ETH zürich

ETH Library

Mikroorganismen in Wasser-in-Oel Mikroemulsionen

Doctoral Thesis

Author(s):
Pfammatter, Nestor

Publication date:
1992

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000665905

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH Nr. 9792 ex. B

MIKROORGANISMEN IN WASSER-IN-ÖL MIKROEMULSIONEN

ABHANDLUNG zur ERLANGUNG DES TITELS eines
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von:

NESTOR PFAMMATTER
Dipl. Chem. ETH
geb. 10.6.1960
von Eischoll (VS)

angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. P.L. LUISI (Referent)
Prof. Dr. J.R. BOURNE (Korreferent)

1992

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH
CatE

Kurzfassung

Es ist seit einigen Jahren bekannt, dass viele Tenside die Fähigkeit besitzen, in apolaren Lösungsmitteln inverse Mizellen zu bilden, und so eine gewisse Menge Wasser (oder wässrige Lösungen) mit auch grösseren Biopolymeren, wie Enzymen, Nukleinsäuren, Plasmide, Mitochondrien und viele andere Zellbestandteile, zu solubilisieren. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass sogar ganze Zellen in solch mizellare Systeme aufgenommen werden, und sich klare, thermodynamisch stabile "Lösungen" für Tage, in Extremfällen sogar Wochen bilden. Für solche Solubilisationsprozesse eignen sich nicht- oder zwitterionische Tenside (Tween, Span, Asolectin,...) in biokompatiblen längerkettigen aliphatischen Lösungsmitteln (Hexadecan,...) oder deren Carbonsäurenestern (Isopropylpalmitat,...).

Der Einfluss auf die Stabilität und die Lebensfähigkeit der Zellen einiger Faktoren wie Tensidkonzentration, HLB (Hydrophilic-Lipophilic-Balance), Wassergehalt (meist als Molekularverhältnis Wasser/Tensid W_0 angegeben) und Temperatur wurden experimentell untersucht.

Unter den getesteten Bakterien (Arthrobacter, Pseudomonas, Bazilli) und Hefen (Saccharomyces, Candida) erhalten einige Mikroorganismen, darunter der *B. subtilis* und vor allem die Vertreter aus der Familie der Hefepilze, ihre Lebensfähigkeit über mehrere Tage hin auf einem recht hohen Stand (über 80%). Dabei lässt sich der Wert durch den Einsatz von Zellen, welche von bereits solubilisierten abstammen, um einige Faktoren erhöhen, wie am Beispiel Bäckerhefe demonstriert wird ("Generationeneffekt").

Es wird eine polarographische Methode mit der Clark-Elektrode zur Messung der Atmung und deren Beeinflussung durch die Faktoren Zeit, Substratart und -konzentration, Wassergehalt, einige für die Atmung relevante chemische Substanzen (z.B Inhibitoren) vorgestellt. Ebenfalls werden Experimente zur Bestimmung des ATP-Gehaltes (mit Variation einiger der oben erwähnten Parameter) mittels Biolumineszenz in diesem organischen Milieu beschrieben. Es wurden ähnliche Umsatzraten wie in wässrigen Medien gleicher Substratkonzentrationen gemessen.

Dass sich die Zellen in dieser invers-mizellaren Lösung sogar vermehren können, sei es auf Kosten der Nährstoffe in der wässrigen Komponente, oder allenfalls durch den Abbau des Lösungsmittels bzw des Tensids, wird unter anderem am Beispiel *C. pseudotropicalis* mit ^{14}C-markiertem Hexadecan berichtet. Unter optimalen Bedingungen kann, je nach eingesetzter Zellzahl, eine bis zu 10-fache Vergrösserung der Biomasse erreicht werden.

Der weitere Verlauf der Experimente hat gezeigt, dass sich diese Zellen nicht nur in Mikroemulsionen, sondern prinzipiell auch in klassischen Gelatin-Organogelen fixieren lassen, auch wenn bezüglich der Biokompatibilität der Gelkomponenten noch einige Fortschritte getätigt werden müssen.

All diese Experimente zielten auf eine Ausweitung der Mikrobiologie auf organische Medien mit dem Gedanken eines biotechnologischen Einsatzes bei wasserunlöslichen Substanzen. Aus diesem Grunde werden in einem weiteren Kapitel, nach einem kurzen Ueberblick auf die bereits in der Literatur erwähnten Reaktionen in W/O Mikroemulsionen, noch drei eigene, mehr oder weniger erfolgreich verlaufene Anwendungsbeispiele im Bereich der Entschwefelung von Erdöl, Hydroxilierung von Progesteron und Abbau von Kunststoffen angeführt. Während bei den ersten beiden Projekten Umsatzraten von ca. 10 resp. 20% erzielt wurden, sind die Experimente "Polymer-Abbau" weit vielversprechender verlaufen. Dabei wurden innert Monatsfrist in mizellarer Lösung mit *Aspergillus niger* ein Polyester (Polycapro-lacton) fast vollständig, und sogar ein Polybutadien immerhin zu beinahe 30 % abgebaut.

Abgerundet werden diese Aufzählungen mit einem kurzen Ausblick auf mögliche zukünftige Studienprojekte.

Abstract

Since several years many surfactants are known to form reverse micelles in apolar solvents. In this way a certain amount of water (or aqueous solution) containing larger biomolecules such as enzymes, nucleic acids, plasmids, mitochondria and many other cell components can be solubilized in an organic solvent. In this work it is demonstrated, that also entire cells can be dissolved in such micellar systems forming clear "solutions", which are thermodynamically stable for several days (or in some cases even for weeks).

The best results in such solubilization processes are obtained by using nonionic or zwitterionic surfactants (Tween, Span, Asolectin, ...) in longchain, biologically compatible aliphatic solvents (Hexadecane, isopropylpalmitate,...). The influence of some parameters such as surfactant concentration, hydrophilic-lipophilic-balance (HLB), water content and temperature on the stability and viability of the cells was investigated experimentally.

Some of the strains tested, in particular those from yeast show a relatively high viability (more than 80% of the cells remain alive for several days). This could even be increased by resolubilizing microorganisms derived from cells which have survived a first contact with this unusual organic environment (so called "generation effect"). This is shown for baker's yeast for example.

A polarographic method with the Clark-electrode has been developed in order to measure the oxygen-uptake in microemulsions and to monitor the influence of time, kind and amount of substrates, and of some other chemicals. Furthermore, data of experiments on the determination of ATP during the above-mentioned changes are presented by the use of a bioluminescence technique. The respiration rate was similar to that of cells in comparable aqueous solutions.

Cell growth was detected in reverse micellar solutions not only due to waterpool nutrients, but even due to metabolism of the organic solvent. This is shown for *Candida pseudotropicalis* with ^{14}C-labelled hexadecane. Depending on the initial cell concentration an increase in the weight of biomass up to a factor of ten could be achieved.

Some successful immobilizations of cells in gelatine organogels were also carried out and immediately one could see that it is very important to improve the biocompatibility of the matrix components.

One of the aims of all these investigations was to apply microbiology in organic media for biotechnological purposes. Therefore a short review of applications in microemulsions, as published in the literature, is presented followed by three own contributions in the field of desulfurization of crude oil, hydroxylation of progesterone and the more promising biodegradation of polymers. In the latter case, *Aspergillus niger* is shown to degrade a dissolved polyester (polycaprolactone) nearly completely and a polybutadiene up to 30% within one month. An outlook on possible future works concludes this dissertation.