lagerfähigkeit unter anaeroben Bedingungen und in Abb. 3.13 für die Lagerfähigkeit der HF-Kulturen unter aeroben Bedingungen dargestellt.

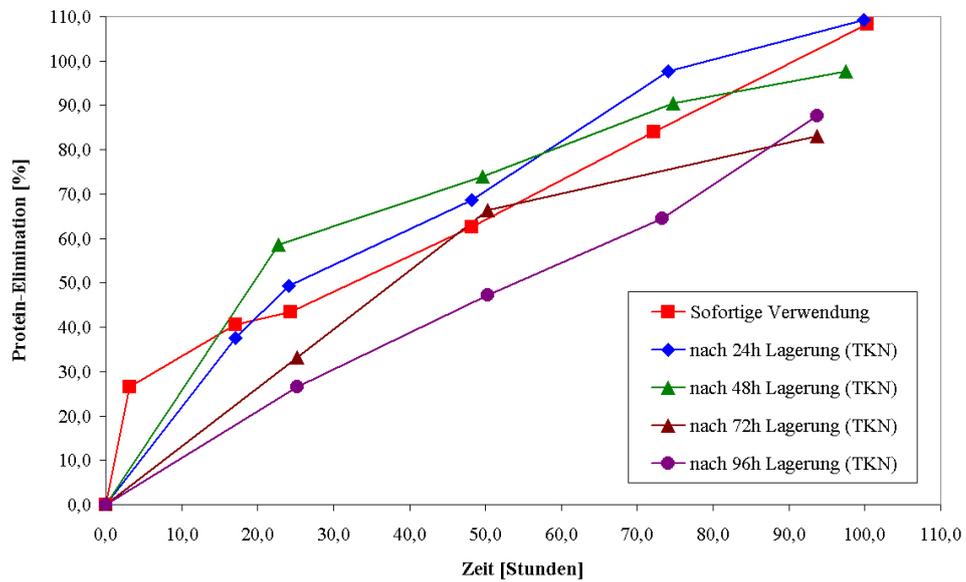


Abb. 3.12: Lagerfähigkeit der HF-Kulturen unter aeroben Bedingungen

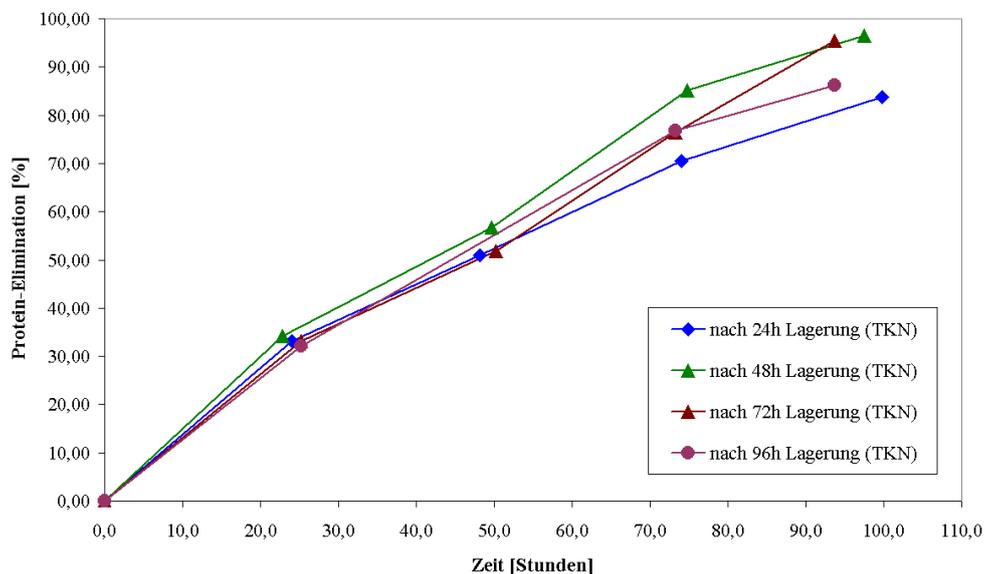


Abb. 3.13: Lagerfähigkeit der HF-Kulturen unter anaeroben Bedingungen

Aus beiden Abbildungen ist zu ersehen, dass die Proteaseaktivität der Anreicherungskultur aus Hackfleisch unterschiedlich beständig ist. Unter aeroben Lagerbedingungen ist die Proteaseaktivität anfangs etwas besser (exponentieller Verlauf der Aktivität bei einer Lagerungsdauer von weniger als 48 Stunden) als bei längerer Lagerungsdauer (Abbildung 3.12). Der Zutritt von Sauerstoff schadet der Proteaseaktivität etwas. Bei der anaeroben Lagerung nimmt die Proteaseaktivität unabhängig von der Lagerungsdauer einen linearen Verlauf (Abb. 3.13). Die Protein-Eliminationsfähigkeit bei aerober Lagerung der Anreicherungskulturen nimmt mit zunehmender Lagerungsdauer stark ab (Abb. 3.12), während bei anaerober Lagerung die Unterschiede in der Protein-Eliminationsfähigkeit nach Lagerung für 96 h nicht so groß sind.

3.1.9 Demineralisierung mit Anreicherungskulturen von Milchsäurebakterien aus Bioghurt

Für eine Demineralisierung von Kalkchitin mit Milchsäurebakterien kann entweder Milchsäure selbst zugesetzt oder die Milchsäure nach Zusatz von Milchsäurebakterien und Glucose in situ erzeugt werden. Eine Anreicherungskultur von Milchsäurebakterien wurde aus einem Bioghurt hergestellt. Dazu wurde Bioghurt in ein MRS-Medium eingimpft. Nach der Ansäuerung wurde die Anreicherungskultur alle 3-4 Tage in ein neues MRS-Medium überimpft. Die Anreicherungskultur wurde unter anaeroben Bedingungen bei 37°C im Schüttelschrank bei 110 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Eine typische Wachstumskurve ist in Abbildung 3.14 dargestellt .

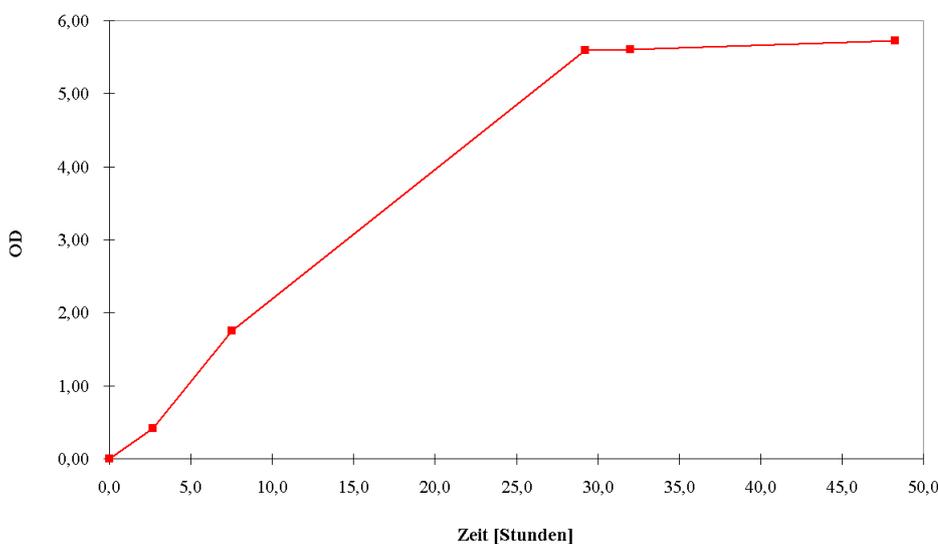


Abb. 3.14: Wachstumskurve von Milchsäurebakterien aus Bioghurt

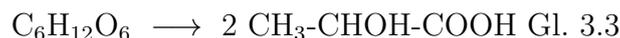
Die Milchsäurebakterien wuchsen nach einer kurzen lag-Phase exponen-

tiell über 25 h Inkubationsdauer und erreichten dann die stationäre Phase bereits nach ca. 28 Stunden.

3.1.10 Isolierung einer Reinkultur von Milchsäurebakterien aus Bioghurt

In der Anreicherungskultur aus Bioghurt wurden sowohl homofermentative Lactobacillen als auch heterofermentative Lactobacillen gefunden. Durchschnittlich werden aus 1 Mol Glucose weniger als 1,5 Mol Lactat gebildet. Somit ist diese Anreicherungskultur nicht für eine wirtschaftliche Demineralisierung von biologisch hergestelltem Kalkchitin geeignet. Es sollten daher aus der Anreicherungskultur Reinkulturen von homofermentativen Milchsäurebakterien isoliert werden, die eine homofermentative Milchsäuregärung durchführen und bis zu 2 Mol Milchsäure pro Mol Glucose ausscheiden.

Das Ziel bestand darin, homofermentative Milchsäurebakterien mit großer Säuretoleranz und hoher Milchsäureproduktionsaktivität zu isolieren. Heterofermentative Milchsäurebakterien sollten dabei ausgeschlossen werden, weil bei der heterofermentativen Milchsäuregärung nur 1 Mol Lactat aus 1 Mol Glucose gebildet wird und als Nebenprodukte Acetat bzw. Ethanol auftreten, die nicht zur Ansäuerung und Calciumlösung aus dem Kalkchitin beitragen. In der Gleichung 3.2 ist die Stöchiometrie der heterofermentativen Milchsäuregärung, in der Gleichung 3.3 die der homofermentativen Milchsäuregärung gegenübergestellt. Für die Demineralisierung sollten nur homofermentative Milchsäurebakterien verwendet werden. Bei der homofermentativen Gärung entstehen idealerweise 2 Mol Lactat aus 1 Mol Glucose und kein anderes Nebenprodukt.



Allerdings muss gesagt werden, dass in der Praxis wahrscheinlich nur ca. 1,8 Mol Lactat aus 1 Mol Glucose gewonnen werden, da ein Teil der Glucose von den Bakterien für das Wachstum verbraucht wird.

Isolierung und Vereinzeln von Milchsäurebakterien

Die Anreicherungskultur aus Bioghurt wurde in steriler physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und unterschiedliche Verdünnungsstufen im China-Blau-Lactose Agar eingepflegt. Nach dem Wachstum wurden mit sterilen Zahnstochern Einzelkolonien entnommen und in MRS-Flüssigmedium unter anaeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Es wurden 10 Kolonien ausgesucht und auf Glucose-Abbau und Lactat-Bildung untersucht. Es sollten homofermentative Milchsäurebakterien mit der Fähigkeit 1 Mol Glucose zu 2 Mol Lactat umzusetzen und mit einer hohen Säuretoleranz isoliert werden. Am Schluß wurden zwei Stämme erhalten und als MRS4 bzw. MRS9 benannt.

Die Isolate wurden noch 3 x der Vereinzelnprozedur unterworfen, um sicher zu sein, dass eine Reinkultur für die Charakterisierung vorlag. Dazu wurden Verdünnungsausstriche auf MRS-Agarplatten durchgeführt. Die einzelnen Kolonien wurden in flüssiges MRS-Medium weitergeimpft.

Klassifikation von Reinkulturen

Die beiden Reinkulturen wurden zuerst mikrobiologisch untersucht. Die beiden Stämme sind Gram-positive Stäbchen (teilweise in Ketten vorkommend) und Gas negativ, d.h. es wird kein Kohlendioxid produziert. Dadurch beschränken sich die Zuordnungsmöglichkeiten auf *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* und *Lactobacillus plantarum*. Das überwiegend gebildete Lactat war L-Lactat. Damit schränkt sich das Artenspektrum auf die Arten *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus bavaricus* und *Lactobacillus casei* ein. Auch die DNA-Sequenzierung deutet auf dies drei Arten hin, mit einer grösseren Ähnlichkeit zu *Lactobacillus casei*.

