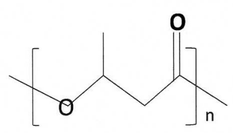
PHB-Produktion durch Süßwasseralgen

Projekt der Technik-Garage

Stefan Skroblin, Astrid Rebischke
Technik-Garage e.V. 31699 Beckedorf, Jahnstraße 2a;
Kontakt; vorstand@technik-garage.de

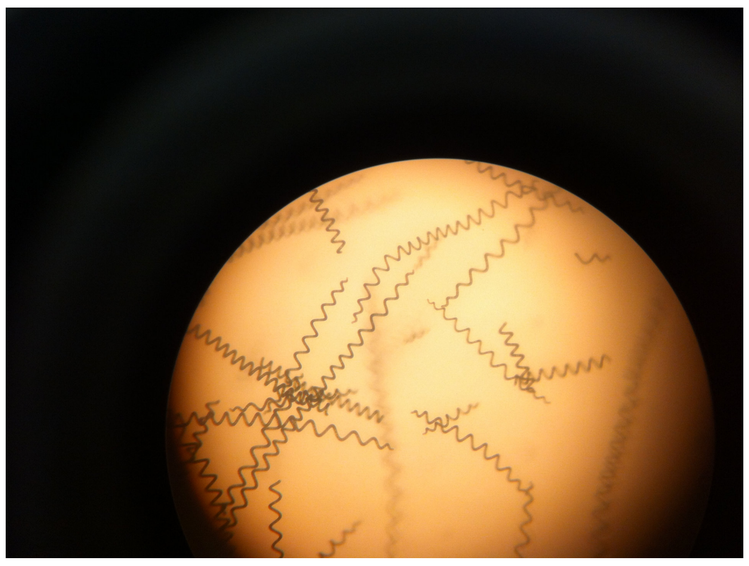
Algen sind Einzeller oder Mehrzeller, die sowohl in Süß- wie auch in Salzwasser vorkommen. Unter ihnen gibt es sowohl Procaryoten (Cyanobakterien) als auch Eucaryoten (Chlorophyta). Sie sind bekannt als Produzenten für wertvolle Nahrungsergänzungsmittel (Protein, essentielle Fettsäuren oder Vitamin B_{12}). Wie viele Einzeller stellen auch sie PHB als Speicherstoff her. Polyhydroxybuttersäure dient auch Pflanzen und Tieren als Reservestoff. Der verarbeitete, thermoplastische Kunststoff ist im Kompost oder Abwasseranlagen schnell abbaubar und erzeugt somit kein Mikroplastik.

Strukturformel von Polyhydroxybuttersäure



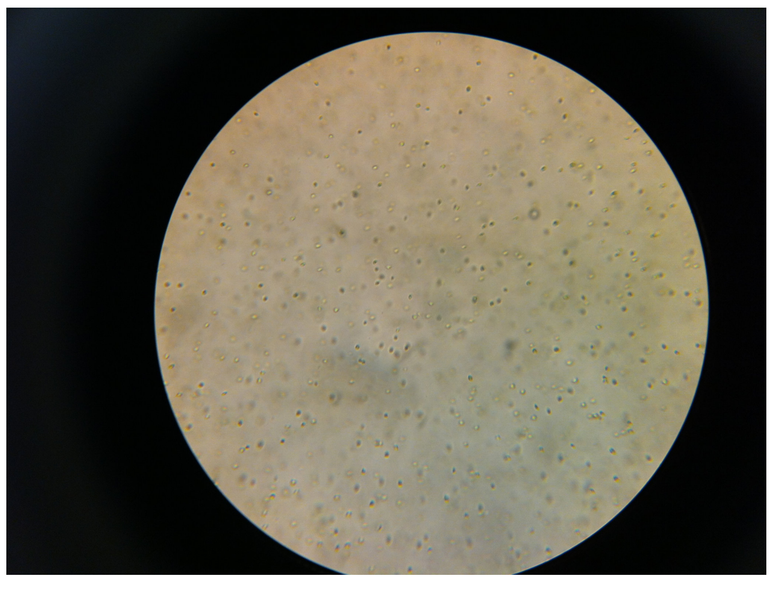
Die für die vorliegenden Untersuchungen eingesetzten Algen stammen aus der Sammlung von Algenkulturen Göttingen (SAG). Beide Arten sind Süßwasseralgen und als Nahrungsergänzungsmittel bekannt.
Die für die Kultur verwendeten Medien wurden entsprechend den Empfehlungen der SAG hergestellt und eingesetzt. Dort wird das für Arthrospora verwendete Medium als “Spirulina-Medium” bezeichnet. Das für die Kultur von Chlorella eingesetzte “ESP Ag” war das Basal Medium (Erddekokt mit Salzen).

