

**Biotechnologische Herstellung von niedermolekularem
Chitosan aus *Mucor* Spezies als pharmazeutischer
Hilfsstoff**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Andreas Niederhofer

Kiel 2003

Referent:	Prof. Dr. Dr. h.c. B.W. Müller
Korreferent:	Prof. Dr. D. Heber
Mündliche Prüfungen:	4., 9., 15. Juli 2003
Zum Druck genehmigt:	16. Juli 2003

Der Dekan

Meinen Eltern und Malcolm H. Ross gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel der Technologie-Stiftung Schleswig-Holstein und der Pharmatech GmbH ermöglicht. Der Technologie-Stiftung Schleswig-Holstein ist insbesondere zu danken, dass ein Laserstreulichtdetektor zur Bestimmung von Molekulargewichten angeschafft werden konnte.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

1.1	Definition	1
1.2	Vorkommen von Chitosan	2
1.3	Biosynthese von Chitin und Chitosan	3
1.4	Chemische Zusammensetzung der Zellwand von <i>Mucor rouxii</i>	4
1.5	Biologische Funktionen von Chitin und Chitosan	6
1.6	Präparation von Chitosan aus Crustaceaen und Pilzen	6
1.7	Charakterisierung von Chitosan	9
1.8	Mikrokristallines Chitosan	13
1.9	Niedermolekulares Chitosan	14
1.10	Verwendung von Chitosan	16
1.11	Ziel dieser Arbeit	20

2 PHYSIKO-CHEMISCHE VORUNTERSUCHUNGEN AN KOMMERZIELLEM CHITOSAN 21

2.1	Molekulargewicht	22
2.2	Identitätsprüfung und Bestimmung des Desacetylierungsgrades	24
2.3	Kristallinität	28
2.4	Bestimmung der Partikelgröße und strukturelle Untersuchung	29
2.5	Wassergehaltsbestimmung	34
2.6	Bestimmung des Reinheitsgrades von Chitosan	35
2.6.1	Bestimmung anorganischer Bestandteile	35

2.6.2	Bestimmung des Restproteingehaltes	37
2.7	Diskussion	41
3	UNTERSUCHUNG VON MUCORALES-ARTEN ZUR PRODUKTION VON CHITOSAN	45
3.1	Eingesetzte Mikroorganismen	45
3.2	Kultivierungsmedium	45
3.3	Wachstumsversuche	46
3.4	Aufbereitung des Zellmaterials	50
3.5	Präparation von Chitosan	50
3.6	Diskussion	56
4	UNTERSUCHUNGEN ZUR DIREKTEN PRÄPARATION VON NIEDERMOLEKULAREM CHITOSAN	61
4.1	Löslichkeit von Chitosan in wässrigem Medium	61
4.1.1	Löslichkeit bei alkalischem pH-Wert	62
4.1.2	Beeinflussung des Molekulargewichtes von Chitosan durch Agglomeration über Wasserstoffbrückenbildung	68
4.2	Präparation von Chitosan aus getrockneter Biomasse von Pilzen	71
4.2.1	Verwendung von Ethanol als Waschmedium	72
4.2.1.1	Vergleich der Nutzung von Wasser und Ethanol als Waschmedien	72
4.2.1.2	Bestimmung des Ethanolanteils	76
4.2.2	Einsatz von flüchtigen bzw. in Ethanol löslichen Deproteinierungsbasen	83

4.2.3	Einfluß verschiedener Säurekonzentrationen auf die Extraktion von Chitosan	86
4.2.4	Dialyse von nach Schema 4-1/Ethanol produziertem Chitosan	88
4.2.5	Herstellung von Chitosan aus Krabbenschalen nach Schema 4-1/Ethanol	92
4.3	Diskussion	95
5	CHARAKTERISIERUNG VON NIEDERMOLEKULAREM CHITOSAN	103
5.1	Molekulargewicht	103
5.2	Identitätsprüfung und Bestimmung des Desacetylierungsgrades	104
5.3	Kristallinität	105
5.4	Bestimmung der Partikelgröße und strukturelle Untersuchung	106
5.5	Wassergehaltsbestimmung	107
5.6	Bestimmung des Reinheitsgrades von LMCh	108
5.6.1	Bestimmung anorganischer Bestandteile (Ph. Eur. 4.02 - 2.4.14)	108
5.6.2	Bestimmung des Restproteingehaltes	109
5.7	Gehaltsbestimmung an bakteriellen Endotoxinen sowie (1-3)- β -D-Glucanen aus Pilzen	109
5.8	Agglomeration und Kristallisation von LMCh - Einlagerung von Wasser	111
5.9	Diskussion	112

6	BEEINFLUSSUNG DES MOLEKULARGEWICHTES VON CHITOSAN DURCH KULTIVIERUNGSPARAMETER	116
6.1	Kultivierung verschiedener Altersstufen	117
6.2	Kultivierung unter osmotischem Streß	119
6.3	Diskussion	123
7	ZUSAMMENFASSUNG	126
	SUMMARY	128
8	ANHANG	130
8.1	Substanzen	130
8.1.1	Kommerzielle Chitosane	130
8.1.2	Chemikalien	130
8.2	Geräte	131
8.3	Protokoll HPLC-Fluoreszenzdetektion	132
8.4	Protokoll GPC-Massenbestimmung	133
8.5	Kultivierungsmedien	134
8.6	Abkürzungen	135
9	LITERATURVERZEICHNIS	136
	DANKSAGUNG	146

1 EINLEITUNG UND ZIEL

1.1 Definition

Als Chitosan werden lineare Polyaminosaccharide bezeichnet, welche sich heterogen aus den Zucker-Untereinheiten 2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glukopyranose und 2-Amino-2-desoxy- β -D-glukopyranose in β -1,4-glykosidischer Bindung zusammensetzen. Es überwiegt der Glukosaminanteil im Gesamtmolekül, welcher die Löslichkeit von Chitosan in wäßrigen Lösungen bedingt und der zur Charakterisierung des Chitosans als Desacetylierungsgrad angegeben wird.

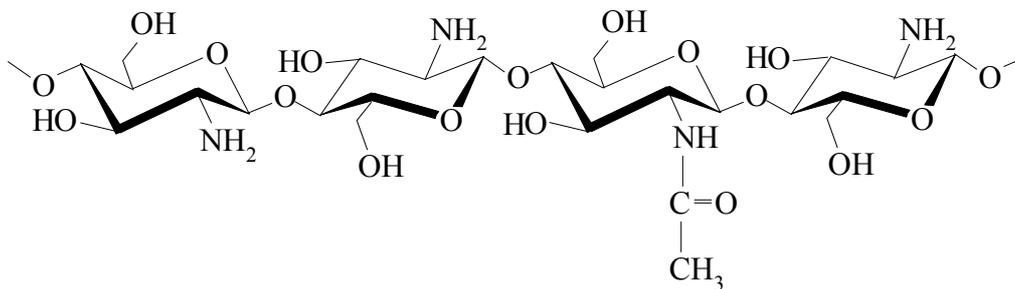


Abb. 1-1 Chitosan

Als Chitinderivat kann Chitosan durch Desacetylierung von Chitin gewonnen werden. Chitin ist nach Zellulose das zweithäufigste natürlich vorkommende Polymer, welches durch Biosynthese gebildet wird. Von Zellulose unterscheidet sich Chitin lediglich durch die Acetamidgruppe am C(2) jeder Glukoseuntereinheit.

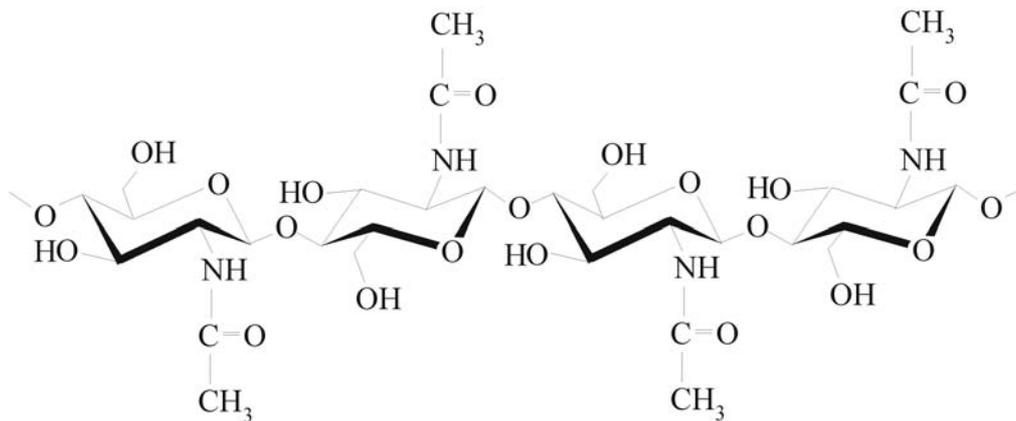


Abb. 1-2 Chitin

1.2 Vorkommen von Chitosan

Chitin ist als Strukturbildner im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet. Merkmalsbestimmend tritt es im Tierreich im Stamm der Arthropoda in Form einer Protein-Chitin-Cuticula als Exoskelett auf, welches regelmäßig gehäutet wird. Vertreter dieses Stammes sind u.a. die Antennata, deren größte Klasse die Insekten bilden und die Mandibulata, von denen die Klasse der Crustacea die Grundlage für die industrielle Produktion von Chitosan stellt. Die Cuticula ist in ursprünglichen Gruppen als dünne, weiche und geschlossene Decke bzw. bei den Euarthropoda seit dem Kambrium als Plattenskelett mit harten, dicken Skleriten und biegsamen Zwischenabschnitten ausgebildet (Westheide und Rieger 1996). Neben den Arthropoden wird Chitin in geringem Maße noch in einzelnen Klassen der Protozoa, Cnidaria, Mollusca, Annelida und Tentaculata gebildet. Auch in Vertebraten konnte Chitin nachgewiesen werden (Wagner, Lo et al. 1993). Chitosan ist dagegen im Tierreich nicht vorgefunden worden.

Im Pflanzenreich ist Chitin sowohl bei Algen als auch bei niederen und höheren Pilzen (Basidiomycetes, Ascomycetes, Zygomycetes) vertreten. Speziell für die Gewinnung von Chitosan ist aus der Abteilung der Eumycota („echte Pilze“) die Klasse der Zygomyceta mit den Mucorales hervorzuheben. Die Arten dieser

Ordnung enthalten neben Chitin bereits auch *in vivo* produziertes Chitosan als Komponente der Zellwand und sind Gegenstand weitgehender Forschung zur Chitosangewinnung aus Pilzen (White, Farina et al. 1979; McGahren, Perkinson et al. 1984; Kobayashi, Takiguchi et al. 1988; Miyoshi, Shimura et al. 1992; Rane und Hoover 1993b; Hu, Yeung et al. 1999; Kuhlmann, Czupala et al. 2000; Pochanavanich und Suntornsuk 2002).

Art	Klassifikation	Zitierung
Mucor spec.	Zygomycetes	(White, Farina et al. 1979)
Absidia spec	Zygomycetes	(Davoust und Hansson 1992)
Rhizopus spec.	Zygomycetes	(El-Ghaouth, Arul et al. 1992)
Circinella spec.	Zygomycetes	(Shimahara et al. 1989)
Lentinus edodes	Basidiomycetes	(Crestini, Kovac et al. 1996)
Gongronella butleri	Zygomycetes	(Rane und Hoover 1993)
Phycomyces blakesleeanus	Zygomycetes	(Rane und Hoover 1993)

Tab. 1-1 auf Chitosan untersuchte Pilzarten

1.3 Biosynthese von Chitin und Chitosan

Im Gegensatz zu der Chitinbildung in Arthropoden sind die Vorgänge der Biosynthese von Chitin und Chitosan bei Pilzen weitgehend untersucht. Es wurde lange Zeit vermutet, dass Chitin und Chitosan von zwei getrennten Enzymsystemen individuell produziert werden. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass Chitosan direkt aus Chitin durch ein binäres Enzymsystem gebildet wird. Chitinsynthetasen bilden Chitin aus den Monomeren, während darauf folgend Chitindesacetylasen Acetylgruppen aus dem Polymer entfernen.

Die Chitinsynthetasen (CHS) [EC 2.4.1.16] sind membranverankerte UDP-Glycosyltransferasen, welche N-Acetylglucosamin-Monomere (GlcNac) in ihrer aktivierten Form als Uridindiphosphat-GlcNac (UDP-GlcNac) auf das zu bildende Chitinpolymer übertragen. Die Polymerisierung erfolgt am nichtreduzierenden Ende des Molekülstranges unter Abspaltung von UDP, welches als kompetitiver Inhibitor auf die Synthetase wirkt. UDP-GlcNac wird im Cytosol gebildet und zur Zellmembran transportiert, wo Chitin *in situ* d.h. außerhalb des Zytoplasmas polymerisiert wird (Bartnicki-Garcia 1989). UDP-GlcN als Vorstufe für eine direkte Chitosanbildung konnte dagegen in Zellen nicht nachgewiesen werden (Davis und Bartnicki-Garcia 1984). CHS werden im Cytosol gebildet und von dort als mikrovesikuläre Strukturen, sogenannte Chitosome, zur Membran transportiert. Chitosomale CHS liegt in einer zymogenen Form vor, d.h. sie werden durch ein proteolytisches Enzym in ihre aktive Form überführt und bilden erst dann molekulares Chitin (Ruiz-Herrera, Lopez-Romero et al. 1977; Ruiz-Herrera, Bartnicki-Garcia et al. 1980). Dieses Chitin wird in den periplasmatischen Raum abgegeben, wo es sich ähnlich wie die Zellulose zu Mikrofibrillen zusammenlagert.

Chitindesacetylasen (CDA) [EC 3.5.1.41] konnten nur bei Pilzen und Bakterien nachgewiesen werden. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse der N-Acetamidogruppe von einzelsträngigem amorphen Chitin. Sobald Chitinmoleküle Mikrofibrillen gebildet haben, kann keine Desacetylierung mehr erfolgen. Demnach muß CDA im periplasmatischen Raum lokalisiert sein, um an aus der Membran austretenden Chitinpolymeren wirksam zu werden (Araki und Ito 1975; Bartnicki-Garcia, Bracker et al. 1984).

1.4 Chemische Zusammensetzung der Zellwand von *Mucor rouxii*

Als Beispielorganismus der Mucorales sind an *M. rouxii* vielfältige Untersuchungen durchgeführt worden, unter anderem hinsichtlich einer Nutzung als Lieferant von γ -Linolensäure wie auch von Chitosan.

Die chemische Zusammensetzung der Zellwand von *M. rouxii* wurde von Bartnicki-Garcia und Nickerson 1962 ausführlich analysiert. Für die filamentöse Form dieses Pilzes ergab sich folgendes Resultat:

Komponente	Anteil [%]
Lipide	7,8
Chitosan	32,7
Chitin	9,4
2-Amino-Zucker (nicht identifiziert)	2,4
Fucose	3,8
Mannose	1,6
Galaktose	1,6
andere Kohlenhydrate	1,7
Proteine	6,3
Purine und Pyrimidine	0,6
Phosphat	23,3
Mg	1,0
Ca	1,0
Gesamt	93,2

Tab. 1-2 Chemische Zusammensetzung der Zellwand

Chitosan ist somit Hauptbestandteil der Zellwand. Der hohe Anteil von Phosphat ist nicht ausschließlich anorganischer Natur, sondern auch Teil organischer Verbindungen wie Lipiden und Nukleinsäuren (Bartnicki-Garcia und Nickerson 1962).

1.5 Biologische Funktionen von Chitin und Chitosan

Chitin und Chitosan bilden einen wesentlichen Bestandteil der Zellwandmatrix. Sie dienen als Strukturbildner zur Formgebung und -haltung, wie auch als Grundlage für die Einbettung von funktionellen Elementen in die Zellwand.

Zur Bildung einer stabilisierenden Netzwerkstruktur in der Zellwand erfolgt eine Verbindung von Chitin/Chitosan mit β -(1,3)-Glucan, so dass nicht nur einvektoriell in Längsrichtung eine β -(1,4)-glykosidische Bindung und eine intra-/intermolekulare Fibrillisierung über Wasserstoffbrückenbildung gegeben ist (Kollar, Petrakovas et al. 1995).

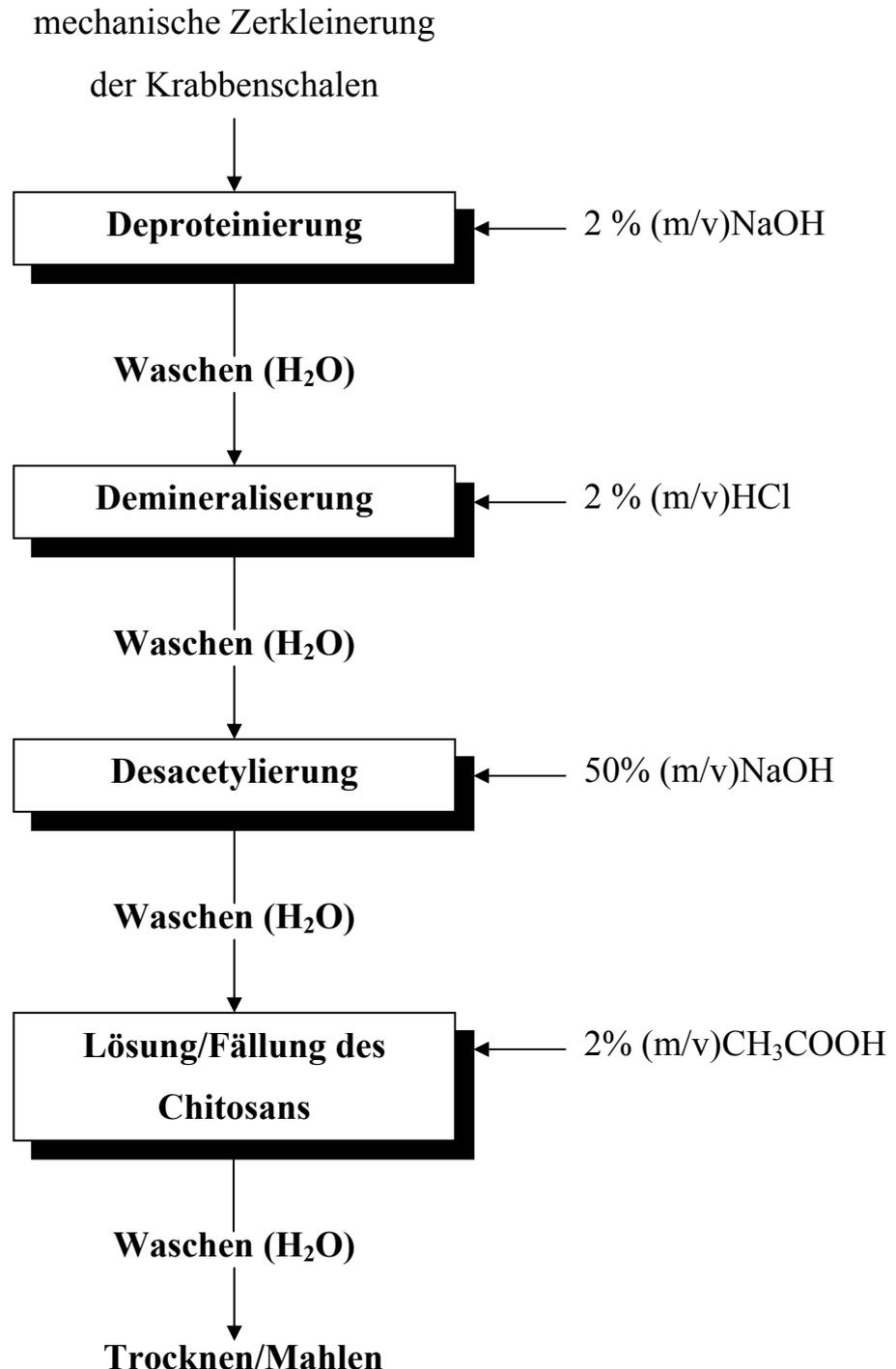
Aminosäureanalysen von Chitosan aus *Aspergillus niger* ergaben einen hohen Anteil von kovalent gebundenem Arginin, Serin und Prolin (Lestan, Pecavar et al. 1993). Es ist charakteristisch für diese Aminosäuren, dass sie aufgrund ihrer Seitengruppenausstattung ausgesprochen hydrophil sind. Welche Aufgabe sie in der Zellwand erfüllen, ist nicht spezifiziert worden und im Gesamtkontext der zugehörigen Proteine zu sehen. Eine Möglichkeit bestände auf der Basis ihrer Polarität, zum Beispiel in der Bindungsvermittlung des jeweiligen Proteins mit der Chitin-/Chitosanmatrix.

Viele der Chitosan produzierenden Pilze parasitieren auf anderen Pflanzen. Als Abwehrreaktion auf diese Besiedlung bilden die potentiellen Wirte unter anderem auch Chitinasen. Es konnte festgestellt werden, dass die Pilze zum Zeitpunkt der Besiedlung Chitin in Chitosan umwandeln, um einer Erkennung durch die Wirtspflanze zu entgehen (Deising, Rauscher et al. 1995; Deising und Siegrist 1995; El-Gueddari und Moerschbacher 2000).

1.6 Präparation von Chitosan aus Crustaceaen und Pilzen

Chitosan wurde erstmals 1859 von Rouget nach intensiver alkalischer Behandlung von Chitin hergestellt. Heute besteht die industrielle Produktion von Chitosan im wesentlichen aus vier Schritten, wenn es direkt aus chitinhaltigem

Rohstoff, wie z.B. Krabbenschalen, gewonnen wird (Benjakul und Sophanodora 1993):

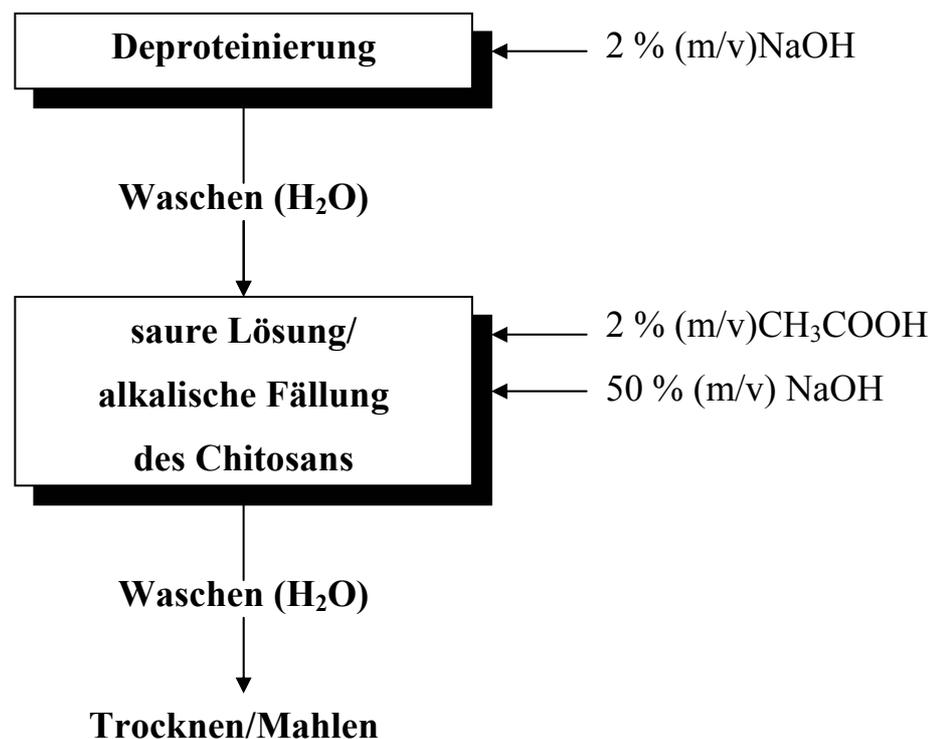


Schema 1-1 Herstellung von Chitosan aus Krabbenschalen

Einleitung und Ziel

Die Herstellung von Chitosan aus Arthropodenschalen erfordert zusätzlich eine thermische Unterstützung der Reaktionsabläufe von bis zu 100°C, insbesondere im Deproteinierungs- und im Desacetylierungsschritt.

Da Pilze keine mineralischen Bestandteile in der Zellwand aufweisen, kann auf einen Demineralisierungsschritt in der Präparation verzichtet werden. Darüberhinaus liegt Chitosan schon *in vivo* im Zellwandmaterial der Mucoraceae vor, so dass auch eine Desacetylierung von Chitin als Vorstufe nicht durchgeführt werden muß. Jedoch ist eine Deproteinierung und ein Lösungsschritt erforderlich, um das Chitosan aus dem Biomaterial zu extrahieren.



Schema 1-2 Herstellung von Chitosan aus Pilzkulturen

Vorgeschlagene Anweisungen zur Gewinnung von Chitosan aus Pilzen beinhalten zur Deproteinierung eine Autoklavierung bei 121 °C für 15 min in alkalischem Medium (z.B. 1M NaOH). Nachfolgend wird die Extraktion von Chitosan mittels Essigsäure oder auch verdünnter Salzsäure bei 95 °C

durchgeführt (Rane und Hoover 1993b; Crestini, Kovac et al. 1996; Hu, Yeung et al. 1999).

Diese Schritte erfolgen unter relativ harten Bedingungen, ähnlich wie die der Extraktion aus Krabbenschalen. Man könnte daher annehmen, dass die Präparation einen erheblichen Einfluß auf das Molekulargewicht und den Desacetylierungsgrad des gewonnenen Chitosans hat. In Anbetracht der Möglichkeit, diese Prozesse schonend bei Raumtemperatur durchführen zu können (Alimuniar und Zainuddin 1992), wäre es interessant festzustellen, welches Molekulargewicht und welchen Desacetylierungsgrad natives Chitosan in vivo besitzt.

1.7 Charakterisierung von Chitosan

Als wichtigste qualitätsbestimmende Merkmale für Chitosan sind unter anderem das Molekulargewicht, der Desacetylierungsgrad, der Reinheitsgrad bezüglich organischer und anorganischer Bestandteile, die Kristallinität und die Biokompatibilität zu nennen.

Die Analytik hierzu wird von den Herstellern marktgängigen Chitosans mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt, dies kann aber je nach Methode zu signifikant voneinander abweichenden Ergebnissen führen (Tanver, Kok et al. 2002). Für Vergleichszwecke sollte daher eine einheitliche Qualitätsanalytik für Chitosan entwickelt und eingesetzt werden.

Das Molekulargewicht von Chitosan kann mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. So werden dafür Viskosimetrie, Laserlichtstreuung und chromatographische Methoden verwendet (Maghami und Roberts 1988; Terbejovich, Alessandro et al. 1993). Zur Viskositätsbestimmung ist anzumerken, dass die Viskosität einer Chitosanlösung nicht nur durch das Molekulargewicht allein bestimmt wird, sondern auch durch den Desacetylierungsgrad, sowie darüber hinaus durch die Konzentration der Lösung, den pH-Wert und die Temperatur. Als neuere Methode wird das Prinzip

der Laserlichtstreuung verwendet, um absolute Molekülmassen zu bestimmen (Beri, Walker et al. 1993; Terbejovich, Alessandro et al. 1993). Gemeinsam ist diesen Methoden, dass die ermittelten Werte für das jeweils vorliegende Chitosan weit im hochmolekularem Bereich lagen. Man geht somit davon aus, dass natives Chitosan, sei es direkt aus Pilzen präpariert bzw. durch den Produktionsprozeß aus Krabbenschalen bereits etwas depolymerisiert, nur in einer hochpolymerisierten Form vorliegt. Dabei scheint das Ausgangsmaterial (Pilze oder Krabben) keinen relevanten Unterschied in der Höhe des Molekulargewichtes zu bedingen.

Der Desacetylierungsgrad (DD) wird durch den prozentualen Anteil der Glucosamin-Untereinheiten an der Gesamtheit der GlcNac- und GlcN-Monomere angegeben. Diese freien NH_2 -Gruppen bedingen durch ihre Fähigkeit zur Protonenbindung unter anderem die Löslichkeit in wässrigen Medien, die Möglichkeit zur Depolymerisation mit Enzymen und die biologische Aktivität von Chitosan. Die Bestimmung des DD kann durch eine Vielzahl von Methoden durchgeführt werden. Dies können beispielsweise Titration (potentiometrisch, Säure/Base) (Khan, Peh et al. 2002), IR-Spektroskopie (Domszy und Roberts 1985; Baxter, Dillon et al. 1992), UV-Spektroskopie (Khan, Peh et al. 2002), Gaschromatographie (Muzzarelli, Tanfani et al. 1980) und ^1H -NMR (Signini und Campana Filho 1999) sein.

Chitosan als Naturprodukt enthält Verunreinigungen von organischen und anorganischen Bestandteilen, welche entweder vom Ausgangsmaterial stammen oder durch den Herstellungsprozeß zugeführt wurden. Ziel der Herstellung ist es natürlich, diese Bestandteile im Laufe der Präparation weitestgehend zu entfernen. Anorganische Verunreinigungen werden durch die Bestimmung des Sulfatasorgehaltes ermittelt (Ph. Eur. 4.02 - 2.4.14), nachdem alle organischen Bestandteile einer Probe in einem Hochtemperaturofen quantitativ zu CO_2 und H_2O aufoxidiert worden sind.

Die Bestimmung des Restproteingehaltes könnte über die klassischen photometrischen Methoden (Biuret, Lowry, BCA und Bradford) durchgeführt werden. Jedoch basieren diese Tests auf einer Reaktion mit der Aminogruppe (Biuret, Lowry, BCA), welche allerdings auch im Chitosan selbst vorhanden ist. Im Test nach Bradford wird die anionische Form von Coomassie Blau durch Bindung an Proteine stabilisiert. Jedoch gibt es keine Aussage, in welchem Ausmaß hier eine Interaktion mit einem Polykation wie Chitosan erfolgt. Somit könnten insgesamt zu hohe Proteinkonzentrationen in der zu vermessenden Probe bestimmt werden. Darüberhinaus erfordern die Tests von Biuret, Lowry und BCA einen alkalischen Reaktionsbereich, wobei Chitosan bei diesen pH-Werten im allgemeinen aus der Lösung ausfällt. Nur der Bradford-Test erfordert einen sauren pH-Bereich. Die höchste Sensitivität ist mit 0,05-0,5 µg Protein/ml bei der Bradford-Methode gegeben, während die Biuret-Methode 1-10 µg Protein/ml Probelösung voraussetzt. Sollten aber im Labormaßstab nur kleinste Mengen von Chitosan präpariert worden sein, so dürfte eine Analytik nur schwer durchzuführen sein. Da ausschließlich der Restproteingehalt bestimmt werden soll, stößt diese Analytik hier an ihre Grenzen. Die Methode der quantitativen Aminosäureanalytik ermöglicht dagegen den Nachweis geringster Mengen (nmol) von Aminosäuren mittels Fluoreszenzdetektion. Proteine werden über Gasphasenhydrolyse in die Aminosäuren gespalten, diese mit einem Fluoreszenzreagenz derivatisiert und nach Auftrennung in der HPLC bei 395 nm detektiert (Cohen, De Antonis et al. 1993; Palace und Phoebe 1997).

Chitinmoleküle können 3 polymorphe Formen bilden, welche auf der Basis von Wasserstoffbrückenbindungen über kristallin geordnete Bereiche verfügen. Die Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen den Amid- und den Carbonylgruppen und bedingen die Bildung von Mikrofibrillen. Man unterscheidet α -, β -, γ -Chitin. Eine antiparallele Stranganordnung bildet α -Chitin. Erfolgt eine parallele Aneinanderlagerung, so entsteht β -Chitin. In γ -Chitin sind in einer Tripletanordnung zwei Stränge parallel und der dritte antiparallel ausgerichtet.

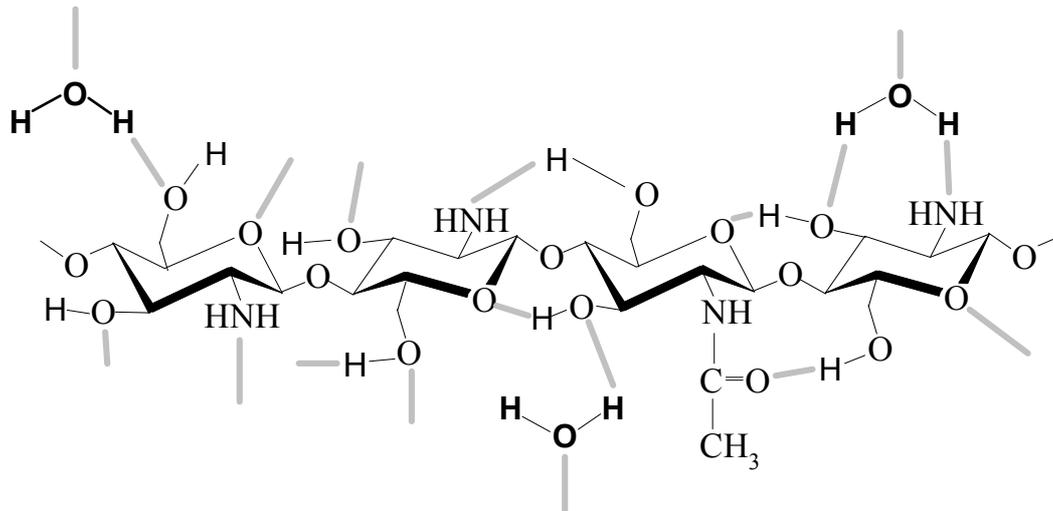


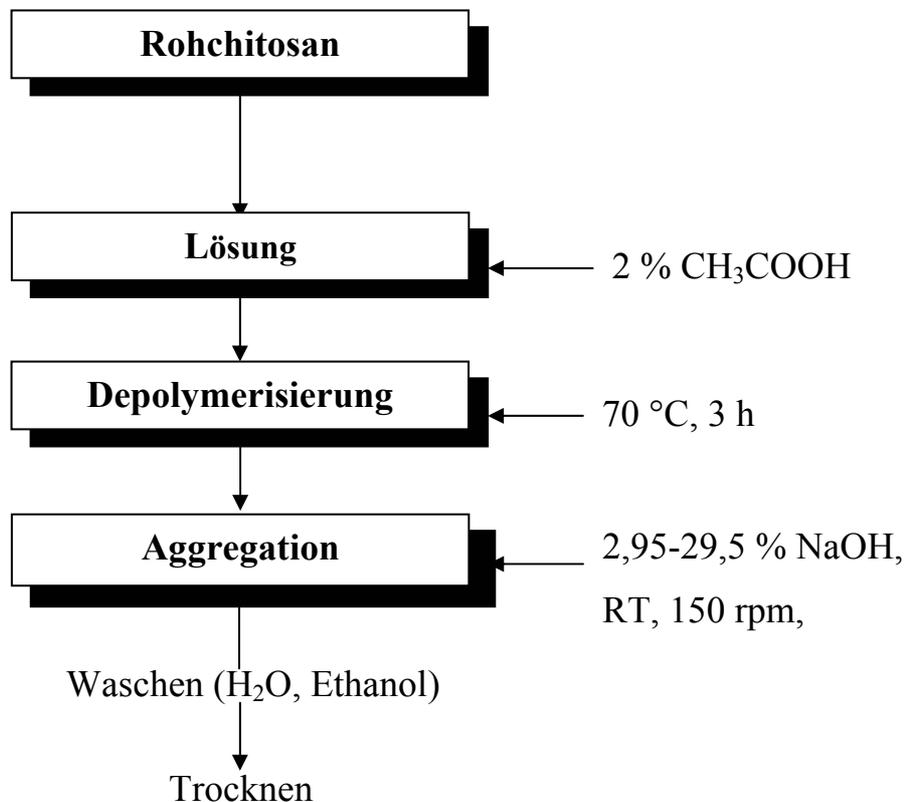
Abb. 1-3 Potentielle intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbildung im Chitosan

Chitosan als Chitinderivat besitzt auch die Fähigkeit zur Ausbildung kristalliner Bereiche, jedoch sind diese unregelmäßiger aufgrund der statistischen Verteilung von Restacetylgruppen an den Monomeren im Molekül angeordnet (Cartier, Domard et al. 1990). Die Untersuchung von kristallinen und amorphen Zuständen einer Substanz kann per Röntgendiffraktometrie durchgeführt werden. Sie basiert auf der Aufzeichnung von angeregten Sekundärstrahlungen von Kristallgitterbausteinen durch emittierte Röntgenstrahlen.

Die Untersuchungen zur Biokompatibilität einer Substanz lassen sich unter anderem einteilen nach der biologischen Aktivität gegen andere Organismen und nach der immunogenen Aktivität auf den eigenen Organismus. Die bakteriozide Wirkung von Chitosan ist vielfältig untersucht und nachgewiesen worden. Hierbei wurde der Effekt von Chitosan, sowie von Chitosanformulierungen auf Bakterien in Kulturen untersucht (Jumaa, Furkert et al. 2002). Pyrogentests werden klassisch nach dem LAL-Verfahren auf bakterielle Endotoxine durchgeführt (Lam und Khor 2001). Für die Gewinnung von Chitosan aus Pilzen ist darüberhinaus auch die Untersuchung auf β -1,3-D-Glucane wichtig, da dieser Bestandteil von Pilzzellwänden immunogen wirkt.

1.8 Mikrokristallines Chitosan

Eine Modifikation von Chitosan stellt mikrokristallines Chitosan (MCCh) dar.



Schema 1-3 Herstellung von mikrokristallinem Chitosan

Rohchitosan wird in Essigsäure gelöst und thermisch depolymerisiert. Nach Struszyk wird der Aggregationsprozeß herbeigeführt durch Zuführen von NaOH zu der sauren Lösung, bis sich ein pH von 8 eingestellt hat. Das entstandene Präzipitat wird mit Wasser und anschließend mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Produkt zeichnet sich durch einen hohen Wasseraufnahmewert (500-5000 %), die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken und zur direkten Filmbildung aus. Darüberhinaus ist mikrokristallines Chitosan bioaktiv und es wirkt bakteriostatisch (Struszczyk 1987). Anwendungsgebiete sollen sich in Bereichen ergeben, in denen Standardchitosan über diese Charakteristika nicht hinreichend zu nutzen ist. Dies betrifft Anwendungen in der Textilindustrie, in der Abwasserbehandlung

und in medizinischen Bereichen. In der Textilindustrie wird eine Nutzung von MCCh als Imprägnierungslösung und als Bindemittel für Stoffbeschichtungen vorgeschlagen. Vergleichende Untersuchungen zur Schwermetallbindung ergaben, dass MCCh bei pH-Werten unter 7 effektiv zwischen 90-100% der gegebenen Schwermetalle (Fe, Cu, Zn, Mg, Pb, Mn) aus wässrigen Lösungen entfernen kann. Standardchitosan dagegen konnte lediglich 10% (Mn) bis 80% (Cu) binden (Struszczyk und Kivekäs 1989).

1.9 Niedermolekulares Chitosan

Basierend auf den industriellen Herstellungsmethoden zeichnet sich das kommerziell produzierte Chitosan durch relativ hohe Molekulargewichte aus. Daraus resultierend konzentrierte sich ein Großteil der Forschung auf Anwendungen von Chitosan mit hohen Molekulargewichten. Jedoch kann hochmolekulares Chitosan nur auf jenen Gebieten zum Einsatz gebracht werden, in denen das Molekulargewicht entweder nur eine untergeordnete Rolle spielt oder aber ein hohes Molekulargewicht mit entsprechend einhergehender Viskosität ausdrücklich gewünscht ist. Gerade im medizinisch-pharmazeutischen Sektor besteht jedoch Interesse am Einsatz von niedermolekularem Chitosan. Denkbar sind hier Anwendungen von Chitosan als Carrier für Wirkstoffe zur parenteralen Applikation (Richardson-Simon, Kolbe-Hanno et al. 1999) ohne eine unerwünschte Reaktion des Immunsystems hervorzurufen. Dies fordert unter anderem auch eine Lösung von Chitosan bei physiologischen pH-Werten, was mit hochmolekularem Chitosan nicht gewährleistet werden kann.

Die Forschung zur Herstellung von niedermolekularem Chitosan basiert im wesentlichen auf der Depolymerisation von industriellem Chitosan. Hierbei wurden Untersuchungen zur chemischen/thermischen Degradation und zum enzymatischen Abbau durchgeführt. Verwendung zur chemischen Depolymerisation fanden Salpetersäure (Allan und Peyron 1995), Salzsäure

(Rege und Block 1999) Wasserstoffperoxid (Chang, Tai et al. 2001) und Phosphorsäure (Zishen und Dongfeng 2002). Bei diesen Untersuchungen wurde die Temperatur als zusätzlicher Parameter zur Einstellung des Molekulargewichtes von Raumtemperatur bis 100°C variiert.

Der enzymatische Abbau kann über spezifische Glycosylhydrolasen, in diesem Fall Chitinasen und Chitosanasen, erfolgen. Diese Enzyme können sowohl von höheren Pflanzen als Abwehr gegen eine Besiedlung durch parasitäre Pilze gebildet werden, wie auch von Bakterien und chitin-/chitosanhaltigen Pilzen selber. Chitinolytische Bakterien nutzen dieses Substrat als Energiequelle, indem sie entweder über eine extrazelluläre Abgabe der erforderlichen Enzyme oder über zellassozierte Enzyme Chitin und Chitosan in die Monomere zerlegen und aufnehmen (Masson, Boucher et al. 1995; Saito, Kita et al. 1999; Zhang und Neua 2002). Aber auch bei chitosanproduzierenden Pilzen spielen diese Enzyme eine Rolle für die Steuerung der Biosynthese der Zellwand in einzelnen Entwicklungsstadien des Mycels (Alfonso, Martinez et al. 1992). Man unterscheidet Endo- und Exochitinasen/-chitosanasen, anhand des Ortes der hydrolytischen Spaltung im Molekül. Enzyme des Endo-Typus spalten nach dem Zufallsprinzip innerhalb des Polysaccharids und bilden als kleinste Endprodukte Glucosamindimere. Als größte Einheiten werden noch Oligomere verzeichnet, d.h. Spaltprodukte mit mehr als 10 Untereinheiten werden nicht gebildet. Exochitinasen/-chitosanasen dagegen spalten endständig Dimere ab (Botha, Nagel et al. 1998). Es wurden eine Reihe dieser Enzyme sequenziert, in Bakterien kloniert und exprimiert. Für industrielle Anwendungen ist die produzierte Menge jedoch noch nicht ausreichend. Daher wurden darüber hinaus auch Untersuchungen zur Depolymerisation von Chitosan mit Lysozym durchgeführt. Lysozym wurde 1922 von Fleming im Nasensekret und in der Tränenflüssigkeit von Menschen entdeckt. Es ist in der Lage Bakterienzellwände zu zersetzen, indem es die glykosidische Bindung zwischen

N-Acetylglucosamin (GlcNac) und N-Acetylmuraminsäure (MNAc) im Polysaccharidanteil der Zellwand spaltet.

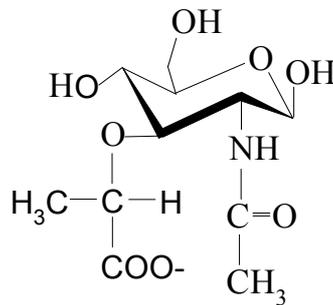


Abb. 1-4 N-Acetylmuraminsäure

Untersuchungen ergaben aber, dass Lysozym auch die Bindung zwischen GlcNac-Monomeren im Chitosan hydrolysieren und endständig Hexamere abspalten kann. Dafür muß dieses Substrat im Polymer mit mindestens drei bis vier acetylierten Untereinheiten gegeben sein. Da Lysozym inzwischen im großen Maßstab aus Hühnereiweiß gewonnen wird, wäre eine biotechnologische Nutzung zur Herstellung von kurzkettigen Chitosanen vorstellbar (Nordtveit, Varum et al. 1994). Weitergehende Untersuchungen zur enzymatischen Degradation von Chitosan wurden u.a. noch mit Papain (Muzzarelli, Terbojevich et al. 2002) und Hemicellulasen (Qin, Du et al. 2002) durchgeführt. Eine direkte Gewinnung niedermolekularen Chitosans aus dem chitin- bzw. chitosanhaltigem Rohmaterial ist nicht bekannt bzw. nicht durchgeführt worden.

1.10 Verwendung von Chitosan

Wesentliche Grundlage zur Nutzung ist die Eigenschaft von Chitosan zur ionischen Bindung und Komplexierung mit anderen Molekülen. Chitosan wird durch die Protonierung der freien Aminogruppen zum Polykation und kann auf dieser Basis mit negativ geladenen Ionen und Molekülen interagieren. Daraus ergeben sich eine Vielzahl von potentiellen Anwendungsmöglichkeiten, welche bereits industrielle Anwendung finden bzw. sich in der Applikationsentwicklung

befinden und über Patente abgesichert sind. Notwendig für solche Entwicklungen sind jedoch einheitliche, länderspezifische Qualitäts- und Deklarationsstandards, sowie eine langfristige Sicherung von konstanten physiko-chemischen Eigenschaften des zu verarbeitenden Chitosans. Eine Übersicht über Anwendungen und Anwendungsmöglichkeiten gibt Tabelle 1-2.