Im nächsten Schritt wurde die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen untersucht. Es werden Arabinose, Mannitol, Sorbitol und Raffinose vergoren. Nach 48 h Inkubationszeit wird das Lactat gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.3 dargestellt. .

Tab. 3.3: Vergärung verschiedener Kohlenstoffquellen durch die beiden *Lactobacillus Isolate*

Stamm	Kohlenstoffquelle	D-Lactat	L-Lactat	Gesamt-Lactat
	(120 mmol)	[mmol/ml]	[mmol/ml]	[mmol/ml]
MRS4	Arabinose	12,82	5,60	18,42
MRS4	Mannitol	26,98	149,96	176,94
MRS4	Sorbitol	19,72	186,80	206,52
MRS4	Raffinose	25,84	26,09	51,93
MRS4	ohne	3,30	9,73	13,03
MRS9	Arabinose	15,00	23,45	38,45
MRS9	Mannitol	32,69	179,02	211,71
MRS9	Sorbitol	17,64	205,48	223,12
MRS9	Raffinose	23,72	38,92	48,21
MRS9	ohne	2,93	14,42	17,35

An Hand des Zuckerspektrums kann man feststellen, dass sowohl MRS4 und MRS9 die Zuckeralkohole Mannitol und Sorbitol verwenden können. Auch Raffinose können MRS4 und MRS9 verwenden. Bei MRS4 wurde im Medium mit Zugabe von Arabinose zwar auch Lactat gebildet, aber offensichtlich von anderen Medienbestandteilen, da Lactat auch ohne Zugabe der Zucker-Quelle entstand.

3.1.11 Demineralisierung von Kalkchitin mit unterschiedlichem Bakterien-Feuchtgewicht von *Lactobacillus casei*

Wie bei den proteolytischen Bakterien spielt das für die Beimpfung eingesetzte Bakterien-Feuchtgewicht ebenfalls eine sehr große Rolle. Es wurde Kalkchitin aus deproteinierten Shrimp-Schalen eingesetzt. Von beiden Reinkulturen von *Lactobacillus casei* wurden in parallelen Ansätzen unterschiedliche Mengen und Bakterien-Feuchtgewicht für die Demineralisierung eingesetzt. Der Versuch wurde unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelschrank mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 110 Umdrehungen pro Minute durchgeführt.

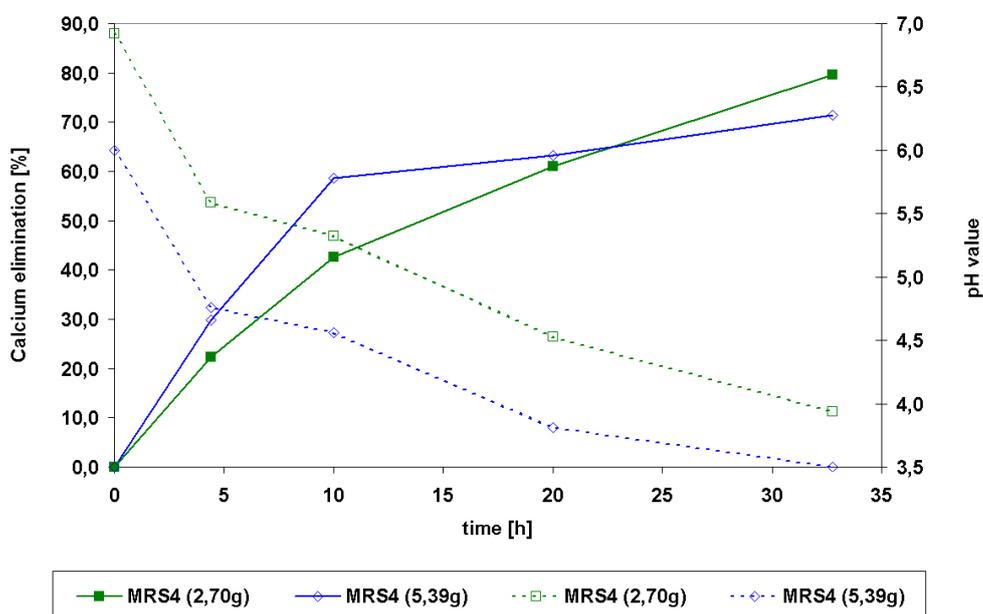


Abb. 3.15: Decalcifizierung von Shrimp-Schalen mit einem *Lactobacillus casei* Isolat

In Abb. 3.15 ist deutlich zu sehen, dass die Demineralisierung umso schneller geht je mehr Bakterien mit dem Inokulum eingebracht werden. Allerdings spiegelt das gelöste Calcium in der Abb. 3.15 nicht das gesamte eliminierte Calcium wieder. In der Abb. 3.15 wurden nur ca. 80% des Calciums im löslichen Überstand, aber nur weniger als 4% des Calciums im gereinigten Chitin vorgefunden. Das Calcium fällt nach der Ablösung aus dem Chitin wieder aus.

3.1.12 Biologische Demineralisierung und Deproteinierung von Garnelenschalen

In diesem Versuchsabschnitt wurde die Reihenfolge "Deproteinierung und Demineralisierung" umgekehrt und zuerst in Batch-Ansätzen die Demineralisierung mit Milchsäurebakterien und dann die Deproteinierung mit einer stabilen Anreicherungskultur aus Hackfleisch durchgeführt. In der Abbildung 3.16 ist das Ergebnis wiedergegeben. 15 g Indonesische Shrimp-Schalen (Abdomenfraktion von *P. monodon*) wurden zuerst mit der homofermentativen Reinkultur MRS4 und Glucose als C-Quelle für die Milchsäurebildung demineralisiert und danach wurde das demineralisierte Chitin mit der proteolytischen Anreicherungskultur HF deproteinisiert. Der Versuch wurde unter anaeroben Bedingung bei 37 °C im Schüttelschrank bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 110 Umdrehungen pro Minute durchgeführt.

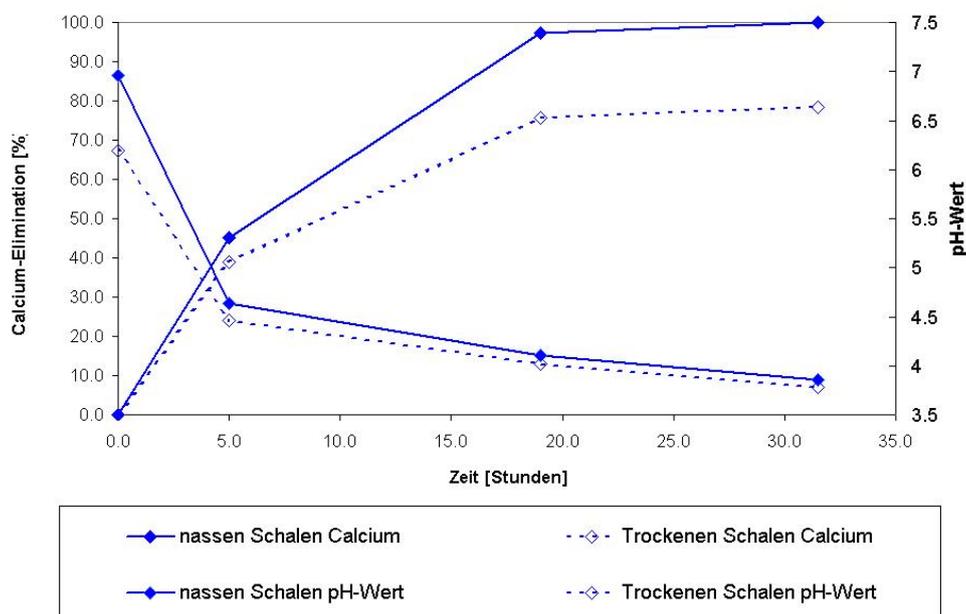


Abb. 3.16: Demineralisierung der Abdomenfraktion von indonesischen Shrimp-Schalen *P. monodon* als erster Schritt der Chitinreinigung

Nach der Demineralisierung wurde das Zwischenprodukt (hier: Proteinchitin) mehrmals mit Leitungswasser (ca. 1000 ml) gewaschen und an der Luft getrocknet. Danach wurde das Zwischenprodukt mit der proteolytischen Anreicherungskultur HF (Bakterien-Feuchtmenge ca. 5 g in 250 ml Leitungswasser) deproteinisiert. Die Deproteinierung wurde unter anaeroben Bedingungen bei 37°C im Schüttelschrank bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 110 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Nach Ende der Inkubation verblieben weniger als 5 % Protein in der Shrimp-Schalen (Abb. 3,17).

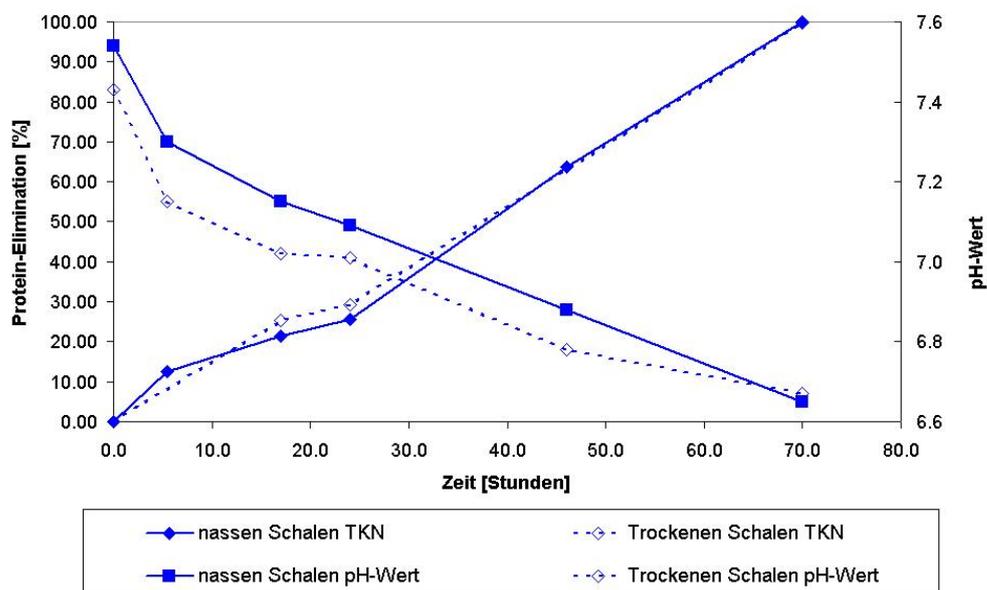


Abb. 3.17: Deproteinierung von entkalkten Shrimp-Abdomen von *P. monodon* aus Indonesien

3.1.13 Biologisches Verfahren im 13 Liter- bzw. 300 Liter-Maßstab

Das biologische Verfahren funktioniert sehr gut in einem Maßstab von 250 ml unter Labor-Bedingungen. Es wurde auch schon in etwas grösseren Maßstab von 10 bzw. 13 Liter unter Labor-Bedingungen durchgeführt. Die Viskosität des Chitins lag bei 2000mPas/s.

Es ist häufig so, dass ein Verfahren in kleinem Maßstab unter Labor-Bedingungen gut funktioniert und dagegen in großem Maßstab nicht mehr so gut. Daher wurden einige Batch-Ansätze im größeren Maßstab durchgeführt. Beispielweise wurde eine 10%ige behandelte Shrimp-Schalen Suspension mit einem 15%igen Inokulum in einem 13 Liter-Reaktor zusammengemischt. Es

wurde kein Gas-Austausch durchgeführt, da der Reaktor bis ganz oben gefüllt war. Der Reaktor wurden mit einem Schlauch ummantelt, der an ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37 °C angeschlossen war.

