

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

Isolierung eines Biopolymers aus gentechnisch veränderten Pflanzen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Rostock

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Katja Neubauer, geb. am 29. Januar 1981 in Berlin

Rostock, 27. November 2009

Vollständiger Abdruck der von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaft genehmigten Dissertation.

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Kragl, Universität Rostock (ICH)
2. Prof. Dr. I. Broer, Universität Rostock (AUF)

Termin des Rigorosums: 20.01.2010

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. M. Köckerling, Universität Rostock

Prüfer Hauptfach (Technische Chemie): Prof. Dr. Udo Kragl, Universität Rostock

Prüfer Nebenfach (Grundlagen der Genetik): Prof. Dr. R. Horn, Universität Rostock

Wissenschaftliches Kolloquium: 02.02.2010

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorgetragen und veröffentlicht:

Abschlussbericht (2007) „*Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffelknollen (Phase II)*“ im BML-Förderschwerpunkt ‚Nachwachsende Rohstoffe‘ (Laufzeit: 01.04.2005 – 30.11.2006)

Förderkennzeichen: 22009202

Abschlussbericht (2009) „*Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffelknollen (Phase IIb)*“ im BML-Förderschwerpunkt ‚Nachwachsende Rohstoffe‘ (Laufzeit: 01.03.2007 – 31.01.2009)

Förderkennzeichen: 22012606

K. Neubauer, W. Ruth, U. Kragl

Production of biopolymers by transgenic plants

Posterpräsentation anlässlich der **Processnet** in Frankfurt a. Main vom 17. bis 19. Februar 2008

K. Neubauer, J. Duwensee, U. Kragl

Production of a polyaspartat related polymer by transgenic plants

Posterpräsentation anlässlich der **European BioPerspectives** in Hannover vom 7. bis 9. Oktober 2008

Hühns *et al.* (2009) Tuber specific *cphA* Expression to enhance cyanophycin production in potatoes. *Plant Biotechnology Journal*, **7** (9): 883-898.

Neubauer *et al.* (2009) Isolation of cyanophycin from tobacco and potato plants with constitutive plastidic *cphA_{Te}* gene expression. **in Vorbereitung**

Abstract

Isolierung eines Biopolymers aus gentechnisch veränderten Pflanzen (Deutsch)

Für die Produktion von Biopolymeren bzw. Proteinen in transgenen Pflanzen gibt es bereits zahlreiche positive Beispiele. Ein entscheidender Aspekt bei der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen für die Produktion von komplexen Molekülen ist die anschließende Isolierung des Wertstoffes aus der entsprechenden Matrix.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Verfahren zur Isolierung von Cyanophycin (ein natürlicher Speicherstoff aus Cyanobakterien) aus transgenen Pflanzenmaterialien (Tabak und Kartoffeln) etabliert werden. Mit Hilfe des ersten Verfahrens, der direkten Säureextraktion des Biopolymers aus der pflanzlichen Matrix, konnten die einzelnen Parameter des Isolierungsverfahrens optimiert werden (Säure für die Extraktion, pH-Wert bei der Fällung und Methode zur Quantifizierung des Produktes). In einem zweiten Verfahren wurde die Anschlussfähigkeit der Isolierung von Cyanophycin aus transgenen Kartoffelknollen an den großtechnischen Prozess der Stärkegewinnung geprüft.

Isolation of a biopolymer from transgenic plant material (English)

Up to now there are several positive examples for the production of biopolymers and novel proteins in transgenic plants. In terms of using plants as renewable resources for the production of complex molecules isolation of the substance of interest is a crucial point.

In the framework of this study two different isolation processes for cyanophycin (a storage molecule from Cyanobacteria) from different transgenic plant materials could be developed. For the experiments tobacco as well as potato material was used. A first extraction procedure was based on the direct extraction of the polymer with diluted acid. It was established in the lab to optimize different process parameters (acid for extraction, pH-level for precipitation, method for quantification of the product). A second process was then developed with regard to link polymer isolation with an existing process for the extraction of starch from potato tubers.

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2005 bis November 2009 am Lehrstuhl für Technische Chemie der Universität Rostock unter der Betreuung von Prof. Dr. Udo Kragl angefertigt.

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Kragl dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Durch sein unermüdliches Werben nach neuen Projektpartnern hat er mir die Chance eröffnet auf diesem interessanten und fachübergreifenden Thema *der Produktion von Biopolymeren in transgenen Pflanzen* zu arbeiten. Dabei konnte ich viel über ‚den Tellerrand schauen‘ und die Zusammenarbeit mit anderen Fachbereichen hat es mir ermöglicht neue Denkansätze zu finden.

Des Weiteren möchte ich Frau Prof. Broer dafür danken, dass sie sich bereit erklärt hat, das Koreferat für meine Arbeit zu übernehmen. Die vielen Gespräche auf den gemeinsamen Projekttreffen haben mir stets das Gefühl vermittelt, das meine Arbeit wichtig ist und vielleicht sogar einmal eine technische Anwendung finden wird.

Für den finanziellen Support der Arbeit möchte ich mich bei der FNR bedanken. Durch ihren Förderschwerpunkt ‚Nachwachsende Rohstoffe‘ haben sie diese Arbeit erst ermöglicht.

Liebe Grüße und ein großes Dankschön möchte ich an dieser Stelle auch an die Mädels (Daniela, Susanne, Julia, Sandra, Vera und Annett) der Arbeitsgruppe richten. Es war eine tolle Zeit mit Euch, an die ich immer wehmütig zurückdenken werde. Julia, Dir danke ich dafür, dass ich mit Dir immer alles besprechen konnte, um meine Ideen und Gedanken zu ordnen. Das hat mir in den letzten Monaten sehr gefehlt.

Natürlich möchte ich mich auch bei dem Rest der Arbeitsgruppe bedanken, für die schöne Zeit, die ich in Eurer Runde verbracht habe. Besonders erwähnen möchte ich noch Anett, die sich tapfer den Herausforderungen „unseres“ Projektes stellt und sich mit mir zusammen des alten GC's angenommen hat. Auch Frau Freitag möchte ich an dieser Stelle extra erwähnen, denn ohne sie würde unser Labor langsam aber sicher im Chaos versinken.

Ein besonderer Dank gilt auch den unzähligen Hiwi-Kräften (Sabine, Ria, Jenny, Anne) und der Laborantin Anja Kammer, die ich im Laufe dieser Arbeit betreut habe. Ich denke die Zusammenarbeit war für beide Seiten lehrreich.

Als vorvorletztes möchte ich meine Mitstreiter im Kampf um den Dokortitel aus der befreundeten Arbeitsgruppe erwähnen. Eure Mitwirkung an unserem Doktoranden-seminar hat meinen Horizont um einige Cluster und Festkörper erweitert. Danke außerdem, dass ihr mich „TCler“ in eure Mittagsrunde aufgenommen habt und wir sogar ein Marathon-Staffel-Team (AC/TC) auf die Beine gestellt haben.

Kommen wir nun zum vorletzten Dank, der sich an ganz spezielle Freunde aus dem ‚Rudel‘ und dessen ‚Anhang‘ richtet. Auch wenn wir schon weit verstreut über den Globus sind, ich hoffe auch in 10 Jahren haben wir noch Kontakt und können uns gemeinsam an unsere Rostocker Jahre erinnern.

Zum Schluss möchte ich noch einmal Anki und Pu, sowie meine Ellies, meine kleine große Schwester und meinen Schatz erwähnen. Danke, Danke, Danke... Nicht nur für das umfangreiche Korrekturlesen, sondern auch für Eure Unterstützung. Ich hoffe ich kann auch einiges an Euch zurückgeben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Katja Neubauer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pflanzenzüchtung früher und heute.....	5
1.2	Pflanzen für die industrielle Nutzung	8
1.3	Biopolymer vs. Biokunststoff	10
1.4	Chemische Synthese von Polyaspartat.....	16
1.5	Cyanophycin – Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten	18
1.6	Produktion von Cyanophycin in transgenen Pflanzen.....	21
1.7	Zielsetzung	25
2	Ergebnisse	27
2.1	Extraktion von Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix.....	27
2.1.1	Saure Extraktion von Cyanophycin aus transgenem Tabakmaterial	29
2.2	Bestimmung der Reinheit der isolierten Cyanophycinproben	31
2.2.1	Reinheitsbestimmung der Cyanophycinproben mittels Elementaranalyse	31
2.2.2	LC/MS Messung zur Bestimmung der Zusammensetzung der Cyanophycinproben	35
2.2.3	Analyse der Cyanophycinproben mit Hilfe der Gelelektrophorese	36
2.2.4	LC/MS Messung der Polymerproben nach Isolierung aus SDS-Gelmatrix.....	39
2.2.5	UV-Messungen der isolierten Cyanophycinproben.....	40
2.2.6	Entwicklung einer angepassten BRADFORD Methode für Cyanophycin	42
2.3	Saure Extraktion von Cyanophycin aus transgenen Kartoffeln	44
2.3.1	Extraktion von Cyanophycin mit verschiedenen Säuren	47
2.3.2	pH-Wert bei der Fällung des Cyanophycins.....	48
2.3.3	Extraktion von Cyanophycin aus lyophilisiertem Kartoffelblattmaterial.....	50
2.3.4	Vergleich saurer Extraktion aus verschiedenen Pflanzenmaterialien	52
2.3.5	Aufreinigung der isolierten Proben durch Mehrfachfällung.....	54
2.4	Filtration zur Isolierung und Aufreinigung des Cyanophycins	55
2.4.1	Isolierung von wasserlöslichem Cyanophycin.....	55
2.4.2	Filtration von Standardproteinen.....	56
2.4.3	Aufreinigung von Cyanophycinproben	57
2.5	Kopplung der Extraktion von Cyanophycin aus transgenen Kartoffelknollen mit einem großtechnischen Prozess	60
2.5.1	Stärkestabilität unter Säureeinfluss	63
2.6	Betrachtung der Gesamtstickstoffgehalte von Cyanophycin produzierenden Tabak- und Kartoffelpflanzen	66
2.6.1	Gesamtstickstoffgehalte von Tabakpflanzen	67
2.6.2	Gesamtstickstoffgehalte von Kartoffelpflanzen	71
3	Zusammenfassung	77
4	Diskussion und Ausblick	79
5	Material und Methoden.....	89
5.1	Bestimmung der Reinheit.....	89
5.1.1	Elementaranalyse.....	89
5.1.2	LC/MS Messung mit Aminosäure Kit EZ:faast™	89

5.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	91
5.1.4	Verdau mit Cyanophycinase.....	92
5.1.5	Isolierung aus SDS Gel-Matrix	92
5.1.6	Proteinbestimmung nach BRADFORD	93
5.1.7	Proteinbestimmung mit BCA-Reaktion.....	93
5.2	Extraktion von Cyanophycin	94
5.2.1	Cyanophycin aus Tabak	95
5.2.2	Cyanophycin aus Kartoffeln.....	96
5.3	Filtration	97
5.3.1	Filtration von Kartoffelwaschwasser	98
5.3.2	Filtration von Standardproteinen.....	99
5.3.3	Filtration von isolierten Cyanophycinproben	99
6	Literatur.....	101
7	Anhang.....	111
7.1	Geräteliste.....	111
7.2	Chemikalienliste	113
7.3	Aufbau der Filtrationsanlage.....	115
7.4	Abbildungen, Tabellen und Kalibrierungen.....	116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Marktanteile der Biotechnologie bei der Produktion von chemischen Erzeugnissen im Vergleich der Jahre 2004 und 2015 (Quelle: Festel Capital).....	1
Abbildung 1-2:	Einteilung der Biotechnologie in verschiedenen Sparten (Definitionen nach OECD)	2
Abbildung 1-3:	Weltweite Verbreitung des Anbaus von gentechnisch veränderten Pflanzen mit Angabe der Anbaufläche sowie der einzelnen GVP für jedes Land (James 2008)....	4
Abbildung 1-4:	Moderne und klassische Methoden in der Pflanzenzüchtung (Kempken und Kempken 2006).....	6
Abbildung 1-5:	Systematik der Biokunststoffe (Beier 2009).....	11
Abbildung 1-6:	Chemische Struktur einiger natürlicher und modifizierter Polymere (Müller 2000; Snell und Peoples 2002).....	12
Abbildung 1-7:	Darstellung der möglichen Peptidbindungen zwischen den Aspartatuntereinheiten bei der Polykondensation zu Polyaspartat (PAA) (Roweton <i>et al.</i> 1997).....	16
Abbildung 1-8:	Stufenweise Hydrolyse von Polysuccinimid zum Polyaspartat (Klein <i>et al.</i> 2004) ...	17
Abbildung 1-9:	Struktur von Cyanophycin (schwarz: Aspartatgrundgerüst, blau: Arginin Seitenreste).....	19
Abbildung 1-10:	Verarbeitung von Cyanophycin zu möglichen Folgeprodukten (van Beilen und Poirier 2008).....	21
Abbildung 1-11:	Schematische Darstellung einer pflanzlichen Zelle und der Bildung und Speicherung von Cyanophycin in Abhängigkeit von der Expression der Synthetase.....	23
Abbildung 1-12:	Fließschema für die Hauptarbeitsgebiete, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten.....	26
Abbildung 2-1:	Veränderung des pH-Wertes von Pufferlösungen nach der Extraktion von gefriergetrocknetem Tabakmaterial PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Event 51-3 (weiße Balken: eingestellter pH-Wert vor der Extraktion; graue Balken: gemessener pH-Wert nach der Extraktion).....	28
Abbildung 2-2:	Schematische Darstellung der sauren Extraktion von Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix.....	29
Abbildung 2-3:	Mehrfachextraktion von Tabaklyophilisat (PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Event 51-3) - 1. Extraktionsschritt mit Natriumhydrogensulfidlösung nur zur Rehydrierung und Vorextraktion (Menge Isolat durch auswiegen der getrockneten Proben bestimmt)	30
Abbildung 2-4:	Strukturformeln von L-Arginin und L-Asparaginsäure sowie Cyanophycin und Kennzeichnung der einzelnen Molekülteile des Polymers (N- und C-terminales Ende und <i>repeating unit</i> des Polymers) und deren Molmassen.....	32
Abbildung 2-5:	Strukturformeln von L-Leucin und Poly-L-Leucin sowie Kennzeichnung der einzelnen Molekülteile des Polymers (N- und C-terminales Ende und <i>repeating unit</i> des Polymers) und deren Molmassen.....	34
Abbildung 2-6:	Chromatogramm für die LC/MS Messung einer Cyanophycinprobe isoliert aus transgenen Tabakblättern zur Bestimmung der Reinheit (rote Balken: Aminosäuren des Biopolymers – Arginin und Aspartat; graue Balken: <i>interne Standards</i> für die Quantifizierung und blaue Balken: beispielhaft ausgewählte zusätzliche Aminosäuren).....	36
Abbildung 2-7:	Gelelektrophorese mit Cyanophycinproben aus transgenen Tabakblättern (PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Event 51-3) - dargestellt sind Polymerproben aus fünf aufeinander folgenden Extraktionsschritten (Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250); M : Proteinstandard mit Größenmarker in kDa.....	37
Abbildung 2-8:	Gelelektrophorese nach Verdau mit Cyanophycinase (Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250) - dargestellt sind sowohl die unverdaute, als auch die verdaute	

	Polymerprobe sowie nur die Verdauungslösung (Molmasse des Verdauungsenzyms Cyanophycinase beträgt 30 kDa); M : Proteinstandard mit Größenmarker in kDa ... 39
Abbildung 2-9:	Darstellung der UV-Spektren von Polyaspartat in unterschiedlichen Lösungsmitteln im Vergleich zu einem Standardprotein (BSA) in Wasser (lokales Absorptionsmaximum für BSA bei ~280 nm) 41
Abbildung 2-10:	Darstellung der UV-Spektren einer Cyanophycinprobe isoliert aus transgenen Tabakblättern in unterschiedlichen Lösungsmitteln – Wasser und SDS-Puffer (lokales Absorptionsmaximum für die Probe in SDS-Puffer bei ~280 nm) 41
Abbildung 2-11:	Vergleichende Darstellung einer BRADFORD Kalibrierung für Cyanophycin aus <i>E. coli</i> (●) und BSA (▲) - entsprechende Kalibriergleichungen siehe rechte Seite 43
Abbildung 2-12:	Veränderung des pH-Wertes von Pufferlösungen nach der Extraktion von gefriergetrocknetem Kartoffelmateriale im Vergleich von A) isogenen Kartoffeln (Wildtyp Sorte Albatros) und B) transgenem Kartoffelmateriale (PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Klon 12 und 23) (weiße Balken: eingestellter pH-Wert vor der Extraktion; graue Balken: gemessener pH-Wert nach der Extraktion) 45
Abbildung 2-13:	Reaktionsschema der Polyphenoloxidasen 46
Abbildung 2-14:	Darstellung der Extraktionsausbeuten bei verschiedenen pH-Werten von PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Klon 12 und PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Klon 23. A) Menge Isolat (ausgewogen) B) Ausbeute Cyanophycin nach Analyse der Proben mit BRADFORD Assay 49
Abbildung 2-15:	Gelelektrophorese mit Cyanophycinproben isoliert aus frischen transgenen Kartoffelknollen (PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Klon23) bei verschiedenen pH-Werten; M : Proteinstandard mit den entsprechenden Größenmarker in kDa 50
Abbildung 2-16:	Extraktion von Cyanophycin aus Kartoffelblattlyophilisat PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Klon 12 (weiße Balken: Ausbeute ausgewogen, graue Balken: Cyanophycingehalt bestimmt mit BRADFORD Methode; „- - -“ mit BRADFORD Methode bestimmter Cyanophycingehalt in den Blättern) A) Fällung bei verschiedenen pH-Werten; B) Mehrfachextraktion 51
Abbildung 2-17:	Vergleich der Ergebnisse aufeinander folgender Extraktionen mit Salzsäure aus lyophilisierten Pflanzenmaterialien (transgene Tabakblätter von PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Event 51-3 und Kartoffelblätter sowie Knollen von PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Klon 12 und 23) - „- - -“ mit BRADFORD Methode bestimmter Cyanophycingehalte A) Menge Isolat (ausgewogen) B) Ausbeute Cyanophycin nach Analyse der Proben mit BRADFORD Assay 53
Abbildung 2-18:	UV-Spektren von Proben aus dem Versuch der Mehrfachfällung: — cyanophycinhaltige Probe <i>nach dem</i> ersten Lösen und Ausfällen; — <i>Rückstand</i> vom ersten Lösen und Ausfällen; - - - Bereich des lokalen Maximums für aromatische Aminosäuren in proteinhaltigen Lösungen 54
Abbildung 2-19:	Schematische Darstellung des Rückhalts bei der Filtration am Beispiel einer Membran mit 20 kDa Ausschlussgröße (Cyanophycin Molmasse zwischen 18 bis 25 kDa) 58
Abbildung 2-20:	Abnahme des Cyanophycingehaltes bei der Filtration in Abhängigkeit des filtrierten Volumens („●●●“ Menge an abfiltriertem Cyanophycin nach entsprechendem Filtrationsvolumen, ausgefällt und ausgewogen) – Cyanophycingehalte vor und nach der Filtration bestimmt nach der BRADFORD Methode 59
Abbildung 2-21:	Darstellung verschiedener Rückhaltekurven bei der Membranfiltration in Abhängigkeit vom Restvolumen und der Anzahl der Filtrationsvolumina (Beschriftung des jeweiligen Rückhaltes direkt an den Kurven) 60
Abbildung 2-22:	Schematische Darstellung der industriellen Verarbeitung von Kartoffelknollen bei der Stärkeproduktion – rot = mögliche Angliederung der Cyanophycin-Isolierung 61
Abbildung 2-23:	Gelelektrophorese von Cyanophycinproben isoliert aus frischen Kartoffelknollen PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Klon 23 mit direkter saurer Extraktion und PsbY- <i>cphA</i> _{Te} Klon 10 nach der gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsmethode M : Proteinstandard mit Größenmarker in kDa 62

- Abbildung 2-24: Beispiel für isoliertes Cyanophycin aus der transgenen Kartoffeln (PsbY-*cphA*_{Te} Klon 12) – extrahiert mit gekoppelter Stärke-Cyanophycin-Isolierungsmethode..... 63
- Abbildung 2-25: HPLC-Chromatogramme für die Stabilitätsversuche von Stärke in verdünnter Salzsäure bei 30 °C (rot) und 45 °C (blau) – RI-Signal bei RT = 6,1 min von verdünnter Salzsäure 64
- Abbildung 2-26: HPLC-Chromatogramme für die Stabilitätsversuche von Stärke in verdünnter Salzsäure bei 60 °C zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuches - Vergrößerung des Chromatogrammausschnitts zwischen 6,5 bis 10,0 min zeigt die Signale für die Zersetzungsprodukte Maltose, Glucose und Fructose 65
- Abbildung 2-27: Schematische Darstellung der sauren Hydrolyse von Stärkemolekülen zu Maltose und Glucose 65
- Abbildung 2-28: Umlagerung von Glucose (Aldose) zu Fructose (Ketose) über eine Endiol-Form.... 66
- Abbildung 2-29: **Links:** beispielhafte Nummerierung der Tabakblätter von unten beginnend nach oben bis zum letzten jüngsten Blatt; **Rechts:** Diagramm zur Verteilung des Stickstoffgehaltes in den Blättern einer Tabakpflanze (siehe Nummerierung links; weiße Balken - isogene Kontrollpflanze, graue Balken - transgene Tabakpflanze) . 68
- Abbildung 2-30: Darstellung des **Gesamtstickstoffgehaltes** in verschiedenen PsbY-*cphA*_{Te} Tabakpflanzen und den entsprechenden Kontrollen (LH9000 und SRI Wildtyp) - grau: Blätter von unten (alt), weiß: Blätter von oben (jung) 69
- Abbildung 2-31: Darstellung des **löslichen Proteingehaltes** in verschiedenen PsbY-*cphA*_{Te} Tabakpflanzen und den entsprechenden Kontrollen (LH9000 und SRI Wildtyp) - grau: Blätter von unten (alt), weiß: Blätter von oben (jung) 69
- Abbildung 2-32: Darstellung des **löslichen Cyanophycingehaltes** in verschiedenen PsbY-*cphA*_{Te} Tabakpflanzen und den entsprechenden Kontrollen (LH9000 und SRI Wildtyp). grau: Blätter von unten (alt), weiß: Blätter von oben (jung) – Messwerte zur Verfügung gestellt von AG Lockau (Humboldt-Universität zu Berlin)..... 70
- Abbildung 2-33: Darstellung des **Gesamtcyanophycingehaltes** in verschiedenen PsbY-*cphA*_{Te} Tabakpflanzen und den entsprechenden Kontrollen (LH9000 und SRI Wildtyp). grau: Blätter von unten (alt), weiß: Blätter von oben (jung) – Messwerte zur Verfügung gestellt von AG Lockau (Humboldt-Universität zu Berlin)..... 71
- Abbildung 2-34: Darstellung des Gesamtstickstoffgehaltes in Kartoffelknollen in verschiedenen PsbY-*cphA*_{Te} Klonen und den entsprechenden Kontrollen (WT und 35S) schwarze Balken: GWH-Versuch 2006; graue Balken: GWH-Versuch 2007, weiße Balken: GWH-Versuch 2008 72
- Abbildung 2-35: Darstellung des Gesamtstickstoffgehaltes in Kartoffelknollen in verschiedenen PsbY-*cphA*_{Te} Klonen und den entsprechenden Kontrollen (WT und 35S) schwarze Balken: FL-Versuch 2007 aus GWH-Knollen; graue Balken: FL-Versuch 2007 aus *in vitro* Knollen; weiße Balken: GWH-Versuch 2007 aus *in vitro* Knollen..... 73
- Abbildung 2-36: Darstellung des Gesamtstickstoffgehaltes in Kartoffelblättern zu unterschiedlichen Wachstumszeitpunkten in verschiedenen PsbY-*cphA*_{Te} Klonen und den entsprechenden Kontrollen (WT und 35S) - von schwarz nach weiß 1. Blattprobenahme bis 4. Blattprobenahme..... 74
- Abbildung 2-37: Darstellung des Gesamtstickstoffgehaltes in Kartoffelknollen in verschiedenen transgenen Klonen (PsbY-*cphA*_{Te} und B33-PsbY-*cphA*_{Te}) und den entsprechenden Kontrollen (WT und 35S) – graue Balken: N(min)-Werte; schwarze Balken: N(max)-Werte 75
- Abbildung 4-1: Massenbilanz des gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsprozesses am Beispiel einer Mischprobe aus PsbY-*cphA*_{Te} Knollen der Klone 12 und 23..... 82
- Abbildung 4-2: Vergleich von Cyanophycinproben aus unterschiedlichen rekombinanten Organismen. **M:** Proteinstandard mit Größenmarker in kDa, **II** und **IX:** Cyanophycin aus *E. coli* (AB Lockau, Humboldt-Universität zu Berlin), **III** und **IV:** Cyanophycin aus PsbY-*cphA*_{Te} Klon 12 nach Stärkemethode, **V:** Cyanophycin aus PsbY-*cphA*_{Te} Klon 23 mit saurer Extraktion, **VI** und **VII:** Cyanophycin aus B33-PsbY-*cphA*_{Te} Klon 32 und

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	38 nach Stärkemethode und VIII : Cyanophycin aus Tabak PsbY- <i>cphA</i> _{T_e} Event 51-3	84
Abbildung 5-1:	Reaktionsschema der Derivatisierungsreaktion.....	90
Abbildung 5-2:	Die verschiedenen Zustände des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue und die dazugehörigen Absorptionsbanden.....	93
Abbildung 5-3:	Reaktionsschema des BCA-Test-Systems: 1. Schritt Reduktion von Cu(II)-Ionen in alkalischem Medium durch Peptidbindung in Proteinen; 2. Schritt Bildung des farbiges BCA-Cu(I)-Komplexes	94
Abbildung 5-4:	Schematische Darstellung des Aufarbeitungsprozesses im Labormaßstab für die wasserunlösliche Form des Cyanophycins.....	96
Abbildung 5-5:	Schematische Darstellung der <i>cross flow</i> Technik (Querstromverfahren).....	98
Abbildung 7-1:	Osmota OS-MC-01 mit <i>cross flow</i> Technik für Flachmembranen: Filtration von Kartoffelwaschwasser (Charakterisierung der Membrananlage von J. Kröckel 2005)	115
Abbildung 7-2:	Rührzelle SC 75 von Schleicher & Schuell für Flachmembranen: Filtration der isolierten Cyanophycinproben (Charakterisierung der Rührzelle SC 75 von J. Kröckel 2005)	115
Abbildung 7-3:	SDS-Gel mit Proben aus dem Versuch zur Mehrfachfällung. I und VII Proteinstandard mit Größenmarker in kDa, II cyanophycinhaltige Fraktion nach dem ersten Auflösen und Wiederausfällen, III Rückstand nach dem ersten Auflösen und Wiederausfällen, IV cyanophycinhaltige Fraktion nach dem zweiten Auflösen und Wiederausfällen, V Rückstand nach dem zweiten Auflösen und Wiederausfällen, VI cyanophycinhaltige Fraktion nach dem dritten Auflösen und Wiederausfällen	116
Abbildung 7-4:	Kalibrierung von verschiedenen Standardproteinen mit der BRADFORD Methode ▲ Myoglobin, ● BSA, ◆ Lysozym, ■ Pepsin – entsprechende Kalibriergleichungen siehe rechte Seite.....	116
Abbildung 7-5:	Kalibrierung verschiedener Zucker mit HPLC-Messmethode (Fluß = 0,8 mL/min, Eluent = Reinstwasser, Detektor = RI); Retentionszeiten: Maltose = 6,6 min, Glucose = 8,3 min und Fructose = 9,7 min.....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Kommerziell erhältliche Fettsäurevarianten von wichtigen Ölpflanzen (Biermann <i>et al.</i> 2000) 9
Tabelle 1-2:	Vergleich der Polyhydroxyalkanoat-Gehalte in einigen gentechnisch veränderten Pflanzen (TGW = Trockengewicht) (van Beilen und Poirier 2008) 15
Tabelle 1-3:	Berechnung des möglichen Gewinns bei der Stärkeisolierung durch die zusätzliche Isolierung von Polyaspartat und Arginin aus Cyanophycin produzierenden Kartoffeln (Serr <i>et al.</i> 2007) 22
Tabelle 1-4:	Zusammenfassung der phänotypischen Veränderungen und Cyanophycingehalte in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen mit unterschiedlichen Konstrukten (TM = Trockenmasse; n.d. = nicht detektierbar) 24
Tabelle 2-1:	Darstellung der Löslichkeit von Cyanophycin in einigen ausgewählten Lösungsmitteln. „+“ Cyanophycin ist löslich, „-“ Cyanophycin ist nicht löslich (Simon 1971) 28
Tabelle 2-2:	Zusammenfassung der Messwerte für die prozentuale Zusammensetzung von Cyanophycin berechnet mit <i>ChemDraw® Ultra</i> (Chemical Structure Drawing Standard) bzw. experimentell ermittelt mit Hilfe der Elementaranalyse 32
Tabelle 2-3:	Zusammenfassung der Messwerte für die prozentuale Zusammensetzung von Poly-L-Leucin berechnet mit <i>ChemDraw® Ultra</i> (Chemical Structure Drawing Standard) bzw. ermittelt mit Hilfe der Elementaranalyse 34
Tabelle 2-4:	Ergebnisse der Cyanophycinextraktion aus transgenem Tabakmaterial (lyophilisiert, PsbY- <i>cphA</i> _{T_e} Event 51-3) - dargestellt ist die Gesamtmasse an Cyanophycin aus 3 Extraktionsschritten mit Salzsäure 44
Tabelle 2-5:	Vergleich der Extraktionsausbeuten bei Verwendung verschiedener Säuren, mit Angabe der pKs-Werte 48
Tabelle 2-6:	Filtration von Standardproteinen (p=1 bar Argonüberdruck) 57
Tabelle 4-1:	Vergleich der beiden Isolierungsverfahren von Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix 80
Tabelle 4-2:	Zusammenfassung der Stärkeausbeuten aus verschiedenen Versuchen zur Isolierung von Cyanophycin aus Kartoffelknollen 81
Tabelle 4-3:	Zusammenfassung der Extraktionsversuche von Cyanophycin aus transgenen Kartoffelknollen nach dem gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsverfahrens (enzymatische Bestimmung der Cyanophycingehalte bzw. mit BRADFORD Methode – AG Lockau) 83
Tabelle 5-1:	Gradientenzusammensetzung für die Analyse von Aminosäuren nach Aufarbeitung mit dem EZ:faast Kit TM (A = MeOH mit 0,1 %iger HCOOH; B = H ₂ O mit 0,1 %iger HCOOH) 90
Tabelle 5-2:	Angaben des Herstellers über die Trenneigenschaften der verwendeten Membran mit einem MWCO von 10 kDa. 98
Tabelle 7-1:	Liste der verwendeten Geräte mit Angabe des Herstellers 111
Tabelle 7-2:	Liste der verwendeten Chemikalien mit Angabe des Herstellers, sowie der verwendeten Reinheit [%] 113
Tabelle 7-3:	Kalibriergleichungen für verschiedene Standardproteine an ihrem Absorptionsmaximum 117
Tabelle 7-4:	Kalibriergleichungen verschiedener Zucker ermittelt mit HPLC-Messmethode (Fluß = 0,8 mL/min, Eluent = Reinstwasser, Detektor = RI) 118

Abkürzungsverzeichnis

\$/kg	Preis in US-Dollar pro Kilogramm Polymer
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
B33-PsbY- <i>cphA</i> _{Te}	Konstrukt für knollenspezifische Expression von Cyanophycin in Kartoffeln
BCA	<i>bicinchonic acid</i> , Bicinchoninsäure
BML	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserum Albumin
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV 35S	<i>cauliflower mosaic virus 35S promotor</i>
CP24	Lichtsammelkomplex Chlorophyllprotein
CphA	Cyanophycin-Synthetase
CphB	Cyanophycinase
CphE	externe Cyanophycinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAO	<i>Food and Agriculture Organisation</i>
FL	Freiland
FNR	Ferredoxin-NADP Oxidoreduktase
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
GVP	gentechnisch veränderte Pflanzen
GWH	Gewächshaus
HCl	<i>hydrochloric acid</i> , Salzsäure
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
kDa	kiloDalton (Maßeinheit in der Biochemie)
KFW	Kartoffelfruchtwasser
kg N/ha	Angabe bei der Düngung über die Menge an pflanzenverfügbarem Stickstoff pro Hektar
KWW	Kartoffelwaschwasser
LC/MS	<i>liquid chromatography/mass spectrometry</i>
LH 9000	Basisvektor für transgene Tabakpflanzen
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PAA	<i>polyaspartic acid</i> , Polyasparaginsäure
PE	Polyethylen
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PHB	Poly-((<i>R</i>)-3-hydroxybutyrat), Polyhydroxybuttersäure
pI	Isoelektrischer Punkt
PLA	<i>polylactic acid</i> , Polymilchsäure
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Polypropylen
PPO	Polyphenoloxidase
PsbY	integrales Protein des Photosystem II
PsbY- <i>cphA</i> _{Te}	Konstrukt für zytoplasmatische Expression von Cyanophycin in Tabak oder Kartoffeln
RI	<i>refractive index</i> , Brechungsindex
Rieske	Rieske Eisen-Schwefel Protein
RT	<i>retention time</i> , Retentionszeit
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SRI WT	Tabaksorte SRI Petit Havanna Wildtyp
<i>T. elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
TGW	Trockengewicht
TM	Trockenmasse
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
USD	US Dollar
UV	ultra violett
VKE	Verband der Kunststoffherstellenden Industrie

1 Einleitung

Mit Hilfe von biotechnologischen Prozessen werden derzeit etwa 5 % der jährlich produzierten chemischen Erzeugnisse hergestellt (Verband der Chemischen Industrie 2009). Dabei verteilen sich die einzelnen Produktklassen prozentual zum Gesamtmarktanteil wie in Abbildung 1-1 dargestellt. In den Jahren von 2004 bis 2015 wird ein etwa siebenfacher Zuwachs auf 305 Mrd. US-Dollar (USD) Marktanteil jährlich erwartet (Struhalla und Fietz 2005, Quelle: Festel Capital).

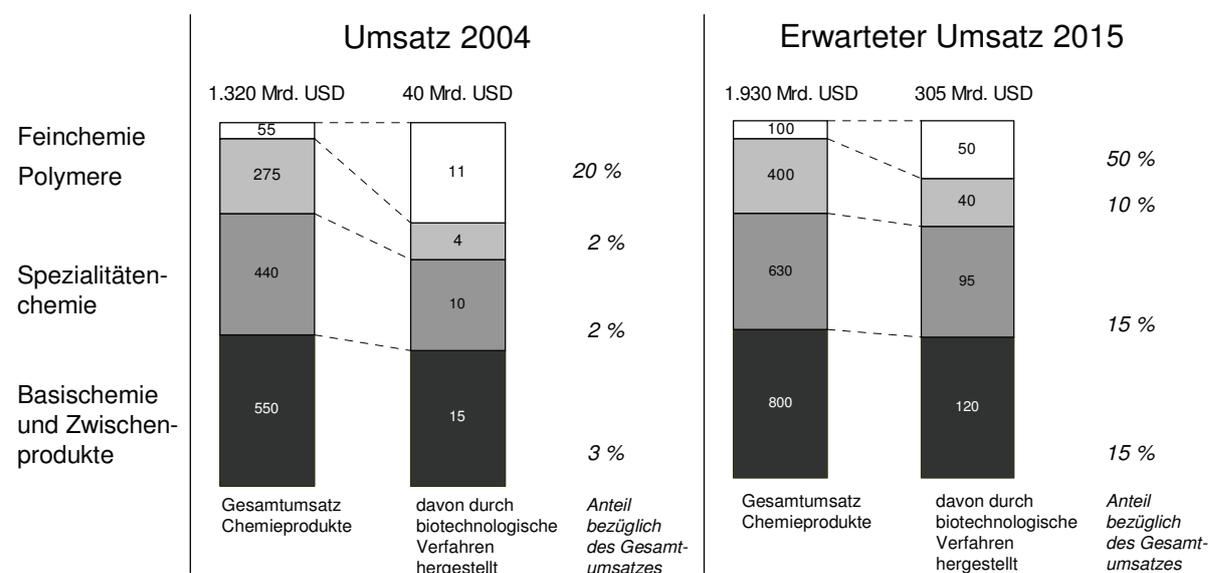


Abbildung 1-1: Marktanteile der Biotechnologie bei der Produktion von chemischen Erzeugnissen im Vergleich der Jahre 2004 und 2015 (Quelle: Festel Capital).

Im Jahr 2015 werden für Feinchemikalien voraussichtlich etwa 50 % des Umsatzes mit Hilfe biotechnologischer Prozesse erzielt. Bei den anderen Klassen von chemischen Produkten (Polymer- und Basischemikalien, sowie Spezialitätenchemie) werden der Prognose nach nur etwa 15 % des Gesamtumsatzes durch biotechnologische Verfahren erwirtschaftet. In diesen Sparten besteht weiterhin ein hoher Entwicklungsbedarf. Grundsätzlich herrschen große Unterschiede zwischen chemischen und biotechnologischen Verfahren (zum Beispiel: Temperaturen bei der Produktion, Ausgangsmaterialien etc.). Daraus ergeben sich verschiedene Vor- und Nachteile, denn nicht alle chemischen Produkte können direkt durch biotechnologisch erzeugte Produkte ersetzt werden. Es gibt dennoch viele Entwicklungsmöglichkeiten für neue Produkte und Anwendungsmöglichkeiten aus biotechnologischen Prozessen (Festel *et al.* 2004).

In den nächsten Jahrzehnten wird durch die fortschreitende Verknappung der fossilen Rohstoffe als Ausgangssubstanzen für die chemische Industrie, der Prozess

zur Entwicklung neuer biotechnologischer Verfahren weiter beschleunigt. Die jährlich produzierten Mengen an Biomasse werden bisher nur zu einem kleinen Teil als Ausgangssubstanzen für chemische Synthesen genutzt. Durch den Aufbau von Bio-raffinerien könnten pflanzliche Abfallstoffe zu chemischen Zwischenprodukten oder Energieträgern umgewandelt werden (Hüsing 2009).

Die Biotechnologie einschließlich ihrer Verfahren und Erzeugnisse wird allgemein in drei Kategorien eingeteilt: die Rote, die Weiße und die Grüne Biotechnologie (Lippold 2006). Zusätzlich dazu gibt es vier weitere Kategorien, deren Themengebiete noch nicht so klar definiert sind, wie bei den drei Hauptsparten (siehe Abbildung 1-2).

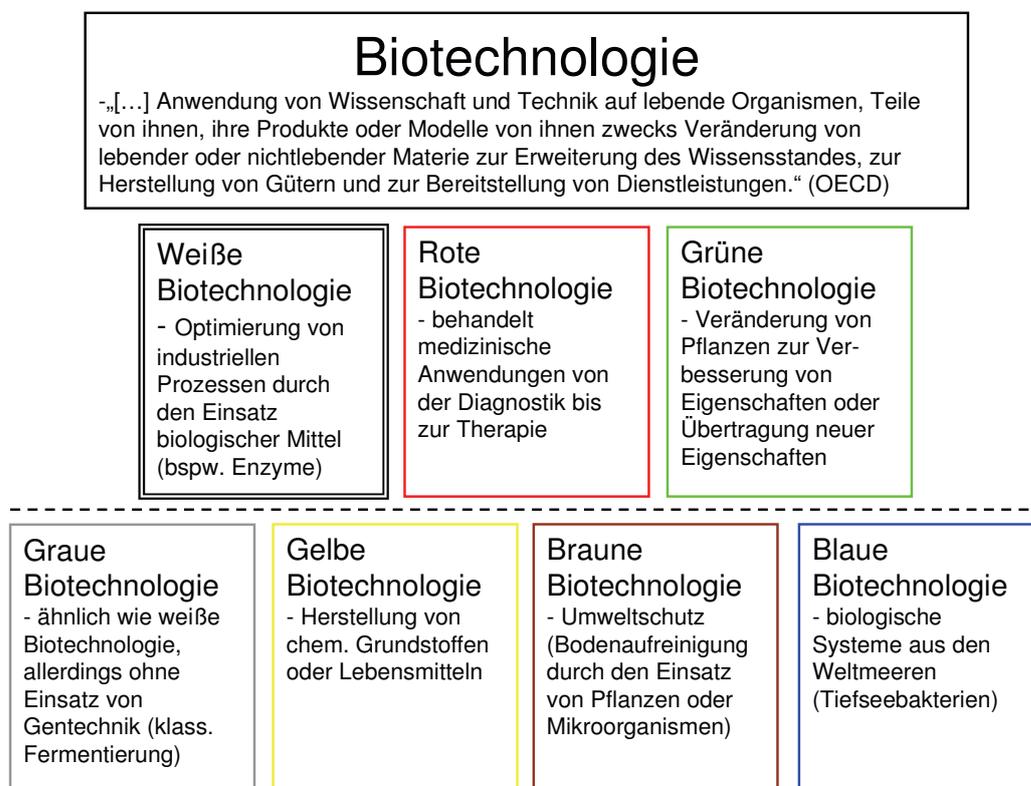


Abbildung 1-2: Einteilung der Biotechnologie in verschiedenen Sparten (Definitionen nach OECD)

Dabei versteht man unter der *Roten Biotechnologie* alle Prozesse, die zu Produkten für den medizinischen Bereich führen und der Herstellung neuartiger Medikamente dienen. Ein besonderer Schwerpunkt liegt in der Krebstherapie, hier kann mit den herkömmlichen Verfahren und Medikamenten oft keine Heilung erfolgen. Durch den Einsatz der Roten Biotechnologie und der Entwicklung von so genannten *Drug-Delivery*-Systemen erhofft man sich gezieltere Behandlungen bei Tumoren und Krebsgeschwüren.

Die *Weiße Biotechnologie* umfasst einerseits alle Prozesse, bei denen mit Hilfe von lebenden Zellen bereits existierende Produkte kostengünstiger und einfacher

hergestellt werden können (Hüsing 2009). Ein sehr populäres Beispiel stammt bereits aus den achtziger Jahren, als es gelang, Insulin durch transgene (d.h. gentechnisch veränderte) Bakterien zu erzeugen, anstatt es wie bisher aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen zu isolieren. Auf der anderen Seite können durch den Einsatz von Biokatalysatoren ebenso neue Produkte erschlossen werden (Struhalla und Fietz 2005). Viele in der Weißen Biotechnologie verwendeten Bakterien oder Enzyme sind mit Hilfe der Gentechnik verändert und an neue Aufgaben angepasst bzw. für bestimmte Prozesse optimiert worden. Große Fortschritte durch den Einsatz von spezialisierten Enzymsystemen konnten zum Beispiel im Bereich der Waschmittelindustrie erreicht werden. Laut dem Verband der Chemischen Industrie 2009 sind die Energiekosten pro Waschladung heute bis zu 50 % geringer als noch vor 25 Jahren.

Die letzte Sparte der Biotechnologie, die *Grüne Biotechnologie*, befasst sich mit transgenen Pflanzen. Durch eine Veränderung des Genoms der Pflanzen erhofft man sich eine gezielte Veränderung im Substanzspektrum oder auch in den Eigenschaften der Pflanzen. Ein wichtiger Aspekt ist bspw. die Stärkung der Pflanzen gegen Schädlinge, Krankheiten und ungünstige klimatische Bedingungen.

Dreizehn Jahre nach Beginn der Kommerzialisierung des Anbaus von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP) erreichte die globale Anbaufläche 2008 eine Größe von 125 Millionen Hektar (8 % der weltweit landwirtschaftlich genutzten Flächen). Weltweit nutzen dabei 25 Länder die Möglichkeiten und Vorteile, die durch den Anbau von GVP entstehen (James 2008). Die transgene Nutzpflanze mit dem größten Vorkommen ist eine herbizidresistente Sojabohne. Diese Pflanzen werden bereits auf 60 % der Soja-Anbauflächen eingesetzt (siehe Abbildung 1-3) (James 2006; Boyesen 2008). Daneben werden hauptsächlich Mais, Baumwolle und Raps als gentechnisch veränderte Pflanzen angebaut.

Europaweit wird der Anbau von transgenen Pflanzen in relativ geringem Maße betrieben. Nur sieben Länder, darunter Deutschland und Polen, bauten 2008 gentechnisch veränderte Pflanzen an. In allen europäischen Ländern wurde ausschließlich transgener Mais mit einer Insektentoleranz gegen die Larven des Maiszünslers kultiviert. Der Mais der Firma Monsanto ist unter dem Namen Bt-Mais oder auch MON 810 bekannt.

Aufgrund der aktuellen politischen Lage kam es 2009 in Deutschland erstmalig zu einem Verbot des Anbaus von MON 810. Auch im restlichen Europa sinkt die Akzeptanz gegenüber gentechnisch veränderten Lebensmitteln. Dies steht im Kontrast zu den Entwicklungen im Rest der Welt. Dort steigen die Anbauzahlen jährlich weiter an und amerikanische und kanadische Landwirte fordern weitere GVP, um den starken Ernteeinbußen und Kosten für Insektizide und Herbizide entgegen zu wirken.

Neben der Züchtung von insekten- und herbizidresistenten Nutzpflanzen sind ebenfalls GVP entwickelt worden, die sich durch die Produktion von neuen

1 EINLEITUNG

Substanzen auszeichnen, oder in denen die Zusammensetzung einzelner Komponenten hinsichtlich einer verbesserten Verarbeitung der Früchte oder der ganzen Pflanzen verändert wurde. Ein Beispiel dafür ist die Amflora-Kartoffel der Firma BASF. In diesen transgenen Kartoffeln wird nur noch Amylopectin produziert. Eine aufwendige Trennung von Amylopectin und Amylose bei der Stärkeverarbeitung entfällt somit. Mit konventionellen Züchtungsmethoden war es bisher nicht gelungen, eine Kartoffel zu entwickeln, deren Stärkezusammensetzung den industriellen Zwecken entspricht. Erst durch den Einsatz von Gentechnik konnte das entsprechende Gen zur Produktion von Amylose so beeinflusst werden, dass die Bildung dieses Stärkebestandteils nahezu vollständig unterdrückt wird.

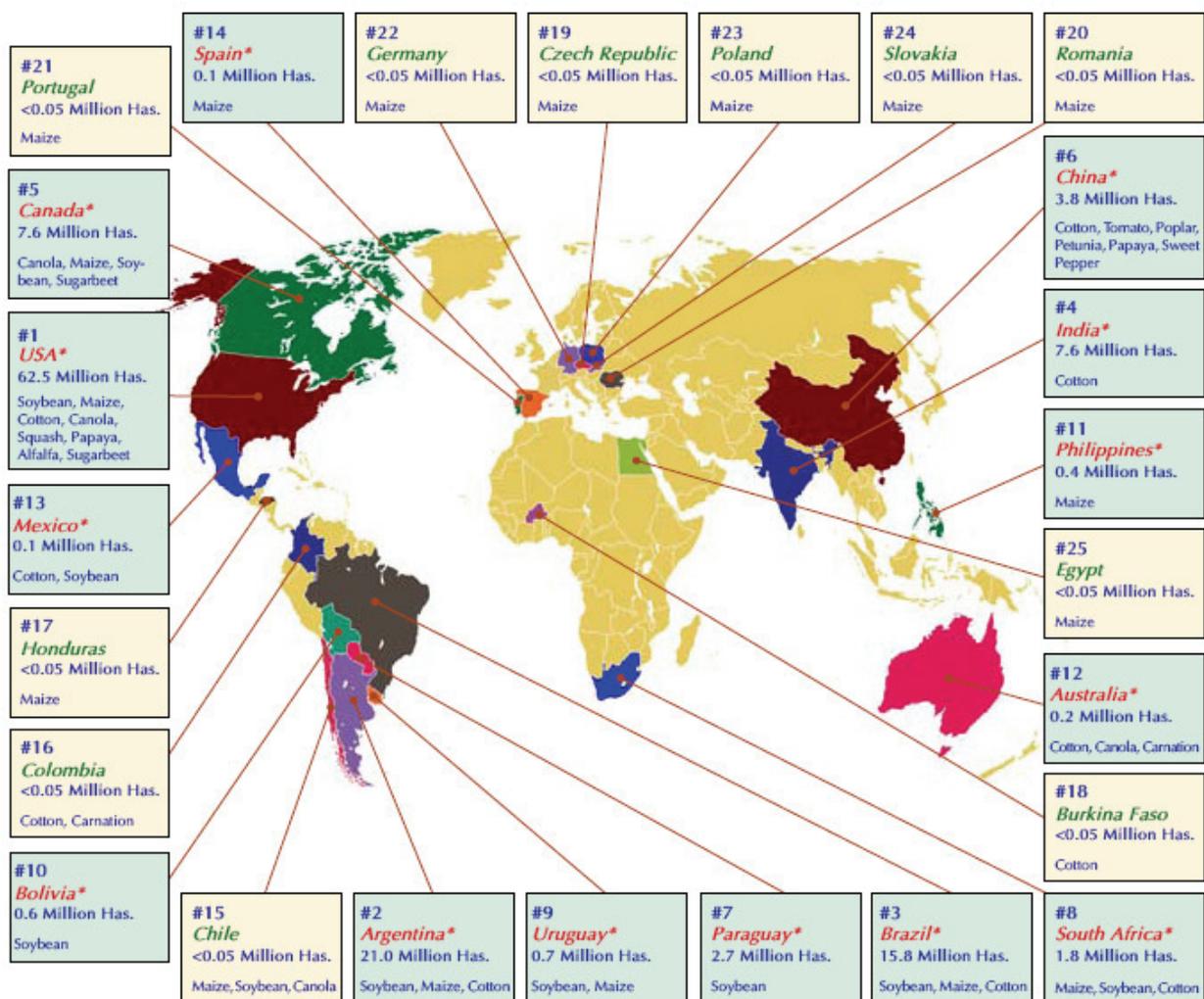


Abbildung 1-3: Weltweite Verbreitung des Anbaus von gentechnisch veränderten Pflanzen mit Angabe der Anbaufläche sowie der einzelnen GVP für jedes Land (James 2008)

Die genetischen Veränderungen beziehen sich nicht in erster Linie auf Pflanzen. Schon früher ist es gelungen verschiedenste Bakterienstämme zu verändern und

speziell zur Produktion von wirtschaftlich interessanten Substanzen zu „erziehen“. Heutzutage werden viele Aromastoffe und Vitamine, ebenso wie ganze Enzyme, durch Fermentationsprozesse von transgenen Bakterien hergestellt und anschließend für weitere Anwendungen im Bereich der Lebensmittelindustrie isoliert.

Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) wie Bakterien und Pflanzen können ebenfalls zur Erzeugung von neuartigen Substanzen verwendet werden. Ein Beispiel ist die Synthese von Polyhydroxyalkanolaten (zum Beispiel: Polyhydroxybutyrat - PHB) in transgenen Organismen. Diese Substanzen können nach erfolgreicher Isolierung in der Polymerchemie eingesetzt werden, da sie Eigenschaften ähnlich denen von Polyacrylaten besitzen und zusätzlich biologisch abbaubar sind.

Mit der Anwendung von biotechnologischen Prozessen kann die Nutzung von fossilen Rohstoffen in Form von Energie und Ausgangssubstanzen für chemische Prozesse zurückgedrängt werden. Bisher ist das Potential der Natur und ihrer Syntheseleistungen nur wenig genutzt (siehe Kapitel 1.2), doch in Zeiten der knapper werdenden Erdöl- und Erdgasreserven müssen neue Rohstoffquellen erschlossen werden.

1.1 Pflanzenzüchtung früher und heute

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzten Tabak- und Kartoffelpflanzen wurden durch gentechnische Veränderungen so bearbeitet, dass sie zusätzlich zum normalen Inhaltsstoffspektrum ein proteinähnliches Biopolymer (Cyanophycin) akkumulieren können. In diesem Kapitel sollen daher zuerst einige grundlegende Begriffe und Verfahren der klassischen und modernen Pflanzenzüchtung erläutert werden.