Anwendungsgebiet	Verfahren	Zitierung
Abwasserbehandlung	Bindung von Proteinen	(Chiou und Li 2003)
	Schwermetallbindung	(Bassi, Prasher et al. 1999)
Biotechnologie	Enzymimmobilisierung	(Oztop, Saraydin et al. 2002)
	Zellimmobilisierung	(Pereira, DeCastro et al. 2001)
	Proteinbindung/- separation	(Takakura, Satoh et al. 2000)
	Chromatographie	(Roberts und Taylor 1989)
	Ionentauscher	(Hou, Miyazaki et al. 1994)
Medizin/Pharmazie	Verbände, Schwämme	(Biagini, Muzzarelli et al. 1992)
	Drug delivery	(Mattioli et al. 1999)
	Künstliche Haut	(Kifune 1992)
	Senkung	(Sandford 1989)
	Blutcholesterin	
	Antibiotische Wirkung	(Seo, Mitsuhashi et al. 1992)
	Immunstimulanz	(Suzuki, Watanabe et al. 1992)
	Antitumoraktivität	(Ouchi, Inosaka et al. 1992)
Kosmetik	Filmbildner	(Wachter 1997)
	Feuchthalter	(Lang und Clausen 1989)

Tab 1-2 Anwendung von Chitosan

Bei den in Tabelle 1-2 aufgeführten Anwendungsgebieten spielt das Molekulargewicht des Chitosans nur eine untergeordnete Rolle. Speziell aber über den Einsatz von niedermolekularem Chitosan im medizinischen Sektor sind in den letzten Jahren vielfältige Untersuchungen durchgeführt worden.

Maßgeblich über die Molekülgröße, verbunden mit den polykationischen Eigenschaften, sind erstmals invasive Anwendungsmöglichkeiten möglich, welche mit dem Standardchitosan aus dem hochmolekularen Bereich nicht durchführbar sind. Eine der herausragenden Eigenschaften der niedermolekularen Chitosane ist ihre Wasserlöslichkeit bis in den alkalischen Bereich, so daß parenterale Zubereitungen auf pH 7.4 eingestellt werden können, ohne dass das Chitosan präzipitiert. Darüberhinaus haben niedermolekulare Verbindungen eine geringere antigene Wirkung als hochmolekulare Äquivalente. Begünstigt wird dies durch die Tatsache, dass Homopolymere und nicht metabolisierbare Stoffe schwache Immunogene sind. Diese drei Eigenschaften bedingen, dass niedermolekulares Chitosan für pharmazeutisch-medizinische Applikationen im menschlichen Körper Verwendung finden könnte.

Um eine frühzeitige Ausscheidung eines kurzkettigen Chitosans z.B. als Drugcarrier über die Niere zu vermeiden, sollte das Molekulargewicht des Komplexes über 15.000 g/mol liegen. Stoffe größer als 80.000 g/mol sind über den Glomerulus nicht mehr filtrierbar, jedoch könnte in diesem Mw-Bereich schon eine immunologische Reaktion gegen das Chitosan im Blut einsetzen. Moleküle mit einem Mw zwischen 15.000 und 80.000 g/mol sind nur teilweise filtrierbar, wobei hier die Ladung des zu filtrierenden Moleküls eine wichtige Rolle spielt. Im glomerulären Filter befinden sich negative Wandladungen, so dass ein Polykation wie Chitosan damit interagieren könnte (Silbernagl und Despopoulos 1991). Tabelle 1-3 gibt eine Übersicht über (potentielle) Anwendungsbereiche für niedermolekulares Chitosan.

Anwendungsgebiet	Zitierung
Löslichkeitsvermittlung	(Imai, Shiraishi et al. 1991)
Kariesprophylaxe	(Shibasaki, Sano et al. 1994) (Shibasaki, Matsukubo et al. 1995)
Gene delivery system	(Richardson-Simon, Kolbe-Hanno et al. 1999)
Magengeschwürbehandlung	(Ito, Ban et al. 2000)
Säureneutralisierung	
Behandlung Typ 2 Diabetes mellitus	(Hayashi und Ito 2002)

Tab. 1-3 Verwendung von niedermolekularem Chitosan

Applikationen wie die Nutzung von niedermolekularen Chitosans als Genvektor oder zur Behandlung von Magengeschwüren und Diabetis mellitus sind noch in der Phase der Entwicklung auf der Basis von Tierversuchen.

1.11 Ziel dieser Arbeit

Es sollte niedermolekulares Chitosan aus Pilzen hergestellt werden. Zu untersuchen waren Bedingungen für die Gewinnung des Rohmaterials und für die Präparation, welche zu einem entsprechenden Molekulargewicht des Chitosans führen. Durch Wachstumsversuche sollten verschiedene Pilzarten auf ihre Biomasse- und Chitosanausbeute hin untersucht werden. Ferner sollten über die Molekulargewichtsbestimmung des produzierten Chitosans geeignete Pilzarten für die Herstellung speziell von niedermolekularem Chitosan bestimmt werden. Bestehende Präparationsmethoden zur Gewinnung von Chitosan sollten analysiert werden, inwieweit sie zur Herstellung von kurzkettigen Chitosanen geeignet sind und falls nötig, eine neue Methode dafür entwickelt werden. Zur Analyse des produzierten Materials sollten vergleichende Untersuchungen mit kommerziellem Chitosan durchgeführt werden. Diese Methoden sollten die relevanten Charakteristika von Chitosan bestimmen und die Eignung der Präparationsmethode zur Produktion von niedermolekularem Chitosan belegen.

2 PHYSIKO-CHEMISCHE VORUNTERSUCHUNGEN AN KOMMERZIELLEM CHITOSAN

Um das herzustellende kurzkettige Chitosan hinsichtlich seiner physikochemischen Eigenschaften zu analysieren, wurden vergleichende Untersuchungen mit industriellem Chitosan und Monomeren durchgeführt. Es wurden Proben aus Krabbenchitosan und Pilzchitosan vermessen.

Ursprung	Bezeichnung	Hersteller	Abkürzung
Krabbe	-	Dalwoo	DAL
Krabbe	Chitopure 026	FishContract	FC1
Krabbe	Chitopure XP	FishContract	FC2
Krabbe	MD5	Primex	PR1
Krabbe	TD127	Primex	PR2
Krabbe	TM1070	Primex	PR3
Krabbe	TM003	Primex	PR4
Krabbe	mikrokristallin	Primex	PRMK
Pilz	S-1247	Tricorporation	TRI
Krabbe	Oligo	Seigakaku	Oligo
-	GlcN	Fluka	GlcN
-	GlcNac	Fluka	GlcNac

Tab. 2-1 analysierte Chitosane, Monomere

Mit dieser Auswahl sollte ein repräsentativer Querschnitt von kommerziellen Chitosanen hinsichtlich der Herkunft, des Molekulargewichtes, des Desacetylierungsgrades sowie des Reinheitsgrades untersucht werden. Da die industrielle Herstellung von Chitosan aus Pilzen sowie die von

mikrokristallinem Chitosan sich noch in der Pilotphase befindet, konnten hier nur Einzelproben getestet werden.

2.1 Molekulargewicht

Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte durch Auftrennung über GPC und Vermessung per Laserlichtstreuung. Die Proben wurden in Laufpuffer (Essigsäure/Natriumacetat, 0,5 M / 0,5 M) gelöst. Je größer das Molekulargewicht war, desto geringere Konzentrationen von Chitosan wurden verwendet. Durch Vorversuche wurde die zu lösende Menge bestimmt, für hochmolekulare Chitosane (>100.000 g/mol) wurden 2 mg/ml und für niedermolekulare Chitosane 5 mg/ml (< 100.000 g/mol) eingewogen. Die Proben wurden über Nacht gelöst und über einen 0,2 µm Filter zur Abtrennung von ungelösten Bestandteilen in ein HPLC-Fläschchen gegeben.

Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgte mit einer Flußrate von 1 ml/min in einem GPC-Säulensystem (Anhang 8.4). Mittels eines Streulichtphotometers (Molmassenbestimmung) und eines RI-Detektors (Konzentrationsbestimmung) wurden die Messungen zur Ermittlung des Molekulargewichtes durchgeführt. Über die angeschlossene Software ASTRA wurden die Daten verarbeitet und die absoluten Molekülmassen im Elutionsvolumen ermittelt.

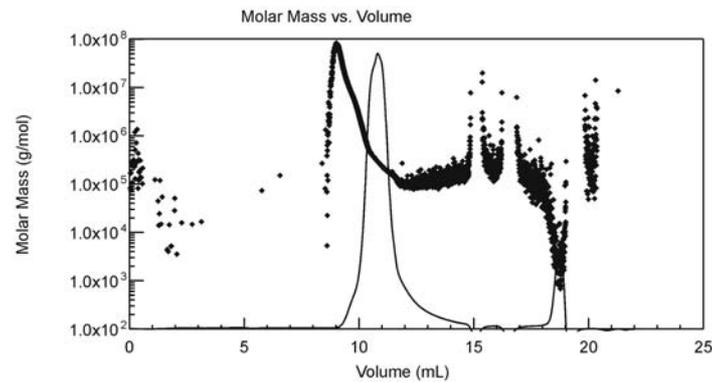


Abb. 2-1 errechnetes Molekulargewicht [g/mol] in Abhängigkeit vom gesamten eluierten Volumen

(Peak: RI-Signal, fett gedruckte Punkte: errechnetes MW)

Durch Fraktionierung des Volumens lassen sich spezifische Bereiche herausrechnen. Es wurden das massenmittlere Molekulargewicht in dem eingegrenzten Bereich (M_w) und das zahlenmäßige mittlere Molekulargewicht im Punkt der höchsten Konzentration (M_n) bestimmt.

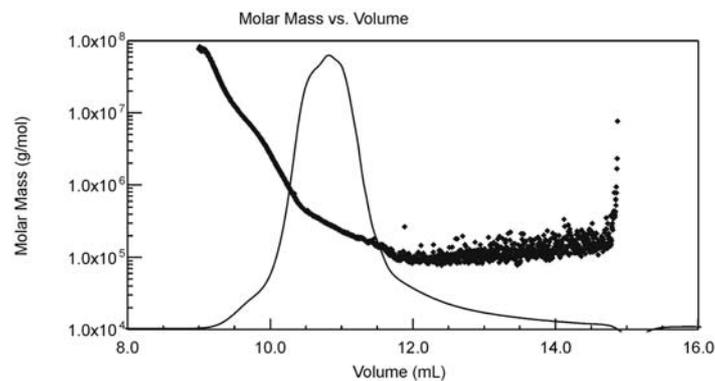


Abb. 2-2 Molekulargewicht in Abhängigkeit vom eluierten Volumen im Bereich von 8,0 ml bis 16 ml ($M_n 2,328 \times 10^5$ g/mol , $M_w 7,904 \times 10^5$ g/mol)

Abkürzung	Mw	Mn	Polydispersität
	[g/mol]	[g/mol]	Mw/Mn
DAL	3.501×10^3	2.231×10^3	1,57
FC1	7.511×10^5	2.522×10^5	2,98
FC2	4.933×10^4	2.879×10^4	1,71
PR1	1.953×10^5	6.797×10^4	2,87
PR2	1.101×10^5	4.493×10^4	2,45
PR3	1.178×10^5	5.102×10^4	2,31
PR4	1.425×10^5	7.147×10^4	1,99
PRMK	7.057×10^5	4.107×10^5	1,72
TRI	7.840×10^5	1.331×10^5	5,89
Oligo	7.706×10^2	6.114×10^2	1,26
GlcN	2.793×10^2	1.934×10^2	1,44
GlcNac	2.942×10^2	2.241×10^2	1,31

Tab. 2-2 Molekulargewichte der Referenzproben

2.2 Identitätsprüfung und Bestimmung des Desacetylierungsgrades

Mittels $^1\text{H-NMR}$ kann eine organische Probe auf ihre Identität geprüft werden und, im bestimmtem Rahmen, auch auf ihren Reinheitsgrad. Abb. 2-3 zeigt ein typisches $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Chitosan. Organische Verunreinigungen können durch zusätzliche und veränderte Peaks, sowie durch eine verrauschte Basislinie detektiert werden.

Von den zu vermessenden Proben wurde eine 2 % (m/V) Lösung mit deuterierter Salzsäure (0,5 % (V/V) in D_2O) hergestellt. Als Standard wurde das Natriumsalz der 3-(Trimethylsilyl)-propansulfonsäure verwendet. Die Proben wurden in einem Kernresonanzspektrometer ARX300 (Bruker, Rheinstetten) bei 300-320 K vermessen.

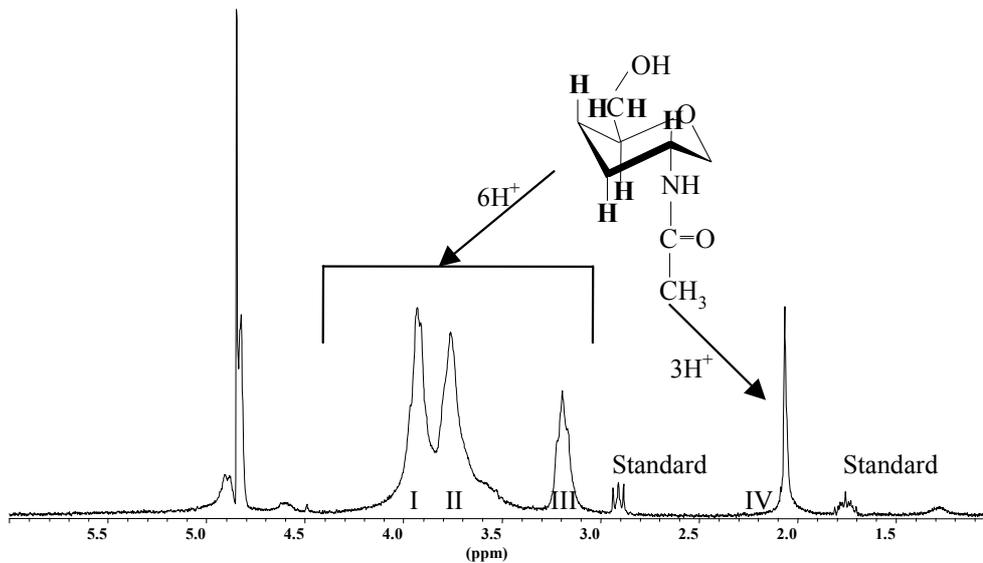


Abb. 2-3 ¹H-NMR-Spektrum: Zuordnung der relevanten Resonanzsignale zu den Wasserstoffatomen im N-Acetylglucosamin-Monomer von Chitosan

Der Desacetylierungsgrad wurde über die in Abb. 2-3 gekennzeichneten Integrale errechnet:

$$DD = 100 - \frac{\int(\text{IV}/3) \cdot 100}{\int(\text{I} + \text{II} + \text{III})/6} \quad [\%]$$

Der Flächeninhalt von Peak IV (Acetylgruppe) wird durch 3 dividiert und damit auf ein H-Atom (entsprechend einer Acetylgruppe) verrechnet. Dieser Quotient wird in das prozentuale Verhältnis zu den drei Integralen des Pyranoseringes gesetzt, welche durch die Division mit 6 den Wert dieser Messung für eine Glucosaminuntereinheit ergeben. Der rechte Term errechnet somit den Acetylierungsgrad, subtrahiert von 100 wird darüber der Desacetylierungsgrad ermittelt.

Abkürzung	Desacetylierungsgrad
DAL	69.1%
FC1	70.5%
FC2	79.3%
PR1	82.5%
PR2	96.9%
PR3	96.8%
PR4	84.9%
PRMK	83.7%
TRI	71.1%
Oligo	100%
GlcN	100%
GlcNac	0%

Tab. 2-3 Desacetylierungsgrad der Referenzproben

Diese Methode kann im hochmolekularen Bereich zur Vermessung von Chitosanen nur bis zu einem Molekulargewicht von ca. 1×10^6 g/mol verwendet werden. Durch den hohen Polymerisierungsgrad ergeben sich Resonanzüberlagerungen der Signale der H-Atome des Ringes. Dies hat zur Folge, dass sich die Peaks I und II verbreitern und letztendlich auch überlagern. In Abb. 2-4 wurden zum Vergleich das Monomer GlcNac gegen DAL (niedermolekular) und PR1 (hochmolekular) aufgetragen.

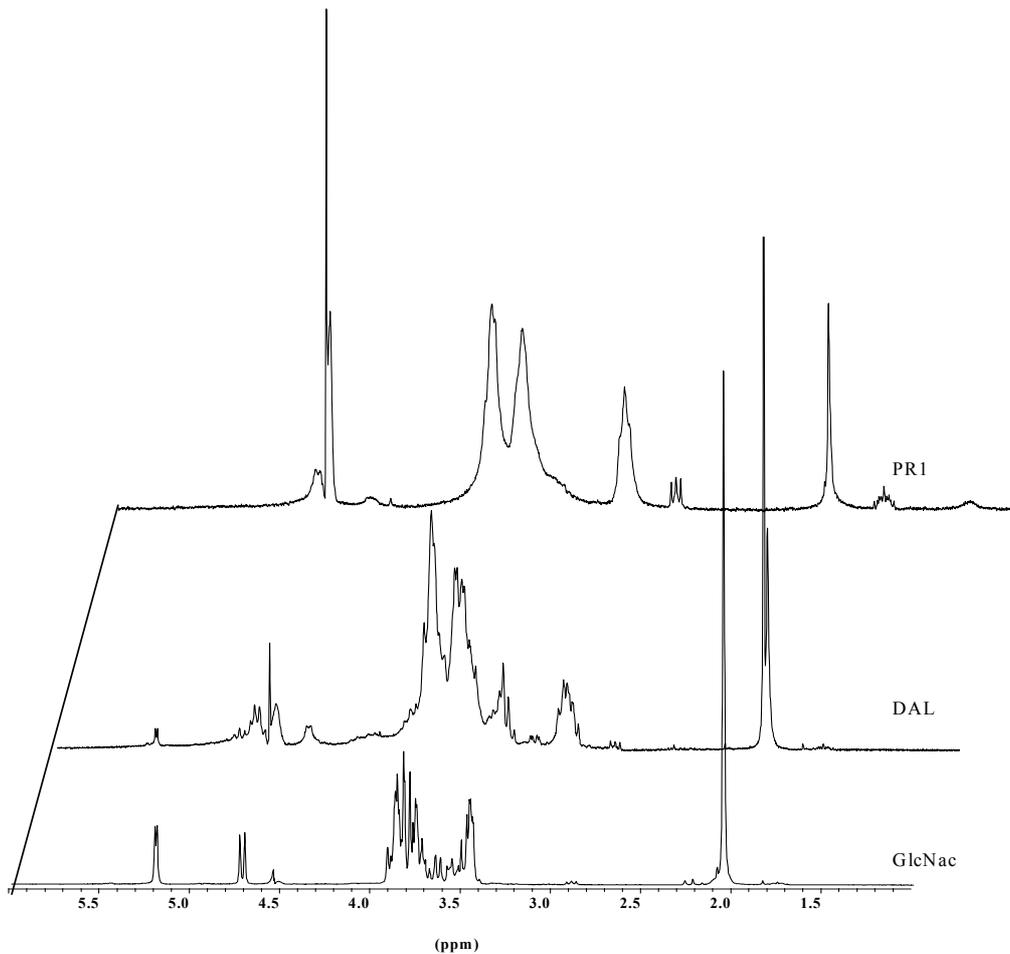


Abb. 2-4 $^1\text{H-NMR}$ von Monomer, nieder- und hochmolekularem Chitosan

In dem NMR-Spektrum von GlcNac sind deutlich Signalaufspaltungen durch die Spin-Spin-Kopplung der einzelnen Protonen des Ringes zu verzeichnen. Das linke Maximum entspricht vier und der rechte Teil zwei H-Atomen. Bei DAL überlagern sich die Signale, jedoch sind noch Aufspaltungen angedeutet. Diese sind bei PR1 zu jeweils einem Peak vereinigt.

DAL weist darüber hinaus bei 3,5 ppm ein Nebensignal auf, welches von Ethanol stammt und Rückschlüsse auf die Verwendung von Ethanol in der Herstellung dieses niedermolekularen Chitosans erlaubt.

2.3 Kristallinität

Die Bestimmung der Kristallinität der Chitosanproben wurde in einem Röntgendiffraktometer (Stoe & Cie, Darmstadt) durchgeführt. Die Proben wurden zwischen zwei Mylarfolien gegeben und in einen um die eigene Achse rotierenden Probenhalter gespannt. Die Röntgenröhre wurde mit 40 kV und 200 mA betrieben, so dass mittels einer Kupfer- $K_{\alpha 1}$ -Emission über einen Monochromatorkristall eine Wellenlänge von 1,405 Å erzeugt werden konnte. Mit einer Winkelgeschwindigkeit von 1°/10 s wurde über den Bereich von $2\theta = 5-50^\circ$ die Transmission der Probe aufgenommen.

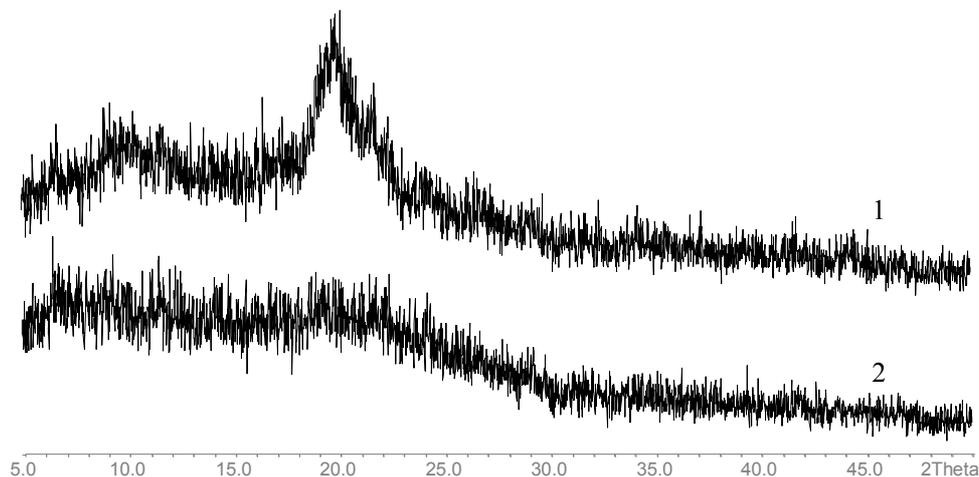


Abb. 2-5 Röntgendiffraktogramme von Chitosan

1- PR1 2- DAL

Die Abbildung zeigt charakteristische Diffraktogramme für die untersuchten Chitosane. Beispielhaft sind in einer Probe von PR1 Signale für Teilkristallinität bei $2\theta = 9^\circ$ und 20° auf einem starken Halosignal zu erkennen. Alle anderen industriellen Proben außer DAL weisen diesen Kurvenverlauf auf. DAL dagegen zeigt nur das Halosignal, dies entspricht einem amorphen Zustand dieses Materials.

2.4 Bestimmung der Partikelgröße und strukturelle Untersuchung

Zur Bestimmung der Partikelgröße wurden die Proben rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Darüberhinaus konnten noch Informationen über die Herstellungsmethode der Chitosane gewonnen werden.

Die Proben wurden auf einem Probenhalter mittels einer beidseitig klebenden, elektrisch leitenden Folie fixiert (Leit-Tabs, W. Plannet GmbH, Wetzlar). In einem Sputter Coater (SCD 005, Bal-Tec AG, Liechtenstein) wurde anschließend die Probe unter Argonatmosphäre bei 50 Pa für 180 s mit Gold bedampft. Die Untersuchung erfolgte in einem Rasterelektronenmikroskop (Series XL20, Philips, Holland) bei einer angelegten Spannung von 15 kV in verschiedenen Vergrößerungsstufen. Über den Maßstab wurde die Partikelgröße und die Oberflächenstruktur der Probe bestimmt. Beispielhaft werden hier einige Proben dargestellt, deren Merkmale charakteristisch für die untersuchten Chitosane sind.

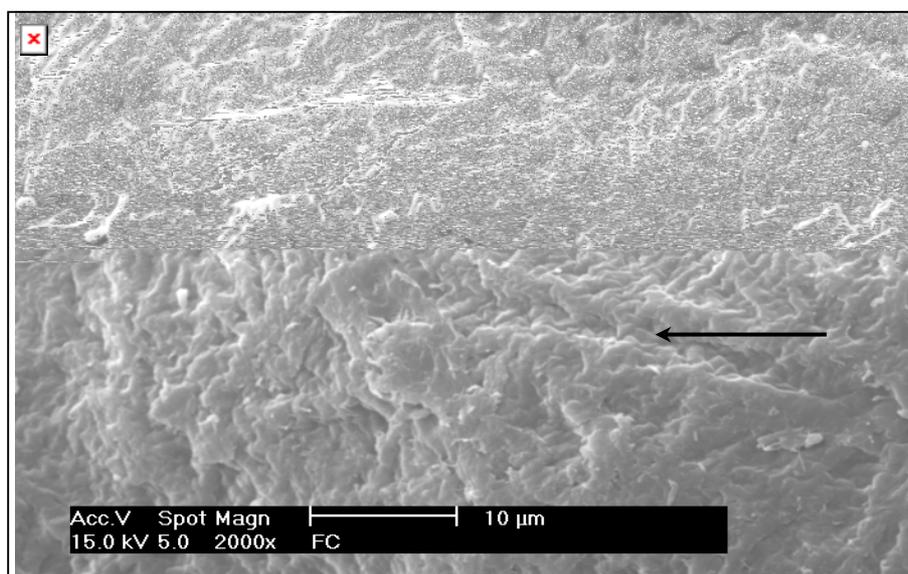


Abb. 2-6 FC (Vergrößerung: 2000x)

Das Chitosan von FishContract weist keine definierte Partikelstruktur im Mikromaßstab auf (Abb. 2-6). Vielmehr handelt es sich um makroskopische Folienbruchstücke, welche bei starker Vergrößerung eine zerklüftete Oberfläche

mit Bereichen von teilweise regelmäßiger Lamellarstruktur (Pfeil) aufweisen. Die Probe ist in sich homogen und mikroskopische Verunreinigungen sind nicht zu erkennen.

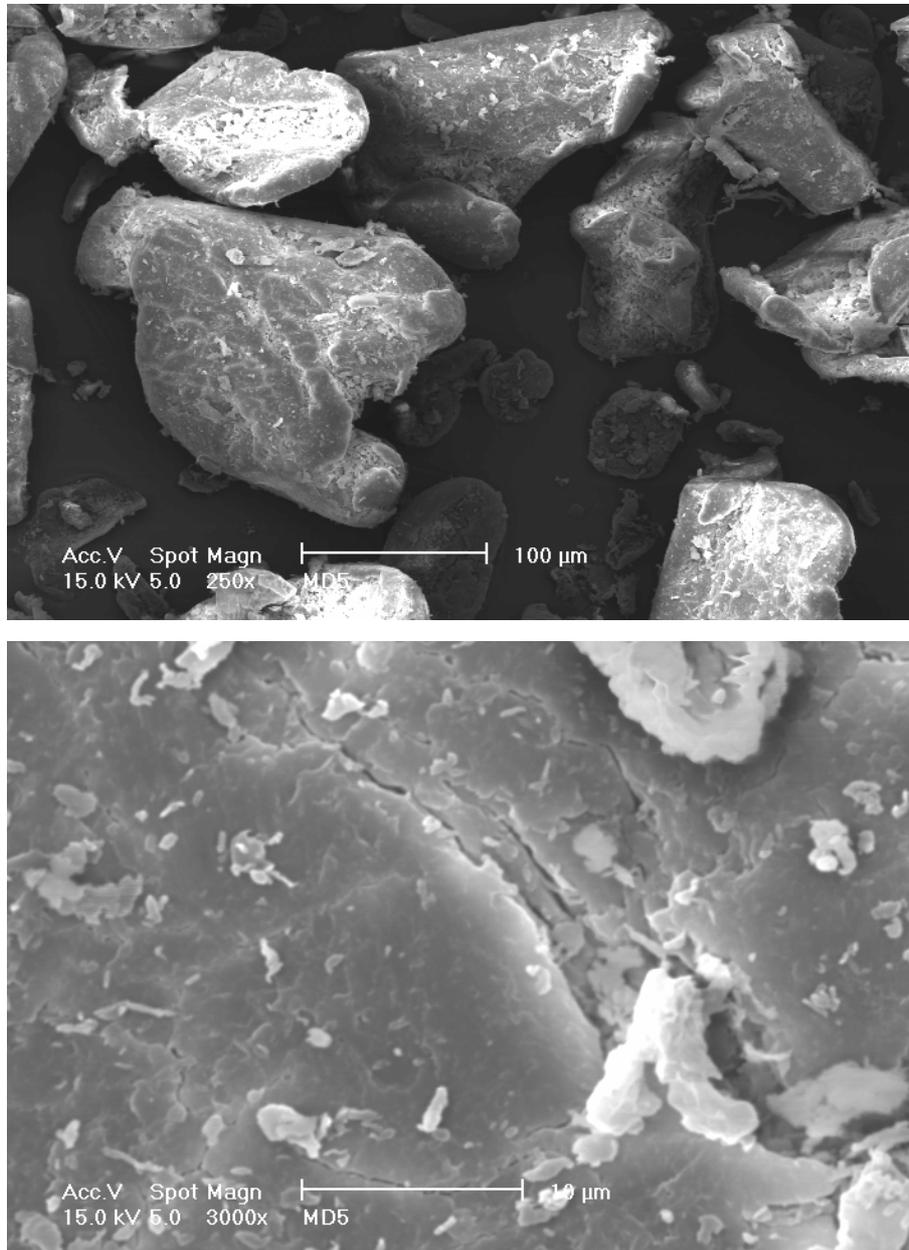


Abb 2-7 PR1 (Vergrößerung: 250x / 3000x)

Die Aufnahme von PR1 zeigt bei kleinerer Vergrößerung unregelmäßig geformte, abgerundete Partikel mit einer geschätzten Größe zwischen 20 µm bis 150 µm. Die Oberfläche dieser Teilchen ist relativ glatt, weist jedoch längere

Spalten auf. Bei starker Vergrößerung zeigt diese Oberfläche teilweise eine schuppenartige Struktur.

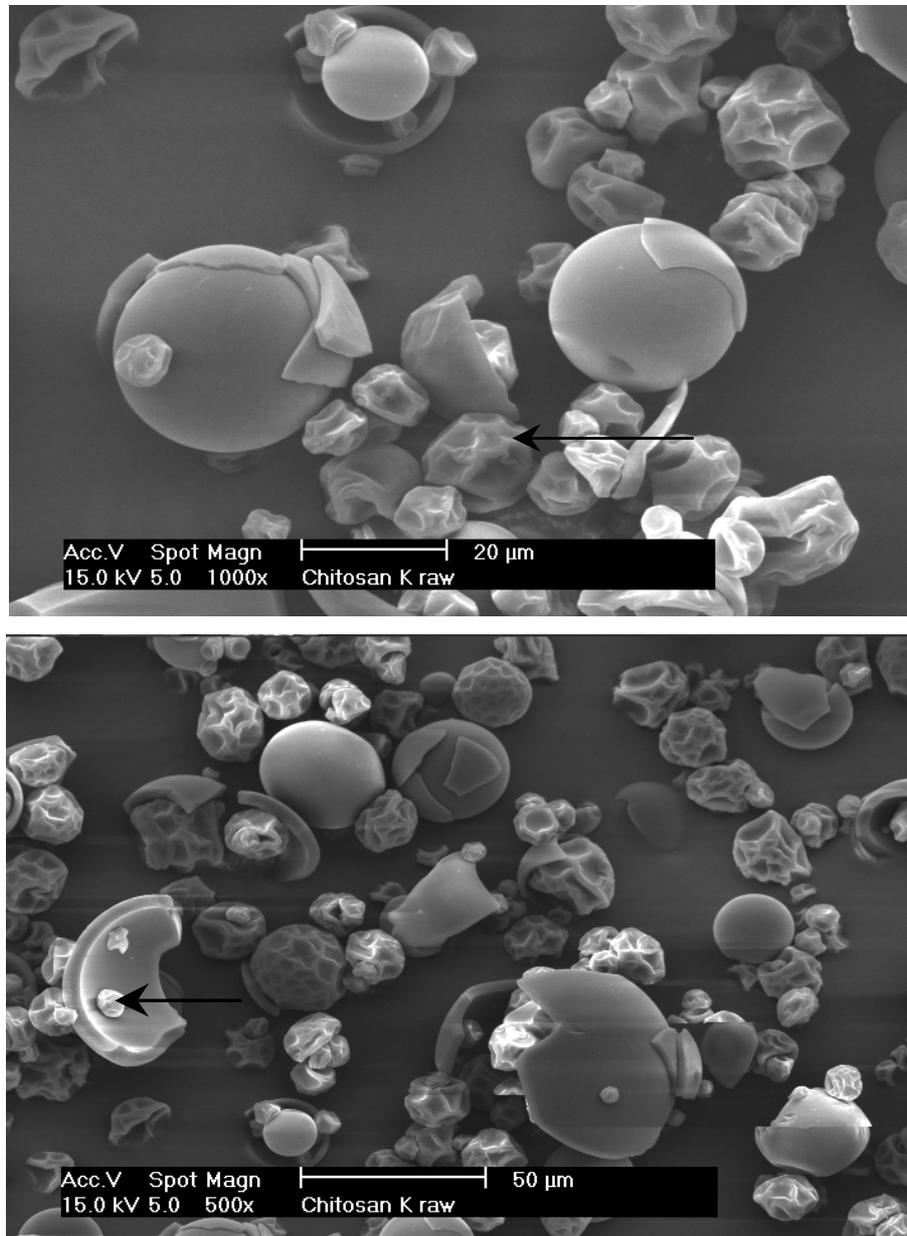


Abb. 2-8 DAL (Vergrößerung: 1000x / 500x)

Chitosan DAL besteht aus runden Partikeln mit einem Durchmesser von 10-50 µm. Die kleineren Partikel weisen Spuren von Volumenkontraktionen auf, welche ein plastisches Einfallen der Außenschicht bewirkten. Damit müssen diese Partikel innen hohlräumig sein, dies wird auch durch Bruchstücke (Pfeil)

bestätigt. Die Probe ist in sich homogen und mikroskopische Verunreinigungen sind nicht zu erkennen.

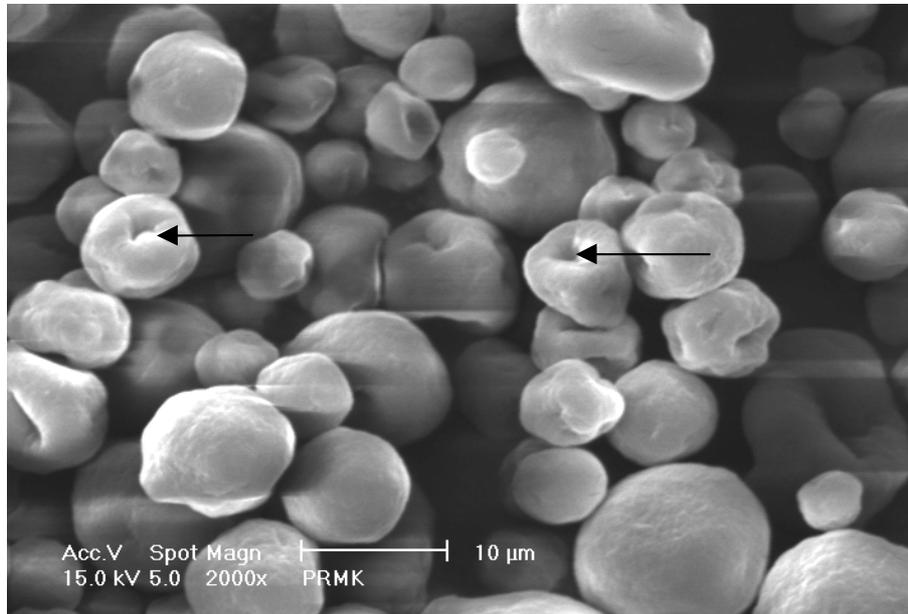


Abb. 2-9 PRMK (Vergrößerung: 2000x)

Ein ähnliches Produkt wie DAL ist das PRMK. Die Teilchengröße beträgt hier zwischen 5-10 µm, jedoch weisen die Partikel Merkmale wie die vorhergehende Probe auf. Es sind Spuren von Schrumpfungsprozessen zu verzeichnen. Einige Partikel weisen einen charakteristischen Schatten an der Oberfläche (Pfeil) auf, welcher entweder eine besonders starke Eindellung der Oberfläche oder aber eine Öffnung zu einem Hohlraum im Teilchen sein könnte.

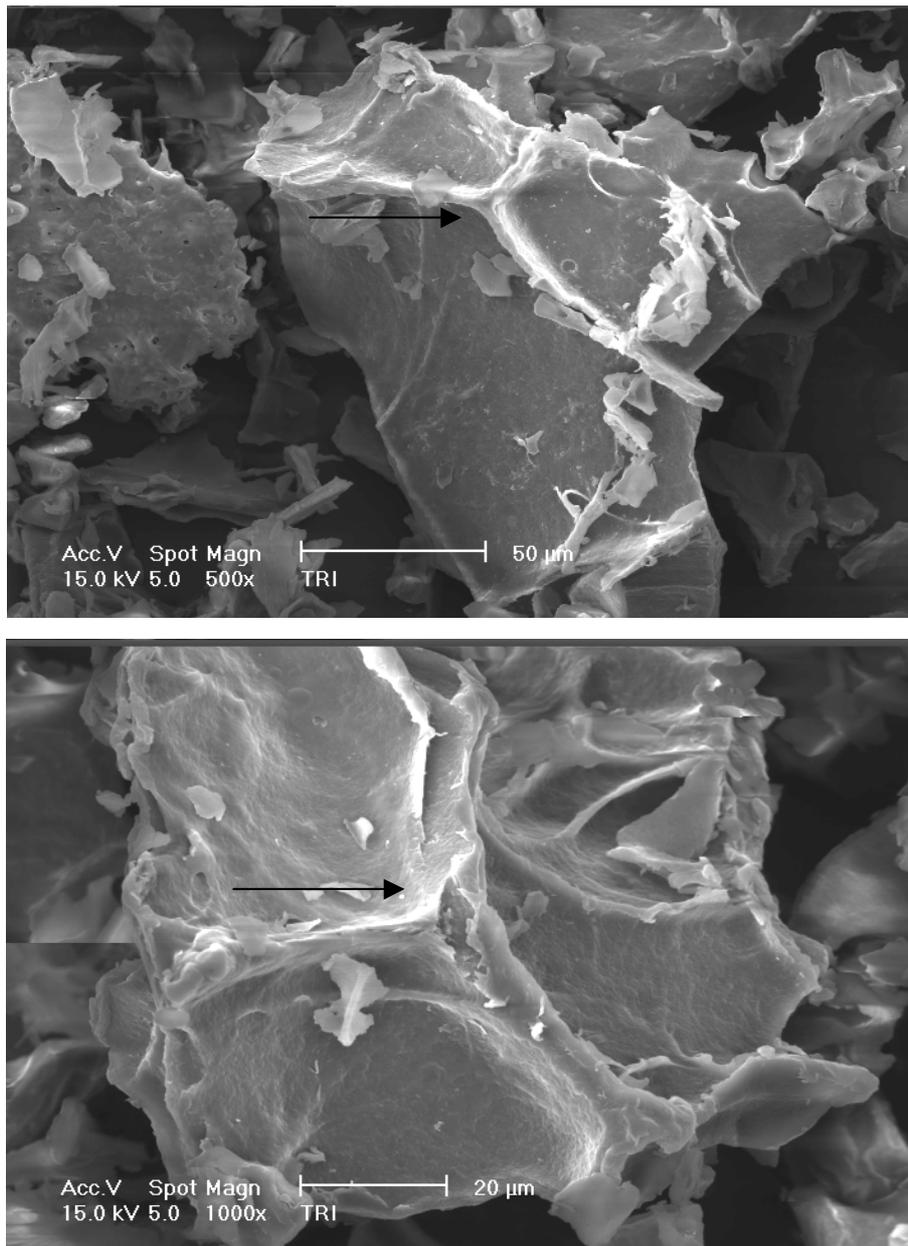


Abb. 2-10 TRI (Vergrößerung: 500x / 1000x)

Die Probe von TRI weist Partikel mit unregelmäßiger Struktur und Größe auf. Auffällig sind trianguläre Strukturen, welche senkrecht aufeinander stehende Wände bilden. Diese Anordnung hat Ähnlichkeit mit mikroskopischen Abbildungen von Zellen, die mittels der Gefrierbruchmethode gefertigt wurden. Da dieses Chitosan aus Pilzmaterial produziert worden ist, könnte man vermuten, dass es sich hier um Überreste von Zellwandmaterial aus dem Mycel handelt.

Bei kleinen Partikeln muß, um die Auflösung des REM zu erhöhen, die angelegte Spannung vergrößert werden. Dies kann jedoch zur thermischen Zerstörung der zu untersuchenden Probe führen.

Daher wurde ab einer Partikelgröße von unter 1 µm die Größenbestimmung per Photonenkorrelationsspektroskopie durchgeführt. Hierzu wurde mit den Proben eine stark verdünnte Suspension in Ethanol hergestellt. Von dieser Suspension wurde 1 ml in eine Quarzküvette gegeben und im Autosizer IIc (Mütek-Laser und optoelektronische Geräte GmbH, Herrsching) vermessen. Mit dem Prinzip der Laserlichtstreuung wurde die Analyse auf der Grundlage folgender Parameter durchgeführt:

Temperatur	25 °C
Viskosität (Ethanol)	1,2 mPas
Brechungsindex (Ethanol)	1,357
Wellenlänge	633 nm

Diese Methode wurde aufgrund der gegebenen Größe und Struktur nicht mit den Referenzproben durchgeführt.

2.5 Wassergehaltsbestimmung

Die Bestimmung wurde im Mikromaßstab durchgeführt. Dazu wurden Eppendorf-Caps auf einer Mikrowaage ausgewogen. Im Dreifachansatz wurden die zu untersuchenden Proben in die Gefäße gegeben und die Einwaage bestimmt. Danach wurden die offenen Gefäße mit dem Chitosan bei 95 °C für 24 h im Trockenschrank gelagert. Direkt nach Entnahme wurden die Caps mit Deckeln verschlossen und im Exsikkator auf Raumtemperatur gebracht. Es erfolgte die Gewichtsbestimmung und aus dem relativen Verhältnis von Anfangsgewicht zu Endgewicht wurde der Wassergehalt in Prozent errechnet.

Abkürzung	Wassergehalt [%]
DAL	14,7 ± 0,2
FC1	9,9 ± 0,2
FC2	10,8 ± 0,8
PR1	10,2 ± 0,3
PR2	8,1 ± 0,2
PR3	8,5 ± 0,1
PR4	9,3 ± 0,2
PRMK	10,2 ± 0,4
TRI	12,7 ± 0,7
Oligo	14,1 ± 0,2
GlcN	1,7 ± 0,1
GlcNac	2,5 ± 0,2

Tab. 2-4 Wassergehalt der Referenzproben [%]

2.6 Bestimmung des Reinheitsgrades von Chitosan

2.6.1 Bestimmung anorganischer Bestandteile (Ph. Eur. 4.02 - 2.4.14)

Zur Bestimmung mineralischer Restbestandteile wurde nach Ph. Eur. 2002/4.00-2.4.14 der Sulfataschegehalt im Mikromaßstab bestimmt. Markierte Reaktionsgefäße wurden bei 600 °C in einem Muffelofen geglüht und deren Gewicht bestimmt. Dieser Vorgang wurde bis zur Gewichtskonstanz wiederholt. Die Gefäße wurden danach mit Proben beschickt (10-20 mg), mehrfach gewogen und 10 % (V/V) Schwefelsäure dazugegeben. Auf einer Heizplatte wurde die Emulsion vorsichtig eingetrocknet und die Reaktionsgefäße anschließend für 15 min zur Veraschung bei 600 °C in den Ofen gegeben. Die Probengefäße wurden danach zum Erkalten in einen Exsikkator gegeben, das

Gewicht ermittelt und wiederum mit einigen Tropfen 10 % (V/V) Schwefelsäure versetzt. Die Proben wurden wieder 600 °C ausgesetzt und voriger Vorgang wiederholt. Nach dem Wiegen wurden einige Tropfen einer 15,8 % (m/V) Ammoniumcarbonatlösung in die Reaktionsgefäße gegeben und erneut bei 600 °C geglüht. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde wieder das Gewicht ermittelt. Das Glühen wurde bis zur Gewichtskonstanz der Gefäße mit den Proben wiederholt. Der Gehalt an anorganischen Bestandteilen in der Probe wurde durch das Verhältnis von Einwaage zum Restaschegewicht in Prozent errechnet.