Im April 2008 wurde ein Pilot-Versuch bei der Firma SeeLab in Büsum im Maßstab von 300 Liter durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein 10 Liter-Versuch gleichzeitig gestartet. Damit sollte überprüft werden, ob das Verfahren wirklich für die Industrie tauglich ist.

Die Shrimp-Schalen *Crangon crangon* wurde 4 Tage vorher aus einem Krustentier verarbeitenden Betrieb abgeholt und eingefroren. Für den 300 Liter-Versuch wurden sie 2 Mal mit einer Bandfilterpresse ausgepreßt. Damit konnte man einen Teil der Proteine aus den Shrimp-Schalen (Restfleisch und Bindegewebe) abpressen. Dieses Protein kann als Tierfuttern verwendet werden. Nach dem Pressen beinhalten die Shrimp-Schalen 37% Protein, 43% Kalk (Asche-Wert 25%) und 20% Chitin (auf TS-Basis). Der Wassergehalt beträgt 64%. Die Shrimp-Schalen wurden kurz vor dem Ansatz unter Raumtemperatur aufgetaut. Ca. 29 kg Shrimp-Schalen (entspricht 9,7% im Ansatz) wurde bei dem 300 Liter Ansatz verwendet. Bei dem 10 Liter Kontroll-Ansatz wurden ca. 1 Kg Shrimp-Schalen (entspricht 10% im Ansatz) verwendet, das heißt, dass ca. 3,9 kg Protein, 4,5 kg Kalk und 2,1 kg Chitin im großen Ansatz und 130 g Protein, 150 g Kalk und 70 g Chitin im kleinen Ansatz zugegeben wurden.

Ca. 40 Liter Anreicherungskultur aus Hackfleisch, die 2 Tage vorher in Karlsruhe angezogen und nach Büsum transportiert wurden, wurden als Inokulum eingesetzt, davon 39 Liter für den 300 Liter Ansatz und 1 Liter für den 10 Liter Ansatz. Dazu kamen noch ca. 260 Liter Leitungswasser (pH 7,4) bei dem großen Ansatz und 9 Liter bei dem kleinen Ansatz. Für die Ablösung

des Proteins durch die proteolytischen Bakterien wurden die beiden Fermenter bei 37°C inkubiert. Bei dem großen Ansatz wurde eine Rühr-Maschine mit einer Rühr-Geschwindigkeit von 50 Umdrehungen pro Minute eingesetzt. Bei dem kleinen Ansatz ist die Rühr-Geschwindigkeit ca. 200 Umdrehungen pro Minute. Nach ca. 40 Stunden wurde die biologische Deproteinierung abgeschlossen. Das Produkt "Kalkchitin" wurde zwei Mal mit Leitungswasser gewaschen. Die Ausbeute des großen Ansatzes betrug ca. 18 kg (Wassergehalt: 71%) und die des kleinen Ansatzes 850 g (Wassergehalt 81%).

Der pH-Verlauf bei der Deproteinierung entspricht dem unter Labor-Bedingungen: Am Anfang stiegen die pH-Werte an, um später wieder leicht abzusinken.

Die "Kalkchitin"-Charakterisierung des großen Ansatzes ergab noch 7% Protein, 61% Kalk (Asche-Wert: 36%) und 32% Chitin (auf TS-Basis). Das heißt, es waren noch ca. 0,31 kg Protein, 3,18 kg Kalk und 1,67 kg Chitin im großen Ansatz enthalten. Es wurde ca. 92% Protein und 29% Kalk eliminiert, dabei gingen aber auch ca. 20% Chitin verloren. Die Ursache dafür ist, dass die kleinen Chitin-Stücke, welche man unter dem Lichtmikroskop beobachten konnte, vermutlich durch das Rühren weiter zerkleinert wurden und beim Waschen verloren gingen. Dies ist zwar nicht gut für die Ausbeute, aber besser für die Chitin-Qualität.

Die "Kalkchitin"-Charakterisierung des kleinen Ansatzes ergab 9,4% Protein, 58,5% Kalk und 32,1% Chitin. Das entspricht 15,2 g Protein, 94,5 g Kalk und 51,8 g Chitin. Die Protein-Elimination betrug 88%, die Kalk-Elimination betrug 37% und der Chitin-Verlust ca. 26%.

Anschließend wurde das Verfahren für die Demineralisierung gestartet. Es wurde ca. 29 Liter Reinkultur von Milchsäurebakterien (MRS4) für den

großen Ansatz und 1 Liter für den kleinen Ansatz zugegeben, der Rest des Arbeitsvolumens wurde mit Leitungswasser (pH 7,4) aufgefüllt. Die Inokula wurden 2 Tage vorher in Büsum vorgezogen. Bei dem kleinen Ansatz wurde ca. 1 kg Glucose am Anfang zugegeben und nach 21 Stunden noch einmal 200 g Glucose. Beim großen Ansatz wurden am Anfang nur 12 kg Glucose und nach ca. 19 Stunden nochmals 4 kg Glucose zugegeben. Am Schluss nach ca. 25 Stunden wurden nochmals 6 kg Glucose zugegeben. Es wurden insgesamt ca. 22 kg Glucose für den großen Ansatz verwendet. Der pH-Wert am Schluss betrug 4,12 beim großen Ansatz und 3,95 beim kleinen Ansatz.

Mit Bezug auf dem Kalkgehalt des Kalkchitins und der Entfernung mit Milchsäure, die von homofermentativen Milchsäurebakterien aus Glucose in situ gebildet wurde, sollten insgesamt 13,3 kg Glucose bei dem großen und 295 g Glucose bei dem kleinen Ansatz verbraucht werden. Das entspricht 0,46 kg Glucose pro kg nassen Shrimp-Schalen beim großen Ansatz bzw. 0,30 kg Glucose pro kg Shrimp-Schalen beim kleinen Ansatz. Theoretisch müßten ca. 5,72 kg Glucose bei dem großen Ansatz und 169 g Glucose bei dem kleinen Ansatz verbraucht worden sein. Aber nach der Deproteinierung sind noch sehr viele andere Bakterien auf den Shrimp-Schalen. Diese verbrauchen leider auch sehr viele Glucose und bilden keine Milchsäure.

Nach ca. 43 Stunden war die Demineralisierung abgeschlossen. Das Produkt Chitin wurde zweimal mit Leitungswasser gewaschen und mit Hand einmal ausgepreßt. Die Ausbeute betrug 7,5 kg beim großen Ansatz (Wassergehalt 77%) und 150 g beim kleinen Ansatz (Wassergehalt 68%).

Die Chitin-Charakterisierung ergab 4,5% Protein, 5,6% Kalk (Asche-Wert 3,3%) und 90% Chitin bei dem großen Ansatz. Das heißt, dass es nur noch 0,08 kg Protein, 0,10 kg Kalk und 1,55 kg Chitin gab. Die Protein-Elimination

betrug 98%, die Kalk-Elimination 98% und die Chitin-Ausbeute betrug 74%.

Im kleinen Ansatz waren 3,1% Protein, 2,0% Kalk und 94,9% Chitin übrig geblieben, das heißt, dass es noch 1,49 g Protein, 0,96 g Kalk und 45,55 g Chitin gab. Die Protein-Elimination betrug 99%, die Kalk-Elimination ebenfalls 99% und die Chitin-Ausbeute 65%.

Es wurde eine zweite Deproteinierung mit frischen Shrimps-Schalen durchgeführt. Ca. 150 Liter Überstand von der 1. Deproteinierung (proteolytische Bakteriensuspension) wurden mit ca. 150 Litern Leitungswasser gemischt und ca. 30 kg Shrimp-Schalen (Wassergehalt 79%) dazu gegeben. Die Shrimp-Schalen wurden frisch von dem Krustentier-verarbeitenden Betrieb geholt und 2-mal mit der Bandfilterpresse abgepresst. Diese Charge beinhaltete 23% Protein, 53% Kalk und 24% Chitin (auf TS-Basis). Das entspricht ca. 1,45 kg Protein, 3,34 kg Kalk und 1,51 kg Chitin.

Nach ca. 44 Stunden wurde die biologische Deproteinierung abgeschlossen. Das Produkt "Kalkchitin" wurde zweimal mit Leitungswasser gewaschen und mit Hand einmal abgepresst. Die Ausbeute betrug 11,5 kg (Wassergehalt 61%).

Es sollten theoretisch ca. 608 mg/l Stickstoff eliminiert werden. Die TKN-Werte erreichten ca. 591 mg/l. Der Ammonium-Wert erreichte ca. 466 mg/l. Der pH-Wert ist auch hier ein bisschen gesunken.

Nach der "Kalkchitin"-Charakterisierung ergaben sich 4,7% Protein, 63,8% Kalk und 31,5% Chitin. Das entspricht 0,21 kg Protein, 2,86 kg Kalk und 1,41 kg Chitin. Die Protein-Elimination betrug somit 86%, die Kalk-Elimination 14% und der Chitin-Verlust 7%. Die Gründe für die etwas schlechtere Protein-Elimination in der 2. Charge gegenüber der 1. Charge sind folgende: durch bessere mechanische Behandlung ergab sich ein deutlich geringerer Protein-

Anteil (nur noch 22,5% bei der 2. Charge statt 37,5% bei der 1. Charge). Auch der Wassergehalt spielt hier eine Rolle: Bei der 2. Charge gab es mehr Wasser (79% statt 64%). Die Protein-Rückstände nach der biologischen Deproteinierung betragen ca. 4,5-4,7% in beiden Ansätzen.

Es wurde die Viskositäten sowohl von Chitin als auch von aus diesem Chitin bei der Firma Seelab hergestellten Chitosan gemessen. Die Viskosität von Chitosan aus dem 1. Großansatz betrug ca. 1200 mPas/s. Zum Vergleich: Für käufliches Chitosan gibt es folgende Angaben: low viscouse < 200 mPas/s, middle viscouse 200-400 mPas/s und high viscos > 400 mPas/s (Firma Merck). In der Abbildung 3.18 wurde die Viskosität von einem Produkt aus einen 10 Liter-Versuch (zuerst Demineralisierung, dann Deproteinierung) gegenüber den Viskositäten von käuflichen Chitin gegenübergestellt. Nach der Aussage der Firma Seelab wurde die Viskosität von Chitosan aus dem großen Ansatz bei ca. 1200 mPas/s gemessen.

Das anaerobe biologische Verfahren funktioniert auch sehr gut im 300 Liter Maßstab. Die Ergebnisse der Pilot-Versuche bestätigen die Resultate, welche unter Labor-Bedingungen erzielt wurden. Das hergestellte Chitosan war ein sehr hochwertiges Produkt. Es gibt einige deutliche Vorteile bei dem ganzen Verfahren: der Geruch während des Verfahrens war fast nicht zu bemerken. Es gab Geruch nur in einer kurzen Zeit während des Waschens nach Deproteinierung. Der Energie-Verbrauch hielt sich auch in Grenzen (Presse, Rührer und Temperatur bei 37°C). Die Anreicherungskultur war robust und auch die anaeroben Bedingungen mussten nicht streng eingehalten werden. Während des Versuchs wurde täglich mehrmals der Deckel aufgemacht, um Proben zu nehmen. Der Glucose-Verbrauch war etwas hoch. Es wurde auch daran gedacht, anstelle der teuren Glucose günstigeren Haushaltszucker zu verwenden. Die entsprechenden Versuche wurden schon unter

Labor-Bedingungen mehrmals durchgeführt. Auch Abwasser von Molkereien, das Milchsäure enthält, wurden in Betracht gezogen.

