

Biokatalytische Gewinnung von Flavonoiden

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von
M.Sc. Anne Schmidt
geboren am 30.06.1982 in Bad Pyrmont

Hannover, im Mai 2011

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferentin: PD Dr. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 16.05.2011

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere, dass die Dissertation nicht bereits als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, Mai 2011

Anne Schmidt

Publikationen

Posterpräsentationen

A. Schmidt, S. Beutel, E. Gross, J.-M. Hilmer, T. Scheper: “Biocatalytic formation of a bioactive flavonoide by *Eubacterium ramulus*”, biocat2010, 5th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Deutschland

A. Schmidt, S. Beutel, E. Gross, J.-M. Hilmer, T. Scheper: “Biocatalytic formation of a bioactive dihydrochalcone by *Eubacterium ramulus*”, IBS 2010, 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Rimini, Italien

Artikel in Fachzeitschriften

A. Schmidt, S. Beutel, E. Gross, J.-M. Hilmer, T. Scheper: „Biocatalytic production of the bioactive dihydrochalcone Phloretin by *Eubacterium ramulus*”, Applied Microbiology and Biotechnology, in Veröffentlichung

P. Jonczyk, A. Schmidt, I. Bice, S. Beutel, T.Scheper: „Strikt anaerobe batch-Kultivierung von *Eubacterium ramulus* in neuartigen Einwegbeutel-Reaktorsystemen“, Chemie Ingenieur Technik, in Veröffentlichung

Zusammenfassung

Zur Überwindung der begrenzten Verfügbarkeit wertvoller natürlicher Substanzen wie beispielsweise Flavonoide, werden immer häufiger maßgeschneiderte biokatalytische Systeme zur industriellen Nutzung genutzt. Der Vorteil biokatalytischer Systeme, wie Mikroorganismen oder Enzyme, liegt neben den meist effizienten und selektiven Reaktionen vor allem in der Bereitstellung „natürlicher Produkte“. Ein solches System soll im Rahmen dieser Arbeit zur Produktion des vielfältig einsetzbaren Dihydrochalcon Phloretin etabliert werden.

In Form des strikt anaeroben Bakteriums *Eubacterium ramulus* wurde ein biokatalytisches System gefunden, das prinzipiell in der Lage ist ein geeignetes, kostengünstiges Substrat, in diesem Fall Naringenin, zum Zielprodukt Phloretin umzusetzen. Dazu wurde die anaerobe Kultivierung von *E. ramulus* bis zu einem Arbeitsvolumen von 10 L etabliert. Zum Einsatz kamen hierbei erstmalig zum einen wellendurchmischte Beutelreaktoren und zum anderen ein herkömmlicher Stahlreaktor. Die Untersuchung der biokatalytischen Umsetzung erfolgte sowohl im Ganzzellkatalysesystem (Kultivierungsprozess) als auch durch den Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellmasse (Enzymmix). Hierbei wird das entstandene Phloretin durch das Enzym Phloretinhydrolase (PhH) unmittelbar weiter abgebaut. Da aber gezeigt werden konnte, dass für Bildung und Abbau unterschiedliche Enzyme verantwortlich sind, ist eine Entkopplung der Reaktionschritte grundsätzlich möglich. Die für die gewünschte Umsetzung von Naringenin zu Phloretin verantwortlichen Enzyme sind jedoch noch weitestgehend unbekannt. Es gibt Hinweise auf die Beteiligung einer Chalcon Isomerase (CHI). Zur weiteren Identifizierung und Isolierung dieser Enzyme wurden verschiedene chromatographische Trennmethoden wie IEC, SEC oder HIC durchgeführt.

Darüber hinaus wurden zur Unterdrückung der PhH-Aktivität verschiedene Inhibitoren getestet und ihre Wirkung auf den Reaktionsverlauf analysiert. Der Inhibitor EDTA-Dinatriumsalz verhinderte den Abbau von Phloretin, verringerte jedoch auch die Umsetzung von Naringenin. Das umgesetzte Naringenin resultierte dafür aber zu annähernd 100 % in Phloretin.

Stichwörter: Flavonoide, Naringenin, Phloretin, *E. ramulus*, Biokatalyse, Phloretinhydrolase (PhH), Chalconisomerase (CHI)

Abstract

To overcome the limited availability of natural substances like flavonoids frequently requires the industrial use of tailor-made biocatalytical systems. The advantage of biocatalytical systems like microorganisms or enzymes is their ability to carry out specific and selective transformations on “natural products”. In this work, a biocatalytic system was developed for the production of the dihydrochalcone phloretin, which is a molecule of wide industrial importance.

A biocatalytical system which is able to transform an economical substrate like naringenin into the target product phloretin was found in the strict anaerobic bacterium *Eubacterium ramulus*. Hence anaerobic cultivation of *E. ramulus* was established in a working volume of up to 10 L. For this purpose a single-use bioreactor with wave-induced agitation as well as a conventionally stainless steel bioreactor was used. The investigation of the biocatalytical reaction was carried out in the whole cell system of *E. ramulus* (cultivation process) as well as in the cell extract of the disrupted biomass (enzyme mixture). During the transformation the generated phloretin is degraded immediately by the enzyme phloretin hydrolase (PhH). It was shown that different enzymes are responsible for the production and degradation of phloretin, which offers the opportunity to uncouple the reaction steps. However, the enzymes responsible for the desired conversion are still unknown. But there are implications that the enzyme chalcone isomerase (CHI) is involved in the process. For the further identification and isolation of the biocatalysts chromatographic methods like IEC, SEC or HIC were used.