Abkürzung	Sulfataschegehalt [% der Einwaage]
DAL	0,48 ± 0,03
FC1	2,28 ± 0,06
FC2	0,84 ± 0,02
PR1	1,11 ± 0,05
PR2	1,15 ± 0,02
PR3	1,24 ± 0,08
PR4	1,06 ± 0,07
PRMK	0,43 ± 0,06
TRI	7,32 ± 0,27
Oligo	2,31 ± 0,03
GlcN	0,45 ± 0,03
GlcNac	0,56 ± 0,03

Tab. 2-5 Anteil anorganischer Bestandteile

2.6.2 Bestimmung des Restproteingehaltes

Die Proben wurden nach einer modifizierten Methode von Palace und Phoebe (1997) auf der Basis der AccQ-Tag Methode (Waters Corp., Milford, MA) aufbereitet. Diese Methode wurde ursprünglich zur Aminosäurenanalyse entwickelt und basiert auf der Derivatisierung von durch Proteinhydrolyse gewonnenen Aminosäuren mit einem fluoreszierenden Reagenz. Das AccQ-Fluor Reagenz (6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidylcarbamate / AQC) derivatisiert primäre und sekundäre Aminosäuren und bewirkt nach Auftrennung der Derivate mittels Reversphasen-HPLC Fluoreszenz bei 395 nm.

In 6 x 50 mm Röhrchen wurde die Probe einer Gasphasenhydrolyse unterzogen. Dafür wurde in ein Reaktionsgefäß 250 µl 20 % (V/V) Salzsäure, ein Phenolkristall und das Röhrchen mit der zu hydrolysierenden Probe gegeben. Die Probeneinwaage betrug jeweils 50 mg unter Zusatz von 5,2 ng L- α -Aminobuttersäure (AABA) als interner Standard. Das Reaktionsgefäß wurde mit Stickstoff beschickt, um eine inerte Atmosphäre zu schaffen, und fest verschlossen. Die Hydrolyse wurde bei 150 °C über 1.5 h durchgeführt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig geöffnet, überschüssige Salzsäure abgewischt und die Probe unter Vakuum getrocknet. Zur Rekonstitution der Proben für die Derivatisierung wurden die hydrolysierten Proben mit 40 µl 20 mM Salzsäure versetzt, gemischt und 10 min in ein Ultraschallbad gegeben. 100 µl AccQ-Fluor Boratpuffer wurden zur rekonstituierten Probe gegeben, gemischt und anschließend mit 60 µl des AccQ-Fluor Reagenz versetzt. Nach wiederholtem Mischen wurde die 200 µl-Probe in ein Autosamplergefäß mit einem Kleinvolumeneinsatz überführt und in einem Ofen für 10 min auf 55 °C erhitzt.

Die Auftrennung erfolgte nach den Kenndaten von 8.3. Als externer Standard zur Ermittlung der Retentionszeiten und der Kalibrierungsintegrale wurde eine 2,5 mM Aminosäurestammlösung (Pierce Lab. Inc.) als externer Standard

verwendet. Diesem Standard wurde wie den aufzutrennenden Proben L- α -Aminobuttersäure (AABA) als interner Standard zugefügt.

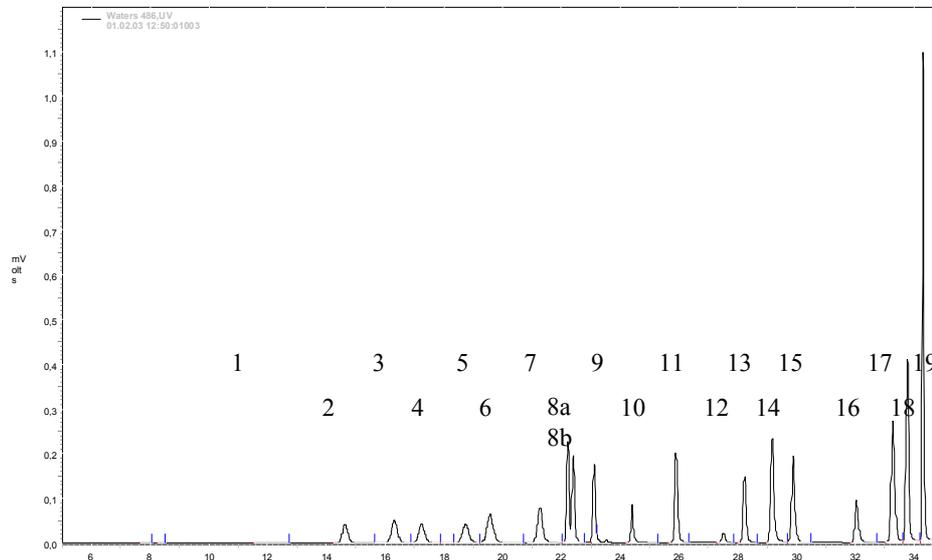


Abb. 2-8 Aminosäuren-Kalibrierungsstandard mit internem Standard

1)AMQ 2)Asp 3)Ser 4)Glu 5)Gly 6)His 7)NH₃ 8a)Arg 8b)Thr 9)Ala 10)Pro 11)AABA
12)Cys 13)Tyr 14)Val 15)Met 16)Lys 17)Ile 18)Leu 19)Phe

Skalierung Y-Achse: 1,1 mV

Einspritzvolumen: 10 μ l (Peaks entsprechen jeweils 100 pmol/Aminosäure)

AMQ ist ein Nebenprodukt der Derivatisierung. Überschüssiges AQC hydrolysiert zu 6-Aminoquinolin, N-hydroxysuccinimid (NHS) und CO₂. Während NHS und CO₂ kein Fluoreszenzsignal erzeugen, fluoresziert AMQ sehr schwach bei 395 nm und wird an erster Stelle nach ca. 11 min eluiert. Die Konzentration von AMQ in der Probe des Standards ist nach der Derivatisierung zu gering, um im gewählten Maßstab der Abb. 2-8 abgebildet werden zu können. In Abb. 2-10 ist AMQ dagegen zu erkennen.

Zusätzlich wurde ein Standard für Glukosaminmonomere unter Verwendung von N-Glukosamin hergestellt. Hierzu wurde eine wäßrige Stammlösung (2,5 mM) von N-Glukosamin hergestellt und in gleichen molaren Verhältnissen für den Kalibrationsstandard eingesetzt.

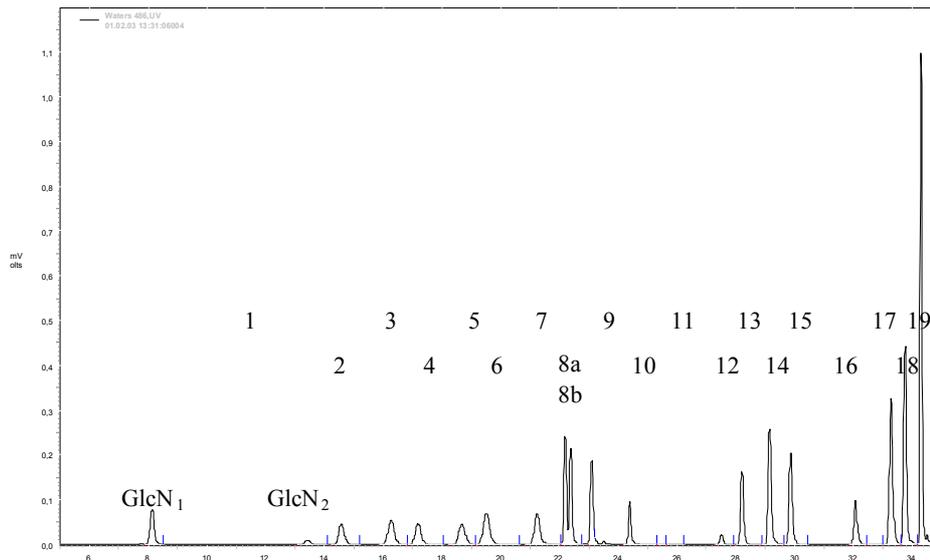


Abb. 2-9 Aminosäuren-Kalibrierungsstandard mit GlcN-Standard

1)AMQ 2)Asp 3)Ser 4)Glu 5)Gly 6)His 7)NH₃ 8a)Arg 8b)Thr 9)Ala 10)Pro 11)fehlt
12)Cys 13)Tyr 14)Val 15)Met 16)Lys 17)Ile 18)Leu 19)Phe

GlcN₁) α -Anomer GlcN₂) β -Anomer

Skalierung Y-Achse: 1,1 mV

Einspritzvolumen: 10 μ l (Peaks entsprechen jeweils 100 pmol/Aminosäure)

Die zwei durch AMQ voneinander getrennten Signale von GlcN stellen die Anomere in der α - und der β -Form da, charakterisiert durch die Hydroxylgruppe am C1 unterhalb bzw. oberhalb der Ringebene.

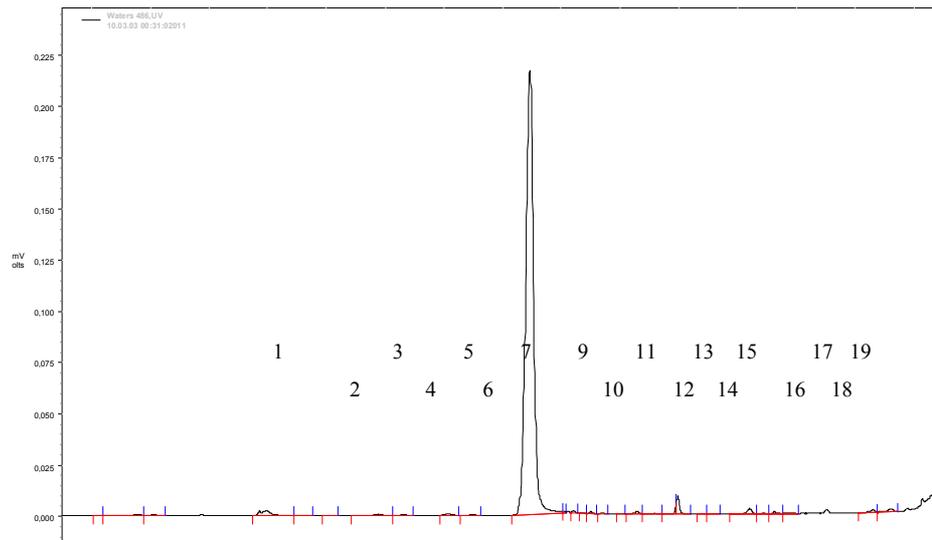


Abb. 2-10 Aminosäuren-Kalibrierungsstandard mit GlcN-Standard

1)AMQ 2)Asp 3)Ser 4)Glu 5)Gly 6)His 7)NH₃ 8a)Arg 8b)Thr 9)Ala 10)Pro 11)fehlt
12)Cys 13)Tyr 14)Val 15)Met 16)Lys 17)Ile 18)Leu 19)Phe

Skalierung Y-Achse: 0,23 mV

Einspritzvolumen: 10µl (Peaks entsprechen weniger als 2 pmol/Aminosäure)

Parallel zu den Proben wurde jeweils eine Leerprobe vorbereitet, um einen Eintrag von Aminosäuren über Kontamination durch verwendete Geräte und Reagenzien festzustellen bzw. auszuschließen. Diese Nullprobe enthielt nur das AccQ-Derivatisierungsreagenz zuzüglich dem Puffer und wurde wie die Proben im Derivatisierungsprozeß behandelt. Im Chromatogramm sind bei entsprechender Skalierung Peaks für AMQ, NH₃ und einiger Aminosäuren festzustellen. AMQ und NH₃ sind Nebenprodukte der Derivatisierung und in jeder Analyse vorhanden. Die Aminosäuren stellen minimale Kontaminationen dar, jedoch sind sie in dieser Größenordnung durch Umwelteinflüsse nicht auszuschließen und beeinflussen in diesem Maßstab (vgl. mit Abb. 2-9) die Messung nicht.

Abkürzung	Proteingehalt [% der Einwaage]
DAL	0,42 ± 0,19
FC1	0,51 ± 0,26
FC2	0,34 ± 0,01
PR1	0,41 ± 0,09
PR2	0,60 ± 0,27
PR3	0,23 ± 0,01
PR4	0,23 ± 0,02
PRMK	0,43 ± 0,21
TRI	0,29 ± 0,02
Oligo	0,39 ± 0,17

**Tab. 2-6 Anteil von Proteinen/Aminosäuren in Referenzproben
(GlcN und GlcNac wurden nicht vermessen)**

2.7 Diskussion

Die Molekulargewichte der vermessenen Proben decken eine breite Skala von Polymerisationsgraden von Chitosan ab. Dabei zeigt die Vermessung von GlcN und GlcNac die Leistungsfähigkeit des verwendeten GPC-Systems auf. Einem stöchiometrischem Molekulargewicht von 216 g/mol (GlcN·HCl) und 223 g/mol (GlcNac) stehen errechnete durchschnittliche Molekulargewichte von 279 g/mol und 294 g/mol gegenüber. Diese Analyseleistung liegt unterhalb des von Wyatt angegebenen als noch sicher zu vermessendes Molekulargewicht von 1.000 g/mol. Die Molekulargewichte der Referenzproben liegen im hochmolekularem Bereich. Ausnahmen bilden FC2 für ein niedermolekulares Chitosan und DAL, welches ein Oligomer mit einem Polymerisationsgrad von 10-15 Monomeren darstellt. Oligo dagegen ist ein Gemisch von Di- bis Heptameren.

Alle Chitosanproben weisen einen relativ hohen Desacetylierungsgrad auf und entsprechen auf der Basis ihrer $^1\text{H-NMR}$ -Spektren den in Abb. 2-3 gezeigten Verläufen.

Pulverdiffraktometrische Untersuchungen ergaben, dass sowohl die hoch- als auch die niedermolekularen Chitosane teilkristallin sind. Setzt man die Interferenz-Peaks für Kristallinität in ein Verhältnis zur Basislinie und vergleicht diese Abbildung mit Röntgendiffraktogrammen rein kristalliner Substanzen, so erkennt man, dass die Ausbildung von geordneten molekularen Strukturen im Chitosan nur in kleineren Bereichen auftritt und ungeordnete Bereiche im Vordergrund stehen.

Da DAL keine Signale aufzeigt, die auf kristalline Bereiche schließen lassen, scheint die Teilkristallinität bei Chitosan eine Funktion des Molekulargewichtes zu sein. Es ist anzunehmen, dass bei einem hohen Polymerisationsgrad eines linearen Polymers sich eine kristalline Nahordnung über größere Bereiche ausbilden kann, während dies bei kleinerem Molekulargewicht weniger möglich ist. Dies wurde auch durch die Analyse von Oligo bestätigt, dessen Röntgendiffraktogramm keine kristallinen Interferenzen aufwies.

Der Hinweis auf Verwendung von Ethanol in der Herstellung von DAL im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 2-4) läßt vermuten, dass das Vorhandensein von Ethanol Einfluß auf die Anordnung von Chitosanmolekülen während des Trocknungsprozesses nimmt.

Aufschlüsse über die Herstellungsmethoden geben auch die mikroskopischen Aufnahmen der Oberflächen der Chitosane. Die Abbildung von FC zeigt, dass es sich hierbei um Folienbruchstücke von Chitosan handelt, welche entstehen, wenn Chitosan aus einer wässrigen Lösung gefällt, mit Wasser gewaschen und thermisch getrocknet wird.. Die regelmäßigen Lamellarstrukturen könnten geordnete, teilkristalline Bereiche darstellen, welche sich bei diesen langsamen

Trocknungsprozessen ausbilden. Es könnte angenommen werden, dass durch den Mahlprozess die Folien gestaucht werden und sich entlang dieser Bereiche übereinander schieben. Die REM-Aufnahme von PR1 weist ähnliche Charakteristika auf. Die schuppenartige Struktur kann auf derselben Grundlage wie diejenige von FC bewertet werden. Da es sich bei Chitosan um teilkristalline Produkte handelt, sind vollständige Übereinstimmungen der Konformation der regelmäßigen Strukturen jedoch nicht zu erwarten. Das Chitosan von Dalwoo (DAL) wurde über Sprühtrocknung hergestellt. Typisch für diese Trocknungsmethode ist hier die runde, hohle Partikelform mit einhergehender Volumenkontraktion und das Austrittsloch für das Lösungsmittel zu erkennen. Ähnliches ist auch für das mikrokristalline Chitosan (PRMK) festzustellen. Da Ethanol, wie auch bei DAL, zur Herstellung von mikrokristallinem Chitosan verwendet wird, könnte durch diese Trocknungsmethode ein alkalischer Fällungsschritt am Ende der Herstellung vermieden worden sein, indem hier durch die Lösungsmittelreduktion eine Freisetzung des Chitosans erfolgte. Die Abbildungen von TRI erlauben lediglich Vermutungen über die Ausbildung der senkrecht aufeinander stehenden Strukturen. Geht man von einem reinem Chitosan aus, so könnte es sich hierbei um Folienbruchstücke handeln, welche durch das Design der Produktionswerkzeuge diese Form annahmen. Anderenfalls könnten es, wie bereits erwähnt, Beimengungen von aufgebrochenem Pilzzellmaterial sein, welche durch die Produktion nicht vom hergestellten Chitosan getrennt worden sind.

Alle Chitosane wiesen noch organische und anorganische Fremd Beimengungen auf. Durch die polykationischen Eigenschaften bedingt, dürfte es grundsätzlich schwierig sein, dieses Naturprodukt hochrein zu isolieren. Die Krabbenchitosane hatten insgesamt einen relativ niedrigen Gehalt an anorganischen Restbestandteilen, welcher entweder durch eine nicht quantitative

Demineralisierung oder aber durch die verwendeten Produktionschemikalien hervorgerufen sein dürfte. Hervorzuheben ist der hohe Sulfataschegehalt der einzigen Chitosanprobe aus Pilzmaterial. Dieser anorganische Anteil im Chitosan von TRI muß durch den Produktionsprozess eingetragen worden sein, da eine Demineralisierung von Pilzbiomasse nicht durchgeführt werden muß. Sieht man in diesem Zusammenhang die REM-Aufnahmen, so könnte man von einer unsaubereren Verarbeitung dieser Testprobe ausgehen.

Der Proteingehalt aller Proben war insgesamt gering und lag auf einem vergleichbarem Niveau.

Die Analysendaten der zehn Referenzproben decken ein breites Spektrum von relevanten Charakteristika von Chitosan ab. Weitere, hier nicht aufgeführte, Chitosane lagen innerhalb der durch diese Proben gegebenen Meßdaten, so dass auf dieser Grundlage das in dieser Arbeit herzustellende Chitosan bewertet werden kann.

3 UNTERSUCHUNG VON MUCORALES-ARTEN ZUR PRODUKTION VON CHITOSAN

3.1 Eingesetzte Mikroorganismen

Zur Optimierung der Chitosanproduktion aus Pilzen hinsichtlich Ausbeute und Molekulargewicht wurden folgende Arten von Mucorales untersucht:

<i>Mucor rouxii</i>	DSM 1191
<i>Absidia coerulea</i>	DSM 1143, DSM 3018
<i>Absidia pseudocyclindrospora</i>	DSM 2254
<i>Absidia glauca</i>	DSM 63295

(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen , Braunschweig)

Lebendstammkulturen wurden durch Überimpfen von Sporen auf Malzextrakt in Agarröhrchen hergestellt. Diese wurden erst bei 30 °C für 2 Tage inkubiert und danach bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. In diesem Temperaturbereich wachsen die Pilze mit verminderter Geschwindigkeit weiter, so dass eine geringere Zahl von Generationenwechseln erreicht wird. Monatlich wurden die Kulturen in neue Agarröhrchen transferiert. Zum Animpfen von Wachstumsversuchen wurde diesen Stammkulturen mit einer Impföse Sporen entnommen und in Flüssigmedium der Vorkultur gegeben.

3.2 Kultivierungsmedium

In Vorversuchen wurde ein Versuchsaufbau für das Wachstum der Pilze im Labormaßstab im Schüttelkolben und die Komposition des Nährmediums bestimmt, welche ein Maximum an Ausbeute von Biomasse ermöglicht.

Versuche mit Pilzmaterial in diesem und den folgenden Kapiteln zur Chitosanproduktion und Methodenevaluierung wurden im Doppelansatz durchgeführt. Vorliegend sind die Mittelwerte der Ergebnisse dieser Ansätze dargestellt. Aufgrund der natürlichen Streuung von biologischen Materialien wurden Standardabweichungen nicht mit angegeben, da darüber keine hinreichenden Aussagen getroffen werden können.

Die Sporen wurden in eine 200 ml Vorkultur des für die jeweilige Art definierten Nährmediums (Anhang 7.5) geimpft und für 48 h auf einem Schüttler bei 130 U/min ausgekeimt. Danach wurden jeweils 20 ml dieser Vorkultur in einen Liter frisches Nährmedium überimpft und diese Kultur wuchs dann in einem bestimmten Zeitraum, welcher durch die jeweilige Versuchsvorschrift definiert war. Die Erlenmeyerkolben besaßen eingearbeitete Schikanen, um eine turbulente Bewegung des Nährmediums und einer damit einhergehenden Belüftung während des Wachstumsversuches zu gewährleisten. Membranpumpen mit nachgeschalteten Sterilfiltern (0,2 µm) beförderten atmosphärische Luft in die Kolben, um aerobe Wachstumsbedingungen zu erzeugen. Der Schüttler wurde für die Literkultur so eingestellt, dass die resultierende Drehbewegung des Nährmediums mit der Umdrehungszahl des Schüttlers interferierte. Dadurch entstanden zyklische Schlagbewegungen des Flüssigmediums im Kolben, welche das wachsende Pilzmycel durch Scherkräfte verteilte und so die Bildung von Mycelagglomeraten verminderte.

3.3 Wachstumsversuche

Basierend auf den Untersuchungen von White, Farina, Fulton et al. 1979; McGahren, Perkinson et al. 1984; Kobayashi, Takiguchi et al. 1988; Shimahara, Takiguchi et al. 1989 und Miyoshi, Shimura et al. 1992 wurde *Absidia coerulea* als Hauptuntersuchungsstamm ausgewählt. Diese Art zeichnet sich im Vergleich

zu anderen Mucoraceen durch eine hohe Biomasseausbeute und gleichzeitig durch einem hohen Chitosangehalt in der Trockenmasse aus.

Um die optimale Dauer der Wachstumsversuche mit einer hohen Ausbeute an Biomasse unter den gegebenen Laborbedingungen zu ermitteln, wurde ein gestaffelter Langzeitwachstumsversuch über 144 h durchgeführt und die resultierende Wachstumskurve der Entwicklung der Biomasse aufgezeichnet. Zu diesem Zweck wurden mehrere Erlenmeyerkolben unter gleichen Bedingungen mit einer Kultur von *A. coerulea* zeitgleich angesetzt. Abgeerntet und nach 3.1.4 aufbereitet wurden die Ansätze nach Wachstumszeiten von jeweils 24, 36, 48 h und danach in weiteren 24 h-Intervallen bis zu einer Gesamtwachstumszeit von 144 h.

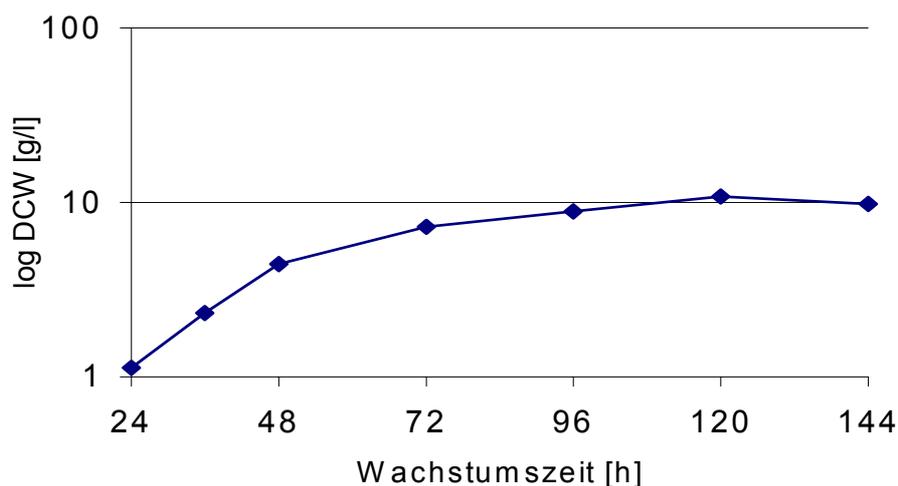


Abb. 3-1 Wachstumskurve von *A. coerulea* über 144h

Die Wachstumskurve von *A.coerulea* über 144 h zeigt einen exponentiellen Verlauf und läßt sich in mehrere Phasen unterteilen. Die Anlaufphase (lag-Phase) ist nicht aufgezeichnet und ist daher innerhalb der ersten 24 h abgeschlossen. Von 24 h bis ca. 120 h befindet sich das Wachstum in der exponentiellen (log)-Phase und nähert sich danach in der stationären Phase asymptotisch einem Gewicht der Biotrockenmasse (DCW) von 10 g/l. Eine Absterbephase ist darüber hinaus nicht mehr erfaßt worden.

Die Entwicklung des pH-Wertes des Kulturmediums als ein Wachstumsparameter weist einen sigmoiden Verlauf auf. Ausgehend von einem Start-pH von 4,5 erfolgt, der Tendenz der Wachstumskurve folgend, eine Ansäuerung des Mediums bis zu einem pH-Wert von 2,8 - 3.

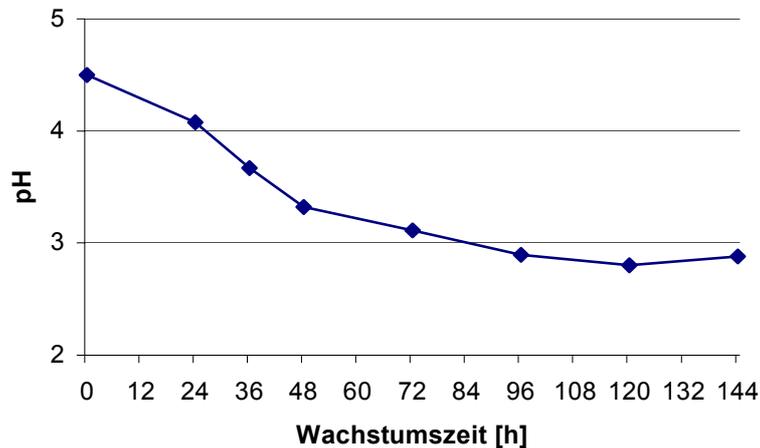


Abb. 3-2 charakteristischer Verlauf des pH-Wertes während eines Wachstumversuches

Basierend auf den Resultaten dieses Versuches sollte als Standardwachstumszeit für vergleichende Untersuchungen zwischen verschiedenen Arten und zwischen Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ein Zeitpunkt in der späten exponentiellen Phase der Wachstumskurve definiert werden. In dieser Wachstumsphase weist die zu untersuchende Kultur eine konstante minimale Generationszeit auf. Zur Ermittlung dieser Wachstumszeit mit der höchsten Vermehrungsrate in der log-Phase wurde die Änderung des DCW pro Stunde innerhalb der Probenintervalle nach folgender Formel ermittelt:

$$\Delta\text{DCW} = (\text{DCW}_x - \text{DCW}_y) / (t_x - t_y) \quad [\text{g/h}]$$

DCW_x : Trockenzellgewicht nach Wachstumszeiten von x Stunden
(x=24, 36, 48, 72, 120, 144)

DCW_y : Trockenzellgewicht nach Wachstumszeiten von y Stunden
(y=0, 24, 36, 48, 72, 120)

t_x : Probenintervall von x Stunden (x=24, 36, 48, 72, 120, 144)

t_y : darauffolgendes Probenintervall von y Stunden
(y=24, 36, 48, 72, 120, 144)

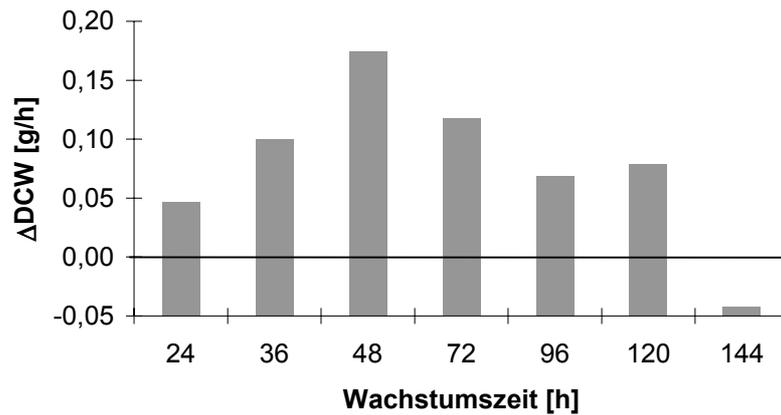


Abb. 3-3 Zu- bzw. Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit im Versuch über 144h

In den ersten 48 h nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit der Biomasse von *A. coerulea* beständig zu und erreicht bei 48 h mit einer Zuwachsrate von 0,17 g/h das Maximum. Danach ist die Vermehrungsrate rückläufig und weist im Probenzeitraum von 144 h auch negative Werte auf. Vergleichende Untersuchungen wurden auf dieser Grundlage mit einer Wachstumszeit von 48 h durchgeführt.

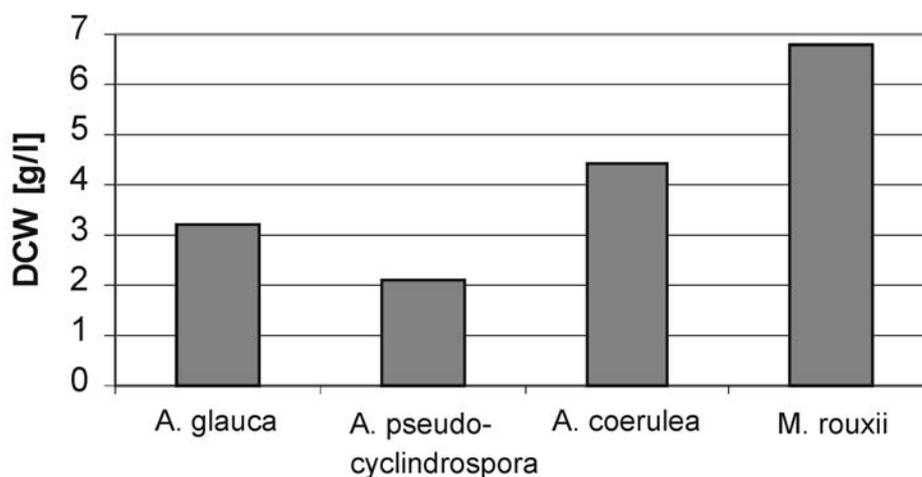


Abb. 3-4 Vergleich der Biomassenausbeute von Mucoralesarten nach einer Wachstumszeit von 48h

Von den vier zu untersuchenden Arten erreicht *M. rouxii* den größten Biomassezuwachs innerhalb von 48 h. Es wurden durchschnittlich 6,8 g/l DCW

produziert, während *A. coerulea* unter den gegebenen Bedingungen eine Ausbeute von 4,4 g/l an Biotrockenmasse ermöglichte. *A. glauca* und *A. pseudocyclindrospora* produzierten 3,2 g/l bzw. 2,1 g/l im gegebenen Versuchszeitraum.

3.4 Aufbereitung des Zellmaterials

Das Mycel wurde filtriert und in bidest. Wasser gewaschen. Danach wurde das Material mit einem Ultraturrax bei 20.000 U/min zerkleinert. Dadurch wurden die Zellen aufgebrochen und die cytosolisch löslichen Bestandteile vom Zellwandmaterial getrennt. Die breiige Masse wurde danach erneut filtriert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und das verbleibende Zellwandmaterial bei 50°C über 12 h im Trockenschrank getrocknet. Die so produzierte Biotrockenmasse (DCM) wurde gewogen und das ermittelte Gewicht durch das Volumen des Kulturmediums dividiert, um das Trockenzellgewicht pro Liter Medium (DCW [g/l]) zu bestimmen.

3.5 Präparation von Chitosan

Nach Schema 1-2 wurde nun Chitosan aus dem getrockneten Pilzmaterial gewonnen. Vor der Weiterverarbeitung wurde das Material in einer Schlagmühle zerkleinert. Jeweils ca. 2 g DCM wurde eingewogen und mit 2 % (m/V) NaOH im Verhältnis von 10 ml/g Biomasse zur Deproteinierung versetzt. Dieser Ansatz wurde über Nacht inkubiert, abzentrifugiert und das Pellet vom alkalischen Überstand getrennt. Anschließend wurde das deproteinierte Material in Wasser (Aq. bidest.) resuspendiert und durch Zentrifugieren (11.000 rpm) vom Waschmedium getrennt. Dieser Vorgang wurde bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes wiederholt. Das alkaliunlösliche Pellet (AIM) wurde danach bei 50 °C getrocknet.

Zum Abtrennen des Chitosans wurde das AIM in 2 % (V/V) Essigsäure resuspendiert, über Nacht geschüttelt und danach durch Zentrifugieren von dem sauren Überstand wieder getrennt. Durch Alkalisieren der Chitosanlösung wurde das Chitosan deprotoniert und ausgefällt. Mittels Zentrifugation wurde das Chitosan pelletiert und danach mehrfach mit Wasser (Aq. bidest.) bis zum Erreichen von pH 7 gewaschen. Das Chitosan wurde anschließend nach den in Kapitel 2 beschriebenen Methoden analysiert.

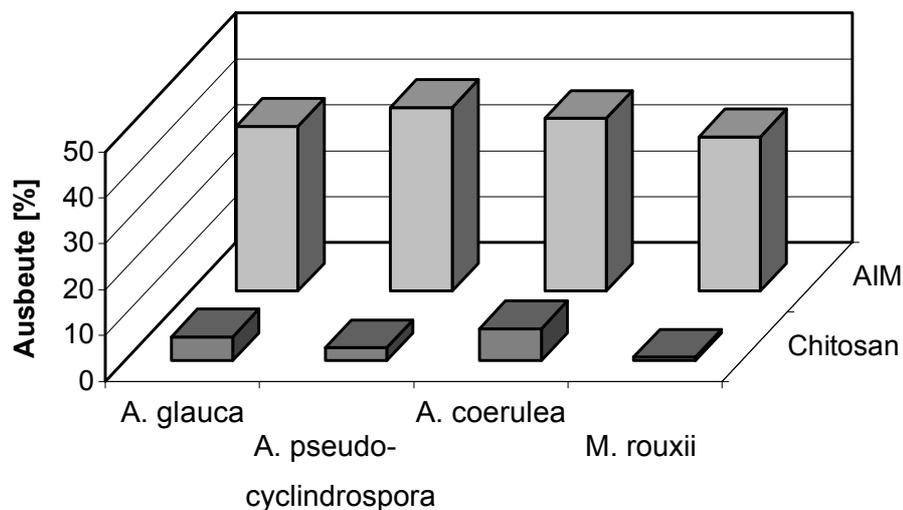


Abb. 3-5 Ausbeute von AIM und Chitosan (nach Schema 1-2 präpariert)

[Angabe in % (m/m) von der Einwaage]

A. pseudocyclindrospora hat mit 40,0 % den höchsten Anteil von alkaliunlöslichem Material im Zellwandmaterial. *M. rouxii* erreicht in dieser Untersuchung mit 33,7 % den niedrigsten Wert. Der Vergleich des absoluten Chitosangehaltes in der Trockenmasse ergibt mit 6,9 % den höchsten Anteil bei *A. coerulea*. Wiederum wurde bei *M. rouxii* der niedrigste Gehalt mit 0,8 % bestimmt.

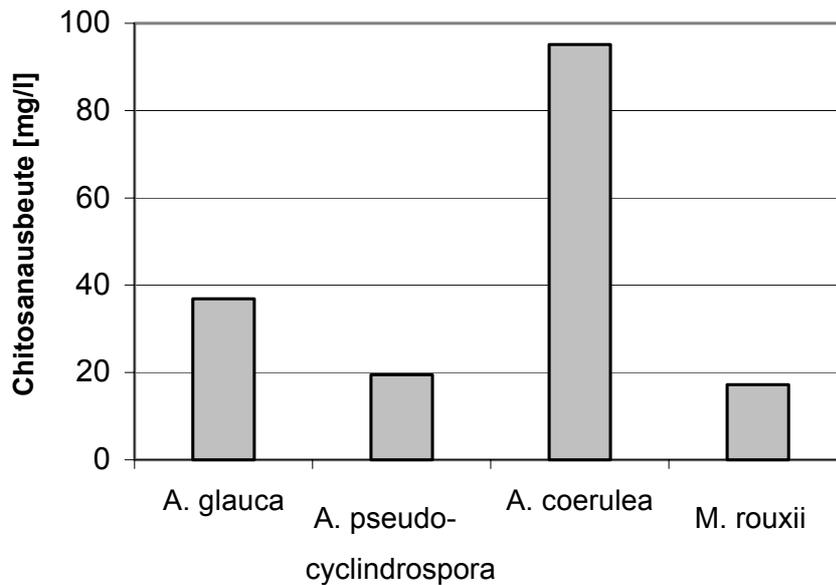


Abb. 3-6 Chitosanausbeute pro Liter Kulturmedium (präpariert nach Schema 1-2)

Um eine *Mucorales*-Art zu bestimmen, welche die größte Gesamtchitosanausbeute ermöglicht, muß der absolute Chitosangehalt im Trockenmycel mit der jeweils spezifisch bestimmten Biomasseausbeute pro Liter Kulturmedium in Relation gesetzt (Abb.3-6) werden. *A. coerulea* ermöglicht so eine Chitosanausbeute von 95 mg/l Kulturmedium. Im Vergleich produzieren jeweils *A. glauca* 36,9 mg/l, *A. pseudocyclindrospora* 19,5 mg/l und *M. rouxii* 17,2 mg/l.

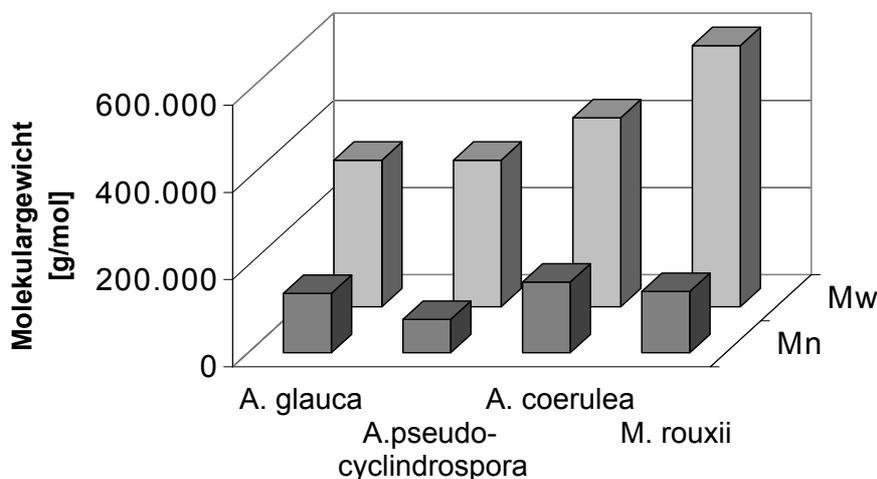


Abb. 3-7 Molekulargewicht von Chitosanen aus verschiedenen Pilzarten

Von den vier untersuchten Arten produzierte *M. rouxii* Chitosan mit dem höchsten Polymerisationsgrad und einem durchschnittlichen Molekulargewicht von $6,14 \times 10^5$ g/mol. Bezogen auf ein M_n von $1,41 \times 10^5$ g/mol ergibt sich daraus ein Polydispersitätsgrad von 4,35. Das ermittelte M_w (M_n) des Chitosans der anderen Proben ergab $3,37 \times 10^5$ g/mol ($1,37 \times 10^5$ g/mol) für *A. glauca*, $3,37 \times 10^5$ g/mol ($7,73 \times 10^4$ g/mol) für *A. pseudocyclindrospora* und $4,34 \times 10^5$ g/mol ($1,63 \times 10^5$ g/mol) für *A. coerulea*. Die daraus errechneten Polydispersitätsgrade betragen 2,46 (*A. glauca*), 4,35 (*A. pseudocyclindrospora*) und 2,66 (*A. coerulea*).

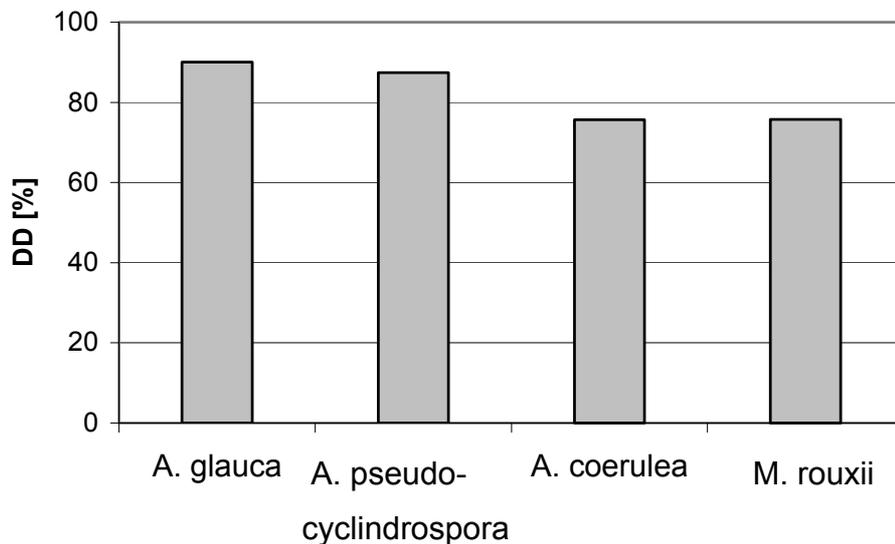


Abb. 3-8 Desacetylierungsgrad von Chitosanen aus verschiedenen Pilzarten

Die präparierten Chitosane weisen hohe Desacetylierungsgrade auf. *A. glauca* produziert Chitosan mit einem Desacetylierungsgrad (DD) von 90,1 %. Den niedrigsten DD weist Chitosan von *A. coerulea* mit 75,7 % auf, gefolgt von *M. rouxii* mit einem DD von 75,8 %. *A. pseudocyclindrospora* besitzt einen GlcN-Anteil im Chitosanmolekül von 87,4 %.

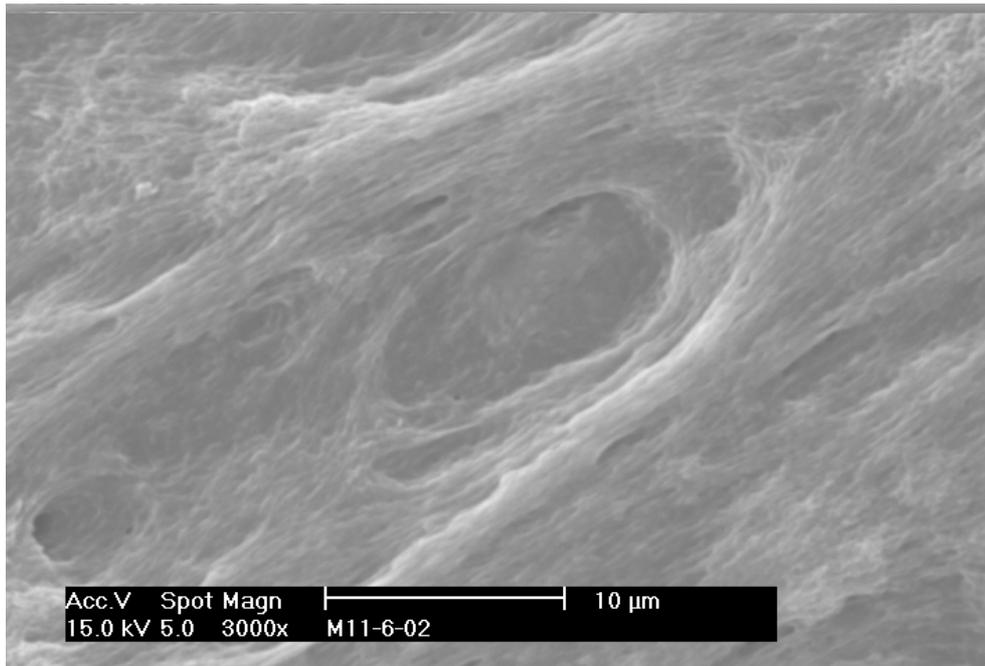


Abb. 3-9 REM-Aufnahme von nach Schema 1-2 präpariertem Chitosan

Die nach Schema 1-2 hergestellten Chitosane ergeben typische REM-Aufnahmen ohne Partikelstruktur. Die Proben zeigen folienartige Bruchstücke, welche im mikroskopischen Maßstab eine fibrilläre Organisation aufweisen. In Abb. 3-9 ist eine lineare Hauptausrichtung dieser Strukturen von links unten nach rechts oben gegeben.