Die Qualität von mit biologischen Verfahren gewonnenem Chitosan ist auf einem sehr hohen Niveau. Damit wurden die Ziele des Projektes, ein umweltschones Verfahren zu Chitingewinnung zu entwickeln und ein Chitosan mit guter Qualität herzustellen, erreicht.

3.2 Viskosität

Viskosität ist ein sehr wichtiges Kriterium für die Chitin-Qualitätsbestimmung, weil sie in gleicher Konzentrierten Lösungen die Kettenlänge wiedergibt: Hohe Viskositäten deuten auf ein unbeschädigtes langkettigen Molekül hin. Verschiedene Produkte aus biologischer Chitingewinnung wurden mit käuflichen Chitin verglichen. In diesem Fall wurde käufliches Chitin der Firma Roth (Produkt-Bezeichnung) verwendet. In Abb. 3.18 wurde die Viskosität von 4 Produkten aus biologischer Chitingewinnung mit der von Chitin der Firma Roth verglichen.

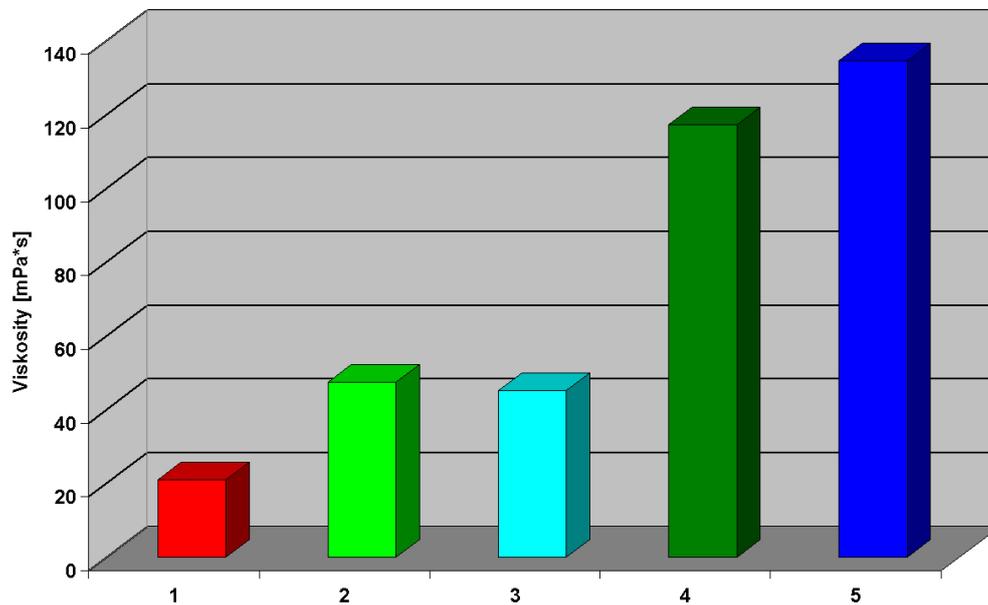


Abb. 3.18: Viskosität von verschiedenen Chitin-Produkten: 1) käufliches Chitin von der Firma Roth aus chemischem Verfahren, 2) und 3) Chitin von *Crangon crangon* aus biologischem Verfahren, 4) und 5) Chitin von *P. monodon* aus biologischem Verfahren.

Es wird deutlich, dass die Produkte aus biologischer Chitingewinnung eine wesentlich höhere Viskosität aufweisen als das Produkt der Firma Roth aus chemischem Verfahren. Die beide Produkte von *Crangon crangon* zeigen eine ca. 2,5 fache höher Viskosität als das käufliche Chitin. Darüber hinaus zeigen beide Produkte von *P. monodon* sogar eine 7,5 facher höhere Viskosität als das käufliche Chitin. Das Chitin von *P. monodon* ist viel länger und damit viel viskoser als das Chitin von *Crangon crangon*.

3.3 Elektronenmikroskopie zur Calcium- und Stickstoff-Lokalisierung

Um Informationen über die strukturelle Beschaffenheit der Shrimp-Schalen von *P. monodon* zu erhalten, wurden entsprechende Ultradünnschnitte für TEM-Untersuchungen präpariert. Da diese Art der Probenpräparation sich dadurch als schwierig erwies, dass die für TEM hergestellten Schnitte sich oft übereinander falteten, wurden Shrimp-Schalen zudem auch in Kunstharz eingebettet und polierte Schlißproben für die REM-Abbildung und für die Lichtmikroskopie hergestellt.

Abb. 3.19 zeigt exemplarisch die rasterelektronenmikroskopische Sekundärelektronen-Abbildung der Oberfläche von *P. monodon* einer derartigen Schlißprobe. Deutlich ist der strukturelle Aufbau der Shrimp-Schale im Bereich des Abdomens anhand der unterschiedlichen Schichten, nämlich Epicuticula (A), Exocuticula (B), Endocuticula (C) und innere Membran (D), zu erkennen. Der im Bild sichtbare Schichtaufbau entspricht gut der von Roer and Dillaman [6] beschriebenen Cuticula-Struktur von *Carcinus maenas*. Die Schalenstruktur erscheint faserförmig und je nach Reinigungsverfahren kann das daraus aufbereitete Chitin auch diesen faserigen Charakter besitzen [10, 12]. In unseren Untersuchungen betrug die Dicke der Epicuticula etwa 3,2 μm , die Exocuticula war ca. 33,5 μm dick und die Endocuticula ca. 16,1 μm (vgl. 3.19).

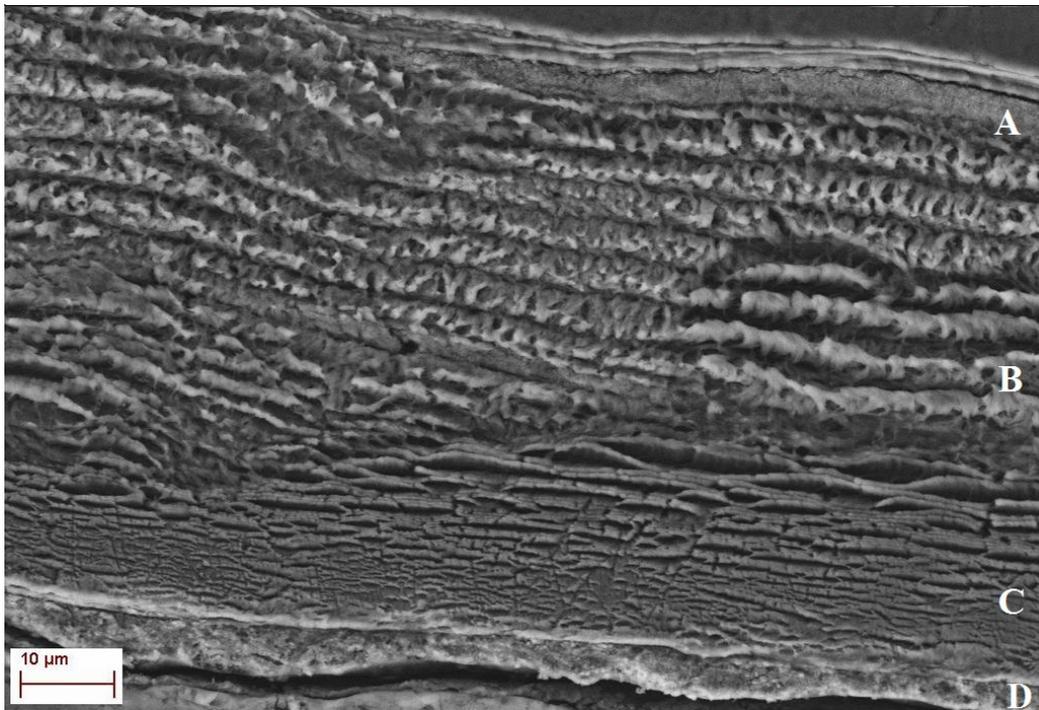


Abb. 3.19: Rasterelektronenmikroskopische Sekundärelektronen-Abbildung der Oberfläche von Shrimp-Schalen von *P. monodon* im Bereich des Abdomens

Der Einsatz abbildender und analytischer Techniken der Transmissionselektronenmikroskopie erlaubt generell die Zuordnung von morphologischen Merkmalen und mikrochemischen Eigenschaften. Aus diesem Grund wurde anhand von TEM-Dünnschnitten mittels EELS und EFTEM speziell die Verteilung der Elemente Stickstoff und Calcium in den unterschiedlichen Bereichen der Shrimp-Schalen analysiert. Insbesondere Stickstoff als Marker für Proteine gibt Aufschluss über deren Präsenz vor, während und nach der Deproteinierung nach den verschiedenen Schritten der organischen Chitin-Extraktion. Stickstoff ist ein chemisches Element, welches sowohl in Proteinen als auch in Chitin vorhanden ist. Insofern ist es möglich, beim Stu-

dium unterschiedlicher Phasen der Deproteinierung von Shrimp-Schalen die Chitin-Schichten anhand eines konstanten Stickstoff-Gehaltes zu identifizieren. Nach erfolgter Deproteinierung sind die meisten Proteine aufgelöst und die Aminosäuren sind deaminiert. In ähnlicher Weise kann der Fortschritt der Demineralisation in den verschiedenen Bestandteilen der Garnelenschale anhand des Calcium-Gehaltes bestimmt werden. Zur Lokalisierung der Elemente Stickstoff und Calcium wurden TEM-Hellfeldabbildungen mit zugehörigen EFTEM-Aufnahmen verglichen. Um dabei den Einfluss von Deproteinierung und Demineralisierung auf die Morphologie und chemische Zusammensetzung der Shrimp-Schalen einschätzen zu können, wurden nicht behandelte Schalen als Referenzproben für den Chitin-Status verwendet.