Die klassische Züchtung ist ein Prozess des stetigen Kreuzens und Rückkreuzens von Pflanzen mit besonderen, für die Landwirtschaft interessanten Eigenschaften. Man spricht dabei auch von einer Kombinationszüchtung, d.h. das gesamte Erbgut der Elternpflanzen wird miteinander vermischt und nach den Mendelschen Gesetzen neu kombiniert (BMBF 2009). Aus der großen Anzahl der pflanzlichen Gene (rund 25.000) ergibt sich eine Vielzahl von erwünschten und unerwünschten Kombinationsmöglichkeiten. Die Nachkommen mit gewünschten und/oder unerwünschten Veränderungen müssen anschließend aufwendig selektiert werden. Alles in allem ist diese Methode sehr zeitintensiv und die Etablierung einer neuen Zuchtlinie kann zwischen 15 und 20 Jahren dauern (Kempken und Kempken 2006).

In Abbildung 1-4 sind die Unterschiede der klassischen und modernen Pflanzenzüchtung in Bezug auf Variabilität und Selektion dargestellt. Die Variabilität der landwirtschaftlich genutzten Pflanzen wurde lange Zeit durch zufällige Mutationen und die aufwendige Kombinationszüchtung erzeugt. Das wachsende Verständnis von biologischen Prozessen hat dazu geführt, dass heute die natürliche

1 EINLEITUNG

Mutationsrate künstlich gesteigert werden kann. Durch Mutationen, ausgelöst etwa durch UV-Strahlung oder chemische Substanzen (bspw. Colchicin – wirkt erbgutverändernd), können eine Vielzahl von neuen Eigenschaften in Pflanzen erzeugt werden. Allerdings ist hierdurch keine Garantie für eine bestimmte Merkmalsausbildung gegeben. Die anschließende Selektion der Pflanzen mit den gewünschten Eigenschaften muss bei der modernen Pflanzenzüchtung nicht mehr an intakten Pflanzen und mit aufwendigen Labortests zur Inhaltsstoffanalyse durchgeführt werden. Die DNA- bzw. Genomanalysen der Pflanzen und die Expressionsrate des neuen Proteins in Zellgewebekulturen lassen bereits direkte Rückschlüsse auf die neuen Eigenschaften der Pflanzen zu.

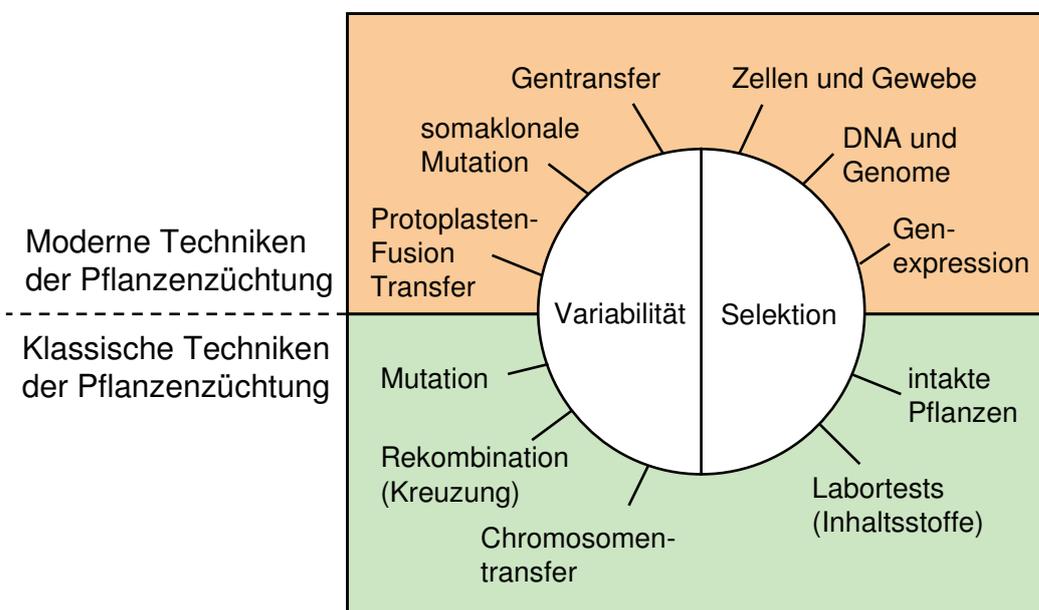


Abbildung 1-4: Moderne und klassische Methoden in der Pflanzenzüchtung (Kempken und Kempken 2006)

Mit der Entschlüsselung von kompletten pflanzlichen Genomen eröffneten sich neue Möglichkeiten in der Pflanzenzüchtung. Bereits im Jahr 2000 konnte das Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* von der „*Arabidopsis Genome Initiative*“ entschlüsselt werden (Initiative 2000). Kurze Zeit später folgte die Aufklärung des Reisgenoms durch zwei unabhängige Forschergruppen in der Schweiz (Syngenta) sowie in China und den USA (Kooperation von: Beijing Genomics Institute und University of Washington Genome Center). Durch die Decodierung des pflanzlichen Genoms und das Verständnis des Stoffwechsels lassen sich schneller neue Pflanzen entwickeln. Mit Hilfe des Gentransfers können so gezielte Veränderungen am Genom einer Pflanze durchgeführt werden. Außerdem können durch die Kombi-

nation verschiedener Pflanzen-DNAs auch beispielsweise stressresistentere Pflanzen entwickelt werden.

Durch den Einsatz neuer Methoden in der Pflanzenzüchtung ist es zudem möglich nur einzelne Gene zu übertragen oder auszuschalten und somit ganz gezielt neue Eigenschaften in den Pflanzen zu entwickeln (Entfernung von Toxinen und anderen störenden Inhaltsstoffen - siehe Raps Kapitel 1.2, Tabelle 1-1). Dabei kann auch die Artenbarriere überwunden und bakterielle DNA mit pflanzlicher verknüpft werden (Richter *et al.* 1999; Kempken und Kempken 2006). Der Einsatz der modernen Biotechnologie in der heutigen Pflanzenzüchtung führt zu effektiveren und kostengünstigeren Methoden als es mit der klassischen Züchtung allein erreichbar ist (Biermann *et al.* 2000).

Die gentechnisch veränderten Pflanzen werden in unterschiedliche Generationen eingeteilt. Die *erste Generation* von transgenen Pflanzen beschreibt die bereits kommerziell genutzten transgenen Pflanzen. Diese Pflanzen sollten durch den Einbau von Toleranzen gegen Herbizide und Insekten die Umwelt bei der Erzeugung von landwirtschaftlichen Produkten entlasten. Bei herbizidresistenten Pflanzen kann ein entsprechendes Herbizid auch erst nach dem vermehrten Auftreten von Unkraut eingesetzt werden und muss nicht bereits im Vorfeld zur Unterdrückung der Schadpflanzen aufgebracht werden. Die transgenen Pflanzen sind in jeder Wachstumsphase gegen die eingesetzten Herbizide resistent, was einen gezielteren Einsatz dieser möglich macht und somit zu einer Kosteneinsparung für die Landwirte führt.

Die *zweite* und *dritte Generation* von gentechnisch veränderten Pflanzen sind diejenigen, die sich bereits kurz vor der Zulassung bzw. erst in einem sehr frühen Forschungs- und Entwicklungsstadium befinden. Bei diesen Generationen wird zukünftig das Augenmerk auf eine verbesserte Inhaltsstoffzusammensetzung der Pflanzen gerichtet sein (Sauter und Hüsing 2005). Durch den Einsatz der Gentechnik sollen so Pflanzen mit neuen ernährungsphysiologischen (z. B. Golden Rice: Provitamin A Bildung) und sensorischen Qualitäten erzeugt werden. Außerdem kann durch eine veränderte Zusammensetzung der Inhaltsstoffe die Verarbeitung der Pflanzen erleichtert (z. B. Amflora-Kartoffel: Stärkezusammensetzung) und das Spektrum der landwirtschaftlich nutzbaren Pflanzen erhöht werden. Die Entwicklung dieser Pflanzen ist erst durch das Verständnis der komplexen Stoffwechselwege und die Entschlüsselung des pflanzlichen Genoms möglich.

Die Entwicklung von neuen Eigenschaften geht mit Hilfe der Gentechnik direktere und gezieltere Wege, trotzdem ist anschließend eine lange Zeitperiode bis zur endgültigen Nutzung der Pflanzen nötig. Die Pflanzen müssen in aufwendigen Tests hinsichtlich ihrer Ungefährlichkeit für Mensch und Tier und die restliche Umwelt getestet werden (OECD 1993; EFSA 2006), auch wenn es sich nicht um transgene Pflanzen für den Lebensmittelgebrauch handelt.

1.2 Pflanzen für die industrielle Nutzung

Nach der Einführung in die Thematik der Pflanzenzüchtung werden in diesem Kapitel anhand von zwei Beispielen (Raps und Kartoffel) die Möglichkeiten von klassischer und moderner Pflanzenzüchtung gegenüber gestellt.

Aus der Sicht der Industrie wird die Nachfrage an nachwachsenden Rohstoffen durch ihre Verfügbarkeit und den Preis bestimmt. Für eine effektive Nutzung der nachwachsenden Rohstoffe müssen immer genügend Materialien zu einem wettbewerbsfähigen Preis zu erwerben sein. Die Entwicklung von Isolierungsmethoden ist dabei weniger entscheidend und in der Bevölkerung genießen Produkte aus nachwachsenden Rohstoffen einen besseren Ruf als vergleichbare Produkte aus Petrochemikalien (Biermann *et al.* 2000).

Gerade im Hinblick auf die Verknappung von fossilen Brennstoffen und Edukten für die chemische Industrie muss an neuen Strategien für die Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen gearbeitet werden. Bisher werden nur etwa 3 % der jährlich gebildeten Biomasse für die Herstellung von Werkstoffen bzw. direkt als Brennstoffe verwendet (Behr und Onken 2006). Dabei geht es weniger um die einfache Verbrennung der pflanzlichen Matrix zur Energiegewinnung als um die Nutzung der Syntheseverleistungen der Natur zur Erzeugung höherwertiger Endprodukte.

Die Nutzung der Gentechnik beschränkt sich nicht allein auf die Erzeugung transgener Pflanzen. Auch gentechnisch veränderte Bakterien können zur Herstellung von industriell relevanten Substanzen oder Enzymen genutzt werden. Die Vorteile beim Einsatz der Gentechnik bei Pflanzen liegen vor allem in den geringeren Kosten bei der Herstellung der gewünschten Produkte. Im Gegensatz zu Bakterien erfolgt die Bildung von Inhaltsstoffen in Pflanzen allein durch CO₂-Fixierung aus der Luft und durch die Nutzung des Sonnenlichtes bei der Photosynthese zur Energiegewinnung. Beides ist frei verfügbar. Es müssen nicht, wie bei der Fermentation von Bakterien üblich, hohe Energiekosten und externe Kohlenstoffquellen als Energielieferanten in Kauf genommen werden (Jung und Steinbüchel 2001). Auf der anderen Seite benötigen Pflanzen beim Anbau mehr Platz, als Bakterien bei der Fermentation. In Deutschland werden bereits 50 % der verfügbaren Fläche landwirtschaftlich genutzt, so dass eine Ausdehnung der Flächen für den Anbau von GVP zur Herstellung chemischen Ausgangssubstanzen schwierig wäre. Außerdem sind die Pflanzen und ihre Erträge stark von Umwelteinflüssen abhängig, was sich wiederum negativ auf die Zusammensetzung der Pflanzen auswirken kann.

Als nachteilig können sich bei der Nutzung von Pflanzen außerdem die Kosten für eine Isolierung der Zielsubstanzen aus der pflanzlichen Matrix erweisen. Außerdem werden bei den Extraktionsprozessen vielfach große Mengen an Lösungsmitteln benötigt, die wiederum aus fossilen Brennstoffen hergestellt werden müssen (Jung und Steinbüchel 2001). Zusätzlich zu den, im Vergleich zur Fermentationsphase von

Bakterien, üblicherweise längeren Vegetationsperioden bei Pflanzen kann sich dies negativ auf den Preis des Endproduktes auswirken.

Im Folgenden werden zwei Kulturarten (Raps und Kartoffeln) vorgestellt, die sowohl durch klassische Züchtung, als auch mit Hilfe gentechnischer Methoden für bestimmte Anwendungen in der Industrie entwickelt worden sind.

Das aus Raps gepresste Öl hatte lange Zeit nur eingeschränkte Einsatzmöglichkeiten. In Tabelle 1-1 ist die Zusammensetzung verschiedener kommerziell erhältlicher Öle, die auch als lebensmitteltechnische Produkte eingesetzt werden, dargestellt. Raps ist die einzige Ölpflanze, die extrem hohe Mengen an Erucasäure bildet. Aufgrund der hohen Gehalte an Erucasäure ($\geq 50\%$) weist das Rapsöl einen bitteren Geschmack auf und ist für den Lebensmittelgebrauch nicht geeignet. Es wurde daher lange Zeit nur als Brennstoff für Öllampen oder in anderen technischen Bereichen (Schmiermittel für Maschinen und Grundstoff für die Seifenherstellung) verwendet (Pude 2005).

Tabelle 1-1: Kommerziell erhältliche Fettsäurevarianten von wichtigen Ölpflanzen (Biermann *et al.* 2000) – Angaben der Fettsäuren in %

Kulturart	Variante	Ursprung	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1	andere
Sojabohne	konventionell		-	-	11	4	23	54	8	-	-	-
Raps	Erucasäure hoch	konventionell	-	-	3	1	11	12	9	8	52	4
	0 oder 00 (Canola)	natürliche Mutation	-	-	4	2	60	21	10	1	1	1
	Linolensäure gering	Mutagenese	-	-	4	2	61	28	3	1	-	1
	Laurinsäure hoch	Gentechnik	37	4	3	1	33	12	7	-	-	3
Sonnenblume	konventionell		-	-	7	5	19	68	-	-	-	1
	Ölsäure hoch	Mutagenese	-	-	3	4	83	10	-	-	-	-
Erdnuss	konventionell		-	-	12	4	47	31	-	-	-	6
	Ölsäure hoch	natürliche Mutation	-	-	6	2	81	3	-	-	-	8
Leinsamen	konventionell		-	-	6	4	18	14	58	-	-	-
	Linolensäure gering (Linola)	Mutagenese	-	-	6	3	15	73	3	-	-	-

gesättigte Fettsäuren: 12:0 = Laurinsäure, 14:0 = Myristinsäure, 16:0 = Palmitinsäure, 18:0 = Stearinsäure

ungesättigte Fettsäuren: 18:1 = Ölsäure, 18:2 = Linolsäure, 18:3 = Linolensäure, 20:1 = Gadoleinsäure, 22:1 = Erucasäure

Mit Hilfe der klassischen Züchtung ist es seit den 70er Jahren gelungen neue Rapsorten auf den Markt zu bringen, die nahezu frei an Erucasäure und Glucosinolaten sind (insgesamt hat die Züchtung fast 20 Jahre gedauert). Diese Sorten

wurden unter dem Namen Doppelnull-Raps (00-Raps oder Canola) bekannt (Tabelle 1-1). Gleichzeitig konnte in diesen Rapsorten der Anteil an Öl- und Linolensäure stark erhöht werden, was zu einer Verbesserung der Ölzusammensetzung für die menschliche Ernährung führte (siehe zum Vergleich Tabelle 1-1). Alle für die Ernährung wichtigen Öle bestehen zu etwa 80 % aus einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Da der Organismus nicht in der Lage ist, diese essentiellen ungesättigten Fettsäuren zu synthetisieren, müssen sie mit der Nahrung aufgenommen werden.

Mit gentechnischen Methoden konnten zusätzlich Rapsorten erzeugt werden, die Laurinsäure produzieren. Dabei ging es um den Ersatz von Koksöl als Ausgangssubstanz für die industrielle Herstellung von Waschmitteltensiden, d.h. um die biotechnologische Nutzung der Rapspflanzen.

Ein weiteres Beispiel für die Anwendung von Gentechnik in der Landwirtschaft ist die Stärkekartoffel Amflora (BASF). Die natürliche Stärkezusammensetzung bei Kartoffeln ist für eine industrielle Nutzung stets ungünstig, da Kartoffelstärke zu etwa 80 % aus Amylopectin und zu 20 % aus Amylose besteht (Nawrath *et al.* 1995). Für die meisten industriellen Anwendungen wird jedoch nur Amylopectin benötigt. Die Kleistereigenschaften dieser Stärkeform sind für die Papier-, Textil- und Klebeindustrie entscheidend. Die Abtrennung der Amylose erfolgt unter hohem Energie- und Wasserverbrauch und führt somit zu hohen Produktionskosten. Durch die Gentechnik kann mit Hilfe der so genannten Antisense-Technik eine Kartoffelsorte gezüchtet werden, die ausschließlich Amylopectin produziert und damit für industrielle Nutzungen von großem Interesse ist (Visser *et al.* 1991). Die Verarbeitung der Kartoffelknollen kann durch die gentechnische Veränderung deutlich vereinfacht werden. Die Inaktivierung des Enzyms Stärkesynthetase durch das Einbringen eines spiegelbildlichen Gens, ermöglicht Mutanten, die bisher mit den Methoden der herkömmlichen Pflanzenzüchtung nicht gezüchtet werden konnten. Im Moment wird diese gentechnisch veränderte Kartoffel allerdings nicht kommerziell angebaut, da bisher keine offizielle Anbaugenehmigung erteilt wurde.

1.3 Biopolymer vs. Biokunststoff

Das in den gentechnisch veränderten Pflanzen eingebrachte Cyanophycin ist ein natürlicherweise in Cyanobakterien vorkommendes Biopolymer. In der Arbeit wird daher häufig der Begriff „Biopolymer“ verwendet. In diesem Kapitel folgt eine Begriffserklärung, da der Terminus mit verschiedenen Bedeutungen belegt ist, außerdem wird anhand eines Beispiels die Gewinnung eines Biopolymers aus rekombinanten Organismen erläutert.

Ein Biopolymer kann sowohl ein natürlich vorkommendes Polymer in Pflanzen und Bakterien beschreiben, als auch ein biologisch abbaubares Polymer, das aus natürlichen oder fossilen Rohstoffen synthetisiert wird (siehe Abbildung 1-5). Nicht

jedes Biopolymer ist auch gleichzeitig als Biokunststoff zu betrachten. Bei den natürlich vorkommenden Biopolymeren, die auch für die chemische Industrie von Bedeutung sein können, handelt es sich vor allem um Stärke und Cellulose. Diese Biopolymere sind jedoch aufgrund ihrer Eigenschaften nicht direkt für eine industrielle Nutzung im Sinne eines Biokunststoffes einsetzbar. Erst durch chemische Veränderung der Molekülstruktur (beispielsweise Veresterung mit Essigsäure; siehe Abbildung 1-6) entstehen daraus schmelzbare Kunststoffe, die mit den gängigen Verfahren der Kunststoffindustrie verarbeitet werden können und brauchbare Eigenschaften aufweisen. Die chemische Veränderung von Stärke und Cellulose führt zu einer sinkenden biologische Abbaubarkeit. Die Veresterungen müssen so gesteuert werden, dass ein sinnvoller Kompromiss zwischen nutzbaren Eigenschaften und Abbaubarkeit erzielt werden kann. Auf der anderen Seite gibt es auch Biokunststoffe, die auf Basis von fossilen Rohstoffen durch chemische Synthesen gewonnen werden. Sie erhalten aufgrund ihrer biologischen Abbaubarkeit das Präfix „Bio-“ (siehe Abbildung 1-5).

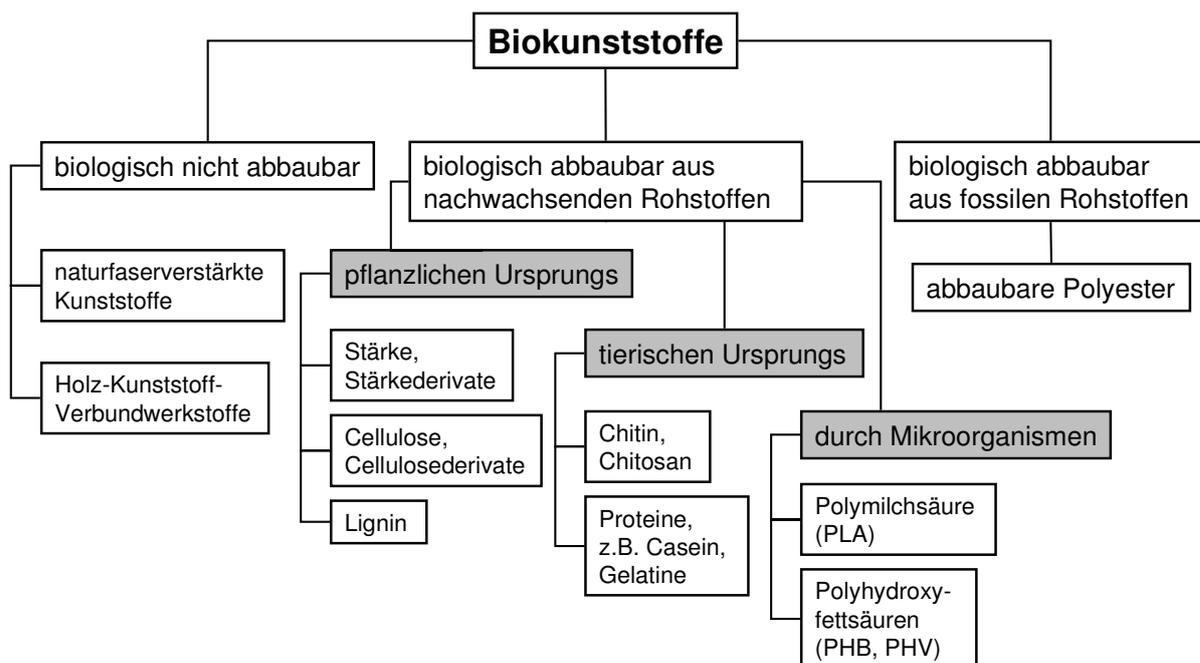


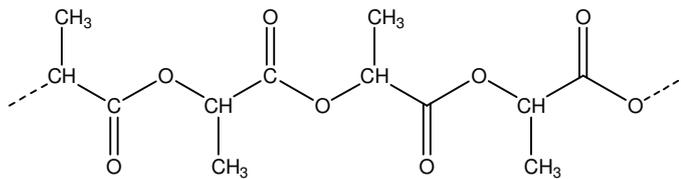
Abbildung 1-5: Systematik der Biokunststoffe (Beier 2009)

Bisher werden jährlich nur etwa 0,1 % des gesamten Kunststoffverbrauches durch Biokunststoffe abgedeckt. Bei den natürlichen Polymeren können keine konstanten Materialeigenschaften garantiert werden. Zu groß ist die Abhängigkeit der Polymerqualität von Umwelteinflüssen während der Wachstumsperiode der Pflanzen. Eine Lösung könnte sich aus der Nutzung von Monomeren aus natürlichen Ressourcen (Pflanzen oder Fermentationsprozesse) zur Herstellung von Polymeren ergeben. Es

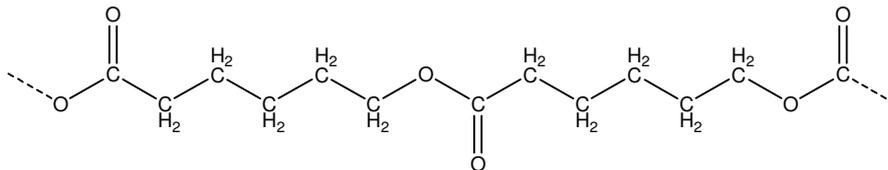
1 EINLEITUNG

wäre dann möglich, Polymere zu synthetisieren, die erwünschte Eigenschaften und eine Struktur, die genügend Angriffsmöglichkeiten für einen biologischen Abbau durch Enzyme bietet, miteinander zu kombinieren (Müller 2000). Polyhydroxymilchsäure (*engl.*: polylactic acid = PLA; Struktur siehe Abbildung 1-6) ist ein Beispiel für solch einen Kompromiss. Dieses Polymer besteht aus einzelnen Milchsäureeinheiten, die bei der Fermentation von Glucose mit Hilfe verschiedener Bakterien gebildet werden. Es kann in verschiedenen Bereichen der Verpackungsindustrie eingesetzt werden und ist vollständig biologisch abbaubar.

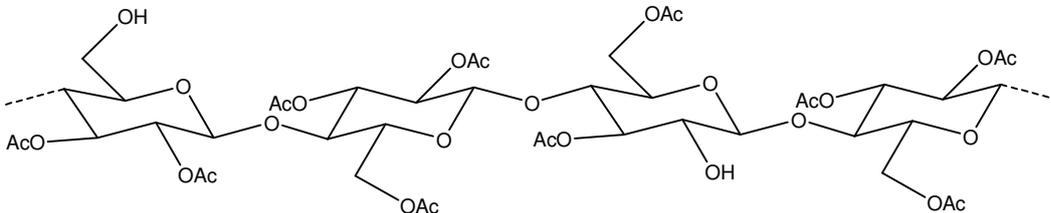
Polymilchsäure (chemisch synthetisiertes Polymer aus nachwachsenden Rohstoffen)



Polycaprolacton (chemisch synthetisiertes Polymer auf Basis fossiler Rohstoffe)



Celluloseacetat (chemisch modifiziertes Biopolymer)



Polyhydroxybutyrat (Biopolymer)

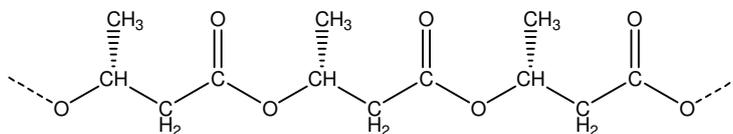


Abbildung 1-6: Chemische Struktur einiger natürlicher und modifizierter Polymere (Müller 2000; Snell und Peoples 2002)

Zelluloid war der erste großtechnisch produzierte Biokunststoff. Es wurde bereits 1869 durch eine chemische Reaktion aus Cellulose und Kampfer hergestellt. Dieser Biokunststoff diente bspw. als Ersatzmaterial für Billardkugeln aus Elfenbein. Als nächstes folgte das Cellophan (1908), das in Folien gepresst für die Verpackung von Lebensmitteln verwendet wird und vollständig abbaubar ist. Biokunststoffe auf Stärkebasis werden heutzutage häufig vor allem in der Landwirtschaft eingesetzt.

Dort erübrigt sich bspw. durch die Anwendung von biologisch abbaubaren Mulchfolien das Einsammeln und Entsorgen der verwendeten Folien. Solche Folien werden zum Schutz vor Unkrautbefall und gegen hohe Wasserverdunstungen eingesetzt und können im Anschluss an die Ernte einfach untergepflügt werden (FNR 2007).

In den Jahren ab 1930 schritt die Entwicklung der Kunststoffe, die auf Basis von fossilen Rohstoffen hergestellt werden, stärker voran. Nylon, Teflon, Polyethylen (PE) und Polypropylen (PP) sind nur einige wenige dieser neuen Kunststoffe (FNR 2007). Die Abbaubarkeit dieser synthetisch hergestellten Kunststoffe ist sehr schlecht und bringt aufgrund ihrer Produktionsmengen große Belastungen für die Umwelt mit sich (lt. VKE 20 Millionen Tonnen Jahresproduktion allein in Deutschland, Stand 2008). Es ist daher von großem Interesse, die strukturellen Voraussetzungen für eine gute biologische Abbaubarkeit zu kennen, bevor immer neue Polymere synthetisiert werden. Im Vergleich zu chemisch hergestellten Polymeren besitzen die meisten natürlichen Polymere (Biopolymere) die Eigenschaft durch biochemische, chemische und physikalische Reaktionen eine vollständige Mineralisierung zu durchlaufen. Die Endprodukte sind dann Kohlenstoffdioxid (CO₂), Wasser, Methan (CH₄) und andere Stoffwechselprodukte (Müller 2000).

Für einen biologischen Abbau der Polymere müssen die langen Polymerketten durch extrazelluläre Enzyme zu wasserlöslichen Bruchstücken verdaut werden können. Dabei ist das Vorhandensein von Heteroatomen (Sauerstoff oder Stickstoff) für den Angriff der Enzyme sehr wichtig. Eine weitere Voraussetzung ist die Beweglichkeit der Polymerketten gegeneinander; bei den synthetisch hergestellten Polymeren existieren zwischen den einzelnen Polymerketten meist starke Anziehungskräfte (Wasserstoffbrückenbindungen). Die Abbaubarkeit von Kunststoffen ist nicht primär abhängig von der Herkunft der Ausgangsmaterialien, sondern vielmehr von den Eigenschaften des Endproduktes. Ein Beispiel für ein synthetisches Polymer aus fossilen Rohstoffen, welches dennoch eine gute biologische Abbaubarkeit besitzt ist Polycaprolacton (Struktur siehe Abbildung 1-6). Es handelt sich dabei um ein nicht toxisches Polymer und wird daher vor allem in der Medizintechnik, als synthetischer Wundverband oder für orthopädische Abdrücke eingesetzt.

Neben Stärke und Cellulose gibt es noch weitere natürliche Polymere, die interessante Eigenschaften für großtechnische Nutzungen aufweisen. In vielen Bakterienstämmen kommen beispielsweise verschiedene Polyhydroxyalkanoate (PHA) vor, die ähnliche Eigenschaften besitzen wie einige synthetisch hergestellte Polymere. Der bekannteste Vertreter dieser natürlichen Polyester ist Poly-3-hydroxybutyrat (PHB, Struktur siehe Abbildung 1-6). PHAs mit kurzen Seitenketten (z. B. PHB) sind kristalline Thermoplasten. Bei mittellangen Seitenketten (C₆ bis C₁₄) hingegen haben die Polyester eher einen elastischen Charakter (Elastomere) (Snell und Peoples 2002).

PHB ist, ebenso wie Cyanophycin, ein bakterieller Kohlenstoff- und Energiespeicher. Die ersten Forschungsergebnisse auf dem Gebiet von rekombinanten Organismen

zur Produktion von PHB sind aus den 90ziger Jahren des 20. Jahrhunderts (Byrom 1987; Peoples und Sinskey 1989; Anderson und Dawes 1990). Im Folgenden werden einige Erkenntnisse dieser Forschungen dargestellt, vor allem im Hinblick auf die Isolierung des Biopolymers aus den verschiedenen Matrices zur Nutzung für unterschiedliche industrielle Prozesse und Anwendungen.

Die Produktion von Polymeren durch Fermentation ist im Vergleich zur chemischen Synthese von gebräuchlichen Polymeren, wie Polyethylen bzw. Polypropylen, um den Faktor 5 bis 10 höher. Sie ist daher nur für Spezialprodukte in geringen Mengen rentabel (Poirier *et al.* 1992a; Bohmert *et al.* 2000b). Dagegen ist die Nutzung von transgenen Pflanzen für die Produktion von Biopolymeren aus verschiedenen Gründen effektiver (dazu siehe auch Kapitel 1.2). Neben der Transformation der entsprechenden Synthetasegene zur PHB Bildung in rekombinante Bakterien (Anderson und Dawes 1990) wurden daher auch transgene Pflanzen, allen voran die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, zur Produktion von PHB und ähnlichen Polyestern gentechnisch verändert (Poirier *et al.* 1992b; Nawrath *et al.* 1994). Eine zusammenfassende Übersicht von transgenen Pflanzen und den in ihnen erzielten PHA-Gehalten ist in Tabelle 1-2 dargestellt.

Wie in den Bakterien formt sich das PHB in kleinen Einschlusskörpern (Granula). Allerdings konnten nur geringe Gehalte von 20-100 µg pro g Frischgewicht erzielt werden. Die Produktion in Pflanzen war somit nicht so effizient wie in Bakterien, denn einige Bakterienstämme können PHB bis zu 80 % ihrer Frischmasse anreichern. Für eine kommerzielle Nutzung müsste der Gehalt in *A. thaliana* stark erhöht werden. Es konnten außerdem keine normalen gesunden Pflanzen erzeugt werden. Nawrath *et al.* gelang es 1994, die Akkumulation von PHB in die Plastiden zu verlagern. Der Gehalt an PHB konnte somit auf bis zu 14 % (140 mg) des Blatt-TGWs gesteigert werden. Die Pflanzen wiesen keine Wachstums- oder Fertilitätsprobleme auf. Die höchsten Gehalte wurden im Jahr 2000 durch Bohmert *et al.* erzielt. Sie konnten *A. thaliana* Pflanzen erzeugen, die PHB bis zu 40 % der Blatt-TM anreicherten, allerdings konnte die Akkumulation des Polyesters nur auf Kosten der Pflanzengesundheit erreicht werden. Die Pflanzen wiesen große Wachstumsstörungen auf und waren zu meist nicht fertil. Außerdem konnte bei einigen anderen Stoffwechselprodukten eine Mangelercheinung nachgewiesen werden z. B. bei organischen Säuren.

Die Produktion von PHB wurde auch auf andere transgene Pflanzen (Tabak, Mais, Baumwolle, Kartoffeln) ausgedehnt. Die Ergebnisse aus den Transformationsversuchen mit *A. thaliana* konnten bisher jedoch nicht auf andere Kulturarten übertragen werden (siehe Tabelle 1-2).

Vor dem Hintergrund eines stetig wachsenden Marktes für Biopolymere und der Möglichkeit einer kostengeringeren und großflächigen Herstellung von PHAs in transgenen Pflanzen erscheinen die Forschungen auf dem Gebiet der Polymerherstellung in Pflanzen trotz der bisherigen Ergebnisse weiterhin attraktiv. Neue Strategien richten sich außerdem auf Kulturarten, die eine Doppelnutzung der

Pflanzen zulassen und damit einen zusätzlichen positiven Einfluss auf die Preisentwicklung des isolierten Biopolymers haben.

Tabelle 1-2: Vergleich der Polyhydroxyalkanoat-Gehalte in einigen gentechnisch veränderten Pflanzen (TGW = Trockengewicht) (van Beilen und Poirier 2008)

Kulturart	Zell-kompartiment	Gewebe	Produziertes PHA	Gehalt PHA (% / TGW)	Literatur
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plastid	Spross	P(3HB) *	14 - 40	Nawrath <i>et al.</i> 1994; Bohmert <i>et al.</i> 2000a
	Zytoplasma	Spross	P(3HB)	0,1	Poirier <i>et al.</i> 1992b
	Plastid	Spross	P(3HB-3HV) **	1,6	Houmiel <i>et al.</i> 1999
Mais	Plastid	Spross	P(3HB)	6	Poirier und Gruys 2001
Baumwolle	Zytoplasma	Vaskuläre Bündel	P(3HB)	0,3	John und Keller 1996
Kartoffel	Plastid	Spross	P(3HB)	0,02	Bohmert <i>et al.</i> 2002
	Plastid	Spross	mclPHA ***	0,03	Romano <i>et al.</i> 2005
Tabak	Plastid	Spross	P(3HB)	< 1,7	Bohmert <i>et al.</i> 2002; Lösli <i>et al.</i> 2003

* Poly-(3-hydroxybutyrat)

** Poly-(3-hydroxybutyrat-3-hydroxyvalerat)

*** *medium chain length* Polyhydroxyalkanoate

Ein wesentlicher Bestandteil der Produktion von Biopolymeren in nachwachsenden Rohstoffen ist die Isolierung des Wertstoffes aus der entsprechenden Matrix. Für die Extraktion aus pflanzlichem Material gab es zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit keine ausführlichen Ergebnisse. Die Isolierung aus Bakterien wurde dagegen bereits ausführlich untersucht. Zum einen gibt es die Extraktion unter Verwendung von großen Mengen von Chloroform bzw. Dichlormethan. Diese Prozesse sind aufgrund der großen Lösungsmittelvorräte und erheblicher Investitionskosten für die Rückgewinnungsanlagen für die eingesetzten Extraktionsmittel nicht ökonomisch (Lee 1996). Auf der anderen Seite kann durch den Einsatz von Natriumhypochlorit ein Aufschluss der Zellbestandteile erreicht und damit die Abtrennung des PHB erleichtert werden. Die Produktion von PHB in Bakterien könnte dann zu einem Preis von 4,75 \$/kg realisiert werden (Divyashree *et al.* 2009). Im Vergleich dazu liegt der Preis für chemisch synthetisiertes Polypropylen unter 1 \$/kg. Durch die Verwendung von Abfallprodukten aus anderen Prozessströmen als Substrat bei der Fermentation der Bakterien, bspw. Glycerol aus der Produktion von Biodiesel, könnte der Endpreis für PHB aus Bakterien weiter gesenkt werden (Ibrahim und Steinbüchel 2009).

1.4 Chemische Synthese von Polyaspartat

Polyaspartat kann in der Systematik der Biokunststoffe in die Gruppe der ‚biologisch abbaubaren aus fossilen Rohstoffen‘ erzeugten Polymere eingeordnet werden (siehe Abbildung 1-5). In Anbetracht der Endlichkeit der fossilen Rohstoffe auf der Erde werden bereits seit einiger Zeit Anstrengungen unternommen, in der chemischen Industrie die Syntheseverleistungen aus der belebten Umwelt für komplexe und hochwertige genauso wie für einige Grundchemikalien besser zu nutzen. Für den Biokunststoff Polyaspartat wurde bisher kein natürlich vorkommendes Analogon gefunden. Allerdings konnte in Cyanobakterien bereits Ende des 19. Jahrhunderts eine Substanz identifiziert werden, die durch einfache chemische Reaktionen in Polyaspartat umgewandelt werden könnte. Dabei handelt es sich um Cyanophycin.

Das Biopolymer Cyanophycin besteht aus einem Polyaspartat-Rückgrat mit seitenverzweigten Argininresten (Simon 1971). Für die chemische Industrie ist das Polymer vor allem auf Grund der Polyaspartatkette von Bedeutung, denn die Eigenschaften entsprechen denen von anderen Polyestern, bspw. Polyacrylat. Allerdings weist Polyaspartat eine deutlich verbesserte biologische Abbaubarkeit im Gegensatz zu Polyacrylat auf (Freeman *et al.* 1994) und ist daher aus ökologischer Sicht den Polyacrylaten vorzuziehen. Im folgenden Kapitel sind sowohl die chemische Synthese als auch einige Anwendungsmöglichkeiten für Polyaspartat dargestellt.

Das zurzeit in der Industrie eingesetzte Polyaspartat (*engl.*: poly(aspartic acid) = PAA) ist ein chemisch synthetisiertes Polymer auf Basis fossiler Rohstoffe. Die Molmasse des chemischen Polymers liegt je nach Herstellungsprozess bei etwa 12 kDa (Kovacs *et al.* 1961). Das entspricht einem Polymerisationsgrad von ~100 Aspartatuntereinheiten. Zwei Reaktionen zur Bildung von Polyaspartat haben sich besonders heraus kristallisiert: zum einen die Polykondensation und zum anderen die thermische Polymerisation.

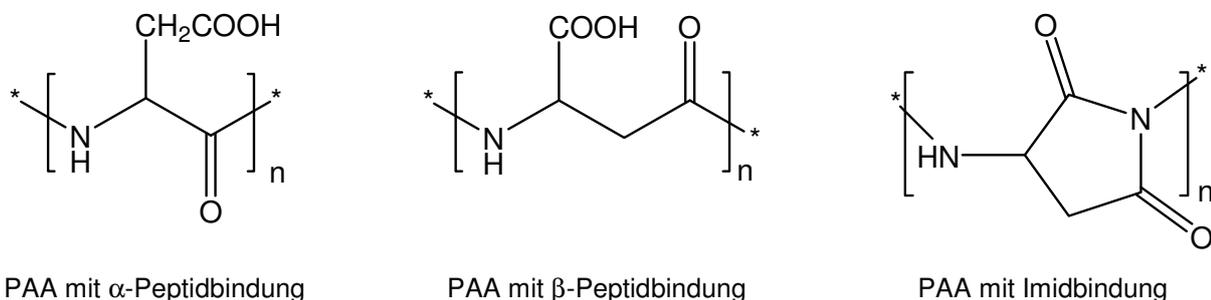


Abbildung 1-7: Darstellung der möglichen Peptidbindungen zwischen den Aspartatuntereinheiten bei der Polykondensation zu Polyaspartat (PAA) (Roweton *et al.* 1997)

Bei der Polykondensation von Aspartat zu PAA können aufgrund der dreifachen Funktionalität des Moleküls (zwei Carboxylgruppen und eine Aminogruppe)

verschiedene Peptidbindungen zwischen den Aspartateinheiten geknüpft werden (siehe Abbildung 1-7). Diese unterschiedlichen Peptidbindungen beeinflussen die Sekundärstruktur des entstehenden Polymers und damit die Eigenschaften maßgeblich. β -Polyasparaginsäure und α,β -Polyasparaginsäure (Polymer mit gemischten Peptidbindungen) sind beispielsweise gut in Wasser löslich. α -Polyasparaginsäure dagegen ist schlecht wasserlöslich (Kovacs *et al.* 1961).

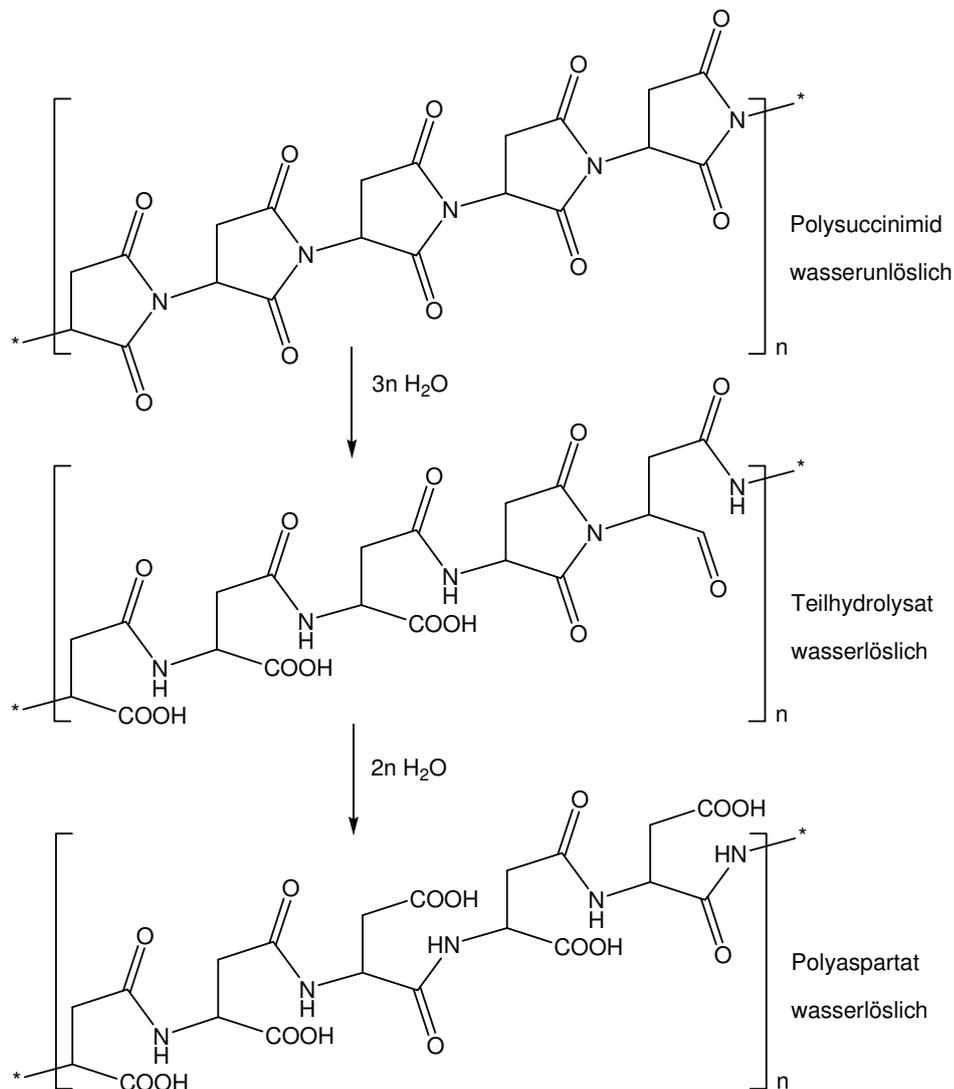


Abbildung 1-8: Stufenweise Hydrolyse von Polysuccinimid zum Polyaspartat (Klein *et al.* 2004)

Ein anderes Verfahren zur Herstellung von PAA ist die Polykondensation von α -Aminosäuren, die an einer Carboxylgruppe blockiert/geschützt worden sind und an der anderen für die Polymerisation aktiviert wurden (N-Carboxyanhydride) (Roweton *et al.* 1997). Des Weiteren kann die Herstellung von PAA durch mehrstündiges Erhitzen von Aspartat auf Temperaturen zwischen 220-270 °C erfolgen. Dieses Verfahren wird auch als Festphasenamidierung bezeichnet (Shogren *et al.* 2008). Das dabei entstehende Polysuccinimid wird anschließend durch Zugabe von

Natriumhydroxid zum Natriumsalz des Polyaspartats umgewandelt (siehe Abbildung 1-8). Die Molmasse des Polymers beträgt zwischen 2 und 3 kDa und entspricht einem Polymerisationsgrad von $n = 15-24$.

Ein großes Anwendungsgebiet für PAA ist die Wasserwirtschaft. Wie alle Polycarboxylate hat es eine hohe Affinität zu zweiwertigen Metallsalzen (Calcium und Magnesium), die für die Wasserhärte verantwortlichen sind. Durch Zusatz von PAA in Waschmitteln und Geschirrspülmitteln kann die Wasserhärte verringert werden, und der bekannte Kalküberzug auf den Heizstäben und Haushaltsgeräten kann verhindert werden (Klein *et al.* 2004). Im Gegensatz zu Polymeren aus Acrylsäure besitzt PAA den entscheidenden Vorteil der besseren biologischen Abbaubarkeit und damit höheren Umweltverträglichkeit. Dafür ist in erster Linie die Linearität des Polyaminosäure-Rückgrats verantwortlich (Freeman *et al.* 1994).

Ausgehend von PAA können außerdem so genannte Superabsorbermaterialien und Hydrogele hergestellt werden, die ein Vielfaches ihrer Masse an Wasser aufnehmen können (Donachy und Sikes 1993; Nagatomo *et al.* 1995; Chang und Swift 1999). In Verbindung mit Polyethylenglycol als Copolymer kann Polyaspartat auch als *drug delivery* System in der Medizin genutzt werden (Yokoyama *et al.* 1990). Des Weiteren dient PAA als Dispergiermittel bei der Herstellung von Papier und Wandfarben.

1.5 Cyanophycin – Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten

In diesem Kapitel wird auf die besonderen Eigenschaften von Cyanophycin eingegangen, die bei der Isolierung des Biopolymers aus rekombinanten Organismen (sowohl Bakterien als auch Pflanzen) eine wichtige Rolle spielen. Des Weiteren wird auf die Verwendungsmöglichkeiten von Cyanophycin und seiner Zersetzungsprodukte hingewiesen.

Cyanophycin gehört zur Klasse der Polyaminosäuren. Davon sind neben Cyanophycin bisher nur zwei weitere bekannt, die in Mikroorganismen gebildet werden: Poly-(ϵ -L-Lysin) und Poly-(γ -Glutaminsäure) (Allen *et al.* 2005). Die Polyaminosäuren unterscheiden sich in wesentlichen Punkten von Proteinen, so genannten Co-Polyaminosäuren. Im Gegensatz zu Proteinen bestehen sie meistens aus nur einer einzigen Aminosäure (Ausnahme: Cyanophycin besteht aus zwei Aminosäuren, siehe Abbildung 1-9) und die Synthese dieser Moleküle wird durch Enzyme aus der Klasse der Kohlenstoff-Stickstoff bindenden Enzyme ausgeführt (z.B: Peptid-synthetasen; EC 6.3.2.-). Die Synthese ist daher unabhängig von der ribosomalen Proteinsynthese (Oppermann-Sanio und Steinbüchel 2002; Obst und Steinbüchel 2004).

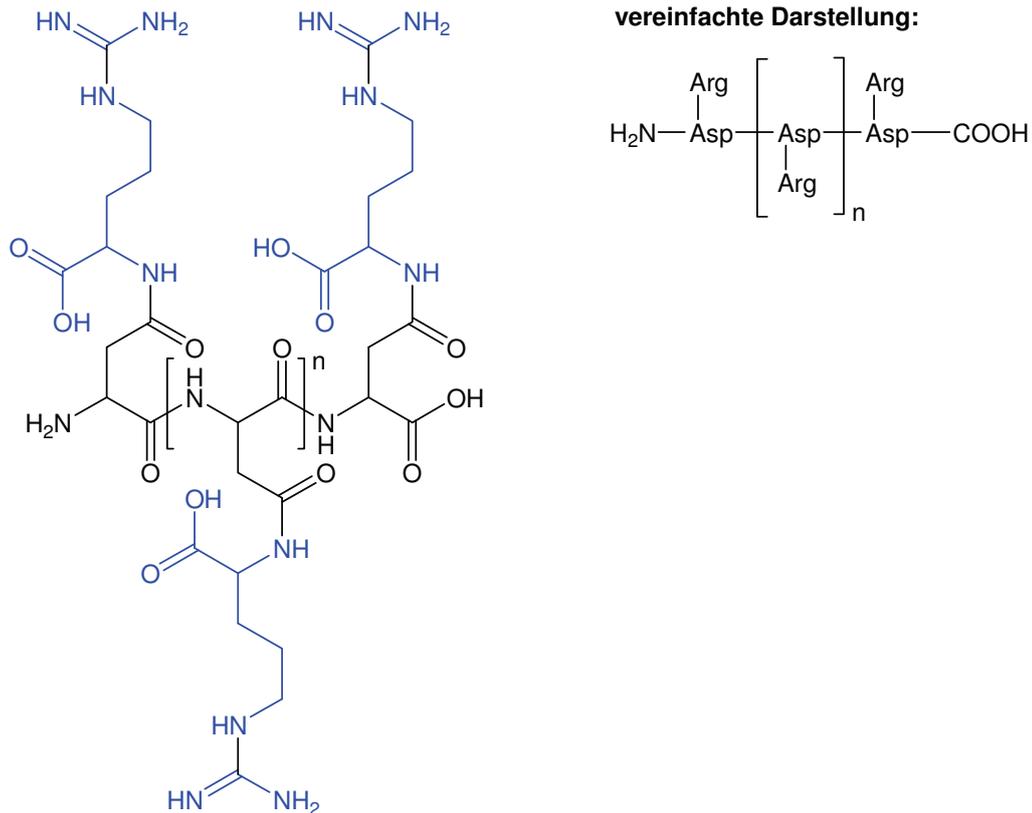


Abbildung 1-9: Struktur von Cyanophycin (schwarz: Aspartatgrundgerüst, blau: Arginin Seitenreste)

Eine weitere gemeinsame Eigenschaft aller Polyaminosäuren ist ihre Polydispersität. Im Gegensatz dazu sind Proteine aufgrund ihrer Bildungsweise monodispers und haben eine definierte Molmasse. Cyanophycin aus Cyanobakterien kommt in einem Molmassenbereich zwischen 25 und 100 kDa vor. Das aus rekombinanten Bakterien und transgenen Pflanzen isolierte Polymer hat dagegen eine sehr viel kleinere Molmasse und einen geringeren Verteilungsbereich. Bakteriell isoliertes Cyanophycin aus *E. coli* hat eine Molmasse zwischen 25 und 35 kDa. In Pflanzen dagegen schwankt die Molmasse zwischen 18 und 25 kDa (Simon 1976; Ziegler *et al.* 1998; Aboulmagd *et al.* 2001).

Cyanophycin wurde erstmals 1887 in Cyanobakterien entdeckt (Borzi 1887). Dort fungiert es als Stickstoff- und Energiespeicherquelle und wird in so genannten Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) im Cytoplasma eingelagert (Allen *et al.* 2005). Die Bildung beziehungsweise der Abbau der Polyaminosäure wird durch die Enzyme Cyanophycin-Synthetase (CphA) und Cyanophycinase (CphB) bestimmt (Ziegler *et al.* 1998; Oppermann-Sanio und Steinbüchel 2002). Das Biopolymer Cyanophycin ist nur aus zwei Aminosäuren aufgebaut, wovon Aspartat das Grundgerüst bildet und Arginin als zweite Aminosäure über β -Carboxylgruppen an die α -Aminofunktion der Aspartateinheiten angeknüpft ist (siehe Abbildung 1-9) (Oppermann-Sanio und Steinbüchel 2003; Luscher *et al.* 2005).