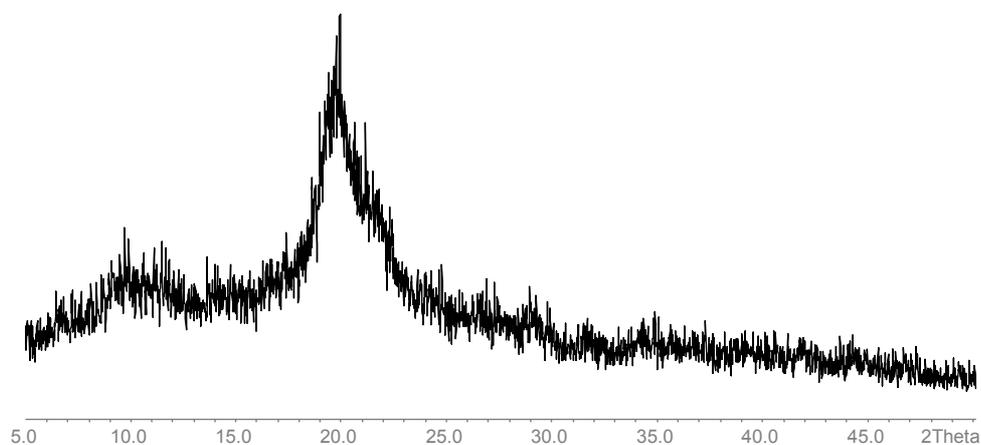


Abb. 3-10 Röntgendiffraktogramm von nach Schema 1-2 präpariertem Chitosan

Das Röntgendiffraktogramm in Abb. 3-10 weist eine schwache Teilkristallinität mit Peaks bei $2\theta = 9^\circ$ und 20° , die einem starken Halosignal aufgesetzt sind.

Das DCM des Langzeitversuches wurde aufpräpariert, um über die Altersstruktur eventuelle Änderungen im Molekulargewicht zu detektieren, welche für die Herstellung niedermolekularen Chitosans zu nutzen wären.

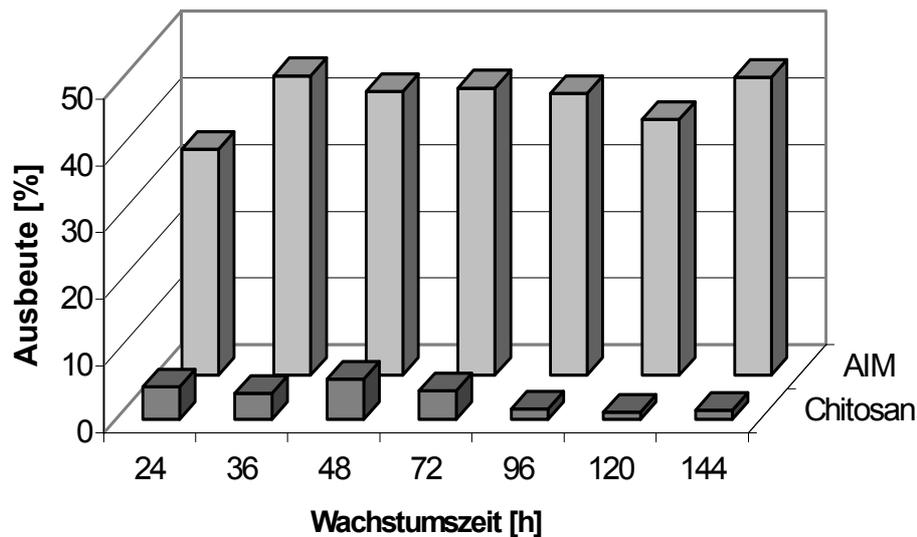


Abb. 3-11 Ausbeute von AIM und Chitosan (nach Schema 1-2 präpariert)

[Angabe in % (m/m) von der Einwaage]

Die Ausbeute an alkaliunlöslichem Material ist am niedrigsten nach einer Wachstumszeit von 24 h mit 34 % relativ zur Einwaage. In den darauffolgenden Teilversuchen liegt die Ausbeute zwischen 38 % und 45 %. Die Ermittlung des Chitosangehaltes ergab eine relativ hohe Ausbeute in den Wachstumsversuchen von 24 h mit 4,9 % bis 72 h mit 4,3 %. Ein Maximalwert wurde für den 48h-Versuch mit 6,1 % erreicht. Die darauf folgenden Versuche erreichten Chitosangehalte von 1,1 % (120 h) bis 1,6 % (96 h).

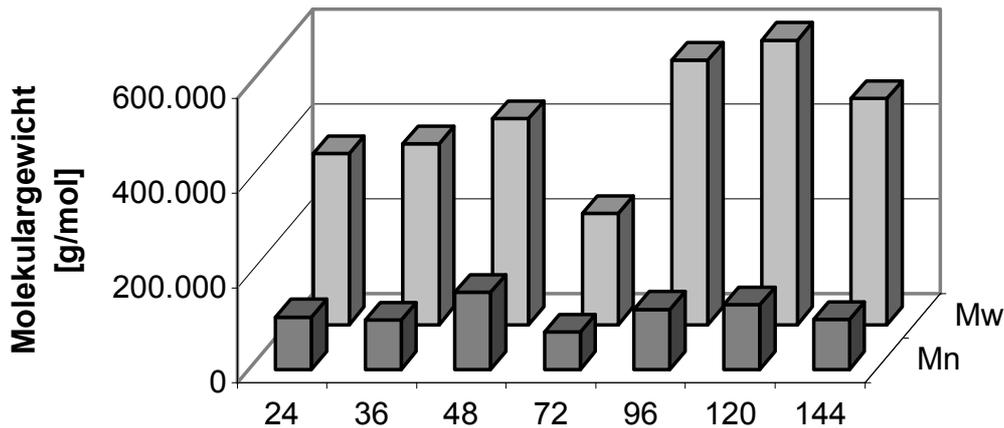


Abb. 3-12 Molekulargewicht des Chitosans der Altersfraktionen

Von 24 h bis 48 h ist eine Zunahme sowohl des Mw wie auch des Mn zu verzeichnen. Ausgehend von $3,61 \times 10^5$ g/mol (Mn: $1,10 \times 10^5$ g/mol) nach 24 h Wachstum, hat das produzierte Chitosan nach 48 h ein Mw von $4,34 \times 10^5$ g/mol (Mn: $1,63 \times 10^5$ g/mol). Der Polydispersitätsgrad liegt zwischen 2,66 und 3,67. Unterbrochen wird diese Tendenz beim 72 h-Versuch. Hier wurde ein Mw von $2,35 \times 10^5$ g/mol und ein Mn von $7,86 \times 10^4$ g/mol ermittelt. Die Fraktionen von 96 h bis 144 h sind wiederum hochmolekular und setzen die Entwicklung der ersten drei Wachstumsversuche fort. Als Maximalwert wurde nach 120 h ein Mw von $6,05 \times 10^5$ g/mol erreicht. Für 96 h konnten ein Mw von $5,58 \times 10^5$ g/mol und für 144 h $4,77 \times 10^5$ g/mol errechnet werden. Dagegen ist das Mn der letzten drei Teilversuche auf dem Niveau der jungen Kulturen und reicht von $1,36 \times 10^5$ g/mol (120 h) bis $1,05 \times 10^5$ g/mol (144 h). Daraus resultiert ein erhöhter Polydispersitätsgrad von 4,39 bis 4,54 für die Alterskulturen.

3.6 Diskussion

Die Wachstumskurven weisen in der Entwicklung der Biomasse und des pH-Wertes einen typischen Verlauf für diskontinuierliche Batch-Kulturen auf, welche durch ein geschlossenes und in Bezug auf Nährstoffe und pH-Wert nicht nachregelbares System charakterisiert sind. In den Literaturquellen sind nur

wenige Aussagen über die Ausbeute an Biomasse zu verzeichnen. Für *M. rouxii* ist ein Wert von 9-14 g/l für eine Batch-Kultur im Maßstab von 11 Litern angegeben (White, Farina et al. 1979) und mit *A. coerulea* wurden 14-19 g/l in einer 10 Literkultur erreicht (McGahren, Perkinson et al. 1984). Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der beschriebenen und der hier durchgeführten Versuche lassen sich über die Ausbeuten nur bedingt vergleichende Aussagen treffen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist neben den klassischen Wachstumsparametern wie Zusammensetzung des Kulturmediums, pH-Wert, Wachstumszeit und Temperatur auch die Turbulenz während der Wachstumsphase von entscheidender Bedeutung für die Biomasseproduktion. *Mucorales* als filamentbildende Organismen tendieren in der Kultur zur Pelletbildung durch Aufwicklung der Mycele. Die Größe der Pellets hat einen großen Einfluß auf das Wachstum der Mycele, da es für im Innenraum befindliche Zellen zu Mangelsituationen bezüglich der Nährstoff- und der Sauerstoffversorgung kommen kann. Je größer das Volumen der Mycelaggregate, desto mehr aktive Biomasse in der Kultur ist von dieser Situation betroffen (Posten and Cooney 2000). In den hier durchgeführten Wachstumsversuchen im 1 Litermaßstab wurde durch entsprechende Einstellung des Schüttlers versucht, durch interferierende Drehbewegungen des Mediums und des Schüttlers eine ungleichmäßige Drehbewegung des Kulturansatzes zu erzeugen, welche eine Zerschlagung der Mycelaggregate bewirken sollte. Eine exakte Angabe der Drehbewegung ist nicht möglich, da diese Interferenz von der Gesamtbeladung des Schüttlers abhängig ist. In der Literatur wird in der Beschreibung des Wachstums der *Mucorales* die Bildung von Pellets in Reiskorngröße erwähnt. In diesen Versuchen konnte eine Aggregation größtenteils vermieden werden. Bildeten sich dennoch Pellets, so erreichten sie teilweise einen Durchmesser von 5 mm. Interessanterweise konnte in

Wachstumsversuchen mit bis zu sechs zeitgleich angesetzten und rotierenden Erlenmeyerkolben die Größe der Pelletbildung sehr unterschiedlich ausfallen.

Im Gegensatz zu der hier verwendeten Methode der Aufbereitung der produzierten Biomasse (Kap. 3.4), wurde in den Literaturangaben das Mycel lediglich gewaschen und sofort getrocknet, um das Trockenzellgewicht zu bestimmen. Mit der Methode des Zellaufbruchs zur Entfernung cytosolischer löslicher Bestandteile ist auch ein Verlust an Zellwand-Biomasse verbunden, welcher nach dem Trocknen des Materials eine geringere Ausbeute als nach den Literaturangaben bedingt. Eine Zusammenfassung über die Ausbeute an AIM und Chitosan (auf einen Kulturansatz von einem Liter verrechnet) der Literaturquellen geben folgende Tabellen:

Art	AIM [mg/l]	Chitosan [mg/l]	Ratio Chitosan/AIM [%]
<i>A. coerulea</i>	1375	720	52
<i>A. glauca</i>	1435 – 2150	530-1220	37-57
<i>A. pseudocyclindrospora</i>	1395	835	60

Tab. 3-1 Angaben aus Kobayashi, Takiguchi et al. 1988

Kobayashi, Takiguchi et al. gaben die Ausbeuten im Verhältnis zum Volumen des Kulturmediums an. Im Vergleich von Abb. 3-6 zu Tab. 3-1 zeigt sich eine große Diskrepanz für diese Werte der Ausbeuten. Vergleicht man zusätzlich das relative Verhältnis von Chitosan und AIM mit den Werten dieser Arbeit, so ergibt sich auch hier eine Differenz. *A. coerulea* erreicht 18 %, *A. glauca* 14 % und *A. pseudocyclindrospora* 7 % Chitosanausbeute aus dem AIM. Demgegenüber weisen andere Quellen Chitosangehalte in den einzelnen Pilzarten aus, welche mit den hier erzielten Werten korrelieren (Tab. 3-2).

Art	Chitosangehalt [% vom DCW]	Zitat
<i>M. rouxii</i>	1,2	(Miyoshi, Shimura et al. 1992)
<i>A. coerulea</i>	10,4	(Miyoshi, Shimura et al. 1992)
<i>A. coerulea</i>	11,5-16	(McGahren, Perkinson et al. 1984)

Tab. 3-2

Dieser Widerspruch kann durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen auf der Basis des Kultivierungsvolumens wie auch durch unterschiedliche Präparationsbedingungen zur Gewinnung des Chitosans bedingt sein. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Arbeit von Kobayashi, Takiguchi et al. weist eine Extraktion bei 115°C aus. Die in Tabelle 3-2 aufgeführten Resultate wurden bei 95°C (Miyoshi, Shimura et al. 1992) bzw. bei Raumtemperatur (McGahren, Perkinson et al. 1984) erzielt, so dass hier eine bessere Vergleichbarkeit gegeben und gezeigt worden ist.

Absolutangaben für das Molekulargewicht in der Literatur machen keine Unterscheidung zwischen einem massenmittleren und einem zahlenmittleren Molekulargewicht. Allgemein wurde das Molekulargewicht angegeben mit $1,2 \times 10^5$ g/mol (Kobayashi, Takiguchi et al. 1988), für *A. coerulea* mit $4,5 \times 10^5$ g/mol und für *M. rouxii* $1,6 \times 10^5$ g/mol (Miyoshi, Shimura et al. 1992). Kuhlmann, Czupala et al. (2000) ermittelten für *A. coerulea* ein Molekulargewicht von 7×10^5 g/mol. Vergleicht man diese Angaben miteinander, zeigen sich für die absoluten Werte widersprüchliche Aussagen. Jedoch sind alle hergestellten Chitosane der Literaturquellen hochmolekular, was auch durch die Ergebnisse in diesem Kapitel bestätigt wird. Der Molekulargewichtsbereich der hier produzierten Chitosane deckt sich mit den

Literaturangaben, artspezifische Übereinstimmungen lassen sich jedoch nicht feststellen.

Wie auch bei den Angaben für die Ausbeute an AIM und Chitosan können neben den unterschiedlichen Kultivierungsmethoden auch Unterschiede im Präparationsverfahren diese voneinander abweichenden Ergebnisse bedingen. Nach Rege und Block (1999) hat gerade auch die Temperatur als Prozeßparameter einen entscheidenden Einfluß auf Ausbeute, Desacetylierungsgrad und Molekulargewicht des Chitosans. Vertiefende Untersuchungen hierzu wurden auch von McGahren, Perkinson et al. (1984) und White, Farina et al. (1979) durchgeführt und ergaben als Resultat große Varianzen in Ausbeute und Molekulargewicht des produzierten Chitosans durch Verwendung verschiedener Säuren und Säurestärken zur Extraktion, dem Einsatz unterschiedlicher Temperaturen und Zeitenlängen der Extraktion.

REM-Aufnahme 3-9 weist in der Struktur Ähnlichkeiten hinsichtlich der fibrillären Struktur mit Abb. 2-6 und 2-7 auf. Bewertet man in diesem Zusammenhang auch die zugehörige Röntgendiffraktogramme und die hohen Molekulargewichte, so weisen diese Chitosane starke Übereinstimmungen auf, obwohl die Vergleichsproben aus Krabbenschalen und das Chitosan hier aus der Pilztrockenmasse hergestellt wurden. Die gemeinsame Grundlage dieser Chitosane ist das Herstellungsprotokoll, so daß man somit annehmen kann, daß die Herstellungsmethode großen Einfluß auf die beschriebenen Charakteristika von Chitosan unabhängig vom Rohmaterial hat.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse sollte daher nachfolgend untersucht werden, in welchem Ausmaß die Präparationsparameter so gestaltet werden können, dass es möglich ist, niedermolekulares Chitosan direkt aus der Biomasse zu gewinnen.

4 UNTERSUCHUNGEN ZUR DIREKTEN PRÄPARATION VON NIEDERMOLEKULAREM CHITOSAN

4.1 Löslichkeit von Chitosan in wässrigem Medium

Prinzipiell stellt sich die Frage, inwieweit bereits gegebene Herstellungs- und Präparationsabläufe auf die vorliegende Aufgabe übertragen werden können. Da die direkte Chitosangewinnung aus Pilzen bisher nicht auf eine bestimmte Qualität hinsichtlich des Molekulargewichtes fokussiert war, wurden in den Literaturquellen lediglich die Methoden der Chitosanproduktion aus Krabbenschalen für die Präparation aus Pilzmaterial übernommen.

Ein wesentlicher Bestandteil des Herstellungsprozesses von Chitosan sind Waschvorgänge, welche jedem einzelnen Herstellungsabschnitt folgen. Industriell wird hierzu Wasser verwendet, um die verwendeten Säuren und Basen und die in ihnen gelösten unerwünschten Bestandteile (Restprotein, Mineralien) zu entfernen und einen neutralen pH-Wert einzustellen. Es ist jedoch bekannt, dass mit abnehmendem Molekulargewicht eines Polysaccharides eine zunehmende Löslichkeit in Wasser einhergeht. Da kurzkettiges Chitosan präpariert werden soll, stellte sich somit die Frage, inwieweit im Biomaterial eventuell vorhandenes niedermolekulares Chitosan durch Waschvorgänge mit Wasser in Lösung gebracht und aus dem Gesamtansatz entfernt wird. Wässrige Überstände werden im Präparationsprozeß von Chitosan aus Pilzen jedoch nicht nur beim Waschen verworfen, sondern auch beim Deproteinierungsschritt mit Natriumhydroxid. Sollte eine Löslichkeit von niedermolekularem Chitosan über pH 7 hinaus gegeben sein, so könnte auch beim alkalischen Deproteinieren dieses Chitosan in Lösung gehen und mit dem Überstand entfernt werden.

4.1.1 Löslichkeit bei alkalischem pH-Wert

Es wurden hochmolekulares (FC) und niedermolekulares Chitosan (DAL) im Gewichtsverhältnis von 1:2 gemischt. Das langkettige Chitosan dient als Relativreferenz zu den zu untersuchenden Konzentrationsänderungen im niedermolekularem Bereich. Mit 2 % (V/V) Essigsäure wurde aus dem Chitosangemisch eine 2 % (m/V) Lösung hergestellt. Je 20 ml dieser Lösung wurden mit NaOH (5 M) auf pH 11 alkalisiert und zusätzlich Ethanol zu folgenden Endkonzentrationen dazugegeben.

Probennummer	Chitosangemisch : Ethanolanteil
1	1:0
2	1:2
3	1:4
4	1:8

Das resultierende Präzipitāt wurde zentrifugiert und der Überstand mit den löslichen Bestandteilen verworfen. Das Pellet wurde in Ethanol resuspendiert, gewaschen und wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Nach dem Waschen wurde das gefällte Chitosan bei 50 °C getrocknet. Die Ausbeute und das Molekulargewicht wurden ermittelt.

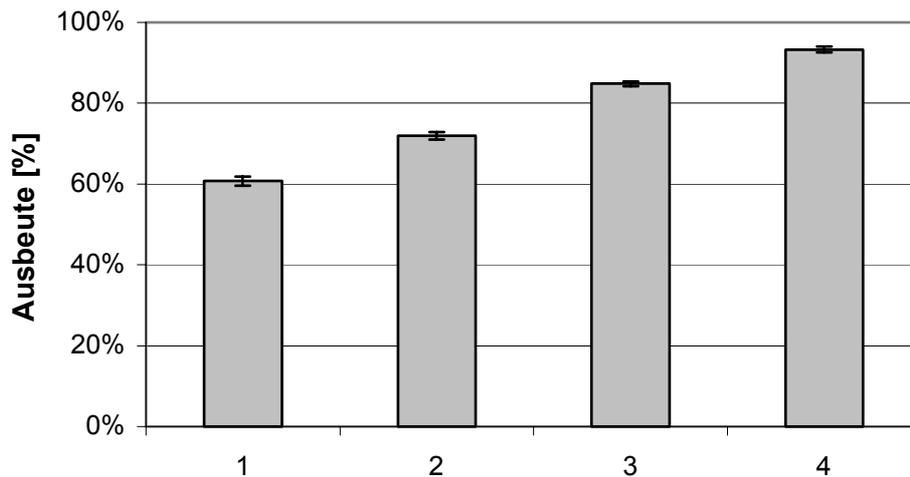


Abb. 4-1 Chitosanausbeute (Einwaage = 100%)

1) Präzipitat [1:0] 2) Präzipitat [1:2], 3) Präzipitat [Ethanol 1:4], 4) Präzipitat [Ethanol 1:8]

Mit zunehmenden Ethanolanteil erhöhte sich die Ausbeute aus dieser Präparation. Die Verwendung von Wasser als Waschsubstanz ergab einen Minimalwert von 61 % an nicht im neutralen bis alkalischen pH-Milieu löslichen Chitosan in dieser Mischung. Trägt man die prozentuale Ausbeute an nicht gelöstem Chitosan gegen die Anteile von Ethanol in der Gesamtlösung auf, so erhält man folgendes Diagramm.

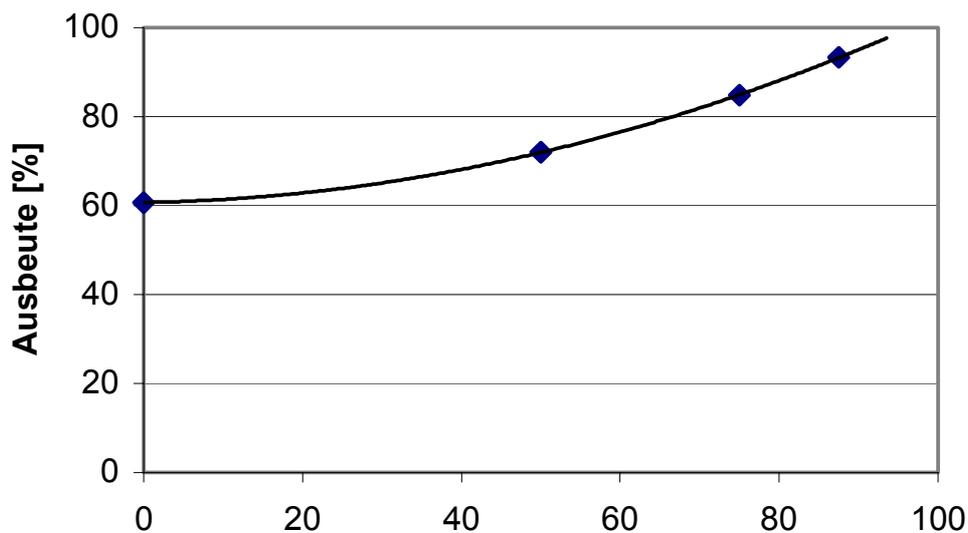


Abb. 4-2 Chitosanausbeute vs Ethanolanteil [%]

Durch Extrapolation der Trendlinie ($R^2=0,9999$) errechnet sich der Ethanolanteil, der für diese Chitosanmischung verwendet werden sollte, um 100 % des gelösten Materials wieder auszufällen. In diesem Fall läge der Wert bei 0,95, entsprechend einem Verhältnis von Chitosanlösung zu Ethanol von 1:20.

Die Messungen mit dem RI-Detektor ergaben folgende interne Konzentrationsverteilungen der einzelnen Präzipitate.

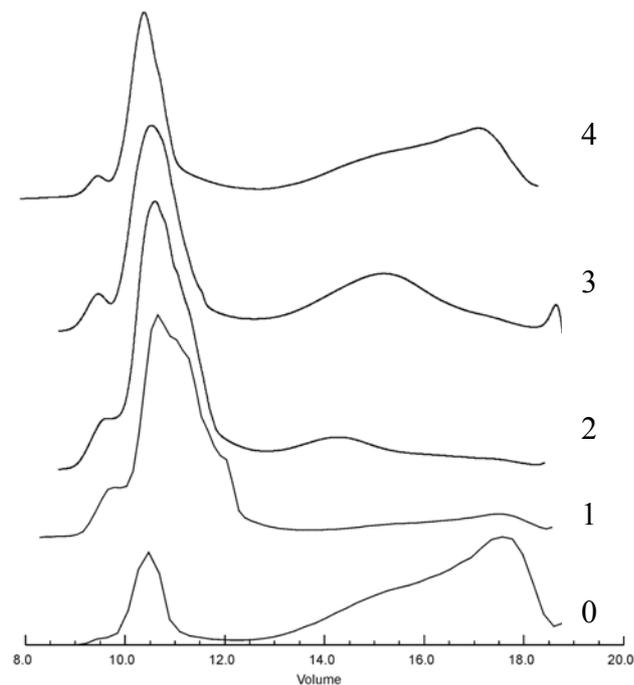


Abb. 4-3 Konzentrationsverteilung innerhalb des Chitosangemisches und der Präzipitate

0) Gemisch, 1) Präzipitat [1:0] 2) Präzipitat [1:2], 3) Präzipitat [Ethanol 1:4], 4) Präzipitat [Ethanol 1:8]

Im verwendeten Säulensystem eluieren zuerst die hochmolekularen Bestandteile der Probe. Im 1. Kurvenverlauf wurde das Chitosangemisch, ohne es einer vorherigen präparativen Behandlung zu unterziehen, aufgetrennt. Der linke Peak mit einem Konzentrationsmaximum bei einem Elutionsvolumen von 10,5 ml repräsentiert den Chitosananteil vom FC im Gemisch und der rechte Peak mit

einem Maximum bei 17,5 ml den von DAL. Das Maximum von DAL im Ursprungsgemisch überwiegt leicht gegenüber dem von FC. Nach einer alkalischen Fällung ohne Ethanolzugabe erhält man im Präzipitat hauptsächlich hochmolekulare Anteile (Abb. 4-3/2). Verglichen mit Kurve 1 ist die Konzentrationsverteilung der beiden Chitosanfraktionen weit zugunsten von FC verschoben. Ein geringer Anteil von DAL ist bei 17,5 ml noch zu erkennen. Kurve 3 des Präzipitates mit einem Ethanolanteil von 50 % zeigt wieder deutlich den FC-Peak, jedoch ist bei einem Elutionsvolumen von 14,5 ml eine Konzentrationserhöhung gegenüber den Kurven 1 und 2 festzustellen. Kurve 4 (Ethanolanteil 75 %) folgt dieser Tendenz, die Konzentrationserhöhung verschiebt sich auf 15,5 ml zu niederen Molekulargewichten. Der Kurvenverlauf von 5 folgt nahezu dem von Kurve 1, die Konzentrationserhöhung im niedermolekularen Bereich hat sich auf 17,5 ml verschoben. Lediglich die Verhältnisse der Konzentrationsmaxima entsprechen nicht denen im Ausgangsgemisch, hier beträgt das Verhältnis 3:1 zugunsten von FC. Ausgehend vom Ursprungsgemisch weisen alle Kurven von 2-5 für die Peaks der hochmolekularen Bestandteile eine Verschiebung des Konzentrationsmaximums von 10,5 ml nach 11 ml auf. Zusätzlich ist eine Schulterbildung auf der rechten Peakseite (besonders deutlich bei Kurve 2 und 3) zu erkennen. Dieser Bereich eluiert bei 12 ml, hier hat Kurve 1 aber ein Konzentrationsminimum.

Die zugehörigen durchschnittlichen Molekulargewichte der Konzentrationsverteilungen sind in Abb. 4-4 aufgetragen.

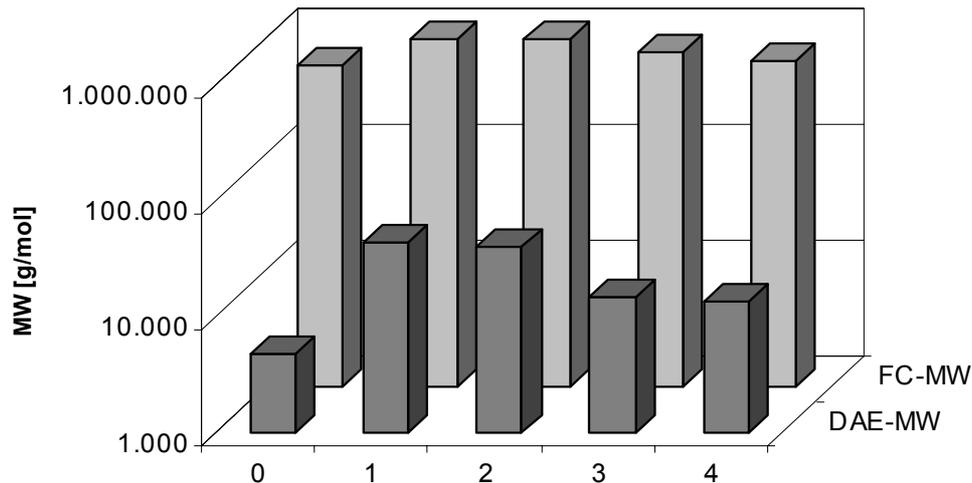


Abb. 4-4 Molekulargewichte des Ausgangsmaterials (FC + DAL) und der Präzipitate [g/mol]

0) Gemisch, 1) Präzipitat [1:0] 2) Präzipitat [1:2], 3) Präzipitat [Ethanol 1:4], 4) Präzipitat [Ethanol 1:8]

Die Abbildung 4-4 zeigt eine Veränderung der durchschnittlichen Molekulargewichte der beiden Chitosanfraktionen im Gemisch durch den Zusatz von Ethanol bei der Fällung. Ausgehend vom Molekulargewicht des Ausgangsgemisches ist eine deutliche Erhöhung bei der Präzipitierung ohne Ethanolzusatz festzustellen. Mit zunehmendem Ethanolanteil während der Fällung verringert sich das Molekulargewicht des hergestellten Präzipitats und nähert sich den Werten des Ausgangsgemisches an. Der Effekt der relativen Molekulargewichtsänderung ist bei dem niedermolekularen DAL stärker ausgeprägt als bei dem langkettigen FC.

Der Effekt der Ethanolausfällung auf die Bildung kristalliner Bereiche im Präzipitat wurde in den Röntgendiffraktogrammen (Abb. 4-5) untersucht.

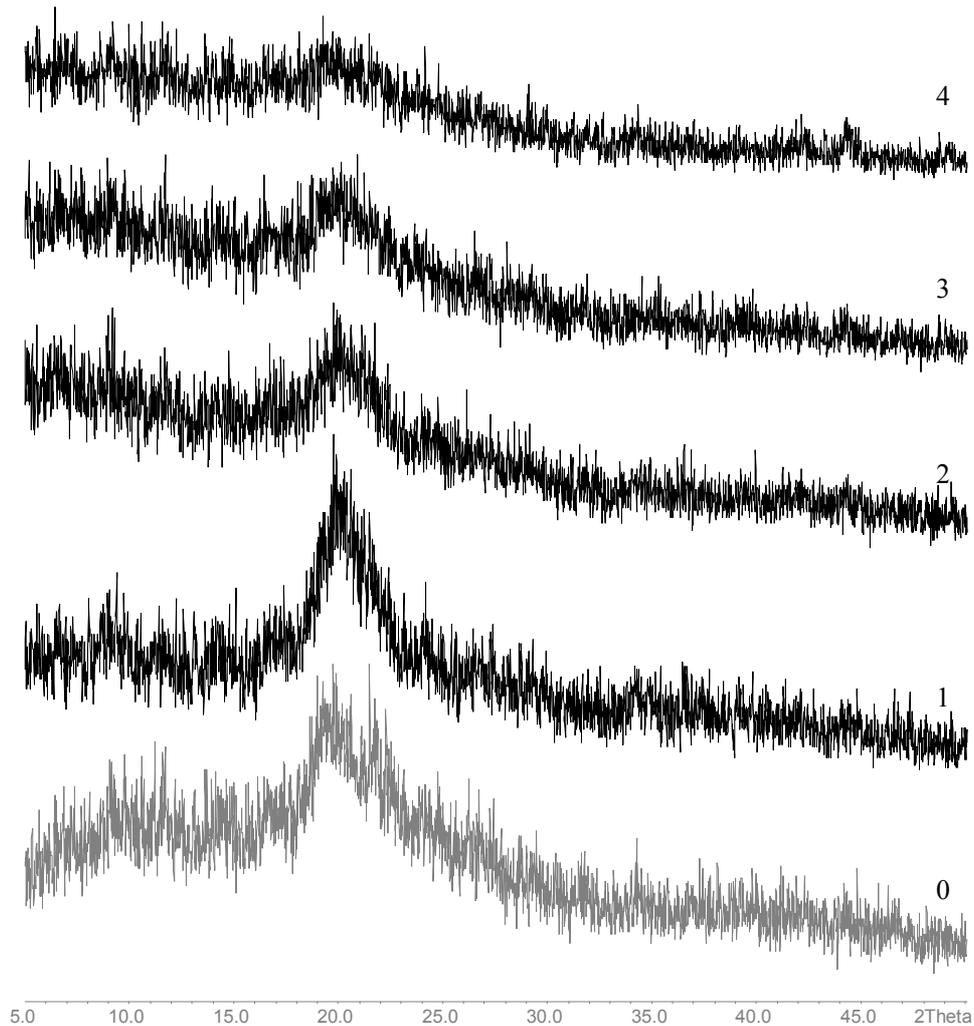


Abb. 4-5 Röntgendiffraktogramme des Ausgangsmaterials (FC + DAL) und der Präzipitate

0) Gemisch, 1) Präzipitat [1:0] 2) Präzipitat [1:2], 3) Präzipitat [Ethanol 1:4], 4) Präzipitat [Ethanol 1:8]

In den Diffraktogrammen der Präzipitate ist von 1 bis 5 eine deutliche Abnahme von Signalen für kristalline Bereiche bei $2\theta = 20^\circ$ zu erkennen. Im Vergleich des Ausgangsmaterials (Diffraktogramm 0) mit dem Produkt der Fällung ohne Ethanolzugabe (Diffraktogramm 1) ist eine leichte Erhöhung der Kristallinität bei $2\theta = 20^\circ$ zu verzeichnen.

4.1.2 Beeinflussung des Molekulargewichtes von Chitosan durch Agglomeration über Wasserstoffbrückenbildung

Die Molekülstruktur von Chitosan ist der von Zellulose sehr ähnlich. Zellulose zeichnet sich durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbildung aus, welche die Ausbildung von Elementarfibrillen bedingen. Es besteht somit für Chitosan die Möglichkeit, dass über eine solche Agglomeration höhere Molekulargewichte gemessen werden, als dies bei Einzelmolekülen der Fall wäre. Darüber hinaus werden durch regelmäßige Aneinanderlagerung der strangförmigen Moleküle kristalline Bereiche gebildet.

Es ist denkbar, dass der Herstellungsprozeß von Chitosan diese Tendenz fördert, da hier die Moleküle im Gegensatz zu ihrem natürlichen Vorkommen stark aufkonzentriert werden und eine Aneinanderlagerung gefördert werden könnte. Durch die Säurebehandlung beim Lösen werden dem Molekül Protonen über die Amidgruppen zugeführt, welche eine Brückenbildung hervorrufen können. Darüber hinaus wird durch den Einsatz von Wasser ein Wasserstoffbrückenbildner verwendet, der sowohl mit sich selbst als auch mit anderen Protonenträgern interagieren kann. Mit folgendem Versuch sollte nun untersucht werden, inwieweit durch Lösung und Repräzipitation potentiell vorhandene Wasserstoffbrücken aufgelöst werden können.

Chitosan (FC) wurde in 2% (V/V) Essigsäure gelöst. Die Lösung wurde anschließend mit Natronlauge bzw. ammoniakalischer Lösung alkalisiert, das Chitosan zur Fällung gebracht und dieses mit Wasser (Aqua bidest.) mehrfach gewaschen. In den Gegenproben wurde mit der jeweiligen Fällungsbase zusätzlich noch Ethanol zu der Lösung gegeben und das entstehende Präzipitat außerdem mehrfach mit Ethanol anstatt mit Wasser gewaschen.

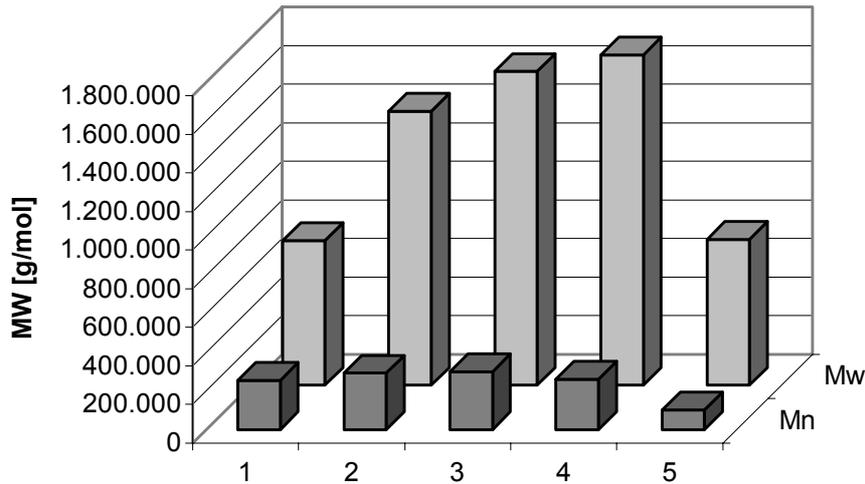


Abb. 4-6 Veränderung des Molekulargewichtes von Chitosan durch Lösung und Verwendung verschiedener Fällungsbasen unter Einsatz von Wasser und Ethanol

1) Ausgangsmaterial 2) NH_3 (H_2O) 3) NH_3 +EtOH 4) NaOH (H_2O) 5) NaOH+EtOH

Der Einsatz von ammoniakalischer Lösung unter anschließendem Waschen mit Wasser bzw. Ethanol bewirkten eine Erhöhung des durchschnittlichen Molekulargewichts (Mw). Diese Erhöhung ist für diese beiden Versuche auch bei den Ergebnissen der Molekulargewichtsermittlung im Punkt der höchsten Konzentration (Mn) festzustellen. Der Einsatz von Ethanol ergab bei der NaOH-Fällung eine Erniedrigung des Mn, jedoch erbrachte die Ermittlung von Mw den gleichen Wert wie derjenige des Ausgangsmaterials. Die Verwendung von Wasser nach der Alkalisierung mit NaOH bewirkte eine starke Änderung des Mw, wohingegen diesmal das Mn unverändert blieb. Die entsprechenden Röntgendiffraktogramme zeigen die Wirkung des Einsatzes von Wasser in der Präparation von Chitosan auf.

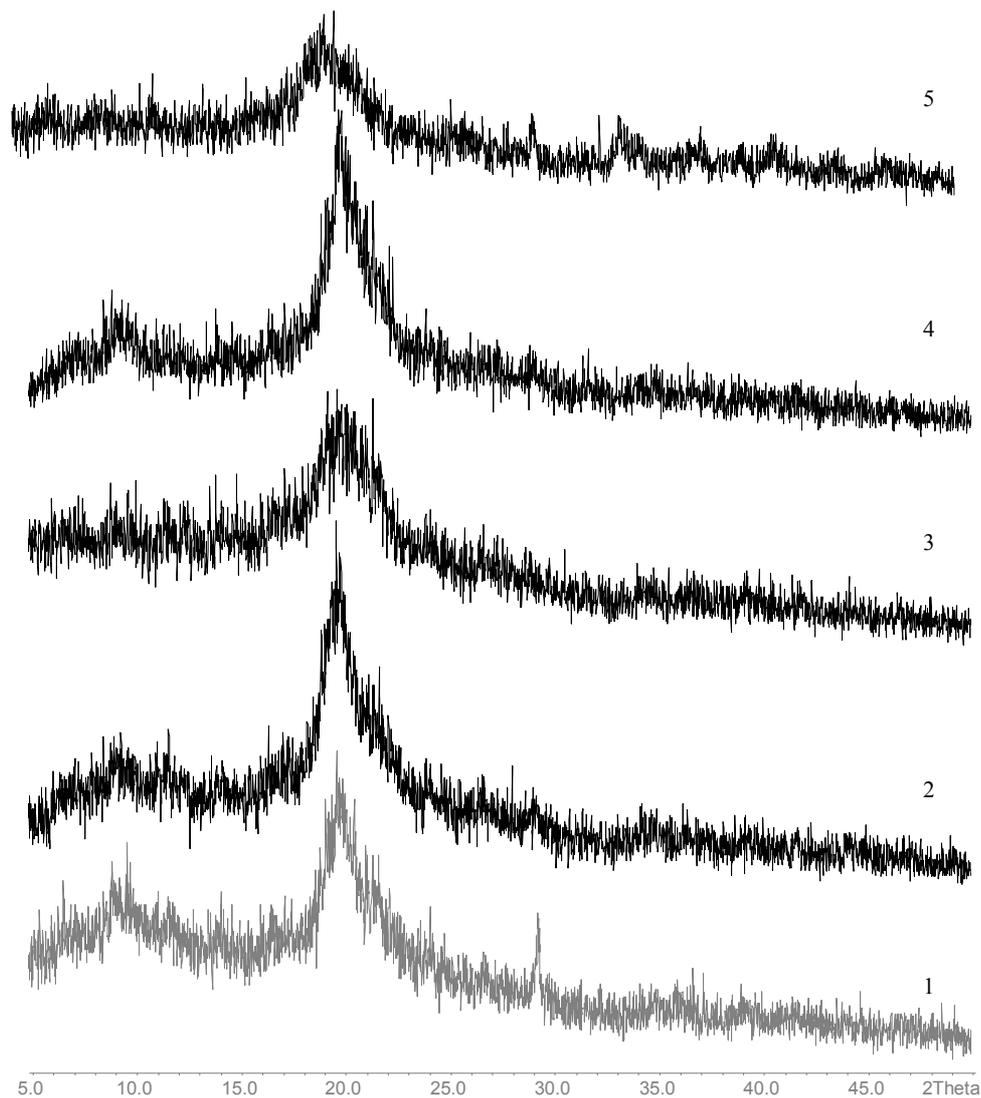


Abb. 4-7 Veränderung der Kristallinität von Chitosan durch Lösung und Verwendung verschiedener Fällungsbasen unter Einsatz von Wasser und Ethanol

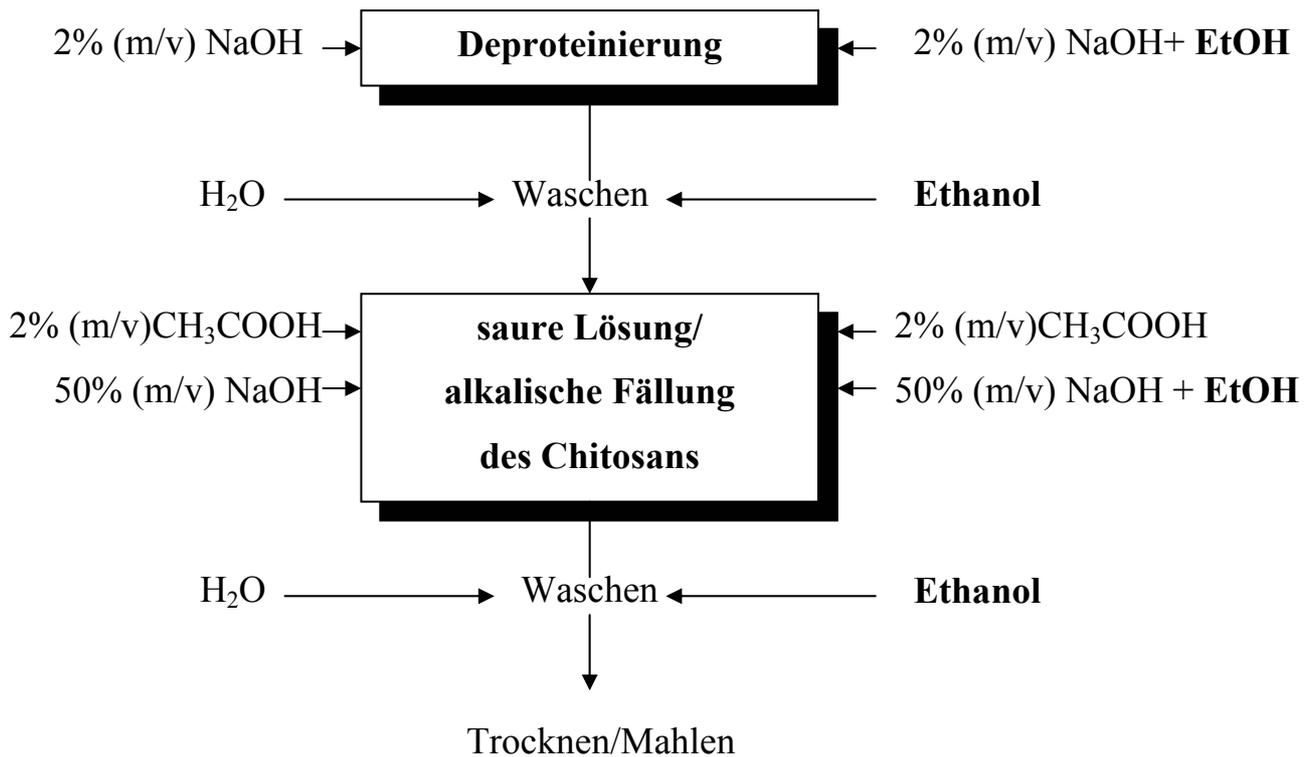
1) Ausgangsmaterial 2) NH_3 (H_2O) 3) $\text{NH}_3 + \text{EtOH}$ 4) NaOH (H_2O) 5) $\text{NaOH} + \text{EtOH}$

Die Präparationen unter Verwendung von Ethanol (3 + 5) weisen eine Verminderung von kristallinen Bereichen auf. Dagegen wirkt der Einsatz von Wasser (2 + 4) fördernd auf die Kristallinität von Chitosan. Das Ausgangsmaterial FC als marktgängiges Produkt wurde unter Verwendung von Wasser als Waschsubstanz hergestellt und weist auch deutlich kristalline Bereiche auf.