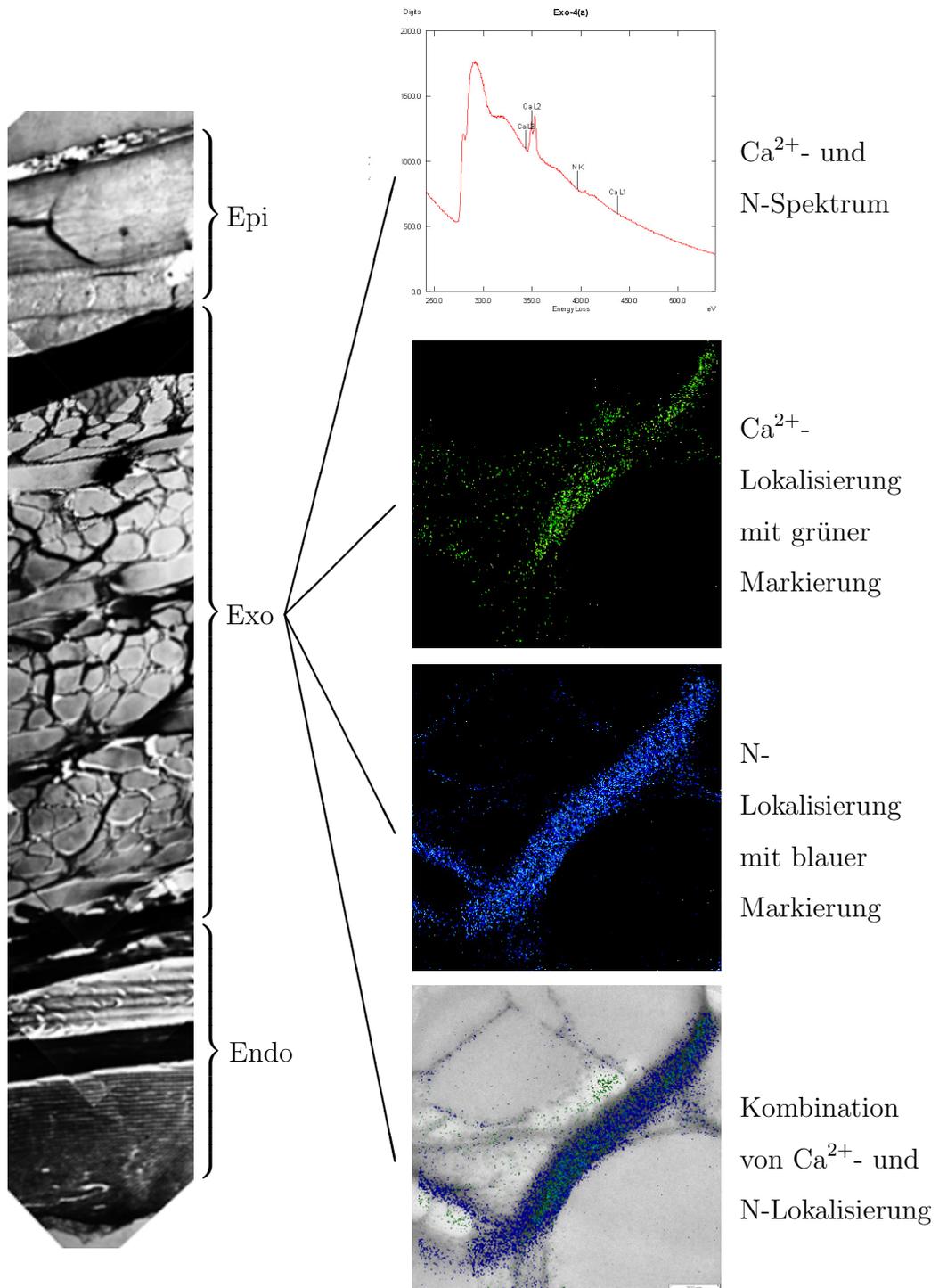


Abb. 3.20: Elektronenmikroskopische Übersichtsabbildung (5000-fache Vergrößerung) einer Probe aus Shrimp-Schalen von *P. monodon* und mittels energiegefilterter TEM-Abbildung erhaltene Darstellung der Ca- und N-Verteilung im Bereich der Exocuticula.

Abb. 3.20 zeigt beispielhaft für den Exocuticula-Bereich von *P. monodon* erhaltene Ergebnisse der analytischen TEM-Untersuchungen. In der linken Bildhälfte ist im Überblick der gesamte Schichtaufbau eines TEM-Ultradünnschnittes von der Endo-, über die Exo- bis hin zur Epicuticula zu sehen. Rechts daneben sind detaillierte EELS/EFTEM-Untersuchungsergebnisse für die Exocuticula dargestellt. Wie anhand der farbkodierten Calcium- und Stickstoff-Verteilungsbilder erkennbar, liegen beide Elemente gleichermaßen in der Exocuticula vor. Ähnliche Befunde (hier nicht gezeigt) wurden auch für Endocuticula-Bereiche erhalten. Zur besseren Visualisierung der lokalen Verteilung von Calcium und Stickstoff wurden die entsprechenden EFTEM-Bilder mit der zugehörigen TEM-Hellfeldabbildung überlagert, diese Darstellung ist in Abb. 3.20 in der rechten Spalte ganz unten abgebildet. Generell kann festgestellt werden, dass nach der Deproteinierung feuchter Shrimp-Schalen durch proteolytische Bakterien keine strukturelle Schädigung der Schichten in Endocuticula-Regionen beobachtet werden konnte. Dies könnte auch erklären, warum ein bestimmter Anteil an Calcium bereits durch Deproteinierung freigesetzt wurde, dieses Calcium war ein früherer Bestandteil der Exocuticula. Da ein nicht zu vernachlässigender Gehalt von Stickstoff in Bereichen der Exocuticula gefunden wurde (vgl. EELS-Spektrum in Abb. 3.20), kann angenommen werden, dass dieser Stickstoff zum Chitin gehört. Im Vergleich zu unbehandelten bzw. lediglich deproteinieren Shrimp-Schalen zeigte EELS nach Inkubation mit LAB nur noch andeutungsweise die Ca-L23-Kante, was ein Indiz für die erfolgte Demineralisierung der Shrimp-Schalen ist (siehe Abb.3.21). Jedoch konnte Stickstoff in ausgedehnten Regionen der Endocuticula mit relativ hoher Konzentration nachgewiesen werden, dieser Stickstoff kann sowohl zum Chitin als auch zu Proteinen gehören. Daraus kann geschlossen werden, dass im Falle demineralisierter Proben der an-

hand der N-Ionisationskante detektierte Stickstoff Bestandteil des Chitins ist. Das zwischen Chitin-Schichten vorliegende Protein wurde vermutlich aufgrund der zu kurzen Deproteinierung nicht vollständig herausgelöst.

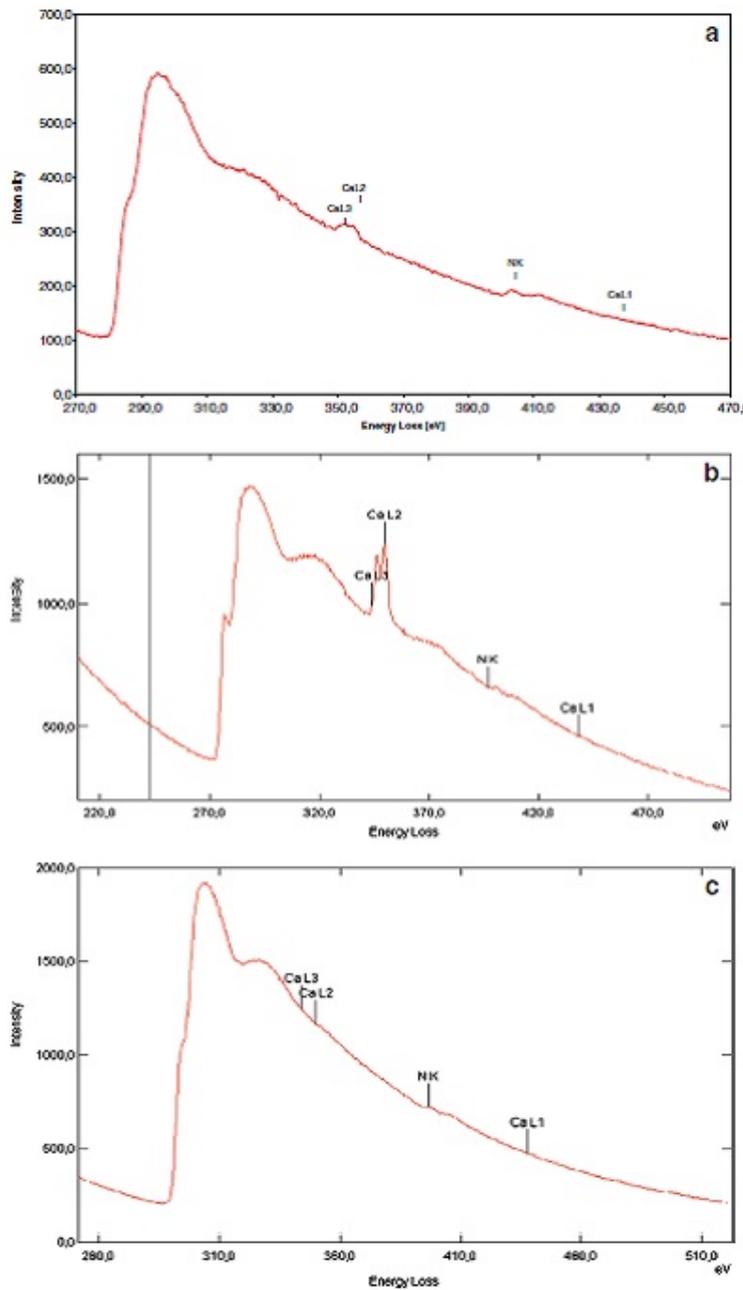


Abb. 3.21: EELS-Spektren unterschiedlicher Bereiche der Shrimp-Schalen von *P. monodon* zu unterschiedlichen Stadien der Chitin-Aufbereitung: a) Exocuticula von unbehandeltem *P. monodon*, b) Endocuticula nach Deproteinierung und c) nach Demineralisierung

3.4 NMR

Die charakteristischen und unterschiedlichen ^{13}C -NMR chemischen Verschiebungen von Zucker und Protein ermöglicht eine Analyse der chemischen Zusammensetzung der Schrimpsschalen anhand von ^{13}C -NMR Spektren. Um die Schrimp-Schalen unverändert, und damit als Feststoff, zu untersuchen, war für die Untersuchung ein Festkörper-NMR notwendig. Um eine hohe Auflösung zu erzielen, wurde Magic Angle Spinning verwendet. Es wurden 8 Signale beobachtet, die den 8 verschiedenen C-Atomen des Chitin durch Vergleich der ^{13}C -NMR chemischen Verschiebungen mit Werten aus der Literatur zugeordnet werden konnten.

Es konnten keine oder nur sehr geringe Signale mit für Protein typischen ^{13}C -NMR chemischen Verschiebungen beobachtet werden. Mit der Genauigkeit der Messung wurde der maximale Anteil an Protein-Verunreinigungen als kleiner als ca. 3% abgeschätzt.

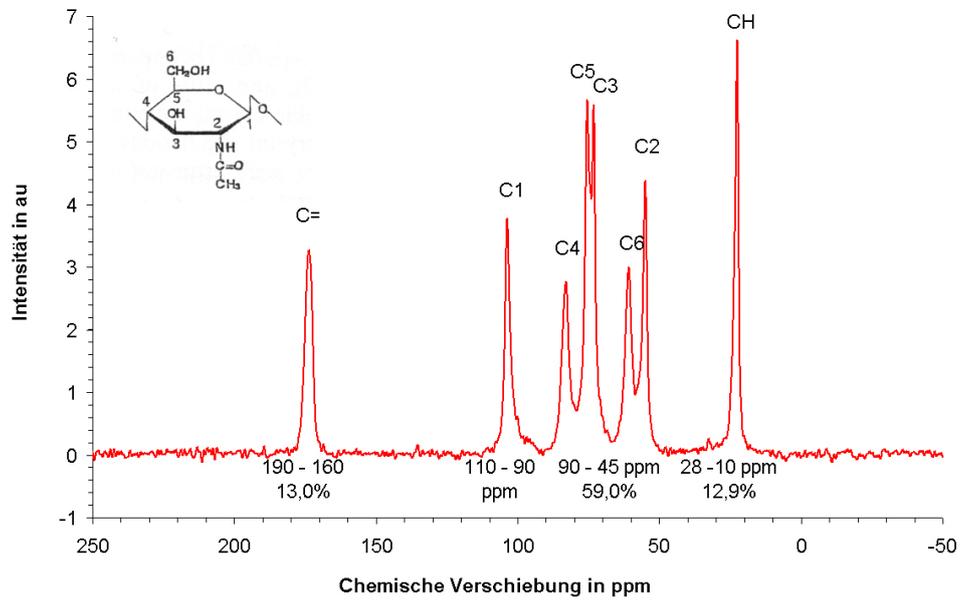


Abb. 3.22: NMR-Untersuchung vom gereinigtem Chitin nach Deproteinierung und Demineralisierung

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Grundlagen des biologischen Verfahrens

Für die Gewinnung von Chitin und Chitosan gibt es unterschiedliche Forschungsansätze: Ein-Schritt-Verfahren bzw. Zwei-Schritt-Verfahren, Enzyme bzw. Bakterienkulturen, Anreicherungskulturen bzw. Reinkulturen, aerobe bzw. anaerobe Behandlung. Es wird viel darüber diskutiert, bis zu 100% Protein zu eliminieren, wobei die lange Inkubationszeit die Qualität des Endproduktes stark beeinflusst. Alternativ kann nur ein großer Teil des Proteins mit deutlich kürzerer Inkubationszeit mittels biologischem Verfahren eliminiert und danach das Restprotein mit einer nachgeschalteten chemischen Behandlung eliminiert werden. Bei einer längeren Inkubationszeit besteht die Gefahr, dass Strangbrüche durch Proteinase bzw. Chitinase stattfinden.