Das Grundgerüst des Cyanophycins, die Polyaspartatkette, ist für viele industrielle Anwendungen interessant. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts begann Schiff mit der Polymerisierung von Asparaginsäure (Schiff 1897). Seine Arbeiten wurden von verschiedenen Wissenschaftlern in der Mitte des 20. Jahrhunderts wieder aufgegriffen (Vegotsky *et al.* 1958; Harada 1959; Kovacs *et al.* 1961). Ihr Ziel war die Erzeugung von proteinogenen Strukturen unter präbiotischen¹ Bedingungen (Bildung von Biopolymeren auf chemischem Weg ohne Anwendung von biologisch aktiven Systemen/Enzymen), da man festgestellt hatte, dass polyanionische Proteine, die reich an Asparaginsäure waren, die Aggregation und das Wachstum von Kristallen beeinflussen können. Man ging davon aus, dass Polyaspartat dazu dienen könnte, die Wasserhärte herabzusetzen, indem es alkalische Carbonate, Sulfate und auch Phosphate zum Sedimentieren/Ausfällen bringt. Mittlerweile wird Polyaspartat daher als Waschmittelzusatz verwendet.

Polyaspartat ist zudem ein vielversprechendes neues Polymer, welches neben den gebräuchlichen polycarboxylierten Homo- und Copolymeren eine verbesserte Bioabbaubarkeit besitzt (Schwamborn und Joentgen 1998; Tabata *et al.* 2000). Weitere Anwendungen von Polyaspartat sind auf dem Gebiet der Biomedizin denkbar. Hierzu gibt es erste Studien, bei denen das Polymer als Träger für Medikamente eingesetzt werden kann oder sich die spezifischen Eigenschaften, wie Micellenbildung, in der Krebsforschung ausnutzen lassen (Pratesi *et al.* 1985; Yokoyama *et al.* 1990; Leopold und Friend 1995).

Neben den bereits aufgezählten Verwendungsmöglichkeiten für Polyaspartat (Kapitel 1.4) sind in Abbildung 1-10 weitere Anwendungsbeispiele bzw. Folgeprodukte ausgehend von den Spaltungsprodukten des Cyanophycins dargestellt. Die Aminosäuren Aspartat und Arginin können sowohl direkt in der Lebensmitteltechnik eingesetzt oder auch als Ausgangspunkt für die Synthesen von weiteren Chemikalien genutzt werden. Das bei der Hydrolyse von Cyanophycin zu Polyaspartat frei werdende Arginin kann unter Abspaltung von Harnstoff zu Ornithin umgewandelt werden. Diese Aminosäure kann ihrerseits über einige Umwandlungsschritte für die Polymerisation von Nylon verwendet werden (van Beilen und Poirier 2008). Aspartat auf der anderen Seite kann bspw. zu 3-Aminotetrahydrofuran und 2-Amino-1,4-butandiol umgesetzt werden. Diese Verbindungen sind für vielfältige Anwendungen in der Polymerchemie einsetzbar (van Beilen und Poirier 2008). Acrylamid kann als Verdickungsmittel bei der Farbherstellung bzw. in der Papierindustrie verwendet werden und Fumarsäure ist eine Ausgangssubstanz bei der Herstellung von ungesättigten Polyesterharzen (Ehrenstein 2006).

¹ Die in diesem Zusammenhang gebrauchte Formulierung „präbiotisch“ unterscheidet sich von der in der Lebensmitteltechnik verwendeten Bezeichnung.

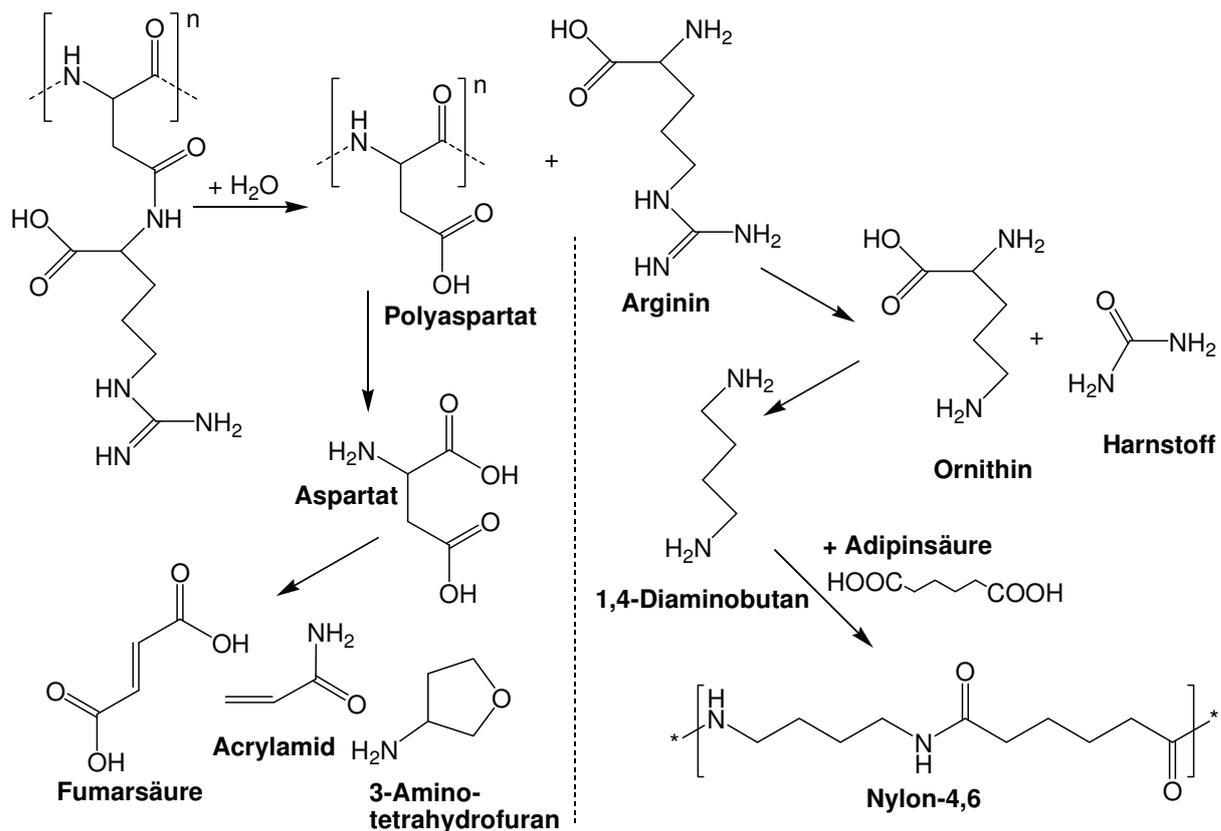


Abbildung 1-10: Verarbeitung von Cyanophycin zu möglichen Folgeprodukten (van Beilen und Poirier 2008)

1.6 Produktion von Cyanophycin in transgenen Pflanzen

Die Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten für Polyaspartat macht das natürliche Polymer Cyanophycin zu einem interessanten Forschungsgebiet. Seit der Anwendung der Gentechnik gab es verschiedene Ansätze, Cyanophycin als Vorstufe von Polyaspartat in großem Maßstab von Bakterien und Hefen produzieren zu lassen (Richter *et al.* 1999; Aboulmagd *et al.* 2001; Frey *et al.* 2002; Ziegler *et al.* 2002a; Steinle *et al.* 2008). Das isolierte Cyanophycin kann anschließend unter milden Hydrolysebedingungen in Argininreste und Polyaspartat gespalten werden (Joentgen *et al.* 1998; Wohlleben *et al.* 1999; Ziegler *et al.* 2002b; Ziegler *et al.* 2003), und diese Verbindungen können somit weiteren Reaktionen und Anwendungen zugeführt werden (siehe Kapitel 1.5, Abbildung 1-10).

Neben der Produktion von Cyanophycin in rekombinanten Bakterienstämmen kann das Biopolymer auch in transgenen Pflanzen akkumuliert werden. Die Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen (Pflanzen) zur Produktion von Cyanophycin ist aus vielen bereits genannten Gründen besonders ökonomisch (siehe Kapitel 1.2). Die Infrastrukturen für den Anbau, die Ernte und die Verarbeitung der Pflanzen sind

1 EINLEITUNG

bereits etabliert und bedürfen keiner kostenintensiven Investitionen. Besonders interessant ist die Speicherung des Polymers in Pflanzen, die einer Doppelnutzung zugeführt werden können (z. B. Kartoffeln). Dadurch wird ein möglicher Preis des Produktes zusätzlich positiv beeinflusst. Bei der Produktion von Cyanophycin in industriellen Stärkekartoffeln kann eine zusätzliche Wertschöpfung innerhalb der normalen Prozesskette für die Isolierung von Stärke aus den Kartoffelknollen erzielt werden (siehe Tabelle 1-3). Bei einem Ertrag von 30 t Kartoffelknollen pro Hektar und einem Gehalt von 5 % Cyanophycin zur Trockenmasse der Knollen könnte ein Gewinn von über 8.000 € erzielt werden.

Tabelle 1-3: Berechnung des möglichen Gewinns bei der Stärkeisolierung durch die zusätzliche Isolierung von Polyaspartat und Arginin aus Cyanophycin produzierenden Kartoffeln (Serr *et al.* 2007)

	Anteil/Tonne in kg	Preis/kg in €	Preis/Tonne Restprotein in €
Trockenmasse	250,00		
Cyanophycin *	12,50		
Polyaspartat	6,25	3,50 €	~ 22,00 €
Arginin	6,25	89,00 €	~ 556,00 €
Isolierungskosten des Polymers			100,00 €
Aufarbeitung			200,00 €
Gewinn			~ 278,00 €
Gewinn/ha (bei 30 t Ertrag/ha)			8.340,00 €
Derzeitiger Gewinn/ha aus der Stärkeproduktion			5.000,00 €

* Unter der Annahme, das Cyanophycin 5 % der Trockenmasse darstellt.

In dem Verbundprojekt „*Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffelknollen*“ im BML-Förderschwerpunkt ‚Nachwachsende Rohstoffe‘ wurden von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Broer (Universität Rostock) bereits verschiedene Pflanzen (Tabak und Kartoffel) gentechnisch so modifiziert, dass sie in der Lage sind Cyanophycin zu produzieren (FKZ 22009202 2007, FKZ 22012606 2009). In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen entwickelten transgenen Konstrukte, die für die Isolierungsversuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, dargestellt und erläutert.

In den ersten transgenen Cyanophycin produzierenden Pflanzen wurde das Gen für die Cyanophycin-Synthetase (*cphA*) unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors exprimiert und in Tabak- und Kartoffelpflanzen eingebracht (Neumann *et al.* 2005). Die Bildung des Biopolymers erfolgte konstitutiv cytoplasmatisch (siehe Abbildung 1-11). Sie ist somit nicht auf ein bestimmtes Kompartiment (beispielsweise Blatt oder

Wurzel) beschränkt. Die transgenen Tabakpflanzen zeigten verringerte Wachstumsraten und hatten einen veränderten Phänotyp, der sich in panaschierten Blättern und frühzeitiger Blühinduktion äußerte. In den Pflanzen konnte erstmals neben der wasserunlöslichen eine in Wasser lösliche Form des Polymers nachgewiesen werden. Die Charakterisierung mit SDS-Gelen zeigte eine verringerte Größe des Polymers im Vergleich zu dem bakteriellen Cyanophycin (in Cyanobakterien 25-125 kDa; in *E. coli* 25-35 kDa). Der Polymerisationsgrad bei dieser Molekülgröße entspricht etwa 125 Einheiten und die Zusammensetzung des Biopolymers konnte wie folgt bestimmt werden: Aspartat : Arginin : Lysin im Verhältnis 1 : 1,05 : 0,1. Der maximale Cyanophycingehalt in den Blättern betrug 1,1 % bezogen auf die Trockenmasse der Blätter (Zusammenfassung siehe Tabelle 1-4).

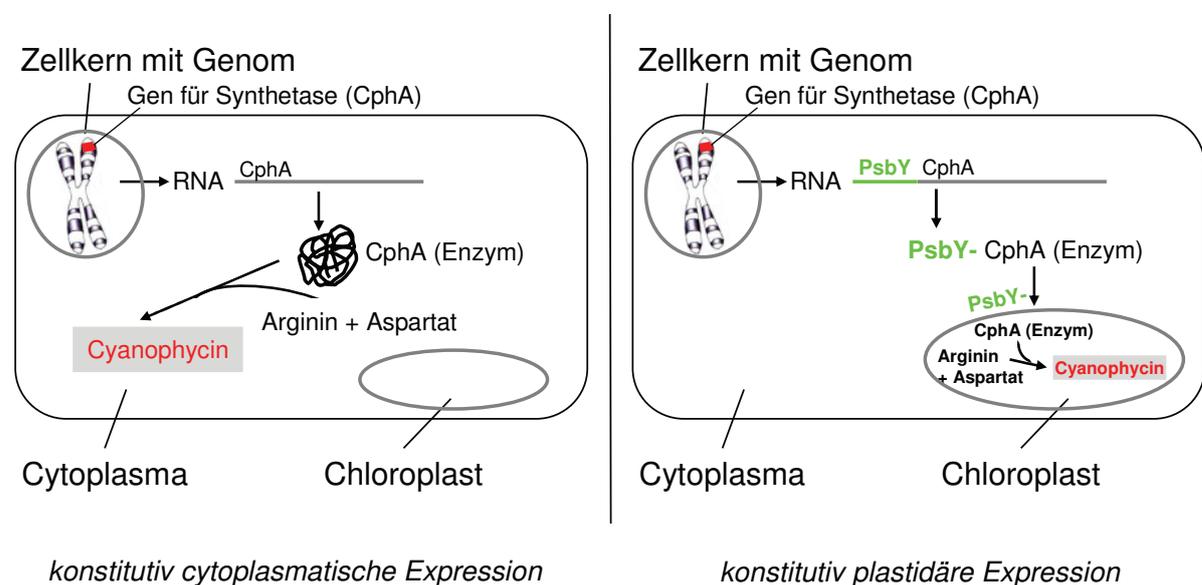


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung einer pflanzlichen Zelle und der Bildung und Speicherung von Cyanophycin in Abhängigkeit von der Expression der Synthetase

Um die Cyanophycinproduktion in wirtschaftlich relevanten Mengen und Ressourcen schonend zu ermöglichen, sollte es als Nebenprodukt zur Stärke in Kartoffelknollen produziert werden. Das Genkonstrukt ($cphA_{Te}$) wurde daher auch in Kartoffelpflanzen eingebracht. Anschließend konnte in diesen Pflanzen sowohl in den Blättern als auch in den Knollen die Bildung von Cyanophycin nachgewiesen werden. Der Gehalt des Biopolymers betrug maximal 0,2 % der Trockenmasse und es wurden ebenfalls beide Formen des Polymers gefunden (Neumann *et al.* 2005) (Zusammenfassung siehe Tabelle 1-4).

Unter Einbeziehung der Endosymbiontentheorie, die davon ausgeht, dass die Bildung der Chloroplasten in den Pflanzenzellen durch die Aufnahme von Einzellern (Prokaryoten wie Cyanobakterien) in die eukaryotischen Zellen stattgefunden hat, soll die Cyanophycin-Synthese ausschließlich in den Plastiden erfolgen. Dort sollte

1 EINLEITUNG

die Produktion des Polymers mit geringeren Stresssymptomen bei den Pflanzen einhergehen und dadurch eventuell auch die Produktions- und Speicherrate des Polymers erhöht werden können. Über ein Transitpeptid (PsbY, FNR, CP24 bzw. Rieske) sollte die Synthetase in die Plastiden transportiert werden und die Produktion und Speicherung des Biopolymers ebenfalls in den Plastiden erfolgen. Nur das Genkonstrukt PsbY-*cphA*_{Te} führt zu einer konstitutiv plastidären Expression der Synthetase (siehe Abbildung 1-11). Die Tabakpflanzen mit diesem Konstrukt zeigen im Gegensatz zu den vorherigen transgenen Pflanzen keine phänotypischen Veränderungen. Der Gehalt an Cyanophycin konnte außerdem bis auf 1,7 % der Trockenmasse gesteigert werden, und es wurde nur die in Wasser unlösliche Form des Polymers gebildet. In den Folgegenerationen konnte der Gehalt bis auf 6,8 % der Trockenmasse gesteigert werden. Allerdings wurden bei diesen Pflanzen verdickte Blätter und eine verringerte Samenproduktion beobachtet (Hühns *et al.* 2008) (Zusammenfassung siehe Tabelle 1-4).

Tabelle 1-4: Zusammenfassung der phänotypischen Veränderungen und Cyanophycingehalte in transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen mit unterschiedlichen Konstrukten (TM = Trockenmasse; n.d. = nicht detektierbar)

Kulturart	Event	Phänotypische Veränderungen		Cyanophycininform in Wasser		max. Cyanophycingehalt (%/TM)
		Spross	Knolle	löslich	unlöslich	
Tabak	35S- <i>cphA</i> _{Te} *	verringerte Wachstumsrate, frühzeitige Blühinduktion	---	ja	ja	1,1
	PsbY- <i>cphA</i> _{Te} ** T0 (Event 51-x)	---	---	n.d.	ja	1,7
		T1	Verdickte Blätter und Blattadern,	---	ja ^a	ja
	(Event 51-3-x)	T2	verringerte Wachstumsrate		ja ^a	ja
Kartoffel	35S- <i>cphA</i> _{Te} *	panaschierte Blätter und verringerte Wachstumsrate	teilweise fehlende Augenbildung (keine Keimung möglich)	ja	ja	0,2
	B33-PsbY- <i>cphA</i> _{Te} ***	normaler Phänotyp	normale Knollen und Knollen mit eingesunkenen braunen Stellen	ja ^a	ja	7,5

* Neumann *et al.* 2005; ** Hühns *et al.* 2008, *** Hühns *et al.* 2009

^a Gehalt an wasserlöslichem Cyanophycin < 0,5 %/TM

Im Fall der Kartoffeln wurde zusätzlich zu der konstitutiv plastidären Expression des Cyanophycins die Speicherung des Polymers ausschließlich in den Plastiden der Knollen (Amyloplasten) angestrebt. Denn nur die Knollen werden industriell verarbeitet, das Kartoffelkraut wird vor der Ernte abgespritzt² und verworfen. Die Cyanophycin-Synthetase wurde dafür mit dem PsbY-Transitpeptid unter Kontrolle des knollenspezifischen B33-Promotors (Rocha-Sosa *et al.* 1989) fusioniert. Die resultierenden Pflanzen wurden mit B33-PsbY-*cphA*_{Te} bezeichnet (Hühns *et al.* 2009). Der Phänotyp der B33-PsbY-*cphA*_{Te} Kartoffelpflanzen war unverändert gegenüber den Kontrollpflanzen. Die Pflanzen bildeten Knollen von normaler Größe und nur einige wiesen eingesunkene braune Stellen auf. Es kam insgesamt zu einer leichten Reduktion des Knollenertrages. Die Knollen akkumulierten das Biopolymer durchschnittlich bis zu 3,8 % ihrer Trockenmasse (37,6 mg/g) (Hühns *et al.* 2009) (Zusammenfassung siehe Tabelle 1-4).

1.7 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Verbundprojektes „*Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffelknollen*“ im BML-Förderschwerpunkt ‚Nachwachsende Rohstoffe‘ durchgeführt. Ziel des Projektes war es neben der Optimierung der Polymergehalte in gentechnisch veränderten Kartoffeln (AG Broer, Universität Rostock), eine Methode zur Isolierung des Biopolymers aus dem Pflanzenmaterial zu entwickeln (AG Kragl, Universität Rostock). Dabei handelt es sich um das ursprünglich aus Cyanobakterien stammende Biopolymer Cyanophycin. In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung dieser Isolierungsmethode beschrieben. Für die Entwicklung des Isolierungsprozesses wurden sowohl transgene Tabak- als auch Kartoffelpflanzen verwendet, wobei der Schwerpunkt auf der Extraktion aus Kartoffelknollen lag.

Eine große Hürde bei der Etablierung von biotechnologischen Verfahren sind die Kosten für Entwicklungsarbeit und die Investitionen für neue Produktionsanlagen (Festel *et al.* 2004). Die Kosten für das zu entwickelnde Verfahren sollten möglichst gering ausfallen, um den Preis für das isolierte Produkt so gering wie möglich zu halten und somit die Konkurrenzfähigkeit zu bereits bestehenden chemisch synthetisierten Produkten zu sichern. Eine Möglichkeit dafür sollte die Verknüpfung des Isolierungsprozesses mit einem bereits bestehenden großtechnischen Prozess sein. Bei gentechnisch veränderten Kartoffeln könnte somit die Kartoffel weiterhin industriell genutzt werden, und die Investitionskosten für eine Prozessneugestaltung wären relativ gering. Im Laufe der Arbeit sollten verschiedene Möglichkeiten zur

² Das Kartoffelkraut wird vor der Ernte entfernt, damit es sich nicht beim Roden (Ernten) der Kartoffeln in den Erntemaschinen verfängt. Das Abspritzen des Krautes erfolgt mit einem bestimmten Pflanzenschutzmittel, das das Kraut absterben lässt.

Kopplung eines Isolierungsprozesses mit einem bereits vorhandenen großtechnischen Prozess getestet und die Vor- und Nachteile betrachtet werden.

Für den eigentlichen Isolierungsprozess sollte im Labor eine vereinfachte Methode etabliert werden, anhand derer die verschiedenen Aspekte des Verfahrens optimiert werden könnten. Dabei waren sowohl die Fragestellung zur Wahl des Extraktionsmittels, als auch die Betrachtung der Abscheidung aus der Extraktionslösung und die Aufreinigung des erhaltenen Produktes von Interesse. Im Anschluss an die Isolierung des Biopolymers sollte ein besonderes Augenmerk auf die Ermittlung der Reinheit des Isolates gelegt werden. Die wichtigsten Arbeitspakete im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind im Fließschema in Abbildung 1-12 zusammengefasst.

Isolierung eines Biopolymers aus pflanzlicher Matrix

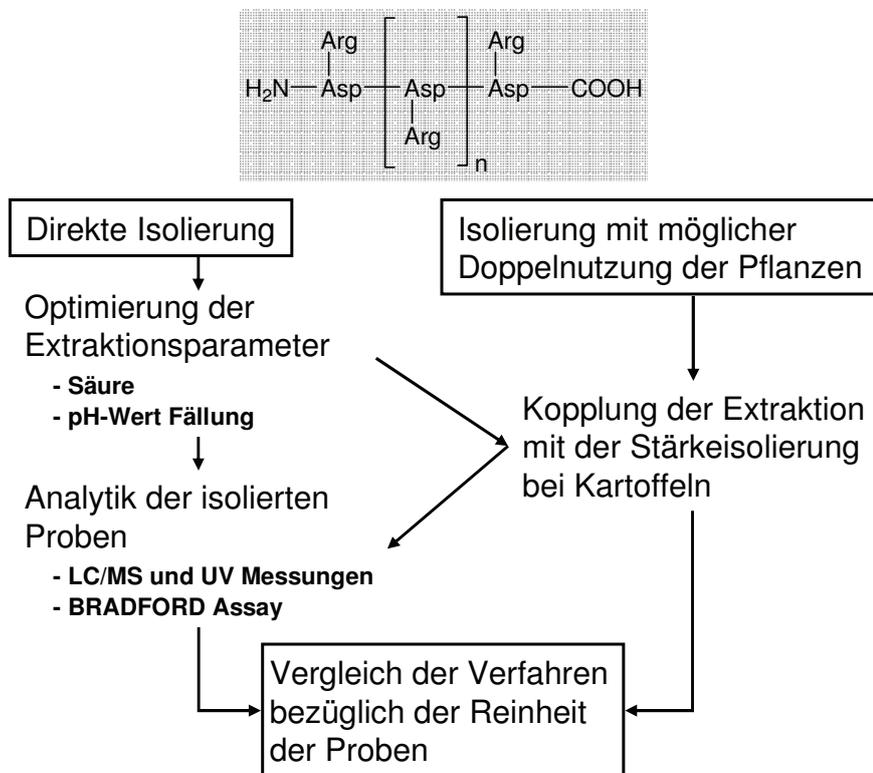


Abbildung 1-12: Fließschema für die Hauptarbeitsgebiete, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten.

2 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse für die Isolationsversuche von Cyanophycin aus transgenem Pflanzenmaterial dargestellt. Es wird dabei unter anderem auf die Isolierung aus gentechnisch verändertem Tabak eingegangen (siehe Kapitel 2.1.1) und die verschiedenen Methoden erläutert, die zur Bestimmung der Reinheit der extrahierten Cyanophycinproben angewendet worden sind (siehe Kapitel 2.2).

Anschließend werden die Daten aus den Versuchen mit transgenem Kartoffelmaterial beschrieben (siehe Kapitel 2.3). Dabei wird das Augenmerk vor allem auf die Optimierung der Isolationsparameter gelenkt und zum Abschluss eine weitere Methode zur Isolierung von Cyanophycin aus transgenen Kartoffelknollen dargestellt (siehe Kapitel 2.5).

Zusätzlich zu der Entwicklung eines Isolierungsverfahrens für Cyanophycin aus der pflanzlichen Matrix wurde der Gesamtstickstoffgehalt der Cyanophycin produzierenden Linien im Vergleich zu isogenem Tabak- und Kartoffelmaterial untersucht (siehe Kapitel 2.6).

2.1 Extraktion von Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix

Im Vorfeld der eigentlichen Extraktion von Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix wurde ein Versuch zur Bestimmung der Acidität des pflanzlichen Zellmilieus nach Balasubramaniam *et al.* (2003) durchgeführt. Dieser Versuch ergab für die lyophilisierten Tabakblätter, dass die zur Extraktion verwendeten Pufferlösungen einer pH-Wert Verschiebung unterliegen, begründet durch den schwach sauren Charakter der pflanzlichen Matrix selbst (siehe Abbildung 2-12).

Durch die Extraktion einiger pflanzlicher Inhaltsstoffe in die entsprechenden Pufferlösungen verändert sich der pH-Wert des Extraktionsmittels. Für die Isolierung von Cyanophycin ist allerdings ein konstanter pH-Wert kleiner 2 erforderlich, andernfalls kann das Polymer bei der Extraktion nicht in Lösung gebracht werden. Daher wurde das Pflanzenmaterial vor der eigentlichen Extraktion mit 0,1 %iger Natriumhydrogensulfidlösung extrahiert.

Weiterhin ist für die Extraktion von Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix die Löslichkeit des Polymers in verschiedenen Lösungsmitteln von Bedeutung. Die ersten Versuche dazu stammen bereits aus den frühen siebziger Jahren (Simon 1971; Lang *et al.* 1972). In Tabelle 2-1 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammenfassend dargestellt. Wie bereits zuvor erwähnt, ist das Biopolymer nur in stark sauren bzw. basischen Medien oder bei hohen Salzkonzentrationen löslich. Die gängigen organischen Lösungsmittel wie Methanol, DMSO oder Aceton sind für eine Extraktion nicht geeignet.

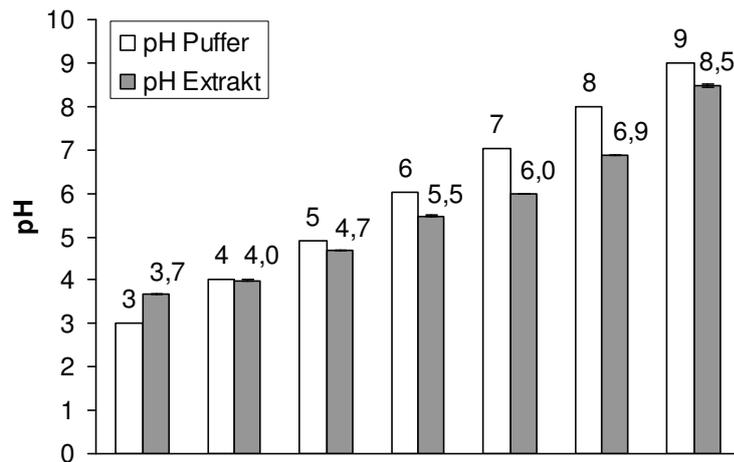


Abbildung 2-1: Veränderung des pH-Wertes von Pufferlösungen nach der Extraktion von gefriergetrocknetem Tabakmaterial PsbY-*cphA*_{Te} Event 51-3 (weiße Balken: eingestellter pH-Wert vor der Extraktion; graue Balken: gemessener pH-Wert nach der Extraktion)

Die Ergebnisse dieser Vorbetrachtungen ergeben für alle nachfolgenden Isolierungsversuche des Cyanophycin aus gentechnisch verändertem Pflanzenmaterial, dass zuerst eine Extraktion mit Natriumhydrogensulfidlösung durchgeführt werden sollte, um einige Substanzen bereits vorab abzutrennen, die den eigentlichen Extraktionsprozess des Biopolymers negativ beeinflussen würden. Die Extraktion des Polymers erfolgt anschließend mit Hilfe verdünnter Säure (pH-Wert < 2).

Tabelle 2-1: Darstellung der Löslichkeit von Cyanophycin in einigen ausgewählten Lösungsmitteln. „+“ Cyanophycin ist löslich, „-“ Cyanophycin ist nicht löslich (Simon 1971)

Lösungsmittel	Löslichkeit von Cyanophycin
destilliertes Wasser	-
0,05 N Salzsäure (HCl)	+
3,0 N Natriumhydroxidlösung (NaOH)	+
0,5 % Glycerin	-
0,01 M EDTA-Lösung	-
Methanol	-
Ethylenglycol	-
Dimethylsulfoxid (DMSO)	-
Formaldehyd	-
1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)	+
2 % Triton X-100	-
4,0 M Harnstofflösung	+
Cäsiumchloridlösung ($\rho = 1,4 \text{ kg/L}$)	+

2.1.1 Saure Extraktion von Cyanophycin aus transgenem Tabakmaterial

Die ersten Transformationsversuche mit Pflanzen zur Bildung von Cyanophycin wurden an Tabak durchgeführt. Das Biopolymer konnte sich in den Pflanzen mit dem Konstrukt *PsbY-cphA_{Te}* in allen Teilen der Tabakpflanze anreichern.

Die Isolierungsversuche wurden ausschließlich mit lyophilisierten Tabakblättern der Pflanzen *PsbY-cphA_{Te}* Event 51-3 durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Löslichkeitseigenschaften des Biopolymers wurde das Pflanzenmaterial zunächst mit Natriumhydrogensulfidlösung zur Rehydrierung und Vorextraktion behandelt und anschließend mit einer salzsauren Lösung extrahiert. Aus der sauren Lösung wurde das Biopolymer durch Zugabe von Natriumhydroxid wieder ausgefällt und der Niederschlag mit Hilfe einer Zentrifuge abgetrennt. Der erhaltene Niederschlag wurde anschließend mittels einer SpeedVac Anlage im Vakuum getrocknet.

Bei den ersten Versuchen variierte das mit Natriumhydroxid ausgefällte Polymer in seiner Farbe von hell bis dunkelgrau und das resultierende getrocknete Cyanophycin war stark gefärbt. Daraufhin wurden vor der abschließenden Trocknung einige Waschgänge mit Wasser und Aceton durchgeführt, um mitausgefällte Störsubstanzen, sowie eventuelle Salzurückstände (bedingt durch die Fällung) zu entfernen. Die acetonhaltigen Waschlösungen wiesen eine starke Grünfärbung auf, was auf Chlorophyll als eine Störsubstanz hinweist.

Aus den Versuchen mit dem Tabakmaterial lässt sich in Anlehnung an die Isolierungsmethode nach Frey *et al.* (2002) das in Abbildung 2-2 dargestellte Schema für die Extraktion von Cyanophycin aus einer pflanzlichen Matrix ableiten.

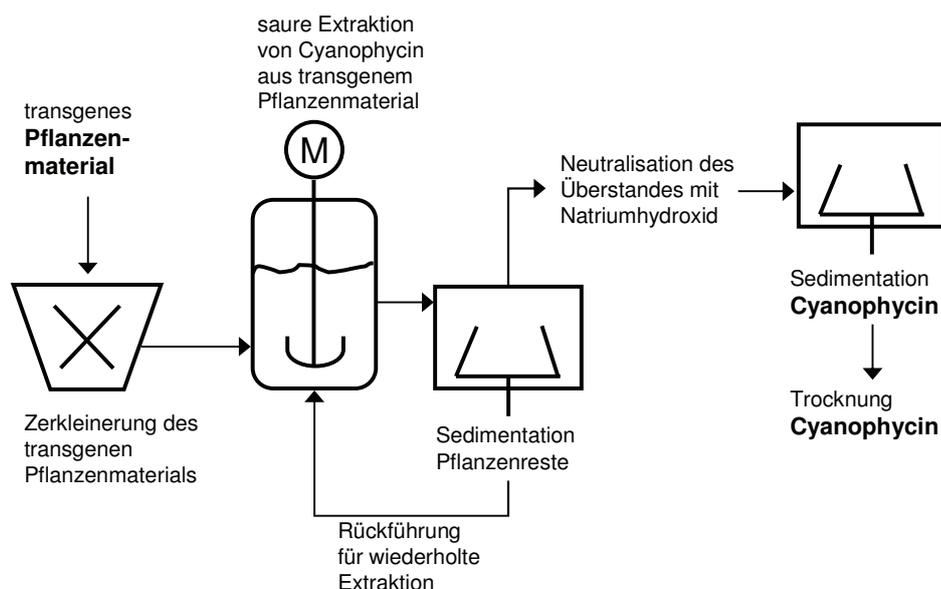


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der sauren Extraktion von Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix

2 ERGEBNISSE

Um die Qualität der Extraktion von Cyanophycin aus Tabakblättern zu analysieren, wurden mehrere Extraktionen desselben Materials nacheinander durchgeführt. Der ausgefällte Niederschlag wurde getrocknet und anschließend gewogen. Die Ausbeute an Cyanophycin wurde in mg/g Trockenmasse (TM) angegeben. In Abbildung 2-3 ist das Ergebnis von sechs aufeinander folgenden Extraktionen dargestellt, wobei mit dem 1. Extraktionszyklus die Vorextraktion mit Natriumhydrogensulfit gemeint ist.

Der Versuch wurde als siebenfacher Ansatz durchgeführt. Die Standardabweichung zwischen den einzelnen Versuchen ist bestimmt worden und ebenfalls im Diagramm dargestellt. Die Abweichungen in den Ergebnissen sind relativ hoch (teilweise $\pm 50\%$) und können nur durch uneinheitliches Probenmaterial und die natürlichen Schwankungen in der Expressionsrate des Polymers in einzelnen Tabakblättern erklärt werden. Erst nach dem 4. Extraktionsschritt mit salzsaurer Lösung sind etwa 80 % des gesamten Cyanophycins extrahiert worden. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Frey *et al.* (2002), bei denen bereits im ersten Extraktionsschritt mit Salzsäure über 69 % des gesamten Cyanophycins extrahiert werden konnten. Die Unterschiede zu diesen Ergebnissen können in den verschiedenen Materialien für die Cyanophycinisolierung liegen. Bei Frey *et al.* (2002) handelt es sich um bakterielle Zellen, wohingegen in dieser Arbeit nur pflanzliche Proben untersucht wurden. In Pflanzen ist der Stoffwechsel viel komplexer und es entstehen zusätzliche Substanzen, die bei der Extraktion störend wirken oder gar mitextrahiert werden können.

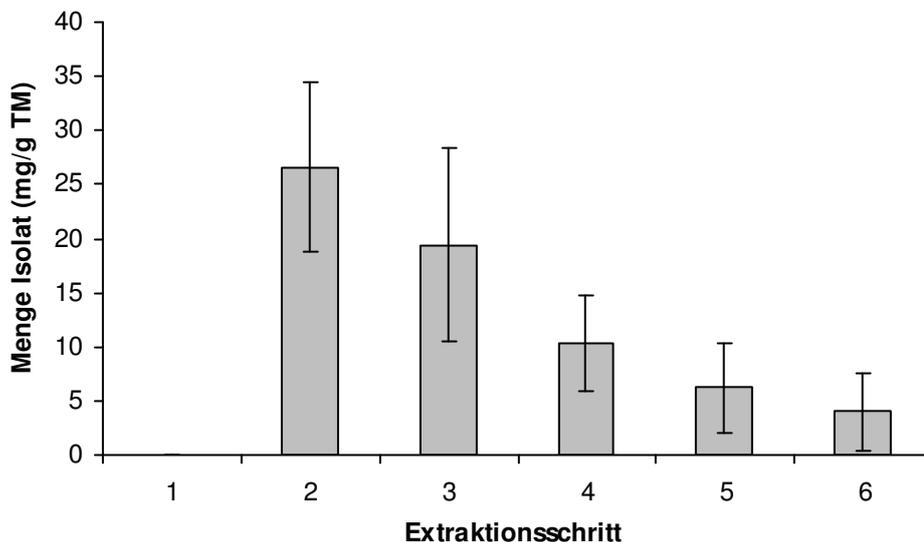


Abbildung 2-3: Mehrfachextraktion von Tabaklyophilisat (PsbY-*cphA*_{Te} Event 51-3) - 1. Extraktionsschritt mit Natriumhydrogensulfitlösung nur zur Rehydrierung und Vorextraktion (Menge Isolat durch auswiegen der getrockneten Proben bestimmt)

Im Anschluss an die Bestimmung der Ausbeute wurden die isolierten Cyanophycinproben mit verschiedenen Methoden auf ihre Reinheit untersucht. Diese

Methoden werden im folgenden Kapitel einzeln betrachtet, und die Ergebnisse für die isolierten Cyanophycinproben werden dargestellt.

2.2 Bestimmung der Reinheit der isolierten Cyanophycinproben

Für eine kommerzielle Anwendung eines isolierten Produktes aus Naturstoffen ist die Bestimmung der Reinheit unerlässlich. Je nach Art der Anwendung (pharmazeutisch, biologisch oder großtechnisch) werden an das Produkt unterschiedliche Anforderungen in Bezug auf die Reinheit gestellt. In jedem Fall müssen durch eine geeignete Form der Analytik der Prozess sowie das Endprodukt charakterisiert werden.

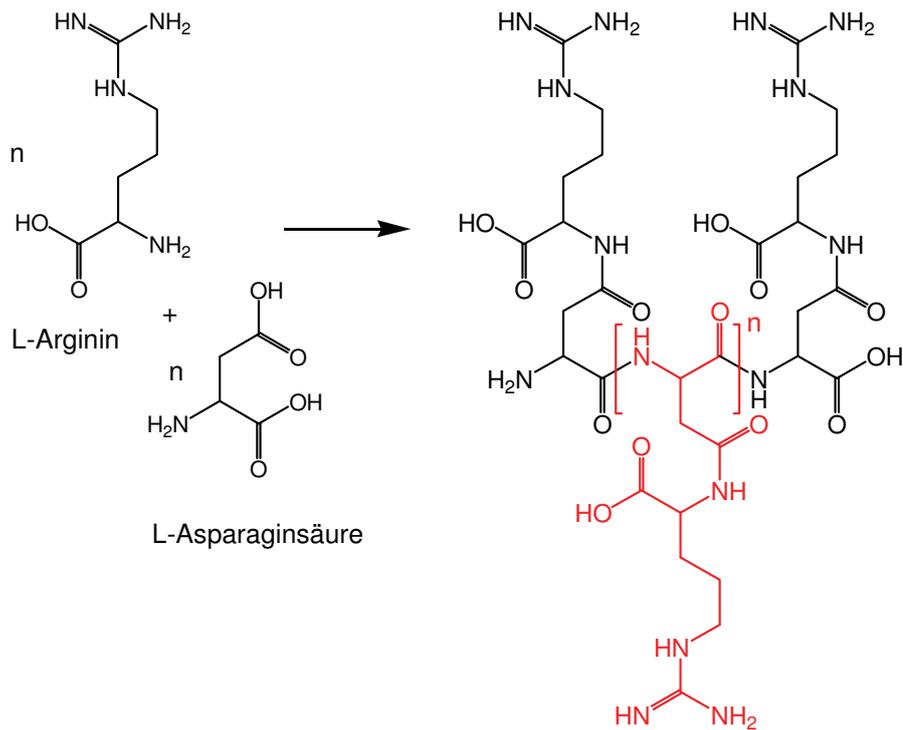
Bei der Darstellung der Ergebnisse aus den verschiedenen Isolierungsversuchen mit Tabakmaterial ist die Reinheit neben der Ausbeute das wichtigste Qualitätsmerkmal des Extraktionsprozesses. An dieser Stelle wird daher auf die verschiedenen Methoden zur Reinheitsbestimmung der isolierten Proben eingegangen und erläutert, welche der beschriebenen Methoden für eine Prozessnahe Analytik am Besten geeignet sind.

2.2.1 Reinheitsbestimmung der Cyanophycinproben mittels Elementaranalyse

Die Reinheit der isolierten Cyanophycinproben aus dem transgenen Tabakmaterial wurde zu Beginn der Arbeit mit Hilfe der quantitativen Elementaranalyse untersucht. Bei den untersuchten Proben 1 und 2 (siehe Tabelle 2-2) handelt es sich um isolierte Polymerproben, die mit Salzsäure direkt aus transgenen Tabakblättern mit dem Konstrukt PsbY-*cphA*_{Te} Event 51-3 extrahiert worden sind.

Zuerst wurde mit Hilfe der Strukturformel und einer angenäherten Molmasse des polydispersen Moleküls (20.000 g/mol) die prozentuale Elementzusammensetzung des Biopolymers bestimmt (siehe Abbildung 2-4). M1 und M3 beschreiben die Enden der Polymerkette, die auf der einen Seite eine freie Aminogruppe und auf der anderen Seite eine freie Carboxylgruppe aufweist. M2 dagegen steht für die *repeating unit* des Polymers. Die Molmassen der einzelnen Molekülteile unterscheiden sich aufgrund ihrer Struktur geringfügig voneinander. Dies muss bei der Berechnung der prozentualen Zusammensetzung ebenso berücksichtigt werden.

Auf den ersten Blick scheinen die Abweichungen zu den berechneten Anteilen mit über 5 % für Kohlenstoff und bis zu 10 % bei Stickstoff für die isolierten Proben sehr hoch zu sein (siehe Tabelle 2-2). Nur der Wert für den Wasserstoffanteil in den Proben liegt in einem annehmbaren Bereich. Der Sauerstoffgehalt kann bei der quantitativen Elementaranalyse nicht bestimmt werden. Er errechnet sich für alle Verbindungen, die keine zusätzlichen Heteroatome enthalten, aus der Differenz zwischen der Summe der Gehalte der übrigen Atome (C, H und N) und 100 %.



	M1	n x M2	M3
Summenformel:	C ₃ H ₅ NO	C ₃ H ₄ NO	C ₂ H ₄ NO
molare Masse:	273,3 g/mol	271,3 g/mol	288,3 g/mol

Abbildung 2-4: Strukturformeln von L-Arginin und L-Asparaginsäure sowie Cyanophycin und Kennzeichnung der einzelnen Molekülteile des Polymers (N- und C-terminales Ende und *repeating unit* des Polymers) und deren Molmassen

Tabelle 2-2: Zusammenfassung der Messwerte für die prozentuale Zusammensetzung von Cyanophycin berechnet mit *ChemDraw® Ultra* (Chemical Structure Drawing Standard) bzw. experimentell ermittelt mit Hilfe der Elementaranalyse

	C	H	N	O
Cyanophycin (berechnet)	Summenformel: (C ₃ H ₄ NO) _k (k=1,2,3, ...)			
Gehalt berechnet [%]	44,2	6,3	25,8	23,7
Probe 1 (experimentell)	Summenformel: (C ₃ H ₅ NO ₂) _k (k=1,2,3, ...)			
Gehalt experimentell [%]	37,5	6,0	16,2	(40,3)
Abweichung [%]	6,7	0,3	9,6	(16,6)
Probe 2 (experimentell)	Summenformel: (C ₃ H ₅ NO ₂) _k (k=1,2,3, ...)			
Gehalt experimentell [%]	37,8	6,0	16,8	(39,4)
Abweichung [%]	6,4	0,3	9,0	(15,7)

Trotz der hohen Abweichungen ergab sich für die aus den experimentell bestimmten Werten für die Elementarzusammensetzung resultierende Summenformel bei beiden Proben für die Atome C, H und N dasselbe Verhältnis wie in der Berechnung für das Aminoende des Polymers (M1). Unter Berücksichtigung des errechneten Sauerstoffgehaltes stimmen die experimentell ermittelten Summenformeln allerdings nicht mehr mit der berechneten Formel überein. Da die Verhältnisse der übrigen Atome (C, H und N) jedoch vergleichbar sind mit den berechneten Summenformeln der einzelnen Molekülteile, ist es denkbar, dass sich zusätzliche Heteroatome in der Probe befinden. Denkbar wären Salze oder Rückstände der Säure aus dem Extraktionsprozess, die als Verunreinigung an dem Biopolymer haften. Andernfalls müssten sich bei Fremdstoffen, die auch C-, H- bzw. N-Atome enthalten, die prozentualen Gehalte zumindest bei einem oder zwei Elementen ebenso erhöhen.

Bei den Berechnungen zur Bestimmung der Reinheit der Cyanophycinproben werden nur die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff berücksichtigt, da sich der Sauerstoffgehalt, wie bereits erwähnt, nicht experimentell bestimmen lässt. Demnach besteht reines Cyanophycin zu insgesamt 76,3 % aus C, H und N. Die Abweichung der Summe der drei Elemente von diesem Wert beträgt für Probe 1 rund 21,8 % und für Probe 2 rund 20,6 %. Nach diesen Berechnungen bestünde Probe 1 zu 78,2 % aus reinem Cyanophycin und Probe 2 zu 79,4 %. Die Ergebnisse der isolierten Polymerproben aus den unterschiedlichen Extraktionsversuchen aus transgenen Tabakblättern stimmen gut überein. Die Extraktion liefert demnach ein reproduzierbares Ergebnis.

Im Gegensatz zur sonstigen Anwendung der Elementaranalyse für die Charakterisierung von kleinen synthetisch hergestellten Molekülen in der organischen und anorganischen Chemie ist die quantitative Elementaranalyse im Rahmen dieser Arbeit zur Beurteilung der Reinheit von hochmolekularen Verbindungen verwendet worden. Durch die Messung einer reinen hochmolekularen Verbindung sollte die Methode daher anschließend auf ihre Aussagekraft und Genauigkeit untersucht werden.

Als Referenz diente die Messung einer Polyaminosäure, Poly-L-Leucin. Aus der Molmasse (8800 g/mol) und mit Hilfe der Strukturformeln (siehe Abbildung 2-5, M1-M3) konnte wiederum die prozentuale Zusammensetzung der Elemente C, H, N und O berechnet werden. In Tabelle 2-3 sind die Abweichungen der berechneten und experimentell bestimmten Daten dargestellt. Die Summenformel für die berechnete Elementarzusammensetzung spiegelt die Zusammensetzung der *repeating unit* (M2) des Moleküls wieder. Das ist auch sinnvoll, da die Enden der Polymerkette M1 und M3 nur einen geringen Anteil an der Gesamtmasse des Moleküls haben.

Die Abweichungen von bis zu 6 % scheinen im ersten Moment wieder sehr groß zu sein. Doch nach einer Berechnung der Summenformel aus der experimentell ermittelten Elementarzusammensetzung ist ersichtlich, dass es sich bei der berechneten Summenformel um die des Carboxylendes (M3) der Polyaminosäure

2 ERGEBNISSE

handelt. Das ist ein Indiz dafür, dass mit Hilfe der Elementaranalyse bei hochmolekularen Verbindungen nicht die exakte Summenformel berechnet werden kann.

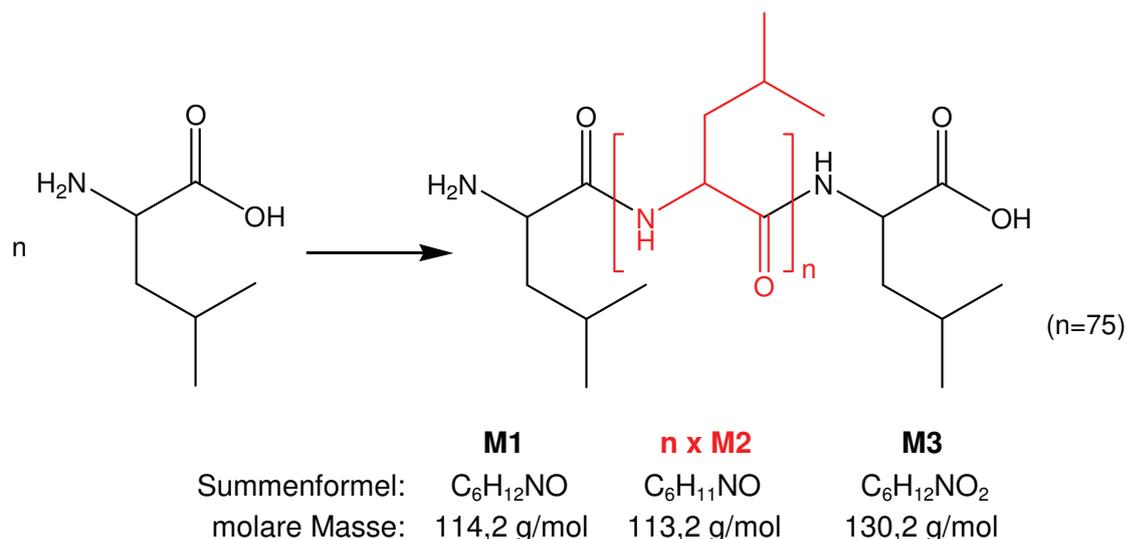


Abbildung 2-5: Strukturformeln von L-Leucin und Poly-L-Leucin sowie Kennzeichnung der einzelnen Molekülteile des Polymers (N- und C-terminales Ende und *repeating unit* des Polymers) und deren Molmassen

Tabelle 2-3: Zusammenfassung der Messwerte für die prozentuale Zusammensetzung von Poly-L-Leucin berechnet mit *ChemDraw® Ultra* (Chemical Structure Drawing Standard) bzw. ermittelt mit Hilfe der Elementaranalyse

	C	H	N	O
Poly-L-Leucin (berechnet)	Summenformel: $(C_6H_{11}NO)_k$ (k=1,2,3, ...)			
Gehalt berechnet [%]	63,6	9,8	12,4	14,3
Poly-L-Leucin (experimentell)	Summenformel: $(C_6H_{12}NO_2)_k$ (k=1,2,3, ...)			
Gehalt experimentell [%]	58,0	9,8	11,0	(21,2)
Abweichung [%]	5,6	0,0	1,4	(6,9)

In wie weit die Methode nun für die Messung von großen Molekülen wie Polyamino­säuren geeignet ist, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Die Abweichungen zwischen berechneter und experimentell bestimmter Zusammensetzung sind hoch. Bei der Messung von Molekülen mit geringeren Molmassen sollte die Abweichung der Messwerte allgemein nicht mehr als 0,3 % betragen.

Die zuvor berechneten Abweichungen und Verunreinigungen für die isolierten Cyanophycinproben 1 und 2 könnten nach dem Ergebnis dieser Messung zum Teil auch durch eine Messungenauigkeit der Methode im Bereich für hochmolekulare Verbindungen zu Stande gekommen sein. Für eine endgültige Aussage über die Reinheit und damit die Qualität des Produktes kann nicht allein die Elementaranalyse genutzt werden. Dazu müssen andere Methoden mit einer höheren Messgenauigkeit für diese größeren Moleküle verwendet werden. Die Reinheit der an dieser Stelle verwendeten Proben 1 und 2 wird wie im Folgenden beschrieben mit Hilfe anderer Methoden genauer bestimmt.

2.2.2 LC/MS Messung zur Bestimmung der Zusammensetzung der Cyanophycinproben

Eine andere Form der analytischen Charakterisierung des Biopolymers bestand in der Untersuchung der im Molekül gebundenen Aminosäuren. Dazu war es notwendig die isolierte Probe durch Zugabe von Salzsäure und unter Wärmeeinfluss über mehrere Stunden hinweg vollständig zu hydrolisieren.

Vor der eigentlichen Analyse der nach dieser Methode freigesetzten Aminosäuren wurde die Hydrolysemischung mit Hilfe des EZ:faast™ Kits der Firma phenomenex® aufgearbeitet. Die freien Aminosäuren werden dabei zum Abschluss derivatisiert und die Messung erfolgt mit einer LC/MS-Methode (liquid chromatography/mass spectrometry).