4.2 Präparation von Chitosan aus getrockneter Biomasse von Pilzen

Basierend auf den vorausgehenden Untersuchungen wurde der Einsatz von Ethanol als Ersatz für Wasser bei den Waschvorgängen zwischen den einzelnen Präparationsschritten von Chitosan untersucht. Chitosan ist in Ethanol nicht löslich. Durch den Einsatz von Ethanol als Waschsubstanz soll verhindert werden, dass kurzkettige Chitosane während des Waschens in Lösung gehen und verworfen werden. Dagegen ist NaOH in begrenztem Maße in Ethanol löslich und könnte auf diesem Weg vom Produkt entfernt werden.

Der Herstellungsgang zur Gewinnung von Chitosan aus Pilzmaterial besteht im wesentlichen aus zwei Abschnitten. Zuerst wird getrocknetes Pilzmycel alkalisch über eine bestimmte Zeit deproteiniert. Das alkaliunlösliche Material (AIM) wird danach gewaschen, getrocknet und die Ausbeute bestimmt. AIM wird im zweiten Abschnitt mit einer Säure versetzt und das Chitosan herausgelöst. Nach Trennung von Säure und unlöslichem Material wird das Medium alkalisiert und das Chitosan fällt aus. Danach wird das Chitosan gewaschen, um die Base und Restsalze zu entfernen. Abschließend wird das Endprodukt getrocknet und die Ausbeute bestimmt.



Schema 4-1 Vergleich der Präparation von Chitosan aus Pilzkulturen unter Einsatz von Wasser als Waschmedium und von Ethanol als Fällungs- und Waschmedium

4.2.1 Verwendung von Ethanol als Waschmedium

4.2.1.1 Vergleich der Nutzung von Wasser und Ethanol als Waschmedien

Getrocknetes Zellwandmaterial aus einem Wachstumsversuch wurde in zwei Proben aufgeteilt und nach vorliegendem Schema 4-1 Chitosan präpariert. Dabei wurde in dem einen Ansatz Wasser zum Waschen und in dem Parallelversuch Ethanol zum Waschen und Präzipitieren in den einzelnen Präparationsschritten verwendet.

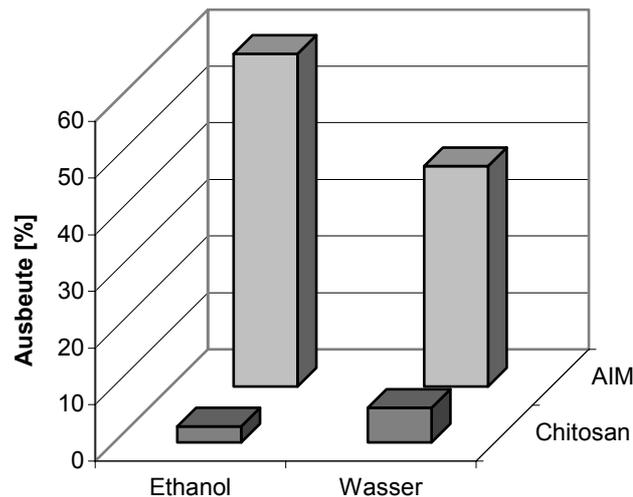


Abb. 4-8 Ausbeute von AIM und Chitosan bei Verwendung von Ethanol bzw. Wasser zum Waschen

Die Ausbeute an AIM im Ethanol-Versuch betrug 59 % vom DCM und übertraf den Gegenversuch, welcher eine Ausbeute an alkaliunlöslichem Material von nur 39 % vom Ausgangsmaterial ermöglichte. Dieses Verhältnis kehrte sich bei der Extraktion des Chitosans aus dem AIM um, hier konnte unter Verwendung von Wasser als Waschmedium 6,2 % Chitosan bezogen auf die Einwaage des Ausgangsmaterials hergestellt werden. Mit Ethanol als Präzipitations- und Waschflüssigkeit ergab sich hier ein Wert von 2,9 %.

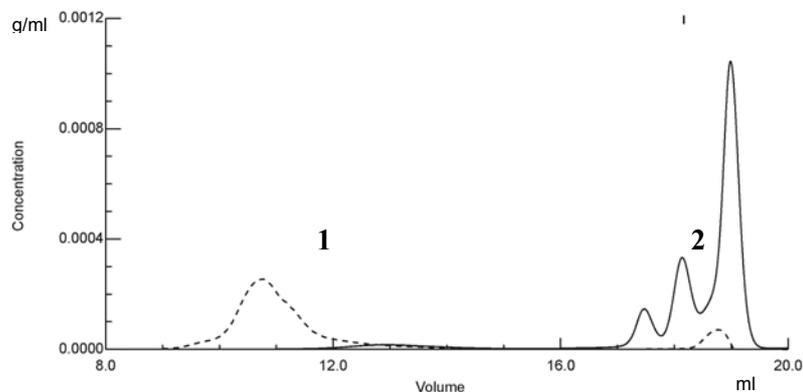


Abb. 4-9 Konzentrationsverteilung innerhalb der Chitosanproben
(durchgezogene Linie: Verwendung von Ethanol)
(gestrichelte Linie: Verwendung von Wasser)

Die Signale des RI-Detektors nach GPC-Auftrennung der Chitosanproben (Abb. 4-9) zeigen für beide Präparate jeweils zwei Areale bei 9-14 ml und bei 17-20 ml Elutionsvolumen. Auffällig ist die gegensätzliche Konzentrationsausprägung der einzelnen Fraktionen. Während die höchste Konzentration in der mit Wasser präparierten Probe bei Areal 1 liegt, so ist dies für die Ethanol-Probe auf der rechten Seite bei Areal 2 gegeben. Für die Ermittlung des zugehörigen Molekulargewichtes beider Versuche wurden jeweils die Peakareale 1 und 2 aus Abb. 4-9 getrennt vermessen.

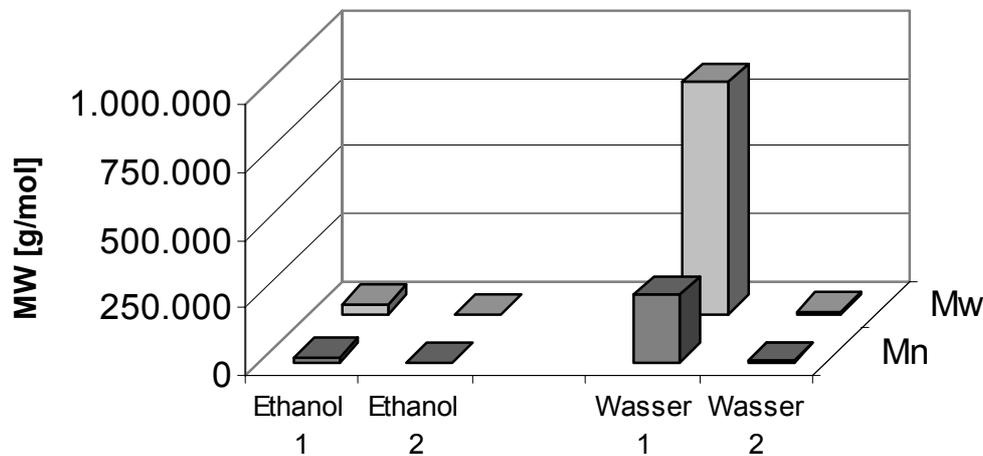


Abb. 4-10 Molekulargewichte der Fraktionen nach Abb. 4-9

Die unter Einsatz von Ethanol hergestellten Proben weisen im Peakareal 1 ein Mw von $3,7 \times 10^4$ g/mol und ein Mn von $1,7 \times 10^4$ g/mol auf. Dagegen ergab die Messung der mit Wasser gewaschenen Probe ein Mw von $8,6 \times 10^5$ g/mol und ein Mn von $2,4 \times 10^5$ g/mol. Im Meßbereich 2 enthielten beide Proben Bestandteile mit Molekulargewichtswerten im Oligomer- bis Monomerbereich, wobei auch hier die Ethanol-Probe mit einem Mw von $4,2 \times 10^2$ g/mol (Mn: $1,7 \times 10^2$ g/mol) niedrigere Werte aufweist als die Wasser-Probe mit einem Mw von $7,3 \times 10^3$ g/mol (Mn: $2,4 \times 10^3$ g/mol).

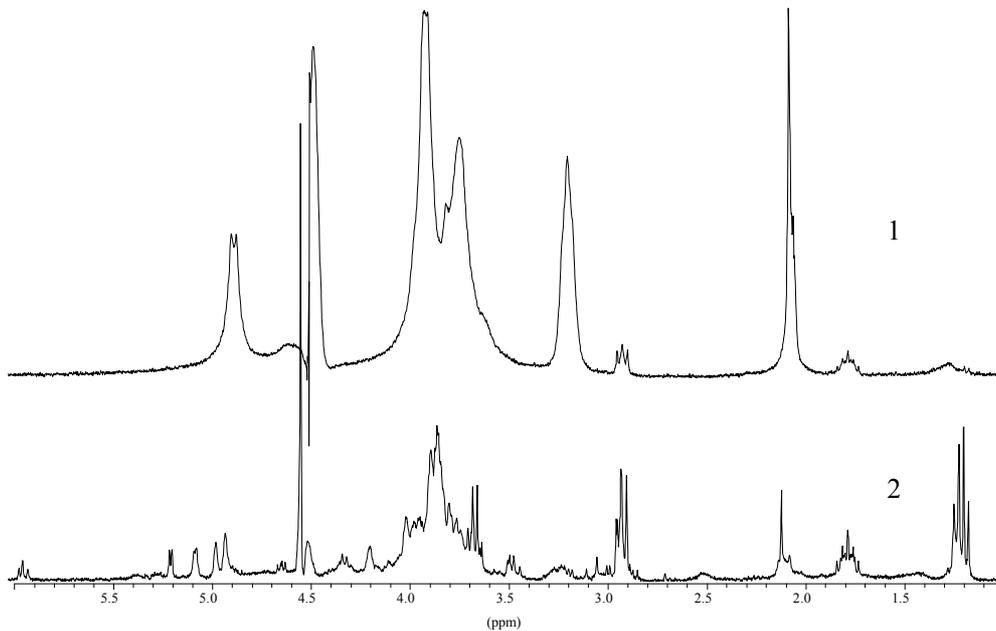


Abb. 4-11 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von nach Schema 4-1 präparierten Chitosanproben

1-Präparation unter Verwendung von Wasser

2- Präparation unter Verwendung von Ethanol

Der Vergleich der beiden Spektren zeigt Übereinstimmungen in der Anordnung des Ringsignals (3,1-4,4 ppm) und des Signals für die Acetylgruppe (2,0 ppm). Spektrum 1 ist ein typisches $^1\text{H-NMR}$ -Abbild eines hochmolekularen Chitosans. Analoge Peaks treten auch in Spektrum 2 in Form des niedermolekularen Chitosans auf (vgl. Abb. 2-4). Die Basislinie von Spektrum 2 zeigt über den gesamten Bereich größere Nebensignale als die von Spektrum 1, welche von Verunreinigungen dieses Chitosans stammen. Darüberhinaus weist Spektrum 1 ein separiertes Ringsignal bei 3,2 ppm auf, welches bei Spektrum 2 fehlt. Hinter 4,5 ppm ist bei Spektrum 1 ein großer Peak gegeben, welcher in kleinerer und aufgespalteter Form bei Spektrum 2 wiederzufinden ist. Spektrum 2 hat bei 3,6-3,7 ppm und bei 1,1-1,3 ppm ein Ethanol signal, welches somit Aufschluß über die Präparationsmethode gibt.

4.2.1.2 Bestimmung des Ethanolanteils

Da es sich nach dem Herstellungsgang in Schema 4-1 um einen zweistufigen Präparationsprozeß handelt, sollte nun geklärt werden, welche Auswirkungen der Einsatz von Ethanol in den einzelnen Stufen auf das Molekulargewicht des gewonnenen Chitosans hat und welche Ethanolkonzentration verwendet werden soll, falls mit Wasser/Ethanol-Gemischen gearbeitet werden muß. Hierzu wurde zuerst die Verwendung von Wasser, Wasser/Ethanol-Gemischen und Ethanol als Waschsubstanzen im 1. Präparationsschritt (Deproteinierung) untersucht.

Getrocknetes Pilzzellwandmaterial aus einem Versuchsansatz wurde mit NaOH (2 %, je 10 ml/g DCM) versetzt. Fünf dieser Proben wurden über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Proben wurden vor dem Zentrifugieren mit ihrer jeweiligen Waschsubstanz auf 45 ml aufgefüllt und danach bei 15.000 rpm pelletiert. Als Waschsubstanzen wurden Wasser, Ethanol und Wasser/Ethanolgemische mit Ethanol in Konzentrationen von 20 %, 50 % und 80 % verwendet. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit dem zugeordneten Waschlösung resuspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes wiederholt. Danach wurde das Pellet bei 50 °C im Trockenschrank bis zur Massenkonstanz getrocknet. Das alkaliunlösliche Material wurde zur Extraktion des Chitosans mit Essigsäure (4 %, 10 ml/g AIM) versetzt und der pH-Wert auf 3 eingestellt. Über Nacht wurden die Proben geschüttelt und die nicht gelösten Bestandteile mit 42.000 U/min in der Ultrazentrifuge vom Überstand getrennt. Die Lösung wurde mit 5 M NaOH alkalisiert und mit Ethanol zum Ausfällen des Chitosans versetzt. Die Suspension wurde mit 15.000 U/min zentrifugiert, das Pellet mit Ethanol wieder aufgeschüttelt und gewaschen. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt und das Präparat anschließend im Trockenschrank getrocknet.

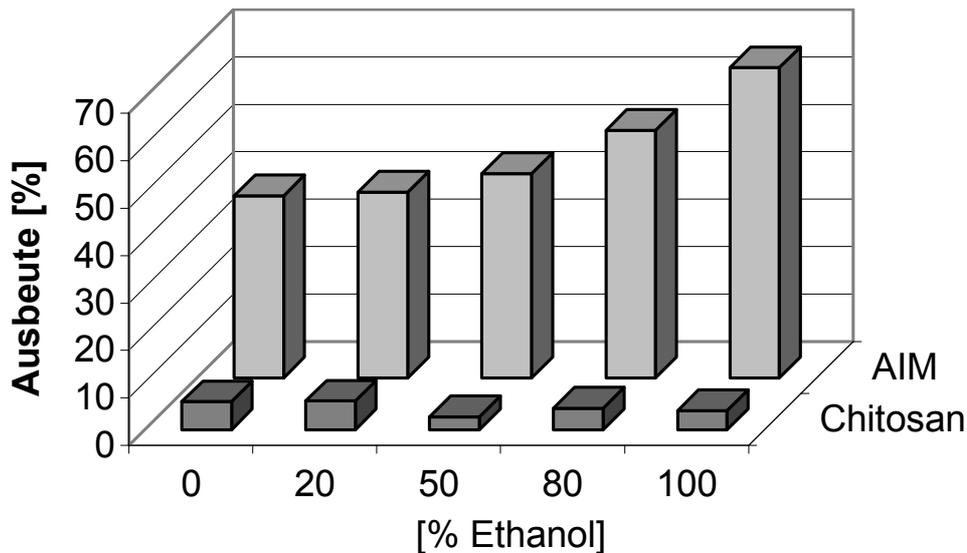


Abb. 4-12 Ausbeute von AIM und Chitosan im ersten Teilversuch

Die Entwicklung der Ausbeute an AIM folgt den Konzentrationsanteilen von Ethanol im Versuchsansatz. Beginnend bei 38 % für die Herstellung ohne Ethanolzusatz (Probe 1) steigert sich die Ausbeute exponentiell bis auf 65 % für die Probe 5, welche mit reinem Ethanol gewaschen wurde. Das meiste Chitosan (5,9 %) wurde unter Verwendung von Wasser (1) hergestellt. Bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 von Wasser zu Ethanol (3) ist die geringste Ausbeute (2,7 %) erbracht worden. Die Verwendung von reinem Ethanol ergab Chitosan mit 4,0 % vom DCM.

In einem anschließendem Versuch wurde nun die Verwendung von Wasser, Ethanol und Wasser/Ethanolgemischen im zweiten Präparationsschritt nach dem alkalischen Fällen des Chitosans untersucht. Dieser Versuch wiederholte den Herstellungsgang nach Schema 4-1, wobei im Deproteinierungsschritt und zum Waschen nur Ethanol verwendet wurde.

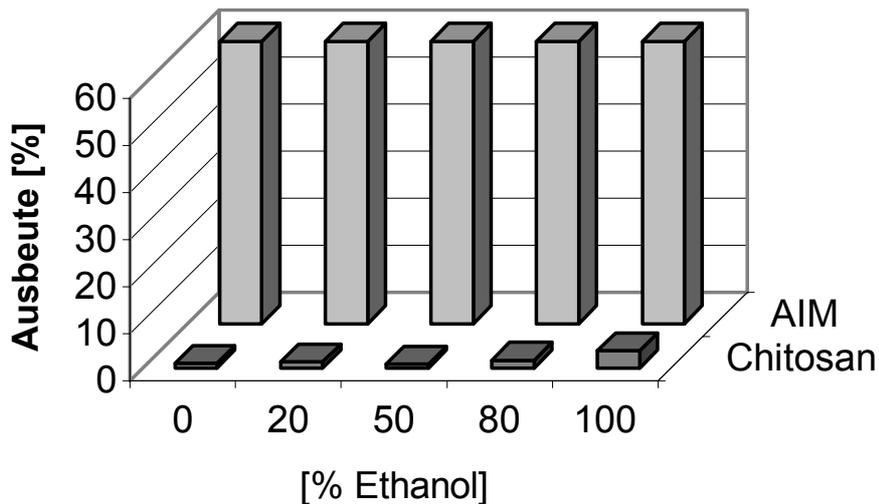
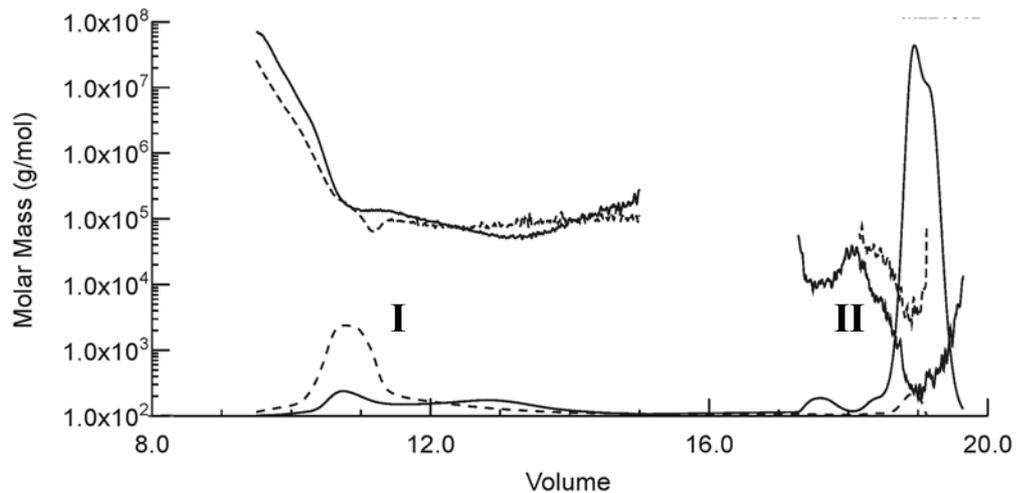


Abb. 4-13 Ausbeute AIM und Chitosan

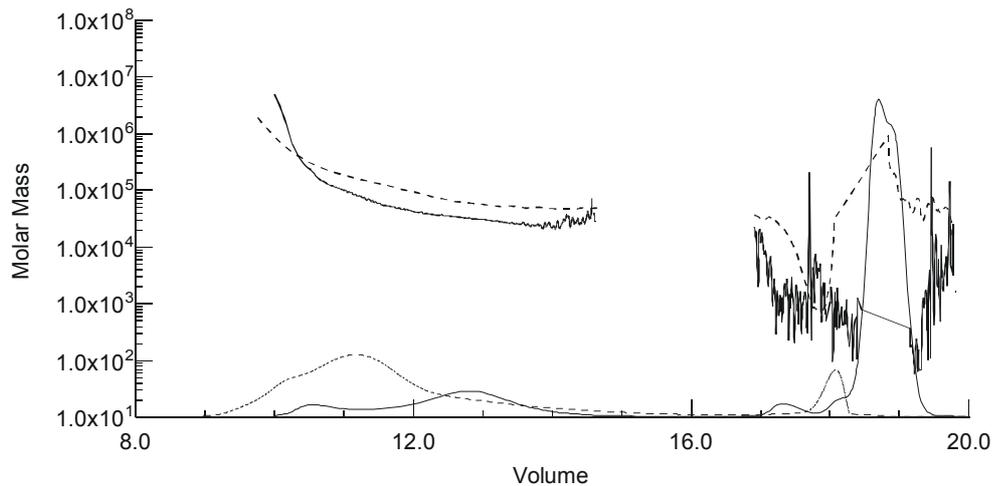
Da im ersten Teilschritt das DCM als Gesamtprobe deproteiniert wurde und erst danach auf die fünf Teilversuche aufgeteilt wurde, wurde somit eine Gesamtausbeute von AIM über 59,8 % ermittelt. Bei der Chitosanausbeute hat auch hier wie im vorherigen Versuch Probe 3 mit 0,7 % den niedrigsten Wert. Das meiste Material konnte bei Probe 5 mit 3,6 % vom Ausgangsmaterial hergestellt werden.

Wie in Versuch 4.2.1.1 wurden die Peaks der eluierten Proben zur Analyse der Molekülmassen und der Konzentrationsverteilungen in die Bereiche I und II (Abb. 4-14) aufgeteilt. Zur Unterscheidung der Versuchsergebnisse werden die Areale mit römischen Ziffern gedruckt. Die Bezifferung in lateinischer Schrift bezeichnet an erster Stelle vor dem Punkt Versuch 1 (Verwendung von Ethanol im ersten Präparationsschritt) bzw. Versuch 2 (Verwendung von Ethanol im zweiten Präparationsschritt). Die Bezifferung nach dem Punkt bezeichnet die jeweils verwendete Ethanolkonzentration. Somit bezeichnet „1.50/II“: Versuch 1 – Ethanolkonzentration 50 % - rechter Peak. Die folgenden Abbildungen zeigen als Peaks die Konzentrationssignale des RI-Detektors und darüber die zugehörigen errechneten Molekulargewichte (s.a. Abb. 2-1 und 2-2).



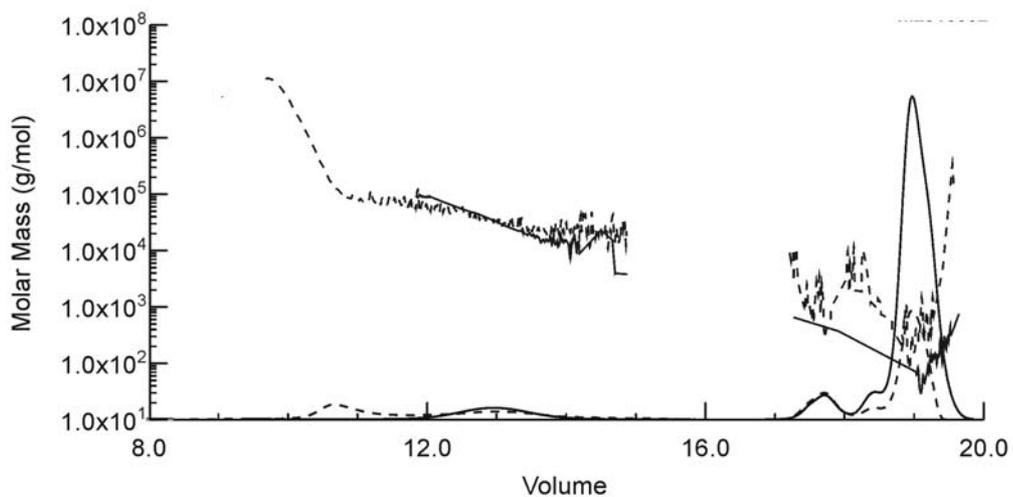
**Abb. 4-14 Konzentrationsverteilung und Molekulargewichte ohne Ethanol:
1.0 (gestrichelt) vs 2.0**

Die Konzentrationsverteilung in Teilversuch 1.0 ist ähnlich der Verteilung in der H₂O-Probe im Versuch 4.2.1.1 (Abb. 4-9). Areal I ist von 9,5-14 ml stark ausgeprägt und zeigt Ansätze einer Normalverteilung mit einem Maximum bei 10,8 ml und einem Ausläufer bis 14 ml. Das errechnete Molekulargewicht im Punkt der höchsten Konzentration (Mn) bei 10,8 ml beträgt 1×10^5 g/mol. Areal II dagegen ist schwach ausgebildet. Mn von Areal II beträgt 2×10^3 g/mol. Teilversuch 2.0/Areal I weist eine langgestreckte Verteilung über 9-15 ml auf. Zwei Maxima sind bei 10,8 ml (Mn: 1×10^5 g/mol) und bei 13 ml (Mn: 5×10^4 g/mol) zu erkennen, wobei das erste Maximum ein wenig höher ist. Die größere Fraktion in dieser Probe ist im Areal II eluiert (Mn: 2×10^2 g/mol).



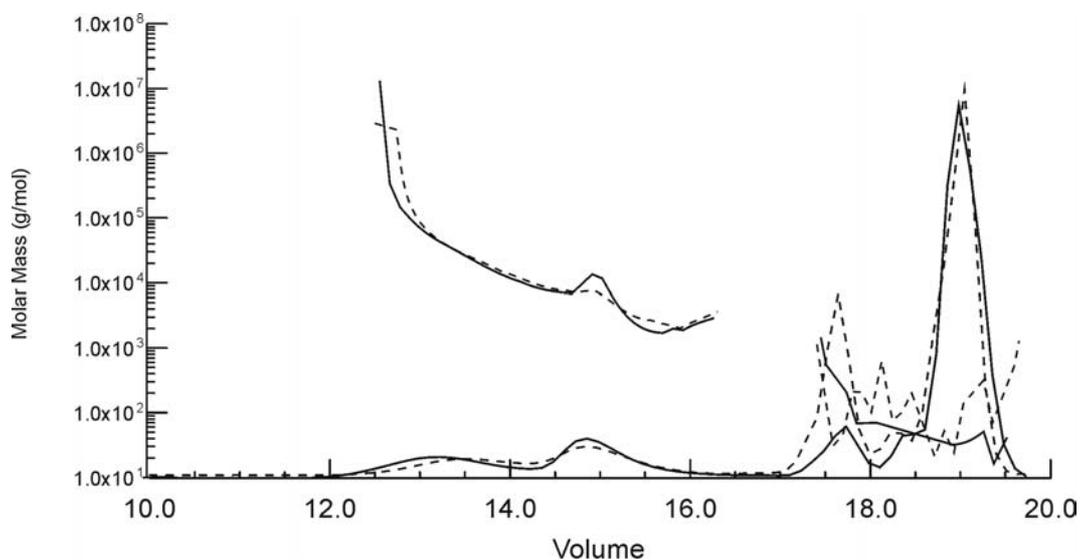
**Abb. 4-15 Konzentrationsverteilung und Molekulargewichte bei 20 % Ethanol:
1.20 (gestrichelt) vs 2.20**

Die Probe von 1.20/Areal I weist Ähnlichkeiten mit 1.0/I auf. Das Maximum hat sich von 10,8 ml (Mn: 1×10^5 g/mol) auf 11,4 ml (Mn: 6×10^4 g/mol) verschoben. Areal II ist weiterhin schwach ausgeprägt (Mn: 5×10^5 g/mol). Bei 2.20/I hat sich das Maximum bei 13 ml (Mn: 3×10^4 g/mol) verstärkt. Das zweite Maximum bei ursprünglich 10,8 ml hat sich verkleinert und liegt nun bei 10,5 ml (Mn: 8×10^4 g/mol). Areal II ist unverändert (Mn: 4×10^2 g/mol).



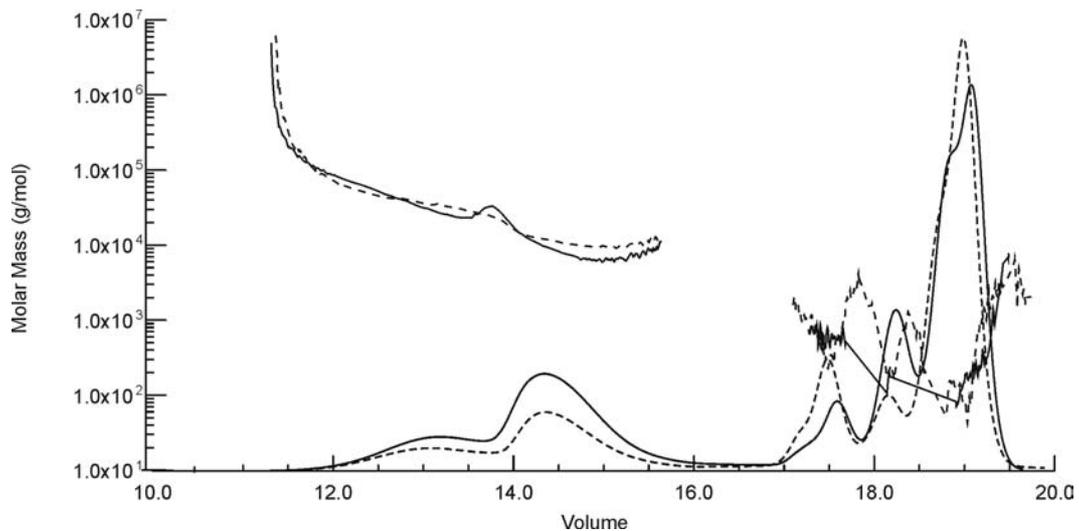
**Abb. 4-16 Konzentrationsverteilung und Molekulargewichte bei 50 % Ethanol:
1.50 (gestrichelt) vs 2.50**

1.50/I bildet im Vergleich zu 1.20/I ein zweites Maximum bei 13 ml (Mn: 3×10^4 g/mol) aus, während der ursprünglich bei 11,4 ml liegende Peak sich abschwächt. 1.50/II (Mn: 1×10^2 g/mol) verschiebt sich auch zu höheren Elutionsvolumina und entspricht Versuch 2.50/II (Mn: 5×10^1 g/mol), erreicht jedoch noch nicht den gleichen Konzentrationsanteil. Das bereits in 2.20/I ausgeprägte rechte Maximum ist bei 13 ml (Mn: 3×10^4 g/mol) in 2.50/I wiederzufinden, wobei jedoch das linke vollständig eliminiert ist.



**Abb. 4-17 Konzentrationsverteilung und Molekulargewichte bei 80 % Ethanol:
1.80 (gestrichelt) vs 2.80**

Beide Signale des RI-Detektors nähern sich in ihrer Form an. Bereiche unterhalb von 12 ml weisen keinen Kurvenverlauf wie in den vorhergehenden Teilversuchen mehr auf. Areal I beider Teilversuche zeigt Maxima bei 13 ml (Mn: 4×10^4 g/mol) und bei 14,8 ml (Mn: 1×10^4 g/mol). Areal II bildet jeweils einen mehrfach gesplitteten Peak von 17 ml bis ca. 20 ml aus (Mn: $2-5 \times 10^1$ g/mol).



**Abb. 4-18 Konzentrationsverteilung und Molekulargewichte bei 100 % Ethanol:
1.100 (gestrichelt) vs 2.100**

Die Entwicklung der Angleichung der Konzentrationsanteile und des Molekulargewichtes mit steigendem Ethanolgehalt in diesen beiden Versuchsreihen ist hier abgeschlossen. Beide Kurvenverläufe sind nahezu identisch mit einem stark ausgeprägten Areal II und einem kleineren Areal I mit einem ausgeprägteren Maximum bei 14,5 ml (Mn: 1×10^4 g/mol).

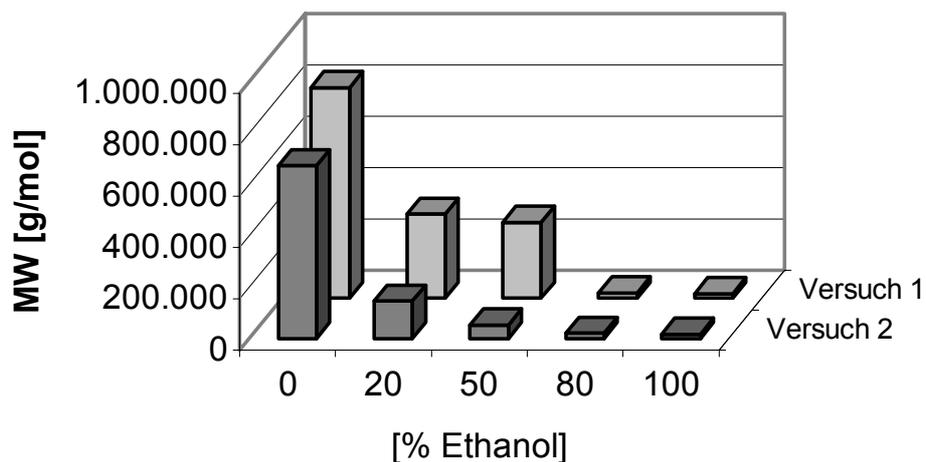


Abb. 4-19 Verteilung der durchschnittlichen Molekulargewichte (Mw)

In beiden Versuchen ist jeweils im internen Vergleich der einzelnen Präparationen eine Abnahme des durchschnittlichen Molekulargewichtes mit

zunehmenden Ethanolgehalt in der Waschlösung festzustellen. Dieser Effekt ist am stärksten bis zu einer Ethanolkonzentration von 50% ausgeprägt, entsprechend einer Abnahme von $8,21 \times 10^5$ g/mol auf $2,96 \times 10^5$ g/mol (Versuchsreihe 1) bzw. $6,73 \times 10^5$ g/mol auf $5,16 \times 10^4$ g/mol (Versuchsreihe 2). Im externen Vergleich zwischen den einzelnen Ethanolkonzentrationen weist die Versuchsreihe 1 mit Einsatz von Ethanol im ersten Präparationsabschnitt durchgehend höhere Molekulargewichte auf als Versuchsreihe 2. Dieser Unterschied ist bei dem Ansatz mit 50 % Ethanol der beiden Versuchsreihen mit einem Faktor von 5 (Mw_1/Mw_2) am stärksten ausgeprägt.

4.2.2 Einsatz von flüchtigen bzw. in Ethanol löslichen Deproteinierungsbasen

Da Ethanol als Waschsubstanz verwendet wird, sollte untersucht werden, inwieweit flüchtige bzw. gut in Ethanol lösliche Basen Verwendung finden können. Es sollte sichergestellt werden, dass diese Base keinen Einfluß auf das Molekulargewicht nimmt, weitgehend das Pilzmaterial deproteiniert und leicht wieder ausgewaschen werden kann.

Jeweils 2 g getrocknetes Mycel wurde mit 20 ml einer Deproteinierungsbase über Nacht inkubiert. Als Basen wurden 25 % (V/V) Triethanolamin, 2 % (m/V) Natronlauge und 25 % (V/V) ammoniakalische Lösung verwendet. Die Suspensionen wurden danach mit Ethanol auf 45 ml aufgefüllt und bei 15.000 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden mehrfach mit Ethanol gewaschen, bei 50 °C getrocknet und gewogen. Danach wurden die Proben mit 2 % (V/V) Essigsäure versetzt, mit Eisessig einheitlich auf pH 3 eingestellt und über Nacht inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden in der Ultrazentrifuge für 30 min mit 42.000 rpm von der Chitosanlösung getrennt und verworfen. Der Überstand wurde mit der jeweils zur Deproteinierung verwendeten Base alkalisiert und durch weitere Ethanolzugabe das Chitosan gefällt. Das Präzipitat wurde mehrfach mit Ethanol gewaschen.

Eine Vergleichsprobe wurde mit NaOH deproteiniert, jedoch wurde anschließend in der weiteren Verarbeitung dort nur Wasser eingesetzt, wo für die restlichen Proben Ethanol verwendet wurde.

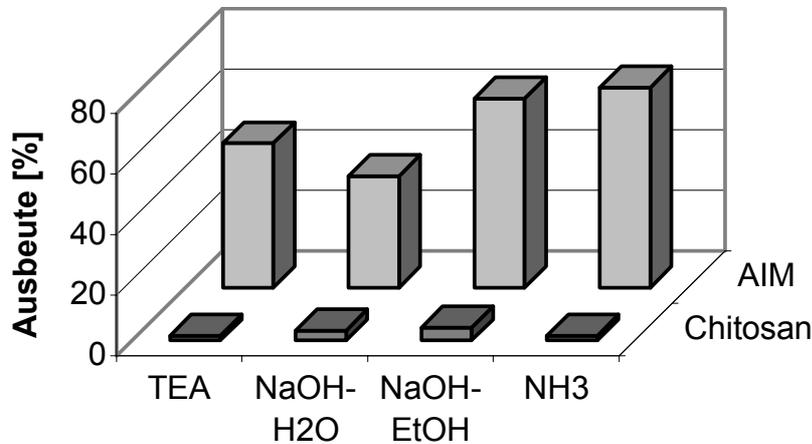


Abb. 4-20 Ausbeute an AIM und Chitosan unter Verwendung unterschiedlicher Deproteinierungsbasen

Die Ausbeute an AIM ist am größten unter Verwendung von ammoniakalischer Lösung und NaOH in Ethanol mit 66,1 % respektive 62,4 %. Die niedrigste Ausbeute wurde mit NaOH in H₂O mit 36,8 % erzielt. Die Mengen an produziertem Chitosan betrug bei NaOH in Ethanol 4,3 %, gefolgt von NaOH in H₂O mit 3,3 %. Triethanolamin und NH₃ erreichten jeweils 1,6 % Ausbeute relativ zur Einwaage. Die Proben wurden nun bezüglich ihres Elutionsverhaltens mit Hilfe der GPC untersucht.

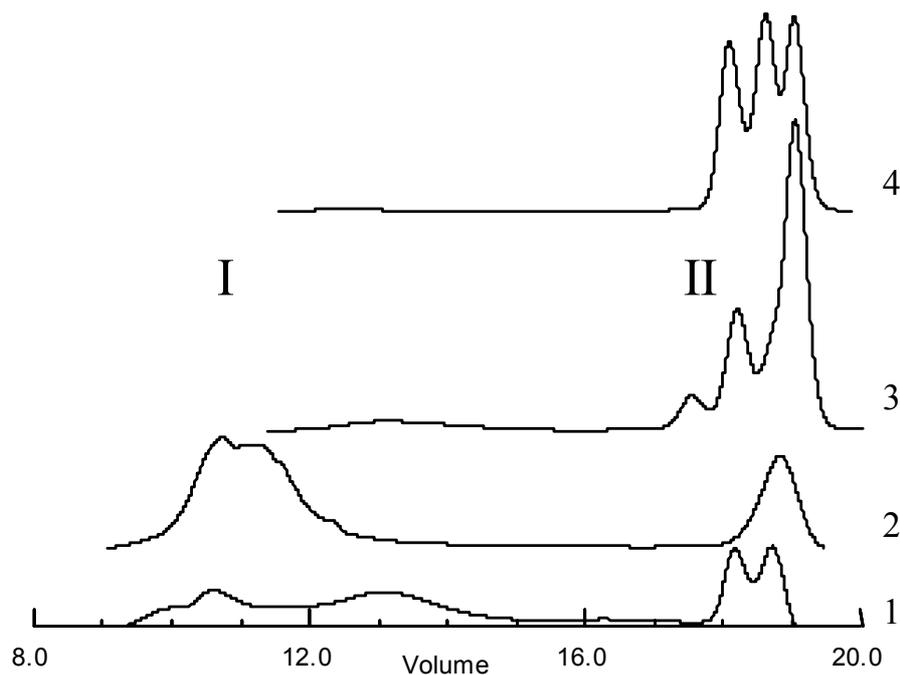


Abb. 4-21 Konzentrationsverteilung innerhalb der aufgetrennten Proben

1-Triethanolamin 2-NaOH (H₂O) 3-NaOH (Ethanol) 4-NH₃

Das Signal des RI-Detektors weist bei Probe 1 in Areal I zwei Maxima bei 10,6 ml und bei 13 ml auf. Areal II besteht wie in vorhergehenden Versuchen unter Ethanolpräparation aus einem gesplitterten Peak. Probe 2 zeigt ein Maximum mit rechtsseitiger Schulterbildung bei 10,6 ml und ein weiteres bei 19 ml. Probe 3 besitzt wie in den vorher beschriebenen Versuchen mit NaOH in Ethanol ein schwach ausgeprägtes Maximum bei 13 ml und einen dreigeteilten, starken Peak von 17 ml bis 20 ml in Areal II. Der Versuch 4 weist einen minimalen Peak auf, dessen Maximum im Elutionsvolumen zwischen dem von Probe 2 und Probe 3 liegt. Areal II ist auch dreigeteilt, jedoch ist innerhalb dieses Gebietes kein so ausgeprägter Konzentrationsgradient gegeben wie bei Probe 3.

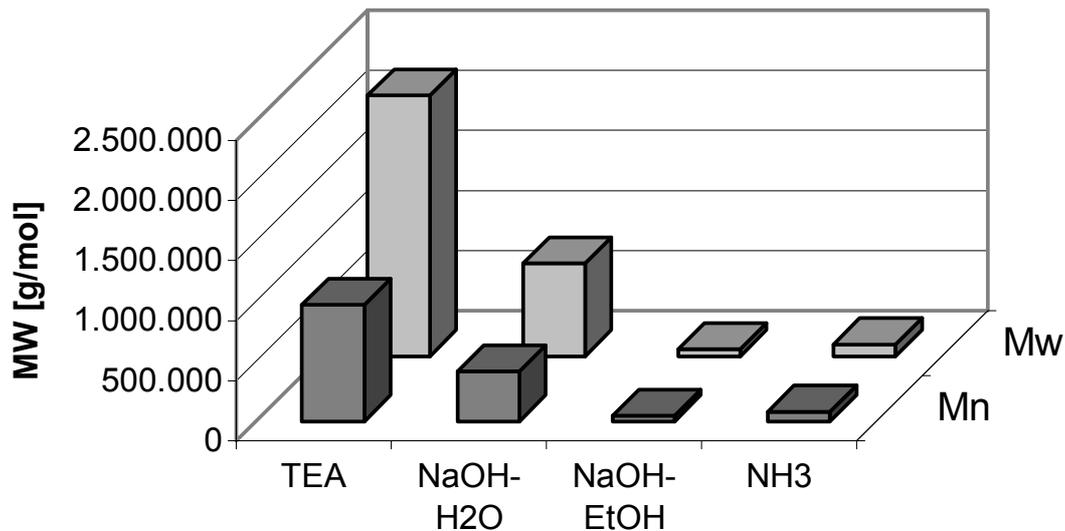


Abb. 4-22 Molekulargewichtsverteilungen von präpariertem Chitosan unter Verwendung unterschiedlicher Deproteinierungsbasen

Die Molekulargewichte der präparierten Chitosanproben weisen große Unterschiede in Abhängigkeit von der verwendeten Deproteinierungsbasis auf. Die TEA-Probe zeigt das höchste durchschnittliche Molekulargewicht mit $2,16 \times 10^6$ g/mol (Mn: $9,7 \times 10^5$ g/mol). Danach folgt die NaOH(H₂O)-Probe mit einem Mw von $7,7 \times 10^5$ g/mol und einem Mn von $4,15 \times 10^5$ g/mol. Das geringste Mw von $5,85 \times 10^4$ g/mol (Mn: $4,66 \times 10^4$ g/mol) zeigt die NaOH-Präparation mit Ethanol. In der gleichen Größenordnung liegt die Präparation mit NH₃ mit einem Mw von $9,87 \times 10^4$ g/mol und einem Mn von $7,99 \times 10^4$ g/mol.