Der Nachteil des Ein-Schritt-Verfahrens liegt darin, eine Reinkultur oder eine Mischkultur zu finden, die gleichzeitig sowohl deproteinieren als auch demineralisieren kann. Hier sind die pH-Werte und der Zeitpunkt von Glucose-Zugaben für die pH-Ansenkung durch Milchsäurebildung sehr entscheidend.

Bis heute liegen in der Forschung noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse solcher Bakterienkulturen vor.

Die Anreicherungskulturen dieser Arbeit (M1, M2, M3, FS und HF) haben auch während der Deproteinierung einen Teil (bis ca. 30%) Calcium eliminiert. Es ist davon auszugehen, dass sich ein Teil von Calcium als Bindungsinion innerhalb der Proteine befindet. Dies zeigt sich bei Untersuchungen unter dem Elektronenmikroskop in dieser Arbeit. Die Anreicherungskultur (MRS) und die Reinkultur (MRS4 und MRS9) der Milchsäurebakterien haben auch proteolytische Aktivität gezeigt. Durch die Zugabe von Glucose wurde die proteolytische Aktivität gestoppt.

4.1.1 Biologische Chitingewinnung

Aktuell wird sehr viel über Chitin bzw. Chitosan geforscht, wobei sich die meisten Forschungen auf die Anwendungen von Chitin bzw. Chitosan konzentrieren. Die wenigen Arbeiten, die sich mit der biologischen Chitingewinnung beschäftigen sind bis heute nicht zufriedenstellend. Bis heute konnte keine 100%ige Protein-Elimination in sehr kurzer Zeit ohne Schädigung des Chitins erreicht werden.

Im Jahr 1982 wurde von Shimahara et al. [46] über biologische Chitingewinnung publiziert. Es wurde Stämme von *Pseudomonas maltophilia* gefunden, bei dem innerhalb von 3 Tagen bei 30 °C eine Deproteinierungsleistung von 95% des Gesamtproteins erreicht werden konnte. Dieser Ansatz wurde im Jahr 1994 von Healy und Bustos [17] wieder aufgegriffen. Sie setzten unterschiedliche Inokuli, unter anderem *Pseudomonas maltophilia*, *Enterococcus faecium* und *B. subtilis* ein, konnten eine Deproteinierungsleistung von 95% jedoch nicht bestätigen. Sie erreichten eine Deproteinierung von 72% in 7

Tagen.

Healy et al. [16] haben das Verfahren im Jahr 2003 verbessert: mit einer Mischkultur von *Lactobacillus plantarium*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus faecium* und *Pediococcus acidilactici* wurde eine Calcium-Elimination von 93,8% erreicht. Während des Versuchs wurde auch ein Teil des Proteins eliminiert. Allerdings dauerte der Versuch 7 Tage verwendet wurden 25%ige Shrimpsschalen von *Nephrops norvegicus* und 15% w/v Glucose. Die Temperatur betrug 30°C. Die pH-Werte sanken von anfänglich ca. 8,5 auf 4,2 am Ende. Schon nach ca. 35 Stunden war der pH-Wert unter 6 und nach ca. 100 Stunden unter 5. In der Arbeit von Hearly et al. (2003) [16] wird ein Ein-Schritt-Verfahren mit einer Mischkultur für die Demineralisierung beschrieben. Die Deproteinierung spielte hierbei eine Nebenrolle, weil die gesamte Inkubationszeit mit 7 Tagen als unwirtschaftlich gilt und eine Qualitätsverminderung bedeutet. Dies bedeutet nach heutigen Forschungsergebnissen, dass es bei diesem Verfahren höchstwahrscheinlich zu Strangbrüchen kam. Allerdings hat Hearly hierüber nichts veröffentlicht.

Das in dieser Arbeit beschriebene Zwei-Schritt-Verfahren bedeutet einen grossen Fortschritt gegenüber der Arbeit von Healy et al. [16]. Die Inkubationszeit für die Demineralisierung wurde auf 2 Tage verkürzt. Zwar ist das Zwei-Schritt-Verfahren technisch komplizierter als das Ein-Schritt-Verfahren, aber durch die kürzere Inkubationszeit wird eine bessere Qualität des Chitins erzielt. Dies spielt bei der Betrachtung der heutigen industriellen Laufzeiten eine wichtige Rolle.

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 mäßi-

ge Deproteinierungsleistung von 81% bzw. 88% des Proteins innerhalb von 3 bzw. 5 Tagen in Schüttelkulturen erreicht. Ähnliche 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). Allerdings gilt *C. parapsilosis* als opportunistisch pathogen, was für einen späteren industriellen Prozess von Nachteil ist (nicht einsetzbar im Humanbereich).

Bei vielen Arbeiten mit dem Ein-Schritt-Verfahren gab es das gleiche Problem: es gibt zwar viele Bakterien, die die verschiedenen Kohlenhydrate (Glucose, Lactose, usw.) zu organischen Säuren umwandeln können, aber durch die organischen Säuren ist der pH-Wert sehr schnell gesunken. Die Kohlenhydrate sind für Bakterien deutlich leichter abbaubar im Vergleich zu den Proteinen, die dann bei niedrigen pH koagulieren.

In der Arbeit von Jung et al. (2005) [21] wurde im Jahr 2005 berichtet, dass man mit *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 mit 10% Inokulum und 10% Glucose eine Demineralisierung von 80% in 5 Tagen erreicht. Im Jahr 2007 (Jung et al. [19]) wurde ein zweiter Schritt - Deproteinierung mit *Serratia marcescens* angeschlossen. Hierdurch wurde eine Demineralisierung von 94% und Deproteinierung von 69% erzielt. Allerdings dauerte die gesamte Fermentation 7 Tage und es wurde kein Nachweis zum Chitinabbau bzw. zur Chitinqualität erbracht.

In der Literatur wurden auch Verfahren mit kommerziell erwerblichen proteolytischen Enzymen vorgestellt. Im Jahr 1993 wurde Actinase E von Santoso et al. [41] und Chymotrypsin und Papain von Gagne und Simpson [12] zur Deproteinierung eingesetzt. Im Labormaßstab konnten sehr gute Deproteinierungsleistungen erzielt werden. Der Nachteil des Einsatzes von

Enzymen besteht im hohen Kostenaufwand, da die Preise für aufgereinigte Enzyme sehr hoch sind. Somit ist diese umweltschonende Verfahren für die Industrie nicht wirtschaftlich.

Eine Zusammenfassung von unterschiedlichen in der Literatur berichteten Deproteinierungsansätzen ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tab. 4.1: Zusammenstellung unterschiedlicher Mikroorganismen zur Deproteinierung und Demineralisierung von Garne-
lenabfällen und der erzielten Eliminationsleistung

Organismus	DP [%]	DM [%]	Zeit [Tage]	Referenz
Ein-Schritt-Verfahren				
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	95	-	3	Shimahara et al., 1982 [46]
Mischkultur	72	-	7	Healy et al., 1994 [17]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	81	-	5	Wang und Chio., 1998 [50]
<i>Lactobacillus plantarum</i> 541	75	86	-	Rao et al., 2000 [34]
<i>Bacillus subtilis</i> CCRC 10029	88	-	3	Yang et al., 2000 [55]
<i>Candida parapsilosis</i> CCRC 20515	87	-	5	Chen et al., 2001 [5]
<i>Lactobacillus paracasei</i> A3	94	97	3	Cremades et al., 2001 [7]
<i>Lactobacillus</i> spp. B2	85	88	6	Cira et al., 2002 [6]

Tab. 4.1: (fortgesetzt)

Organismus	DP	DM	Zeit	Referenz
	[%]	[%]	[Tage]	
Mischkultur	-	94	7	Healy et al., 2003 [16]
<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>tolerans</i> KCTC-3074	53	97	7	Jung et al., 2006 [20]
<i>Bacillus subtilis</i>	84	72	15	Sini et al., 2007 [47]
Zwei-Schritt-Verfahren				
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> KCTC-3074 und <i>Serratia marcescens</i> FS-3	69	94	12	Jung et al., 2007 [19]
Anreicherungskultur und <i>Lactobacillus casei</i>	98	99	4	Xu et al. 2008 [54]

Es wird auch diskutiert, ob man Reinkulturen oder Anreicherungskulturen verwendet soll. Eine Reinkultur hat den Vorteil, dass diese Kultur immer stabil ist. Die Nachteile sind erstens die strenge Einhaltung von hygienischen Parametern für die Industrie und die damit verbundenen hohen Kosten und die technischen Voraussetzungen. Zweitens beinhaltet die Shrimp-Schale selbst Bakterien, trotz der vorherigen Reinigung, so dass die Reinkultur schnell kontaminiert wird. Anreicherungskulturen sind mit einfachem und preiswertem Verfahren zu erhalten. Ebenso besteht die Annahme, dass die verschiedenen Bakterien einer Anreicherungskultur zusammen agieren, d.h. Synergien beim Abbau vorliegen.

In dieser Arbeit wurde ein anaerobes Verfahren zur Chitingewinnung verwendet. Vorteile des anaeroben Verfahrens sind: 1) Dieses Verfahren benötigt nur 37°C während aerobe Verfahren häufig mit 55°C im thermophilem Temperaturbereich betrieben werden. 2) das anaerobe Verfahren benötigt gegenüber dem aeroben Verfahren keine Begasung. Somit wird ein hoher Energieaufwand und damit verbundene komplizierte Luftfilter und eine intensive Geruchsentwicklung vermieden.

Die in dieser Arbeit verwendete Anreicherungskultur HF wurde auch bezüglich ihrer Lagerungsfähigkeit untersucht. Die Bakterien-Pellets können mindestens 5 Tage fast ohne Aktivitätsverlust unter anaeroben Bedingungen aufbewahrt werden. Die Aktivität unter aeroben Bedingungen ist ca. 10% schlechter als unter anaeroben Bedingungen. Es ist sehr wichtig für die Industrie, dass die Bakterien die Aktivität nicht bei langer Aufbewahrung verlieren. Im Ergebnis ist festzustellen, dass die Anreicherungskultur sowohl unter anaeroben Bedingungen auch unter aeroben Bedingungen aufbewahrt werden kann. Somit müssen nicht ständig neue Anreicherungskulturen selektioniert werden. Dies bedeutet für die Industrie eine Kosteneinsparung.

4.2 Optimierung der Bakterienkulturen

4.2.1 Optimierung der proteolytischen Anreicherungskulturen

Der größte Vorteil von Anreicherungskulturen besteht in den niedrigen Kosten für die Herstellung und Erhaltung der Kulturen und auch in der Effektivität der Zusammenarbeit mehrerer Bakterien (Synergismen).