Unter der Annahme, dass das isolierte Produkt zu 100 % aus Cyanophycin besteht, sollten bei der Messung nur zwei Aminosäuren zusätzlich zu den internen Standards detektiert werden können. In Abbildung 2-6 ist ein Chromatogramm für die Messung von Probe 1 (Cyanophycin aus Tabak *PsbY-cphA_{TE}* Event 51-3) dargestellt. Daraus ist zu entnehmen, dass die isolierte Probe kein reines Cyanophycin enthält.

In der Probe können neben den internen Standards Homoarginin, Methionin-d3 sowie Homophenylalanin weitere Aminosäuren identifiziert werden. Ob es sich dabei um freie Aminosäuren handelt, die bei der Isolierung des Biopolymers aus der pflanzlichen Matrix mit extrahiert worden sind, oder ob diese Aminosäuren durch die Hydrolyse von mit extrahierten Proteinen entstanden sind, kann an dieser Stelle nicht endgültig geklärt werden. Allerdings deutet die Vielzahl verschiedener Aminosäuren eher auf andere hydrolisierte Proteine hin. In natürlichen Proteinen kommen alle 21 proteinogenen Aminosäuren zu einem gewissen Anteil vor.

Mit Hilfe der LC/MS-Untersuchungen konnte wiederum belegt werden, dass es sich bei den isolierten Proben nicht um reines Cyanophycin handelt. Die Messungen deuten darauf hin, dass die Verunreinigungen unter anderem von Fremdproteinen aus dem Extraktionsprozess stammen. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass andere niedermolekulare Substanzen als Verunreinigung im Isolat vorhanden sind. Die Analyse der isolierten Polymerproben mit Hilfe der LC/MS ist zeitaufwendig, da die Proben immer zuerst hydrolisiert werden müssen (22h bei 110 °C), da mit der

2 ERGEBNISSE

etablierten Methode nur freie Aminosäuren gemessen werden können. Die Ergebnisse aus den ermittelten Chromatogrammen könnten für eine Quantifizierung der detektierten Aminosäuren genutzt werden. Allerdings lässt sich darüber allein nicht bestimmen, wie hoch der Grad an Verunreinigung bei der vermessenen Cyanophycinprobe ist. Für eine quantitative Analyse der isolierten Cyanophycinproben muss eine andere Methode gefunden werden.

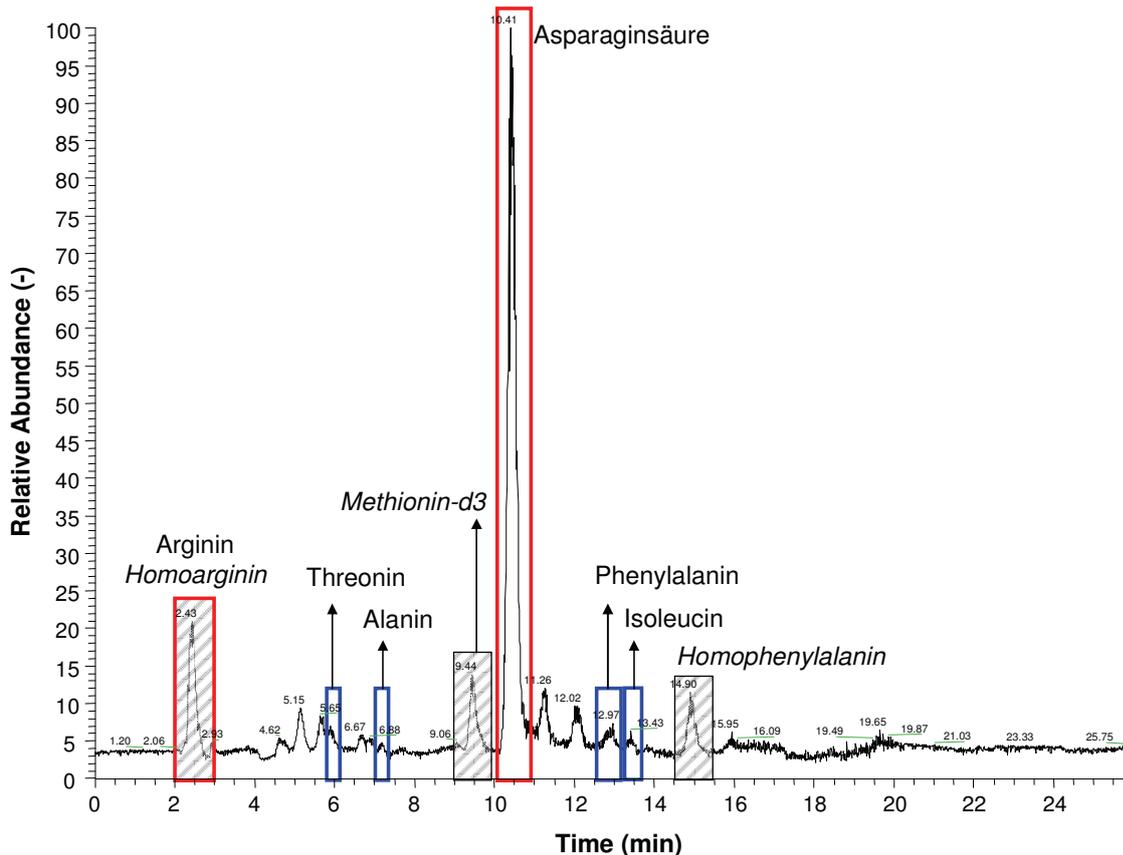


Abbildung 2-6: Chromatogramm für die LC/MS Messung einer Cyanophycinprobe isoliert aus transgenen Tabakblättern zur Bestimmung der Reinheit (rote Balken: Aminosäuren des Biopolymers – Arginin und Aspartat; graue Balken: *interne Standards* für die Quantifizierung und blaue Balken: beispielhaft ausgewählte zusätzliche Aminosäuren)

2.2.3 Analyse der Cyanophycinproben mit Hilfe der Gelelektrophorese

Für die Qualitätsbeschreibung von Proteinen wird häufig die Gelelektrophorese angewendet. Dabei werden die Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt, mit Hilfe verschiedener Färbemethoden visualisiert und durch einen Vergleich mit Standardproteinen identifiziert.

Bei Cyanophycin handelt es sich um eine nicht ribosomal hergestellte proteinähnliche Substanz aus zwei Aminosäuren. Es sollte daher mittels der gängigen

Methode zur Charakterisierung von Proteinen möglich sein, eine Reinheitsbestimmung der isolierten Cyanophycinproben durchzuführen.

Das isolierte Biopolymer wurde zur Vorbereitung der SDS-Gelelektrophorese wieder in Lösung gebracht (0,1 M Salzsäure bzw. SDS-Laufpuffer). Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix eine verringerte Molekülgröße im Vergleich zu bakteriellem Cyanophycin aus Cyanobakterien und *E. coli* hat (Ziegler *et al.* 2002a; Neumann *et al.* 2005). Das in Abbildung 2-7 dargestellte Gel zeigt eine breite Hauptbande zwischen 18 und 28 kDa. Das stimmt gut mit den Angaben aus der Literatur überein. Aufgrund dieser Messungen und dem Lösungsverhalten bei der Extraktion kann man davon ausgehen, dass das Isolat aus transgenen Tabakblättern zu einem großen Teil Cyanophycin enthält.

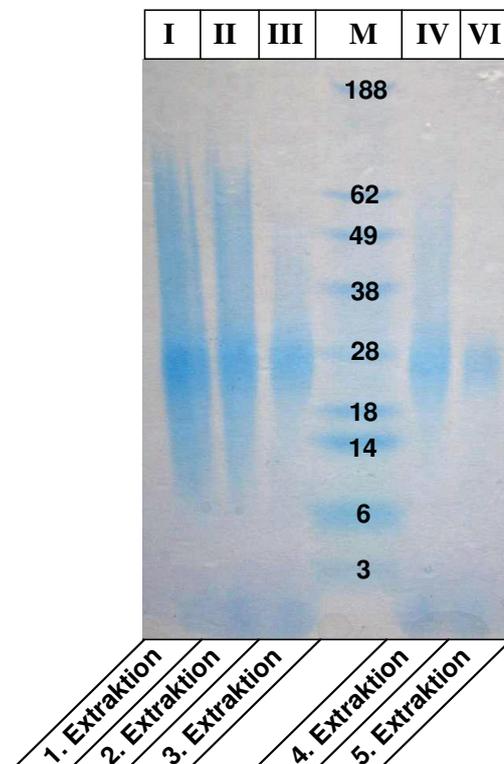


Abbildung 2-7: Gelelektrophorese mit Cyanophycinproben aus transgenen Tabakblättern (PsbY-*cphA*_{Te} Event 51-3) - dargestellt sind Polymerproben aus fünf aufeinander folgenden Extraktionsschritten (Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250); **M**: Proteinstandard mit Größenmarker in kDa

Bei der Auswertung der Gele zeigte sich, dass die wiederholte Extraktion des Pflanzenmaterials einen direkten Einfluss auf die Reinheit der jeweiligen isolierten Polymerprobe hat (siehe Abbildung 2-7). Für alle Ansätze wurde dieselbe Menge an Isolat für die Messung eingewogen und in Lösung gebracht. Die Färbung der

Proteinbanden erfolgte durch Zugabe von Coomassie Brilliant Blue G-250³ (Durchführung siehe Kapitel 5.1.3). Die Intensität der Bande nimmt von Geltasche **I** bis hin zu Geltasche **VI** deutlich ab. Da die Intensität der Bandenfärbung proportional zur Konzentration der enthaltenen Proteine ist, könnte mit einem entsprechenden Gerät (*gel reader*) und einer Kalibrierung direkt die Konzentration des Biopolymers in der Gelmatrix ermittelt werden. Ein solches Gerät stand für die Auswertung der Gele nicht zur Verfügung. Die gewonnenen Ergebnisse aus der Gelelektrophorese sind daher nur qualitativer Art. Dennoch kann man festhalten, dass bei gleicher Einwaage mit zunehmender Extraktionswiederholung der Anteil an Cyanophycin in der isolierten Probe sinkt und der Anteil an Verunreinigungen folglich zunimmt.

Durch die saure Extraktion des Polymers aus der pflanzlichen Matrix können auch andere säurelösliche Proteine mit herausgelöst werden. Aufgrund der polydispersen Molekülverteilung für Cyanophycin kann allerdings nicht genau bestimmt werden, ob sich unter der Bande für Cyanophycin weitere Proteinbanden befinden.

Für die Reinheitsbestimmung der für Cyanophycin charakteristischen Gelbande wurde ein Verdau mit Cyanophycinase (CphB, zur Verfügung gestellt durch die AG Lockau, Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt. Das Verdauungsenzym ist in der Lage die α -Peptidbindungen in der Polyaspartatkette zu spalten: Dadurch entstehen β -Aspartylarginin Dipeptide (Richter *et al.* 1999; Berg *et al.* 2000), die für eine gelelektrophoretische Bestimmung zu klein sind und nicht mehr nachgewiesen werden können. Die Probe gilt als verdaut.

Eine aus Tabakblättern isolierte Cyanophycinprobe (dieselbe Probe wie in Abbildung 2-7 Geltasche **I**) wurde in einem Verdauungspuffer über Nacht bei 30 °C inkubiert. Vor der Reaktion ist der pH-Wert der Verdauungslösung richtig einzustellen, denn nur bei pH-Werten ≥ 7 kann das Verdauungsenzym zuverlässig arbeiten. Andernfalls kommt es zur Inaktivierung des Enzyms. Nach der Inkubationszeit wurde eine Probe aus der Verdauungslösung erneut mittels Gelelektrophorese untersucht (Abbildung 2-8). In der Geltasche **II** wurde die unverdaute Ausgangsprobe (Cyanophycin aus Tabakmaterial PsbY-*cphA*_{Te} Event 51-3) aufgetragen. In die Geltasche **III** wurde die entsprechende verdaute Probe gegeben, und die Kammer **IV** enthielt zum Vergleich die reine Verdauungslösung, in der sich nur Cyanophycinase (30 kDa, rot) befand. Nach Abschluss der Inkubationszeit konnte in der verdauten Cyanophycinprobe aus Tabak keine zusätzliche Bande mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt werden. Die aus dem Pflanzenmaterial isolierten Proben enthalten demnach kein weiteres Protein bzw. nur in einer sehr geringer Konzentration, die mit der Färbemethode nicht nachweisbar ist. Da Cyanophycinase ein für Cyanophycin spezifisches Verdauungsenzym ist (Richter *et al.* 1999), kann somit ausgeschlossen werden, dass unter der Cyanophycinbande noch weitere Proteinbanden liegen.

³ Nachweisgrenze bei der Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 liegt bei etwa 0,5 μ g Protein pro Gelbande.

Bei den isolierten Proben aus transgenen Tabakblättern handelt es sich um Cyanophycin, und der Reinheitsgrad der Proben ist von der Anzahl der Wiederholungen bei der Extraktion abhängig. Allerdings können die Verunreinigungen nicht von weiteren Proteinen stammen bzw. sind die Konzentrationen so gering, dass sie mit der gewählten Färbemethode nicht nachweisbar sind. Bei den im Isolat befindlichen Substanzen muss es sich also um niedermolekulare Verbindungen handeln (Salzrückstände von der Fällung, freie Aminosäure etc.).

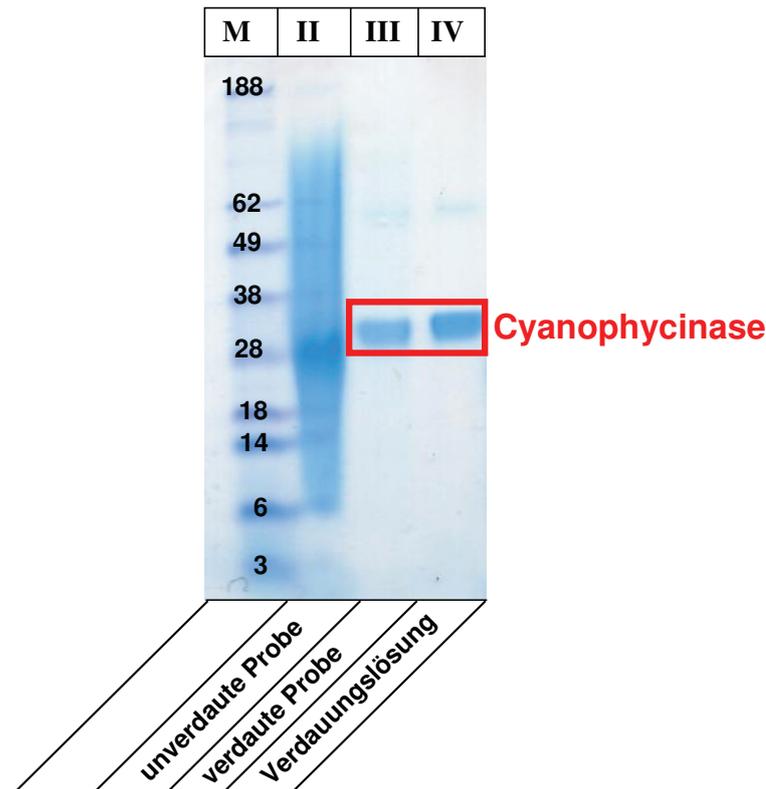


Abbildung 2-8: Gelelektrophorese nach Verdau mit Cyanophycinase (Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250) - dargestellt sind sowohl die unverdaute, als auch die verdaute Polymerprobe sowie nur die Verdauungslösung (Molmasse des Verdauungsenzyms Cyanophycinase beträgt 30 kDa); M: Proteinstandard mit Größenmarker in kDa

2.2.4 LC/MS Messung der Polymerproben nach Isolierung aus SDS-Gelmatrix

Durch die Verwendung der Gelelektrophorese kann die mit Proteinen verunreinigte Cyanophycinprobe in ihre Einzelbestandteile aufgetrennt werden. Der Verdau mit Cyanophycinase zeigte, dass es sich bei der Proteinbande für Cyanophycin nur um diese eine proteinogene Struktur handelt und keine coeluiierenden Substanzen in der Probe vorhanden waren.

Nach einem Artikel von Neumann *et al.* (2005) konnte in Cyanophycinproben aus Tabak neben den Aminosäuren Aspartat und Arginin eine dritte Aminosäure (Lysin) identifiziert werden. Die Messungen ergaben einen Anteil von bis zu 10 % Lysin

(Zusammensetzung von Cyanophycin – Aspartat : Arginin : Lysin = 1 : 1,05 : 0,1). Mit den aus den SDS-Gelen isolierten Cyanophycinbanden sollte überprüft werden, in wie weit diese Beobachtungen auch für Cyanophycin aus Kartoffelpflanzen zutrifft.

Diese Untersuchungen zur Zusammensetzung und zum Aufbau des Biopolymers setzen reines Cyanophycin voraus. Aus den Ergebnissen der Reinheitsuntersuchungen war ersichtlich, dass mit den angewendeten Isolierungsmethoden kein reines Cyanophycin isoliert werden konnte. Daher wurde für die Gewinnung von reinem Cyanophycin auf eine Methode zur Isolierung des Biopolymers aus der Gelmatrix zurückgegriffen.

Die „aufgereinigte“ Probe des Biopolymers wurde aus der Gelmatrix nach einem Verfahren von Hager *et al.* von 1980 isoliert. Anschließend wurde die Probe vollständig hydrolysiert (22 h, 110 °C mit 6 N Salzsäure) und mit dem EZ:faast™ Kit aufgearbeitet und derivatisiert. Die Probe wurde danach mittels LC/MS untersucht. Pro Bande sind in dem Gel etwa 10 µg Cyanophycin enthalten, diese Menge war für die nachfolgenden Elutions- und Fällungsschritte zu gering, denn in den entsprechenden LC/MS-Chromatogrammen konnten keine Aminosäuren detektiert werden.

2.2.5 UV-Messungen der isolierten Cyanophycinproben

Die Konzentration von proteinhaltigen Lösungen kann auf sehr einfache Weise mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem Photometer durchgeführt werden. Die Absorption bei 280 nm ist charakteristisch für die aromatischen Aminosäuren, die in den Proteinketten eingebaut sind. Cyanophycin dagegen ist nur aus zwei nicht aromatischen Aminosäuren (Aspartat und Arginin) aufgebaut. Für eine reine Cyanophycinprobe sollte sich demnach bei 280 nm keine Absorptionsbande zeigen. Die photometrische Analyse der gelösten Cyanophycinproben kann somit zur Bestimmung der Reinheit im Hinblick auf andere Proteine angewendet werden.

Im Vorfeld der Untersuchung der isolierten Cyanophycinproben wurden die Aminosäuren Aspartat und Arginin sowie Polyaspartat und verschiedene Standardproteine einzeln photometrisch vermessen, um charakteristische Absorptionsbanden zu ermitteln (Abbildung 2-9). Abgesehen von den nicht spezifischen Absorptionsbanden zwischen 190 und 210 nm können weder für Polyaspartat noch für die einzeln vermessenen Aminosäuren (Aspartat und Arginin) zusätzliche charakteristische Banden ermittelt werden. Für alle anderen Proteine (hier beispielhaft an BSA ermittelt) ergibt sich eine charakteristische Absorptionsbande bei ~ 280 nm, die von den aromatischen Aminosäuren in der Proteinkette herrührt (siehe Abbildung 2-9).

Wieder in Lösung gebrachte Cyanophycinproben zeigen in Abhängigkeit vom gewählten Lösungsmittel (Salzsäure bzw. SDS-Puffer) ein lokales Absorptionsmaximum bei ~280 nm (Abbildung 2-10). Dieser Effekt erklärt auch die scheinbar nicht vorhandene Verunreinigung durch Fremdproteine in den gelelektrophoretischen Messungen. Die dort untersuchten Proben wurden in Salzsäure aufgelöst. Dabei

bleibt immer ein unlöslicher Rückstand in den Reaktionsgefäßen zurück, der nicht untersucht werden kann. Auch das UV-Spektrum der isolierten Polymerprobe weist in verdünnter Säure kein lokales Maximum bei ~280 nm auf. Die in SDS-Puffer angesetzte Probe zeigt allerdings ein deutliches Absorptionsmaximum bei ~280 nm. Das deutet daraufhin, dass sich doch Fremdproteine als Verunreinigung in den isolierten Proben befinden.

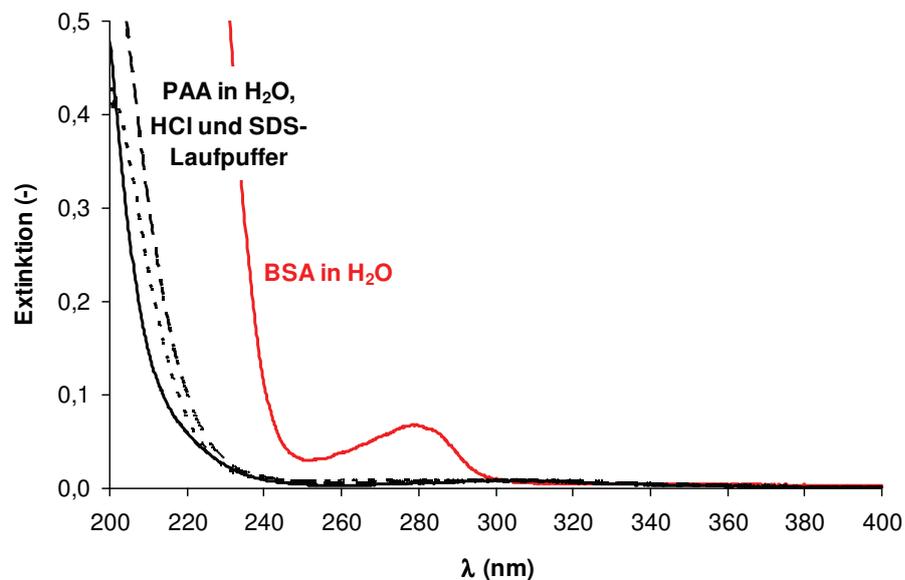


Abbildung 2-9: Darstellung der UV-Spektren von Polyaspartat in unterschiedlichen Lösungsmitteln im Vergleich zu einem Standardprotein (BSA) in Wasser (lokales Absorptionsmaximum für BSA bei ~280 nm)

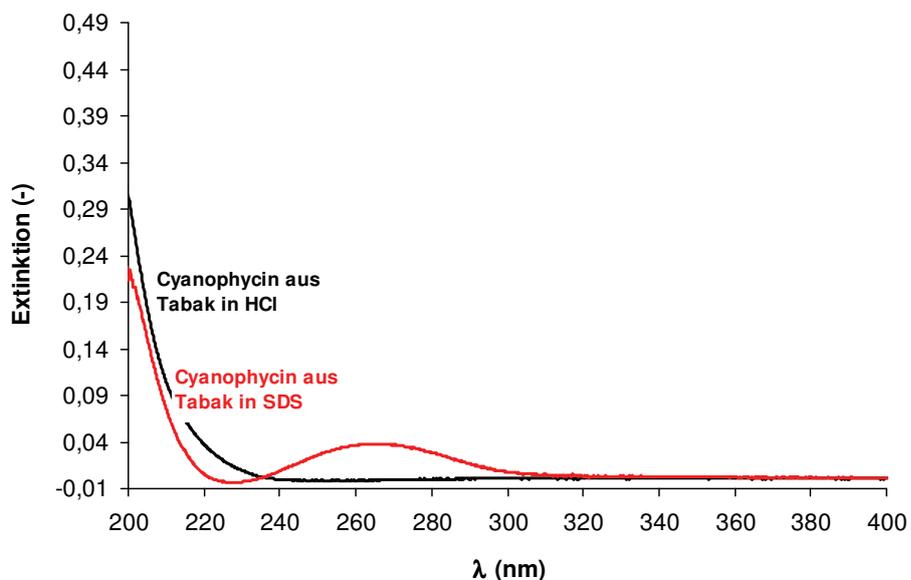


Abbildung 2-10: Darstellung der UV-Spektren einer Cyanophycinprobe isoliert aus transgenen Tabakblättern in unterschiedlichen Lösungsmitteln – Wasser und SDS-Puffer (lokales Absorptionsmaximum für die Probe in SDS-Puffer bei ~280 nm)

Die Intensität der Absorptionsbande bei ~280 nm ist abhängig von der Anzahl der aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) im Protein und kann somit zur Bestimmung der Konzentration eines Proteins genutzt werden. Da die Anzahl der aromatischen Aminosäuren in Proteinen nicht konstant ist, muss für eine quantitative Auswertung eine Kalibrierung mit dem entsprechenden Protein selbst durchgeführt werden. Eine Quantifizierung der Fremdproteine konnte an dieser Stelle deshalb nicht durchgeführt werden. Über einen Vergleich mit anderen Standardproteinen (BSA, Myoglobin bzw. Pepsin) kann der Gehalt an Fremdprotein etwa auf 10 % geschätzt werden.

2.2.6 Entwicklung einer angepassten BRADFORD Methode für Cyanophycin

Die letzte im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Methode zur Bestimmung der Reinheit der isolierten Proben aus den Tabakblättern ist die Methode nach Bradford (Bradford 1976). Mit Hilfe einer angepassten BRADFORD Methode konnte dann auch quantitativ die Reinheit der zuvor bereits untersuchten Proben 1 und 2 bestimmt werden (siehe Tabelle 2-4).

Für die Messungen wurde eine definierte Menge der isolierten Polymerprobe in ein Reaktionsgefäß eingewogen und mit verdünnter Säure in Lösung gebracht. Der wässrige Überstand wurde von evtl. vorhandenem Rückstand des Lösungsansatz durch Zentrifugation getrennt und für die weiteren Schritte der BRADFORD Methode eingesetzt (Durchführung Kapitel 5.1.6).

Das Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue G beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Sulfonsäuregruppen des Farbstoffmoleküls und den basischen Aminosäuren in der Proteinkette (Tal *et al.* 1980). Die Bindung des Farbstoffs ist somit zu basischen Aminosäuren besonders stark ausgeprägt. Für die Kalibrierung der BRADFORD Messungen wird standardmäßig Rinderserum Albumin (BSA) verwendet. Dieses Protein hat einen Anteil an basischen Aminosäuren von rund 16 %. Das Quasi-Protein Cyanophycin besteht zu nahezu 50 % aus Arginin (bis zu 10 % können durch Lysin ersetzt werden). Eine Eichung mit BSA ist daher nicht geeignet, denn der Gehalt an basischen Aminosäuren in beiden Molekülen weicht stark voneinander ab. Die Kalibrierung für Cyanophycin erfolgte daher mit Cyanophycin, das aus rekombinanten *E. coli* Bakterien isoliert wurde (AG Lockau, Humboldt-Universität zu Berlin). Die Abweichung in der Steigung der beiden Kalibriergeraden beträgt rund 200 % (siehe Abbildung 2-11).

Die Berechnung der Reinheit für die isolierten Proben erfolgte aufgrund der Überlegung, dass Cyanophycin wegen des hohen Arginingehaltes eine übermäßig starke Affinität zu Coomassie Brilliant Blue G aufweist (siehe auch Steigung der Kalibriergeraden). Bei einer genau eingewogenen Probe werden alle Abweichungen von der erwarteten Extinktion daher als Verunreinigung bewertet. Somit kann im Umkehrschluss die Reinheit der Cyanophycinprobe angegeben werden. Zusätzlich wurde der im Reaktionsgefäß verbliebene Rückstand vom Lösen der isolierten

Polymerproben getrocknet und anschließend ausgewogen. Er wurde ebenfalls als Verunreinigung bewertet.

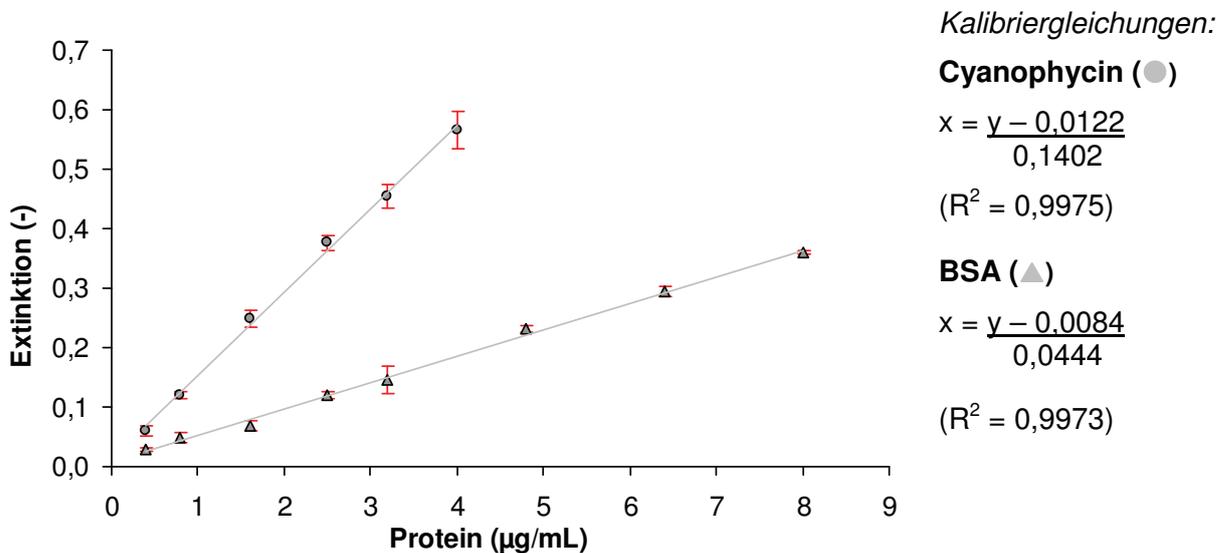


Abbildung 2-11: Vergleichende Darstellung einer BRADFORD Kalibrierung für Cyanophycin aus *E. coli* (●) und BSA (▲) - entsprechende Kalibriergleichungen siehe rechte Seite

Für die isolierten Proben aus transgenem Tabakmaterial aus dem Versuch mit den aufeinander folgenden Extraktionszyklen (siehe Kapitel 2.1.1) konnte die Reinheit der Proben mit Hilfe der BRADFORD Methode mit 60-70 % für die ersten beiden sauren Extraktionen ermittelt werden. Bei den nachfolgenden Extraktionsschritten sinkt die Reinheit drastisch bis auf 40 % im 3. Schritt und bis auf 10 % im 4. Schritt ab.

Ein weiteres Indiz für die Verunreinigung der isolierten Polymerproben ist auch die Differenz zwischen den zuvor ermittelten Cyanophycingehalten in den Tabakblättern und den realen Gesamtausbeuten nach der Extraktion (siehe Tabelle 2-4). Bei den Wiederholungsmessungen für die Isolierung von Cyanophycin aus transgenem Tabak wurde zuerst der Cyanophycingehalt in den Tabakblättern mit der BRADFORD Methode bestimmt (AG Broer, Universität Rostock). Dafür ergab sich ein Gehalt von 2,93 % Cyanophycin zur Trockenmasse (TM). Das entspricht 29,3 mg/g TM.

Die Ausbeute bei der erneuten Isolierung ist mit $3,23 \pm 0,13$ % / TM etwas größer als der vorab bestimmte Cyanophycingehalt. Diese Abweichung von etwa 10 % zwischen dem bestimmten Gehalt an Biopolymer und der tatsächlich isolierten Menge kann durch die Reinheit der Cyanophycinproben erklärt werden. Für die isolierten Proben konnte eine Reinheit von > 60 % ermittelt werden. Der Vergleich der isolierten reinen Cyanophycinmenge mit dem mit BRADFORD ermittelten Gehalt zeigt, dass die Isolierung des Biopolymers aus den transgenen Tabakblättern auch nach 5 Extraktionsschritten nicht vollständig war. Es konnten insgesamt nur 70 %

2 ERGEBNISSE

des zuvor ermittelten Cyanophycingehaltes isoliert werden. Weitere Extraktionen wurden aufgrund der geringen Ausbeute nicht mehr durchgeführt, da bereits die 5. Extraktion mit Salzsäure nur noch 5 % des insgesamt extrahierbaren Cyanophycins ergab, und der Aufwand weiterer Extraktionsschritte somit nicht gerechtfertigt ist.

Tabelle 2-4: Ergebnisse der Cyanophycinextraktion aus transgenem Tabakmaterial (lyophilisiert, PsbY-*cphA*_{Te} Event 51-3) - dargestellt ist die Gesamtmasse an Cyanophycin aus 3 Extraktionsschritten mit Salzsäure

Einwaage Tabak TM (g)	Gehalt Cyanoph. (% / TM)	Isolat (% / TM)	Reinheit _{Isolat} (%)	Cyanophycin (% / TM)
8,01	2,93 *	3,36	67,2	2,26
8,02	2,93 *	3,09	64,6	2,00
8,00	2,93 *	3,23	58,9	1,90
Mittelwert ± SE :		3,23 ± 0,14	63,6 ± 2,4	2,05 ± 0,18

* Die Cyanophycingehalte wurden von der AG Broer (Universität Rostock) mit der BRADFORD Methode bestimmt.

Als Zusammenfassung des Kapitels lässt sich feststellen, dass für die Reinheitsuntersuchungen die Gelelektrophorese für qualitative Analysen des Isolates und die angepasste BRADFORD Methode für die quantitativen Messungen der isolierten Cyanophycinproben etabliert werden konnte.

Die Arbeiten zur Isolierung von Cyanophycin aus Tabakblättern dienten lediglich zur Etablierung einer Extraktionsmethode und zur Bestimmung der Effektivität dieser Methode im Labor. Die weiteren experimentellen Untersuchungen wurden an transgenen Kartoffeln durchgeführt, da sich dabei eher eine Doppelnutzung der Pflanzen anbietet. Dies ist im Hinblick auf die Isolierungskosten ein wesentlicher Aspekt bei der Produktion von Cyanophycin in gentechnisch veränderten Pflanzen.

2.3 Saure Extraktion von Cyanophycin aus transgenen Kartoffeln

Vor der eigentlichen Extraktion des Biopolymers aus dem gentechnisch veränderten Kartoffelmaterial wurde wiederum der Versuch zur Bestimmung der Acidität des pflanzlichen Zellmilieus nach Balasubramaniam *et al.* (2003) durchgeführt. Genau wie bereits zuvor bei dem Tabakmaterial ergab dieser Versuch auch für Kartoffeln, dass die zur Extraktion verwendeten Pufferlösungen aufgrund des sauren Charakters der pflanzlichen Matrix selbst einer pH-Wert Verschiebung unterliegen (siehe Abbildung 2-12: A und B; Tabak siehe Kapitel 2.1.1, Abbildung 2-1).

Bei den Untersuchungen verhält sich das gefriergetrocknete Kartoffelmateriale von Wildtypknollen (**A**) und von transgenen Knollen (**B**) gleich. Die Exprimierung des Biopolymers (Cyanophycin) in den gentechnisch veränderten Knollen beeinflusst demnach nicht das allgemeine Zellmedium. Das lyophilisierte Tabakmaterial (siehe Abbildung 2-1) zeigt einen größeren Abfall für die basischen Pufferlösungen nach der Extraktion als es bei dem Kartoffellyophilisat der Fall ist (siehe Abbildung 2-12: **A** und **B**). Daraus kann man schließen, dass das Zellmilieu in den Tabakblättern saurer ist als in den Kartoffelknollen.

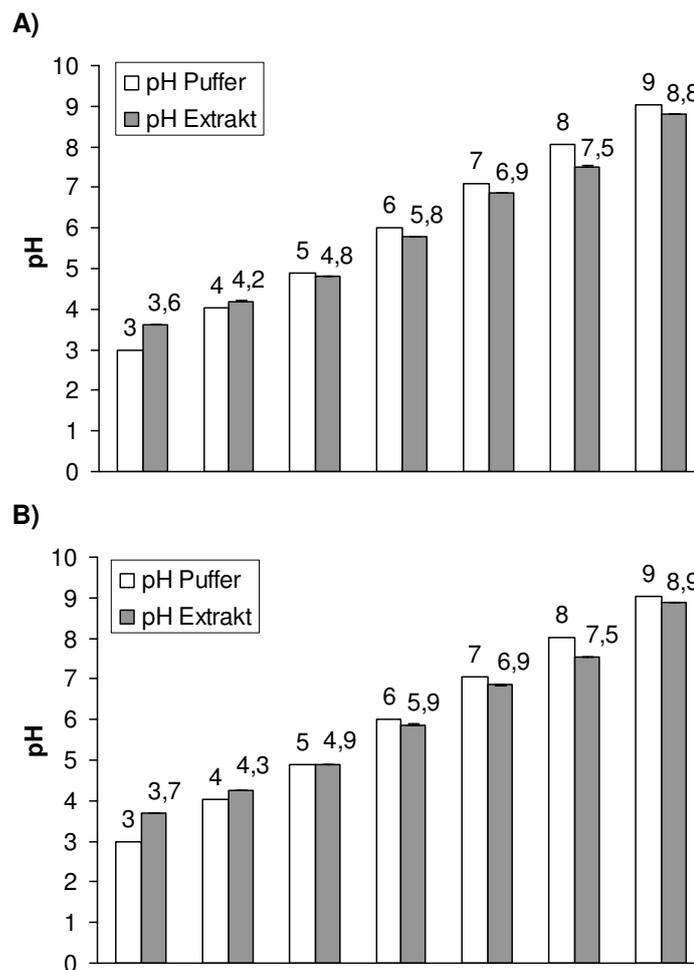


Abbildung 2-12: Veränderung des pH-Wertes von Pufferlösungen nach der Extraktion von gefriergetrocknetem Kartoffelmateriale im Vergleich von **A**) isogenen Kartoffeln (Wildtyp Sorte Albatros) und **B**) transgenem Kartoffelmateriale (PsbY-*cpha*_{T_e} Klon 12 und 23) (weiße Balken: eingestellter pH-Wert vor der Extraktion; graue Balken: gemessener pH-Wert nach der Extraktion)

Wie bereits beim Tabakmateriale beobachtet wurde, ist ein nahezu konstanter pH-Wert bei der Extraktion des Biopolymers von Bedeutung, da andernfalls bei Überschreitung eines pH-Wert von 3 die Extraktion des Cyanophycin nicht mehr durchgeführt werden kann. Daher wurde das Pflanzenmateriale vor der eigentlichen Extraktion wiederum mit 0,1 %iger Natriumhydrogensulfidlösung extrahiert.

2 ERGEBNISSE

In der Kartoffel verarbeitenden Industrie ist Natriumhydrogensulfidlösung außerdem ein weit verbreiteter Zusatzstoff, denn eine besondere Schwierigkeit bei der Aufarbeitung von Kartoffeln liegt in der enzymatischen Bräunung während des Produktionsprozesses. Diese Bräunung wird durch Polyphenoloxidasen hervorgerufen (Weaver 1974). Sie katalysieren die Reaktion von phenolischen Substraten mit Luftsauerstoff zu quinoiden Substanzen (Dörnenburg und Knorr 1997), die der Polymerisation unterliegen können (siehe Abbildung 2-13).

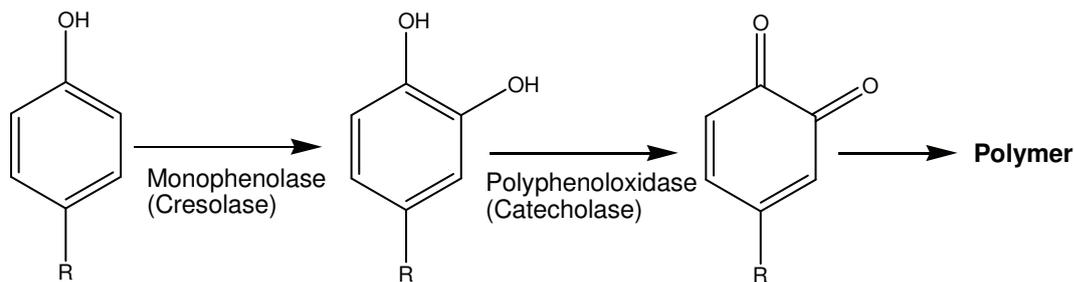


Abbildung 2-13: Reaktionsschema der Polyphenoloxidasen

Die entstehenden polymeren Strukturen sind meist stark gefärbt und besitzen anti-fungale Wirkungen. Sie sind daher wahrscheinlich für den Schutz der Pflanzen von großer Bedeutung und werden bei jeder Beschädigung der Pflanzenhülle gebildet und freigesetzt (Mayer 1987; Thygesen *et al.* 1995). Bei der Verarbeitung von Kartoffelprodukten sind diese Enzyme jedoch unerwünscht. Die gebildeten Verbindungen beeinträchtigen die Qualität der gewonnenen Produkte. Daher ist es unerlässlich, die für die Bräunung verantwortlichen Enzyme während der Verarbeitung der Kartoffeln zu inhibieren bzw. ganz zu zerstören.

In der Industrie wurden dafür verschiedene Lösungen entwickelt, wie zum Beispiel das Arbeiten unter einer Schutzgasatmosphäre aus SO_2 . Hierdurch wird die Oxidation der phenolischen Substrate an den Schnittflächen mit Luftsauerstoff unterbunden (Denniston und Topping 2001). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, verschiedene Inhibitoren direkt in den Aufarbeitungsprozess einzubringen. Bei der Stärkeproduktion wird dem Waschwasser Natriumhydrogensulfid zugesetzt und somit die Reaktion der Polyphenoloxidasen unterdrückt. Durch den Einsatz dieser Verbindung werden die für die unerwünschten Bräunungsreaktionen verantwortlichen Enzyme (Polyphenoloxidasen) inhibiert.

Bei der Isolierung von Cyanophycin aus Kartoffeln können zusätzlich zur Unterdrückung der enzymatischen Bräunung durch die schwach saure Natriumhydrogensulfidlösung (pH=4,15) bereits erste Störsubstanzen entfernt werden. Der pH-Wert der sauren Extraktionslösung bleibt in den folgenden Extraktionsschritten nahezu konstant (z.B. 0,1 M HCl-Lösung vor der Extraktion pH=1,0 und nach der Extraktion

pH=1,4 – 1,5), so dass eine Extraktion des Biopolymers aus der pflanzlichen Matrix gewährleistet ist.

Für die Isolierungsversuche von Cyanophycin aus Kartoffeln wurde neben frischen Kartoffelknollen auch lyophilisiertes Blatt- und Knollenmaterial verwendet. An den entsprechenden Stellen wird separat darauf hingewiesen. Weiterhin wurden im Laufe der experimentellen Untersuchungen Kartoffeln mit unterschiedlichen Genkonstrukten untersucht. Die genauen Erläuterungen zu den einzelnen Konstrukten sind in Kapitel 1.6 zu finden.

Die ersten Versuche wurden, wie schon beim Tabak, an lyophilisiertem Kartoffelmaterial durchgeführt. Zunächst wurde die saure Extraktionsmethode verwendet, um das Polymer aus der pflanzlichen Matrix herauszulösen. Dabei wurden verschiedene Parameter des Isolierungsprozesses untersucht und hinsichtlich der Ausbeute für Cyanophycin optimiert.

2.3.1 Extraktion von Cyanophycin mit verschiedenen Säuren

Aufgrund der Eigenschaften von Cyanophycin hat sich eine saure Extraktion aus der pflanzlichen Matrix als besonders effektiv erwiesen. Für eine großtechnische Anwendung muss bei der Benutzung von Säuren einiges beachtet werden. Die aus dem Laboralltag bekannten Säuren, beispielsweise Salzsäure, haben aufgrund ihrer korrosiven Eigenschaften einen negativen Einfluss auf Stahlbehälter. Bei der Verwendung von Salzsäure müsste die gesamte Isolierung des Biopolymers in korrosionsbeständigen Apparaturen durchgeführt werden und ginge mit einem enormen Kostenfaktor einhergeht.

Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung einer nicht korrosiv wirkenden Säure, um die teuren Investitionskosten für die korrosionsbeständigen Apparaturen sparen zu können. Aus diesem Grund wurde die Extraktion des Biopolymers mit anderen Säuren (Ameisensäure und Schwefelsäure) getestet. Die Konzentration der Säuren wurde entsprechend so gewählt, dass der für die Isolierung von Cyanophycin nötige pH-Wert < 2 eingehalten wurde. Das Ergebnis der Extraktion ist in Tabelle 2-5 dargestellt. Die gewählten Säuren zeigten beim Vergleich eine deutlich geringere Isolierungsausbeute als Salzsäure. Im Gegensatz zu Schwefelsäure konnte mit dieser Säure mehr als das Doppelte extrahiert werden. Die Versuche, das bereits isolierte Cyanophycin in Schwefelsäure wieder aufzulösen, scheiterten ebenfalls an der schlechten Löslichkeit des Biopolymers in dieser Säure.

Ein Grund für die großen Differenzen in der Löslichkeit könnten die pK_s-Werte der einzelnen Säuren sein. Salzsäure ist in der Reihe der getesteten Säuren die stärkste Säure (pK_s= -6). Die Menge des Polymers nach der Isolierung ist nicht allein das wichtigste Kriterium für die Bewertung des Extraktionsprozesses. Zusätzlich ist die Reinheit der isolierten Proben von entscheidender Bedeutung. Die Untersuchungen dazu erfolgten nach der bereits beschriebenen BRADFORD Methode und haben gezeigt, dass nur ein sehr geringer Teil des Isolates Cyanophycin enthält. Für eine

2 ERGEBNISSE

großtechnische Anwendung kommen Ameisensäure und Schwefelsäure daher nicht in Frage. Für einen effektiven Isolierungsprozess muss demnach Salzsäure verwendet werden.

Tabelle 2-5: Vergleich der Extraktionsausbeuten bei Verwendung verschiedener Säuren, mit Angabe der pKs-Werte

Säure	c(Säure) (mol/L)	m(Isolat) (g)	% (Isolat) TM	pKs-Wert	Reinheit (%)	m(Cyanophycin) (g)
Ameisensäure	>0,60	52,80	0,16	3,75	10,61 *	5,60
Schwefelsäure	0,01	24,10	0,07	-3,00	15,47 *	3,73
Schwefelsäure	0,10	86,50	0,27	-3,00	4,20 *	3,63
Salzsäure	0,10	204,70	0,65	-6,00	51,95 *	105,35

* Die Reinheit der isolierten Proben wurde mit der BRADFORD Methode bestimmt.

2.3.2 pH-Wert bei der Fällung des Cyanophycins

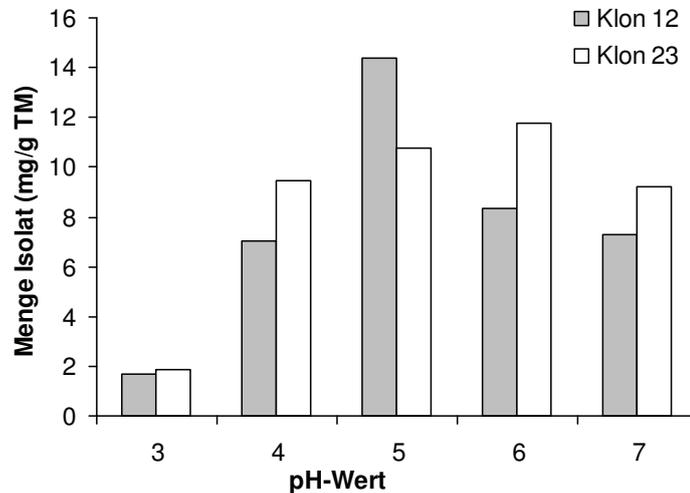
Einen weiteren Aspekt des Isolierungsverfahrens stellte die Fällung des Polymers aus der salzsauren Lösung dar. Auch für diesen Punkt wurden verschiedene Versuche durchgeführt und ein optimaler pH-Wert festgelegt.

Für die Fällung von Proteinen ist der isoelektrische Punkt (*pI*) besonders wichtig. Der *pI* eines Proteins wird durch die an der Proteinoberfläche befindlichen Aminosäuren bestimmt. Am isoelektrischen Punkt ist die Ladung des Proteins nach außen hin neutral. In wässrigen Lösungen kommt es daher aufgrund fehlender Wechselwirkungen mit den Wassermolekülen zur Präzipitation. Simon und Weathers haben 1976 den *pI* von Cyanophycin, isoliert aus Cyanobakterien, mit folgendem Ergebnis bestimmt: Hauptsignal bei pH=4,65 und eine kleinere Bande (2-10 % des Materials) bei pH=6,5. Für die Isolierung von Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem das Polymer bei pH=3, 4, 5, 6 und 7 gefällt wurde.

Alle Versuche wurden als Doppelbestimmung an frischem Knollenmaterial durchgeführt. Aus den Ernten 2007 im Freiland und Gewächshaus standen dazu die transgenen Klone *PsbY-cphA_{Te} 12* und *PsbY-cphA_{Te} 23* für die Isolierungsversuche zur Verfügung. Klon 12 ist eine Hoch-Cyanophycin-produzierende Kartoffellinie, im Gegensatz dazu wird in Klon 23 weniger Cyanophycin akkumuliert. In Abbildung 2-14 ist dieser Unterschied ebenfalls deutlich in den Extraktionsausbeuten zu erkennen. Die größte Ausbeute wird bei der Fällung des Polymers bei einem pH-Wert zwischen 5 und 6 erreicht, das entspricht auch den Erwartungen in Bezug auf den isoelektrischen Punkt. Im Anschluss an die Isolierung der Cyanophycinproben wurde wieder mit Hilfe des BRADFORD Tests die Reinheit bestimmt. Die Proben aus dem Klon 23 wiesen eine deutlich höhere Verunreinigung auf als die Proben aus Klon 12. Die Reinheit der Cyanophycinproben aus Klon 12 lag zwischen 18 und 53 %, bei Klon 23 hingegen nur zwischen 11 und 17 %. Alle Werte wurden noch einmal um diesen

Faktor korrigiert (siehe Abbildung 2-14 **B**). Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuches wurden alle nachfolgenden Untersuchungen bei pH=5 durchgeführt.

A)



B)

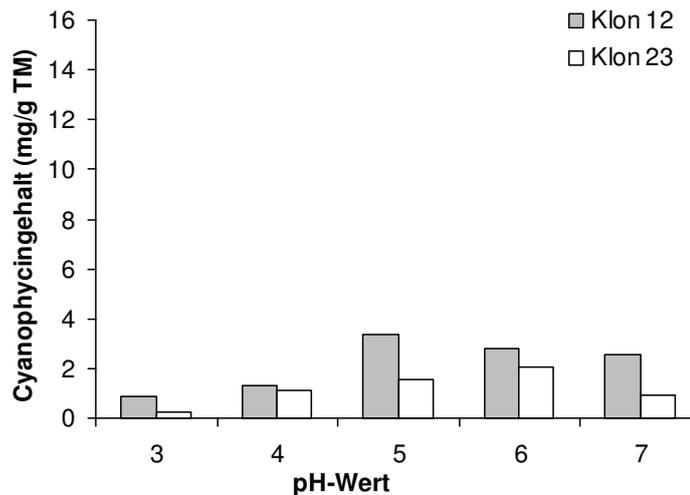


Abbildung 2-14: Darstellung der Extraktionsausbeuten bei verschiedenen pH-Werten von *PsbY-cphA_{Te}* Klon 12 und *PsbY-cphA_{Te}* Klon 23. **A)** Menge Isolat (ausgewogen) **B)** Ausbeute Cyanophycin nach Analyse der Proben mit BRADFORD Assay

Die isolierten Cyanophycinproben wurden nicht nur mit der BRADFORD Methode untersucht. Parallel dazu sind auch Untersuchungen mittels Gelelektrophorese durchgeführt worden. Abbildung 2-15 zeigt das Ergebnis einer solchen Messung. Von links nach rechts steigt der pH-Wert der Fällung von 3 auf 7 an. In Abhängigkeit vom pH-Wert bei der Fällung änderte sich der Anteil an Proteinverunreinigungen. Die Hauptbande zwischen 18 und 25 kDa entspricht Cyanophycin. Dies konnte, ebenso wie in früheren Untersuchungen mit isolierten Proben aus Tabakmaterial, durch einen Verdau mit Cyanophycinase belegt werden (Daten nicht dargestellt). Die normalen Kartoffelproteine werden bei der gewählten sauren Extraktionsmethode

2 ERGEBNISSE

immer mit extrahiert. Kartoffelprotein hat die Eigenschaft, dass umso mehr Protein ausfällt, je saurer die Lösung ist (ausgehend von pH=7). Die maximale Fällung ist bei einem pH-Wert von 5,4 erreicht (Lotz und Eggengoor 2008).

