

Poly-3-hydroxybutyrat (PHB)

Prinzip

Das Polymer PHB wird durch alkalische Hydrolyse in die C4-Untereinheiten gespalten, welche in ihre 2-en-Alkansäuren umgewandelt werden. Letztere können mittels HPLC aufgetrennt werden. Die Detektion der einzelnen Substanzen erfolgt UV-photometrisch bei 215 nm.

Anwendungsbereich

Daten zur PHB-Eichkurve

Element	trans-Crotonsäure
Eichgerade	$y = 0.27637 + 0.062473 \cdot c \quad R^2 = 0.999$
Gültigkeitsbereich für Masse c in [$\mu\text{g}/\text{Ansatz}$]	0.29-40
LQDC, c in [$\mu\text{g}/\text{Ansatz}$]	0.29
Rel. Standardfehler <5% für Masse c in [$\mu\text{g}/\text{Ansatz}$]	0.29-40
Rel. Standardfehler >5% für Masse c in [$\mu\text{g}/\text{Ansatz}$]	0.29-40

LQDC lowest quantitatively determinable concentration

Reagenzien und Messapparaturen

- **Laufmittel:** 0.01 N H₂SO₄ (0.558 ml konzentrierte H₂SO₄ mit 2000 ml destilliertem Wasser mischen, filtrieren (Millipore GS, 0.22 μm Porengrösse) und während 10 Minuten über eine ins Laufmittel eingetauchte Fritte mit Helium begasen).
- **Flussrate:** 0.7 ml/Minute. Pumpe: HPLC Pumpe 420 und Autosampler: MSI 660 T (Kontron Instruments, Zürich, Schweiz). Wasserbad: Haake FE (Haake Karlsruhe, BRD).
- **Vorsäule:** Micro-Guard, Refill Cartridge CationH, **Säule:** Aminex Ion Exclusion HPX-87H (9micron), beide von BioRad Chemical Division, Richmond, California.
- **Detektor:** Uvikon UV-LCD 725, Kontron Instruments, Zürich, Schweiz.

Vorgehen

- Lyophilisierte Biomasse aus 25-50 ml Seeprobe oder 3 ml Laborkultur in Röhrchen mit Schraubdeckel transferieren.
- Zugabe von 1 ml 2N NaOH, mischen.
- 30 Minuten im Wasserbad bei 100°C lysieren.
- Reaktion in Eiswasserbad stoppen.
- Zugabe von 1 ml 2 N HCl, mischen.
- Während 5 Minuten bei 11400 rpm zentrifugieren.
- Überstand in Eppendorfröhrchen dekantieren und einfrieren.
- Messung mittels HPLC/UV-Detektor.
- Als **Standard** für die Eichkurve wird das Copolymer p(HB-co-HV) [83%-17%] verwendet. Da die Proben oft nur sehr wenig PHB enthalten, wird nur der Peak der trans-Crotonsäure betrachtet (erfahrungsgemäss beträgt der Anteil an cis-Crotonsäure etwa 3% davon). 2-Pentensäure konnte weder in Seeproben (Cadagnosee) noch in den Laborkulturen nachgewiesen werden.

Literatur

- Capon RJ, Dunlop RW, Ghisalberti WL, Jefferies PJ. 1983. Poly-3-hydroxyalkanoates from marine and freshwater cyanobacteria. *Phytochemistry* 22:1181-1184
- Del Don C, Hanselmann K, Peduzzi R, Bachofen R. 1994. Biomass composition and methods for the determination of metabolic reserve polymers in phototrophic sulfur bacteria. *Aquat. Sci.* 56:1-15
- Känel B, Mez K. 1992. *Vielfalt und Dynamik mikrobieller Stoffwechselaktivitäten in der Redoxtransitionszone des Lago di Cadagno*. Diplomarbeit Universität Zürich
- Karr DB, Waters KJ, Emerich DW. 1983. Analysis of Poly- β -hydroxy butyrate in *Rhizobium japonicum bacterioide* by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV-detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1339-1344