Die autochthonen Bakterien, welche auf den Shrimpsschalen sind, besitzen zwar gute Fähigkeiten, um die Proteine abzubauen, brauchen aber ohne zwischenzeitliche Anreicherung zu lange, um eine hohe Eliminationsleistung für Protein und Calcium zu erreichen. Dies wurde in der Anfangsphase dieses Projektes durch mehrere Versuche nachgewiesen.

Tab. 4.2: Vergleich zwischen verschiedenen Anreicherungskulturen

	Protein-Eliminationsrat	Zeitdauer
ohne Inokulum	60-70 %	96-120 h
Inokulum aus Shrimp-Schalen	90-98 %	96-120 h
Inokulum aus Hackfleisch	98-99 %	48-72 h
Inokulum aus Faulschlamm	98-99 %	48-72 h

Die Protein-Elimination und die Zeitdauer dafür sind bei Anreicherungskulturen deutlich besser bzw. kürzer als ohne Inokulum (Tab. 4.2). Das lag sicherlich daran, dass es deutlich mehr Bakterien gibt, die durch peptonhaltige Medien angereichert werden können und somit mehr proteolytische Aktivität besitzen. Auch die fast 100 %ige Protein-Elimination von Anreicherungskulturen aus Hackfleisch und Faulschlamm wird in kürzerer Zeit erreicht als mit Anreicherungskulturen aus Shrimpsschalen. Beide Anreicherungskulturen aus Faulschlamm und Hackfleisch besitzen den Vorteil einer hohen proteolytischen Aktivität und sind im Gegensatz zur Anreicherungskultur aus Shrimpsschalen frei von Chitinase.

Es sprechen mehrere Gründe gegen eine mehrmalige Verwendung einer

Anreicherungskultur: 1) durch wiederholte Verwendungen erhöht sich die Konzentration von Ammonium, welches das biologische Verfahren verlangsamt und sogar zum Stillstand bringen kann. 2) Durch wiederholte Verwendung werden auch die Bakterien, die Gene von Chitinase besitzen, weiter vermehrt, wodurch die Gefahr von Kettenbrüchen im Chitin erhöht wird.

Die Arbeit des BMBF-Projekt-Partners an der Universität Hamburg zur aeroben Chitingewinnung hat sehr gute Ergebnisse bei der aeroben Reinigung von Chitin erzielt. In der folgenden Tabelle wird die Deproteinierung zwischen aerober biologischen Chitingewinnung der Universität Hamburg und anaerober biologischen Chitingewinnung der Universität Karlsruhe (TH) verglichen:

Tab. 4.3: Unterschiede zwischen aerober biologischer Chitingewinnung (Universität Hamburg) und anaerober biologischen Chitingewinnung (Universität Karlsruhe (TH))

	aerobes Verfahren	anaerobes Verfahren
Kultur	Reinkultur	Anreicherungskultur
Temperatur	55°C	37°C
Belüftung	ja	nein
Geruchsfiltration	ja	nein
Energieverbrauch	hoch	niedrig
Zeitdauer	1 Tag	2 Tage
Protein-Elimination	100%	98%
Pilot-Versuch	in Planung	durchgeführt

Es läßt sich nicht so einfach sagen, welches Verfahren das bessere Verfahren ist. Die Vorteile von aeroben Verfahren liegen hauptsächlich darin,

dass das Verfahren sehr kurz dauert und die Deproteinierung etwas besser funktioniert. Eine kurze Inkubationszeit erzielt auch eine bessere Viskosität des Chitins bzw. des daraus gewonnenen Chitosans und eine bessere Wirtschaftlichkeit. Welches Verfahren für die Industrie geeignet ist, ist nur unter Betrachtung des jeweiligen Gesamt-Verfahrens zu entscheiden. Das anaerobe Verfahren hat zwar eine etwas längere Inkubationszeit, benötigt aber eine deutlich niedrigere Temperatur. Dies bedeutet Energieeinsparung. Weiterhin ist keine Luft- oder zu Sauerstoffzufuhr notwendig und es wird kein Abluftfiltration benötigt.

Schon einmal verwendete Anreicherungskulturen besitzen eine höhere Konzentration von Proteasen, welche beim wiederholten Einsatz die Proteine deutlich schneller und effektiver eliminieren können.

Bei beiden Möglichkeiten sind die Kosten zur Vorbereitung der Anreicherungskulturen und die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens zu berücksichtigen.

4.2.2 Optimierung der Milchsäurebakterienkulturen

Bis jetzt gibt es noch keine Methode, dass Bakterien direkt Calcium eliminieren können. Es wurde entschieden, Milchsäurebakterien unter Zugabe von Glucose zu verwenden. Durch Milchsäuregärung können die Milchsäurebakterien unter anaeroben Bedingungen Glucose zu Lactat umwandeln. Danach bildet das Lactat mit dem Calcium das Calcium-Lactat. Im Gegensatz zum gebundenen Calcium bei Shrimp-Schalen ist Calcium-Lactat im Wasser löslich.

Bei der Milchsäuregärung gibt es zwei unterschiedliche Wege: heterofermentative Gärung und homofermentative Gärung [42]. Bei der heterofermentativen Gärung bildet 1 Mol Glucose nur 1 Mol Lactat, bei der homofermentativen Gärung dagegen wurden aus 1 Mol Glucose 2 Mol Lactat gebildet.

In der Praxis wird 1 mol Glucose zu ca. 1,8 Mol Lactat bei der homofermentativen Gärung umgesetzt. Der Rest wird für das Wachstum der Bakterien verbraucht.

In der ersten Projekt-Phase wurde eine Anreicherungskultur aus Joghurt isoliert. Es wurde festgestellt, dass die Anreicherungskultur nur ca. 1,2 Mol Lactat aus 1 Mol Glucose bilden konnte, d.h. es gibt überwiegende Milchsäurebakterien die heterofermentative Gärung verwendet. Da die Glucose eine sehr teure Substanz für die Industrie ist, ist das Verfahren mit einer Anreicherungskultur und Glucosefütterung ein unwirtschaftliches Verfahren. In der zweiten Projekt-Phase wurde eine Reinkultur aus der Anreicherungskultur isoliert. Nach der mikrobiologischen Untersuchung wurde *Lactobacillus casei* identifiziert. Mit der Reinkultur wird die Glucose zu mehr als 1,8 Mol Lactat umgewandelt, d.h. *Lactobacillus casei* ist ein homofermentativer Lactobacillus.

Das Verfahren mit Milchsäurebakterien funktioniert sehr gut im Labormaßstab (von 250 ml bis zu 13 Liter), mit 6% bis zu 10% Schalengewicht. Es ist zwar nicht so schnell wie ein chemischen Verfahren mit Salzsäure, aber die Ergebnisse sind sehr gut. Nach der Untersuchung des biologisch gereinigten Chitins lag der Rückstand von Calcium unter 1 %. Dies entspricht dem in der Industrie verwendeten chemischen Verfahren.

4.3 Durchführung in der Industrie

Verfahren unter Labor-Bedingungen (Abb. 4.1) sind oftmals unter industriellen Bedingungen nicht anwendbar. Unter Labor-Bedingungen kann z.B. das Gewicht des Anfangsmaterials, der Nebenprodukte und der Endprodukte

(Chitin) genau bestimmt werden. Auch Temperatur, pH-Werte usw. sind im Labor genau zu beobachten. Es konnte allerdings ein erster Versuch unter industriellen Bedingungen erfolgreich durchgeführt werden.



Abb. 4.1: Versuch unter Laborbedingungen

Bei der Firma SeeLab in Büsum wurde ein Pilot-Versuch im 300 Liter-Maßstab durchgeführt. Abweichend von den Labor-Untersuchungen wurden Shrimp-Schalen verwendet, die unmittelbar vorher gepulvert wurden. Im Labor wurden gefrorene Shrimp-Schalen verwendet. Die frische Shrimpschalen werden gepresst und in einen Fermenter gefüllt (Abb. 4.2) .



Abb. 4.2: Mechanische Vorbehandlung der Shrimp-Schalen in der Firma SeeLab BÜsum (links) und Fermentation (rechts)

In der Industrie stehen Fermenter mit Deckel und Rühr-Einrichtungen zur Verfügung. Der Fermenter wurde bis zum Rand aufgefüllt. Nach Verschluss des Fermenters entstehen automatisch anaerobe Bedingungen. Bei diesem Pilot-Versuch wurde eine proteolytische Anreicherungskultur aus Hackfleisch und eine Reinkultur von Milchsäurebakterien für die Demineralisierung der Shrimp-Schalen verwendet.

Das Ergebnis dieses Pilot-Projektes war annäherend identisch mit den Labor-Verfahren, obwohl die Anlagen-Konstruktionen nicht 100%ig übereinstimmten. Der im Pilot-Versuch verwendete Fermenter hatte ein Fassungsvermögen von 300 Liter gegenüber 250 ml bis 13 Liter im Labor. Dadurch erhöht sich die Masse an Shrimp-Schalen von 15 g bis 1 kg auf 30 kg im 300 Liter Reaktor. In der Industrieanlage war die Rührergeschwindigkeit niedri-

ger als im Labor-Reaktor.

Die Protein- und Kalk-Eliminationen waren unter beiden Bedingungen fast identisch. Die Ausbeute unter industriellen Bedingungen betrug ca. 74% gegenüber Labor-Ergebnissen von unter 60%. Sowohl unter Labor- als auch unter industriellen Bedingungen im größeren Maßstab war die biologische Chitin-Gewinnung erfolgreich.

4.4 Schlusswort

Die bisherigen Versuchsreihen unter Labor- als auch industriellen Bedingungen haben gezeigt, dass die biologische Chitingewinnung durchführbar und erfolgreich ist. Die Calcium-Elimination bei der biologischen Demineralisierung mit *Lactobacillus casei* unter Zugabe von Glucose funktioniert rasch und mit hoher Effizienz. Der Rückstand von Calcium liegt weit unter 1%. Der Rückstand von Protein nach der Deproteinierung beträgt ca. 5%. Nach Deacetylierung mit NaOH für die Chitosanherstellung ist kaum noch Protein vorhanden. Für die Deacetylierung von Chitin zu Chitosan ist ein kalkfreies Chitin wichtiger als ein proteinfreies Chitin.

Die Entfernung der Rückstände von Protein und Calcium vor Deacetylierung von Chitin ist notwendig, um ein hochwertiges Chitosan zu produzieren. Nur mit qualitativ gutem Chitin kann man gutes Chitosan herstellen. Ein weiteres wichtiges Qualitätsmerkmal für Einsatzmöglichkeiten von Chitin ist die Viskosität. Je höher die Viskosität ist, desto qualitativ höher ist der Anwendungsbereich des gewonnenen Chitosans, z.B. in der Pharmaindustrie oder in der Medizin zur Wundabdeckung.

Für die Demineralisierung besteht die Überlegung, anstatt Glucose preis-

werte Nebenprodukte aus anderen Industrie-Zweigen wie z.B. Melasse, Stärke, Zuckerrohr, milchsäurehaltiges Abwasser, usw. zu verwenden.

Die Inkubationszeiten für Deproteinierung und Demineralisierung sind insgesamt noch zu lang. Das kann dazu führen, dass sich die Qualität von Chitin verschlechtert. Eine Idee für die Zukunft ist, die Inkubationszeit für die Deproteinierung und Demineralisierung auf 24 Stunden zu beschränken und das Rest-Protein und Rest-Calcium mit verdünnter NaOH und HCl in kurzer Zeit zu eliminieren. Forschungen hierzu stehen noch aus. Die Vorteile könnten eine bessere Qualität im Hinblick auf die Reinheit und eine bessere Viskosität durch kürzere Inkubationszeit sein.