Bei der Charakterisierung von Kartoffelfruchtwasser (KFW) konnten folgende Proteingruppen identifiziert werden: zu rund 38 % besteht Kartoffelprotein demnach aus Patatin, die Gruppe der Protease Inhibitoren macht etwa 50 % des Kartoffelproteins aus, und die restlichen 12 % verteilen sich auf andere Proteine. Neben den Proteinen enthält KFW außerdem freie Aminosäuren, Zucker (15 %/ TM), Mineralien (20 %/ TM), organische Säuren (14 %/ TM) und andere Komponenten wie phenolische Verbindungen (van Koningsveld 2001). In Abbildung 2-15 sind die Proteinverunreinigungen gut zu erkennen. Patatin, das Hauptspeicherprotein der Kartoffel, hat eine Größe von 40 kDa (grün), die Bande >62 kDa entspricht der dimeren Patatinform (Menzel *et al.* 2005). Die schwache Bande bei ~6 kDa kann der in den Kartoffeln vorkommenden Gruppe von Proteaseinhibitoren zugeordnet werden.

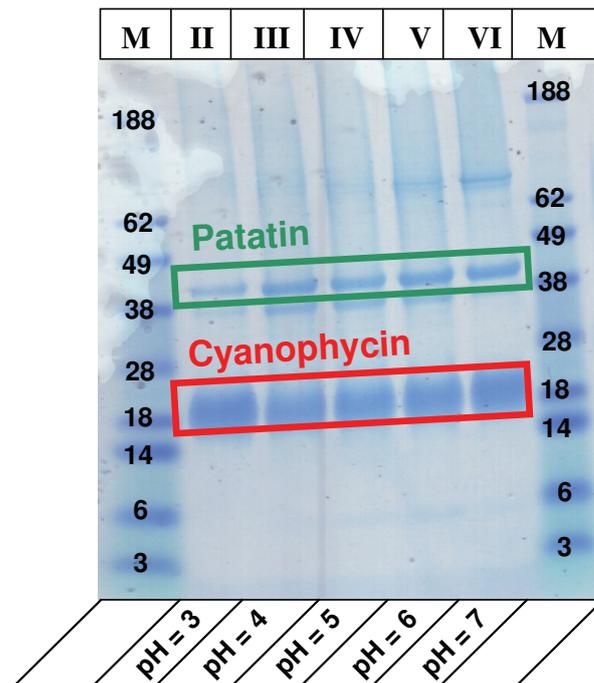


Abbildung 2-15: Gelelektrophorese mit Cyanophycinproben isoliert aus frischen transgenen Kartoffelknollen (PsbY-*cphA*_{Te} Klon23) bei verschiedenen pH-Werten; M: Proteinstandard mit den entsprechenden Größenmarker in kDa

2.3.3 Extraktion von Cyanophycin aus lyophilisiertem Kartoffelblattmaterial

Für die folgenden Versuche wurde lyophilisiertes Blattmaterial des transgenen Kartoffelklons PsbY-*cphA*_{Te} 12 (aus dem Freilandversuch 2008) verwendet. Die Extraktion wurde wie bereits beschrieben zuerst mit Natriumhydrogensulfidflösung

durchgeführt und anschließend folgten jeweils 3 Extraktionsschritte mit Salzsäure bevor die vereinigten Extraktionslösungen mit Natronlauge auf die entsprechenden pH-Werte eingestellt wurden. Die Reinheit der Proben wurden mit Hilfe der BRADFORD Methode ermittelt und ist im Diagramm (Abbildung 2-16 **A**) durch die Differenz zwischen den weißen und grauen Balken dargestellt. Im Gegensatz zur Extraktion des Knollenmaterial ist die höchste Ausbeute bei diesen Versuchen bei pH=4 erreicht worden. Da die Versuche zur Mehrfachextraktion parallel zu diesen Messungen durchgeführt worden sind, wurde dabei die Fällung des Polymers bei pH=5 durchgeführt, so wie es sich nach den bisherigen Ergebnissen als optimal erwiesen hat.

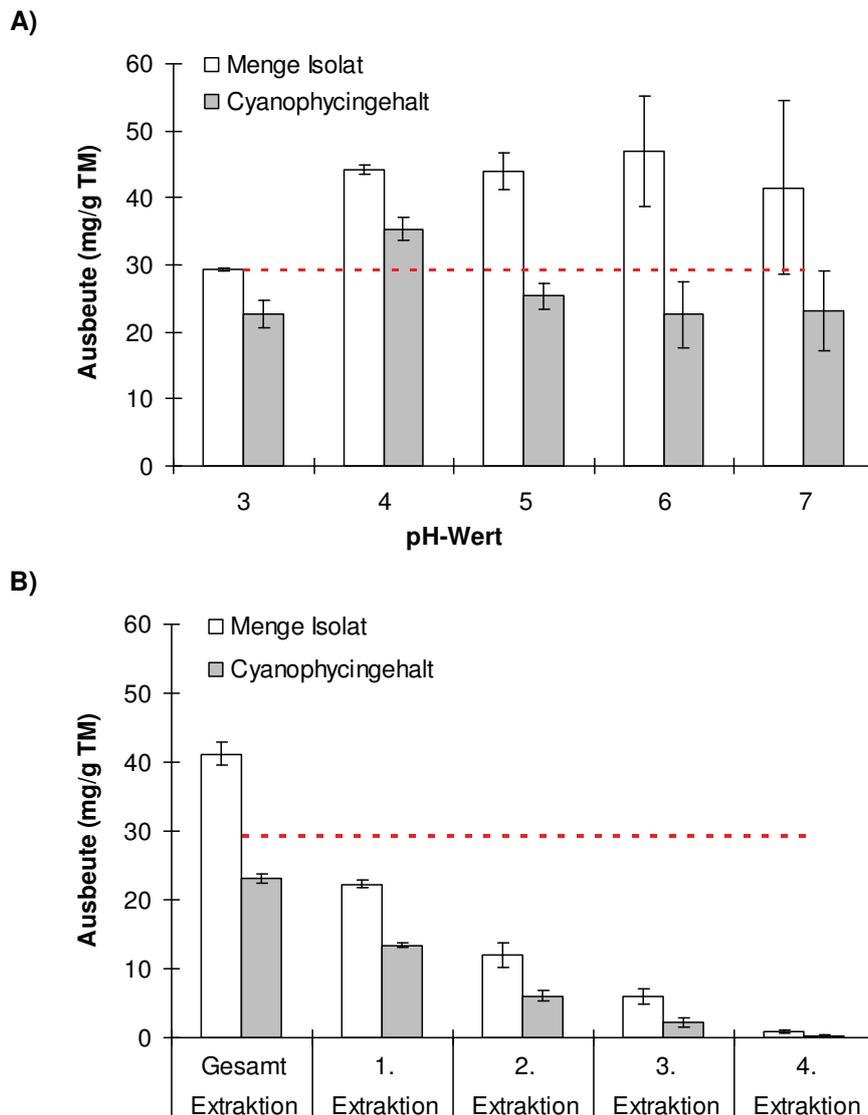


Abbildung 2-16: Extraktion von Cyanophycin aus Kartoffelblatlyophilisat PsbY-*cphA*_{Te} Klon 12 (weiße Balken: Ausbeute ausgewogen, graue Balken: Cyanophycingehalt bestimmt mit BRADFORD Methode; „- -“ mit BRADFORD Methode bestimmter Cyanophycingehalt in den Blättern) **A**) Fällung bei verschiedenen pH-Werten; **B**) Mehrfachextraktion

Die in den Diagrammen **A)** und **B)** dargestellte gestrichelte Linie gibt den im Vorfeld bestimmten Cyanophycingehalt für das eingesetzte Pflanzenmaterial an. Beim Vergleich der Extraktionsausbeuten mit diesem Wert wird deutlich, dass für alle Fällungen zunächst eine höhere Ausbeute erreicht wird, als die Bestimmung des Cyanophycingehaltes vorhergesagt hat. Durch die Bestimmung der Reinheit und einer Korrektur der Cyanophycinausbeuten um diesen Faktor ergibt sich allerdings für alle Fällungen ein geringerer Wert, außer bei pH=4. Die Reinheit der bei pH=4 gefällten Proben ist mit 80 % deutlich höher, als bei den anderen Fällungen. Die Ausbeuten bei den Fällungen zwischen pH=4-6 sind nahezu gleich, allerdings sinkt die Reinheit bei pH=5 bereits auf 60 % und bei pH=6 sogar noch unterhalb von 50 %. Je größer der pH-Wert bei der Fällung des Biopolymers ist, desto näher kommt er dem pI für die übrigen Kartoffelproteine. Die Ausbeute für diese Proteine steigt an, und die Reinheit sinkt.

In Abbildung 2-16 **B)** sind noch einmal die Ergebnisse für eine Mehrfachextraktion abgebildet. Genauso wie bei dem zuvor untersuchten Tabakblattmaterial konnte mit den durchgeführten Extraktionszyklen keine vollständige Isolierung des Biopolymers aus der pflanzlichen Matrix erreicht werden. Insgesamt wurden in 4 Extraktionsschritten nur 75 % des zuvor bestimmten Gesamtcyanophycingehaltes isoliert. Allerdings sind ausgehend von der experimentell isolierbaren Cyanophycinmenge bereits nach dem zweiten Extraktionsdurchgang rund 90 % des Biopolymers isoliert. Alle weiteren Extraktionsschritte sind im Hinblick auf Zeit- und Kostenaufwand genau zu überdenken.

2.3.4 Vergleich saurer Extraktion aus verschiedenen Pflanzenmaterialien

In Abbildung 2-17 ist ein Vergleich der Extraktionsausbeuten für die verschiedenen Pflanzenmaterialien dargestellt.

Alle Versuche wurden mit 0,1 M Salzsäure als Extraktionsmittel durchgeführt. Es ist sehr gut zu erkennen, dass bei den Blattmaterialien mehrere Extraktionsschritte (Tabak = 4 Extraktionen und Kartoffel = 3 Extraktionen) nacheinander ausgeführt werden müssen, um eine nahezu quantitative Ausbeute an Cyanophycin zu erzielen. Bei dem Knollenmaterial hingegen ist ein Extraktionszyklus ausreichend, um über 90 % des extrahierbaren Cyanophycins zu isolieren. Für alle isolierten Cyanophycinproben wurde wieder die Reinheit bestimmt (BRADFORD Methode). In Abbildung 2-17 **B)** sind die korrigierten Ausbeuten an Cyanophycin aus den verschiedenen Pflanzenproben dargestellt.

Die aus dem Tabakmaterial isolierten Proben besitzen nur eine geringe Reinheit von etwa 50 % (siehe auch Kapitel 2.1.1). Die Reinheit sinkt zudem von der 1. Extraktion bis zur 4. Extraktion deutlich ab. Bei den Cyanophycinproben aus Kartoffelblättern ist die Reinheit im Vergleich zum Tabak leicht erhöht. Die Reinheit der ersten Cyanophycinprobe liegt bei etwa 60 %. Bei den anschließenden Extraktionsschritten sinkt die Reinheit wiederum auf etwa 30 %. Die saure Extraktion von Cyanophycin aus

Knollenlyophilisat führt ebenfalls zu verunreinigten Polymerproben. Die Reinheit der Proben für Klon 12 beträgt, angefangen bei der 1. Extraktion, rund 60 % und sinkt für die nachfolgenden Extraktionen auf 10 % bzw. 5 % ab. Für die Cyanophycinproben aus Klon 23 konnte die Reinheit sogar nur mit 35 % bestimmt werden. In den anschließenden Extraktionen fällt die Reinheit auf 25 % bzw. 15 % ab.

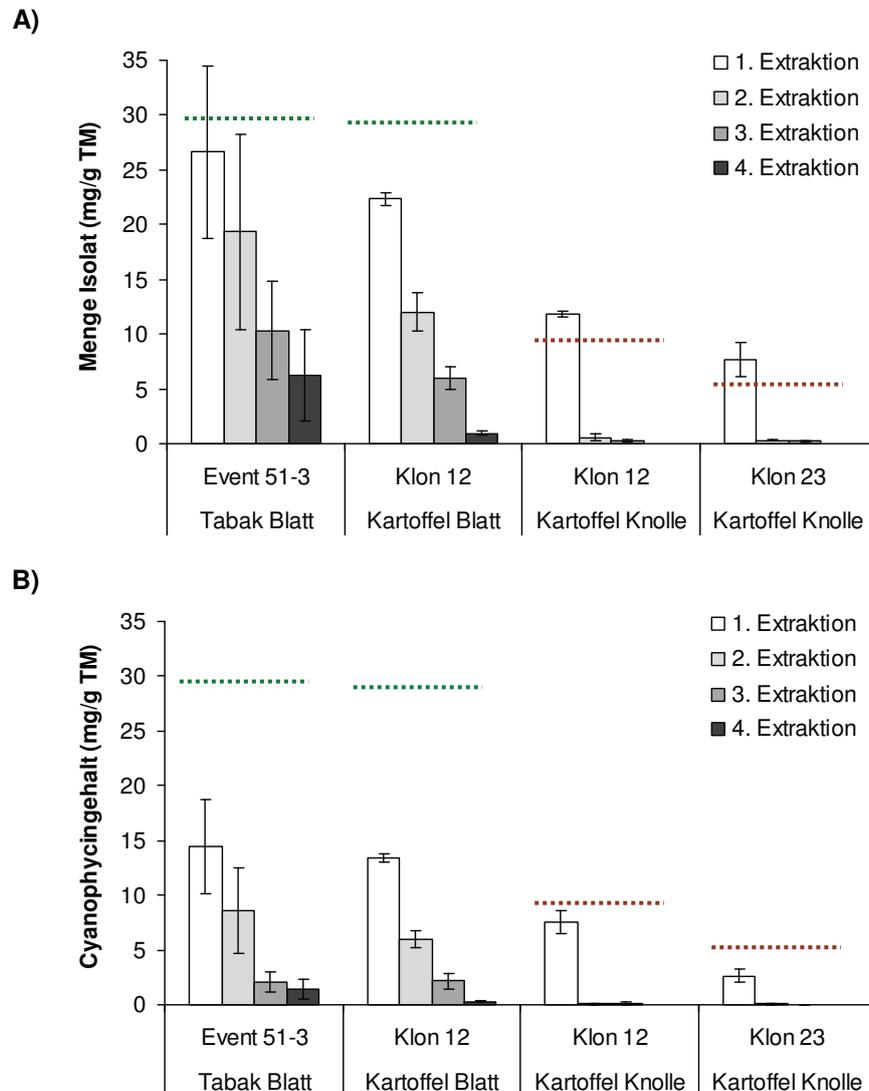


Abbildung 2-17: Vergleich der Ergebnisse aufeinander folgender Extraktionen mit Salzsäure aus lyophilisierten Pflanzenmaterialien (transgene Tabakblätter von *PsbY-cphA_{Te}* Event 51-3 und Kartoffelblätter sowie Knollen von *PsbY-cphA_{Te}* Klon 12 und 23) - „- -“ mit BRADFORD Methode bestimmter Cyanophycingehalte **A)** Menge Isolat (ausgewogen) **B)** Ausbeute Cyanophycin nach Analyse der Proben mit BRADFORD Assay

Bedingt durch die pflanzliche Matrix und ihre vielfältigen Inhaltsstoffe erhält man bei der sauren Extraktion des Biopolymers aus Pflanzen stark verunreinigte Proben. Bei den Verunreinigungen handelt es sich sowohl um andere säurelösliche Proteine (siehe Patatin bei Kartoffeln), als auch um Salzurückstände von der Extraktion oder Chlorophyll bei den Blattmaterialien. Für nachfolgende Anwendungen des Polymers

ist die Reinheit entscheidend. Die Cyanophycinproben müssten im Anschluss an die Isolierung entsprechend aufgereinigt werden. Es sei denn die angeschlossene Weiterverarbeitung wird durch die Verunreinigungen nicht behindert und eine Aufreinigung erfolgt nur für die abschließenden Produkte.

2.3.5 Aufreinigung der isolierten Proben durch Mehrfachfällung

Eine Möglichkeit die Verunreinigung des Zielproteins zu verringern ist die Mehrfachfällung. Dabei wird die bereits ausgefällte Probe in einem geringen Lösungsmittelvolumen wieder aufgelöst und mögliche Störsubstanzen, die dann nicht wieder mit gelöst werden, können abzentrifugiert werden.

Dieses Verfahren wurde auch auf die isolierten Cyanophycinproben angewendet. Mit Hilfe dieser Technik konnte die Reinheit nur geringfügig bzw. gar nicht verbessert werden. Möglicherweise war das verwendete Volumen zum Wiederauflösen zu groß, so dass auch die Verunreinigungen noch gelöst werden konnten.

In Abbildung 2-18 ist ein UV-Spektrum einer cyanophycinhaltigen Probe (—) isoliert aus transgenem Kartoffelmaterial nach dem ersten Lösen und Wiederausfällen, sowie des Rückstandes (—) nach dem ersten Lösen dargestellt.

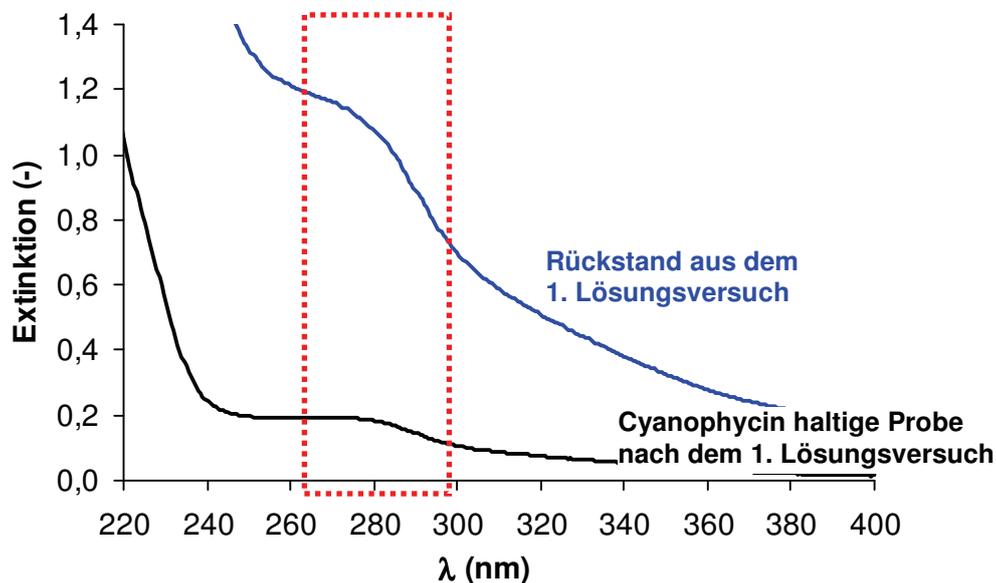


Abbildung 2-18: UV-Spektren von Proben aus dem Versuch der Mehrfachfällung: — cyanophycinhaltige Probe *nach dem* ersten Lösen und Ausfällen; — Rückstand vom ersten Lösen und Ausfällen; - - - Bereich des lokalen Maximums für aromatische Aminosäuren in proteinhaltigen Lösungen

Es ist deutlich erkennbar, dass in dem Rückstand Proteine enthalten sein müssen, denn das Spektrum zeigt ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei einer

Wellenlänge von 280 nm. Allerdings kann man auch in dem Spektrum der aufgereinigten Probe eine geringfügige Absorption bei 280 nm erkennen.

Bereits getrocknetes Cyanophycin weist eine schlechte Rehydrierungsfähigkeit auf. Bei den Versuchen zur Aufreinigung durch Mehrfachfällung ist daher auch immer ein erheblicher Teil des Cyanophycins nicht wieder aufgelöst worden. Dies konnte vor allem mit Gelelektrophorese Untersuchungen bestätigt werden (siehe Anhang Abbildung 7-3).

2.4 Filtration zur Isolierung und Aufreinigung des Cyanophycins

In vielen großtechnischen Lebensmittelverarbeitungsprozessen kommen Filtrationsanlagen zum Einsatz, um die gewünschten Produkte aus verdünnten Prozessströmen aufzukonzentrieren bzw. abzutrennen. Ein Beispiel ist die Verarbeitung von Milch zu Käse und die anschließende Aufbereitung der verbliebenen Molke. Über einen mehrstufigen Filtrationsprozess mit unterschiedlichen Membranmodulen (Mikro-, Ultra- und Nanofiltration) können Molkeproteine sowie Fette und Laktose aus dem Abfallstrom aufgereinigt werden. Mit dieser Erweiterung der Milchverarbeitung kann eine Steigerung des Gewinns erzielt werden (Ulber 2005; Bou-Habib und Thalhammer 2006).

Ein weiteres Beispiel für die Verwendung von Filtrations- bzw. Membrantechniken bei der Verarbeitung von landwirtschaftlichen Produkten ist die Aufreinigung von Kartoffelproteinen aus den Abfallströmen, die bei der Isolierung der Stärke anfallen. Aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung hat Kartoffelprotein einen Ernährungswert ähnlich dem von Ei-Proteinen. Kartoffelprotein weist für alle essentiellen Aminosäuren die von der FAO empfohlenen Gehalte auf (FAO 1973; Knorr *et al.* 1977) und ist besonders reich an Lysin. Damit könnte es als Ergänzung für die lysinarmen Proteine aus Getreide dienen (Knorr 1978).

2.4.1 Isolierung von wasserlöslichem Cyanophycin

Neben der bisher hauptsächlich betrachteten wasserunlöslichen Cyanophycinform existiert in den untersuchten Pflanzen auch eine in Wasser lösliche Form des Polymers (Neumann *et al.* 2005). Nach dem Verarbeitungsschema für Kartoffeln (siehe Abbildung 2-22) befindet sich diese Form des Cyanophycins zusammen mit den anderen Kartoffelproteinen in dem Waschwasser, das beim Auswaschen der Stärke anfällt.

In herkömmlichen Kartoffelverarbeitungsprozessen werden die Proteine anschließend durch Hitzeokoagulation ausgefällt und von den restlichen Bestandteilen des Kartoffelwaschwassers (KWW) abgetrennt. Das erhaltene Kartoffelprotein ist aufgrund der Hitzebehandlung schlecht in Wasser löslich und kann nur schwer

weiterverarbeitet werden (Knorr 1980). Neuere Verfahren verwenden Zyklontechniken (Sprühtrocknung) bzw. fällen das Kartoffelprotein bei schwach sauren pH-Werten aus.

Für eine separate Nutzung des wasserlöslichen Cyanophycins müsste das Polymer von den restlichen Kartoffelproteinen und anderen Substanzen aus dem KWW abgetrennt werden. Die Versuche zur Filtration des KWW und einer Abtrennung des Cyanophycins sowie der anderen Kartoffelproteine waren nicht zufriedenstellend. Trotz langwieriger Filtrationen (über mehrere Tage) konnte der Proteingehalt in dem erhaltenen Sprühtrocknerrückstand lediglich von 3 % auf etwa 10 % gesteigert werden. Die verwendete Filtrationsanlage von Osmota (siehe Abbildung 7-1) ist für diese Versuche nicht geeignet.

Für die weitere Trennung des Cyanophycins von den restlichen Kartoffelproteinen wurden zuerst verschiedene Standardproteine zur Charakterisierung der verwendeten Membranen filtriert. Dabei zeigte sich, dass eine exakte Abtrennung der Proteinfraction (besonders Cyanophycin rund 18 und 28 kDa und Patatin rund 40 kDa) sehr schwierig sein würde, da eine genaue Trennung in diesem Bereich nicht möglich ist (siehe Kapitel 2.4.2). Im Hinblick auf den sehr geringen Anteil an wasserlöslichem Cyanophycin in den Kartoffeln wurden die Versuche zur Isolierung dieser Polymerform nicht weiter verfolgt.

2.4.2 Filtration von Standardproteinen

Nachdem mit verschiedenen Methoden (Gelelektrophorese, BRADFORD Messungen) die Reinheit der isolierten Cyanophycinproben untersucht worden ist, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit eine Möglichkeit gefunden werden, die Reinheit des Produktes aus der direkten sauren Extraktion zu erhöhen. Mit den Versuchen zur Mehrfachfällung des isolierten Biopolymers konnten in diesem Zusammenhang keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Daher wurde die Filtration als Methode zur Aufreinigung des Cyanophycins untersucht.

Man unterscheidet bei der Filtration je nach Größe der Membranporen zwischen Nano-, Mikro- oder Ultrafiltration. Die Nanofiltration wird bspw. zur Aufbereitung von Trinkwasser genutzt, um Schwermetallionen abzutrennen. Bei der Ultrafiltration werden Substanzen mit einer Partikelgröße von 0,01 bis 0,1 μm voneinander getrennt. Für die Filtration von Partikeln zwischen 0,1 und 0,5 μm oder größer wird die Mikrofiltration verwendet.

Für die Abtrennung von Proteinen aus den isolierten Cyanophycinproben wurde eine Ultrafiltrationsanlage (siehe Abbildung 7-2) eingesetzt. Ein wichtiges Kriterium für die Auswahl der Membran ist deren Säure- bzw. Laugenbeständigkeit. Die gewählten Membranen sind über einen pH-Bereich von 1-11 stabil, so dass eine Filtration mit 0,1 M Salzsäure ohne Probleme durchgeführt werden kann. Die Ultrafiltrationsmembran besteht aus Cellulose als Trägersubstanz und ist in verschiedenen Ausführungen hinsichtlich der Ausschlussgrenze (*molecular weight cut offs* - MWCO)

zu erhalten. Der MWCO einer Membran bezeichnet den Grenzbereich bei der Filtration, der die Substanzen in filtrierbar und nicht filtrierbar trennt. Eine Membran mit einem *cut off* von 10 kDa sollte demnach alle Proteine, die größer als 10 kDa sind, zurückhalten (Rückhalt laut Hersteller > 90 %). Um diesen Bereich für die getesteten Membranen besser einschätzen zu können, wurden zuerst verschiedene Standardproteine mit bekannter molarer Masse filtriert (siehe Tabelle 2-6). Die Versuche zeigten, dass die Trennung über die Membran nicht exakt ist. Bei der Filtration von Proteinen und höher molekularen Substanzen ist nicht nur die Molmasse entscheidend, sondern auch die äußere Form der filtrierten Partikel (Faltung), die Wechselwirkung mit der Membranoberfläche (Ladung), der gewählte Überdruck und das Filtrationsvolumen sowie das Vorhandensein einer möglichen Hydrathülle um das Molekül (Ulber 2002).

Am Beispiel von Pepsin ist dies gut zu erkennen (siehe Tabelle 2-6). Obwohl die Ausschlussgrenze der Membran mit 30 kDa unterhalb der Molekülgröße liegt, können mit dieser Membran nur 57,5 % des Proteins zurückgehalten werden. Erst bei einer Membran mit einem MWCO von 20 kDa kann der Rückhalt des Proteins auf über 80 % erhöht werden. Myoglobin mit einer Größe von 18 kDa wird mit dieser Membran nur zu 36,6 % zurückgehalten. Aus Pflanzen isoliertes Cyanophycin liegt im Größenbereich von 18 bis 25 kDa. Unter der Annahme eines ähnlichen Filtrationsverhaltens wie bei den Standardproteinen beobachtet, sollte die Membran für Cyanophycin zum überwiegenden Teil durchlässig sein.

Tabelle 2-6: Filtration von Standardproteinen (p=1 bar Argonüberdruck)

Protein	Größe (kDa)	Ausschlussgrenze (kDa)	Rückhalt (%)
Myoglobin	18	30	0,9
Pepsin	35	30	57,5
BSA	62	30	83,1
Myoglobin	18	20	36,6
Pepsin	35	20	83,0

Die Ergebnisse der Filtrationsversuche mit verschiedenen Standardproteinen zeigen, dass die Filtration der isolierten Cyanophycinproben mit einer Ultrafiltrationsmembran mit einem MWCO von 20 kDa effektiv möglich ist. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Versuche zur Filtration der verunreinigten Polymerproben mit dieser Membran durchgeführt.

2.4.3 Aufreinigung von Cyanophycinproben

Bei der Auswertung der SDS-Gelelektrophorese wurde das Kartoffelprotein Patatin (40 kDa) als Hauptverunreinigung in den isolierten Cyanophycinproben identifiziert.

2 ERGEBNISSE

Die Filtrationseigenschaften sollten bei identischen Bedingungen vergleichbar mit denen für Pepsin sein. Die im Vorfeld ausgewählte Membran mit einem MWCO von 20 kDa sollte für eine Abtrennung des Patatins geeignet sein. In Abbildung 2-19 ist der Rückhalt während der Filtration mit einer 20 kDa Membran schematisch dargestellt.

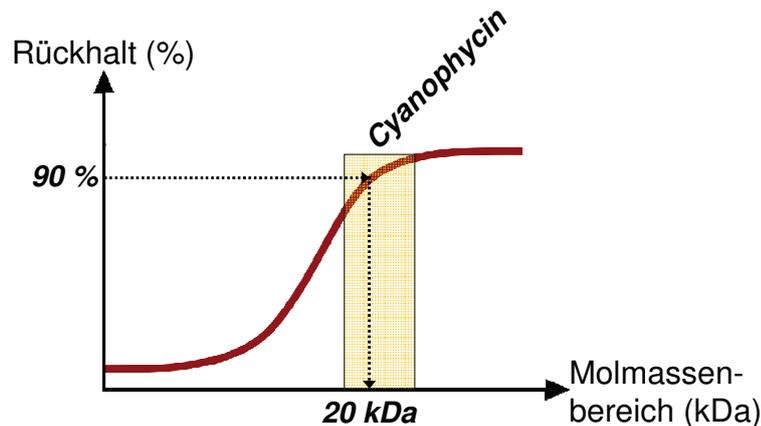


Abbildung 2-19: Schematische Darstellung des Rückhalts bei der Filtration am Beispiel einer Membran mit 20 kDa Ausschlussgröße (Cyanophycin Molmasse zwischen 18 bis 25 kDa)

Die Funktion des Rückhalts in Abhängigkeit zur Molekülgröße der filtrierten Teilchen wird durch eine sigmoide Kurve beschrieben. Die Membran mit einer Ausschlussgrenze von 20 kDa weist für die Teilchen mit einer Molekülgröße von 20 kDa lediglich einen Rückhalt von 90 % auf. Eine Filtration dieser Teilchen ist nicht unmöglich, aber erschwert. Cyanophycin ist ein polydisperses Molekül (siehe Kapitel 1.5) mit einer Molmassenverteilung zwischen 18 bis 25 kDa. Bei der gewählten Membran ist ein großer Rückhalt zu erwarten. Für das größere Fremdprotein Patatin sollte die Membran jedoch noch undurchlässiger sein.

Mit Hilfe der verwendeten Ultrafiltrationsmembran (MWCO 20 kDa) konnte keine vollständige Abtrennung des Patatins erreicht werden. Die Filtration erfolgte in 5 mL Schritten. Anschließend wurden die Filtrate mit Hilfe eines Photometers bezüglich ihrer Reinheit untersucht. In allen Spektren ist noch immer eine schwache Absorptionsbande bei ~280 nm zu erkennen (Daten nicht dargestellt). Dies ist ein Anzeichen für die Verunreinigung der Cyanophycin-Filtrate mit anderen Proteinen. Über den betrachteten Filtrationszeitraum (Filtrationsvolumen 225 mL – 3,75-mal das Anfangsvolumen vollständig erneuert, Filtrationszeit etwa 9 h) konnte außerdem keine vollständige Abtrennung des Biopolymers aus der sauren Lösung erzielt werden (siehe Abbildung 2-20). In dem Diagramm sind sowohl die Anfangs- und Endkonzentrationen des Biopolymers, als auch die Menge an Cyanophycin aus den 5 mL Filtraten aufgetragen. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der BRADFORD Methode, die filtrierten Cyanophycinmengen durch Auswaage der ausgefällten und getrockneten Niederschläge aus den Filtraten bestimmt. Die Endkonzentration

stimmt sehr gut mit der abfiltrierten Cyanophycinmenge überein. Die Berechnung ergab einen Restanteil von 39,9 % Cyanophycin im Retentat nach Abbruch der Filtration.

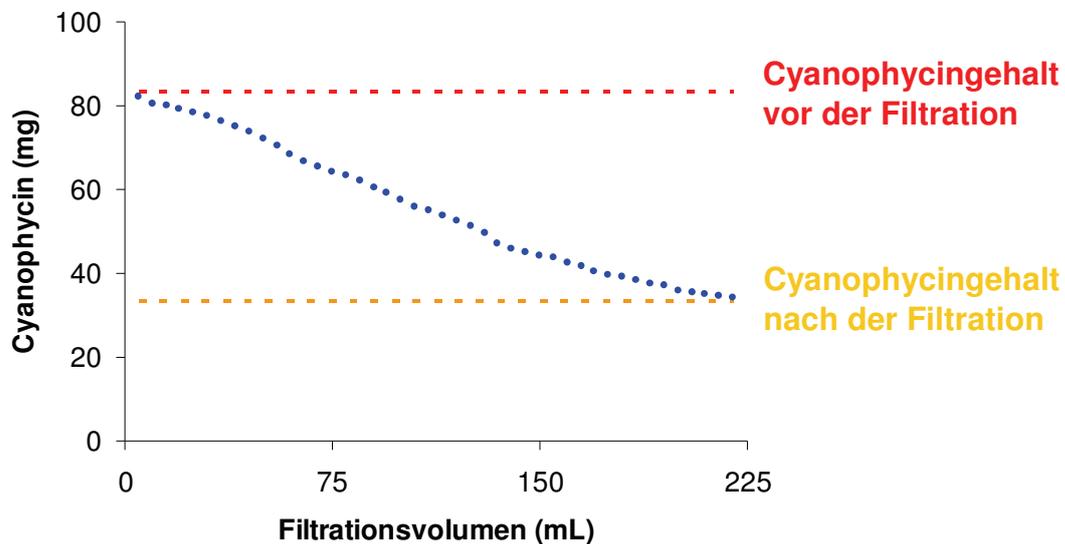


Abbildung 2-20: Abnahme des Cyanophycingehaltes bei der Filtration in Abhängigkeit des filtrierten Volumens („•••“ Menge an abfiltriertem Cyanophycin nach entsprechendem Filtrationsvolumen, ausgefällt und ausgewogen) – Cyanophycingehalte vor und nach der Filtration bestimmt nach der BRADFORD Methode

Mit Hilfe von Gleichung 2-1 kann über den Restanteil und die Anzahl ausgetauschter Volumina bei der Filtration der Rückhalt einer Membran für die betrachtete Substanz berechnet werden.

$$\frac{c}{c_0} = e^{-(1-R) \cdot \Theta} \quad (\text{Gl. 2-1})$$

c – Konzentration, c_0 – Anfangskonzentration, R – Rückhalt, Θ – Anzahl der Volumina bei der Filtration

Die Berechnung für das gewählte Experiment ergab einen Rückhalt von 75,5 % für die 20 kDa Membran. In Abbildung 2-21 sind einige Rückhaltekurven in Abhängigkeit vom Restanteil und der Anzahl der Filtrationsvolumina aufgetragen. Für eine quantitative Filtration des Biopolymers müsste das Volumen der Filtrationsanlage mehr als 15mal durch Zusatz von frischem Lösungsmittel (0,1 M Salzsäure) ausgetauscht werden. Für diesen Ansatz sind die gewählte Filtrationsapparatur und -bedingungen nicht geeignet. Die Filtration wäre zu zeitaufwendig. Durch den Einsatz eines größeren Vorratsbehälters (größere Membranfläche) sowie die Anwendung höherer Drücke könnte eine effektivere Filtration erreicht werden. Die kontinuierliche

Einspeisung von frischem Lösungsmittel (0,1 M HCl) würde ebenfalls zu einer höheren Effektivität der Filtration führen. Diese Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt.

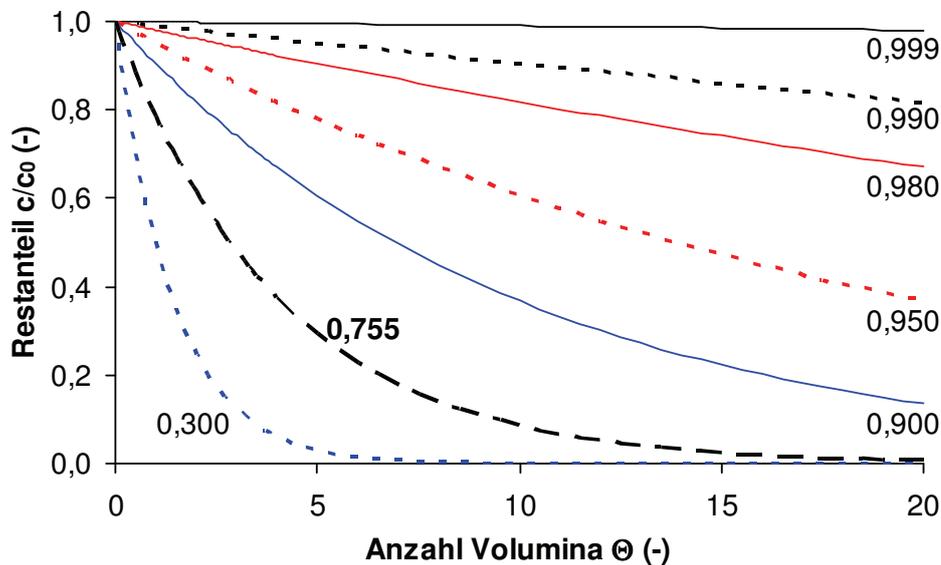


Abbildung 2-21: Darstellung verschiedener Rückhaltekurven bei der Membranfiltration in Abhängigkeit vom Restvolumen und der Anzahl der Filtrationsvolumina (Beschriftung des jeweiligen Rückhaltes direkt an den Kurven)

Aufgrund der in den folgenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse kann allerdings auf eine Abtrennung von Fremdproteinen bei der Isolierung von Cyanophycin verzichtet werden. Entscheidend scheint die Filtration hinsichtlich Verunreinigungen im niedermolekularen Bereich. Daher wird in Zukunft die Abtrennung solcher Substanzen von größerem Interesse sein. Tests mit weiteren Membranen mit den entsprechenden Eigenschaften sind folglich nötig.

2.5 Kopplung der Extraktion von Cyanophycin aus transgenen Kartoffelknollen mit einem großtechnischen Prozess

Bedingt durch die saure Extraktion des Polymers aus pflanzlicher Matrix können die Pflanzenreste schlecht für weitere Anwendungen genutzt werden. Die Extraktion von Cyanophycin aus den Pflanzen würde sich nur bei sehr hohen Preisen für das Endprodukt bzw. hohen Polymergehalten in den Pflanzen rentieren. Der effektivere Ansatz für die Produktion des Polymers in Pflanzen ist eine mögliche Doppelnutzung der Pflanze. Bei der Zielpflanze Kartoffel soll neben der normalen Stärkeproduktion das Polymer isoliert werden und somit ein Zugewinn bei der Verarbeitung der Kartoffeln entstehen, was anfallende Mehrkosten in der Prozesserweiterung

rechtfertigt. Für die Aufarbeitung des Polymers wurde daher neben der sauren Extraktion ein weiteres Verfahren entwickelt.

Nach eingehenden Analysen von großtechnischen Kartoffelverarbeitungsprozessen konnte folgendes Schema (Abbildung 2-22) für die Aufarbeitung von Kartoffeln bei der Stärkeproduktion entwickelt werden (Holm 1980; Westfalia Separator Industry 2006). Dieser Prozess wurde als Grundlage der Versuche für ein gekoppeltes Stärke- und Cyanophycin-Isolierungsverfahren aus transgenen Kartoffelknollen verwendet.

Aus den Eigenschaften des Biopolymers Cyanophycin ergibt sich nur ein Abschnitt im Prozess, an dem eine Abtrennung der wasserunlöslichen Cyanophycinform sinnvoll erscheint (Abbildung 2-22: **rote** Beschriftung). Die wasserlösliche Form des Polymers geht mit den restlichen Kartoffelproteinen in die Waschlösung über, mit deren Hilfe die Stärke aus den aufgebrochenen Zellen ausgewaschen wird. Die Form des Cyanophycins, die nur in wässrigen Lösungen bei pH-Werten kleiner 2 oder größer 9 löslich ist (Frey *et al.* 2002), wird zusammen mit den Stärkekörnern aus den Zellen ausgespült.

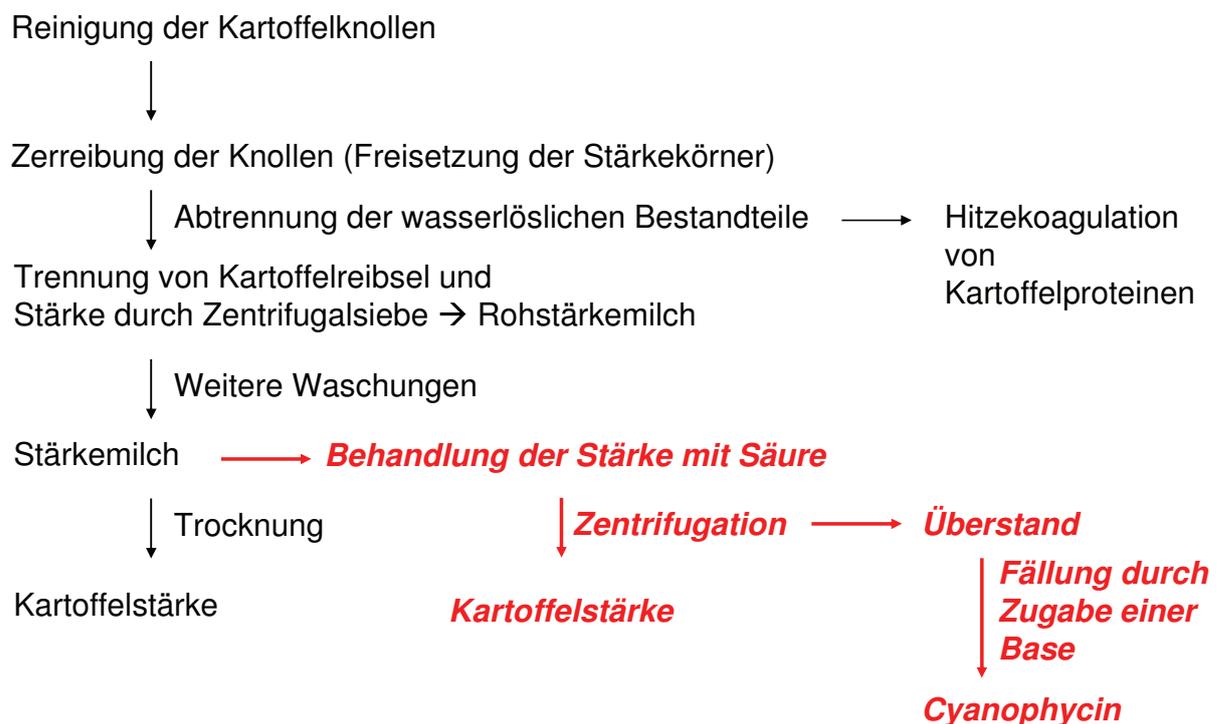


Abbildung 2-22: Schematische Darstellung der industriellen Verarbeitung von Kartoffelknollen bei der Stärkeproduktion – **rot** = mögliche Angliederung der Cyanophycin-Isolierung

Für eine weitere Aufreinigung der wasserunlöslichen Form muss in einem zweiten Schritt die abzentrifugierte und getrocknete Stärke mehrfach mit verdünnter Säure gewaschen werden. Dadurch erfolgt die Abtrennung des Cyanophycins von der

2 ERGEBNISSE

Stärke. Anschließend muss die saure Lösung mit Natronlauge neutralisiert werden, um das Polymer wieder auszufällen. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und mit Hilfe einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Für die letzten Schritte kann auf die bereits optimierten Parameter von der sauren Extraktion zurückgegriffen werden (siehe Kapitel 2.3). Der pH-Wert bei der Fällung beträgt demnach 5 und die vorangegangene saure Extraktion der Stärke erfolgt mit Salzsäure.

Auch im Falle des im Labormaßstabs entwickelten Stärkeverarbeitungsprozesses der Kartoffeln ist der Zusatz von Inhibitoren wichtig (siehe Anfang Kapitel 2.1). Hierbei geht es weniger um die Qualitätssicherung als darum, eine Oxidation des Cyanophycins mit den quinoiden Substanzen zu vermeiden. Es ist bekannt, dass die quinoiden Verbindungen nicht nur zur Reaktion untereinander neigen, sondern auch Reaktionen mit Aminosäuren und reduzierenden Zuckern denkbar sind (Robertson und Christensen 1996). Dies würde zu einem Abbau des Biopolymers führen, welches bekanntermaßen nur aus Arginin- und Aspartateinheiten besteht. Daher wird, wie bei der großtechnischen Kartoffelverarbeitung üblich, dem Waschwasser Natriumhydrogensulfit zugesetzt.

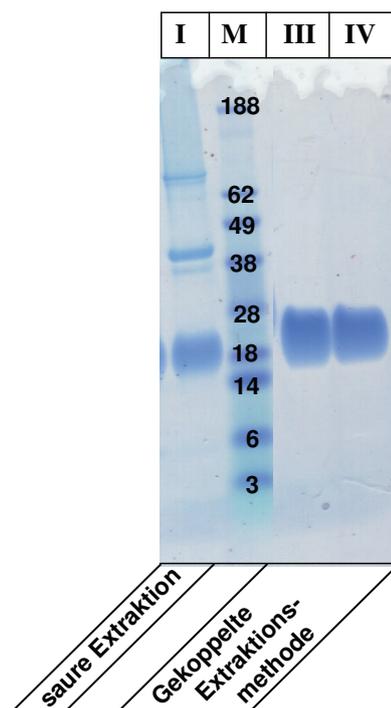


Abbildung 2-23: Gelelektrophorese von Cyanophycinproben isoliert aus frischen Kartoffelknollen *PsbY-cphA_{Te}* Klon 23 mit direkter saurer Extraktion und *PsbY-cphA_{Te}* Klon 10 nach der gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsmethode **M**: Proteinstandard mit Größenmarker in kDa

Abbildung 2-23 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese für den Vergleich von direkt mit Säure extrahiertem Cyanophycin und zwei Proben, die nach der

gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsmethode isoliert wurden. Die Polymerproben wurden zum einen aus frischen Kartoffelknollen PsbY-*cphA*_{Te} Klon 23 und für die neue Isolierungsmethode aus Knollen des PsbY-*cphA*_{Te} Klons 10 isoliert. Die Cyanophycinproben aus beiden Isolierungsverfahren weisen eine ähnliche Größenverteilung über denselben Molmassenbereich auf. Im Gegensatz zu den Proben von der direkten Extraktion mit Säure sind bei den anderen beiden Proben keine zusätzlichen Banden zu erkennen. Für alle Ansätze bei der Gelelektrophorese wurde dieselbe Menge isoliertes Polymer eingewogen. Die unterschiedlichen Reinheiten sind deshalb auch in der Intensität der Cyanophycinbande erkennbar. Für die Probe in der Geltasche I ist die Bande deutlich schwächer ausgeprägt als für die Proben in den anderen Geltaschen. Mit der BRADFORD Methode konnte die Reinheit der Proben aus dem gekoppelten Verfahren mit $\geq 90\%$ bestimmt werden. Damit wird durch das gekoppelte Verfahren ein sehr viel sauberes Produkt erhalten, als es mit der direkten sauren Extraktion möglich ist.

Das Ergebnis des gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsverfahrens ist in Abbildung 2-24 dargestellt. Sie zeigt aus gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen (PsbY-*cphA*_{Te} Klon 12) isoliertes Cyanophycin, als weißes Pulver nach dem Gefrier-trocknen und Zermahlen der isolierten Proben.



Abbildung 2-24: Beispiel für isoliertes Cyanophycin aus der transgenen Kartoffeln (PsbY-*cphA*_{Te} Klon 12) – extrahiert mit gekoppelter Stärke-Cyanophycin-Isolierungsmethode

2.5.1 Stärkestabilität unter Säureeinfluss

Während des gekoppelten Stärke- und Cyanophycin-Isolierungsprozesses muss die Stärke über einen längeren Zeitraum mit verdünnter Salzsäure behandelt werden, um das Biopolymer von der Stärke abzutrennen. Da die Stärke das Hauptprodukt des Verfahrens ist, darf durch die Kopplung mit einem neuen Prozess keine Beeinträchtigung der Stärkequalität auftreten.

Um den Einfluss der Säure auf die Stärkekörner und einen eventuellen Abbau der Stärke zu untersuchen, wurde zuvor isolierte Stärke mit verdünnter Salzsäure behandelt und die Lösung anschließend chromatographisch untersucht. Dazu wurden drei Versuche parallel bei unterschiedlichen Temperaturen (30 °C, 45 °C und 60 °C) durchgeführt, da die genauen Temperaturen während des Stärkeisolierungsprozesses nicht sind. Somit kann auch der Einfluss der Säure in Abhängigkeit von

2 ERGEBNISSE

der Temperatur betrachtet werden. Bei den Versuchen, die bei 30 °C und 45 °C durchgeführt wurden, konnte innerhalb des Versuchszeitraumes von sechs Stunden keine Zersetzungs- bzw. Spaltungsprodukte gemessen werden (siehe Abbildung 2-25). Die Chromatogramme spiegeln dasselbe Bild wieder, wie es für reine verdünnte Salzsäure gemessen werden konnte.

Das bei der Durchsicht der Spektren konstante Signal bei einer Retentionszeit von 6,1 min ist das RI-Signal von Salzsäure (RT= 6,06 min). Der Eluent, der für die chromatographische Messung benutzt wurde, besteht lediglich aus Reinstwasser. Unterscheidet sich der Brechungsindex einer Substanz von dem des Eluenten, dann wird mit Hilfe des RI-Detektors ein Signal gemessen. Daher kann auch die in der Probelösung enthaltene verdünnte Salzsäure bestimmt werden.

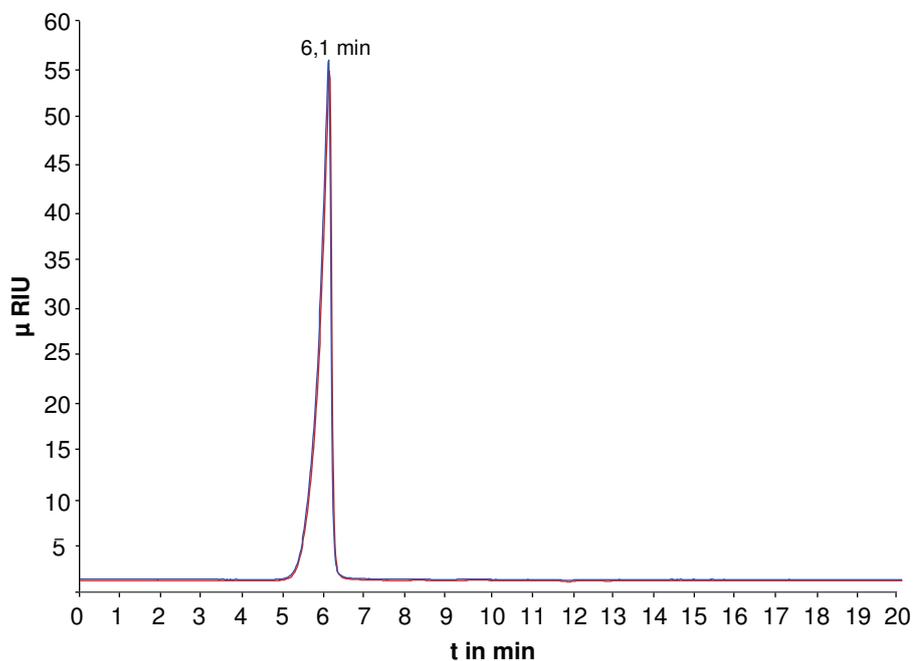


Abbildung 2-25: HPLC-Chromatogramme für die Stabilitätsversuche von Stärke in verdünnter Salzsäure bei 30 °C (rot) und 45 °C (blau) – RI-Signal bei RT = 6,1 min von verdünnter Salzsäure

Für den Stabilitätsversuch bei 60 °C konnten bereits nach einer Stunde mit Hilfe der chromatographischen Messungen erste Zersetzungsprodukte der Stärke nachgewiesen werden (siehe dazu Abbildung 2-26).