Arthrospira platensis (früher Spirulina) - Cyanobakterium (Procaryot Blaualge)



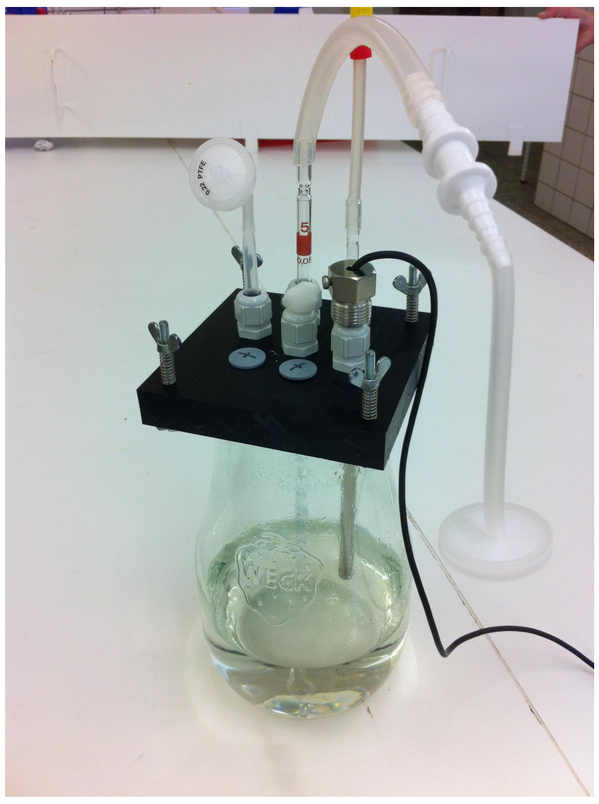
Die Trockenmasse enthält ca. 60% Protein, 20% Kohlenhydrate, 4% Fett und 5% Mineralstoffe. Arthrospira enthält u.a. eine Vit.B12Vorstufe, ß-Carotin und Vit. E)

Chlorella vulgaris - Chlorophytae (Eucaryot - Grünalge)

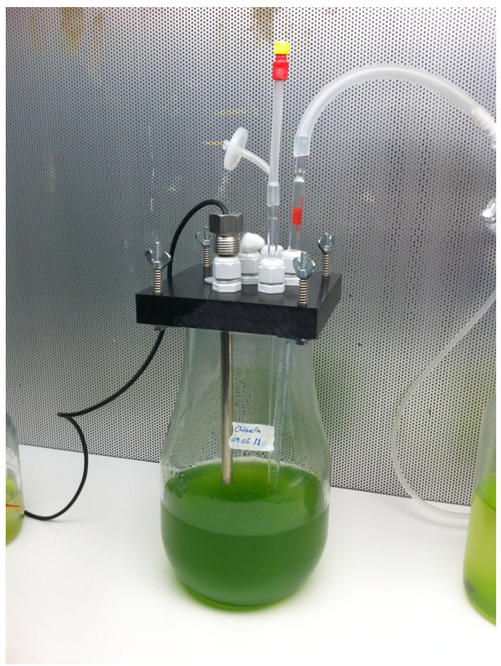


DieTrockenmasse enthält ca. 50% Protein, u.a. mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Carotinoide.

Die Kultur beider Algen erfolgte bei Zimmertemperatur (ca. 20°C) und Beleuchtungsintervall 14h hell/10 h dunkel, zur Belichtung wurde eine handelsübliche Pflanzenlampe, 1790 Lux, und zur Belüftung eine Aquarienpumpe (20l/h) eingesetzt, deren Luftstrom individuell durch Mehrwegehähne (aus dem Aquarium-Bedarf) reduziert wurde. Die Belüftungsintensität betrug bei Arthrospira und Chlorella ca. 160 ml/min jeweils 15 min/h. Nach 3-4 Wochen wurden die Algen auf neue Medien umgesetzt.
Als Reaktionsgefäße wurden zunächst kommerzielle 1l -Gläser mit Siliconschläuchen zur Be- und Entlüftung eingesetzt, die mit Sterilfiltern (PTFE, 0,22µm) versehen waren. Das Kulturvolumen betrug jeweils ca. 400-500 ml.



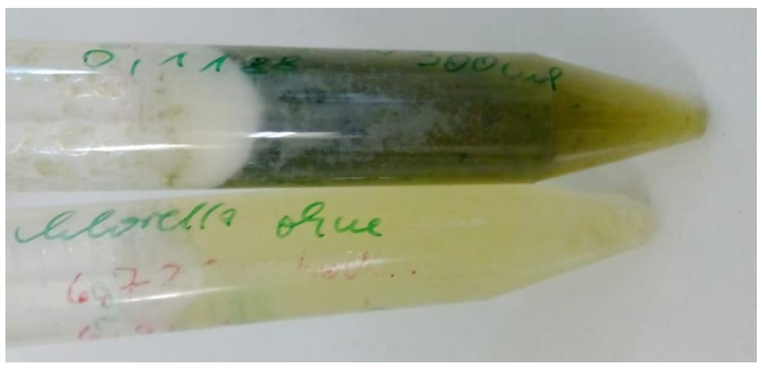
Der alternativ zu den kommerziellen Reaktoren entworfene Photobioreaktor besteht aus einem 1,5 Weckglas mit einem Deckel aus Delrin. Die Zugänge bestehen aus hitzefesten und spritzwasserdichten, variablen Kabelverschraubungen. Der neue Typ lässt ein deutlich größeres Medienvolumen (1l) und eine bessere Überwachung zu.