4.2.3 Einfluß verschiedener Säurekonzentrationen auf die Extraktion von Chitosan

Es sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß die Konzentration der Säure eine Rolle bei der Lösung der Moleküle aus dem AIM spielt. Besteht hier eine Konzentrationsabhängigkeit, dann könnten sich die einzelnen Versuchsansätze in ihren Ausbeuten unterscheiden und weisen eventuell darüber hinaus auch

unterschiedliche durchschnittliche Molekulargewichte auf. Dies könnte darin bedingt sein, dass durch niedrigere pH-Werte auch mehr höhermolekulare Bestandteile gelöst werden.

Es wurde nach Herstellungsschema 4-1 unter Verwendung von Ethanol gearbeitet. Das AIM wurde in drei Proben aufgeteilt und diese mit jeweils unterschiedlich konzentrierter Essigsäure (5 %, 10 %, 20 %) versetzt. Das Chitosan wurde gelöst und nach vorliegender Vorschrift gefällt und mit Ethanol gewaschen.

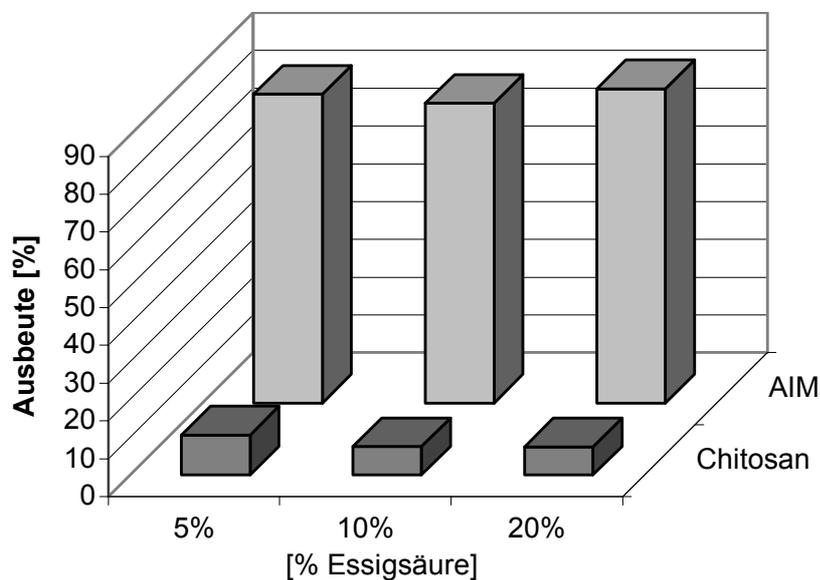


Abb. 4-27 Ausbeute an AIM und Chitosan in Abhängigkeit der Essigsäurekonzentration

Die Menge an präpariertem AIM der drei Teilversuche liegt zwischen 79,3 % (10 % HAc) und 83,2 % (20 % HAc). Das produzierte Chitosan ergab eine Ausbeute zwischen 7,4 % (20 % HAc) und 10,6 % (5 % HAc) bezogen auf das eingewogene DCM.

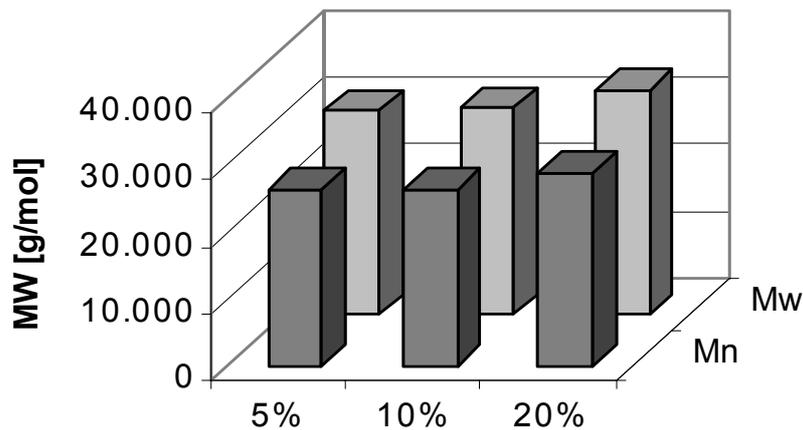


Abb. 4-28 Mw und Mn des mit unterschiedlichen Säurestärken produzierten Chitosans

Die Molekulargewichte des präparierten Chitosans aus den drei Teilversuchen weichen nicht stark voneinander ab, auch wenn ein leichter Anstieg mit Zunahme der Säurekonzentration zu verzeichnen ist. Das Mw reicht von $3,03 \times 10^4$ g/mol (5 % HAc) bis $3,34 \times 10^4$ g/mol (20 % HAc), verbunden mit einem Mn von $2,63 \times 10^4$ g/mol (5 % HAc) bis $2,88 \times 10^4$ g/mol (20 % HAc). Der Polydispersitätsgrad beträgt für diese drei Versuche 1,16.

4.2.4 Dialyse von nach Schema 4-1 mit Ethanol produziertem Chitosan

Die Ethanol-präparierten Proben weisen nach der GPC-Auftrennung im Diagramm der Konzentrationsverteilung gegen das Elutionsvolumen zwei deutliche Peakregionen auf (Abb. 4-9). Es kann vermutet werden, dass das zu präparierende Chitosan die linke Region stellt und der rechte Bereich durch niedermolekulare Verunreinigungen (Restproteine, Aminosäuren, etc.) bedingt ist. Um diese beiden Areale voneinander zu trennen und eine Analyse der Bestandteile der linken höhermolekularen Region durchzuführen, wurde das hergestellte Chitosan einer Dialyse unterzogen.

DCM wurden nach Schema 4-1 unter Verwendung von Ethanol präpariert. Der Versuchsansatz wurde alkalisiert und dann mit Ethanol versetzt, um das

Chitosan vom Lösungsmittel zu trennen. Das produzierte Chitosan wurde mit Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet.

Anschließend wurde von dem Chitosan eine Probe genommen, der Rest in bidest. Wasser gelöst und in einen Dialyseschlauch mit einem molekularen Ausschlußgewicht (MWCO) von 3.000 g/mol gegeben. Dieser Ansatz wurde fünfmal gegen je einen Liter bidest. Wasser dialysiert. Die neutral-wässrige Chitosanlösung wurde aus dem Schlauch entfernt, mit NaOH alkalisiert und Ethanol versetzt, um das dialysierte Chitosan zur Fällung zu bringen. Das Präzipitat wurde mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute und das Molekulargewicht wurden bestimmt.

Präparationsschritt	Ausbeute [% der Einwaage]
Einwaage	100
AIM	66,1
Extraktion des Chitosans	2,9
Dialysiertes Chitosan	0,7

Tab. 4-2 Ausbeute der einzelnen Präparationsschritte

Die Auftrennung mittels GPC zur Vermessung des Molekulargewichtes ergab die in Abb. 4-23 und Abb. 4-24 dargestellten Ergebnisse.

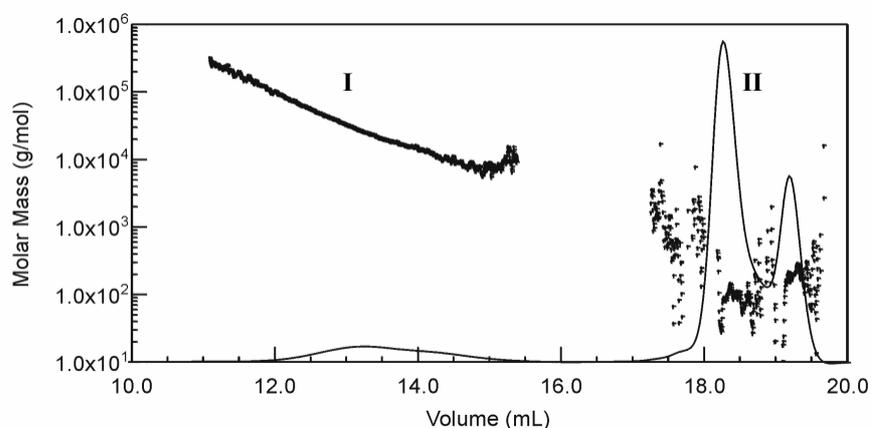


Abb. 4-23 Konzentrationsverteilung und Molekulargewichte der Probe vor der Dialyse

Die Chitosanprobe vor der Dialyse zeigt im RI-Signal die beschriebene Fraktionierung in Areal I und II. Areal II ist niedermolekular und hat einen relativ hohen Konzentrationsanteil an der Gesamtprobe verglichen mit Areal I. Das Molekulargewicht von Areal I reicht von 7×10^3 g/mol bis 2×10^5 g/mol, mit einem Mn von $1,6 \times 10^4$ g/mol.

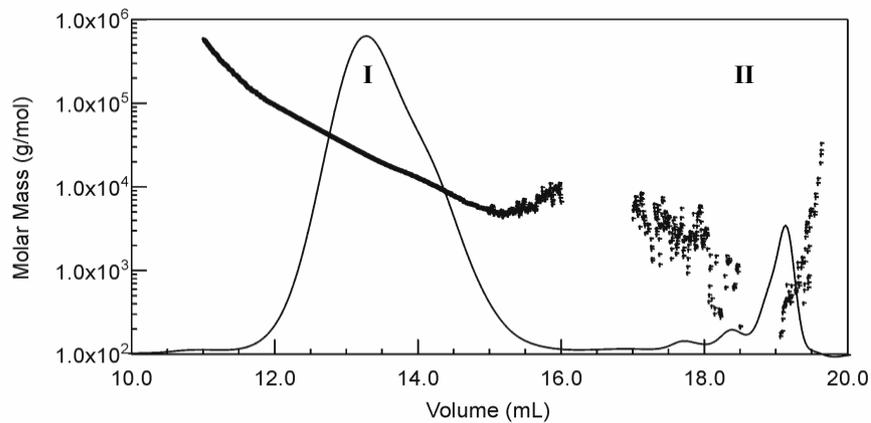


Abb. 4-24 Konzentrationsverteilung und Molekulargewichte der Probe nach der Dialyse

Nach der Dialyse haben sich die Konzentrationsverhältnisse von Areal I und II umgekehrt. Durch die Dialyse wurden niedermolekulare Bestandteile im Elutionsvolumen von 17-20 ml entfernt, dies jedoch nicht quantitativ. Bereiche oberhalb des Ausschlußmolekulargewichtes des Dialyseschlauches wurden nicht erfaßt. Zusätzlich sind noch Reste mit einem Mw innerhalb des verwendeten MWCO zu verzeichnen.

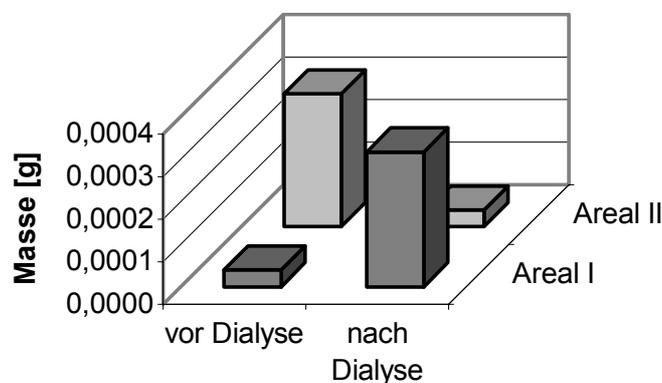


Abb. 4-25 kalkuliert Massenanteile der Konzentrationsintegrale

Die Kalkulation der Massenanteile der gezeigten Peaks in Abb. 4-23 und Abb. 4-24 an der Gesamtprobe ergibt eine Zunahme von Areal I und eine Abnahme von Areal II durch die Dialyse um jeweils den Faktor 8 (Abb. 4-25).

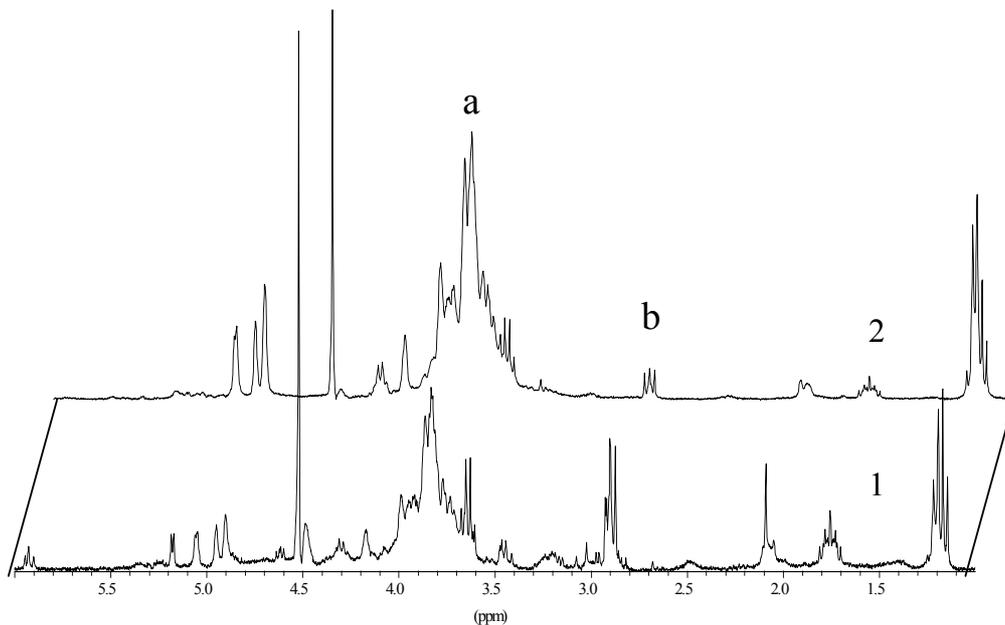


Abb. 4-26 ¹H-NMR-Spektren: 1) vor Dialyse, 2) nach Dialyse

Das ¹H-NMR-Spektrum der Probe vor der Dialyse zeigt Signale für Chitosan auf einer verrauschten Basislinie. Das Signalniveau der Peaks von Chitosan ist relativ niedrig im Verhältnis zum Hintergrundsignal. Vergleicht man dagegen das Spektrum dieser Probe nach der Dialyse, so ist die Basislinie nun wesentlich ebener. Der Flächeninhalt des Monomer-Peaks (Abb. 4-26/ a) ist deutlich vergrößert relativ zum Signal des Standards (Abb. 4-26/ b), wobei beide Proben mit gleichen Konzentrationsverhältnissen des Standards zur Vermessung hergestellt wurden. Bei 3,6-3,7 ppm ist bei beiden Spektren ein mit dem Ringintegral verschmolzenes Signal für Ethanol zu verzeichnen. Resonanzsignale vom Ethanol sind darüber hinaus auch bei 1,1-1,3 ppm festzustellen.

4.2.5 Herstellung von Chitosan aus Krabbenschalen nach Schema 4-1 unter Verwendung von Ethanol

Da die Mehrzahl der kommerziellen Referenzproben aus Krabbenschalen hergestellt wurde, sollte untersucht werden, ob nach Schema 4-1/Ethanol niedermolekulares Chitosan auch aus diesem Rohmaterial gewonnen werden kann. Dazu wurde dieser Herstellungsgang noch um einen Demineralisierungsschritt und einen Desacetylierungsschritt erweitert, da Chitosan in Arthropodenschalen nicht *in vivo* vorliegt.

Chitinhaltige Schalenreste wurden in einer Schlagmühle zerkleinert. Ca. 4 g wurden jeweils verwendet für die Präparation nach Schema 4-1 (Probe 1) und für einen zweiten Versuch (Probe 2), welcher nach dem Standardverfahren für die industrielle Herstellung von Chitosan durchgeführt wurde (Schema 1-1). Die Proben wurden mit 2 % (m/V) NaOH für 3 h bei 100 °C deproteiniert. Probe 1 wurde mit dem dreifachen Volumen mit Ethanol aufgefüllt, um gelöste, eventuell vorhandene chitosanhaltige Bestandteile zurückzufällen. Danach wurde die Probe mit 11.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet mehrfach mit Ethanol gewaschen. Probe 2 wurde ebenfalls abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Die Proben wurden bei 50 °C getrocknet und die Ausbeute bestimmt. Im zweiten Schritt erfolgte eine Demineralisierung mit 0,5 M HCl über 3 h bei Raumtemperatur. Probe 1 wurde alkalisiert, um eine eventuelle Lösung von bereits gebildetem Chitosan im sauren Bereich zu verhindern, und wiederum mit Ethanol aufgefüllt. Der Waschvorgang zum Aufreinigen von den mineralischen Bestandteilen erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei der Deproteinierung jeweils mit Ethanol (Probe 1) und Wasser (Probe 2). Das aufbereitete Material wurde wiederum getrocknet und gewogen. Die Desacetylierung des chitinhaltigen Materials wurde unter Verwendung von 50 % (m/V) NaOH durchgeführt. Die Inkubation erfolgte über 3 h bei 100 °C im Trockenschrank. Der nachfolgende Waschvorgang und die Trocknung wurde wie bei den vorhergehenden Schritten durchgeführt. Zur Lösung des Chitosans

vom alkaliunlöslichen Material wurde 2 % (V/V) Essigsäure eingesetzt. Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Chitosanlösungen wurden durch Zentrifugation mit 42.000 rpm in einer Ultrazentrifuge von unlöslichen Bestandteilen getrennt, alkalisiert und bei Probe 1 mit Ethanol aufgefüllt. Das produzierte Chitosan wurde mit Ethanol bzw. Wasser gewaschen. Danach wurden die beiden Versuchsergebnisse getrocknet, gewogen und jeweils das Molekulargewicht bestimmt.

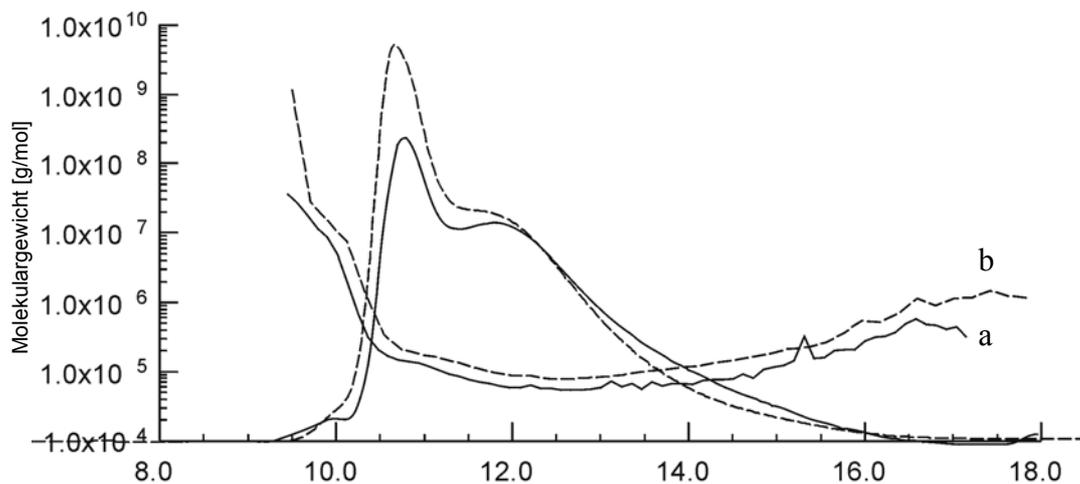
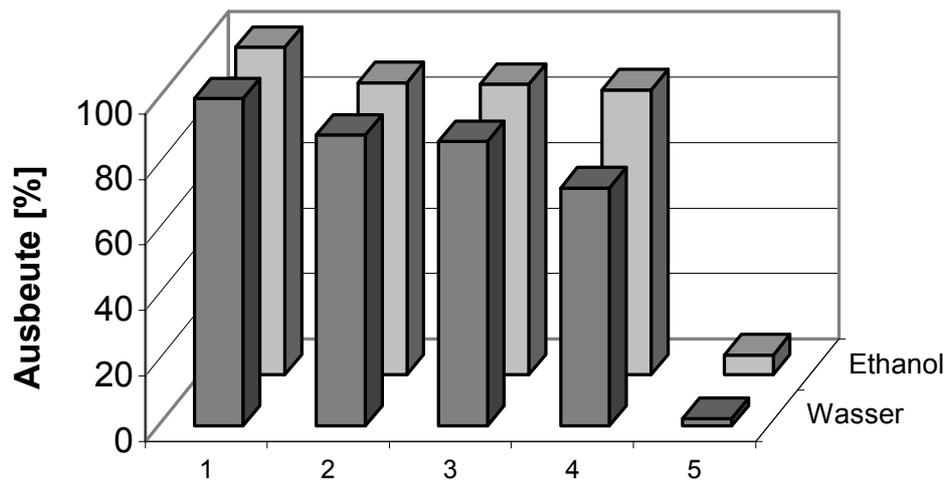


Abb. 4-29 a- Präparation unter Verwendung von Ethanol
b- Präparation unter Verwendung von Wasser

In dem Signal des RI-Detektors und des berechneten Molekulargewichtes sind keine fundamentalen Unterschiede, bedingt durch die Verwendung von H₂O bzw. Ethanol, festzustellen. Die Konzentrationsverteilung besteht aus einer Fraktion, welche ihr Maximum bei 10,7 ml mit einer ausgeprägten Schulterbildung bei 12 ml hat. Verschiebungen, wie sie in der Ethanol- vs. Wasserpräparation aus Pilzmaterial zu verzeichnen sind, sind nicht gegeben.



**Abb. 4-30 Ausbeute der einzelnen Präparationsschritte [% der Einwaage]
1- Einwaage, 2- Deproteinierung, 3- Demineralisierung, 4- Desacetylierung,
5-Extraktion**

Die Ausbeutermittlung der einzelnen Präparationsstufen zeigt für die Deproteinierung und die Demineralisierung nahezu übereinstimmende Werte von jeweils 87-89 %. Dies sowohl im Vergleich von Stufe 2 zu Stufe 3 innerhalb eines Versuches, sowie auch im Vergleich zwischen den zwei Präparationsmethoden. Ab dem Desacetylierungsschritt erfolgt bei der Wasserpräparation eine Abnahme in der Ausbeute von 87 % auf 73 %, wohingegen sich in der Ethanolpräparation dieser Wert nur von 89 % auf 87 % verringert. Nach der Lösung und der Extraktion konnten für die Herstellung mit Wasser 2,2 % Chitosan aus dem Schalenmaterial gewonnen werden. Unter Verwendung von Ethanol erreichte dieser Wert 6,2 %.

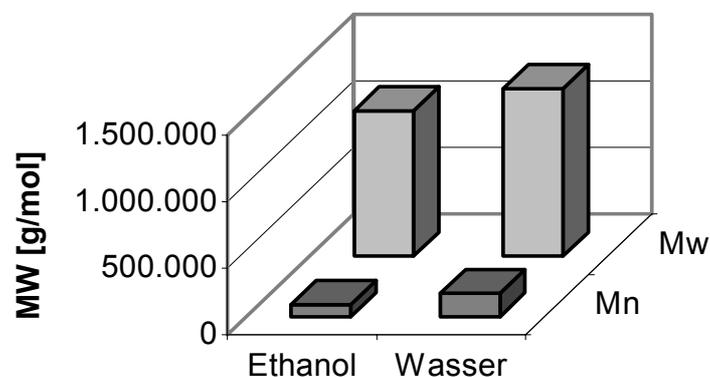


Abb. 4-31 Molekulargewicht des Krabbenchitosans

Die durchschnittlichen Molekulargewichte der Präparate weichen zwar voneinander ab, sind jedoch beide im hochmolekularen Bereich einzuordnen. Das Ethanol-präparierte Krabbenchitosan ist mit $1,1 \times 10^6$ g/mol (M_n : $9,2 \times 10^4$ g/mol) etwas kleiner als die mit Wasser präparierte Probe mit einem M_w von $1,3 \times 10^6$ g/mol (M_n : $1,7 \times 10^5$ g/mol).

4.3 Diskussion

Die Löslichkeitsversuche mit hoch- und niedermolekularem Chitosan (Versuch 4.1.1) zeigen, dass Chitosan auch in alkalischen pH-Bereichen löslich ist. Diese Eigenschaft ist nach vorliegenden Ergebnissen eine Funktion des Molekulargewichtes, da sich nach Abb. 4-3 Konzentrationsänderungen in der Zusammensetzung der Präzipitate hauptsächlich im niedermolekularen Bereich ergeben. Dies wird auch durch die Entwicklung der durchschnittlichen Molekulargewichte bestätigt, welche sich relativ zueinander für das niedermolekulare DAL stärker ändern als für das hochmolekulare FC. Damit muß die allgemein verwendete Aussage, Chitosan sei nur in saurem Milieu löslich, dahingehend modifiziert werden, dass dies nur für hochmolekulare Chitosane gültig ist.

Ethanol wurde in diesem Experiment als Nichtlösungsmittel verwendet, mit dem gelöstes Chitosan durch Verringerung der Dielektrizitätskonstanten des Lösungsmittels zur Fällung gebracht wird. Darüber hinaus wirkt Ethanol auch dehydrierend. Im Falle von Chitosan hat dieser Wasserentzug Auswirkung auf die Ausbildung von teilkristallinen Bereichen (Abb. 4-5). Es kann vermutet werden, dass Chitosanmoleküle sich nicht direkt geordnet aneinanderlagern und kristalline Bereiche ausbilden, sondern dass Wassermoleküle als Brückenbildner dienen und somit intermediär die Teilkristallinität von Chitosan bedingen. Auf dieser Basis ist die Erhöhung der Kristallinität zu erklären, vergleicht man die Diffraktogramme des Chitosan-Ausgangsgemisches (Abb. 4-5/0) und des Präzipitates, welches ohne Ethanol nur in wässrigem Medium hergestellt wurde

(Abb. 4-5/1). Unterstützt wird diese Annahme darüber hinaus durch die abnehmende Kristallinität in den Präzipitaten mit steigendem Ethanolanteil während der Fällung (Abb. 4-5/1 bis Abb. 4-5/4).

Die Fällungsbasen und der Einsatz von Ethanol bzw. Wasser haben Einfluß auf das Molekulargewicht des Produktes. NH_3 und Wasser sind Wasserstoffbrückenbildner und könnten die Assoziation von Molekülen fördern. Vergleicht man nur die NH_3 -Produkte (Abb. 4-6/2 und Abb. 4-6/3), so zeigt die Präparation unter Verwendung von Ethanol ein höheres Molekulargewicht. Es ist anzunehmen, dass Ammoniak in Lösung über die Änderung der Lösungseigenschaften durch Ethanol und durch den Entzug von Wasser eine stärkere Tendenz hat, mit Chitosanmolekülen zu interagieren, als dies bei der Verwendung von Wasser der Fall wäre. Der deutlichste Unterschied ist in der Präparation mit NaOH zu sehen (Abb. 4-6/4). Hier wurde bei gleichem Ausgangsmaterial durch die Verwendung von Wasser eine Verdoppelung des durchschnittlichen Molekulargewichtes bewirkt, was ein Anzeichen für Molekülagglomeration sein kann. Sollten diese Agglomerate durch die Auftrennung in der GPC und durch die im System auftretenden Druck-Scherkräfte nicht aufgelöst werden, so werden nicht die Einzelmoleküle vermessen und damit insgesamt zu hohe Molekulargewichte detektiert. Diese Annahme wird unterstützt durch Abb. 4-6/5, welche eine Verminderung von Mn aufweist, die durch den dehydrierenden und damit agglomerationsabbauenden Effekt von Ethanol bedingt ist.

Die Entwicklung der Kristallinität folgt den Ergebnissen der Molekulargewichtsbestimmung. Teilkristallinität von Chitosan ist in den Wasserpräparaten zu beobachten. Ethanol scheint nicht nur Einfluß auf die Verminderung kristalliner Bereiche durch Wasserentzug zu haben, sondern auch die Ausbildung von geordneten Bereichen durch Einlagerung zu stören. Dies ist bei NH_3 unter Verwendung von Ethanol zu beobachten (Abb. 4-7/3), wo Kristallinität detektiert wurde, jedoch nicht so ausgeprägt ist, wie bei den

Präparationen mit Wasser (Abb. 4-7/2 und Abb. 4-7/4). Abb. 4-7/5 zeigt Restkristallinität, welche noch aus dem Ausgangsmaterial stammen könnte und nicht durch die Präparation aufgelöst wurde.

Aus den Fällungsversuchen mit Chitosan (Versuch 4.1.1 und 4.1.2) läßt sich somit insgesamt die Schlußfolgerung ziehen, dass bei der Präparation von niedermolekularem Chitosan aus chitin-/chitosanhaltigem Ausgangsmaterial zwei Punkte wesentlich sind:

- 1) Niedermolekulares Chitosan darf nur bei der Extraktion in Lösung gebracht werden, bei den anderen Präparationsschritten muß es gegebenenfalls wieder in den Versuchsansatz zurückgefällt werden.
- 2) Durch die Präparation sollte die Bildung von teilkristallinen Produkten vermieden werden, da dadurch eine Assoziation der Moleküle verhindert wird und Gemische von amorphem Chitosan niedrigere Molekulargewichte zeigen werden.

Durch die Verwendung von Ethanol in der Präparation von Chitosan aus Pilzmycel wird Punkt 1 erfüllt. Dies zeigt sich deutlich in der Ausbeutenermittlung für das alkaliunlösliche Material. Durch die Zugabe von Ethanol wird bereits gelöstes Material wieder gefällt, was dann in einer höheren Ausbeute für das AIM gegenüber der Wasserpräparation resultiert. Welche wasserlöslichen Bestandteile diese Fällung insgesamt beinhaltet, ist nicht bekannt.

Eine erhöhte Ausbeute läßt sich allerdings für das Chitosan nicht ermitteln. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass nach der alkalischen Fällung aus der sauren Lösung eine Agglomeration durch die Zugabe von Ethanol verhindert wird, aber dadurch wiederum niedermolekulares Chitosan noch in der Lösung verbleiben kann. In einer Wasserpräparation könnte dieses Chitosan mit anderen Molekülen aggregieren und damit aus der Lösung präzipitieren. Dies würde sowohl eine

erhöhte Ausbeute an Chitosan als auch ein erhöhtes Molekulargewicht bedingen. Die Ermittlung des Molekulargewichtes zeigt den Einfluß von Ethanol auf das Produkt. Im RI-Signal (Abb. 4-9) der mit Hilfe der GPC aufgetrennten Proben von Ethanol-präpariertem Chitosan sind auf der rechten Seite drei miteinander verbundene Peaks zu sehen, welche im Vergleich mit dem Produkt aus der Wasserpräparation durch das zurückgefällte Material hervorgerufen sein müssen. Nach dem errechneten Molekulargewicht ist dieses Areal niedermolekular.

Mit abgestuften, steigenden Ethanolanteilen in den beiden Präparationsschritten läßt sich die Entwicklung des Endproduktes vom hoch- zum niedermolekularen Chitosan verfolgen. Es sind die Ausbildung von Schulterformationen und von Doppelpeaks zu beobachten, welche auf intermolekulare Assoziationsprozesse schließen lassen (Abb. 4-14 bis Abb. 4-18). Der entscheidende Abschnitt zur Verwendung von Ethanol als Nichtlösungsmittel ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die Deproteinierung im ersten Präparationsschritt nach Schema 4-1. Dabei wird niedermolekulares Chitosan aus der Protein-Polymer-Matrix freigesetzt, löst sich in dem alkalischen Deproteinierungsmedium und muß daher wieder zurückgefällt werden. Ohne Ethanolverwendung würde niedermolekulares Chitosan gelöst bleiben und mit dem Überstand verworfen werden. In 4-14/1.0 wurde im ersten Abschnitt Wasser eingesetzt und im zweiten Abschnitt 97 % Ethanol, dennoch zeigt das RI-Signal die typische Konzentrationsverteilung einer Wasserpräparation. Für Versuch 2.0 wurde zuerst Ethanol eingesetzt und im zweiten Abschnitt Wasser. Das Signal des RI-Detektors zeigt hier zwar auch hochmolekulare Bestandteile, jedoch sind die Ausbildung von Peaks mit geringerem Molekulargewicht und der typische rechte Peak einer Ethanolpräparation zu erkennen. Betrachtet man insgesamt die Entwicklung des Molekulargewichtes des präparierten Chitosans aus den Versuchen mit abgestuften Wasser/Ethanolgemischen als Waschmedium (Abb. 4-14 bis Abb. 4-18), so zeigt sich, dass in beiden Präparationsschritten

reines Ethanol zur Rückfällung und zum Waschen verwendet werden muß, um zu verhindern, dass während der Gesamtpräparation niedermolekulares Chitosan in Lösung geht und verworfen wird.

Der Versuch, NaOH als Deproteinierungs- und Fällungsbasis gegen eine flüchtige bzw. besser in Ethanol lösliche Base zu ersetzen, ergab, dass die untersuchten Basen Einfluß auf das Molekulargewicht des zu präparierenden Chitosans nehmen und damit keine Alternative zu NaOH als Deproteinierungs- und Fällungsbasis darstellen. Triethanolamin (TEA) ist zwar sehr gut in Ethanol löslich, jedoch wie NH_3 ein Wasserstoffbrückenbildner, was durch die Abbildung der RI-Signale deutlich wird (Abb. 4-21). Es scheint, dass TEA eine Zwischenstellung zwischen den NaOH-Präparationen mit Ethanol und Wasser einnimmt. Das RI-Signal (Abb. 4-21/1) zeigt in Areal I einen Doppelpick, dessen linkes Maximum mit NaOH in H_2O und dessen rechtes Maximum mit NaOH in Ethanol im Elutionsvolumen übereinstimmt. Damit könnte diese Abbildung eine Zwischenstufe einer Aggregation von niedermolekularem Chitosan zu hochmolekularen Komplexen darstellen.

Da durch den Einsatz von Ethanol hochmolekulares Chitosan nicht mehr auftritt und dieses in der Präparation durch Waschvorgänge nicht entfernt wurde, müßte es, falls vorhanden, noch im Präparationsansatz sein. Die einzige Möglichkeit, dieses Chitosan zu gewinnen, kann nur eine erhöhte Säurekonzentration während des Extraktionsvorganges sein. Die Ergebnisse (Abb. 4-27) zeigen jedoch keine relevanten Unterschiede in den Ausbeuten und den Molekulargewichten bei Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen.

Auf der einen Seite läßt sich somit die Annahme treffen, dass durch die Verwendung von Ethanol hochmolekulares Chitosan in der Präparation nicht erfaßt wird und im Versuchsansatz verbleibt. Denkbar wäre eine Beladung der langkettigen Moleküle mit durch Ethanol denaturierte Proteine, welche ansonsten wasserlöslich sind und nun zurückgefällt wurden, so dass eine saure

Extraktion des Chitosans durch Nichtlöslichkeit dieser Komplexe verhindert wird.

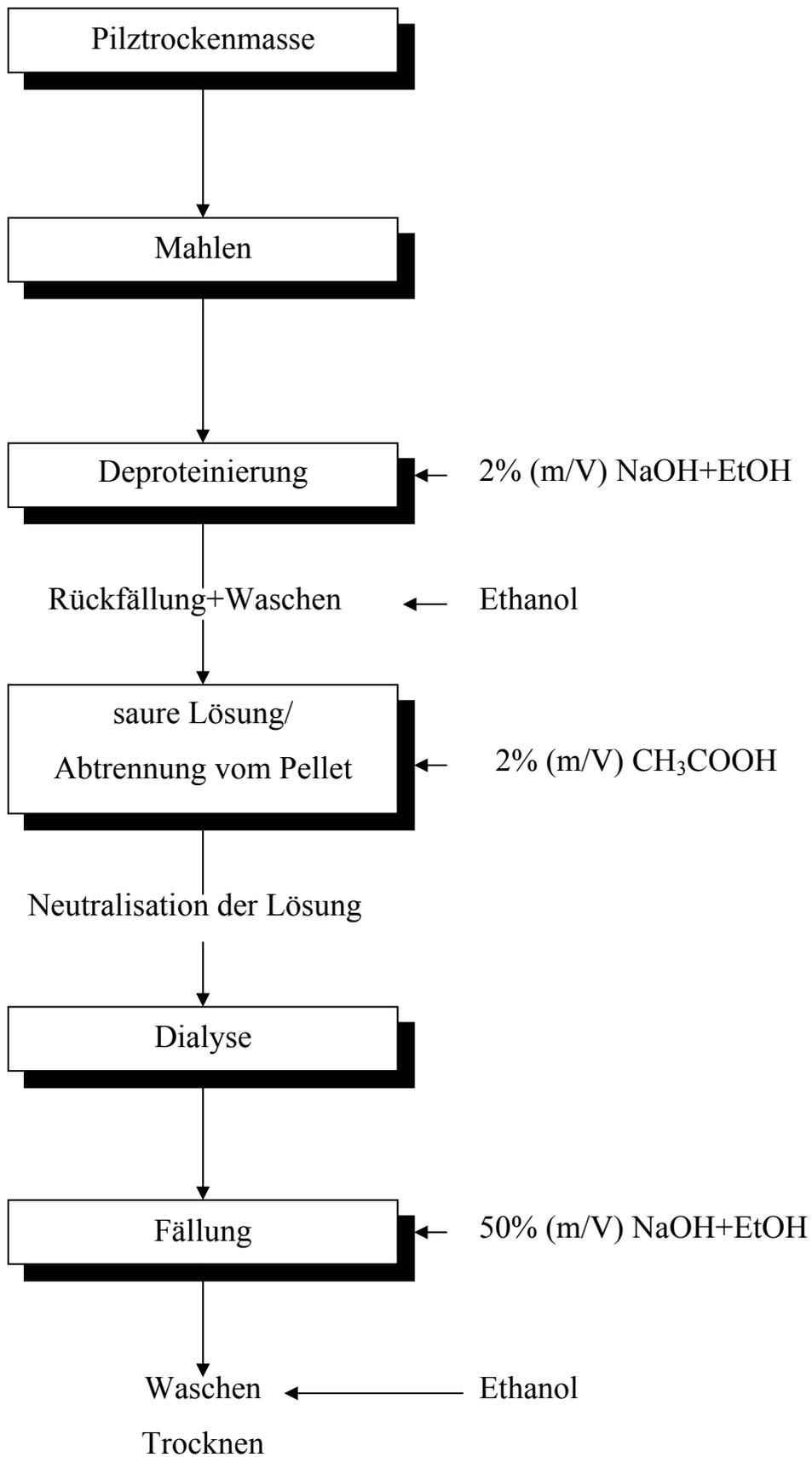
Auf der anderen Seite wäre auch annehmbar, dass hochmolekulares Chitosan nicht in der beschriebenen Größenordnung in Pilzen existiert. Die Angaben in der Literatur und den hier dargestellten Ergebnissen aus Kapitel 3 weisen demnach dann Molekulargewichte von löslichen Chitosanagglomeraten aus, welche durch die Präparationsmethode gebildet und bei der Lösung zur Vermessung des Molekulargewichtes in der GPC nicht wieder vollständig in Einzelmoleküle aufgetrennt wurden. Unterstützt wird diese Annahme durch die Frage nach dem Verbleib von niedermolekularem Chitosan in diesen Präparationen, da Chitosan in den Zellwänden nicht ad hoc hochmolekular gebildet wird, sondern Monomer für Monomer in Chitinform aufpolymerisiert wird. Diese Zwischenstufen müßten in einer Präparation auftreten. Geht man von einem Monomer-Ringdurchmesser von 1 nm aus und berechnet auf Basis der Molekulargewichte der produzierten hochmolekularen Chitosane die entsprechende Anzahl von Untereinheiten, so erhält man Moleküllängen von bis 10 μm . Diese Länge entspräche dem mehrfachen Umfang einer Pflanzenzelle, so dass es fraglich sein könnte, ob in diesem Verhältnis derartig hochpolymerisierte Einzelmoleküle durch die Zellen produziert werden und mit welchem Mechanismus der Vortrieb eines solchen Moleküls aus der Zellmembran zur Einlagerung in die Zellwandmatrix bewerkstelligt wird.

Mit Hilfe der Dialyse wurden die niedermolekularen Bestandteile größtenteils aus dem Präparationsansatz entfernt. Es bestand jedoch bei allen durchgeführten Aufreinigungen dieser Arbeit das Problem, dass während der Dialyse Chitosan aus der Lösung präzipitierte. Es ist anzunehmen, dass dadurch die Poren des Dialyseschlauches verstopften und eine quantitative Dialyse verhindert wurde. Nebenversuche ergaben, dass der pH-Wert der Probe und des Dialysates möglichst übereinstimmen sollten, um dieses Problem zu verringern, jedoch

konnte eine vorzeitige Präzipitation des Chitosans und damit verbundener Verunreinigungen nicht vollständig verhindert werden.

Der Versuch zur Präparation von niedermolekularem Chitosan aus Krabbenschalen nach der Ethanolmethode erbrachte keine relevante Molekulargewichtsdifferenz zu Krabbenchitosan, welches im Parallelversuch unter Verwendung von Wasser produziert wurde. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass zur Herstellung von Krabbenchitosan die Demineralisierung mit einer starken Säure durchgeführt werden muß. Dabei wird das entstehende Chitosan als Base fungieren und sofort protoniert werden, was die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und daraus folgend eine Agglomeration begünstigen könnte. Im Gegensatz dazu erfolgt die Herstellung von Pilzchitosan unter Verwendung von Ethanol im alkalischen bis neutralen pH-Bereichen. Nur die Extraktion wird mit einer schwachen Säure durchgeführt, welche aber durch die alkalische Fällung und dehydrierende Wirkung von Ethanol aus dem Chitosan entfernt wird.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist die Herstellung von niedermolekularem Chitosan nach der Ethanolmethode nur aus der Biotrockenmasse von Mucoralesarten möglich. Als Präparationsmethode zur direkten Gewinnung von niedermolekularem Chitosan wird folgender Herstellungsgang vorgeschlagen:



Schema 4-2 Herstellungsschritte zur direkten Präparation von niedermolekularem Chitosan aus der Biotrockenmasse von Mucoraceae

5 CHARAKTERISIERUNG VON NIEDERMOLEKULAREM CHITOSAN

Nach den in Kapitel 2 beschriebenen Methoden wurde das auf der Basis der Untersuchungen in Kapitel 4 hergestellte kurzkettige Chitosan (LMCh) untersucht. Hierzu wurden die physiko-chemischen Parameter von LMCh denen der industriellen Referenzproben gegenübergestellt.

5.1 Molekulargewicht

Das mittlere und das zahlenmäßige Molekulargewicht sind in Abb.5-1 für die Referenzproben von Kap. 2 und für das LMCh aufgetragen

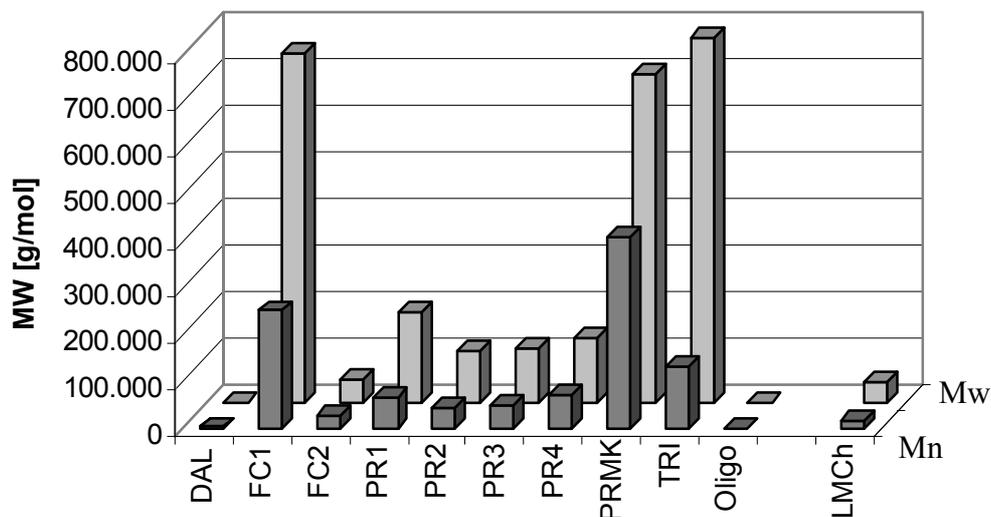


Abb. 5-1 Molekulargewichte von LMCh und der Referenzproben

Mit einem Mw von $4,5 \times 10^4$ g/mol und einem Mn von $1,6 \times 10^4$ g/mol ist das direkt aus dem Pilzmycel präparierte und dialysierte Chitosan niedermolekular. Im Vergleich mit den Proben aus Krabbenchitosan liegt nur FC2 (Mw: $4,93 \times 10^4$ g/mol, Mn: $2,88 \times 10^4$ g/mol) in diesem Molekulargewichtsbereich.