Die nur aus glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten bestehenden Stärkekettchen, die unter Einfluss von Temperatur und Säure in Zuckerdimere und -monomere aufgespalten werden können, liefern zusätzlich zu dem Signal der verdünnten Säure weitere Signale in den HPLC-Chromatogrammen. Bei der Hydrolyse von Stärke können Maltose und Glucose freigesetzt werden (siehe Abbildung 2-27).

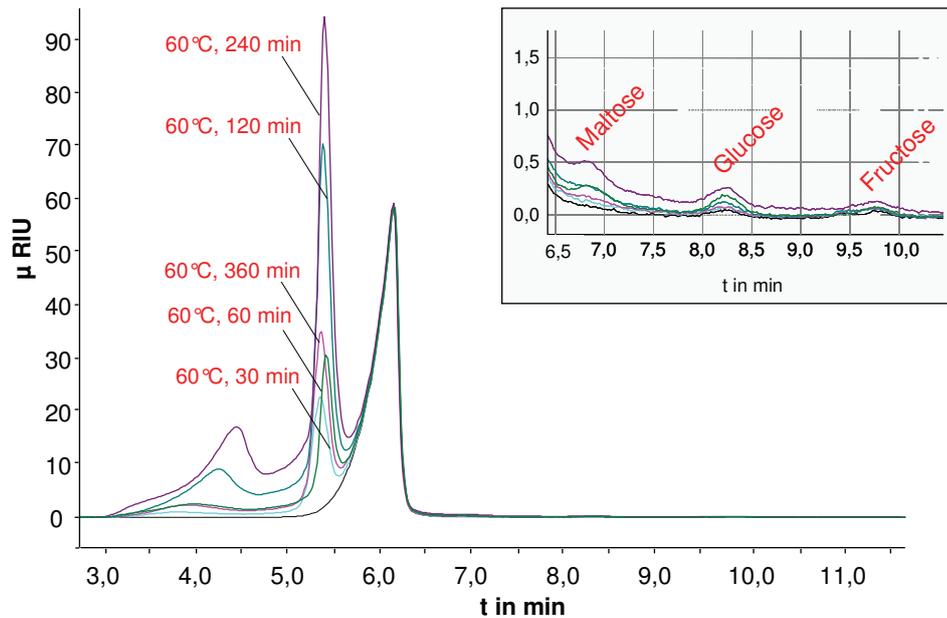


Abbildung 2-26: HPLC-Chromatogramme für die Stabilitätsversuche von Stärke in verdünnter Salzsäure bei 60 °C zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuches - Vergrößerung des Chromatogrammausschnitts zwischen 6,5 bis 10,0 min zeigt die Signale für die Zersetzungsprodukte Maltose, Glucose und Fructose

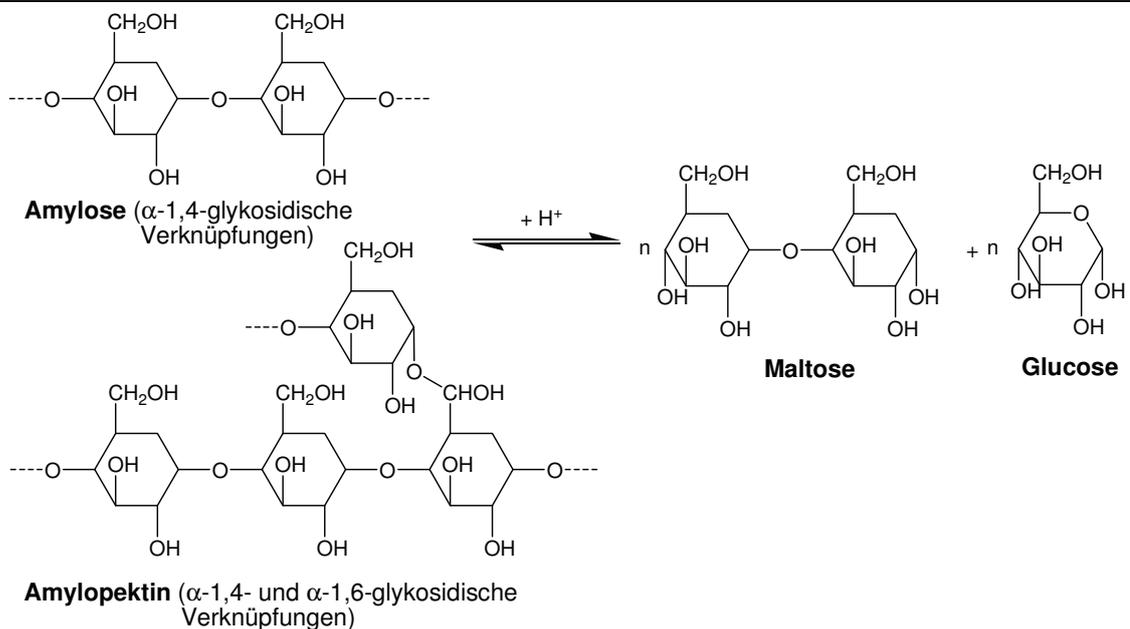


Abbildung 2-27: Schematische Darstellung der sauren Hydrolyse von Stärkemolekülen zu Maltose und Glucose

Die Signale in den Chromatogrammen konnten über einen Vergleich mit Referenzsubstanzen eindeutig Maltose (RT= 6,8 min), Glucose (RT= 8,2 min) und Fructose (RT= 9,8 min) zugeordnet werden. Das Signal für Fructose lässt sich nur durch die

Umlagerung der frei werdenden Glucosemoleküle über die offenkettige Aldoseform in die Ketoform (siehe Abbildung 2-28) erklären (Angyal 2001).

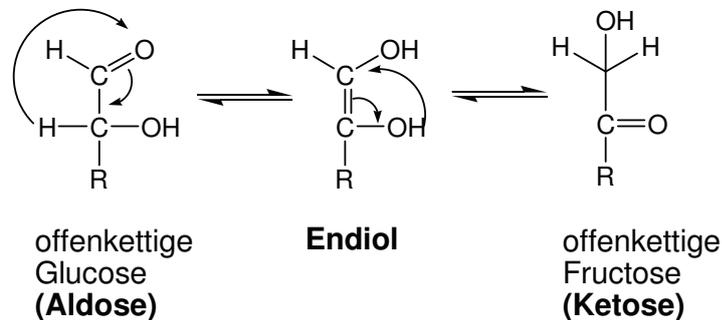


Abbildung 2-28: Umlagerung von Glucose (Aldose) zu Fructose (Ketose) über eine Endiol-Form

Die Stärke ist bei Betriebstemperaturen bis zu 45 °C über viele Stunden hinweg gegenüber verdünnter Salzsäure stabil. Die Kopplung eines sauren Isolierungsverfahrens mit der Stärkeproduktion aus Kartoffelknollen scheint für das Hauptprodukt Stärke aus diesem Grund keine negativen Auswirkungen zu haben.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zur Stabilität von Stärke gegenüber Säure berücksichtigen nicht die möglichen Veränderungen in den Eigenschaften der Stärke. Durch die Behandlung mit Säure könnte sich bspw. das Lösungsverhalten oder die Reaktionsfähigkeit der Stärke gegenüber chemischen Reagenzien verändern. Diese Eigenschaften sind für die stärkeverarbeitende Industrie von großer Bedeutung und müssen noch untersucht werden.

2.6 Betrachtung der Gesamtstickstoffgehalte von Cyanophycin produzierenden Tabak- und Kartoffelpflanzen

Neben den Arbeiten zur Isolierung von Cyanophycin aus transgenem Pflanzenmaterial wurden innerhalb des Verbundprojektes „Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffelknollen“ auch Untersuchungen zum Gesamtproteingehalt in transgenen Pflanzen in Abhängigkeit von den einzelnen transgenen Konstrukten, der Anbaufläche (GWH oder FL) und der Stickstoffgabe während der Wachstumsperiode durchgeführt.

Im Laufe des Projektes wurden sowohl Tabakpflanzen als auch Kartoffelpflanzen untersucht. Der Gesamtproteingehalt wurde über die Ermittlung des Gesamtstickstoffgehaltes zuerst mit Hilfe der Elementaranalyse und später nach der Methode von Kjeldahl (Kjeldahl 1883) bestimmt. Für die Berechnung des Gesamtproteingehaltes geht man davon aus, dass ein Protein in der Regel zu etwa 16 % aus Stickstoff besteht. Nach der Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes wird dieser

zur Ermittlung des Gesamtproteingehaltes mit dem Faktor 6,25 multipliziert. Für einige Pflanzen ergibt sich aufgrund ihrer Proteinzusammensetzung allerdings ein anderer Faktor. Kartoffelprotein enthält bspw. rund 13,5 % Stickstoff. Dies ergibt zur Berechnung des Proteingehaltes aus dem Gesamtstickstoffgehalt einen Faktor von 7,5 (Desborough und Weiser 1974). Damit keine Missverständnisse bei der Darstellung der Ergebnisse auftreten, wurde innerhalb des Projektes nur noch mit dem Begriff Gesamtstickstoffgehalt gearbeitet.

Über die Ermittlung des Gesamtstickstoffgehaltes erhoffte man sich eine Beurteilung hinsichtlich der Auswirkung der Expressierung eines zusätzlichen rekombinanten Proteins in den Pflanzen. Denn durch die Expressierung eines neuen Proteins müsste der Gesamtstickstoffgehalt ansteigen. Ist dies nicht der Fall, wird das neue Protein auf Kosten der übrigen Proteine bzw. zu Lasten der freien Aminosäuren gebildet, was sich negativ auf den restlichen Stoffwechsel der Pflanzen auswirken kann. Die Messungen erfolgten immer im direkten Vergleich mit einer nah isogenen Kontrolle und einer Pflanze, die nur den Basisvektor enthielt.

2.6.1 Gesamtstickstoffgehalte von Tabakpflanzen

Die ersten Untersuchungen fanden hinsichtlich eines Vergleiches von nah isogenen Pflanzen und transgenen Tabakpflanzen statt. Ein zweiter Aspekt war die Untersuchung einzelner Tabakblätter einer Tabakpflanze zur Überprüfung des Stickstofflevels in Abhängigkeit vom Alter der Blätter.

Aus Abbildung 2-29 wird deutlich, dass einerseits innerhalb der Pflanze eine Stickstoffanreicherung in den jüngeren Blättern (Blattnummerierung siehe Abbildung 2-29 links) stattfindet und andererseits der Stickstoffgehalt in den transgenen Tabakblättern bis auf eine Ausnahme immer deutlich höher ist als in den Blättern der isogenen Vergleichspflanze. Dies spricht zunächst für eine Expressierung des rekombinanten Enzyms zusätzlich zu den normalen Pflanzenproteinen in den alten Blättern. Bei den jüngeren Blättern kommt es wahrscheinlich zu einer Konkurrenzsituation bei der Bildung der normalen Proteine während der Wachstumsphase und der Bildung des neuen Proteins. Eine genaue Aussage kann dazu nur bei Betrachtung des Cyanophycingehaltes bzw. bei der Analyse des löslichen Proteins stattfinden.

Die zuvor beschriebenen Messungen konnten bisher nur anhand einer Pflanze vorgenommen werden. Um die Ergebnisse zu verifizieren, müssten diese Messungen mit weiteren Pflanzen wiederholt werden. Bei der Untersuchung von verschiedenen transgenen *PsbY-cphA_{TE}* Tabaklinien und deren Gesamtstickstoffgehalt in ausgewählten unteren und oberen Blättern zeigte sich für alle Pflanzen dasselbe Bild wie zuvor in Abbildung 2-29 (Abbildung 2-30). Der Stickstoffgehalt ist in den älteren unteren Blättern ebenfalls kleiner als in den jüngeren oberen Blättern. Im Vergleich zu den Kontrollen LH9000 und SRI Wildtyp Tabak zeigt sich in den unteren Blättern (graue Balken) keine deutliche Anhebung des Gesamtstickstoffgehaltes in den

2 ERGEBNISSE

transgenen Tabaklinien. Bei den oberen Blättern (weiße Balken) ist eine geringe Erhöhung des Gesamtstickstoffgehaltes im Vergleich zu den Kontrollpflanzen messbar.

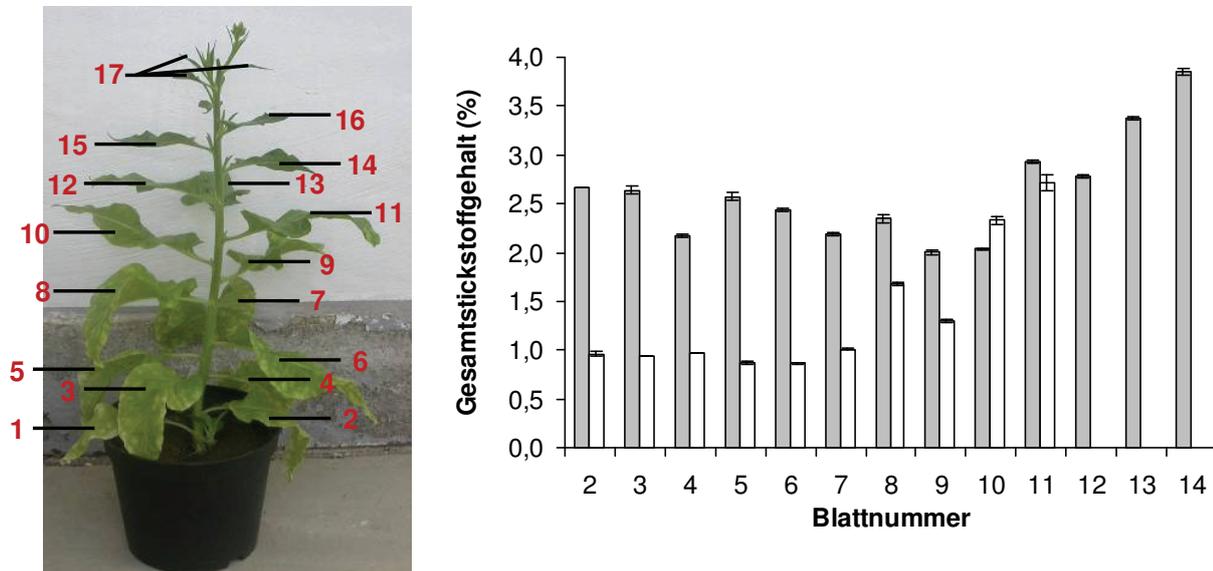


Abbildung 2-29: **Links:** beispielhafte Nummerierung der Tabakblätter von unten beginnend nach oben bis zum letzten jüngsten Blatt (Foto: Maja Hühns); **Rechts:** Diagramm zur Verteilung des Stickstoffgehaltes in den Blättern einer Tabakpflanze (siehe Nummerierung links; weiße Balken - isogene Kontrollpflanze, graue Balken - transgene Tabakpflanze)

Die Frage nach einer Beeinträchtigung des Gesamtproteingehaltes durch die Synthese von Cyanophycin in den transgenen Pflanzen kann an dieser Stelle nicht eindeutig beantwortet werden. Dazu müssen noch weitere Messungen erfolgen, die die bereits ermittelten Daten untermauern. Bisher lässt sich feststellen, dass in den jüngeren Blättern (weiße Balken) aufgrund einer erhöhten Stoffwechselaktivität mehr Stickstoff enthalten ist, als in den älteren Blättern (graue Balken).

In Abbildung 2-30 sind die Ergebnisse für die Bestimmungen des Gesamtstickstoffgehaltes, in Abbildung 2-31 für den löslichen Proteinanteil und in Abbildung 2-32 für den löslichen Cyanophycingehalt der gleichen Pflanzen aufgetragen. Dabei wurde jeweils zwischen jungen Blättern (weiße Balken) und älteren Blättern (graue Balken) unterschieden.

Bei der Bestimmung der löslichen Proteinfraction (siehe Abbildung 2-31) ist ein großer Unterschied zwischen den transgenen und den Kontrollpflanzen erkennbar. Die Werte für die jungen und alten Blätter einer Pflanze sind für drei Konstrukte nahezu gleich und für drei weitere Konstrukte sehr verschieden. Allerdings sollte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen der Proteingehalt in den jungen Blättern höher sein, als in den alten Blättern. Der Unterschied zu den Kontrollpflanzen lässt sich nur durch die besonders hohe Affinität des BRADFORD Reagenzes zu der basischen Aminosäure Arginin erklären. Hierbei werden auch kleinste Mengen von löslichem

Cyanophycin als extreme Absorptionswerte wiedergegeben (siehe auch Kapitel 2.2.6).

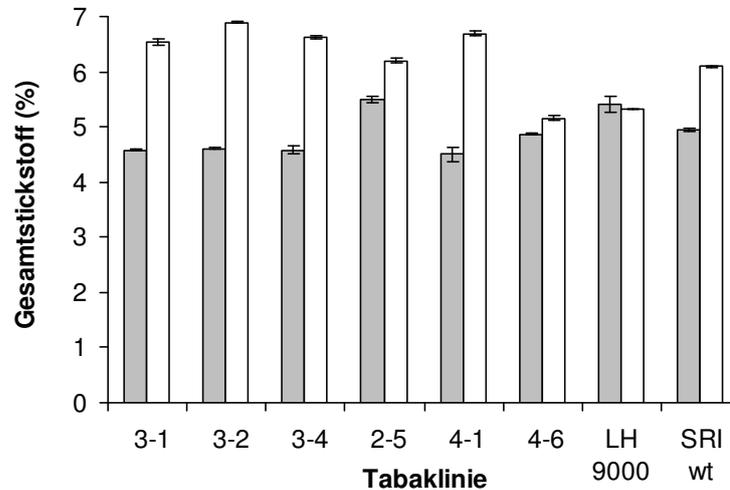


Abbildung 2-30: Darstellung des **Gesamtstickstoffgehaltes** in verschiedenen *PsbY-cphA_{Te}* Tabakpflanzen und den entsprechenden Kontrollen (LH9000 und SRI Wildtyp) - grau: Blätter von unten (alt), weiß: Blätter von oben (jung)

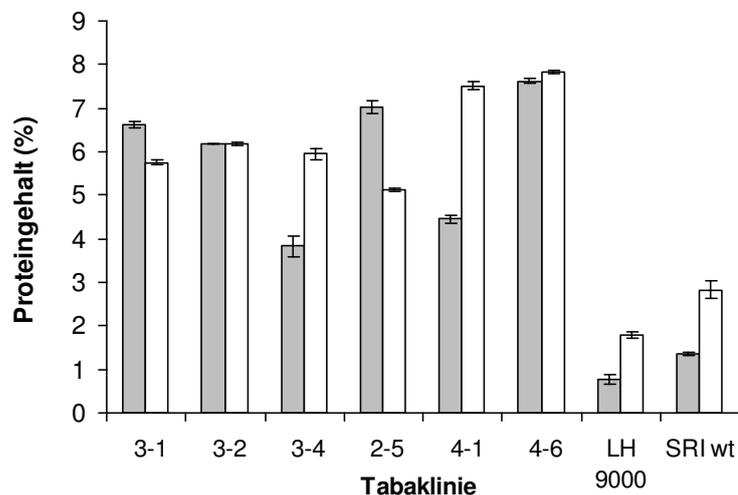


Abbildung 2-31: Darstellung des **löslichen Proteingehaltes** in verschiedenen *PsbY-cphA_{Te}* Tabakpflanzen und den entsprechenden Kontrollen (LH9000 und SRI Wildtyp) - grau: Blätter von unten (alt), weiß: Blätter von oben (jung)

Im Diagramm der Abbildung 2-32 ist der Cyanophycingehalt der löslichen Fraktion des Polymers für die betrachteten Pflanzen dargestellt (AG Lockau, Humboldt-Universität zu Berlin). Die Werte verhalten sich in den einzelnen transgenen Pflanzen

2 ERGEBNISSE

sehr unterschiedlich. Ein Trend ist dennoch erkennbar. Die Ergebnisse zeigen, dass es zu einer Anreicherung des Polymers in den älteren Blättern (graue Balken) der Tabakpflanzen kommt.

Die drei unterschiedlichen Messungen ergeben zusammen betrachtet kein schlüssiges Ergebnis. Der Gesamtstickstoffgehalt ist in den jüngeren Blättern größer als in den älteren. Der Proteingehalt verhält sich in beiden Blattproben nahezu gleich. Da in der löslichen Proteinfraction nur der wasserlösliche Anteil des Cyanophycingehaltes mit berücksichtigt wird, müssten sich die Ergebnisse des Polymergehaltes in den Ergebnissen der Bestimmung des Proteingehaltes widerspiegeln. Hierbei ist jedoch keine Übereinstimmung festzustellen. Der lösliche Anteil des Biopolymers in den jungen Blättern (weiße Balken) des Events 4-1 beträgt nur 10 % im Vergleich zum löslichen Cyanophycingehalt in den älteren Blättern (graue Balken). Die Messungen des Proteingehaltes dagegen ergeben in den jüngeren Blättern einen deutlich erhöhten Gehalt im Vergleich zu den älteren Blättern.

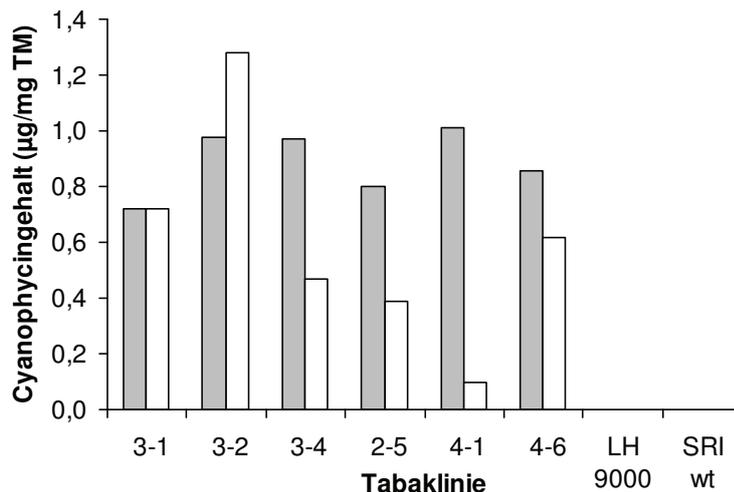


Abbildung 2-32: Darstellung des **löslichen Cyanophycingehaltes** in verschiedenen *PsbY-cphA_{TE}* Tabakpflanzen und den entsprechenden Kontrollen (LH9000 und SRI Wildtyp). grau: Blätter von unten (alt), weiß: Blätter von oben (jung) – Messwerte zur Verfügung gestellt von AG Lockau (Humboldt-Universität zu Berlin)

Betrachtet man den Gesamtcyanophycingehalt (siehe Abbildung 2-33), wird deutlich, dass die älteren Blätter sehr viel mehr Cyanophycin eingelagert haben, als die jungen Blätter. Allerdings korreliert dieses Ergebnis nicht mit dem Gesamtstickstoffgehalt (Abbildung 2-31).

Insgesamt ist in den jüngeren Blättern mehr Stickstoff enthalten als in den älteren Blättern. Durch die erhöhte Stoffwechselrate in den noch jungen Blättern wird wahrscheinlich, bedingt durch andere stickstoffhaltige Verbindungen (freie Aminosäuren und weitere sekundäre Pflanzenmetaboliten), der Stickstoffgehalt nach

oben getrieben. Wenn man nur den Protein- bzw. den Cyanophycingehalt betrachtet, dann müssten die Werte entgegengesetzt orientiert sein.

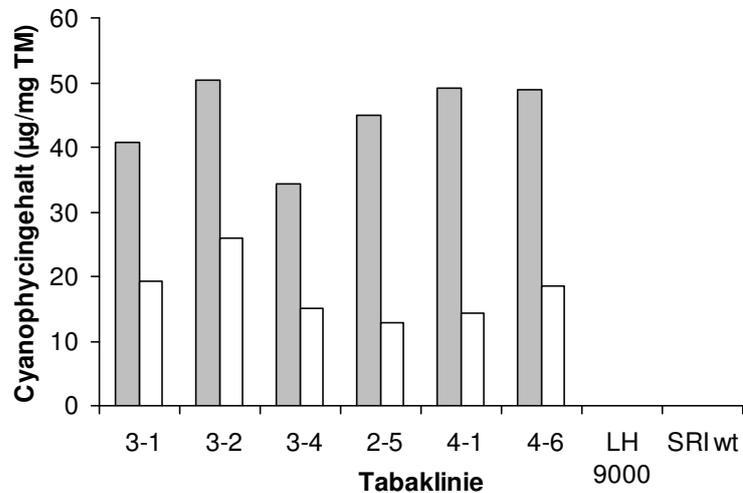


Abbildung 2-33: Darstellung des **Gesamtcyanophycingehaltes** in verschiedenen *PsbY-cphA_{TE}* Tabakpflanzen und den entsprechenden Kontrollen (LH9000 und SRI Wildtyp). grau: Blätter von unten (alt), weiß: Blätter von oben (jung) – Messwerte zur Verfügung gestellt von AG Lockau (Humboldt-Universität zu Berlin)

Die im Vorfeld beschriebenen Ergebnisse zur Analyse der Elementarzusammensetzung von reinen Polymerproben (siehe Kapitel 2.2.1) haben bereits gezeigt, dass die Elementaranalyse nicht zur Bestimmung der elementaren Zusammensetzung von komplexen Proben geeignet ist. Die großen Messunsicherheiten bei der Bestimmung der einzelnen Elemente könnten ein weiterer Grund für die schlechte Übereinstimmung der Messergebnisse (Gesamtstickstoff – Proteingehalt – löslicher Cyanophycinanteil – Gesamtcyanophycingehalt) untereinander sein. Die weiteren Messungen zur Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes in Kartoffelproben wurden nach der in der Lebensmittelchemie gängigen Prozedur von Kjeldahl durchgeführt (Kjeldahl 1883). Bei diesem Verfahren wird für die einzelnen Proben eine deutlich größere Einwaage vorgenommen (Einwaage Elementaranalyse: <10 mg; Einwaage Kjeldahl-Messungen: 1 g). Dadurch können bereits einige Matrixeffekte, wie zum Beispiel inhomogene Proben (in Zusammensetzung und Vermahlungsgrad), minimiert werden.

2.6.2 Gesamtstickstoffgehalte von Kartoffelpflanzen

Für die Analysen der Kartoffelpflanzen wurden nur noch der Gesamtstickstoffgehalt und der Cyanophycingehalt gemessen. Dazu wurde in einem Zeitraum von drei Jahren (2006-2008) Kartoffelmaterial (sowohl Blatt, als auch Knolle) aus GWH- und FL-Versuchen analysiert. Bei diesen Experimenten wurde unter anderem der Einfluss der Stickstoffdüngung während der Wachstumsperioden der Kartoffelpflanzen

2 ERGEBNISSE

untersucht. Alle Versuche wurden stets mit zwei transgenen Konstrukten (PsbY-*cphA*_{TE} Klon 12 und 23) sowie der nah isogenen Sorte (WT – Albatros) und einem Konstrukt mit dem leeren Vektor (35S) durchgeführt. Im Jahr 2007 wurden im GWH auch B33-PsbY-*cphA*_{TE} Kartoffelknollen geerntet und hinsichtlich ihres Gesamtstickstoffgehaltes untersucht.

In den folgenden Abbildungen sind einige ausgewählte Ergebnisse exemplarisch dargestellt. Abbildung 2-34 zeigt die Ergebnisse für den Gesamtstickstoffgehalt in Kartoffelknollen für die GWH-Versuche 2006, 2007 sowie 2008 (schwarz, grau und weiß) und Abbildung 2-35 verschiedene Versuche aus dem Jahr 2007 (schwarz: FL aus GWH-Knollen, grau: FL aus *in vitro* Knollen und weiß: GWH aus *in vitro* Knollen).

Die Variabilität im Stickstoffgehalt zwischen den einzelnen GWH-Versuchen (Abbildung 2-34) ist für alle untersuchten Konstrukte einschließlich der Kontrollpflanzen signifikant. Die Differenzen zwischen dem Versuch 2006 und den anderen beiden Anbaujahren lassen sich durch eine geringere Stickstoffgabe erklären. Die Untersuchungen des Bodens ergaben im Jahr 2006, dass 60 kg pflanzenverfügbarer Stickstoff (N) pro Hektar Ackerboden vorhanden waren. Dieser Wert wurde als N(min) für die Freilandversuche übernommen. Die Stickstoffdüngung N(max) wurde in diesem Jahr auf 180 kg N/ha eingestellt. In den Folgejahren lag der N(min) bereits vor Beginn der Versuche bei 76 kg N/ha, so dass der N(max)-Wert im Vergleich zum Anbaujahr 2006 ebenfalls erhöht wurde, um mögliche Effekte bei den Cyanophycinproduzierenden Pflanzen deutlicher hervortreten zu lassen. Die für das Freiland ermittelten Stickstoffdüngungen wurden ebenfalls für die GWH-Versuche übernommen.

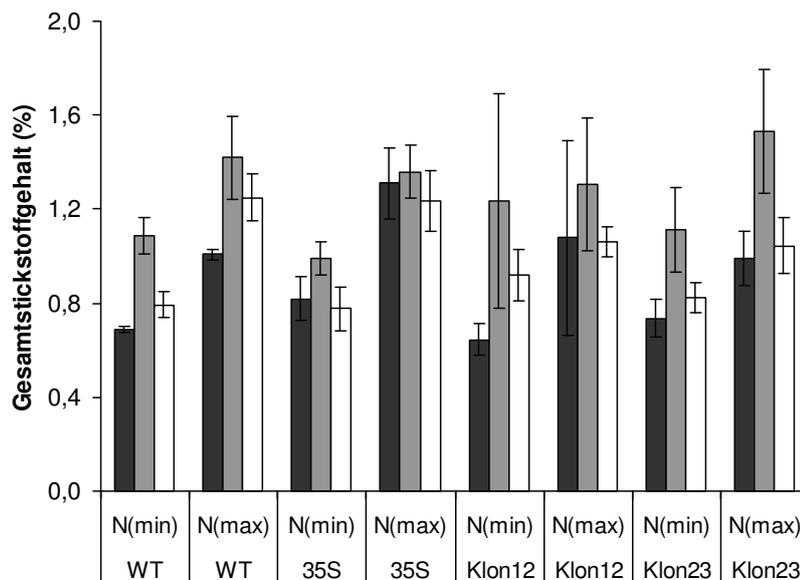


Abbildung 2-34: Darstellung des Gesamtstickstoffgehaltes in Kartoffelknollen in verschiedenen PsbY-*cphA*_{TE} Klonen und den entsprechenden Kontrollen (WT und 35S) schwarze Balken: GWH-Versuch 2006; graue Balken: GWH-Versuch 2007, weiße Balken: GWH-Versuch 2008

Die Schwankung in den Jahren 2007 und 2008 ist ein Zeichen für die natürliche Variabilität der Kartoffelpflanzen. Selbst bei annähernd gleichen äußeren Bedingungen (Temperatur, Boden, Licht und Wasser) können sich die Pflanzen unterschiedlich entwickeln. Auffällig ist des Weiteren, dass nicht wie zuvor bei den Messungen an den Tabakpflanzen zwischen den isogenen und den transgenen Pflanzen deutliche Unterschiede liegen. Bei den Kontrollpflanzen wird deutlich, dass eine höhere Stickstoffgabe während der Wachstumsperiode zu einem erhöhten Stickstoffgehalt in den Kartoffelknollen führt. Für die transgenen Knollen konnte nur im ersten Anbaujahr (im GWH) ebenso ein starker Anstieg in den Stickstoffgehalten bei der höheren Stickstoffgabe ermittelt werden. In den anderen Jahren lagen die Unterschiede für die Stickstoffgehalte bei unterschiedlichen Düngungsstufen innerhalb der Schwankungsbreite der Messungen. Es war keine deutliche Erhöhung feststellbar.

In Abbildung 2-35 sind die Ergebnisse verschiedener Versuche aus dem Jahr 2007 gegenüber gestellt. Sie unterscheiden sich zum einen im Ursprung der Pflanzen (*in vitro* oder knollen-bürtige Pflanzen) und zum anderen ist ein Vergleich von FL- und GWH-Knollen dargestellt.

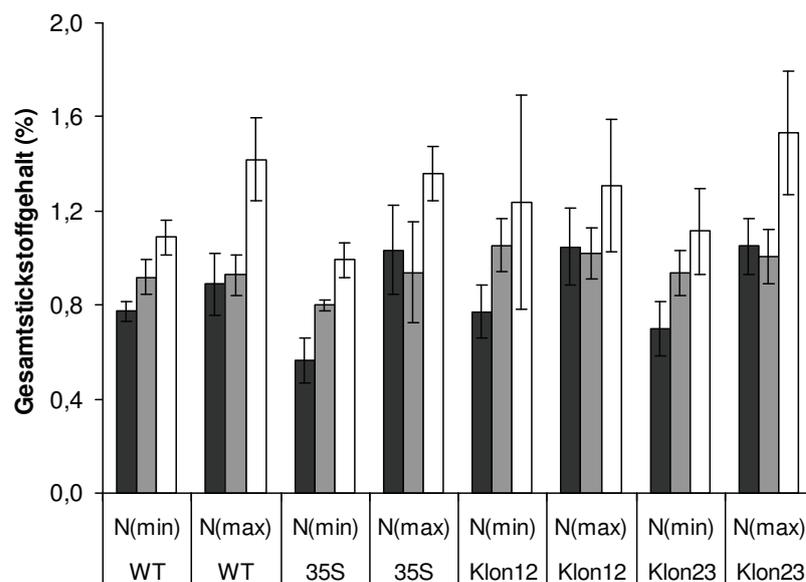


Abbildung 2-35: Darstellung des Gesamtstickstoffgehaltes in Kartoffelknollen in verschiedenen PsbY-*cphA*_{Te} Klonen und den entsprechenden Kontrollen (WT und 35S) schwarze Balken: FL-Versuch 2007 aus GWH-Knollen; graue Balken: FL-Versuch 2007 aus *in vitro* Knollen; weiße Balken: GWH-Versuch 2007 aus *in vitro* Knollen

Auffällig ist dabei, dass die Stickstoffgehalte in den Knollen aus dem GWH-Versuch (weiße Balken) deutlich erhöht sind im Vergleich zu den Knollen aus dem Freilandversuch. Dieses Ergebnis wird auch bei der Betrachtung der Messwerte für die Blattproben deutlich (Daten nicht gezeigt). Insgesamt sind die Stickstoffgehalte der GWH-Pflanzen im Bezug zu den FL-Pflanzen erhöht. Es kann allerdings bei den

2 ERGEBNISSE

transgenen Pflanzen keine deutliche Steigerung der Stickstoffgehalte gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Der Bedarf der transgenen Pflanzen an Stickstoff während der Wachstumsperiode liegt wahrscheinlich über der Düngergabe von 240 kg N/h. Daher konnten die gemessenen Gesamtstickstoffgehalte für die N(max)-Werte bei den transgenen Pflanzen keine deutliche Steigerung erreichen.

In Abbildung 2-36 ist ein Vergleich der Stickstoffgehalte in Kartoffelblättern zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Wachstumsperiode im FL 2008 (Versuch a) aus FL-Knollen dargestellt. Für nahezu alle Konstrukte (außer *PsbY-cphA_{Te}* Klon12) wird dabei deutlich, dass während der Wachstumsperiode ab der 2. Blattprobenahme der Stickstoffgehalt in den Blättern abnimmt. Die Blätter durchlaufen dabei zuerst eine Phase mit erhöhter Stoffwechselaktivität (1. und 2. Probenahme) und nähern sich anschließend ihrer Seneszenzphase⁴. Während dieser letzten Phase des Lebenszykluses der Blätter werden unter anderem Makromoleküle degradiert und die gewonnenen Nährstoffe (Stickstoff, Kohlenstoff etc.) für andere Pflanzenteile zur Verfügung gestellt. Dabei sinkt der Stickstoffgehalt in den Blättern ab (Zimmermann und Zentgraf 2004). Bei den Blättern ist ebenso wie bei den Knollen keine deutliche Anhebung des Gesamtstickstoffgehaltes in Abhängigkeit von der Düngung zu erkennen.

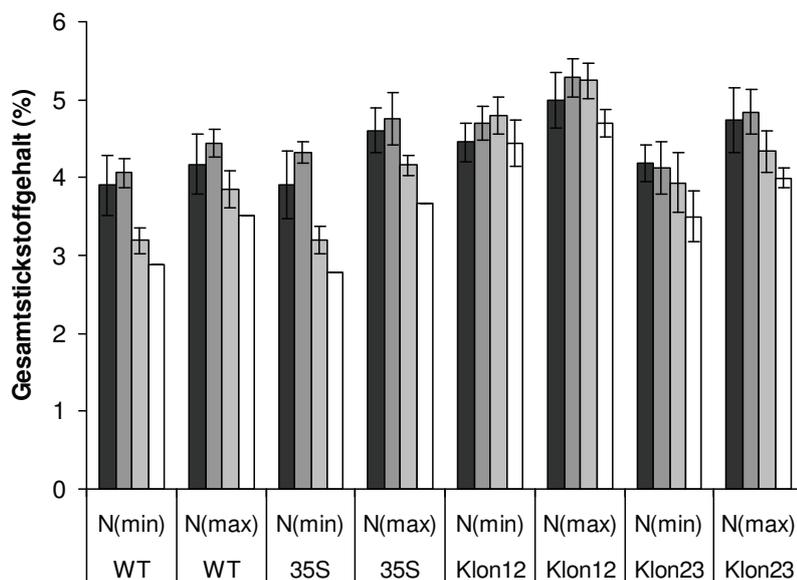


Abbildung 2-36: Darstellung des Gesamtstickstoffgehaltes in Kartoffelblättern zu unterschiedlichen Wachstumszeitpunkten in verschiedenen *PsbY-cphA_{Te}* Klonen und den entsprechenden Kontrollen (WT und 35S) - von schwarz nach weiß 1. Blattprobenahme bis 4. Blattprobenahme

Der letzte Vergleich zeigt die N(min)- und N(max)-Werte für Kartoffelknollen aus den GWH-Versuchen 2007 (siehe Abbildung 2-37). Dabei werden sowohl die Knollen mit

⁴ Mit Seneszenz wird die letzte Phase in der Entwicklung einer Pflanze oder von Pflanzenorganen bezeichnet, die dem Tod vorausgeht.

dem Konstrukt *PsbY-cphA_{Te}* (Klon 12 und 23), als auch die Knollen mit dem B33-*PsbY-cphA_{Te}*-Konstrukt (Klon 32 und 38) betrachtet (nähere Erläuterungen zu den einzelnen Konstrukten siehe Kapitel 1.6). Die Abweichungen vom Mittelwert betragen bei einigen Konstrukten bis zu 30 %, und die Unterschiede zwischen der minimalen Stickstoffversorgung und der erhöhten Stickstoffgabe liegen nicht bei allen Pflanzen außerhalb dieser Streuung. Es ist also wiederum keine deutliche Erhöhung im Gesamtstickstoffgehalt ausgehend von einer höheren Düngungsrate zu beobachten.

Sehr deutlich ist dagegen der Unterschied zwischen den einzelnen transgenen Konstrukten zu erkennen. Bei den Klonen 12 und 23 liegt das Cyanophycin im Cytoplasma über die ganze Pflanze verteilt vor. Die B33-*PsbY-cphA_{Te}* Klone 32 und 38 hingegen bilden Cyanophycin nur in den Amyloplasten. Dadurch konnte die Produktions- und Speicherrate für das Biopolymer deutlich gesteigert werden (Cyanophycingehalt bei der konstitutiv plastidären Produktion etwa dreimal so hoch wie bei der konstitutiv cytoplasmatischen Bildung – Daten nicht dargestellt). Dies wird auch in den Werten für den Gesamtstickstoffgehalt sichtbar. Die Mittelwerte für die Klone 32 und 38 sind im Vergleich zu den mittleren Stickstoffgehalten im Wildtyp um 20 bis 40 % erhöht. Bei den Knollen der Klone 12 und 23 sind es nur rund 5 %.

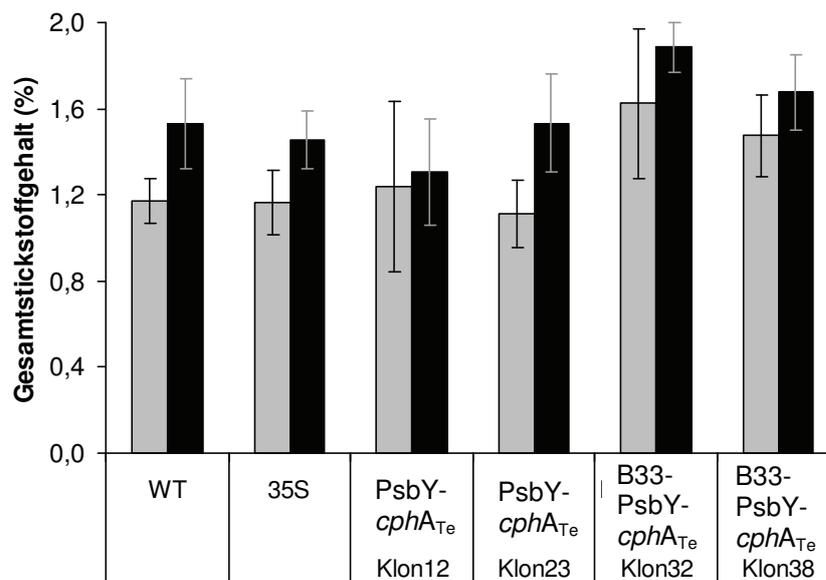


Abbildung 2-37: Darstellung des Gesamtstickstoffgehaltes in Kartoffelknollen in verschiedenen transgenen Klonen (*PsbY-cphA_{Te}* und *B33-PsbY-cphA_{Te}*) und den entsprechenden Kontrollen (WT und 35S) – graue Balken: N(min)-Werte; schwarze Balken: N(max)-Werte

Abschließend kann man feststellen, dass mit Hilfe der Gesamtstickstoffanalyse der transgenen Pflanzen im Vergleich zu den Gesamtstickstoffgehalten in den Kontrollpflanzen eine Tendenz hinsichtlich des Gehaltes für die zusätzliche Substanz ermittelt werden kann. Allerdings ist nur im Zusammenhang mit einer Bestimmung des Gesamtcyanophycingehaltes zu klären, ob die Produktion des rekombinanten

2 ERGEBNISSE

Biopolymers in den Pflanzen zu Mangelerscheinungen hinsichtlich der normalen Proteinversorgung führt, d.h., ob die Produktion der zusätzlichen Substanz im Stoffwechsel der Pflanzen zu Lasten der anderen Inhaltsstoffe stattfindet.

3 Zusammenfassung

Für die Produktion von Biopolymeren bzw. Proteinen in transgenen Pflanzen gibt es bereits zahlreiche positive Beispiele. Ein entscheidender Aspekt bei der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen für die Produktion von komplexen Molekülen ist die anschließende Isolierung des Wertstoffes aus der entsprechenden Matrix. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Verfahren zur Isolierung von Cyanophycin (ein natürlicher Speicherstoff aus Cyanobakterien) aus transgenen Pflanzenmaterialien etabliert werden. Dabei wurden sowohl Tabak-, als auch Kartoffelpflanzen für die Versuche genutzt.

Mit Hilfe des ersten Verfahrens, der direkten Säureextraktion des Biopolymers aus der pflanzlichen Matrix, konnten die einzelnen Parameter des Isolierungsverfahrens optimiert werden. Als Extraktionsmittel eignet sich aufgrund der Eigenschaften der Zielsubstanz vor allem verdünnte Salzsäure mit einem pH-Wert ≤ 2 (siehe Kapitel 2.1, Tabelle 2-1). Die anschließende Fällung des Polymers aus der sauren Lösung erfolgte durch Zugabe von Natronlauge bis zu einem pH-Wert von 5. Der anfallende Niederschlag konnte abzentrifugiert und nach wiederholtem Spülen mit Reinstwasser und Methanol getrocknet werden.

Die Reinheit des isolierten Produktes wurde mit gängigen Methoden aus dem Bereich der Analytik untersucht. Für eine qualitative Bewertung des Isolates konnte die Gelelektrophorese und für gelöste Proben des Isolates die UV-Messung etabliert werden. Um eine quantitative Beurteilung der Reinheit des Isolates durchführen zu können, wurde eine angepasste BRADFORD Methode entwickelt, die sich die erhöhte Affinität des Polymers zu dem gewählten Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue G-250) im Vergleich zu normalen Proteinen zu Nutze macht. Mit dieser Methode konnte die Reinheit des Isolates wie folgt bestimmt werden. Es bestand in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial (Tabak- oder Kartoffelblätter) zu etwa 60 % aus reinem Cyanophycin. Die Hauptverunreinigungen kommen vermutlich durch Salzurückstände von der Fällung des Polymers und durch andere säurelösliche Proteine zu Stande.

In einem zweiten Verfahren sollte die Anschlussfähigkeit der Isolierung von Cyanophycin aus transgenen Kartoffelknollen an den großtechnischen Prozess der Stärkegewinnung geprüft werden. Für die Isolierung des Polymers konnte dabei auf die bereits optimierten Extraktionsparameter aus dem ersten Verfahren zurückgegriffen werden. Zusätzlich wurden im Labormaßstab die Extraktion von Stärke aus Kartoffelknollen etabliert und anschließend die beiden Verfahren (Stärke- und Cyanophycinextraktion) mit einander verknüpft. Die Kopplung erfolgte im Anschluss an die Auswaschung der Stärkekörner aus den Knollen. Aufgrund der Eigenschaften des Polymers wird es zusammen mit der Stärke aus den Pflanzenzellen gespült und kann als Bodensatz von der Kartoffelpülpe und den verbleibenden Zellbestandteilen abgetrennt werden. Anschließend wird die Stärke mit verdünnter Säure extrahiert

3 Zusammenfassung

und somit vom Cyanophycin abgetrennt. Die Stabilität der Stärkekörner hinsichtlich der Behandlung mit verdünnter Säure konnte in zusätzlichen Versuchen bis zu einer Temperatur von einschließlich 45 °C über einen Zeitraum von 6 h bestätigt werden. Die Reinheit der Polymerproben aus diesem zweiten Verfahren konnte mit $\geq 90\%$ bestimmt werden. Die Kopplung der Stärkeisolierung mit der Extraktion des Biopolymers aus transgenen Kartoffelknollen ist durchführbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die gewählte Methode, die Extraktion des Biopolymers aus Kartoffelknollen an die Stärkeisolierung zu koppeln, zusätzlich deutliche Vorteile gegenüber einer direkten Extraktion aus der pflanzlichen Matrix hinsichtlich der Reinheit des Produktes mit sich bringt. Allerdings werden aufgrund des verwendeten Extraktionsmittels (Salzsäure) besondere Anforderungen an die verwendeten Apparaturen gestellt, welche die Investitionskosten und damit den Preis des Produktes negativ beeinflussen können. Inwiefern noch geringfügig vorhandene Verunreinigungen des isolierten Polymers für spätere Anwendungen des Cyanophycins hinderlich sind, muss noch genauer untersucht werden. Jedoch sollte es mit einer einfachen Filtrationsanlage gelingen, die niedermolekularen Störsubstanzen abzutrennen und damit die Reinheit des Produktes weiter zu verbessern.

4 Diskussion und Ausblick

In der abschließenden Diskussion der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse sollen folgende Punkte noch einmal genauer betrachtet werden:

- 1) Welches der entwickelten Verfahren ist hinsichtlich der Ausbeute und Reinheit der isolierten Cyanophycinproben am effektivsten? *und*
- 2) Welche analytische Methode ist am besten für eine Quantifizierung der isolierten Proben geeignet?

In einem letzten Punkt soll noch einmal die Möglichkeit zu einem gekoppelten Extraktionsprozess diskutiert werden:

- 3) Ist es möglich die Cyanophycinextraktion mit einem großtechnischen Kartoffelverarbeitungsprozess zu koppeln?

Vergleich beider Extraktionsverfahren für Cyanophycin aus transgenem Pflanzenmaterial

Die vereinfachte Labormethode mit direkter Salzsäure-Extraktion ist durch eine hohe Verunreinigung des isolierten Cyanophycins basierend auf anderen Kartoffelproteinen, niedermolekularen Inhaltsstoffen und mögliche Salzurückstände von der Fällung gekennzeichnet. Aus diesem Grund und für eine bessere Vermarktung wurde ein weiteres Verfahren entwickelt, welches an einen bereits bestehenden Prozess gekoppelt werden soll (vergleichende Übersicht siehe Tabelle 4-1).

Cyanophycin liegt in der Knolle ähnlich wie Stärke in einer granulären Form vor. Zusammen mit den Stärkekörnern kann das Polymer somit aus fein zerkleinerten Kartoffelreibseln ausgewaschen werden. Beide Substanzen können dann zusammen durch Zentrifugieren von der Waschlösung abgetrennt werden. Anschließend muss das Cyanophycin mit Salzsäure extrahiert und durch Zugabe von Natriumhydroxid bei einem pH-Wert von 5 wieder ausgefällt werden. Die Stärke bleibt als Feststoff nach der Extraktion zurück und wird getrocknet und ausgewogen (zur Bewertung des Isolierungsverfahrens – siehe Tabelle 4-2). Der gewonnene Niederschlag wird daraufhin wie bereits bei der direkten Säureextraktion aufgearbeitet.

Mit Hilfe der BRADFORD Methode konnte ein Reinheitsgrad für das isolierte Cyanophycin von >85 % festgestellt werden. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese stimmen damit ebenfalls sehr gut überein (siehe Abbildung 2-23). Eine Verunreinigung mit anderen Kartoffelproteinen ist nicht mehr vorhanden, so dass die übrigen Verunreinigungen von niedermolekularen Substanzen stammen müssen. Diese könnten eventuell durch eine dem Isolierungsprozess nachgeschaltete Ultrafiltrationsanlage abgetrennt werden.

4 Diskussion und Ausblick

Tabelle 4-1: Vergleich der beiden Isolierungsverfahren von Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix – TM = Trockenmasse

	direkte saure Extraktion von Cyanophycin	gekoppeltes Stärke-Cyanophycin-Isolierungsverfahren
Material	<ul style="list-style-type: none"> - frisches oder lyophilisiertes Pflanzenmaterial - Vielzahl von möglichen Materialien kann eingesetzt werden 	<ul style="list-style-type: none"> - nur frisches Knollenmaterial kann verwendet werden
Verfahren	<ul style="list-style-type: none"> - Zerkleinerung der Kartoffelknollen - Vorextraktion bzw. Rehydrierung des Lyophilisates mit 0,1 %iger NaHSO₃-Lösung - Pflanzenmaterial wiederholt mit 0,1 M HCl extrahieren (in Abhängigkeit vom verwendeten Material) <ul style="list-style-type: none"> - Abtrennung der sauren Lösung durch Zentrifugieren bzw. Filtrieren - Fällung des Biopolymers durch Zugabe von NaOH - Abtrennung des Niederschlages durch Zentrifugieren - Niederschlag gründlich mit Methanol waschen (Entfernung von Chlorophyll bei Isolierung aus Blattmaterial) <ul style="list-style-type: none"> - Niederschlag mehrfach mit Wasser waschen, Entfernung von Salzurückständen aus der Fällung 	<ul style="list-style-type: none"> - Zerkleinerung der Kartoffelknollen - Auswaschen von Stärkekörnern und Cyanophycin granula mit 0,1 %iger NaHSO₃-Lösung - Stärkekörner und Cyanophycin mit 0,1 M HCl behandeln
Ausbeute *	1,4 % Isolat/TM	0,8 % Isolat/TM
Reinheit	50-60 %	> 85 %

* Für die Ausbeute ist hier der maximale Wert angegeben, ermittelt aus den experimentellen Untersuchungen für PsbY-*cphA*_{Te} Kartoffelknollen von verschiedenen Klonen (10, 12 und 23).

