

---

## Thesen zur Dissertation

### **Strukturanalyse modifizierter Bakteriencellulosen verschiedener Subspezies des *A. xylinum* mittels Festkörper-Kernresonanz-Spektroskopie**

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Physikerin Stephanie Hesse

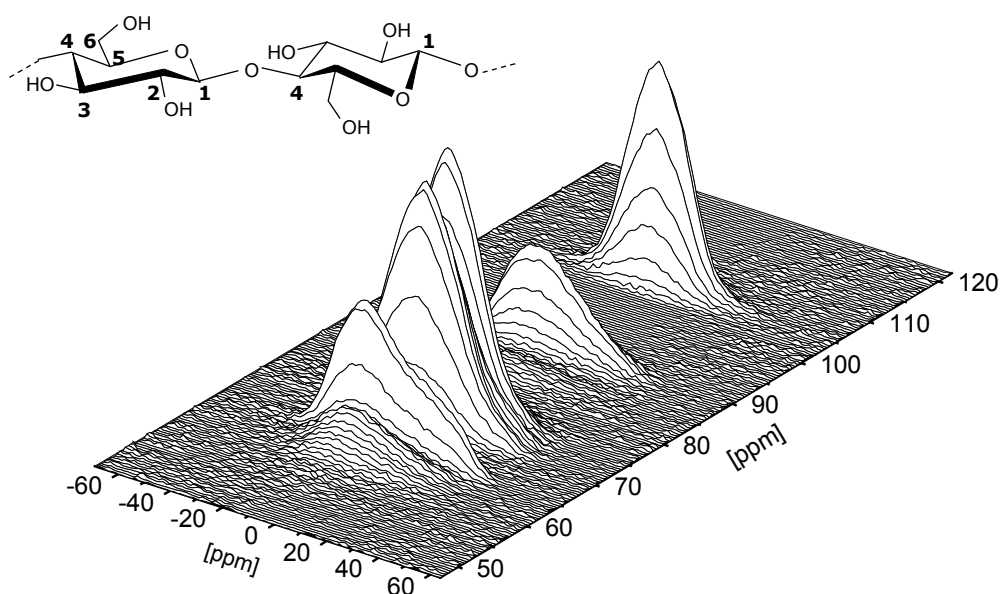
Als extrazellulär gebildetes Stoffwechselprodukt prokaryotischer Einzeller findet die Bakteriencellulose (BC) enormes wissenschaftliches und sogar kommerzielles Interesse, beispielsweise in Form „diätischer Fasern“ der Nahrungsmittelindustrie oder als Verbandsmaterial zur medizinischen Wundversorgung. Zudem hat unlängst die Entwicklung künstlicher Materialien basierend auf BC zur Implantation in lebendes Gewebe die Aufmerksamkeit der Biomaterialwissenschaftler auf sich gezogen. Derartig besondere Einsatzmöglichkeiten werden zweifelsohne durch die spezifischen Merkmale von BC begünstigt.

Die vorliegende Arbeit dient dem grundlegenden Verständnis struktureller Eigenschaften von Bakteriencellulose bei der Herstellung mit alternativen Kohlenstoffquellen. Zudem wird auf Möglichkeiten eingegangen, über speziell auf die Problematik zugeschnittene Proben und effiziente NMR-Methoden, Fragen zur supramolekularen Struktur von Cellulose zu klären. Anhand isotonenmarkierten Materials wurden essentielle Strukturdaten ermittelt und zudem ein Beitrag zur detaillierteren Analyse von Stoffwechselvorgängen des *A. xylinum* geleistet.

1. Bei den untersuchten BC der Subspezies AX 5, GAX und NQ 5 handelt es sich um typische Cellulose der Kristallmodifikation I mit einem hohen  $I_{\alpha}$ -Anteil. Die Subspezies AY 201 bildet keine einheitlichen und verifizierbaren Vliese und ist überraschenderweise fähig, typische Cellulose I wie auch ein Gemisch aus den Modifikationen I und II zu synthetisieren.
2. Initialfeuchte BC zeichnet sich durch intakte Wasserstoffbrücken und einen besonders hohen Ordnungszustand von ca. 80% Kristallinität aus. Während der Trocknung nimmt der kristalline Anteil auf bis zu 68% ab. Demgegenüber bleibt das Verhältnis der Cellulosemodifikationen mit  $I_{\alpha} : I_{\beta} \approx 2.8 : 1$  nahezu konstant.  $T_1$ -Relaxationszeiten belegen eine eingeschränkte Beweglichkeit der Protonen initialfeuchter BC, die auf einer höheren Kettensteifigkeit durch starke Wasserstoffbrückenbindungen beruht.