5.2 Identitätsprüfung und Bestimmung des Desacetylierungsgrades

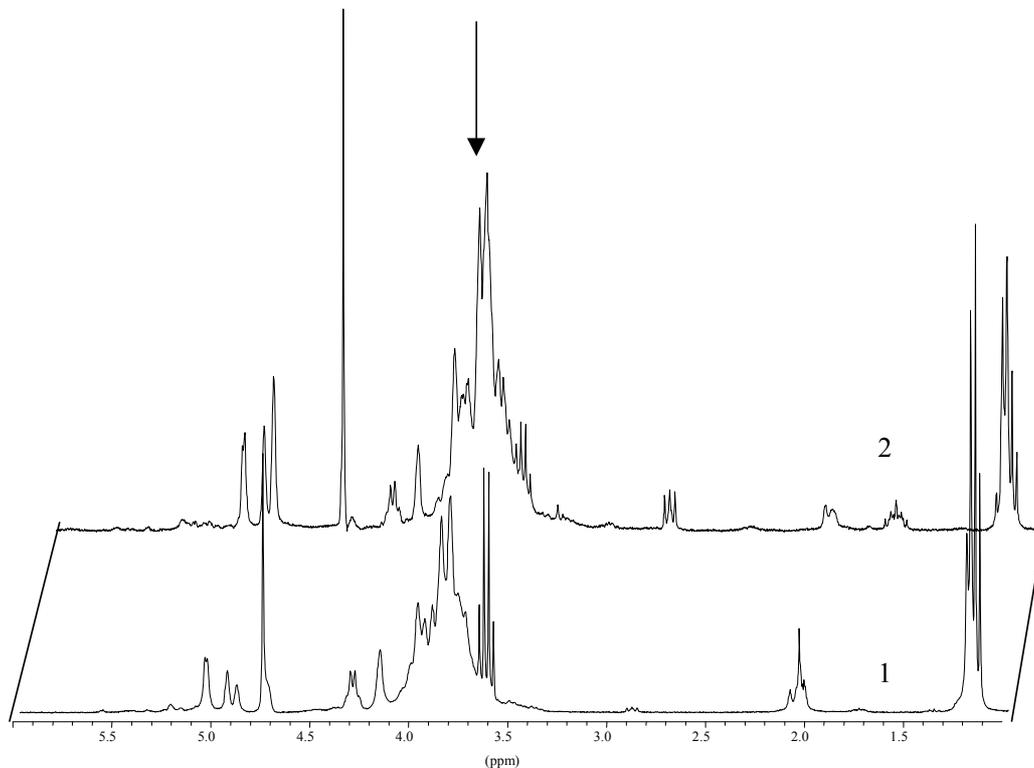


Abb. 5-2 ^1H -NMR-Spektren von verschiedenen Proben von LMCh

Die Spektren zeigen einen typischen Verlauf für niedermolekulares Chitosan. Es sind Resonanzüberlagerungen (Abb. 5-2 / Pfeil) zu verzeichnen, welche in Spektren von hochmolekularem Chitosan zu einem Peak (Abb. 2-3) vereinigt sind. Die Basislinie ist in Spektrum 1 ebener als in Spektrum 2. Die Signale der beiden Spektren sind übereinstimmend, obwohl beide Proben aus unterschiedlichem DCM präpariert wurden.

Bei 3,6 ppm und 1,2 ppm sind Signale vom Ethanol vorhanden, welche in Spektrum 1 ein relativ groß sind.

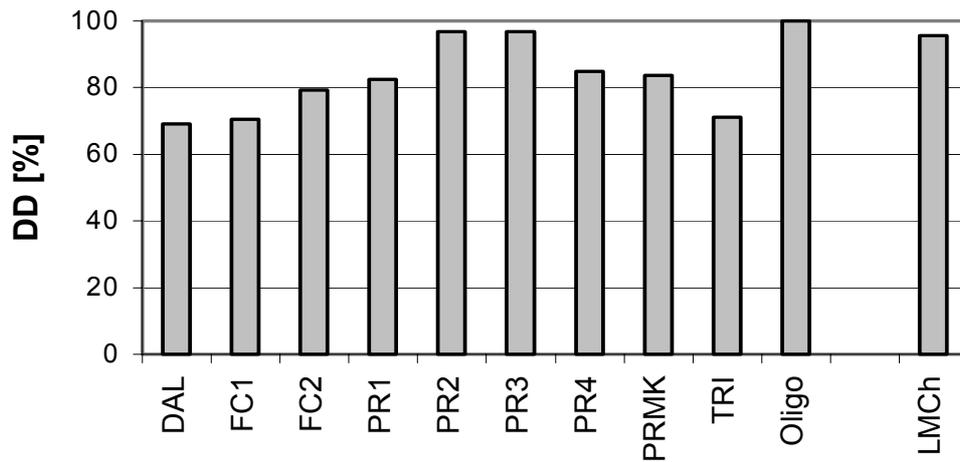


Abb. 5-3 Desacetylierungsgrad von LMCh und den Referenzproben

Der Desacetylierungsgrad von LMCh beträgt 96 % und entspricht damit dem von PR2 und PR3. Insgesamt sind alle Proben mit einem DD von über 70 % hoch desacetyliert.

5.3 Kristallinität

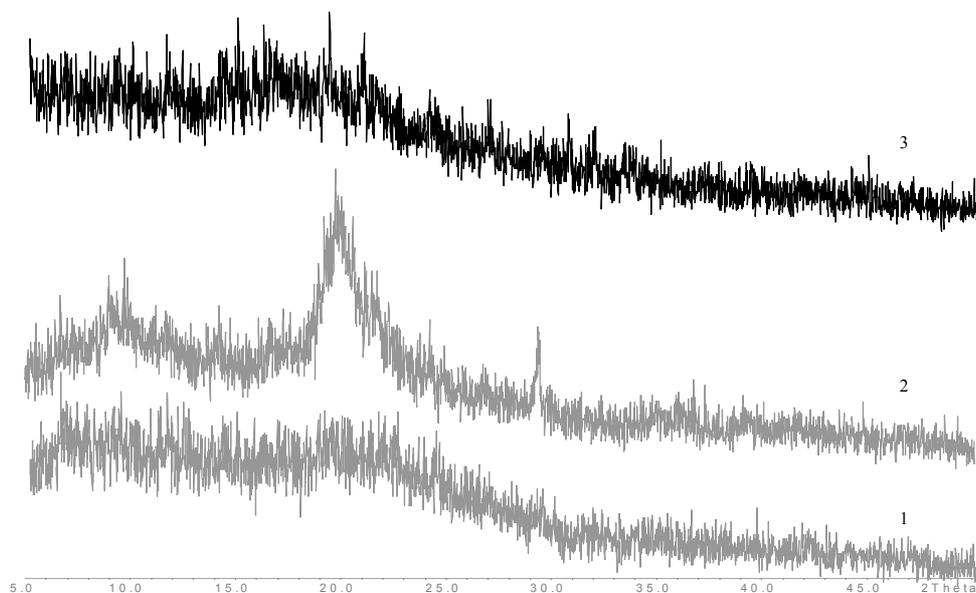


Abb. 5-4 Röntgendiffraktogramme von 1) DAL, 2) FC1 und 3) LMCh

Das Röntgendiffraktogramm zeigt eine amorphe Struktur von LMCh.

5.4 Bestimmung der Partikelgröße und strukturelle Untersuchung

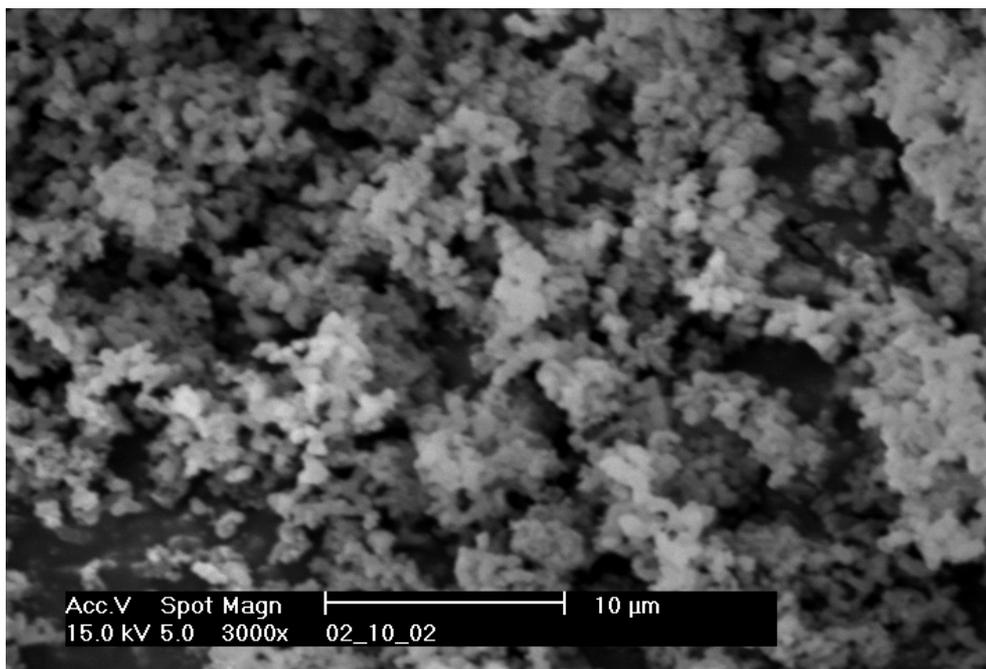
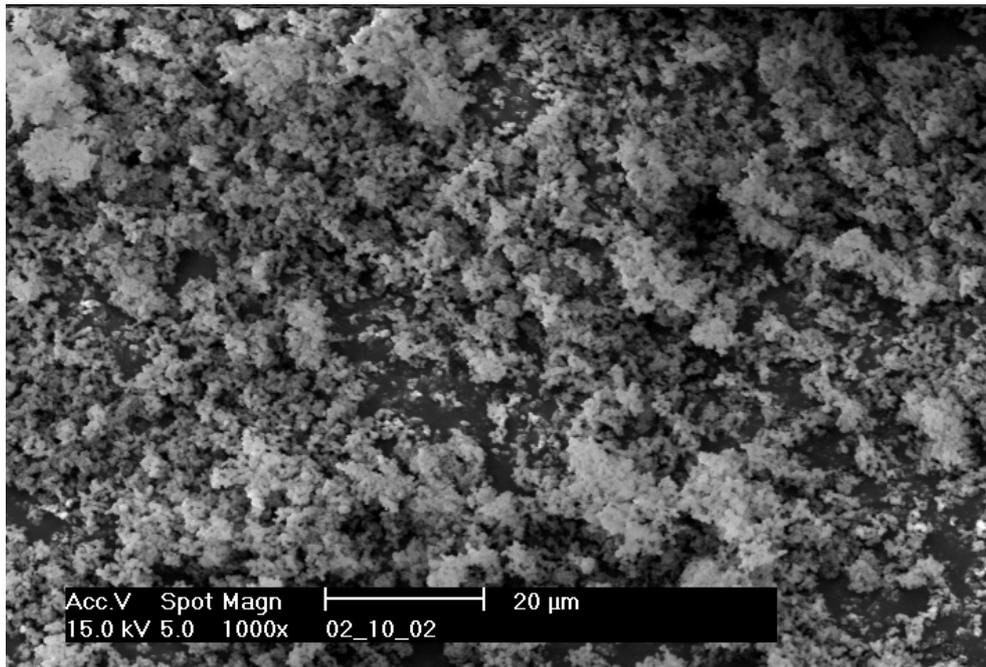


Abb. 5-5 REM-Aufnahmen von LMCh (1000x/3000x)

In der Aufnahme sind unregelmäßige Zusammenlagerungen von abgerundeten Partikeln zu erkennen. Die Probe ist in sich homogen, Fremd Beimengungen sind nicht zu detektieren.

Die Partikelgröße ist so gering, dass sie nicht mehr scharf aufgelöst und abgebildet werden kann. Die dafür nötige Spannung und die damit verbundene Wärmeeinwirkung würde diese organische Probe ansonsten im Rasterelektronenmikroskop zerstören. Weil auf dieser Grundlage keine Größenschätzung gemacht werden kann, wurde die in Kapitel 2.1.4 beschriebene PCS durchgeführt. Die Partikelgrößenverteilung von LMCh ergibt eine mittlere Teilchengröße von $442.1 \pm 123,1$ nm.

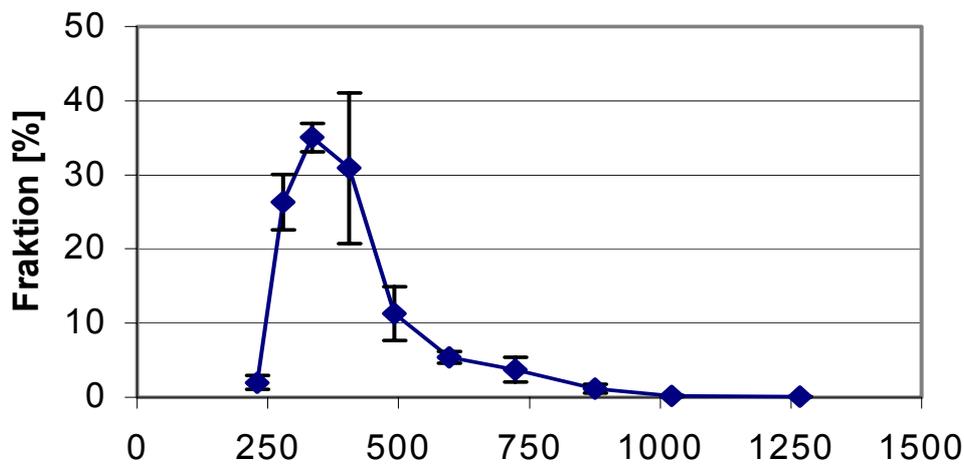


Abb. 5-6 Partikelgrößenverteilung von LMCh [nm]

5.5 Wassergehaltsbestimmung

Mit 17 % weist LMCh den höchsten Feuchtigkeitsgehalt auf. Auffällig ist, dass DAL als Referenzprobe mit dem höchsten Wassergehalt auch mit Ethanol präpariert wurde (Abb. 2-4) und mit einem Gehalt von 15 % nahe bei dem von LMCh liegt (Abb. 5-7).

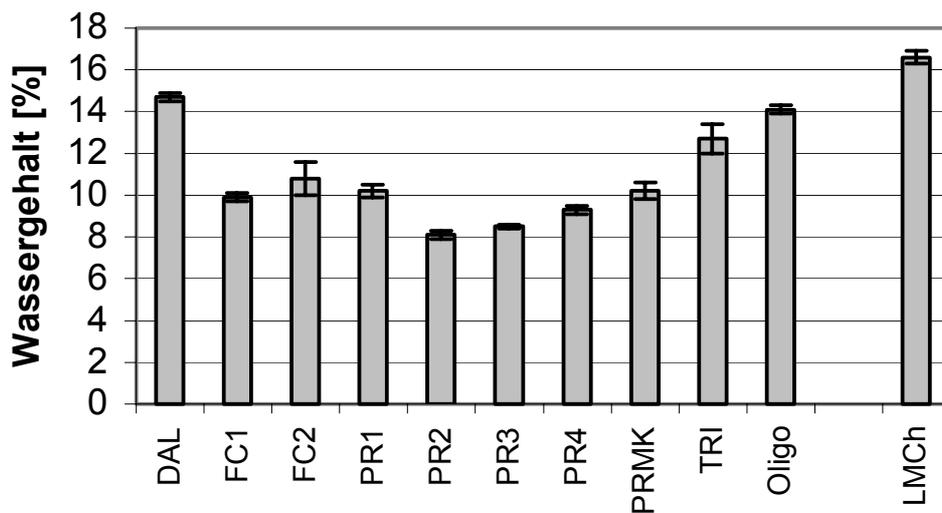


Abb. 5-7 Wassergehalt von LMCh und den Referenzproben

5.6 Bestimmung des Reinheitsgrades von LMCh

5.6.1 Bestimmung anorganischer Bestandteile (Ph. Eur. 4.02 - 2.4.14)

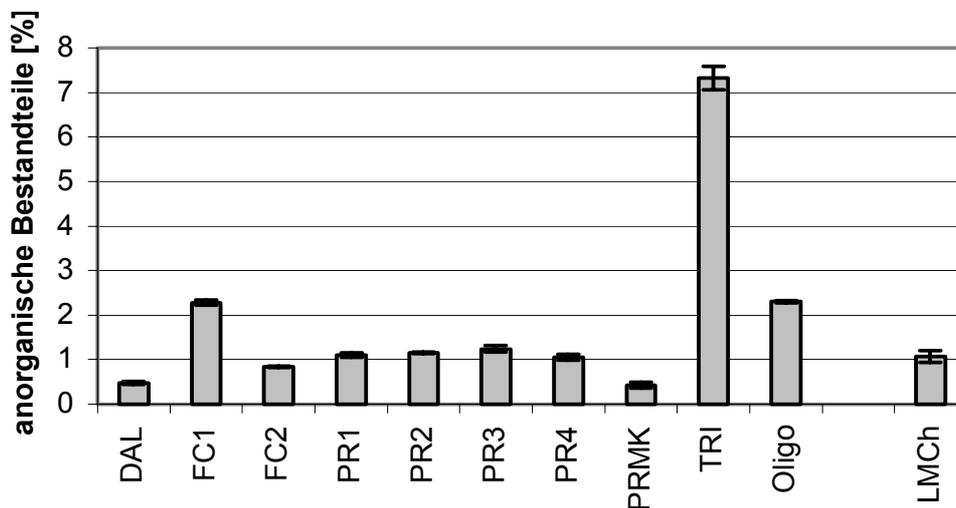


Abb. 5-8 Gehalt an anorganischen Bestandteilen in LMCh und den Referenzproben

LMCh hat anorganische Bestandteile in Höhe von 1 %. Dieser Wert liegt im Mittel des Gehaltes der untersuchten industriell hergestellten Chitosane. Für die Biotrockenmasse wurde ein Sulfataschegehalt von $7,4 \pm 0,4$ % ermittelt.

5.6.2 Bestimmung des Restproteingehaltes

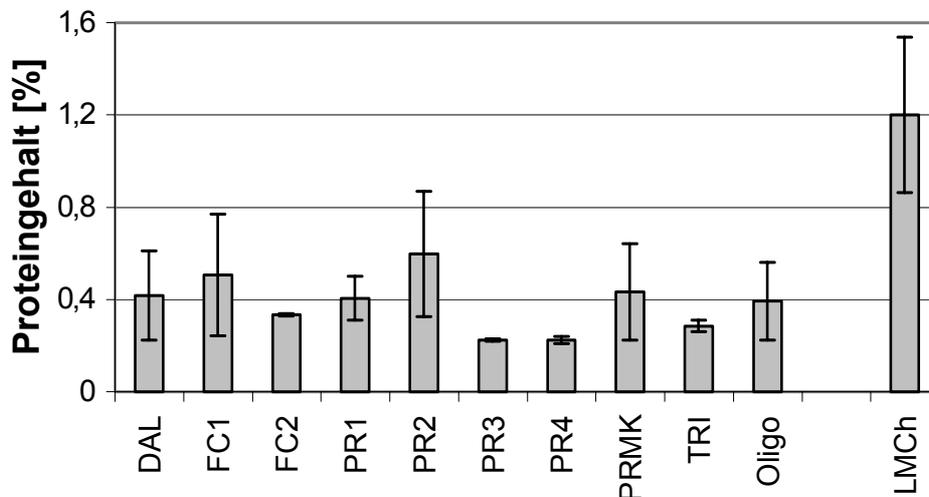


Abb. 5-9 Restproteingehalt in LMCh und den Referenzproben

Der mittlere Restproteingehalt von LMCh liegt mit 1,2 % über den Werten der Referenzproben.

5.7 Gehaltsbestimmung an bakteriellen Endotoxinen sowie (1-3)- β -D-Glucanen aus Pilzen

Immunreaktionen können durch bakterielle Endotoxine, Lipopolysaccharide bakterieller Zellwände und durch β -(1-3)-D-Glucane, welche Bestandteile der Zellwände von Pilzen sind, hervorgerufen werden. Diese Reaktion dient als Abwehr des menschlichen Organismus gegen eine invasive Besiedlung durch eine Bakterien- bzw. Pilzinfektion.

Als Nachweisreagenz werden Amöbozyten von *Limulus polyphemus*, einer Pfeilschwanzkrebs-Art, verwendet. Diese Blutzellen reagieren nach Kontakt mit den immunogenen Zellwandbestandteilen, indem sie lysieren (LAL: *Limulus*-Amöbozyten-Lysat) und Zymogene freigeben. Diese werden zu aktiven Serin-Proteasen, welche über Zwischenstufen eine Gelbildung durch Spaltung von Koagulogenen zu Koagulin bewirken und damit auch den Verschuß einer Wunde

in dem Pfeilschwanzkrebs ermöglichen. Das Prinzip der Gelbildung wird im Test zur semiquantitativen Bestimmung auf Endotoxine verwendet (nach Angaben von Ph. Eur. 4.02 - 2.6.14).

Die Menge an aktiviertem Enzym korreliert mit der Konzentration von Pyrogenen. Unter Verwendung eines künstlichen Testsubstrates, welches am Ende der Aktivierungskette durch diese Proteasen gespalten wird, kann ein quantitativer Nachweis von β -(1-3)-D-Glucanen geführt werden. Durch die Abspaltung von p-Nitroanilin (pNA) vom Substrat und eine anschließende spektrometrische Quantifizierung der Konzentration von pNA erfolgt eine Quantifizierung. Die beiden Testreihen wurden nur mit LMCh durchgeführt, da eine Löslichkeit bei neutralen pH-Werten erforderlich war.

Der Test auf bakterielle Endotoxine wurde nach Anleitung von Cape Cod Inc. (Falmouth, MA, USA) durchgeführt. In pyrogenfreie Röhrchen wurde rekonstituiertes LAL-Reagenz mit einer Empfindlichkeit von 0,03 EU/ml (empfindlichstes markterhältliches Testreagenz) gegeben. In diese Röhrchen wurden 0,1 ml der zu untersuchenden Substanz pipettiert. Tests wurden im Dreifachansatz mit jeweils einer Negativprobe und einem Endotoxinstandard durchgeführt. Alle Ansätze wurden bei 37 °C für 1 h inkubiert und auf Gelbildung geprüft. Die Prüfung der hier verwendeten Probe von LMCh auf bakterielle Endotoxine erbrachte für eine Probenkonzentration von 25 mg/ml keine Gelbildung, diese erfolgte dagegen bei einer Konzentration von 50 mg LMCh/ml Lösung. Damit liegt der Pyrogenanteil zwischen 0,6 bis 1,2 IE/g LMCh.

Die Quantifizierung von Pilz-Glucan wurde nach Anleitung des Glucatell™ (1-3)- β -D-Glucan Detection Reagent Kits von Cape Cod Inc. für einen kinetischen Assay vorgenommen, in dem über den mittleren Anstieg der Absorption pro Zeiteinheit die Glucankonzentration ermittelt wird. Eine Standardreihe mit einem Konzentrationsbereich von 0-50 pg/ml β -D-Glucan

wurde hergestellt. Die Proben wurden nach Anleitung im Dreifachansatz in Mikrotiterplatten aufbereitet und die Absorption bei 405 nm gegen 490 nm im Plattenlesegerät über 40 min vermessen. Mit der angeschlossenen Software wurde über die Werte der Standardreihe der β -D-Glucan-Gehalt der Proben ermittelt. Bei einer Chitosankonzentration von 50 mg LMCh/ml ergab die Messung der Konzentration von (1-3) β -D-Glucanen im Test 32,5 ng/ml. Der relative Glucananteil betrug somit $6,4 \times 10^{-5} \%$.

5.8 Agglomeration und Kristallisation von LMCh - Einlagerung von Wasser

Im Umkehrschluß zum Versuch einer Verminderung der Kristallinität durch Lösung und Fällung unter Ethanolzusatz (Versuch 4.1.1.3) soll im folgenden gezeigt werden, in welchem Ausmaß das mit Ethanol entwässerte Chitosan zu einer Kristallisation gebracht werden kann. LMCh wurde mit Wasser versetzt und gelöst. Danach wurde die Lösung bei 50 °C eingetrocknet. Dieser Vorgang wurde mehrfach als Zyklus wiederholt.

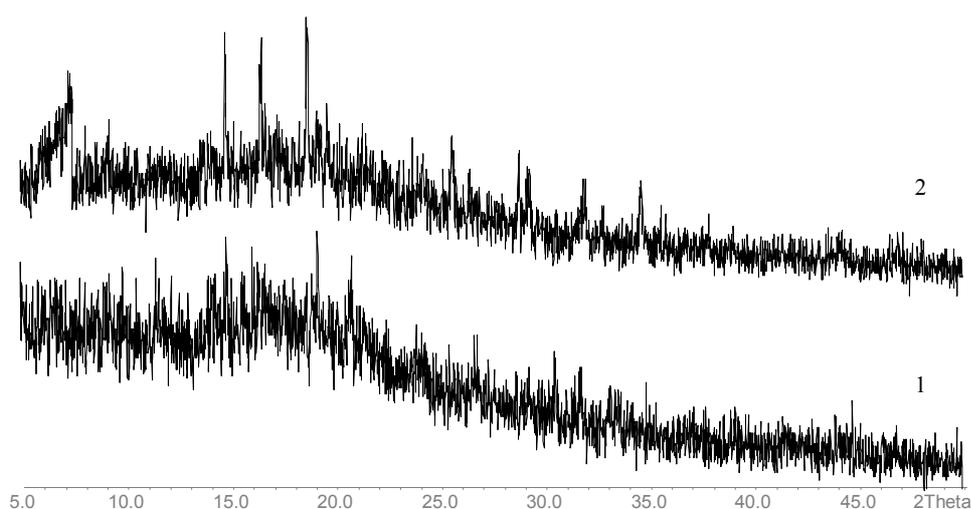


Abb. 5-10 Röntgendiffraktogramme 1) vor dem Wässern und 2) nach dem Wässern

Vom Ursprungsmaterial (1) ausgehend ist die Entwicklung von Signalen im Bereich bei $2\theta = 9^\circ$ und 20° zu beobachten. Diese Signale sind im Vergleich zu denen von teilkristallinem Chitosan (Abb. 2-5) schwach ausgeprägt.

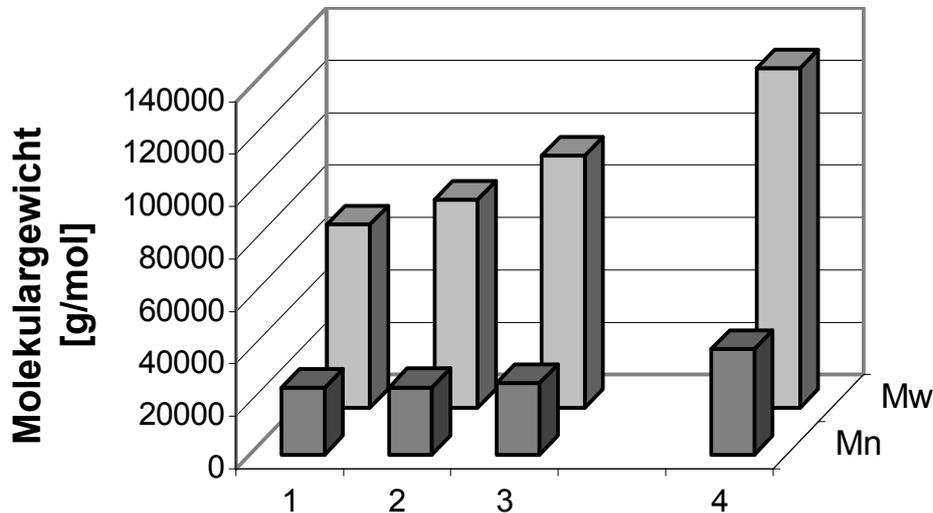


Abb. 5-11 Molekulargewicht im Verlauf des Agglomerationsversuches

(1, 2, 3: aufeinanderfolgende Wässerungs-Trocknungs-Zyklen

4: nach fünf weiteren Wässerungs-Trocknungs-Zyklen)

Ausgehend von Versuch 1 bis zu Versuch 4 ist eine Erhöhung des durchschnittlichen Molekulargewichtes um den Faktor 1,8 ist zu verzeichnen. Dieser Molekulargewichtsentwicklung von Mw folgt Mn mit einem Faktor von 1,6.

5.9 Diskussion

LMCh ist ein niedermolekulares Chitosan. DAL und Oligo stellen Oligomere aus Chitosan bzw. N-Glukosamin dar und wären durch ihr niedriges Molekulargewicht nicht für eine parenterale Anwendung z.B. als Drugcarrier geeignet, da sie über die Nieren sofort wieder ausgeschieden würden.

In der Reihe der Referenzproben hat FC2 ein ähnliches durchschnittliches Molekulargewicht, sowie ein doppelt so hohes zahlenmäßiges Molekulargewicht. Im Gegensatz zu LMCh ist FC2 jedoch nicht wasserlöslich. Demnach scheint die durch das Molekulargewicht determinierte Löslichkeit von

Chitosan in Wasser bei einem Mn unterhalb von $1,6 \times 10^4$ g/mol bis $2,9 \times 10^4$ g/mol zu liegen. Ferner müssen zusätzlich noch vergleichbare Desacetylierungsgrade gegeben sein, welche die Fähigkeit zur Protonierung und damit zur Löslichkeit bedingen. FC2 hat einen um 16% niedrigeren Desacetylierungsgrad als LMCh, wobei jedoch mit 80% aller Untereinheiten dieses Chitosan wie LMCh hoch desacetyliert ist.

Im ^1H -NMR-Spektrum sind Spuren von Ethanol zu verzeichnen. Dieser Restanteil konnte trotz langer Trocknungszeiten und Vakuumbehandlung nicht eliminiert werden. Es ist anzunehmen, dass der Anteil von Ethanol wie in Spektrum 5-2/2 physiologisch unbedenklich ist. Entscheidend ist jedoch in diesem Zusammenhang die Frage, in welchem Ausmaß Restbestandteile von Ethanol die Bindungsfähigkeit für Wirkstoffe beeinflusst, wenn Chitosan als Wirkstoffträger benutzt werden soll. Sollte dies der Fall sein, müßte nach der Dialyse auf eine alkalische Fällung unter Ethanolzusatz (Kap. 4.2.4) verzichtet und eine direkte Sprühtrocknung der dialysierten Chitosanlösung durchgeführt werden. Diese Methode konnte in dieser Arbeit aufgrund der im Labormaßstab kleinen Mengen an produziertem Chitosan nicht durchgeführt werden.

LMCh ist amorph und verfügt damit über keine geordneten intermolekularen Strukturen. Dies bewirkt im Vergleich zu FC2 eine bessere Löslichkeit bei neutralem pH-Wert, da die Einzelmoleküle größere Abstände untereinander haben, als dies in einer kristallinen Struktur mit entsprechender Nahordnung der Fall wäre. Darüberhinaus werden die guten Lösungseigenschaften durch die geringe Partikelgröße von LMCh unterstützt.

Anorganische Bestandteile sind durch die Präparation weitgehend entfernt worden. Es sollte möglich sein, diesen Wert zu verbessern, indem auf eine alkalische Fällung und der damit verbundenen Salzbildung in der Extraktionslösung verzichtet und das Chitosan durch Sprühtrocknung gewonnen wird.

Der Restproteingehalt liegt über den Werten der übrigen Chitosanmuster. Es ist anzunehmen, dass die Ursache für diesen Gehalt in der Dialyse zu suchen ist. Durch die vorzeitige *In-situ*-Ausfällung des Chitosans und der damit einhergehenden Verstopfung der Poren des Dialyseschlauches konnten niedermolekulare Bestandteile nicht quantitativ entfernt werden.

Da sich die Durchführung der Deproteinierung in der Ethanolpräparation bis auf die Rückfällung von löslichem Material nicht von der Wasserpräparation unterscheidet, kann man annehmen, dass die Deproteinierung bei diesen beiden Herstellungsgängen zu einer vergleichbar quantitativen Zerstörung der Protein-Chitosan-Matrix der Zellwand führt. Die freigesetzten und rückgefällten Bestandteile bilden die typischen drei ineinander übergehenden Peaks im niedermolekularen Bereich des RI-Signals der GPC-Auftrennung (Abb.4-9). Dagegen wird Areal I weitgehend durch das in der Probe vorhandene Chitosan gebildet, wie das ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 5-2) der dialysierten Probe belegt. Demnach sind Chitosan und Restprotein durch die Vorbehandlung über ihre Molekulargewichte schon weitgehend voneinander getrennt, so dass durch eine bessere Methode (z.B. Cross Flow Filtration) eine Trennung möglich sein sollte. Das produzierte LMCh ist weitgehend pyrogenfrei. Der Gehalt an gramnegativen Bakterien, der den Eintrag von Endotoxinen bedingt, dürfte durch die Nutzung von Ethanol in dieser Präparationsmethode gering gehalten werden. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, da das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Chitosan nicht unter aseptischen Bedingungen produziert wurde. Das europäische Arzneibuch erlaubt Endotoxingehalte für parenterale Applikationen von 5 IE/kg Körpermasse/h. Bewertet man das Ergebnis im Zusammenhang mit diesen Angaben, so könnten bei einem Durchschnittsmenschen von 70 kg LMCh-Gaben in Höhe von 290 - 583 g/h appliziert werden. Es ist darüber hinaus auch anzunehmen, dass die Ethanolpräparation der Wasserpräparation überlegen ist, da sich durch die Behandlung des Zellmaterials zu keinem Zeitpunkt günstige Bedingungen für

bakterielles Wachstum einstellen. Während beispielsweise die Endtrocknung des produzierten Chitosans hier auf der Grundlage eines hohen Ethanolgehaltes erfolgt, ist bei der herkömmlichen Methode in diesem finalen Präparationsschritt eine gute Grundlage für bakterielles Wachstum durch den Wasser- und Kohlenhydratgehalt gegeben.

Der Glucangehalt von LMCh ist äußerst gering. Es könnte auf dieser Grundlage angenommen werden, dass im Downstream-Processing von Chitosan (1-3)- β -D-Glucan wie auch andere Polysaccharide während der sauren Lösung durch den Verbleib im Pellet abgetrennt und dann verworfen werden, so dass diesbezüglich mit der Ethanolpräparation eine sehr effektive Extraktionsmethode für Chitosan gegeben ist.

Der Versuch zur Teilkristallisation von amorphem LMCh durch Wassereinlagerung (Versuch 5.8) ist als Ergänzung zu den unter 4.1 aufgeführten Versuchen der Verminderung des teilkristallinen Zustandes von Chitosan durch Lösung und Präzipitierung unter Ethanolzusatz zu bewerten. Es konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, daß Wasser zur Ausbildung der Teilkristallinität von Chitosan beiträgt und eine Veränderung des gemessenen Molekulargewichtes bewirkt. Auf dieser Basis kann auch angenommen werden, daß Chitosanassoziate während der Gelpermeations-Chromatographie nicht bzw. nur in geringem Maße aufgetrennt werden und demnach zu hohe Molekulargewichte ermittelt werden. Andererseits kann jedoch auch keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit LMCh ein heterogenes Gemisch von Einzelmolekülen darstellt oder ob nicht doch, wenn auch in geringem Ausmaß, eine Agglomeration von Chitosanmolekülen stattgefunden hat.

6 BEEINFLUSSUNG DES MOLEKULARGEWICHTES VON CHITOSAN DURCH KULTIVIERUNGSPARAMETER

Die Zellwand einer Pflanzenzelle stellt die Verbindung des Zellinneren und seiner Produkte zur Außenwelt, seien es andere Zellen oder abiotische Umweltfaktoren, her. Durch sie werden im biotischen Umfeld Zell-Zell-Interaktionen, -Erkennung, chemische Signaltransduktion zur Kommunikation, etc. bewerkstelligt. Als Bestandteil einer Epidermalzelle bzw. eines One-Layer-Zellverbandes, wie er auch im Pilzmycel gegeben sein kann, garantiert die Zellwand darüber hinaus als Reaktion auf abiotische Umweltfaktoren die Integrität der Zelle, gibt mechanische Formstabilität und bewirkt durch ihre physiko-chemische Ausstattung den Schutz der Zelle. Basierend auf der Variabilität von Umweltfaktoren und den sich hieraus stellenden Herausforderungen, stellt die Zellwand als Organell ein flexibles System von Einzelkomponenten dar, welches sich als Reaktion auf die Umwelt in der gegebenen genetischen und biomechanischen Ausstattung verändern kann. Hierzu werden diese integralen Bestandteile vermehrt, abgebaut bzw. chemisch modifiziert. Chitosan erfüllt sowohl mechanische wie auch biochemische (z.B. Verhinderung des Zellwandabbaus durch Chitinasen) Aufgaben. Der Polymerisationsgrad der Einzelmoleküle dieses Chitinderivates trägt hauptsächlich zur mechanischen Formstabilität der Zelle bei. Dies wird zusätzlich auch durch die quantitative Ausstattung der Zellwand mit Chitin und Chitosan gewährleistet. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, durch Veränderung von abiotischen Umweltbedingungen eine Veränderung des Molekulargewichtes des durch die Zelle produzierten Chitosans und eine Erhöhung der Ausbeute an niedermolekularem Chitosan mit eventuell verändertem Molekulargewicht zu bewirken.

6.1 Kultivierung verschiedener Altersstufen

In einer Batch-Kultur durchläuft die Kultur einen Lebenszyklus, der in der Wachstumskurve Ausdruck findet. Es wurde untersucht, in welchem Ausmaß sich die Zellwandausstattung des Pilzmycels mit Chitosan in verschiedenen Zeitabschnitten der Kultivierung verändert. Der Wachstumsversuch wurde mit *A. coerulea* nach 3.1.3 durchgeführt und das Biomaterial nach 3.1.4 aufbereitet.

Abb. 3-1 stellt die Ausbeute an DCM in diesem Langzeitversuch dar. Die Präparation des Chitosans erfolgte diesmal nach Schema 4-1. Der Vergleich der Ausbeuten an alkaliunlöslichem Material aus den Präparationen nach Schema 1-2 (H₂O) und nach Schema 4-1 unter Verwendung von Ethanol zeigt höhere Ausbeuten durch Verwendung von Ethanol.

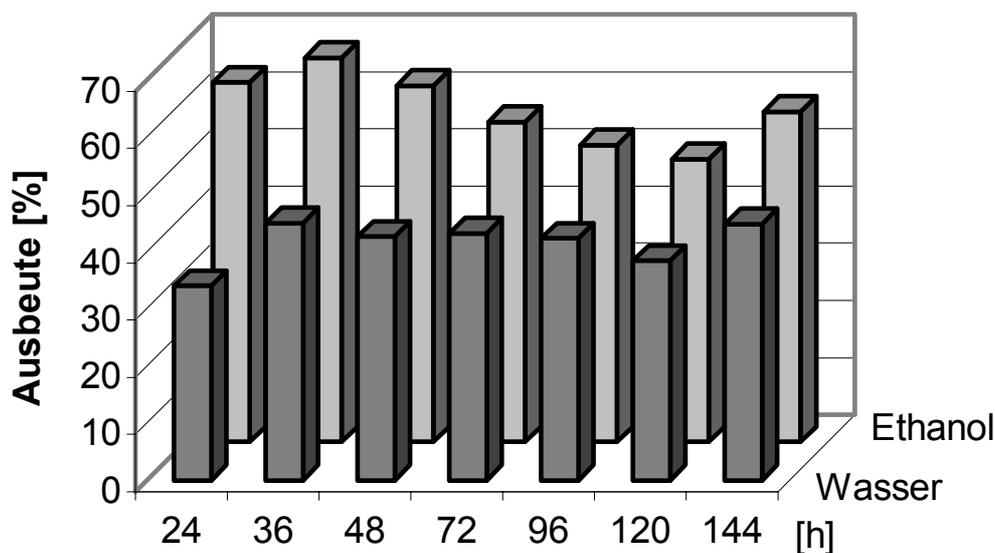


Abb. 6-1 Vergleich der Ausbeute von AIM aus den Altersfraktionen

Innerhalb einer Präparationsreihe zeigt sich bei Verwendung von Wasser ein Anstieg von 34 % im 24-stündigen Wachstumsversuch auf 45 % nach 36 h. Für ältere Kulturen liegt die Ausbeute dann zwischen 38-45 %.

In der Ethanolreihe ergibt sich ein Abfall von 67 % (36 h) auf ein Minimum von 50 % (120 h). Der Wert des Versuches über 144 h folgt nicht dieser Entwicklung, sondern liegt mit 57 % nahe bei dem Ergebnis des Versuches über 72 h. In beiden Präparationsansätzen ist eine generelle Abnahme der produzierten Menge an Chitosan zu verzeichnen.

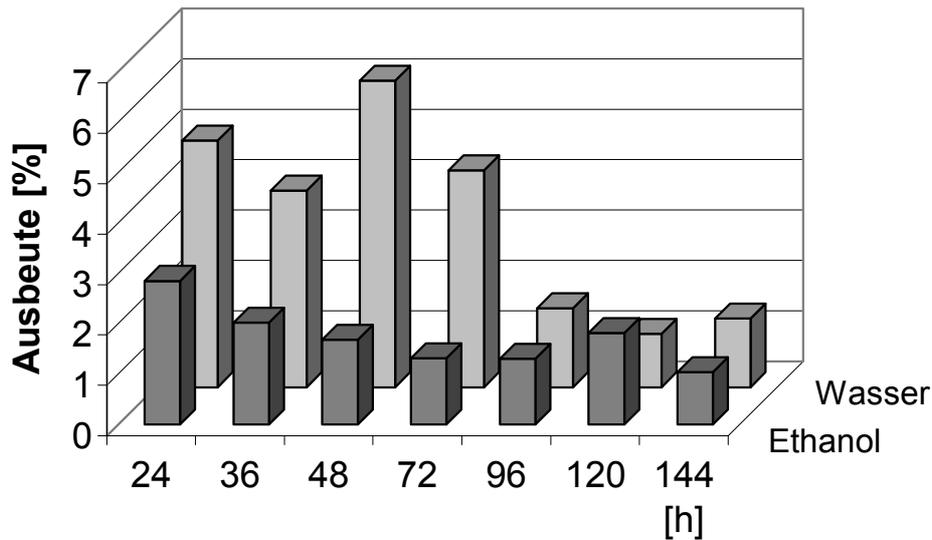


Abb. 6-2 Vergleich der Ausbeute an Chitosan aus den Altersfraktionen

Für die Wasserpräparation zeigt sich ein relativ hohes Ausbeuteniveau von 4-6 % für eine Wachstumszeit von 24-72 h. Es erfolgt für die darauffolgenden Versuche bis 144 h ein Abfall auf 1-1,6 % produziertes Chitosan bezogen auf die Einwaage. Die Präparation mit Ethanol folgt dieser Entwicklung, jedoch sinkt die Ausbeute kontinuierlich von 2,9 % (24 h) bis auf 1 % (144 h).

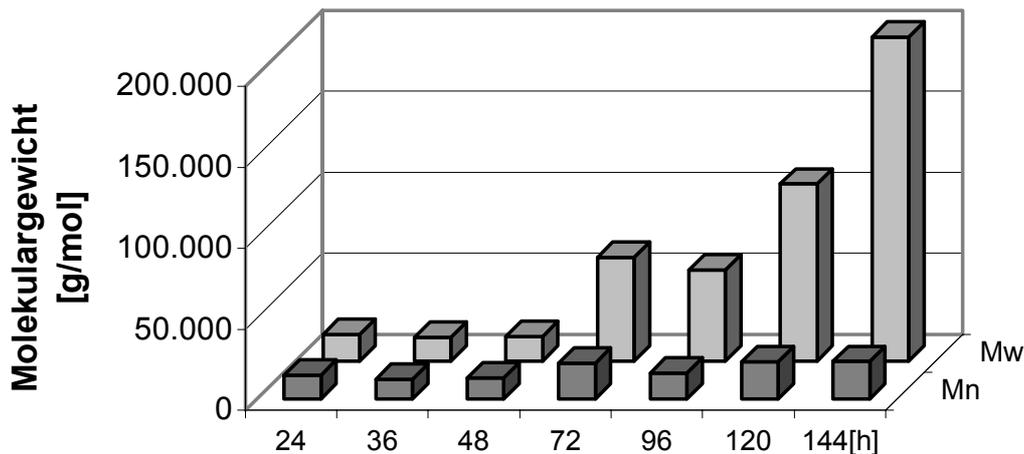


Abb. 6-3 Molekulargewicht des Chitosans aus den Altersfraktionen

Im Verlauf des Wachstumsversuches ist eine Zunahme des Mw ab 72 h festzustellen. In den ersten 48 h bleibt das durchschnittliche Molekulargewicht auf einem Niveau von $1,5 \times 10^4$ g/mol. Danach steigt es von $6,4 \times 10^4$ g/mol (72 h) auf bis zu $1,9 \times 10^5$ g/mol (144 h). Das zahlenmittlere Molekulargewicht folgt dieser Entwicklung in geringerem Maße. Die ersten drei Teilversuche erreichen ein Mn von $1,2-14 \times 10^4$ g/mol. In den nachfolgenden Präparationen nimmt Mn dann auf $2,2-2,3 \times 10^4$ g/mol zu. Der Versuch über 96 h unterbricht diese Entwicklung durch ein etwas geringeres Mw und Mn, was versuchsbedingt auf eine zu große Pelletbildung des Mycels im Kulturansatz zurückzuführen sein könnte. Dies führt zu Mangelbedingungen für die inneren Zellen im Pellet (s.a. Kap.3, Seite 58).