Im Vergleich der beiden Verfahren ist auffällig, dass die Ausbeuten mit der direkten Säureextraktion scheinbar sehr viel höher sind, als bei dem gekoppelten Verfahren. Zum einen ist das der hohen Verunreinigung geschuldet, die eine höhere Ausbeute an Cyanophycin vortäuscht. Andererseits ist auch das Stärkeisolierungsverfahren im Labormaßstab nicht quantitativ. Bei den Versuchen mit dem gekoppelten Verfahren wurde die Stärkeausbeute als Beurteilungskriterium für den Prozess mitbestimmt. Industriell genutzte Kartoffelsorten haben einen Stärkegehalt von > 15 %, wobei allgemein von etwa 20 % Stärke in Kartoffeln ausgegangen wird (Souci *et al.* 1994). Bei der Auswertung der Stärkeausbeuten wird deutlich, dass nur etwa 40 bis 80 % der in den Knollen enthaltenen Stärke im Labor isoliert werden kann (siehe Tabelle 4-2). Die Isolierung von Stärke ist ein Verfahren mit einem hohen Wasserverbrauch. Die zerriebenen Kartoffeln werden in mehreren Schritten kontinuierlich mit Wasser gespült, um alle Stärkekörner auszuwaschen. Dies war im Labormaßstab so nicht möglich gewesen. Bei der Bestimmung der Stärkeausbeute spielte es keine Rolle, ob es sich um isogene oder transgene Kartoffelknollen handelte. Die Abweichungen sind in alle Versuchen annähernd gleich groß. Mit der unvollständigen Stärke-

extraktion geht somit möglicherweise auch eine nicht quantitative Cyanophycin-isolierung einher.

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der Stärkeausbeuten aus verschiedenen Versuchen zur Isolierung von Cyanophycin aus Kartoffelknollen – FM = Frischmasse

Transgene Kartoffellinie	Stärkeausbeute ± SE (%)	Abweichung (%) bei Annahme von 20 g Stärke/100 g FM
PsbY- <i>cphA</i> _{TE} Klon 10	8,2 ± 0,8	59,2
PsbY- <i>cphA</i> _{TE} Klon 12	8,5 ± 2,1	57,7
PsbY- <i>cphA</i> _{TE} Klon 23	7,3 ± 0,0	61,5
nah isogene Kontrolle (WT)	9,1 ± 2,4	54,5
Kontrolle mit Leervektor (35S)	10,1 ± 4,1	49,7
B33-PsbY- <i>cphA</i> _{TE} Klon 32	10,6 ± 0,0	46,8
B33-PsbY- <i>cphA</i> _{TE} Klon 38	9,7 ± 0,7	51,3
nah isogene Kontrolle (WT)	15,8 ± 0,7	20,9
Kontrolle mit Leervektor (B33)	9,0 ± 0,5	54,9

Bei den Versuchen mit dem gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsverfahren wurde im Anschluss an die Stärkeauswaschung eine saure Extraktion der verbliebenen Kartoffelreibsel durchgeführt. Die Reinheit der dabei extrahierten Cyanophycinfraktion war vergleichbar mit der Reinheit aus dem gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsverfahren. Die Ausbeute lag hierbei ähnlich hoch wie die des bereits isolierten Polymers. Es konnte also noch einmal so viel Cyanophycin zusätzlich extrahiert werden, wie bereits durch das gekoppelte Verfahren zuvor. Durch die wiederholte Waschung der Kartoffelreibsel mit 0,1 %iger Natriumhydrogensulfidlösung sind alle sonst mit ausgefallenen Fremdstoffen bereits abgetrennt worden und können in dem nachgeschalteten sauren Extraktionsschritt nicht mehr isoliert werden. Dies hat einen positiven Einfluss auf die Reinheit des isolierten Produktes.

In Abbildung 4-1 ist an einem Beispiel die Massenbilanz für den entwickelten Prozess dargestellt. Für den betrachteten Versuch wurde eine Mischprobe aus PsbY-*cphA*_{TE} Knollen der Klone 12 und 23 angefertigt. Ein Teil der Probe wurde lyophilisiert und zur Bestimmung des Cyanophycingehaltes verwendet (enzymatische Bestimmung; AG Lockau, Humboldt-Universität zu Berlin). Der Rest der Probe wurde für die Extraktion des Biopolymers nach dem gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsverfahren eingesetzt. Im Anschluss an die Extraktion wurde die isolierte Probe ebenfalls enzymatisch auf ihre Reinheit untersucht (AG Lockau, Humboldt-Universität zu Berlin).

Der Standardfehler bei der Bestimmung des Cyanophycingehaltes in den transgenen Kartoffelknollen beträgt rund 36 % (siehe Beispiel in Abbildung 4-1: 5,6 ± 2,0 mg/g TM). Der enzymatische Test ist aufgrund eines Multienzym-Assays hoch spezifisch

4 Diskussion und Ausblick

für Cyanophycin. Diese große Messunsicherheit ist vor allem dem Probenmaterial geschuldet. Die Kartoffelmischprobe wurde vor der Cyanophycingehaltsbestimmung getrocknet. Der verbleibende Feststoff besteht dann zu rund 80 % aus Stärke, bei einer Einwaage von nur 30 mg kann der Fehler, verursacht durch einen übermäßigen Stärkeanteil, sehr hoch sein.

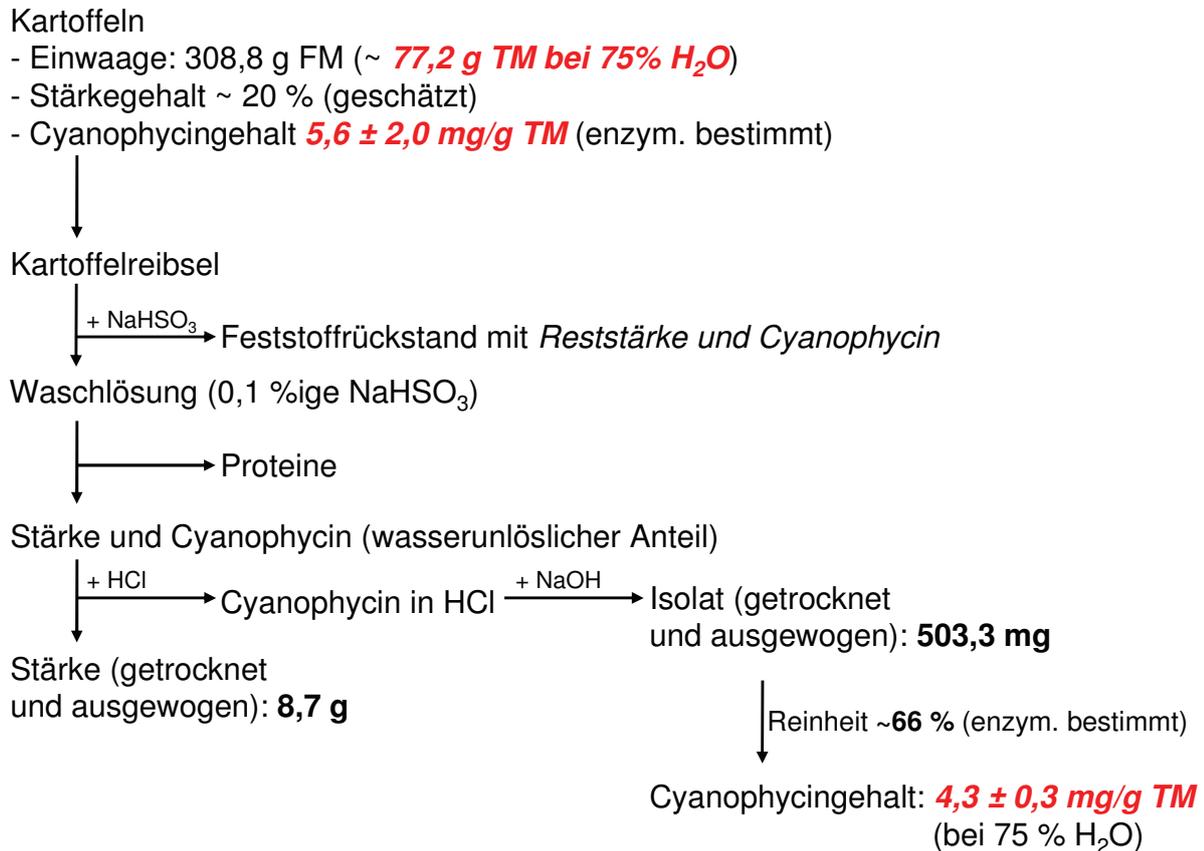


Abbildung 4-1: Massenbilanz des gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsprozesses am Beispiel einer Mischprobe aus PsbY-*cphA*_{TE} Knollen der Klone 12 und 23

Die nach dem gekoppelten Isolierungsverfahren extrahierte Probe enthält zu etwa 66 % reines Cyanophycin. Der enzymatische Test wurde genau wie zuvor für die Gehaltsbestimmung im Ausgangsmaterial durchgeführt, und an dieser Stelle ist die Messungenauigkeit < 10 %, da das Untersuchungsmaterial bezüglich der untersuchten Substanz bei dieser zweiten Messung homogener war.

Insgesamt liegt bei dem hier betrachteten Beispiel die Abweichung zwischen reinem Cyanophycin und zuvor enzymatisch ermittelten Cyanophycingehalt in der Ausgangsprobe innerhalb der Standardabweichung für die Gehaltsbestimmung (siehe Abbildung 4-1). Für alle die Versuche, bei denen eine Extraktionsausbeute außerhalb der Standardabweichung für den Cyanophycingehalt ermittelt wurde, kann ein Grund in der unvollständigen Stärkeisolierung gesehen werden (siehe auch

Tabelle 4-2). Dieser Verlust könnte aber in einem großtechnischen Verfahren reduziert werden.

In Tabelle 4-3 sind weitere Messergebnisse für die Isolierung von Cyanophycin zusammengefasst. Auch hierbei ist wiederum ersichtlich, dass die Standardabweichungen bei einigen Messungen für die Cyanophycingehaltsbestimmung sehr hoch sind (zwischen 10 und 40 %). Die Reinheiten für die Proben aus dem gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsverfahren sind nahezu >80 %, und damit liegen die meisten Extraktionsausbeuten direkt oder sehr dicht bei den bestimmten Cyanophycingehalten und ihren Standardabweichungen.

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der Extraktionsversuche von Cyanophycin aus transgenen Kartoffelknollen nach dem gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsverfahrens (enzymatische Bestimmung der Cyanophycingehalte bzw. mit BRADFORD Methode – AG Lockau) – TM = Trockenmasse

Konstrukt	Klon	Cyanophycingehalt (%/ TM)	Reinheit _{Isolat} (%)	Cyanophycingehalt _{korrigiert} (%/ TM)
PsbY-cphA _{Te}	10 ^a	0,8 ± 0,3	> 80 %	0,4 *
	12 ^b	0,9 ± 0,6	> 80 %	0,6 **
	23 ^a	1,3 ± 0,2	> 80 %	0,3 *
B33-PsbY-cphA _{Te}	32 ^c	4,1 ± 0,5	> 80 %	3,7 **
	38 ^c	3,8 ± 0,5	~ 70 %	3,2 *

^a Ernte 2007, GWH

^b Ernte 2006

^c Ernte 2008, GWH

* außerhalb des bestimmten Cyanophycingehaltes und der Standardabweichung

** innerhalb des bestimmten Cyanophycingehaltes und der Standardabweichung

In Abbildung 4-2 sind noch einmal mit verschiedenen Isolierungsmethoden gewonnene Cyanophycinproben unterschiedlichen Ursprungs gemeinsam in einem Gel aufgetragen. Dabei wird deutlich, dass es einen Größenunterschied zwischen bakteriellem Cyanophycin aus *E. coli* (20 bis 35 kDa) und Cyanophycin aus pflanzlicher Matrix (15 bis 25 kDa) gibt. Die Isolierungsmethode selbst (saure Extraktion bzw. Stärke gekoppelte Extraktion) hat scheinbar keinen Einfluss auf die Größe des isolierten Biopolymers bzw. dessen Molmassenverteilung. Dagegen zeigen die Proben aus den B33-PsbY-cphA_{Te} Pflanzen (Klon 32 und 38) und den Tabakpflanzen PsbY-cphA_{Te} Event 51-3 eine leicht erhöhte Molmasse. Im Vergleich zu Geltasche V sind in den Taschen III, IV, VI und VII keine Verunreinigungen durch Fremdproteine sichtbar. In diesen Geltaschen wurden die Proben aufgetragen, die nach dem gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierungsverfahren gewonnen wurden.

4 Diskussion und Ausblick

Im Hinblick auf eine großtechnische Aufarbeitung von transgenen Kartoffelknollen bietet die Methode der gekoppelten Stärke-Cyanophycin-Isolierung viele Vorteile gegenüber einer direkten Extraktion mit verdünnter Salzsäure. Aufgrund der korrosiven Eigenschaft von Salzsäure müssen große Teile der Produktionsanlagen mit korrosionsbeständigem Stahl ausgestattet werden. Bei der gekoppelten Methode kann der überwiegende Teil der vorhandenen Anlagen zur Isolierung von Stärke beibehalten werden und nur in den nachfolgenden Schritten (ab der Extraktion des Cyanophycins von den Stärkekörnern) des Prozesses müssen die Reaktionsbehälter umgerüstet werden. Außerdem ist die erzielte Reinheit der isolierten Proben aus diesem Verfahren deutlich größer im Vergleich zur direkten sauren Extraktion des Polymers und benötigt aus diesem Grund, in Abhängigkeit von der späteren Anwendung, keine aufwendigen Reinigungsschritte mehr.

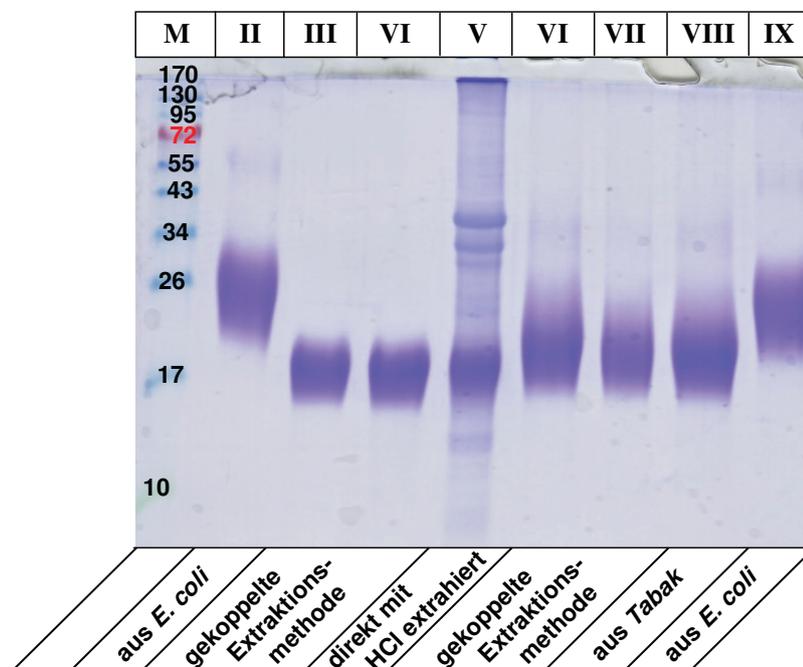


Abbildung 4-2: Vergleich von Cyanophycinproben aus unterschiedlichen rekombinanten Organismen. **M**: Proteinstandard mit Größenmarker in kDa, **II** und **IX**: Cyanophycin aus *E. coli* (AB Lockau, Humboldt-Universität zu Berlin), **III** und **IV**: Cyanophycin aus PsbY-cphA_{Te} Klon 12 nach Stärkemethode, **V**: Cyanophycin aus PsbY-cphA_{Te} Klon 23 mit saurer Extraktion, **VI** und **VII**: Cyanophycin aus B33-PsbY-cphA_{Te} Klon 32 und 38 nach Stärkemethode und **VIII**: Cyanophycin aus Tabak PsbY-cphA_{Te} Event 51-3

Analytische Methode für die Quantifizierung der isolierten Cyanophycinproben

Im Rahmen der Arbeit wurden die verschiedensten analytischen Methoden die zur Verfügung standen für die qualitative und quantitative Untersuchung der isolierten Polymerproben getestet. Dabei hat sich gezeigt, dass die besten Ergebnisse für eine qualitative Aussage hinsichtlich der Reinheit der isolierten Cyanophycinproben mit

Hilfe der Gelelektrophorese und der UV-Messung gelöster Proben gewonnen werden können. Mit diesen beiden Methoden können zum einen Proteinverunreinigungen ermittelt und im Abgleich mit bekannten Standardproteinen halbquantitativ bestimmt werden. Für eine quantitative Aussage müssen bei beiden Methoden die Proteine zur Kalibrierung verwendet werden, die sich als Verunreinigung in der Probe befinden oder die eigentliche Zielsubstanz sind. Da Cyanophycin kein spezifisches UV-Signal liefert und das Fremdprotein Patatin (bei Extraktion von Cyanophycin aus Kartoffeln) nicht zur Verfügung stand, konnte mit diesen Methoden keine quantitative Bewertung der isolierten Cyanophycinproben erfolgen.

Mit Hilfe einer angepassten BRADFORD Methode konnte dagegen der Gehalt in den Polymerproben quantifiziert werden. Der für die Methode verwendete Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 hat eine besondere Affinität zu basischen Aminosäuren und aufgrund der speziellen Zusammensetzung von Cyanophycin (nur Arginin und Aspartat) reagiert das Polymer überproportional mit dem Farbstoff. Die Abweichung in der Kalibrierung zu einem Standardprotein wie bspw. BSA liegt bei 200 % (siehe Kapitel 2.2.6, Abbildung 2-11). Für eine exakt eingewogene Probe des isolierten Polymers können somit alle Abweichungen von dem erwarteten Extinktionswert als Verunreinigungen betrachtet werden. Einziger Schwachpunkt dieser Methode ist, dass dadurch auch nicht genauer bestimmt werden kann, welche Substanzen sich als Verunreinigung in der isolierten Polymerprobe befinden.

Dennoch erscheint die BRADFORD Methode bezüglich einer schnellen Reinheitsbestimmung für isolierte Cyanophycinproben, beispielsweise für eine prozessnahe Analytik, die Methode der Wahl zu sein.

Kopplungsfähigkeit der Cyanophycinextraktion an einen großtechnischen Prozess

Für die Isolierung von Cyanophycin aus transgenen Kartoffelknollen konnte gezeigt werden, dass eine Angliederung an den großtechnischen Stärkeaufarbeitungsprozess möglich ist. Ein Besuch der Firma Emsland Stärke brachte dafür die nötigen Anregungen. Mit dem gewonnenen Einblick in den Verarbeitungsprozess der Kartoffelknollen konnte das in Abbildung 2-22 (Kapitel 2.5) dargestellte Schema entwickelt werden, mit dessen Hilfe die Isolierung des Biopolymers aus den transgenen Pflanzen im Labor sowie im großtechnischen Maßstab möglich ist.

Die Kopplung von industrieller Stärkeverarbeitung mit dem Isolierungsprozess für Cyanophycin scheint in mehrerer Hinsicht Vorteile zu haben. Stärke ist einer der billigsten Rohstoffe weltweit (20 Cent/kg) (Poirier *et al.* 1992a; Lee 1996), allein in Deutschland werden jährlich über 500.000 t Kartoffelstärke gewonnen (Maul *et al.* 2008). Wenn nur ein geringer Teil der Stärkekartoffeln durch die Cyanophycin produzierenden transgenen Kartoffeln ersetzt werden würde, könnte bereits eine beachtliche Menge an Cyanophycin und damit Polyaspartat und Arginin hergestellt werden. Die Infrastruktur für den Anbau und die Verarbeitung von Kartoffelknollen ist sehr gut etabliert. Durch die Kopplung der Cyanophycinextraktion mit solch einem

großtechnischen Prozess könnten teure Investitionskosten für den Aufbau eines neuen eigenständigen Verfahrens gespart werden. Die Isolierung von Cyanophycin aus Kartoffeln würde eine zusätzlich Wertschöpfung innerhalb der Stärkeverarbeitung ermöglichen (siehe Kapitel 1.6, Tabelle 1-3).

Die Ernte von Kartoffeln ist saisonal gebunden und findet in Abhängigkeit von der angebauten Sorte von Juni (Frühkartoffeln) bis Ende September statt. Bis zur Verarbeitung der Kartoffeln müssen die geernteten Knollen teilweise über einen langen Zeitraum gelagert werden. Das Biopolymer Cyanophycin darf sich in diesem Zeitraum nicht zersetzen und muss über einen längeren Zeitraum in den Knollen stabil sein. Die Stabilität des Biopolymers wurde über einen Zeitraum von 32 Wochen untersucht, und es konnte keine Beeinträchtigung des Cyanophycingehaltes während der Messperiode festgestellt werden (Hühns *et al.* 2009). Damit erfüllt das Biopolymer auch diese für die Produktion in Kartoffelknollen wichtige Eigenschaft. Gleichzeitig wurde bei der Analyse der Stärkegehalte in den transgenen Knollen nur eine geringfügige Abnahme gegenüber den Kontrollpflanzen ermittelt (Hühns *et al.* 2009). Damit könnten die transgenen Knollen weiterhin für die Stärkeproduktion eingesetzt werden und Cyanophycin als Beiprodukt isoliert werden.

Ausblick

Die Ziele der modernen Pflanzenzüchtung liegen heutzutage vor allem in der Steigerung der Widerstandsfähigkeit von Pflanzen (Stresstoleranzen bzw. Pflanzengesundheit), einer verbesserten Produktqualität für nachfolgende Verarbeitungsschritte und einer Erhaltung bzw. Erweiterung der genetischen Diversität (Kempken und Kempken 2006). Die Methoden der Gentechnik können dazu einen großen Beitrag leisten. Dabei geht es nicht in erster Linie um den vollständigen Ersatz der klassischen Züchtung. Die Gentechnik kann als zusätzliches Werkzeug zur Erzeugung neuartiger Sorten mit verbesserten Eigenschaften genutzt werden. Im Bereich der Landwirtschaft war die Entwicklung von Toleranzen gegen Herbizide sowie Resistenzen gegen Pilz, Virus oder Insekten bereits erfolgreich und steht auch weiterhin hoch im Kurs, da diese Veränderungen relativ einfach durchzuführen sind.

Auf der anderen Seite können durch die natürlichen Syntheseleistungen in Pflanzen und Bakterien sowie durch den Einsatz von Gentechnik neue Organismen erzeugt werden, die auch für chemische Prozesse interessant sind. Ein Beispiel ist die verbesserte Ölzusammensetzung in Raps- und Sonnenblumen, die zu einer vielfältigen Nutzung der Pflanzen auch in der chemischen Industrie führten. Weiterhin gibt es Forschungsansätze bestimmte Biopolymere in gentechnisch veränderten Organismen zu erzeugen und damit eine teure chemische Synthese zu umgehen. Die Produktion von Biopolymeren in gentechnisch veränderten Pflanzen zeigt dabei im Gegensatz zur Fermentation von transgenen Bakterienstämmen verschiedene Vor- und Nachteile (siehe dazu Kapitel 1.2). Besonders hervorzuheben ist die günstige Energiebilanz, da die Pflanzen allein durch CO₂-Fixierung und Sonnenenergie die Produktion der Biopolymere bewerkstelligen können. Nachteile bei der

Produktion in Pflanzen sind wiederum die langen Standzeiten (Zeit vom Anbau bis zur Ernte), die großen für den Anbau benötigten Flächen sowie die zusätzlichen Kosten für einen Extraktionsprozess aus der pflanzlichen Matrix (Jung und Steinbüchel 2001).

Die Isolierung aus der entsprechenden Matrix ist ein entscheidender Punkt bei der Produktion von Biopolymeren sowohl in rekombinanten Bakterien als auch in transgenen Pflanzen. Für einen ökonomischen Aufarbeitungsprozess müssen vor allem stabile Polymergehalte in den Pflanzen erzielt werden. Gleichzeitig müssen die Gehalte der Zielsubstanz eine bestimmte Höhe erreichen, damit die Isolierungs- und evtl. Aufreinigungskosten kleiner sind als der mögliche Gewinn für das Biopolymer. Dabei spielt vor allem die Verwendung des isolierten Biopolymers und seiner Zeretzungs- bzw. Folgeprodukte eine große Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass für Cyanophycin bzw. Polyaspartat bereits vielfältige Einsatzgebiete vorhanden sind (Yokoyama *et al.* 1990; Schwamborn 1998; Chang und Swift 1999; Tabata *et al.* 2000; Hühns und Broer 2010).

Ein anderer Aspekt bei der Entwicklung von gentechnisch veränderten Pflanzen ist die Sicherheitsforschung. Bevor eine Pflanze für eine kommerzielle Nutzung zugelassen werden kann, wird sie einer tief greifenden und langwierigen Prüfung unterzogen. Das Prinzip der substantiellen Äquivalenz dient dabei der Beurteilung der GVP im Vergleich zur ihrer nah isogenen Ursprungssorte (OECD 1993; EFSA 2006). Die von den Behörden erlassenen Richtlinien sollen die Bevölkerung so vor möglichen Gefahren, die durch den Anbau und die Nutzung von GVP entstehen könnten, schützen. Die gesetzlichen Regelungen sind ein weiterer Nachteil, der gegen eine Nutzung von GVP zur Produktion von Biopolymeren spricht. Das Zulassungsverfahren für eine gentechnisch veränderte Nutzpflanze kann sich über viele Jahre hinweg ziehen (die Amflora-Kartoffel der BASF Plant Science hat bis heute 13 Jahre Zulassungsverfahren hinter sich, ohne eine endgültige Genehmigung). Aufgrund der aktuellen politischen Lage in Deutschland und Europa ist eine Anmeldung von neuen transgenen Pflanzen generell schwierig.

Aufgrund der Vielzahl an genannten Anwendungsmöglichkeiten für Polyaspartat und Arginin ist die Produktion von Cyanophycin in Pflanzen oder Bakterien im großtechnischen Maßstab dennoch ein lohnender Ansatz. Welchem Produktionsmedium letztendlich der Vorrang gegeben wird, hängt zum einen von der Produktivität der Bakterien bzw. Pflanzen ab und zum anderen von der öffentlichen Akzeptanz der Gentechnik in der Bevölkerung. Die Produktion von Cyanophycin in rekombinanten Mikroorganismen ist derzeit weniger umstritten als der Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass nachwachsende Rohstoffe insbesondere dann eine gute Alternative zu chemisch synthetisierten Produkten auf Basis von Erdöl sind, wenn die Syntheseverleistung der Natur im Endprodukt zumindest teilweise sichtbar wird. Heutzutage wird bereits bei etlichen Fein- und Spezialchemikalien auf Produkte aus nachwachsenden Rohstoffen zurückgegriffen. Dazu

4 Diskussion und Ausblick

zählen z. B. Tenside in Waschmitteln auf Basis von Fettsäuren, Polyurethane auf der Basis von modifizierten Pflanzenölen, Biopolymere auf Basis von Cellulose, naturfaserverstärkte Werkstoffe sowie Zwischenprodukte aus biotechnologischen Verfahren gewonnen aus Zuckern bzw. Stärke (Peters 2006).

5 Material und Methoden

5.1 Bestimmung der Reinheit

Für die Beurteilung eines Isolierungsprozesses ist die Reinheit des Produktes eine entscheidende Kenngröße. Im Falle des Biopolymers Cyanophycin bieten sich aufgrund seiner speziellen Eigenschaften für diese Untersuchungen verschiedene Möglichkeiten. Die unterschiedlichen Verfahren, die zur Bestimmung der Reinheit der isolierten Cyanophycinproben angewendet wurden, werden im Folgenden einzeln beschrieben.

5.1.1 Elementaranalyse

Für die Bestimmung der Reinheit wurde zuerst die Methode der Elementaranalyse verwendet. Die Untersuchungen erfolgten im Institut für Chemie in Zusammenarbeit mit Frau Pries. Für die Analysen wurde ein *Thermoquest Flash EA 1112 C/H/N/S-Analysator* verwendet.

Bei einer reinen organischen Verbindung mit bekannter Molekülgröße kann mit Hilfe der Ergebnisse einer quantitativen Elementaranalyse, aus den prozentualen Gehalten der einzelnen Elemente (C, H, N, S und Halogene), die Summenformel berechnet werden. Bei den Reinheitsuntersuchungen der isolierten Cyanophycinproben wurden die prozentualen Gehalte der enthaltenen Elemente vorher berechnet und anschließend mit den gemessenen Werten verglichen.

Für die Messung wurde die zu untersuchende Probe (10–20 mg) in einen Aluminiumtiegel eingewogen und bei sehr hohen Temperaturen (900 °C) mit Sauerstoff katalytisch verbrannt. Die anfallenden Stickoxide (NO_x) werden mit Kupfer zu elementarem Stickstoff umgewandelt (reduziert). Die Verbrennungsgase (CO₂, H₂O und N₂) werden anschließend an Trennsäulen isoliert und über einen Wärmeleitfähigkeitsdetektor quantifiziert.

5.1.2 LC/MS Messung mit Aminosäure Kit EZ:faast™

Um die genaue Zusammensetzung eines Proteins zu bestimmen, kann das Protein unter Einfluss von hohen Temperaturen und starker Säure in seine Aminosäuren gespalten werden. Anschließend können diese Aminosäuren mit verschiedenen chromatographischen Trennmethode qualitativ und quantitativ untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Zusammensetzung und die Reinheit von isolierten Cyanophycinproben aus transgenem Pflanzenmaterial untersucht werden. Dazu wurden rund 4 mg Cyanophycin mit 200 µL 6 M HCl mit 4 % Thioglycolsäure in einem Probengefäß zusammengegeben und über Nacht (22 h) bei 110 °C im Trockenschrank hydrolisiert.

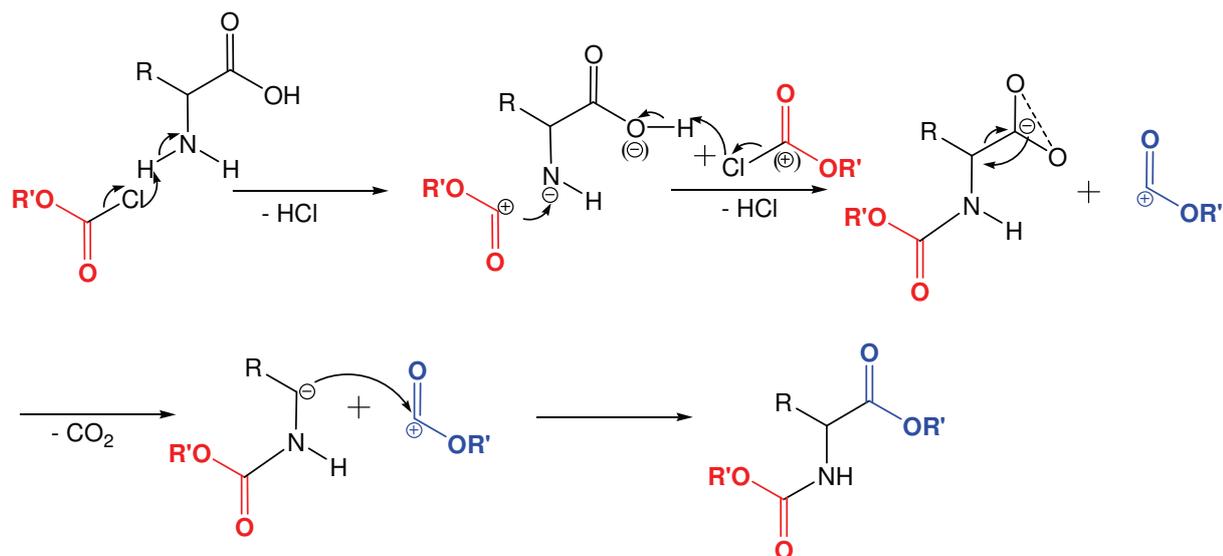


Abbildung 5-1: Reaktionsschema der Derivatisierungsreaktion

Bevor die Messung der einzelnen Aminosäuren mit Hilfe der LC/MS erfolgen konnte, musste die Reaktionslösung mit dem EZ:faast™ Kit von Phenomenex® aufgearbeitet werden. Neben einem Neutralisationsschritt und der Abtrennung von Verunreinigungen mittels Festphasenextraktion wurden bei dieser Aufarbeitungsmethode die Aminosäuren mit einem Säurechlorid derivatisiert (Bathke 2008).

Das Säurechlorid reagiert dabei sowohl mit der Carboxyl- als auch mit der Aminofunktion der Aminosäure und bildet die entsprechenden Derivate (siehe Abbildung 5-1). Aus dieser Überlegung können für die untersuchten Aminosäuren die Derivatmassen berechnet werden. Durch die Aufspaltung des Proteins unter Säureeinfluss sind die Aminosäuren Asparagin und Glutamin nicht bestimmbar, sie werden zu Asparagin- bzw. Glutaminsäure umgewandelt (Phenomenex 2005).

Tabelle 5-1: Gradientenzusammensetzung für die Analyse von Aminosäuren nach Aufarbeitung mit dem EZ:faast Kit™ (A = MeOH mit 0,1 %iger HCOOH; B = H₂O mit 0,1 %iger HCOOH)

t (min)	A (%)	B (%)	Flussrate (µL/min)
0,00	68	32	150
16,00	83	17	150
16,01	68	32	150
40,00	68	32	150

Die Einstellungen für die Messung an der LC/MS-Anlage wurden aus den Diplomarbeiten von Frau Bathke und Frau Bandomir übernommen. Der Gradient setzte sich aus Methanol (A) und Reinstwasser (B) mit je 0,1 % Ameisensäurezusatz

zusammen (siehe Tabelle 5-1). Bei der Injektion der Proben wurde ein Volumen von 2 μL eingespritzt und die Detektion erfolgte im positiven Ionisierungsmodus (+ ESI full ms) im Massenbereich von 50 bis 650 m/z.

Für die quantitative Bewertung der Messergebnisse wurde im Vorfeld eine Kalibrierung der einzelnen Aminosäuren durchgeführt und in jedem Chromatographielauf wurden drei interne Standards (Homoarginin, Methionin-d3 und Homophenylalanin) mit gemessen.

5.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode bei der die proteinhaltigen Proben in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Für die Reinheitsuntersuchungen mittels Gelelektrophorese wurde eine Anlage der Firma Sigma benutzt. Die verwendeten Gele (NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris Mini-Gele), ebenso wie die für die Gelelektrophorese verwendete Gelkammer stammten von der Firma Invitrogen. Das Stromversorgungsgerät war von Consort. Alle Versuche an der Elektrophoreseeinheit wurden bei 75 V und 2 mA durchgeführt.

Für eine Messung der isolierten Cyanophycinproben aus den verschiedenen Pflanzenmaterialien wurden jeweils 2 mg Polymer mit 2 mL SDS-Laufpuffer bzw. Salzsäure ($c = 2 \text{ mol/L}$) versetzt und bei 37 °C im Thermoschüttler gelöst. Die Lösungen wurden nach Ablauf einer Stunde zentrifugiert (10 min; 19.000 g; 20 °C) und der Überstand für die weitere Vorbereitung separiert. Bevor die einzelnen Proben auf das Gel aufgetragen werden konnten, wurden 15 μL der Proben mit 5 μL des Probenpuffers (NuPAGE[®] LDS Probenpuffer; 4x) versetzt und in einem Heizblock bei 70 °C für 10 min erwärmt. Aus diesem Gemisch wurden wiederum 10 μL entnommen und in eine der Geltaschen eingefüllt (Fritz 2008). Zusätzlich wurden pro Durchgang ein bis zwei Geltaschen mit einem Gemisch aus Standardproteinen (Novex[®] SeeBlue[™] Prestained Standard; 1x) gefüllt. Alle nicht genutzten Taschen wurden nur mit Probenpuffer (NuPAGE[®] LDS Probenpuffer; 4x) befüllt.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die Gelkassette aus der Anlage entfernt und mit Hilfe eines Gelmessers geöffnet. Für die Anfärbung der einzelnen Proteinbanden wurde die Coomassie-Färbung gewählt (Instruction Manual; Invitrogen). Dabei wurde wie bei der Proteinbestimmung nach BRADFORD die Reaktion von kationischen Aminosäuren mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 zu einem farbigen Komplex ausgenutzt.

Zunächst wurde dazu das Gel durch die Zugabe von Reinstwasser (100 mL) und unter Verwendung von Mikrowellenstrahlung (45 s, 960 W) gewaschen. Anschließend wurde der Gelbehälter 1 min lang geschüttelt (50 U/min), das Wasser verworfen und der Vorgang zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Wasser nicht entfernt, sondern mit 20 mL SimplyBlue Färbelösung versetzt. Das Gel wurde mit der Lösung nochmals in der Mikrowelle erhitzt und 5 min geschüttelt (50 U/min). Die Lösung wurde daraufhin wieder verworfen und das angefärbte Gel

zum Abschluss noch einmal mit frischem reinst Wasser (100 mL) für 10 min (50 U/min) geschüttelt.

Zur Aufbewahrung des Gels erfolgte die Zugabe von Natriumchloridlösung (20 mL; 20 %ig) zum Reinstwasser. Danach konnten die Gele für mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

5.1.4 Verdau mit Cyanophycinase

Cyanophycin ist für normale Verdauungsenzyme, wie bspw. Trypsin, nicht zugänglich (Simon 1973). Diese Enzyme spalten Aminosäureketten nur nach für sie spezifischen Aminosäuren (Trypsin: Spaltung nach Lysin und Arginin). Das Biopolymer Cyanophycin besteht aus einem Rückgrat aus Aspartateinheiten mit seitenverzweigten Argininresten. Dieses kann nur von bestimmten Enzymen aus den Cyanobakterien selber wieder gespalten werden. Ein Enzym ist die Cyanophycinase.

Für den Verdau mit Cyanophycinase (isoliert aus *E. coli*) wurden 2 mg Cyanophycin in 1 mL der Enzymlösung suspendiert. Die Stammlösung (3,1 mg Cyanophycinase pro 1 ml 20 mM Tris-Puffer; pH = 7,4) wurde vorher im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Nach der Zugabe der Enzymlösung wurde der pH-Wert der Lösung überprüft. Wenn der pH-Wert unter 7 lag, musste die Lösung durch die Zugabe von Natriumhydroxid neutralisiert werden, da das Enzym nur bei neutralen pH-Werten einsetzbar ist. Anschließend wurde die Lösung über Nacht bei 30 °C inkubiert und am nächsten Tag mit Hilfe der Gelelektrophorese analysiert (siehe Kapitel 5.1.3).

Bei der Gelelektrophorese wurde zum Vergleich eine Geltasche nur mit Enzymlösung befüllt. Die Proteinbande bei 30 kDa entspricht dem Enzym Cyanophycinase und war auch in den anderen Verdauungsproben zu finden.

5.1.5 Isolierung aus SDS Gel-Matrix

Die Isolierung des Cyanophycins aus der Gelmatrix ist in Anlehnung an eine Vorschrift aus der Literatur durchgeführt worden (Hager und Burgess 1980).

Dazu wurden die Proteinbanden des Cyanophycins aus der Gelmatrix herausgeschnitten und mit 1 mL Elutionspuffer (0,1 % SDS; 0,05 M Tris-HCl pH=7,9; 0,1 mM EDTA; 5 mM DTT; 0,1 mg/mL BSA und 0,15 M NaCl) vermischt. Die Gelstücke wurden mit Hilfe eines Teflon-Pistills zerstoßen und die Lösung anschließend eine Stunde bei 25 °C inkubiert, damit die Proteine aus der Gelmatrix eluieren konnten. Danach erfolgte die Zentrifugation der Lösung (1 min; 19.000 g; 25 °C) und die Überführung des Überstand in ein silanisiertes Eppi (Protein LoBind Gefäße von Eppendorf). Das SDS aus der Gelmatrix und dem Elutionspuffer wurde durch Behandlung des Überstandes mit eiskaltem Aceton entfernt. Dazu musste die Proteinlösung mit dem vierfachen Volumen an Aceton versetzt und 30 min inkubiert werden. Dann wurde die Lösung 10 min zentrifugiert (19.000 g; 4 °C) und der

Überstand in einem neuen Gefäß gesammelt. Das Aceton wurde im Argonstrom abgedampft (bei 40 °C) und die getrockneten Proben für die weiteren Untersuchungen bereitgestellt.

5.1.6 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Reinheit von Proteinen ist die Ermittlung des Proteinanteils einer Probe mit Hilfe einer für Proteine spezifischen Farbreaktion. Bei diesem colorimetrischen Testverfahren wird die Proteinprobe mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 versetzt und bildet einen stabilen farbigen Komplex. Die verschiedenen Zustände des Farbstoffes absorbieren Licht unterschiedlicher Wellenlängen (siehe Abbildung 5-2).

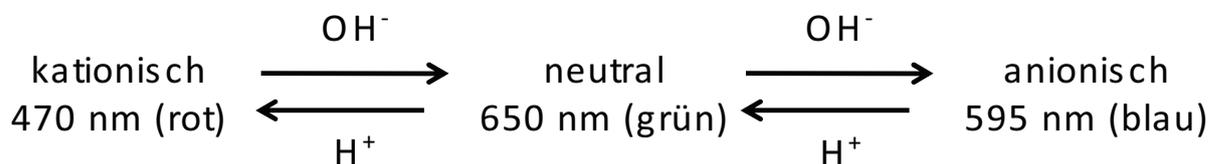


Abbildung 5-2: Die verschiedenen Zustände des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue und die dazugehörigen Absorptionsbanden

Die Komplexierung des Farbstoffes durch die basischen Aminosäuren (z. B. Arginin) eines Proteins führt zum Übergang vom kationischen in den anionischen Zustand. Die Konzentration eines Proteins kann dann in Abhängigkeit von der Intensität der Extinktion bei 595 nm gemessen werden.

Die Messungen für die Proteinbestimmung wurden mit einem Kit von Pierce (Rockford, IL, USA) durchgeführt. Die gebrauchsfertige Farbstofflösung wurde in einem Verhältnis 1:1 mit der verdünnten Proteinlösung versetzt und nach 10 min photometrisch vermessen. Die Kalibrierung erfolgte über eine Eichreihe mit BSA (bovine serum albumin) bzw. Cyanophycin (aus *E. coli*). Im Bereich von 1-8 µg/mL bzw. 1-5 µL/mL wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration der Proteine und Intensität der Absorption festgestellt (Kalibriergeraden siehe Kapitel 2.2.6 Abbildung 2-11).

5.1.7 Proteinbestimmung mit BCA-Reaktion

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes ist die Reduktion von Cu(II)-Ionen zu Cu(I)-Ionen durch Proteine in alkalischem Medium (= BIURET-Reaktion). Im Anschluss daran erfolgt eine Chelatisierung der Cu(I)-Ionen mit jeweils zwei Bicinchoninsäuremolekülen. Es bildet sich ein farbiger Komplex, dessen Intensität bei 562 nm quantitativ gemessen werden kann.

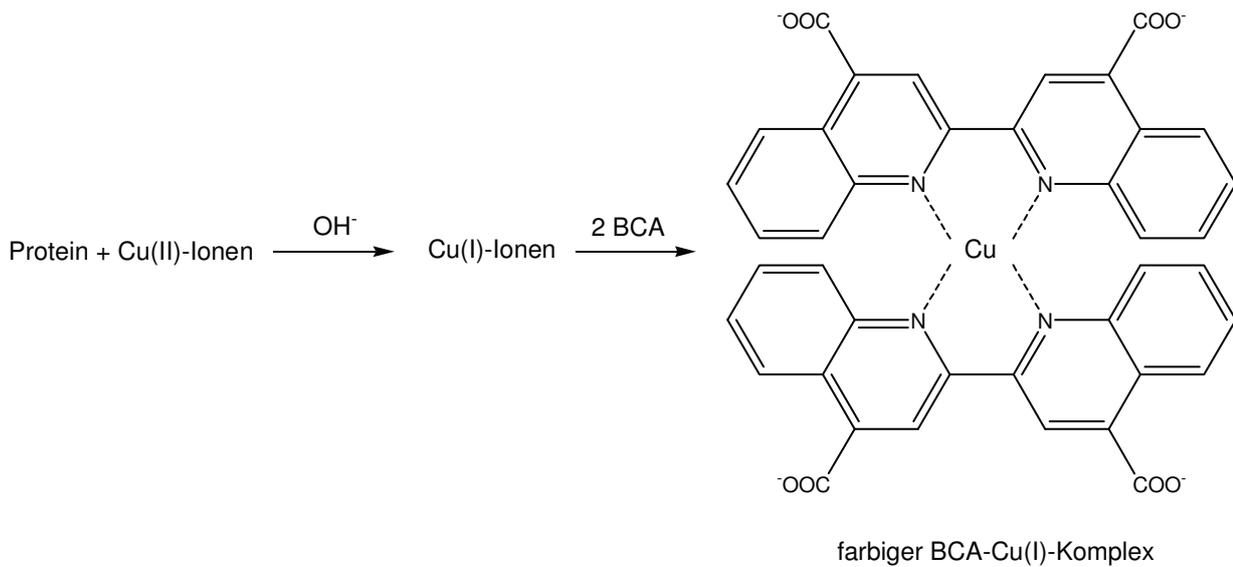


Abbildung 5-3: Reaktionsschema des BCA-Test-Systems: 1. Schritt Reduktion von Cu(II)-Ionen in alkalischem Medium durch Peptidbindung in Proteinen; 2. Schritt Bildung des farbigen BCA-Cu(I)-Komplexes

Die Extraktion für die Bestimmung der löslichen Proteine erfolgte aus 25 mg getrocknetem Pflanzenmaterial mit 1 mL Extraktionspuffer, bestehend aus folgenden Substanzen: 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,25 M Saccharose und 2 mM PMFS. Da PMFS nicht wasserlöslich ist, musste von dieser Substanz eine Stammlösung in Isopropanol angefertigt werden. Die restlichen Pufferbestandteile konnten direkt eingewogen werden und sind in Reinstwasser zu lösen.

Die Extraktionsmischung wurde für 5 min im Thermoschüttler, bei 25 °C und 1000 U/min inkubiert. Anschließend erfolgte die Abtrennung der wässrigen Phase durch Zentrifugation (10 min; 19.000 g; 4 °C). Für die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes wurde 50 µL Probelösung mit 1 mL BCA-Reagenz vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend bei 562 nm gegen eine Blanklösung (nur Puffer mit BCA-Reagenz) vermessen. Durch den Einsatz einer Mikrowelle (MarsXpress von CEM) konnte die Zeit bei der Reaktion der Probelösung mit dem BCA-Reagenz auf 20 s (bei 600 W) verkürzt werden (PierceBiotechnology 2006).

5.2 Extraktion von Cyanophycin

Für die Extraktion von Cyanophycin aus verschiedenem Pflanzenmaterial wurden die besonderen Eigenschaften des Polymers in Bezug auf die Löslichkeit in wässrigen Systemen ausgenutzt. Cyanophycin ist nur bei pH-Werten < 2 bzw. > 9 löslich, sowie

bei hohen Salzkonzentrationen (Simon und Weathers 1976; Simon *et al.* 1980; Elbahloul *et al.* 2005; Füsler und Steinbüchel 2005).

5.2.1 Cyanophycin aus Tabak

Bei der Isolierung von Cyanophycin aus Tabakblättern wurde stets gefriergetrocknetes Material verwendet, welches von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Broer (Universität Rostock) zur Verfügung gestellt wurde.

Das Blattmaterial wurde mit 0,1 %iger Natriumhydrogensulfidlösung vorbehandelt, um einige störende Substanzen im Vorfeld zu extrahieren. Dazu mussten die Blätter in einem Becherglas mit dem 15-20fachen an Lösungsmittel versetzt und mit einem Pürierstab zerkleinert werden. Anschließend wurde mit einem Laborrührer, mit Blattrührer, die Mischung aus Blättern und Lösungsmittel 30 min kontinuierlich gerührt (300 U/min). Bei diesem ersten Extraktionsschritt wurde von den gefriergetrockneten Blättern ein Großteil des Lösungsmittels zur Rehydrierung genutzt und konnte nicht zurückgewonnen werden. Das Gemisch wurde nach dem Rühren zentrifugiert (30 min; 3.000 g; 25 °C). In der überstehenden Lösung wurde der pH-Wert gemessen. Der pH-Wert der Lösung lag nach diesem ersten Extraktionsschritt stets über 3. Somit konnte kein Cyanophycin isoliert worden sein. Die Lösung wurde verworfen und der Blattrückstand wurde zurück in ein Becherglas überführt und erneut extrahiert.

Für die eigentliche Extraktion des Biopolymers wurde dann eine Salzsäurelösung ($c = 0,1 \text{ mol/L}$; $\text{pH} = 1$) im Verhältnis 1:10 (m:V) verwendet. Die Mischung wurde wieder für 30 min gerührt (300 U/min) und anschließend zentrifugiert (30 min; 3.000 g; 25 °C). Der pH-Wert der überstehenden Lösung sollte < 2 sein. Die Blätter wurden für evtl. nachfolgende Extraktionen in das Becherglas zurückgegeben.

Die Lösung musste für die weiteren Schritte der Isolierung des Biopolymers vollständig klar sein, es sollten keine Schwebstoffe enthalten sein, die bei der anschließenden Fällung zu einer Verunreinigung des Niederschlages führen könnten. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Natriumhydroxidlösung ($c = 1-3 \text{ mol/L}$) auf $\text{pH} = 5$ eingestellt. Bei großen Lösungsmittelmengen wurde der pH-Wert auch zuerst mit Hilfe von festem Natriumhydroxid (in Plätzchenform) erhöht, um eine große Zunahme des Endvolumens zu verhindern. Der anfallende Niederschlag wurde abzentrifugiert (45 min; 3.000 g; 25 °C). Die Lösung wurde entsorgt und der Niederschlag mit Methanol und Wasser mehrfach gewaschen, um eventuell noch vorhandene Salzlasten und störende Substanzen (Chlorophyll) zu entfernen. Abschließend wurde der Niederschlag noch einmal zentrifugiert und in einer Gefrier-trocknungsanlage getrocknet.

5.2.2 Cyanophycin aus Kartoffeln

Bei der Isolierung von Cyanophycin aus Kartoffeln wurde sowohl gefriergetrocknetes als auch frisches Material verwendet, welches wiederum von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Broer (Universität Rostock) zur Verfügung gestellt wurde.

Bei den transgenen Kartoffellinien PsbY-*cphA*_{TE} L 12 und L 23 lag das Biopolymer im gesamten Pflanzenmaterial verteilt vor. Von diesen Pflanzen wurden wie bereits zuvor beschrieben (siehe Kapitel 5.2.1) auch die Blätter zur Isolierung benutzt. Bei den gentechnisch veränderten Kartoffellinien B33-PsbY-*cphA*_{TE} L 32 und L 38 wurden nur die Knollen aufgearbeitet, da sich hier die Bildung und Speicherung des Biopolymers einzig auf die Knollen der Kartoffelpflanzen beschränkt.

Isolierung aus frischem Knollenmaterial

Die Extraktion von Cyanophycin aus frischem transgenem Kartoffelmaterial (siehe Abbildung 5-4) erfolgte in Anlehnung an die Isolierung von Stärke aus konventionellen Kartoffeln.

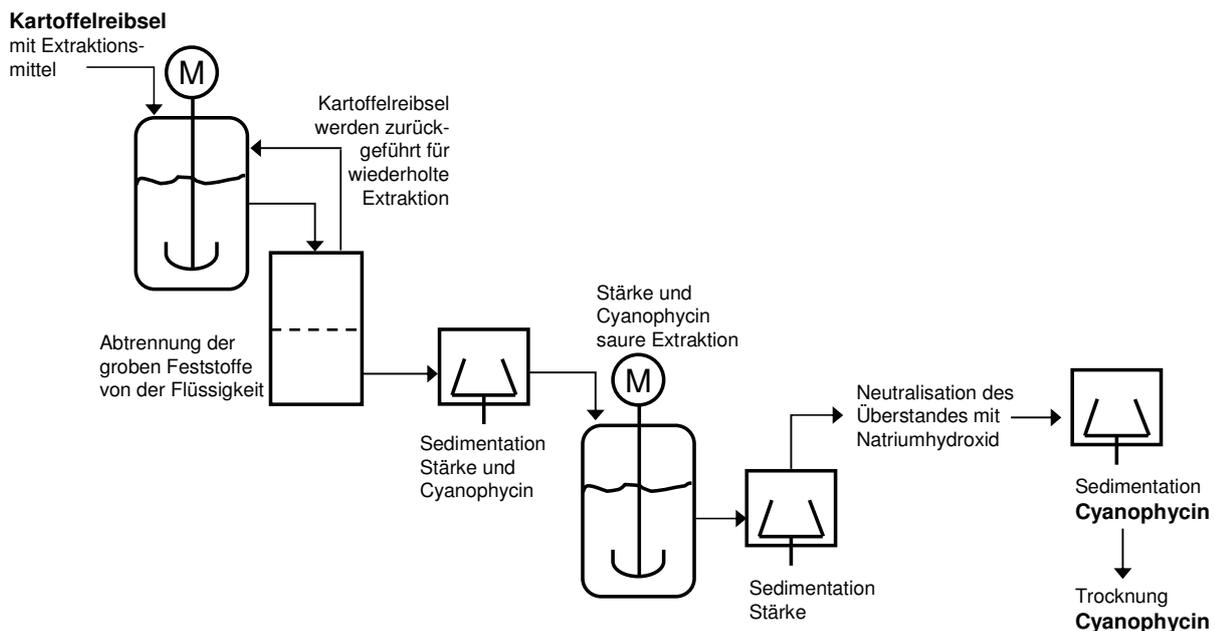


Abbildung 5-4: Schematische Darstellung des Aufarbeitungsprozesses im Labormaßstab für die wasserunlösliche Form des Cyanophycins.