3. Die Ausdünnung des Protonensystems (Deuterierung) von BC eröffnet Möglichkeiten, die Wasserstoffbrücken der Cellulose NMR-spektroskopisch zu charakterisieren. Der Einsatz von vollständig deuterierter D-Glucose bewirkt vornehmlich einen Einbau der deuterierten Kohlenstoffe an den Positionen C1 und C6 der Cellulose. Bei der mikrobiellen Synthese wird D-Glucose bis zur Uridin-5'-diphosphorsäure gespalten.
4. Die Variation der Nährmedien-Bestandteile beeinflusst die Struktur von BC sehr stark. Bei der alternativ durch Saccharose statt D-Glucose synthetisierten und getrockneten BC deutet das CP/MAS  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum auf einen strukturellen Zustand ähnlich dem einer initialfeuchten BC hin. Des Weiteren bewirkt der Zusatz von Carboxymethylcellulose (CMC), Methylcellulose (MC) und Polyvinylalkohol (PVAL) zu jeweils 0.5%, 1.0% und 2.0% (m/V) zum üblichen Schramm-Hestrin Nährmedium die Abnahme der I $\alpha$  Modifikation (bzw. I $\alpha$  & I $\beta$ ) der BC-CMC (bzw. BC-MC) Reihe, jedoch keine signifikanten Änderungen bei BC-PVAL.
5. Selektiv und uniform  $^{13}\text{C}$ -markierte BC erschließen weitere Details zum Biosyntheseprozess. Bei der Umsetzung von D-Glucose( $1\text{-}^{13}\text{C}$ , 99%) verbleibt die Anreicherung zu  $\sim 90\%$  ausschließlich in der C1-Position, während durch Verwendung von D-Glucose( $2\text{-}^{13}\text{C}$ , 99%), D-Glucose( $3\text{-}^{13}\text{C}$ , 99%) und D-Glucose( $6\text{-}^{13}\text{C}$ , 99%) kompliziertere Markierungsmuster erzielt werden. Neben der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung der bereits pro D-Glucose markierten C-Position erfährt C1 der BC eine zusätzliche 21-47%-ige Isotopenanreicherung. Bei Verstoffwechslung selektiv  $^{13}\text{C}$ -markierter D-Glucose sinkt der I $\alpha$ -Anteil von BC geringfügig (I $\alpha$  : I $\beta$   $\approx$  2.4 : 1).
6. Die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung durch Nutzung uniform markierter D-Glucose-U- $^{13}\text{C}_6$  als C-Quelle hat verschieden starken Einfluss auf die Subspezies des *A. xylinum*; bei Einsatz von D-Glucose-U- $^{13}\text{C}_6$  erhöht sich die Zellteilungsrate von NQ 5 um  $\sim 13\%$  und von AY 201 um  $\sim 26\%$ ; die Bewegung einer einzelnen Zelle auf einem nematisch geordneten Substrat wird durch D-Glucose-U- $^{13}\text{C}_6$  reduziert. Die Produktionsrate von NQ 5 sinkt von  $4.2 \pm 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$  auf  $2.1 \pm 0.5 \mu\text{m}/\text{min}$ , die von AY 201 von  $3.2 \pm 0.5 \mu\text{m}/\text{min}$  auf  $2.2 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{min}$ .
7. Die Umsetzung von D-Glucose-U- $^{13}\text{C}_6$  hat sowohl Einfluss auf das einzelne Bakterium als auch auf die Struktur des Celluloseproduktes. Die NIR FT Ramanspektren normaler und  $^{13}\text{C}$ -markierter BC sind unterschiedlich.
8. Rastersondenmikroskopie zeigt, dass D-Glucose-U- $^{13}\text{C}_6$  keinen Einfluss auf die Breite ( $\approx 60 \text{ nm}$ ) synthetisierter Cellulosefasern des AY 201 hat. Dagegen nimmt die durchschnittliche Breite einer Cellulosefaser von BC NQ 5 von  $81.1 \text{ nm}$  auf  $67.4 \text{ nm}$  ab, sobald D-Glucose-U- $^{13}\text{C}_6$  verstoffwechselt wird.
9. Mittels CP/MAS  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR und Röntgendiffraktometrie wurde keine signifikante Beeinflussung der Struktur durch D-Glucose-U- $^{13}\text{C}_6$  nachgewiesen.

10. Isotopenmarkierte Materialien finden zunehmend Anwendung bei mehrdimensionalen NMR-Verfahren. Eine Methode zur Separation von Seitenbanden und eine Technik zur Rekopplung anisotroper Informationen dienen zur erstmaligen Bestimmung der Anisotropien  $^{13}\text{C}$ -chemischer Verschiebungen einer normalen BC AX 5 im Vergleich mit Cellulose II und mit den uniform  $^{13}\text{C}$ -markierten BC NQ 5 und AY 201. Nach C6 mit etwa 50 ppm besitzt C4 mit ca. 44 ppm stets den größten Span  $\Omega$  aller Kohlenstoffe des Anhydroglucosering, C1 besitzt den kleinsten ( $\sim 28$  ppm). Durch die Nutzung der  $^{13}\text{C}$ -markierten und hinsichtlich des Vliesbildungsprozesses hinreichend charakterisierten BCs wurde eine drastische Messzeitverkürzung bei gleichwertigen Resultaten erzielt.



**Abbildung 1.** 2D-RAI Spektrum von uniform  $^{13}\text{C}$ -markierter BC AY 201.

11. Die uniform  $^{13}\text{C}$ -markierten Proben erlauben eine exakte Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen zu den Kohlenstoffen im Anhydroglucosering der dominierenden  $\text{I}\alpha$  Modifikation. Es treten nur geringfügige Unterschiede zwischen den Cellulose I-typischen chemischen Verschiebungen der beiden Subspezies auf. Die optimierten Daten wurden zur erfolgreichen Verbesserung der Anisotropieparameter Span  $\Omega$  und Skew  $\kappa$  eingesetzt und dienen zur Verfeinerung von Cellulose  $\text{I}\alpha$  Strukturmodellierungen. Nach der Strukturverfeinerung stimmen die theoretischen Tensoren (z.B.  $\text{C4}_1$ :  $\delta_{11} = 107$  ppm;  $\delta_{22} = 102$  ppm;  $\delta_{33} = 60$  ppm) mit den experimentellen Werten ( $\delta_{11} = 109$  ppm;  $\delta_{22} = 93$  ppm;  $\delta_{33} = 65$  ppm) überein.