6.2 Kultivierung unter osmotischem Streß

In hypotonem Medium steht die Zelle vor der Herausforderung einer Deplasmolyse, welche im Extremfall zum Platzen der Zelle führen kann. Im Normalfall bewirkt das Zellwandgerüst den Aufbau des Gegendruckes. Nachfolgend wurde untersucht, ob als Reaktion auf osmotischen Streß eine

Verdickung der Zellwand durch erhöhte Produktion von Chitin/Chitosan und damit eine erhöhte Ausbeute an Chitosan bewirkt werden kann.

Vier Versuche von *A. coerulea* in doppeltem Ansatz wurden nach 3.1.2 für 48 h kultiviert. Nach 48 h wurde das Mycel unter sterilen Bedingungen geerntet und mit bidest. Wasser gewaschen. Die Referenzkultur wurde sofort nach 3.4 aufbereitet. Die restlichen Kulturen wurden in bidest. Wasser auf dem Schüttler belassen und für 12, 24 bzw. 48 h dem osmotischem Streß durch ein hypotones Medium ausgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Mycele geerntet und nach 3.4 für die weitere Präparation vorbereitet. Als Test auf Lebensfähigkeit wurde Mycel dieser Versuche auf Agarplatten gegeben und einige Tage inkubiert.

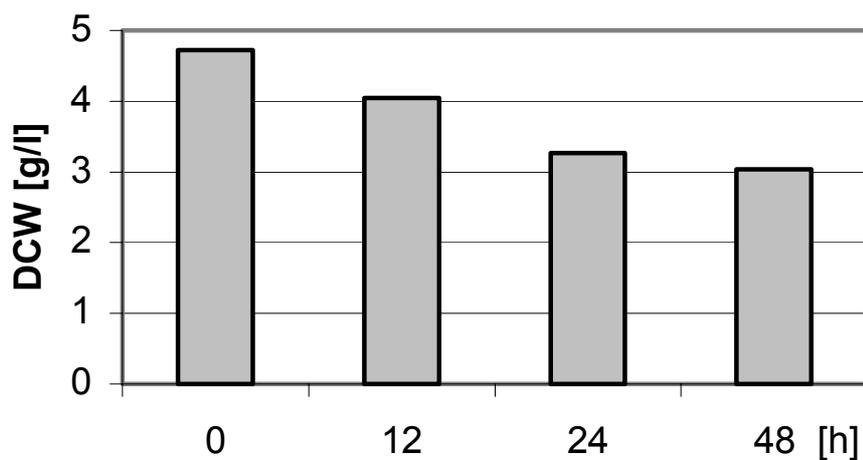


Abb. 6-4 Ausbeute an Biotrockenmasse der Kulturen nach hypotonem Streß

Ausgehend von der Referenzkultur, welche eine Ausbeute von 4,7 g/l an getrocknetem Pilzmycel ergab, sank die Menge an produziertem Biomaterial mit der Dauer des Verbleibens in bidest. Wasser kontinuierlich bis zu einem Minimalwert von 3 g/l. Alle Mycele waren nach dem Streßversuch noch aktiv und keimten auf Agarplatten bis zum Ausbilden von Sporangien aus.

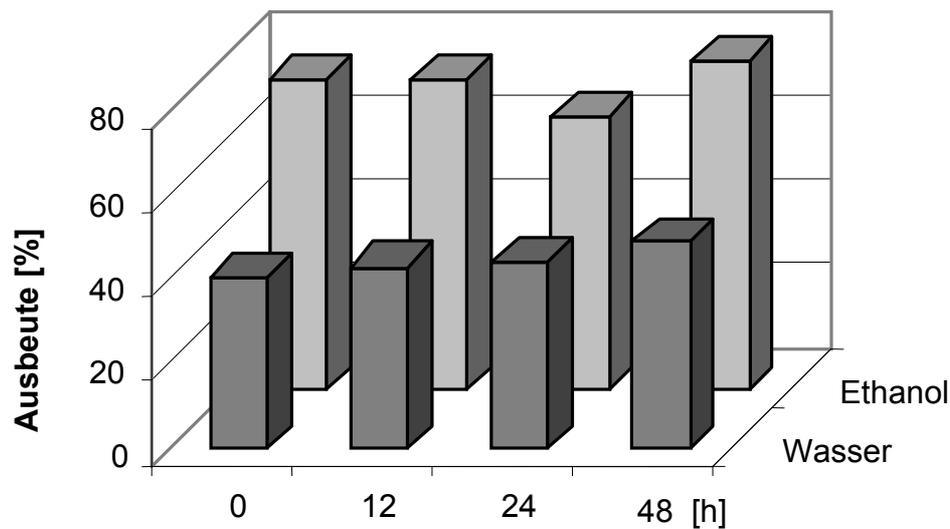


Abb. 6-5 Vergleich der Ausbeute an AIM der Kulturen nach hypotonem Streß

Das DCM wurde sowohl nach Schema 1-2 mit Wasser als auch nach Schema 4-1 unter Verwendung von Ethanol zur Herstellung von Chitosan (mit AIM als Zwischenprodukt) präpariert.

Mit der Dauer des osmotischen Stresses ist in der Wasserreihe ein leichter Anstieg der Menge an produziertem AIM von 40 % (Abb. 6-5/0: kein Streß) bis 49 % (Abb. 6-5/48: nach 48 h Streßbedingungen) der Trockenmasse zu verzeichnen. Diese Entwicklung ist auch in der Reihe von Ethanol zu sehen. Hier erfolgt ein Anstieg von 73 % auf 78 %. Unterbrochen wird dieser Verlauf nach 24 h Streßbedingungen, hier wurde eine Ausbeute von nur 65 % erreicht, was auf Präparationsverluste zurückzuführen ist.

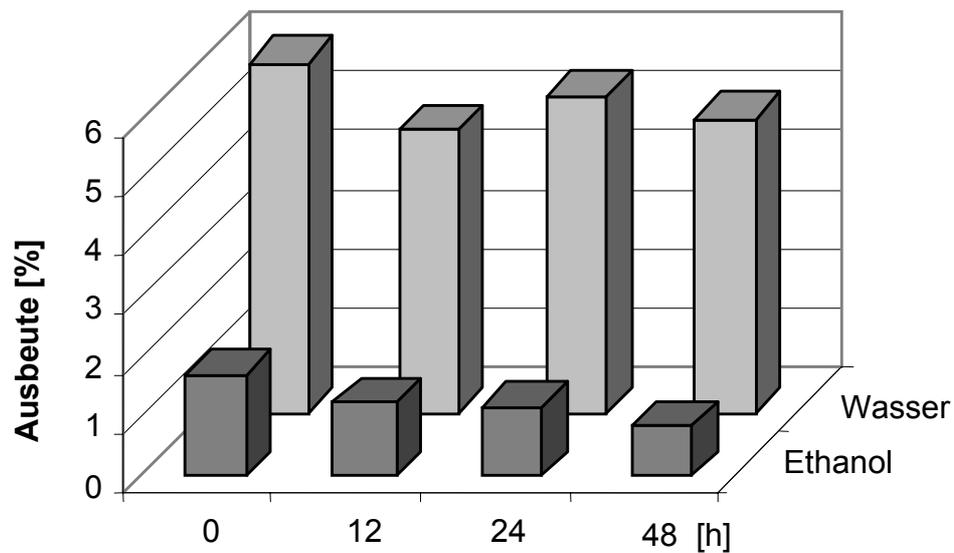


Abb. 6-6 Vergleich der Ausbeute an Chitosan nach hypotonem Kultivationsstreß

Die unter hypotonem Kultivationsstreß produzierten Chitosanmengen sind in beiden Reihen rückläufig. In der Herstellung mit Wasser konnten 5,9 % Chitosan nach 48 h im Kulturmedium ohne nachfolgende Streßeinwirkung gewonnen werden. Im Streßversuch ergaben sich 4,7 % (nach 12 h Streßbedingungen), 5,2 % (nach 24 h Streßbedingungen) und 4,9 % (nach 48 h Streßbedingungen). Wurde Ethanol zur Präparation verwendet, war nach 48 h im Kulturmedium ohne nachfolgende Streßeinwirkung eine Ausbeute von 1,7 %. In den nachfolgenden Wachstumsversuchen wurden 1,2 % (nach 12 h Streßbedingungen), 1,1 % (nach 24 h Streßbedingungen) und 0,8 % (nach 48 h Streßbedingungen) hergestellt.

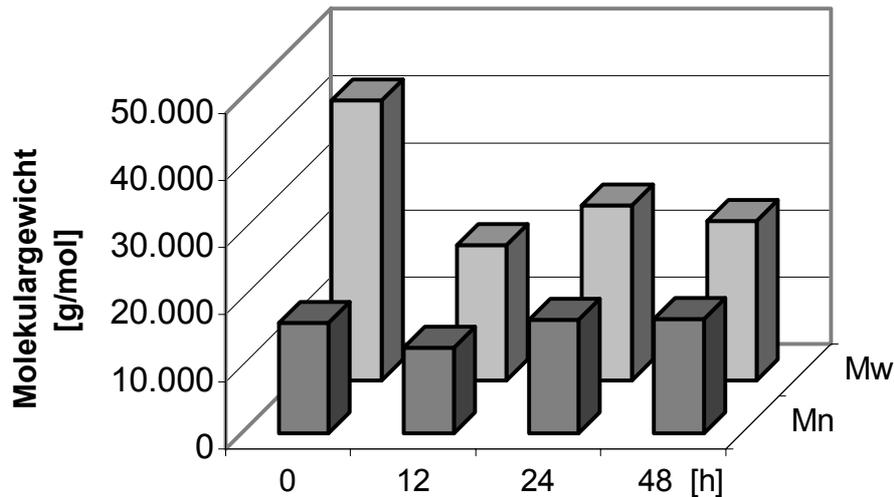


Abb. 6-7 Molekulargewicht von nach Schema 4-1 unter Verwendung von Ethanol produziertem Chitosan der Streßkulturen

Das ohne osmotischen Streß produzierte Chitosan hat ein Mw von $4,2 \times 10^4$ g/mol. Dieser Wert fällt bei den gestressten Kulturen auf $2,0-2,6 \times 10^4$ g/mol. Das Mn aller Kulturen verbleibt dagegen auf einem relativ einheitlichen Niveau zwischen $1,2-1,7 \times 10^4$ g/mol.

6.3 Diskussion

Die Kultivierungsparameter haben Einfluß auf Ausbeute und Molekulargewicht des Chitosans. Mit zunehmendem Alter einer Pilzkultur verringert sich der Chitosangehalt in den Zellwänden. Ursache dafür könnte sein, dass Chitosan eine physiologische Funktion in den jungen Zellen der log-Phase erfüllt, die über eine substantielle Matrixbildung in der Zellwand hinausgeht. Allerdings könnte die Abnahme auch eine Reaktion auf die Änderung der Zusammensetzung des Kulturmediums mit einhergehender Änderung des pH-Wertes sein. Eine sterile kontinuierliche Erfassung und Nachführung des pH-Wertes war mit diesen Kulturansätzen nicht möglich.

Wie in Abb. 3-12 hat sich auch das Molekulargewicht des mit Ethanol präparierten Chitosans der einzelnen Altersfraktionen erhöht. Damit konnten

Literaturangaben nicht bestätigt werden, welche von einer Verminderung des Molekulargewichtes im Zeitverlauf einer Wachstumskultur berichten (Arcidiacono, Lombardi et al. 1988). Allerdings weichen auch die Kultivierungs- und Präparationsmethode von den in dieser Arbeit verwendeten Methoden ab, was die unterschiedlichen Resultate bedingen könnte.

Man kann davon ausgehen, daß die hier eingesetzten Präparationsmethoden bei Raumtemperatur eine sehr schonende Freisetzung des Chitosans aus dem Zellwandmaterial bewirkten. Auf dieser Basis sollte das produzierte Chitosan den *status quo* von nativem Chitosan in der Zellwand hinsichtlich Ausbeute, Molekulargewicht als auch Desacetylierungsgrad darstellen. Es ließe sich für die Alterskulturen daher annehmen, daß Chitinmoleküle durch die Synthetasen im Verlauf des aktiven Stadiums einer Zelle kontinuierlich aufpolymerisiert werden. Sollten zusätzlich die Desacetylasen nur im frühen Stadium einer Zelle aktiv sein, so ließe sich damit die abnehmende Ausbeute und zugleich die Erhöhung des Molekulargewichtes des Chitosans mit zunehmendem Alter einer Pilzkultur erklären.

Die Kultivierung unter osmotischem Streß erbrachte dagegen eine Verminderung des Molekulargewichtes des produzierten Chitosans. Die Entwicklung der Ausbeute an Biotrockenmasse zeigt deutlich einen Substanzabbau im hypotonen Kulturmedium, was auf eine Nährstoffunterversorgung schließen läßt. Die Verminderung des Molekulargewichtes des Chitosans der Streßkulturen läßt die Annahme zu, daß die Zellen eine Umstrukturierung der Zellwand als Reaktion auf feindliche Umweltbedingungen vorgenommen haben. In einer Streßsituation durch erhöhten osmotischen Innendruck ließen sich durch niedermolekulare Gerüstbausteine dichtere Strukturen in der Zellwand gestalten, um die Zelle vor einer Zerstörung zu schützen. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die

Zunahme an AIM, so könnten noch zusätzlich Zellwandbestandteile wie β -1,3-Glucane gebildet worden sein, die eine stabilisierende Quervernetzung in der Wandmatrix bewirken. Diese Form der Kultivierung mit *in vivo* erbrachter Manipulation des Molekulargewichtes ist einfach durchzuführen und wäre somit für die Herstellung niedermolekularen Chitosans mit einem niedrigem Polydispersitätsgrad effizient einzusetzen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war die biotechnologische Herstellung von niedermolekularem Chitosan aus Pilzen.

Die Methoden zur Charakterisierung von Chitosan wurden anhand kommerzieller Referenzchitosanproben festgelegt. Als qualitätsbestimmende Merkmale von Chitosan in dieser Arbeit wurden das Molekulargewicht, der Desacetylierungsgrad, die Kristallinität, die Partikelgröße und -struktur, der Wassergehalt und der Reinheitsgrad bezüglich anorganischer Beimengungen und des Restproteingehaltes analysiert. Die Referenzchitosane deckten ein breites Spektrum an Molekulargewichten ab und hatten einen hohen Desacetylierungsgrad. Hochmolekulare Proben waren teilkristallin, während dagegen niedermolekulares Chitosan eine amorphe Zusammensetzung aufweist. Auf der einen Seite sind die Chitosanpartikel durch Mahlung hergestellt worden und weisen unregelmäßige Strukturen mit einer Größe von 20 µm bis 150 µm auf. Andererseits wurde Sprühtrocknung zur Produktion von Chitosan eingesetzt, resultierend in runde hohlräumige Partikel mit einem Durchmesser von 5 µm bis 50 µm. Der Wassergehalt der industriellen Proben lag zwischen 8 % bis 15 %, anorganische Verunreinigungen betragen zwischen 0,5 % bis 7,3 % und der Anteil des Restproteingehaltes in diesen Proben war relativ gering mit 0,2 % bis 0,6 %.

Zur Chitosanproduktion wurden vier Mucoralesarten hinsichtlich Biomasse- und Chitosanausbeute und in diesem Zusammenhang die erforderlichen Kultivierungsbedingungen untersucht. Das nach Literaturangaben hergestellte Chitosan aus Pilzen ist hochmolekular und weist Eigenschaften von aus Krabben hergestelltem langkettigen Chitosan auf. Daher wurde mit Biomaterial aus *Absidia coerulea* eine neue Methode zur direkten Präparation von niedermolekularem Chitosan aus Pilzen entwickelt.

Vorversuche mit kommerziellem Chitosan ergaben eine Löslichkeit von niedermolekularem Chitosan in wässrigem Medium bis in alkalische pH-Bereiche. Darüber hinaus konnte aufgezeigt werden, daß die Nutzung von Wasser die Ausbildung von Teilkristallinität und Molekülagglomeraten bedingt, welche zur Messung von hohen Molekulargewichten führt. Darauf basierend wurde der Einsatz von Ethanol als Nichtlösungsmittel im Herstellungsprozess von Chitosan aus Pilzen untersucht. Ethanol bewirkt über eine Erniedrigung der Dielektrizitätskonstanten des Präparationsmediums eine Fällung von gelöstem niedermolekularem Chitosan und zugleich wird durch Wasserentzug die Ausbildung von Agglomeraten vermindert.

Es konnte somit niedermolekulares Chitosan direkt aus dem Rohmaterial präpariert werden, welches nach einer abschließenden Aufreinigung über Dialyse ein vergleichbares $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wie die Referenzproben aufweist. Eine Herstellung von niedermolekularem Chitosan aus Krabbenschalen kann mit dieser Methode nicht durchgeführt werden.

Eine abschließende Charakterisierung des niedermolekularen Chitosans mit den bereits erwähnten Methoden und ein Vergleich mit den Referenzchitosanen ergab neben dem geringen Molekulargewicht eine amorphe Zusammensetzung und eine geringere Partikelgröße von 440 nm. Der Feuchtigkeitsgehalt war gegenüber den Vergleichsproben leicht erhöht. Der Gehalt an anorganischen Bestandteilen war vergleichbar, wohingegen der Restproteingehalt zwar gering, aber dennoch doppelt so hoch war wie der der kommerziellen Proben. Eine Prüfung des niedermolekularen Chitosans auf bakterielle Endotoxine und (1-3)- β -D-Glucane ergab Werte, welche unterhalb der Anforderungen des Europäischen Arzneibuches liegen.

Weiter ausführende Untersuchungen zur einfachen Beeinflussung des Molekulargewichtes über Veränderung von Kultivierungsparametern resultierten in veränderten Chitosanausbeuten und Molekulargewichten, welche auf den jeweils spezifischen Wachstumsbedingungen der Kulturen basierten.

Summary

The aim of this work was the biotechnological production of chitosan with low molecular weight from fungi.

The analytical methods for characterization of chitosan used in this thesis were determined with commercial reference chitosans. Quality determining characteristics of chitosan, such as molecular weight, grade of deacetylation, crystallinity, particle size and structure, water contents and purity relative to ash content and protein content were analysed. The chitosans used as references had a broad spectrum of molecular weights and a high grade of deacetylation. High molecular samples were partly crystalline, but in contrast low molecular chitosan had an amorphous composition. Particles of chitosan were produced by two methods, firstly by grinding and therefore presented irregular shapes with a size of 20 μm to 150 μm . In the second method spray drying was used for production of chitosan, which resulted in round hollow particles with a diameter of 5 μm to 50 μm . The water content of the industrial samples was between 8 % and 15 %, the anorganic impurities were between 0,5 % and 7,3 % and the content of residual protein left in these samples was relatively low with 0,2 % to 0,6 %.

For production of chitosan four species of the order Mucorales were screened relative to yield of biomass and yield of chitosan and in this context the conditions of culturing were analysed. The chitosan produced from fungi according to the methods given in literature was of high molecular weight and had the same characteristics of these long chained chitosans produced from crabs.

On this basis a new method for direct preparation of low molecular chitosan from fungi was developed, using mycelia from *Absidia coerulea* as raw material. Preliminary experiments with commercial chitosan gave evidence for a solubility of low molecular chitosan in aqueous medium up to alkaline pH. Furthermore, it could be shown that the use of water causes crystallinity and the

agglomeration of molecules to occur, which leads to a measurement of higher molecular weights. Based on this the use of ethanol as a non-solvent for the production of chitosan from fungi was examined. This causes precipitation of the already solved chitosan by lowering the dielectricity constant of the preparational medium. Furthermore, the formation of agglomerates is minimized by eliminating the water through ethanol.

Therefore low molecular weight chitosan can be directly prepared from the raw material, which after a final purification through dialysis presents a $^1\text{H-NMR}$ -spectrum comparable to the reference chitosans. Low molecular weight chitosan from crab shells cannot be produced with this method.

A final characterization of the low molecular chitosan with the named methods and a comparison with the reference chitosans resultated beside the low molecular weight in an amorphous composition and a particle size of 440 nm. The water content was slightly higher than the samples used for comparison. The content of anorganic parts was comparable but the content of residual protein, although still small, was twice as much as within the commercial samples. The examination of the low molecular chitosan for bacterial endotoxins and (1-3)- β -D-glucans resulted in lower contents than demanded by the European Pharmacopoeia.

Further research was carried out on the manipulating of the molecular weight by changing culture conditions. This resulted in changed yields of chitosan and molecular weights, which are based on the specific growing conditions of the cultures.

8 ANHANG

8.1 Substanzen

8.1.1 Kommerzielle Chitosane

Chitopure 026	FishContract (Bremerhaven, D)
Chitopure XP	FishContract (Bremerhaven, D)
MD5	Primex (Siglofjordur, Island)
TD127	Primex (Siglofjordur, Island)
TM1070	Primex (Siglofjordur, Island)
TM003	Primex (Siglofjordur, Island)
Mikrokristallines Chitosan	Primex (Siglofjordur, Island)
S-1247	Tricorporation (Alpharetta, USA)
Oligomeres Chitosan	Seikagaku

8.1.2 Chemikalien

Acenaphthen	Merck
Ammoniumsulfat	Merck
Ethanol	Merck
Bacillol	Kruse
Calciumchlorid	Merck
Deuteriumoxid	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Eisen-III-chlorid	Merck
Eisen-II-sulfat	Merck

Essigsäure	Merck
Glucosaminhydrochlorid	Merck
Glucose	Merck
Hefeextrakt	Difco
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kupfer-II-sulfat	Merck
L-2-Aminobuttersäure	Sigma
Magnesiumsulfat	Merck
Mangan-II-chlorid	Merck
N-Acetyl-D-glucosamin	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Pepton	Merck
Salzsäure	Merck
Triethanolamin	Roth

8.2 Geräte

0,2 µl-Spritzenvorsätze	Minisart	Sartorius
Dialyseschläuche	MWCO 2000 Spectra	Roth
Dispergiergerät	Ultra-Turrax T25	IKA-Labortechnik
Magnetrührer	IKA-Combimag	IKA-Labortechnik
Moisture Analyzer	MA50	Sartorius
Kernresonanzspektrometer	ARX300	Bruker
pH-Meter	pH 540 GLP	WTW
REM	XL20	Philips
Schüttler	GFL 3005	GFL
Sputter Coater	SCD 005	Bal-Tec AG

Tischzentrifuge	Biofuge 17 RS	Heraeus-Sepatech
Trockenschrank	T6	Heraeus
Ultra Centrifuge Tubes		Beckman
Ultrazentrifuge	L7-65 Ultrazentrifuge	Beckman
Zentrifugengefäße 50ml		Nunc

8.3 Protokoll HPLC-Fluoreszenzdetektion

Controller:	Waters 600S
Fluoreszenzdetektor:	2475 Multi λ (Waters, Milford, USA) $\lambda_{\text{ex}}=250$ nm $\lambda_{\text{em}}=395$ nm
Pumpe:	Waters 616 Flußrate: 1 ml/min
Autosampler:	Waters 717plus Injektionsvolumen: 10 μ l
Software:	EZChrom Elite 2.8.3 (Scientific Software, Inc.)
Mobile Phase:	Eluent A: 0,14 M Natriumacetat 0,017 M Triethylamin pH 5.0 Eluent B: Acetonitril Eluent C: Wasser

Zeit	%A	%B	%C
0	100	0	0
0.5	99	1	0
18	95	5	0
19	91	9	0
28	83	17	0
35	0	60	40
38	100	0	0

Tab. 7-1 Gradientenprofil

Stationäre Phase: Nova-Pak C₁₈ Senty Guard (Waters Corp.)
 Temperatur: 37 °C

8.4 Protokoll GPC-Massenbestimmung

Streulichtdetektor: miniDawn Tristar, Wyatt Technology (Woldert, D)

RI-Detektor: Shodex RI SE-51, Showa Denko KK

Pumpe: Kontron Instruments HPLC 320

Flußrate: 1 ml/min

Autosampler: Kontron Instruments HPLC 560

Injektionsvolumen: 100 µl

Mobile Phase: Essigsäure/Natriumacetat (0,5 M/0,5 M) aq.bidest.

Stationäre Phase: < 50 x 10⁶ g/mol

TSKgel GMPWxl (Tosohaas)

50.000 – 1.000.000 g/mol

PL aquagel-OH 50 (Polymer Laboratories)

100 – 30.000 g/mol

PL aquagel-OH 30 (Polymer Laboratories)

Software: Astra V4.73.04, Wyatt Technology (Woldert, D)

8.5 Kultivierungsmedien

Absidia spec.

Glukose	40	g/l
Pepton	10	g/l
Hefeextrakt	1	g/l
MgSO ₄	0,5	g/l
CaCl ₂	0,1	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	g/l
K ₂ HPO ₄	1	g/l
NaCl	1	g/l

pH 4,5 mit HCl einstellen

Temperatur: 20°C

Mucor spec.

Glukose	40	g/l
Pepton	10	g/l
Hefeextrakt	1	g/l
KH ₂ PO ₄	2	g/l
MgSO ₄	0,5	g/l
CaCl ₂	0,2	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,7	g/l
CuSO ₄	0,001	g/l
MnCl ₂	0,004	g/l
FeSO ₄	0,01	g/l
ZnSO ₄	0,01	g/l

pH 5,5 mit HCl einstellen

Temperatur: 20°C

8.6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Hac	Essigsäure
AIM	alkali-unlösliches Material
DCM	Trockenzellmaterial
DCW	Trockenzellgewicht
EtOH	Ethanol
h	Stunde
LMCh	niedermolekulares Chitosan
(m/V)	Gewichtsprozent
min	Minute
MW	Molekulargewicht
Mw	massenmittleres Molekulargewicht
Mn	zahlenmäßiges Molekulargewicht
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
RI	Brechungsindex
rpm	Umdrehungen pro Minute
(V/V)	Volumenprozent

9 LITERATURVERZEICHNIS

Alfonso, C., M. J. Martinez et al. (1992)

Purification and properties of two endochitinases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation.

Microbiol. Lett. **95**(2-3): 187-194

Alimuniar, A. und R. Zainuddin (1992)

An economical technique for producing chitosan

Advances in Chitin and Chitosan

C. J. Brine, P. A. Sandford und J. P. Zikakis. London, New York

Elsevier Science Publishers Ltd.: 627-632

Allan, G. G. und M. Peyron (1995)

Molecular weight manipulation of chitosan. I: Kinetics of depolymerization by nitrous acid.

Carbohydr. Res. **277**(2): 257-72.

Araki, Y. und E. Ito (1975)

A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. Enzymatic deacetylation of chitin

Eur. J. Biochem. **55**(1): 71-78

Arcidiacono, S., S. J. Lombardi et al. (1988)

Fermentation, processing and enzyme characterization for chitosan biosynthesis by *Mucor rouxii*.

Chitin and Chitosan

G. Skjak-Braek, T. Anthonsen und P. A. Sandford, London, New York

Elsevier Applied Science. **1**: 319-332

Bartnicki-Garcia, S. (1989)

The Biochemical Cytology of Chitin and Chitosan Synthesis in Fungi

Chitin and Chitosan

G. Skjak-Braek, T. Anthonsen und P. A. Sandford. London, New York

Elsevier Applied Science.: 23-37

Bartnicki-Garcia, S., C. E. Bracker et al. (1984)

Chitosomes from the wall-less "slime" mutant of *Neurospora crassa*

Arch. Microbiol. **139**(2-3): 105-112

- Bartnicki-Garcia, S. und W. J. Nickerson (1962)
Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*
Biochim. Biophys. Acta **58**: 102-119
- Bassi, R., S. O. Prasher et al. (1999)
Remediation of metal-contaminated leachate using chitosan flakes
Environ.Tech. **20**(11): 1177-1182
- Baxter, A., M. Dillon et al. (1992)
Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan
Int. J. Biol. Macromol. **14**(3): 166-169
- Benjakul, S. und P. Sophanodora (1993)
Chitosan production from carapace and shell of black tiger shrimp
Asean Food J. **8**(4): 145-148
- Beri, R. G., J. Walker et al. (1993)
Characterization of chitosans via coupled size-exclusion chromatography and multiple-laser light-scattering technique
Carbohydr. Res. **238**: 11-26
- Biagini, G., R. A. A. Muzzarelli et al. (1992)
Biological materials for wound healing.
Advances in Chitin and Chitosan
C. J. Brine, P. A. Sandford und J. P. Zikakis. London,
Elsevier Science Publishers Ltd.: 16-24
- Botha, A. M., M. A. C. Nagel et al. (1998)
Russian wheat aphid infestation, exogenous ethylene, mechanical wounding, and chitinase isoenzyme
Bot. Bull. Acad. Sin. (39): 99-106
- Cartier, N., A. Domard et al. (1990)
Single crystals of chitosan
Int J Biol Macromol **12**(5): 289-94
- Chang, K. L., M. C. Tai et al. (2001)
Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide
J. Agricult. Food Chem. **49**(10): 4845-4851

- Chiou, M. S. und H. Y. Li (2003)
Adsorption behavior of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads
Chemosphere **50**(8): 1095-1105
- Cohen, S. A., K. De Antonis et al. (1993)
Compositional Protein Analysis using 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidylcarbamate, a Novel Derivatization Reagent
Techniques in Protein Chemistry. A. R.H. San Diego, Academic Press
- Crestini, C., B. Kovac et al. (1996)
Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*
Biotech. Bioengin. (50): 207-210
- Davis, L. L. und S. Bartnicki-Garcia (1984)
Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*
Biochemistry **23**: 1065-1073
- Davis, L. L. und S. Bartnicki-Garcia (1984)
The coordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*
J Gen Microbiol **130**(Pt 8): 2095-102
- Davoust, N. und G. Hansson (1992)
Identifying the conditions for development of beneficial mycelium morphology for chitosan-producing *Absidia* spp. in submersed cultures
Appl. Microbiol. Biotechn. **36**(5): 618-620
- Deising, H., M. Rauscher et al. (1995)
Differentiation and cell wall degrading enzymes in the obligatory biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae*
Can. J. Bot. **73**: 624-631.
- Deising, H. und J. Siegrist (1995)
Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* is controlled by fungal morphogenesis
FEMS Microbiol. Lett. **127**: 207-212
- Domszy, J. G. und G. A. F. Roberts (1985)
Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan
Makromol. Chem. (186): 1671-1677

- El-Ghaouth, A., J. Arul et al. (1992)
Effect of chitosan and other polyions on chitin deacetylase in *Rhizopus stolonifer*
Exp. Myc. **16**(3): 173-177
- El-Gueddari, N. E. und B. M. Moerschbacher (2000)
A rust fungus turns chitin into chitosan upon plant tissue colonization to evade recognition by the host
Adv. Chitin Sci. **4**: 588-592
- Hayashi, K. und M. Ito (2002)
Antidiabetic action of low molecular weight chitosan in genetically obese diabetic KK-Ay mice
Biol. Pharm. Bull. **25**(2): 188-192
- Hou, W. M., S. Miyazaki et al. (1994)
Preparation and evaluation of ion-exchange cross-linked chitosan microspheres
Yakuzaigaku **54**(1): 10-18
- Hu, K. J., K. W. Yeung et al. (1999)
Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *Absidia glauca*.
J. Food Biochem. (23): 187-196
- Imai, T., S. Shiraishi et al. (1991)
Interaction of indomethacin with low molecular weight chitosan, and improvements of some pharmaceutical properties of indometthacin by low molecular weight chitosan
Int. J. Pharm. **67**(1): 11-20
- Ito, M., A. Ban et al. (2000)
Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats
Jap. J. Pharmacology **82**(3): 218-225
- Jumaa, M., F. H. Furkert et al. (2002)
A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan
Eur. J. Pharm. Biopharm. **53**: 115-123
- Khan, T. A., K. K. Peh et al. (2002)
Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods
J. Pharm. Sci. **5**(3): 205-212

- Kifune, K. (1992)
Clinical application of chitin artificial skin
Advances in Chitin and Chitosan
C. J. Brine, P. A. Sandford und J. P. Zikakis. London,
Elsevier Science Publishers Ltd.: 9-15
- Kobayashi, T., Y. Takiguchi et al. (1988)
Distribution of Chitosan in Absidia Strains and Some Properties of the Chitosan
isolated
Nippon Nogeikagaku Kaishi **62**(10): 1463-1469
- Kollar, R., E. Petrakovas et al. (1995)
Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and β -(1,3)-
Glucan
J. Biol. Chem. **270**: 1170-1178
- Kuhlmann, K., A. Czupala et al. (2000)
Preparation and characterization of chitosan from Mucorales
Advances in Chitin Science
M. G. Peter, A. Domard und R. A. A. Muzzarelli. Potsdam,
The European Chitin Society. **4**: 7-14
- Lam, L. S. und E. Khor (2001)
Biological Evaluation of Chitin and Chitosan Materials
Dep. of Chemistry, National University of Singapore, Applied Chemistry
Honors Year Project
- Lang, G. und T. Clausen (1989)
The use of chitosan in cosmetics
Chitin and Chitosan
G. Skjak-Braek, T. Anthonsen und P. A. Sandford. London, New York,
Elsevier Applied Science.
- Lestan, M., A. Pecavar et al. (1993)
Amino acids in chitin-glucan complex of *Aspergillus niger*
Amino Acids (4): 169-176
- Maghami, G. G. und G. A. F. Roberts (1988)
Evaluation of viscometric constants for chitosan
Macromol. Chem. **189**: 195-200

- Masson, J. Y., I. Boucher et al. (1995)
A new chitosanase gene from *Nocardioides* sp. is a third member of glycosyl
hydrolase family 46
Microbiol. **141**(10): 2629-2635
- Mattioli-Belmonte-M, Gigante-A et al. (1999)
N,N-Dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic
protein in the repair of articular cartilage
Med. Biol. Engin. Comput. **37**(1): 130-134
- McGahren, W. J., G. A. Perkinson et al. (1984)
Chitosan by fermentation
Process Biochem. (19): 88-90
- Miyoshi, H., K. Shimura et al. (1992)
Characterization of some fungal chitosans
Biosci. Biotech. Biochem. **56**: 1901-105
- Muzzarelli, C., F. Tanfani et al. (1980)
The degree of acetylation of chitins by gas chromatography and infrared
spectroscopy
J. Biochem. Biophys. Meth. **2**(5): 299-306
- Muzzarelli, R. A. A., M. Terbojevich et al. (2002)
Chitosans depolymerized with the aid of papain and stabilized as
glycosylamines
Carbohydr. Pol. **50**(1): 69-78
- Nordtveit, R.-J., K.-M. Varum et al. (1994)
Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with
lysozyme
Carbohydr. Pol. **23**(4): 253-260
- Posten, C. H. und C. L. Cooney (2000)
Growth of microorganisms.
Biotechnology
Wiley-VCH. **1**: 113-159
- Ouchi, T., K. Inosaka et al. (1992)
Design of chitin- or chitosan/5-fluorouracil conjugate having antitumor activity.
Advances in Chitin and Chitosan.
C. J. Brine, P. A. Sandford und J. P. Zikakis. London,
Elsevier Science Pub. Ltd: 106-115

- Oztop, H. N., D. Saraydin et al. (2002)
pH-sensitive chitosan films for baker's yeast immobilization
Appl. Biochem. Biotechnol. **101**(3): 239-249
- Palace, G. P. und C. H. Phoebe (1997)
Quantitative determination of amino-acid levels in neutral and glucosamine-containing carbohydrate polymers
Anal. Biochem. **244**: 393-403
- Pereira, E. B., H. F. DeCastro et al. (2001)
Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: A comparative study between free and immobilized enzyme onto porous chitosan beads
Appl. Biochem. Biotechnol. (91-93): 739-752
- Pochanavanich, P. und W. Suntornsuk (2002)
Fungal chitosan production and its characterization
Lett. Appl. Microbiol. (35): 17-21
- Qin, C., Y. Du et al. (2002)
Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity
Int. J. Biol. Macromol. **31**(1-3): 111-117
- Rane, K. D. und D. G. Hoover (1993)
Production of chitosan by fungi
Food Biotechnol. (7): 11-33
- Rane, K. D. und D. G. Hoover (1993b)
An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi
Process Biochem (28): 115-118
- Rege, P. und L. H. Block (1999)
Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties
Carbohydr. Res. **321**: 235-245
- Richardson-Simon, C.-W., V. J. Kolbe-Hanno et al. (1999)
Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA
Int. J. Pharm. **178**(2): 231-243

- Roberts, G. A. F. und K. E. Taylor (1989)
The preparation and characteristics of chitin beads for use in chromatography.
Chitin and Chitosan
G. Skjak-Braek, T. Anthonsen und P. A. Sandford. London,, New York,
Elsevier Applied Science
- Ruiz-Herrera, J., S. Bartnicki-Garcia et al. (1980)
Dissociation of Chitosomes by Digitonin into 16s subunits with Chitin
Synthetase Activity
Biochim. Biophys. Acta **629**: 201-216
- Ruiz-Herrera, J., E. Lopez-Romero et al. (1977)
Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *Mucor
rouxii*
J. Biol. Chem. **252**(10): 3338-3343
- Saito, J. I., A. Kita et al. (1999)
Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1.6 Å
resolution and its substrate recognition mechanism
J. Biol. Chem. **274**(43): 30818-30825
- Sandford, P. A. (1989)
Chitosan: commercial uses and potential applications
Chitin and Chitosan
G. Skjak-Braek, T. Anthonsen und P. A. Sandford. London, New York
Elsevier Applied Science
- Seo, H., K. Mitsunashi et al. (1992)
Antibacterial and antifungal fiber blended by chitosan
Advances in Chitin and Chitosan
C. J. Brine, P. A. Sandford und J. P. Zikakis. London
Elsevier Science Pub. Ltd.: 34-40
- Shibasaki, K.-I., T. Matsukubo et al. (1995)
Cariostatic effect of low molecular weight chitosan in rats
Shikwa Gakuho **95**(1): 1-17
- Shibasaki, K.-I., H. Sano et al. (1994)
Effects of low molecular chitosan on pH changes in human dental plaque
Bull. Tokyo Dental Coll. **35**(1): 33-39

- Shimahara, K., Y. Takiguchi et al. (1989)
Screening of Mucoraceae strains suitable for chitosan production
Chitin and Chitosan
G. Skjak-Braek, T. Anthonsen und P. A. Sandford. London, New York,
Elsevier Applied Science
- Signini, R. und S. P. Campana Filho (1999)
On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride
Pol. Bull. **42**: 159-166
- Silbernagl, S. und A. Despopoulos (1991)
Taschenatlas der Physiologie
Stuttgart, Thieme Verlag
- Struszczyk, H. (1987)
Microcrystalline Chitosan - Preparation and Properties of Microcrystalline
Chitosan
J. Appl. Pol. Sci. **33**: 177-189
- Struszczyk, H. und O. Kivekäs (1989)
Microcrystalline Chitosan - Some Areas of Application
Brit. Pol. J. **23**: 261-265
- Suzuki, S., T. Watanabe et al. (1992)
Immuno-enhancing effects of N-acetylchitohexaose
Advances in Chitin and Chitosan
C. J. Brine, P. A. Sandford and J. P. Zikakis. London,
Elsevier Science Pub. Ltd: 96-105
- Takakura, K., S. Satoh et al. (2000)
Immobilization of heparin onto microporous polyvinyl alcohol hollow-fiber
membranes for improved antithrombogenicity
Bulletin-of-the-Okayama-University-of-Science **36a**: 225-234
- Tanver, A. K., K. P. Kok et al. (2002)
Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical
methods
J. Pharm. Pharmaceut. Sci. **5**(3): 205-212
- Terbejovich, M., C. Alessandro et al. (1993)
High-performance gel-permeation chromatography of chitosan samples
Carbohydr. Res. **250**: 301-314

Wachter, R. (1997)

Chitosan in der Kosmetik

Internationales Symposium Chitin/Chitosan, Lübeck

Wagner, Lo et al. (1993)

Chitin in the Epidermal Cuticle of a Vertebrate (Paralipophrys trigloides, Blenniidae, Teleostei)

Experientia **49**: 317-319

Westheide, W. und R. Rieger (1996)

Spezielle Zoologie

Gustav Fischer Verlag

White, S. A., P. R. Farina et al. (1979)

Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*

Appl Environ Microbiol **38**(2): 323-328

Zhang, H. und S. H. Neua (2002)

In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents

Biomaterials **23**(13): 2761-2766

Zishen, J. und S. Dongfeng (2002)

Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid

Carbohydr. Pol. **49**(4): 393-396

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd W. Müller möchte ich für das Angebot dieses Themas, die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die finanzielle Gewährleistung über die Firma Pharmatech und der Technologiestiftung Schleswig-Holstein danken. Durch die Freiheit, das Thema nach meinen Vorstellungen gestalten zu können und die hervorragende Ausstattung des Institutes, welche im wesentlichen sein Verdienst ist, konnte ich das Thema optimal bearbeiten. Danken möchte ich auch für die Erfahrung Ihres Bremskraftverstärkers, welcher, wie ich nun weiß, bei 180 km/h nicht zu stark betätigt werden darf, was andernfalls zu heftigem Kopfnicken mit Schleudertrauma bei schlafenden Beifahrern führt...Haben Sie sich jemals in größere Gefahr begeben???

Regina Krehl, Simone Bruhn, Rüdiger Smal, Dirk Böhme und Valerie Schütt möchte ich für die vielen guten Gespräche und Gedanken bei einer guten Tasse Kaffee zu morgendlichen Un- und anderen Zeiten danken. Im einzelnen noch ein spezielles Danke an Regina und Dr. Franz Furkert für die Hilfe bei den ET-Versuchen und Ratschläge aus dem Leben, an Simone für ausdauernde Proteinanalytik und -fehlersuche und Diskussionen über Karstadtmode, an Rüdi Röntgen für ebendieses und philosophische Gedanken, Dirk „Düsentrieb“ für Ideen und Realisation so manch' nützlicher Sache und Frau Schütt für fleißiges Rechnen, ob's Geld noch reicht und Korrekturlesen.

Dr. Girreser danke ich für ausdauerndes Erstellen von $^1\text{H-NMR}$'s und die vielen netten Kommentare zu meinen Spektren. Für chemische Synthetiker haben Proben biologischen Ursprunges schon etwas Unheimliches... Sven Wichmann möchte ich für die schnelle und unkomplizierte Unterstützung bei der HPLC danken, die das quälend lange Suchen nach den Fehlern in der Analytik beendet hat.

Bei Sven Krohn möchte ich mich für die Zusammenarbeit, die vielen Tipps und gegenseitig aufbauenden Gespräche bedanken. Ich wünsche Euch dreien alles alles Gute für Eure kleine Familie, einen guten Start in einer neuen Stadt weit weg im Äppelwoiländsche und....es kann nur leichter werden!!! Meinen Kollegen danke ich für viele freiwillige und unfreiwillige Einblicke in die Pharmazeutenwelt, welche ich bis heute zwar nicht so ganz verstehe, aber die es mich auch gerade in diesem letzten Jahr wirklich schade finden lassen, daß diese Zeit jetzt vorbei sein soll.

Спасибо, товарищи! Meinen fleißigen Korrekturlesern, Genossen Hückstedt und Dennis Aulert gebührt mein Dank für akribische Fehlersuche. Kai, Kap. 3 erster Absatz ist für Dich und Dennis, wie sag ich es nur, aber ich konnte mich nicht vom Protokoll trennen. So mußte der Chef entscheiden...und Du hattest Recht!

Ich danke Malcolm H. Ross für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht in den letzten Jahren, welche mir immer wieder neue Perspektiven aufzeigten, Energie gaben und unvergeßliche Momente auf den vielen Reisen bescherten. Ohne Deine Hilfe wäre diese Arbeit nicht vollendet worden! Meinen Eltern danke ich für ihre immer verlässliche, stille Hilfe in meinen Universitätsjahren. Sie haben mich zu jeder Zeit in all meinen Plänen unterstützt und damit die Grundlage für meine Entwicklung bis zu diesem Punkt gelegt. Ohne Euch und ohne Euer Wagnis vor 18 Jahren wäre dies alles nicht möglich geworden! Silke möchte ich für Ihre Geduld und Unterstützung ganz besonders auch jetzt in dieser Zeit danken. Meiner kleinen Prinzessin Luka danke ich von ganzen Herzen für die vielen Bilder, die mein karges Büro verschönten und die vielen kleinen und großen Momente, welche mich mit Leben, Liebe und Stolz erfüllen.

Julie danke ich dafür, daß sie zum richtigen Zeitpunkt da war und hoffentlich lange bleiben wird.