Die zuvor gesäuberten Kartoffeln wurden mit Hilfe einer elektrischen Mühle zerkleinert (Kartoffelreibsel). Anschließend wurden die Kartoffelreibsel in 0,1 %iger Natriumhydrogensulfidlösung aufgenommen und noch einmal mit einem Pürrierstab behandelt, um die Stärkekörner möglichst vollständig aus der Kartoffelmatrix zu lösen. Anschließend wurde die Mischung über ein feinmaschiges Sieb

(Maschenweite 70 μm) in Kartoffelwaschwasser + Stärke und feste Kartoffelbestandteile (Zellwände etc.) getrennt. Das stärkehaltige Waschwasser wurde dann zentrifugiert (45 min; 3.000 g; 25 °C) und der Niederschlag aus Stärke und Cyanophycin (wasserunlöslicher Anteil) für die weitere Isolierung des Biopolymers gesammelt.

Das Gemisch aus Stärke und Cyanophycin wurde mit Salzsäure ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) behandelt und danach erneut zentrifugiert (45 min; 3.000 g; 25 °C). Die Stärke wurde zur Charakterisierung des Isolierungsprozesses gesammelt, getrocknet und anschließend ausgewogen. Die überstehenden Lösungen aus den einzelnen Zentrifugenröhrchen wurden in einem Becherglas vereinigt und nach Kontrolle des pH-Wertes (sollte < 2 sein) mit Hilfe von Natriumhydroxid ($c = 1\text{-}3 \text{ mol/L}$) auf $\text{pH} = 5$ eingestellt. Der anfallende Niederschlag wurde wiederum mit Hilfe einer Zentrifuge von der Lösung abgetrennt und in einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

Isolierung aus lyophilisiertem Knollenmaterial

Bei der Extraktion des Biopolymers aus gefriergetrocknetem Material (Knollen- oder Blattmaterial) wurde dieselbe Methode angewendet, die bereits für die Tabakblätter beschrieben worden ist (siehe Kapitel 5.2.1).

In einem ersten Schritt wurde die Probe mit 0,1 %iger Natriumhydrogensulfidlösung behandelt und das beim Zentrifugieren anfallende Lösungsmittel verworfen. Anschließend erfolgte die eigentliche Extraktion mit Salzsäure ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und die Fällung aus der klar filtrierten Lösung mit Natriumhydroxid.

Der Niederschlag wurde mit Wasser und Methanol gewaschen und mit Hilfe einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

5.3 Filtration

Bei der Isolierung von Cyanophycin aus transgenen Kartoffelknollen müssen die zwei verschiedenen Formen des Biopolymers berücksichtigt werden. Sie unterscheiden sich vor allem bezüglich ihrer Löslichkeit in Wasser. Aufgrund dieser verschiedenen Löslichkeitseigenschaften gab es zwei unterschiedliche Ansätze, die mit der Filtration bearbeitet werden sollten. Zum einen sollte das bei der Extraktion anfallende Kartoffelwaschwasser (KWW) mit der wasserlöslichen Cyanophycinform aufkonzentriert werden, zum anderen sollte das ausgefällte in Wasser unlösliche Cyanophycin nach der Isolierung aufgereinigt werden.

In Kapitel 7.3 sind die beiden Filtrationsanlagen abgebildet, die für diese Fragestellungen benutzt worden sind.

5.3.1 Filtration von Kartoffelwaschwasser

Für die Filtration des Kartoffelwaschwassers (KWW) wurde die Filtrationsanlage der Firma Osmota (siehe Abbildung 7-1) verwendet. Die Antriebskraft für die Filtration entsteht bei dieser Anlage durch eine in das System integrierte Hochdruckpumpe, so dass mit einem kontinuierlichen Überdruck (5 bis 10 bar) gearbeitet werden kann. Zusätzlich kann die Überströmungsgeschwindigkeit der Membran durch Regler eingestellt werden, um eine möglichst optimale Trennung der Bestandteile zu erreichen.

Tabelle 5-2: Angaben des Herstellers über die Trenneigenschaften der verwendeten Membran mit einem MWCO von 10 kDa.

Testsubstanz	MW [kDa]	Rückhalt [%]
Inulin (10 %)	5	60-80
Dextran T10 (1 %)	10	80-93
BSA (0,15 %)	67	>99

Die verwendete Membran bestand aus Cellulose (Nadir GmbH) mit einer Ausschlussgrenze (MWCO) von 10 kDa. Vom Hersteller wurden für diese Membran die in Tabelle 5-2 aufgelisteten Trenneigenschaften angegeben.

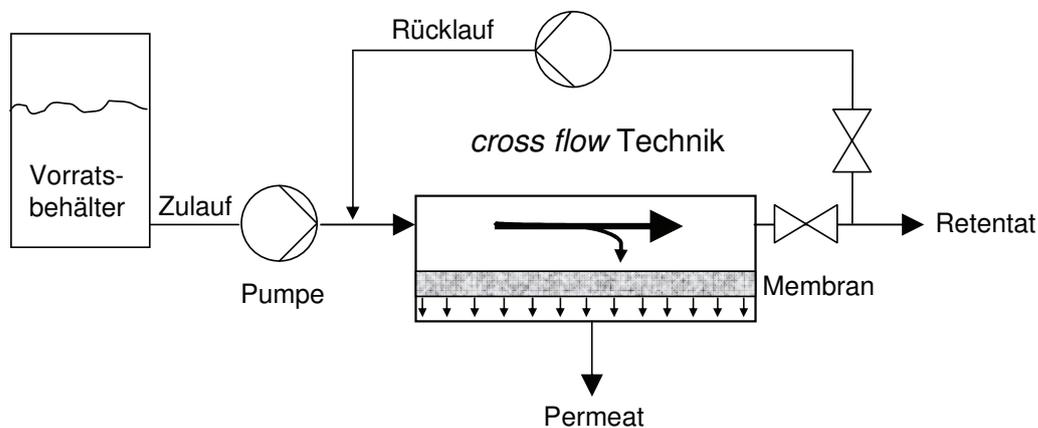


Abbildung 5-5: Schematische Darstellung der *cross flow* Technik (Querstromverfahren)

In der Anlage können Volumina zwischen 0,5 und 2 L mit *cross flow* Technik (Querstromverfahren) über eine Flachmembran filtriert werden. Die Technik des *cross flow* wird vor allem zur Aufkonzentrierung oder zur Entsalzung von Lösungen verwendet. Es wird dabei eine Lösung in einem geschlossenen Kreislauf parallel zur Membran zirkuliert und das gewünschte Produkt durch die Filtrationsmembran zurückgehalten (siehe Abbildung 5-5).

Durch die Zugabe von Wasser sollten die niedermolekularen Bestandteile aus dem Kartoffelwaschwasser über die Membran abgetrennt werden. Lediglich die Proteine sollten zurückgehalten werden. Die Filtration wurde durch pH-Wert- und Leitfähigkeitsmessungen des Permeates ständig kontrolliert.

5.3.2 Filtration von Standardproteinen

Im Gegensatz zur Osmota-Anlage, die mit einer hohen Überströmungsrate an der Membran einer Verstopfung entgegen zu wirken versucht, wurde die Lösung in der zweiten Membrananlage (Rührzelle von Schleicher & Schuell) gerührt. Die Anlage ist mit einem magnetischen Röhreinsatz ausgestattet, der über ein Magnetrührwerk gesteuert werden konnte. Die Geschwindigkeit des Rührers betrug während aller Versuche 300 U/min.

Durch die Erweiterung der Membrananlage, um ein 3-Wege-Ventil, war es möglich, den Flüssigkeitsstand in der Anlage nahezu konstant zu halten bzw. wieder auszugleichen, so dass der Druck auf die Membran nur leichten Schwankungen unterworfen war. Somit konnte auch die vorzeitige Verstopfung der Membranporen verhindert werden.

Das Permeat aus den Filtrationsversuchen mit einigen Standardproteinen wurde photometrisch untersucht. Dazu wurden jeweils 5 mL Permeat in einem 15 mL Falcongefäß gesammelt und anschließend zur Konzentrationsbestimmung mit der BRADFORD Methode oder direkt photometrisch vermessen (Kalibriergeraden für die einzelnen Standardproteine siehe Kapitel 7.4, Abbildung 7-4 und Tabelle 7-3).

5.3.3 Filtration von isolierten Cyanophycinproben

Die Filtration der isolierten Cyanophycinproben wurde durch einen Argonüberdruck von 1,5 bar erreicht. Die verwendeten Membranen bestanden wiederum aus Cellulose (Nadir GmbH) mit einem Ausschlussgrenze (MWCO) von 5-30 kDa. Ein entscheidendes Auswahlkriterium bei der Filtration der isolierten Cyanophycinproben war die pH-Stabilität der Membranen, vor allem im stark saurem Bereich unterhalb von $\text{pH} = 2$.

Das Permeat der Filtrationsversuche wurde photometrisch untersucht. Dazu wurden jeweils 5 mL Permeat in einem 15 mL Falcongefäß gesammelt und anschließend mit der BRADFORD Methode vermessen.

6 Literatur

FKZ 22009202 (2007) Abschlussbericht. *Produktion von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffelknollen (Phase II)*, Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR e.V.).

FKZ 22012606 (2009) Abschlussbericht. *Production von biologisch abbaubaren Polymeren in transgenen Kartoffelknollen (Phase IIb)*, Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR e.V.).

Aboulmagd, E., Voss, I., Oppermann-Sanio, F.B. und Steinbüchel, A. (2001) Heterologous expression of cyanophycin synthetase and cyanophycin synthesis in the industrial relevant bacteria *Corynebacterium glutamicum* and *Ralstonia eutropha* and in *Pseudomonas putida*. *Biomacromolecules*, **2** (4): 1338-1342.

Allen, M.M., Yuen, C., Medeiros, L., Zizlsperger, N., Farooq, M. und Kolodny, N.H. (2005) Effects of light and chloramphenicol stress on incorporation of nitrogen into cyanophycin in *Synechocystis* sp. strain PCC 6308. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, **1725** (2): 241-246.

Anderson, A.J. und Dawes, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, **54** (4): 450-472.

Angyal, S.J. (2001) *The Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformation and related reactions*. In: Stütz, A.E. (eds) *Glycoscience - Epimerisation, Isomerisation and rearrangement reactions of carbohydrates*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp 1-14.

Bathke, C. (2008) *Vergleichende Analytik von freien Aminosäuren in transgenen und konventionellen Pflanzen mittels Flüssigkeitschromatographie / Massenspektrometrie*. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock in Rostock, Diplomarbeit.

Balasubramaniam, D., Wilkinson, C., van Cott, K., Zhang, C. (2003) *Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction*. *Journal of Chromatography A* **989** (1): 119-129.

Behr, A. und Onken, U. (2006) *Nachwachsende Rohstoffe*. In: Baerns, M., Behr, A., Brehm, A. et al. (eds) *Technische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, pp 517-529.

Beier, W. (2009) *Biologisch abbaubare Kunststoffe*. *Umweltbundesamt*, www.umweltbundesamt.de.

Berg, H., Ziegler, K., Piotukh, K., Baier, K., Lockau, W. und Volkmer-Engert, R. (2000) Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin) - Mechanism of the cyanophycin synthetase reaction studied with synthetic primers. *European Journal of Biochemistry*, **267** (17): 5561-5570.

Biermann, U., Friedt, W., Lang, S., Lühs, W., Machmüller, G., Klaas, M.R., Metzger, J.O., Schäfer, H.J. und Schneider, M.P. (2000) New syntheses with oils and fats as renewable raw materials for the chemical industry. *Angewandte Chemie-International Edition*, **39** (13): 2206-2224.

- BMBF (2009) Runder Tisch zur Pflanzengenetik. <http://www.bmbf.de/de/13622.php>.
- Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawrath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R.N. und Willmitzer, L. (2000a) Transgenic *Arabidopsis* plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4 % of their fresh weight. *Planta*, **211** (6): 841-845.
- Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawrath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R.N. und Willmitzer, L. (2000b) Transgenic *Arabidopsis* plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight. *Planta*, **211** (6): 841-845.
- Bohmert, K., Balbo, I., Steinbüchel, A., Tischendorf, G. und Willmitzer, L. (2002) Constitutive expression of the β -ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants. *Plant Physiology*, **128** (4): 1282-1290.
- Borzi, A. (1887) Le comunicazioni intracellulari delle Nostochinee. *Malpighia*, **1**: 28-74.
- Bou-Habib, G. und Thalhammer, W. (2006) Aus Abfall werden wertvolle Produkte. *Umwelt Perspektiven*, 2-3.
- Boysen, M. (2008) Grüne Gentechnik - eine gesellschaftliche Kontroverse. *Bundeszentrale für politische Bildung*, <http://www.bpb.de/themen/AXSF27.html>.
- Bradford, M.M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72** (1-2): 248-254.
- Byrom, D. (1987) Polymer synthesis by microorganisms - technology and economics. *Trends in Biotechnology*, **5** (9): 246-250.
- Chang, C.J. und Swift, G. (1999) Poly(aspartic acid) hydrogel. *Journal of Macromolecular Science, Part A (Pure and Applied Chemistry)*, **36** (7&8): 963-970.
- Denniston, K.J. und Topping, J.J. (2001) Adaptation of a traditional study of enzyme structure and properties for the constructivist classroom. *Towson University* <http://www.towson.edu/csme/mctp/Journeys/Adaptation.doc>.
- Desborough, S.L. und Weiser, C.J. (1974) Improving potato protein 1. Evaluation of selection techniques. *American Potato Journal*, **51** (6): 185-196.
- Divyashree, M.S., Shamala, T.R. und Rastogi, N.K. (2009) Isolation of Polyhydroxyalkanoate from Hydrolyzed Cells of *Bacillus flexus* using Aqueous Two-phase System Containing Polyethylene Glycol and Phosphate. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **14** (4): 482-489.
- Donachy, J. und Sikes, S.C. (1993) Water-insoluble crosslinked poly(amino acid) superabsorbants. Patent: University of South Alabama (US), WO 3220856 A1.
- Dörnenburg, H. und Knorr, D. (1997) Evaluation of elicitor- and high-pressure-induced enzymatic browning utilizing potato (*Solanum tuberosum*) suspension cultures as a model system for plant tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45** (10): 4173-4177.

- EFSA (2006) Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *The EFSA Journal*, **99** 1-100.
- Ehrenstein, G.W. (2006) *Ungesättigtes Polyesterharz (UP-Harz)*. In: Ehrenstein, G.W. (eds) *Faserverbundkunststoffe (Werkstoffe - Verarbeitung - Eigenschaften)*, Carl Hanser Verlag, München Wien, pp 54-60.
- Elbahloul, Y., Krehenbrink, M., Reichelt, R. und Steinbüchel, A. (2005) Physiological conditions conducive to high cyanophycin content in biomass of *Acinetobacter calcoaceticus* strain ADP1. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** (2): 858-866.
- FAO (1973) Energy and protein requirements. *FAO Nutrition Meeting Report Series*, **No. 52**, Rome.
- Festel, G., Knöll, J., Götz, H. und Zinke, H. (2004) Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie. *Chemie Ingenieur Technik*, **76** (3): 307-312.
- FNR (2007) Werkstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen: Biokunststoffe. <http://www.biowerkstoffe.info/biokunststoffe.html>.
- Freeman, M.B., Paik, Y.H., Swift, G. und Yocom, K.M. (1994) Biodegradability of polycarboxylates: structure - activity studies. *Polymer Preprints*, **35** (2): 423-424.
- Frey, K.M., Oppermann-Sanio, F.B., Schmidt, H. und Steinbüchel, A. (2002) Technical-scale production of cyanophycin with recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (7): 3377-3384.
- Fritz, R. (2008) *Identifizierung von Proteinen mittels Flüssigchromatografie/Massenspektrometrie*. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock in Rostock, Diplomarbeit.
- Füser, G. und Steinbüchel, A. (2005) Investigations on the solubility behavior of cyanophycin. Solubility of cyanophycin in solutions of simple inorganic salts. *Biomacromolecules*, **6** (3): 1367-1374.
- Hager, D.A. und Burgess, R.R. (1980) Elution of proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gels, Removal of Sodium Dodecyl-Sulfate, and renaturation of enzymatic-activity - Results with sigma subunit of *Escherichia-Coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Analytical Biochemistry*, **109** (1): 76-86.
- Harada, K. (1959) Polycondensation of thermal precursors of aspartic acid. *Journal of Organic Chemistry*, **24** (11): 1662-1666.
- Holm, F. (1980) A new system for the production of starch and protein from potato. *Starch-Stärke*, **32** (8): 258-262.
- Houmiel, K.L., Slater, S., Broyles, D., Casagrande, L., Colburn, S., Gonzalez, K., Mitsky, T.A., Reiser, S.E., Shah, D., Taylor, N.B., Tran, M., Valentin, H.E. und Gruys, K.J. (1999) Poly(β -hydroxybutyrate) production in oilseed leukoplasts of *Brassica napus* Planta, **209** (4): 547-550.

- Hühns, M., Neumann, K., Hausmann, T., Ziegler, K., Klemke, F., Kahmann, U., Staiger, D., Lockau, W., Pistorius, E.K. und Broer, I. (2008) Plastid targeting strategies for cyanophycin synthetase to achieve high-level polymer accumulation in *Nicotiana tabacum*. *Plant Biotechnology Journal*, **6** 321-326.
- Hühns, M., Neumann, K., Hausmann, T., Klemke, F., Lockau, W., Kahmann, U., Kopertekh, L., Staiger, D., Pistorius, E.K., Reuther, J., Waldvogel, E., Wohlleben, W., Effmert, M., Junghans, H., Neubauer, K., Kragl, U., Schmidt, K., Schmidtke, J. und Broer, I. (2009) Tuber specific *cphA* Expression to enhance cyanophycin production in potatoes. *Plant Biotechnology Journal*, **7** (9): 883-898.
- Hühns, M. und Broer, I. (2010) *Biopolymers*. In: Kempken, F. and Jung, C. (eds) Genetic Modifikation of Plants, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp
- Hüsing, B. (2009) Weiße Gentechnologie. *Bundeszentrale für politische Bildung*, <http://www.bpb.de/themen/AMFGLO.html>.
- Ibrahim, M.H.A. und Steinbüchel, A. (2009) Poly(3-Hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. *Applied and Environmental Microbiology*, **75** (19): 6222-6231.
- James, C. (2006) Weltweiter Anbau transgener Pflanzen nach 10 Jahren Kommerzialisierung 2005 weiterhin im Aufwind. *ISAAA - International Service for the Acquisition of Agro-Biotech Applications*, Sao Paulo, Brasilien.
- James, C. (2008) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008. *ISAAA - International Service for the Acquisition of Agro-Biotech Applications*, ISAAA Brief No. 39, Ithaca, NY.
- Joentgen, W., Groth, T., Steinbüchel, A., Hai, T. und Oppermann, F.B. (1998) Polyasparaginic acid homopolymers and copolymers, biotechnical production and use therefor. Patent: Bayer Aktiengesellschaft; D-51368 Leverkusen (DE), WO 98/39090.
- John, M.E. und Keller, G. (1996) Metabolic pathway engineering in cotton: biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93** 12768-12773.
- Jung, C. und Steinbüchel, A. (2001) Bioplastik aus Nutzpflanzen: Palette der nachwachsenden Rohstoffe erweitert. *Biologie in unserer Zeit*, **31** (4): 250-258.
- Kempken, F. und Kempken, R. (2006) *Gentechnik bei Pflanzen - Chancen und Risiken*, Berlin Heidelberg by Springer-Verlag.
- Kjeldahl, J. (1883) Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Z.Anal.Chem.*, **22** 366-382.
- Klein, T., Mitschker, A. und Moritz, R.J. (2004) Zur Hydrolyse von Polysuccinimid und zu dessen Wirkung gegen Tunnelversinterung. *Wasserwirtschaft*, **04** 32-37.
- Knorr, D., Kohler, G.O. und Betschart, A.A. (1977) Potato protein concentrates: The influence of various methods of recovery upon yield, compositional and functional characteristics. *Journal of Food Processing and Preservation*, **1** (3): 235-247.
- Knorr, D. (1978) Protein quality of potato and potato protein concentrates. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, **11** (3): 109-115.

- Knorr, D. (1980) Effect of recovery methods on yield, quality and functional properties of potato protein concentrates. *Journal of Food Science*, **45** (5): 1183-1186.
- Kovacs, J., Csaszar, J., Kovacs, H.N., Vajda, T., Mix, H. und Konyves, I. (1961) Chemical studies of polyaspartic acids. *Journal of Organic Chemistry*, **26** (4): 1084-1091.
- Kröckel, J. (2005) *Membranverfahren zur Aufarbeitung von Lösungen mit ionischen Flüssigkeiten*. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock in Rostock, Dissertation.
- Lang, N., Simon, R.D. und Wolk, C.P. (1972) Correspondence of cyanophycin granules with structured granules in *Anabaena cylindrica*. *Archiv für Mikrobiologie*, **83** (4): 313-320.
- Lee, S.Y. (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, **49** (1): 1-14.
- Leopold, C.S. und Friend, D.R. (1995) *In vivo* pharmacokinetic study for the assessment of poly(L-aspartic acid) as a drug carrier for colon-specific drug delivery. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **23** (4): 397-406.
- Lippold, B. (2006) Der Regenbogen der Biotechnologie. *Chemie.de*® Informations Service, <http://www.chemie.de/articles/d/44283/>.
- Lössl, A., Eibl, C., Harloff, H.J., Jung, C. und Koop, H.U. (2003) Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Reports*, **21** (9): 891-899.
- Lotz, M. und Eggengoor, G. (2008) Method of obtaining plant protein fractions with a medium molecular weight, plant protein fraction, and its use. Patent: Emsland Stärke GmbH, *WO/2008/052501*.
- Luscher, C., Schlüter, O. und Knorr, D. (2005) High pressure-low temperature processing of foods: impact on cell membranes, texture, color and visual appearance of potato tissue. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **6** (1): 59-71.
- Maul, A.G., Richter, M. und Gramm, U. (2008) 248. *Versorgung mit Kartoffeln*. In: Schmidt, M. (eds) Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland, Wirtschaftsverlag NW, Bremerhaven, pp 217-218.
- Mayer, A.M. (1987) Polyphenol oxidases in plants - Recent progress. *Phytochemistry*, **26** (1): 11-20.
- Menzel, F., Kasper, C., Scheper, T. und Zeidler, R. (2005) Abtrennung wertvoller Kartoffelproteine mit Hilfe von Membranabsorbern. *BioSpektrum*, **11.Jahrgang** (1): 105-106.
- Müller, R.J. (2000) Biologisch abbaubare Kunststoffe. *Biologie in unserer Zeit*, **30** (4): 218-225.
- Nagatomo, A., Tamatani, H., Ajioka, M. und Yamaguchi, A. (1995) Superabsorbent polymer and process for producing same. Patent: Mitsui Toatsu Chemicals (Japan), US 5461085 (A).

- Nawrath, C., Poirier, Y. und Somerville, C. (1994) Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91** (26): 12760-12764.
- Nawrath, C., Poirier, Y. und Somerville, C. (1995) Plant polymers for biodegradable plastics - cellulose, starch and polyhydroxyalkanoates. *Molecular Breeding*, **1** (2): 105-122.
- Neumann, K., Stephan, D.P., Ziegler, K., Huhns, M., Broer, I., Lockau, W. und Pistorius, E.K. (2005) Production of cyanophycin, a suitable source for the biodegradable polymer polyaspartate, in transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal*, **3** (2): 249-258.
- Obst, M. und Steinbüchel, A. (2004) Microbial degradation of poly(amino acid)s. *Biomacromolecules*, **5** (4): 1166-1176.
- OECD (1993) Safety evaluation of food derived by modern biotechnology: Concepts and Principles. *Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris*, <http://www.oecd.org/pdf/M00034000/M00034525.pdf>.
- Oppermann-Sanio, F.B. und Steinbüchel, A. (2002) Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *Naturwissenschaften*, **89** (1): 11-22.
- Oppermann-Sanio, F.B. und Steinbüchel, A. (2003) *Cyanophycin*. In: (eds) Polyamides and Complex proteinaceous materials, Wiley-VCH, pp 83-106.
- Peoples, O.P. und Sinskey, A.J. (1989) Poly- β -hydroxybutyrate (Phb) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16 - Identification and characterization of the Phb polymerase gene (Phbc). *Journal of Biological Chemistry*, **264** (26): 15298-15303.
- Peters, D. (2006) Nachwachsende Rohstoffe in der Industrie. *Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR)*, www.nachwachsende-rohstoffe.de.
- Phenomenex (2005) *For amino acid analysis of protein hydrolysate by LC-MS*. in EZ:faast™ User's manual, <http://www.phenomenex.com/products/brands/view.aspx?id=178>.
- PierceBiotechnology (2006) Shorten the BCA Protein Assay incubation using a microwave oven. *Tech Tip #10*, www.piercenet.com.
- Poirier, Y., Dennis, D., Klomparens, K., Nawrath, C. und Somerville, C. (1992a) Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in plants. *FEMS Microbiology Reviews*, **103** (2-4): 237-246.
- Poirier, Y., Dennis, D.E., Klomparens, K. und Somerville, C. (1992b) Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science*, **256** (5056): 520-523.
- Poirier, Y. und Gruys, K.J. (2001) *Production of polyhydroxyalkanoates in transgenic plants*. In: Steinbüchel, A. (eds) Biopolymers, Wiley-VHV-Verlag GmbH, Weinheim, pp 401-435.
- Pratesi, G., Savi, G., Pezzoni, G., Bellini, O., Penco, S., Tinelli, S. und Zunino, F. (1985) Poly-L-aspartic acid as a carrier for doxorubicin: a comparative *in vivo* study of free and polymer-bound drug. *British Journal of Cancer*, **52** (6): 841-848.

- Pude, R. (2005) Pflanzen für die Industrie - Pflanzen, Rohstoffe, Produkte. *Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR)*.
- Richter, R., Hejazi, M., Kraft, R., Ziegler, K. und Lockau, W. (1999) Cyanophycinase, a peptidase degrading the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin) - Molecular cloning of the gene of *Synechocystis* sp. PCC 6803, expression in *Escherichia coli*, and biochemical characterization of the purified enzyme. *European Journal of Biochemistry*, **263** (1): 163-169.
- Robertson, C. und Christensen, G. (1996) Enzymatic browning inhibitors: Factors which interfere or prevent polyphenoloxidase from oxidizing phenolic compounds in tissue and creating brownish polymers.
<http://food.oregonstate.edu/flavor/phenol.html>.
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J. und Willmitzer, L. (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class-I patatin gene. *Embo Journal*, **8** (1): 23-29.
- Romano, A., van der Plas, L.H.W., Witholt, B., Eggink, G. und Mooibroek, H. (2005) Expression of poly-3-(R)-hydroxyalkanoate (PHA) polymerase and acyl-CoA-transacylase in plastids of transgenic potato leads to the synthesis of a hydrophobic polymer, presumably medium-chain-length PHAs. *Planta*, **220** (3): 455-464.
- Roweton, S., Huang, S.J. und Swift, G. (1997) Poly(aspartic acid): Synthesis, biodegradation, and current applications. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, **5** (3): 175-181.
- Sauter, A. und Hüsing, B. (2005) TA-Projekt grüne Gentechnik - Transgene Pflanzen der 2. und 3. Generation. *TAB - Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag*, Endbericht.
- Schiff, H. (1897) Über Polyaspartsäuren. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **30** 2449-2459.
- Schwamborn, M. (1998) Chemical synthesis of polyaspartates: A biodegradable alternative to currently used polycarboxylate homo- and copolymers. *Polymer Degradation and Stability*, **59** (1-3): 39-45.
- Schwamborn, M. und Joentgen, W. (1998) Chemical synthesis of polyaspartates. A biodegradable alternative to currently used polycarboxylate homo- and copolymers. *Chimica Oggi - Chemistry Today*, **16** (11-12): 36-40.
- Serr, A., Pühler, A. und Broer, I. (2007) Der Beitrag von Pflanzen mit neuartigen Eigenschaften zur Inwertsetzung ländlicher Räume. *Materialien der Interdisziplinären Arbeitsgruppe "Zukunftsorientierte Nutzung ländlicher Räume" Nr.19*, Berlin: Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften.
- Shogren, R.L., Willett, J.L., Westmoreland, D., Gonzalez, S.O., Doll, K.M. und Swift, G. (2008) Properties of copolymers of aspartic acid and aliphatic dicarboxylic acids prepared by reactive extrusion. *Journal of Applied Polymer Science*, **110** (6): 3348-3354.
- Simon, R.D. (1971) Cyanophycin granules from blue-green alga *Anabaena cylindrica*: A reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **68** (2): 265-267.

- Simon, R.D. (1973) Measurement of the cyanophycin granule polypeptide contained in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Journal of Bacteriology*, **114** (3): 1213-1216.
- Simon, R.D. (1976) Biosynthesis of multi-L-Arginyl-poly(L-Aspartic Acid) in filamentous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **422** (2): 407-418.
- Simon, R.D. und Weathers, P. (1976) Determination of structure of novel polypeptide containing aspartic acid and arginine which is found in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, **420** (1): 165-176.
- Simon, R.D., Lawry, N.H. und McLendon, G.L. (1980) Structural characterization of the cyanophycin granule polypeptide of *Anabaena cylindrica* by circular-dichroism and raman-spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **626** (2): 277-281.
- Snell, K.D. und Peoples, O.P. (2002) Polyhydroxyalkanoate polymers and their production in transgenic plants. *Metabolic Engineering*, **4** 29-40.
- Souci, Fachmann und Kraut (1994) *Kartoffel (Solanum tuberosum L.)*. In: (eds) Food composition and nutrition tables - Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, pp 606-608.
- Steinle, A., Oppermann-Sanio, F.B., Reichelt, R. und Steinbüchel, A. (2008) Synthesis and accumulation of cyanophycin in transgenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* *Applied and Environmental Microbiology*, **74** (11): 3410-3418.
- Struhalla, M. und Fietz, C. (2005) Feinchemie braucht Weiße Biotechnologie. *Transkript*, **12** 47-48.
- Tabata, K., Abe, H. und Doi, Y. (2000) Microbial degradation of poly(aspartic acid) by two isolated strains of *Pedobacter* sp. and *Sphingomonas* sp. *Biomacromolecules*, **1** (2): 157-161.
- Tal, M., Silberstein, A. und Nusser, E. (1980) Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? *The Journal of Biological Chemistry*, **260** (18): 9976-9980.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408** (6814): 796-815.
- Thygesen, P.W., Dry, I.B. und Robinson, S.P. (1995) Polyphenol oxidase in potato - A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiology*, **109** (2): 525-531.
- Ulber, R. (2002) *Biotechnologische Methoden zur effizienteren Rohstoffnutzung*. Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover in Hannover, Habilitationsschrift.
- Ulber, R. (2005) Aufarbeitung nachwachsender Rohstoffe - Downstream-Processing und Biotransformation. *Chemie Ingenieur Technik*, **77** (4): 363-372.
- van Beilen, J.B. und Poirier, Y. (2008) Production of renewable polymers from crop plants. *The Plant Journal*, **54** (4): 684-701.

- van Königsveld, G.A. (2001) *Physico-chemical and functional properties of potato proteins*. Agrotechnology and Food Sciences, Wageningen University in Wageningen, Dissertation.
- Vegotsky, A., Harada, K. und Fox, S.W. (1958) The characterization of polyaspartic acid and some related compounds. *Journal of the American Chemical Society*, **80** (13): 3361-3366.
- Verband der chemischen Industrie (2009) Pilze und Bakterien immer wichtiger für die Chemie: Weiße Biotechnologie eröffnet neue Wege. *Analytik News - Das Online-Magazin für Labor und Analytik*, <http://www.analytik-news.de/Presse/2009/321.html>.
- Visser, R.G.F., Somhost, J., Kuipers, G.J., Ruys, N.J., Feenstra, W.J. und Jacobson, E. (1991) Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthetase in potato by antisense constructs. *Molecular and General Genetics*, **225** (2): 289-296.
- Weaver, C.M. (1974) *Factors influencing enzymatic browning of ripening bananas*. Department of Foods and Nutrition, Oregon State University in Corvallis, Master of Science.
- Westfalia Separator Industry (2006) *Gewinnung von Stärke und Protein aus Kartoffeln (Take the Best - Separate the Rest)* Geschäftsbericht.
- Wohlleben, W., Lockau, W., Ziegler, K., Pistorius, E.K., Ruppel, H.-G., Stephan, D.P. und Broer, I. (1999) Cyanophycin synthetase gene useful for producing transgenic plants for food or fodder use or for producing cyanophycin or derivatives, e.g. polyaspartate polymers. Patent: Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG, DE 19981013692 19980327.
- Yokoyama, M., Miyauchi, M., Yamada, N., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K. und Inoue, S. (1990) Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Research*, **50** (6): 1693-1700.
- Ziegler, K., Diener, A., Herpin, C., Richter, R., Deutzmann, R. und Lockau, W. (1998) Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin). *European Journal of Biochemistry*, **254** (1): 154-159.
- Ziegler, K., Deutzmann, R. und Lockau, W. (2002a) Cyanophycin synthetase-like enzymes of non-cyanobacterial eubacteria: Characterization of the polymer produced by a recombinant synthetase of *Desulfitobacterium hafniense*. *Zeitschrift für Naturforschung C - Journal of Biosciences*, **57** (5-6): 522-529.
- Ziegler, K., Lockau, W., Ebert, J., Piotukh, K., Berg, H. und Volkmer-Engert, R. (2002b) Method for improved production of cyanophycine and the secondary products thereof. Patent: Bayer AG (DE), WO 0212459-A 1.
- Ziegler, K., Lockau, W. und Deutzmann, R. (2003) Preparing a biopolymer with polyaspartate backbone, useful for preparing polyaspartate and related copolymers, comprises recombinant expression of specific synthetase. Patent: Bayer AG (DE), DE 10201758.

Zimmermann, P. und Zentgraf, U. (2004) Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Blattseneszenz während der Entwicklung von Pflanzen. *Gesunde Pflanzen*, **56** (7-8): 208-217.

7 Anhang

7.1 Geräteliste

Tabelle 7-1: Liste der verwendeten Geräte mit Angabe des Herstellers

Gerät	Bezeichnung	Firma
Elektrische Mühle Sieb Mahleinsatz	MF 10 basic 1,0 mm	IKA® Labortechnik
Elementaranalysator	Quest ...	Thermo
Filtrationsanlage	Rührzelle SC 75	Schleicher & Schuell
Filtrationsanlage	MEMCALL OS-MS-01	KSC Osmota GmbH
Gelelektrophorese Kammer	Vertical Mini-Gel System, Single Unit	Sigma
Stromversorgung	Electrophoresis Power Supply EV231	Consort
Heizblock		
HPLC: Knauer K 501		
Pumpen	Smartline 1000	Knauer
Autosampler	Smartline 3800	Knauer
Degasser		Knauer
DAD-Detektor	Smartline 2800	Knauer
RI-Detektor	K-2301	Knauer
Säulenofen	Jetstream 2 Plus	Knauer
Vorsäule	Supelcoguard Ca/C 611 59306-U 5 cm x 4,6 mm	Supelco
Säule	Supelcogel Ca 59306-U 30 cm x 7,8 mm	Supelco
Software	Chrom Elite (Version 2.05)	Knauer
Laborrührer	Eurostar digital	IKA Labortechnik
LC-MS: (Baujahr 2005)		Thermo Scientific
Pumpen	MS Pump Plus- Finnigan Surveyor	
Autosampler	Plus – Finnigan Surveyor	
UV-Detektor	PDA Plus - Finnigan Surveyor	
MS-Detektor	Finnigan LTQ	
Software	Xcalibur (Version 2.0 SR2)	
Säulenofen		
Vorsäule		
Säule	EZ:faast AAA-MS HPLC Column 25 cm x 2,0 mm HPLC column (150 x 2,1mm; 5µm)	

Gerät	Bezeichnung	Firma
Leitfähigkeitsmessgerät	Portamess® SE 204	Knick
Mikrowelle	MARS Xpress	CEM
pH Meter	pH 340i inolab pH Level 1	WTW WTW
Photometer	UV1 Specord 200 und 50	Thermo Spectronic Analytik Jena
Software	WinAspect	Analytik Jena
Pipetten	100-1000µL, 20-200µL, 2-20 µL, 1-5 mL	Eppendorf
Pürrierstab	STM1200	SIG GmbH
Reinstwasseranlage		SG Seral
Speed Vakuum Anlage		
Zentrifuge	RVC 2-18	Christ
Pumpe	LVS 301	ILMVAC
Sprühtrockner	Mini Spray Dryer B-290	BÜCHI
Thermoschüttler	Thermomixer comfort HTM 130	Eppendorf HLC
Vortex	VV3 S40	VWR
Waage	BP 121 S	Sartorius
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R Centrifuge 5415 R Mikro 22R	Eppendorf Eppendorf Hettich

7.2 Chemikalienliste

Die verwendeten transgenen Tabak- und Kartoffelproben wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Inge Broer (Universität Rostock) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um Tabak mit dem Konstrukt PsbY-*cphA*_{Te} Event 51-3 und Kartoffeln mit dem gleichen Konstrukt PsbY-*cphA*_{Te} Klon 10, 12 und 23, sowie Kartoffeln mit einem knollenspezifischen Promotor B33-PsbY-*cphA*_{Te} Klon 32 und 38. Das Pflanzenmaterial stammt sowohl aus GWH- wie auch aus FL-Versuchen.

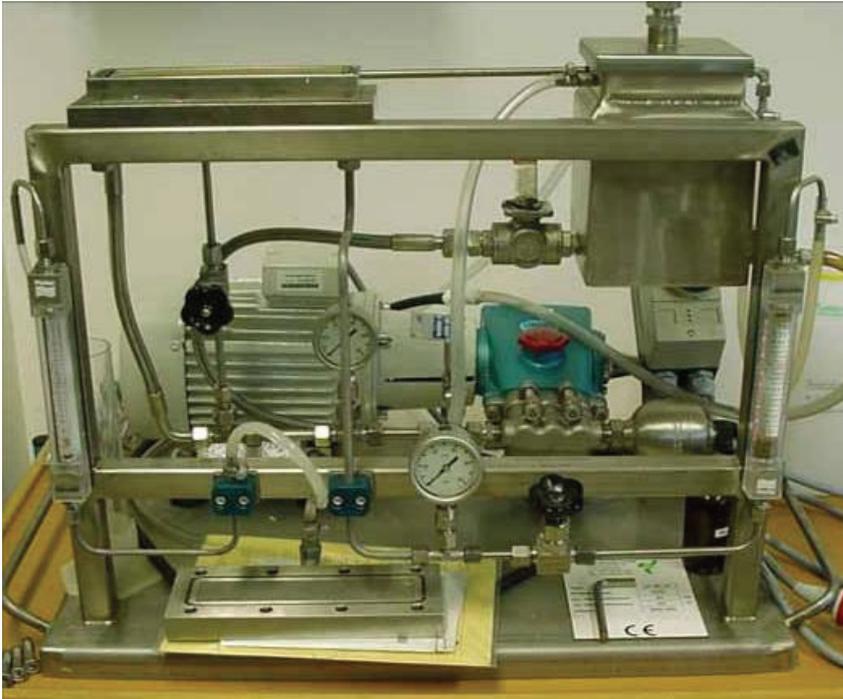
Die Cyanophycin-Isolate aus *E. coli* sowie das Verdauungsenzym Cyanophycinase wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wolfgang Lockau (Humboldt-Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 7-2: Liste der verwendeten Chemikalien mit Angabe des Herstellers, sowie der verwendeten Reinheit [%]

Chemikalie	Beschreibung / Reinheit	Firma
Aceton	ultra Resi-analyzed	J.T. Baker
ACN mit 0,1 % HCOOH	LC-MS Chromasolv [®]	Riedel-de Haën
Ameisensäure	84 – 86,5 %	VEB Laborchemie Apolda
BRADFORD Reagenz	Coomassie Protein Assay Kit	Pierce
Cyanophycin	aus <i>E. coli</i>	AG Lockau
Coomassiefärbung	SimplyBlue [™] SafeStain	Invitrogen
Gele	NuPAGE [®] Novex [®] 10 % Bis-Tris und 4-12 % Bis-Tris; 1,0 mm x 10 well	Invitrogen
Laufpuffer	MES-SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
Methanol	ultra Resi-analyzed	J.T. Baker
Natriumhydrogensulfat	≥ 95 %	Fluka
Natriumhydrogensulfit	39 %ige Lösung in Wasser, p.a.	Merck-Schuchardt
Natriumhydroxid	zur Analyse	Lachema
Polyaspartat	Baypure DS 100 fest G/MU	Bayer AG
Poly-L-Leucin		
Probenpuffer	NuPAGE [®] LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
Proteinstandards	NuPAGE [®] SeeBlue [™] Prestained Standard (1x) und Unstained Standard	Invitrogen
Reinstwasser		

Chemikalie	Beschreibung / Reinheit	Firma
Salzsäure	37 % puriss. p.a.	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure	95-97 % für Analyse	Sigma-Aldrich
SDS	for molecular biology / approx. 99 %	Sigma
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan ultra Resi-analyzed	J.T. Baker
Proteine		
BSA	Albumin from bovine serum / ≥ 96 %	Sigma
Lysozym	from chicken white egg	Sigma
Myoglobin	Myoglobin from horse heart / min. 90 %	Sigma
Pepsin		
Trypsin	Proteomics Grade	Sigma
Wasser mit 0,1 % Ameisensäure	LC-MS Chromasolv [®]	Riedel-de Haën
Zitronensäure	ultra Resi-analyzed	J.T. Baker

7.3 Aufbau der Filtrationsanlage



Filtrationsdruck:

max. 100 bar

Volumen:

2 L (Vorratsbehälter)

Membranfläche (effektiv):

80 cm²

Verhältnis

Volumen/Fläche:

25 cm

Abbildung 7-1: Osmota OS-MC-01 mit *cross flow* Technik für Flachmembranen: Filtration von Kartoffelwaschwasser (Charakterisierung der Membrananlage von J. Kröckel 2005)



Filtrationsdruck:

max. 6 bar

Volumen:

max. 75 mL

Membranfläche (effektiv):

13,9 cm²

Verhältnis

Volumen/Fläche:

5,39 cm

Abbildung 7-2: Rührzelle SC 75 von Schleicher & Schuell für Flachmembranen: Filtration der isolierten Cyanophycinproben (Charakterisierung der Rührzelle SC 75 von J. Kröckel 2005)

7.4 Abbildungen, Tabellen und Kalibrierungen

Zu Kapitel 2.3.5 *Aufreinigung der isolierten* Proben durch Mehrfachfällung

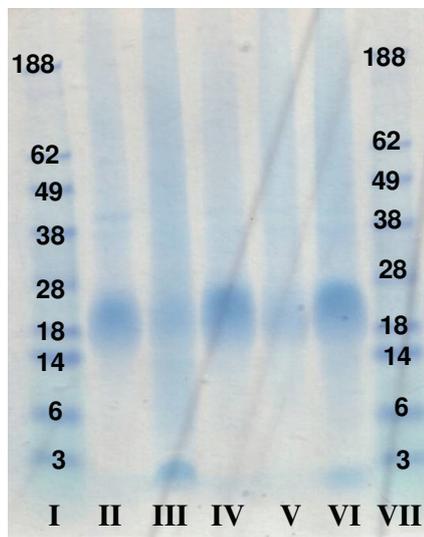


Abbildung 7-3: SDS-Gel mit Proben aus dem Versuch zur Mehrfachfällung. **I** und **VII** Proteinstandard mit Größenmarker in kDa, **II** cyanophycinhaltige Fraktion nach dem **ersten** Auflösen und Wiederausfällen, **III** Rückstand nach dem ersten Auflösen und Wiederausfällen, **IV** cyanophycinhaltige Fraktion nach dem **zweiten** Auflösen und Wiederausfällen, **V** Rückstand nach dem zweiten Auflösen und Wiederausfällen, **VI** cyanophycinhaltige Fraktion nach dem **dritten** Auflösen und Wiederausfällen

Zu Kapitel 2.4.2 *Filtration von Standardproteinen*

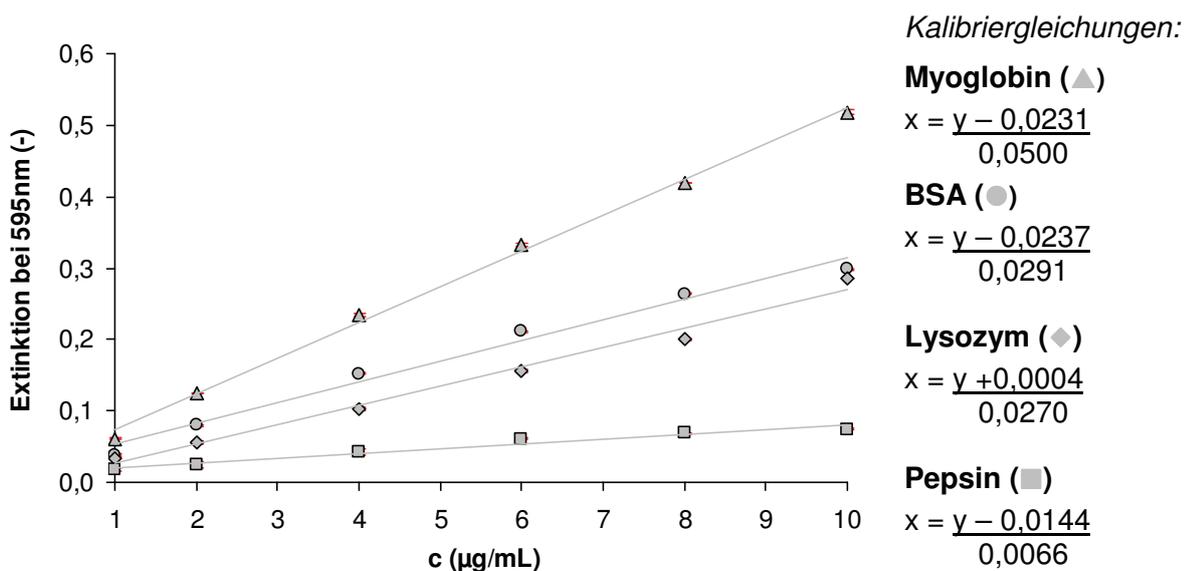


Abbildung 7-4: Kalibrierung von verschiedenen Standardproteinen mit der BRADFORD Methode
 ▲ Myoglobin, ● BSA, ◆ Lysozym, ■ Pepsin – entsprechende Kalibriergleichungen siehe rechte Seite

Tabelle 7-3: Kalibriergleichungen für verschiedene Standardproteine an ihrem Absorptionsmaximum

Protein	Konzentrationsbereich	Absorptionsmaximum	Kalibriergleichung	Bestimmtheitsmaß R^2
Pepsin	10 – 200 $\mu\text{g/mL}$	276 nm	$x = \frac{y - 0,0259}{0,0012}$	0,9972
	100-1000 $\mu\text{g/mL}$	276 nm	$x = \frac{y + 0,0035}{0,0011}$	0,9998
Myoglobin	10-1000 $\mu\text{g/mL}$	280 nm	$x = \frac{y - 0,0353}{0,0016}$	0,9997
BSA	100-1000 $\mu\text{g/mL}$	280 nm	$x = \frac{y + 0,0409}{0,0006}$	0,9970

Zu Kapitel 2.5.1 Stärkestabilität unter Säureeinfluss

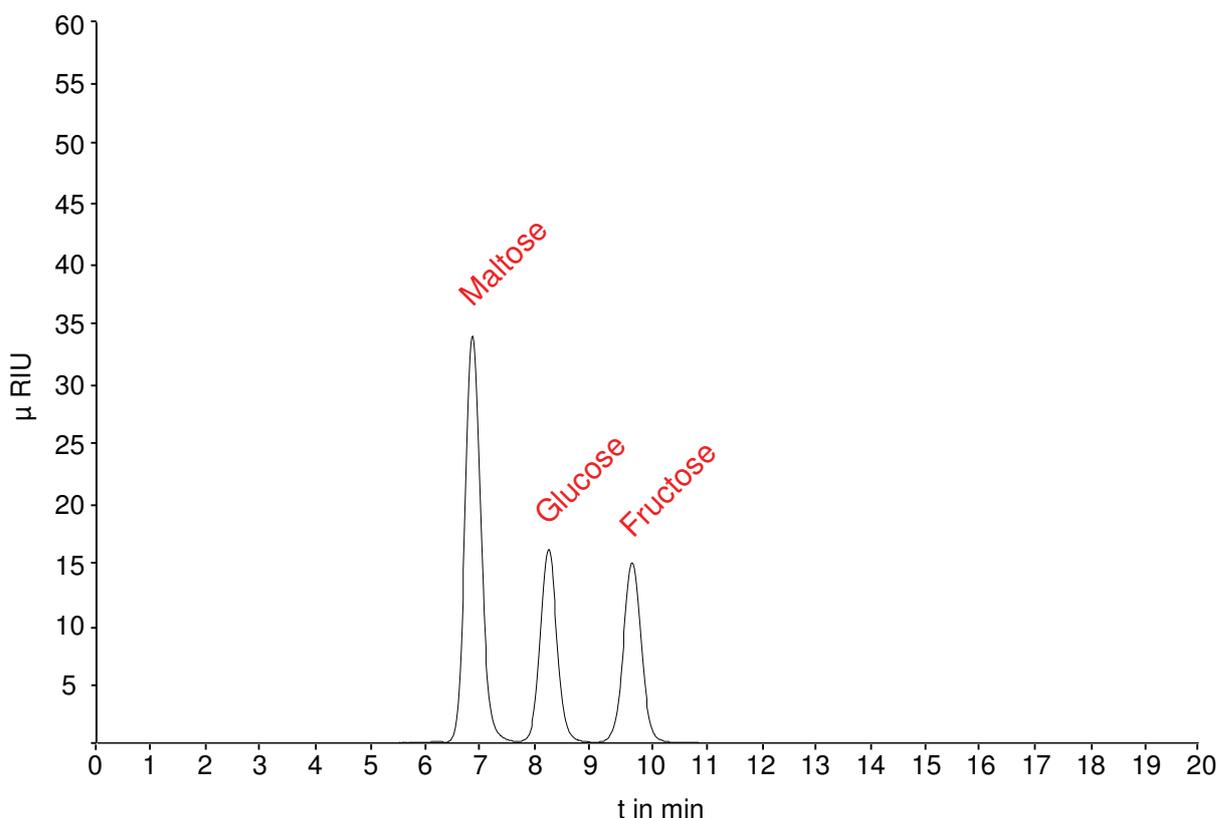


Abbildung 7-5: Kalibrierung verschiedener Zucker mit HPLC-Messmethode (Fluß = 0,8 mL/min, Eluent = Reinstwasser, Detektor = RI); Retentionszeiten: Maltose = 6,6 min, Glucose = 8,3 min und Fructose = 9,7 min

Tabelle 7-4: Kalibriergleichungen verschiedener Zucker ermittelt mit HPLC-Messmethode (Fluß = 0,8 mL/min, Eluent = Reinstwasser, Detektor = RI)

Zucker	Retentionszeit	Konzentrationsbereich	Kalibriergleichung	Bestimmtheitsmaß R ²
Maltose	6,8 min	1 – 20 mM	$x = \frac{y - 25,81}{3394,69}$	1,0000
Glucose	8,2 min	1 – 20 mM	$x = \frac{y + 7,58}{1637,08}$	1,0000
Fructose	9,7 min	0,25 – 2,5 mM	$x = \frac{y + 21,63}{1406,10}$	0,9999
		1 – 20 mM	$x = \frac{y + 11,93}{1505,50}$	1,0000