Bei der biologischen Deproteinierung und Demineralisierung entsteht Abwasser. Wie dieses gereinigt oder nutzbar gemacht werden könnte, ist noch in Betracht zu ziehen. Calcium-Lactat wäre z.B. weiter verwendbar. Wenn das Abwasser aus der Deproteinierung neben Peptiden und Aminosäuren auch viel Ammoniumionen durch Desaminierung von Aminosäuren beinhaltet, muss das Abwasser noch speziell entsorgt werden.

Die Qualität von Chitin ist ein wichtiger Punkt für die Industrie. Die Preise sind sehr unterschiedlich je nach Qualität. Kurzkettiges, wässriges Chitin kostet z.B. ca. 10 Euro/kg während langkettiges hochviskoses und hochreines Chitin für mehr als 2500 Euro/kg gehandelt wird. Die Produkte aus biologischer Chitingewinnung sind besser als die aus chemischen Verfahren.

Der wichtigste Aspekt liegt in umweltfreundlichen Verfahren der biologischen Chitingewinnung. Auch aus Material-Kostengründen spricht alles für das biologische Verfahren. Platz-Bedarf und Zeitaufwand sind in tropischen Entwicklungsländern, die Ganerlen produzieren, nicht unbedingt ein wichtiger Gesichtspunkt. So wird das meiste Chitin in den Entwicklungsländern

unter großer Umweltverschmutzung produziert.

Literatur

- [1] J. Bautista, M. Jover, J.F. Gutierrez, R. Corpas, O. Cremades, E. Fontiveros, F. Iglesias, and J. Vega. Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production. *Proces Biochem*, vol. 37:229–234, 2001.
- [2] J. Benitez, A. Silva, and R. Finkelstein. Environmental signals controlling production of hemagglutinin/protease in vibrio cholerae. *Infection and Immunity*, vol. 69:6549–6553, 2001.
- [3] B. Borchers. Chitosan in der papierindustrie. symposium zum stand der anwendung und forschung von chitin und chitosan. *Vortragsabstracts*, page 19, 2004.
- [4] E. Brandl and E. Sobeck-Skal. Zur methodik der keimzahlbestimmung in milch mit chinablau-lactoseagar. *Milchwiss. Ber.*, 13, 1963.
- [5] H.C. Chen, K.A. Phang, S.D. Wu, and W.J. Mau. Isolation of chitin from shrimp shells deproteinized by *candida parapsilosis* ccre 20515. *Food Sci Agric Chem*, 3, 2001.
- [6] L.A. Cira, S. Huerta, G.M. Hall, and K. Shirai. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp waste for chitin recovery. *Process Biochem*, vol. 37:1359–1366, 2002.

- [7] O. Cremades, E. Ponce, R. Corpas, Gutierrez, M. Jover, M. Alvarez-Ossoria, J. Parrado, and J. Bautista. Processing of crawfish (*procambarus clarkii*) for the preparation of crotenoproteins and chitin. *J Agric Food Chem*, vol. 49:5468–5472, 2001.
- [8] G. Daum. *Aerobe Deproteinierung von Crustaceen-Abfällen zur Gewinnung von Chitin mittels proteolytischer Mikroorganismen*. PhD thesis, Universität Hamburg, 2005.
- [9] R.F. Egerton. *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer, 2005.
- [10] C. Eiden, C. Jewell, and J. Wightman. Interaction of lead and chromium with chitin and chitosan. *J Appl Polym Sci*, vol. 25:1587–1599, 1980.
- [11] Food and Agriculture Organisation. Database. 2005.
- [12] N. Gagne and B.K. Simpson. Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnol*, 7:253–263, 1993.
- [13] D. Groboillot, D. Poncelot, and R. Neufeld. Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit Rev Biotechnol*, vol. 14:75–107, 1994.
- [14] R. Gupta and R. Kumar. Drug release behaviour of beads and microgranules of chitosan. *Biomaterials*, pages 1115–1119, 1998.
- [15] L. Hartwiger, B. Fristensky, and R. Riggelmann. Chitin chitosan and related enzymes. *Academic Press*, page 291, 1984.
- [16] M. Healy, A. Healy, and A. Healy. Bioprocessing of marine crustacean shell waste. *Acta Biotechnol*, vol. 23:151–160, 2003.

- [17] M.G. Healy, C.R. Romo, and R. Bustos. Bioconversion of marine crustacean shell waste. *Resour Conserv Recycl*, vol. 11:139–147, 1994.
- [18] S. Hinaro. Production and application of chitin and chitosan. In *Braek GS; Anthosen T; Sandford P (Ed.), Chitin and Chitosan, New York: Elsevier*, pages 37–43, 1989.
- [19] W.J. Jung, G.H. Jo, J.H. Kuk, K.Y. Kim, K.T. Oh, and R.D. Park. Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *lactobcillus paracasei* kctc-3074 and *serratia marcescens* fs-3. *Carbohydrate Polymers*, vol. 68:746–750, 2007.
- [20] W.J. Jung, G.H. Jo, J.H. Kuk, K.Y. Kim, and R.D. Park. Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *lactobcillus paracasei* subsp. *tolerans* kctc-3074 and *serratia marcescens* fs-3. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 71:234–237, 2006.
- [21] W.J. Jung, J.H. Kuk, K.Y. Kim, and R.D. Park. Demineralization of red crab shell waste by lactic acid fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 67:851–854, 2005.
- [22] K. Kifune. Clinical application of chitin artificial skin. In S. P. Brine CJ & Zikakis JP (Ed.). *Advances in Chitin and Chitosan*, pages 9–15, 1992.
- [23] R. Kroepke, A. Knueppel, J. Nielsen, and W. Lindemann. Increase of stability of lecithin- and chitosan-containing cosmetic formulations by addition of iminodisuccinic acid, 2003.
- [24] R. Kumar. A review of chitin and chitosan application. *React Funct Polym*, vol. 46:1–27, 2000.

- [25] R. Kumar, R. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, and A. Domb. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev*, vol. 271:413–424, 2004.
- [26] J.D. De Man, M. Rogosa, and M.E. Sharpe. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl. Bact.*, vol. 22:130–135, 1960.
- [27] G. McKay, H. Blair, and J. Gardner. The adsorption of dyes onto chitin in fixed bed columns and batch adsorbers. *J App Polym Sci*, vol. 29:1499–1514, 1984.
- [28] G. L. Miller. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, vol. 31:426–428, 1959.
- [29] M.B. Müller. *Bewertung von Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren für die Strukturelle Charakterisierung der gelösten organischen Substanz in Gewässern*. PhD thesis, Universität Karlsruhe (TH), 2004.
- [30] H. No and S. Mayers. Preparation of chitin and chitosan. In *Muzzarelli RAA; Peter MG (Ed.), Chitin Handbook. Grottamare; Italien: Atec*, pages 475–489, 1997.
- [31] K. Ono, Y. Saito, H. Yura, K. Ishikawa, A. Kurita, T. Akaike, and M. Ishihara. Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. *J Biomed Mater Res*, pages 289–295, 2000.
- [32] H. Oztop, D.Saraydin, and S. Cetinus. pH-sensitive chitosan films for baker's yeast immobilisation. *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 101:239–249, 2002.
- [33] P.R. Rajamohanam, S. Ganapathya, P.R. Vyasb, A. Ravikumarb, and M. V. Deshpande. Solid-state cp/mass ^{13}C -nmr spectroscopy: a sensitive

- method to monitor enzymatic hydrolysis of chitin. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 31:151–163, 1996.
- [34] S.M: Rao, J. Munoz, and W.F. Stevens. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Appl Microbio Biotechnol*, vol. 54:808–813, 2000.
- [35] L. Reimer. *Scanning Electron Microscopy*. Springer, 1983.
- [36] L. Reimer and H.Kohl. *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation*. Springer, 2008.
- [37] J. Rhoades and S. Roller. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoliage organisms in laboratory media and foods. *Appl Environ Microbiol*, vol. 66:80–86, 2000.
- [38] M. Risbud, M. Bhonde, and R. Bhonde. Effect of chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel on proliferation and cytokine expression of endothelial cells; implications in islet immunoisolation. *J Biomed Mater Res*, pages 300–305, 2001.
- [39] G. Roberts and K. Taylor. 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*, 1989.
- [40] M. Rodriguez, L. Albertengo, and E. Agullo. Emulsification capacity of chitosan. *Cabohyd Polym*, vol. 48:271–276, 2002.
- [41] U. Santoso, M. Wada, T. Koguchi, T. Iijima, K. Yamada, and et al. Isolation and purification of chitin from indonesian shrimp (*penaeus merguensis*) shells using actinase e. *J Agr Sci (Tokio)*, 38:27–34, 1993.

- [42] H.G. Schlegel. *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, 1992.
- [43] P.F. Schmidt. *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobe-reichsanalyse*. Expert-Verlag, Renningon-Malmsheim, 1994.
- [44] B. Schmietenknap. *Extrazelluläre Chitinacetylase marine und terre-strischer Chitin verwertender Bakterien*. PhD thesis, Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven, 2006.
- [45] C. Scholz. The role of chitosan in wound healing.: Symposiumzum-stand der anwendung von chitin und chitosan, vortragsabstracts büsum. Technical report, 2004. Statusseminar Chitin und Chitosan (Foschung, Entwicklung, Anwendung) in Büsum/Germany.
- [46] K. Shimahara, K. Ohkouchi, and M. Ikeda. A new isolation method of crustacean chitin using a proteolytic bacterium, *pseudomonas maltophi-lia*. *Chitin Chitosan, Proceeding Int. Conf, 2nd*, pages 10–14, 1982.
- [47] T.K: Sini, S. Santhosh, and P.T. Mathew. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *bacillus subtilis* ferment-ation. *Carbohydr Res*, vol 342:2423–2429, 2007.
- [48] T. Stegmeier. Entwicklung von hocheffizienten, biologisch abbaubaren schlichtemittel auf der basis von chitosan. symposium zum stand der anwendung und forschung von chitin und chitosan. Technical report, 2004. Statusseminar Chitin und Chitosan (Foschung, Entwicklung, An-wendung) in Büsum/Germany.
- [49] R. Tharanathan and F. Kittur. Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutri*, vol. 43:61–87, 2003.

- [50] S.L. Wang and S.H. Choi. Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *pseudomona aeruginosa* k-187. *Enzyme Micro Technol*, 22:629–633, 1998.
- [51] D.B. Williams and C.B. Carter. *Transmission Electron Microscopy - A Textbook for Materials Science*. Springer, 2009.
- [52] J. Winter. *Der Einflüß $\frac{1}{2}$ von organischen Säuren und von Sauerstoff auf die Gär- und Energiebilanz von Leuconostoc und verschiedener Lactobacillen*. PhD thesis, Universität München, 1974.
- [53] Y. Xu, A. Freiberg, C. Gallert, and J. Winter. Biologische chitingewinnung. Technical report, Insitute für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers, 2007. Statusseminar Chitin und Chitosan (Foschung, Entwicklung, Anwendung) in Büsum/Germany.
- [54] Y. Xu, C. Gallert, and J. Winter. Chitin purification from shrimp waste by microbial deproteination and decalcification. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79:687–697, 2008.
- [55] J.K. Yang, I.L. Shih, Y.M. Tzeng, and S.L. Wang. Production and purification of protease from a *bacillus subtilis* that deproteinize crutacean waste. *Enzyme Micro Technol*, 26:406–413, 2000.