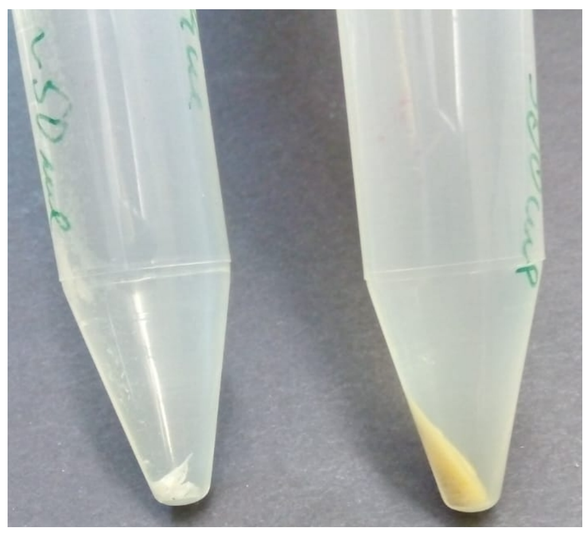
Zur Aufarbeitung wird die Algensuspension filtriert:

- Chlorella ca. 100 ml mit Cellulosenitratfilter, steriler Membranfilter Fa. Whatmann
- Spirulina ca. 400 ml mit Rundfilter, Fa. Schleicher & Schuell

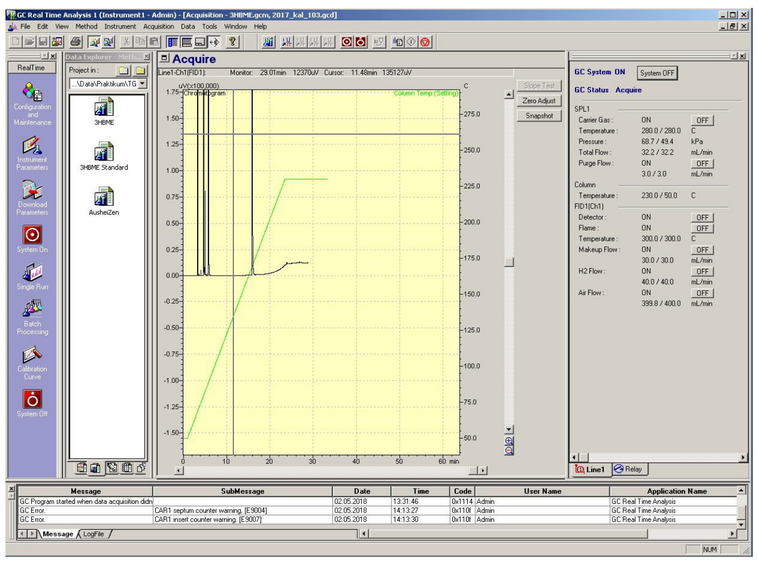
Die Filter werden in 15 ml Falcon-Spitzbodenzentrifugenröhrchen eingelegt, bei 80°C ca. 30 min angetrocknet, (Frischgewichtsbestimmung), mit ca. 10 ml dem. Wasser vom Filter gespült und bei 6000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die Filter werden entfernt, getrocknet und zurückgewogen.



Durch Dekantieren wird das durch Zentrifugation entstandene Sediment gewonnen, mit 5 ml Dan Chlorix suspendiert und 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das PHB trennt sich durch Zentrifugation vom aufgelösten Zelldebris. Es wird als Sediment durch Dekantieren gewonnen und in 10 ml Wasser aufgenommen, wieder zentrifugiert und vom Überstand durch Dekantieren befreit. Das so entstandene Sediment (PHB) in 5 ml Aceton aufgenommen und abermals zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.



Nach Trocknung des Sediments bei 80°C wird das PHB in 1 ml Methanol(-3% H_2SO_4) suspendiert und in Pyrexröhrchen überführt, mit 1 ml Chloroform (enthält 1% Benzoesäuremethylesther) für 4 h bei 100°C methyliert, anschließend abgekühlt und mit 1 ml H_2O versetzt. Im Anschluss an die Trennung der Phasen kann die untere, organische Phase mittels Pasteurpipette überführt und ein 1µl Aliquot im GC analysiert werden.



GC-2010 Shimadzu Gaschromatograph, Säule: J&W Scientific, DB-WAX, 25m, FID 300°C; Temperaturprogramm: 50°C 10 min; 8°C/min bis 230°C 10 min. In den Zellen von Arthrospira ist PHB eindeutig nachgewiesen.
Quelle:
SAG: www.uni-goettingen.de/de/45175.html