Furthermore, the suppression of PhH-activity by different inhibitors and their effect on the reaction process was investigated. It was found that disodium EDTA inhibits the degradation of phloretin but the overall conversion of naringenin was decreased as well. On the other hand, the converted naringenin results almost completely in the product phloretin.

Keywords: flavonoids, naringenin, phloretin, *E. ramulus*, biocatalysis, phloretin hydrolase (PhH), chalcone isomerase (CHI)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	Flavonoide.....	3
2.2	Anaerobe Kultivierungstechniken.....	9
3	EXPERIMENTELLER TEIL	15
3.1	Kultivierung von <i>Eubacterium ramulus</i>	15
3.1.1	Vorversuche zu Glukosekonzentration und Schüttelgeschwindigkeit.....	16
3.1.2	Kultivierung in Beutelreaktoren.....	19
3.1.3	Kultivierung im Stahlreaktor.....	24
3.1.4	Zusammenfassende Diskussion.....	26
3.2	<i>E. ramulus</i> als potentiellies Produktionssystem.....	29
3.2.1	Ganzzellkatalyse.....	29
3.2.2	Untersuchungen mittels Rohextrakt	34
3.2.3	Zusammenfassende Diskussion.....	41
3.3	Isolierung ausgewählter Enzyme	42
3.3.1	Ultrafiltration.....	44
3.3.2	Ammoniumsulfatfällung	47
3.3.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	49
3.3.4	Ionenaustauschchromatographie (IEC)	50
3.3.5	Größenausschlusschromatographie (SEC)	53
3.3.6	Hydrophobe Interaktionschromatographie	55
3.3.7	Zusammenfassende Diskussion.....	58
3.4	Unterdrückung der Phloretinhydrolase-Aktivität.....	60
3.4.1	Testung verschiedener Inhibitoren	60
3.4.2	siRNA.....	66
3.4.3	Zusammenfassende Diskussion.....	69
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	72
5	ANHANG	76
5.1	Materialien	76
5.1.1	Geräte	76
5.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	77
5.1.3	Reagenzien und Chemikalien.....	77
5.1.4	Kulturmedien und Puffer.....	78
5.2	Methoden	81
5.2.1	Kultivierungstechniken	81
5.2.2	Zellaufschluss.....	83
5.2.3	Herstellung des Rohextrakts.....	83

5.2.4	Aktivitätstest.....	84
5.2.5	HPLC.....	84
5.2.6	Sonstige Trennverfahren	85
5.2.7	Elektrophoretische Trennmethoden.....	86
5.2.8	Chromatographische Trennmethoden.....	88
5.2.9	Testung verschiedener Inhibitoren	91
5.2.10	PCR	91
5.2.11	siRNA.....	91
5.3	Ergebnisse	92
5.3.1	Beutelmultiplicierungen	92
5.3.2	Ganzzellkatalyse.....	92
5.3.3	Testung verschiedener Inhibitoren	93
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	96

1 Einleitung und Zielsetzung

Die stetig zunehmende Lebenserwartung der Bevölkerung geht einher mit einem Wandel des Ernährungsbewusstseins der Menschen des 21. Jahrhunderts. In den letzten Jahren ist die Nachfrage an „natürlichen Produkten“ vor allem im Lebensmittelbereich rasant gestiegen. Neben dem Anspruch der Natürlichkeit steht häufig auch der Wunsch nach gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen im Vordergrund. Der Zusammenhang zwischen gesunder Ernährung und der Prävention von Krankheiten wird immer deutlicher und es zeigt sich ein deutlicher Einfluss auf das Kaufverhalten des Verbrauchers und den zu bedienenden Markt [1-2].

Dieser Trend zu natürlichen, gesundheitsfördernden und dennoch wohlschmeckenden Produkten stellt die Lebensmittelindustrie vor immer neue Herausforderungen bezüglich der Rohstoffe und ihrer Produktion. Die steigende Nachfrage nach begrenzt verfügbaren natürlichen Rohstoffen bringt den Bedarf an effizienten Produktionsverfahren mit sich, die dennoch die natürliche Authentizität des Endprodukts gewährleisten. Dieser Aspekt hat intensive Forschungsaktivitäten zur Nutzung von Biokatalysatoren vor allem in der Produktion von Geschmacks- und Nahrungsmittelinhaltsstoffen ausgelöst. Biokatalysatoren bieten die Möglichkeit, spezifische Reaktionen effizient und selektiv durchzuführen und lebensmittelkonforme Prozesse zu gestalten, ohne die „Natürlichkeit“ des Produktes zu verlieren [3-4].

Eine für industrielle Anwendungen interessante Stoffgruppe stellen die Flavonoide dar. Flavonoide gehören zu den polyphenolischen Verbindungen, die universell in Pflanzen vorkommen und für ihre präventive und gesundheitsfördernde Wirkung bekannt sind [5]. Sie finden vor allem aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften Anwendung in Pharmaprodukten, Lebensmitteln und Kosmetika [6]. Ein Vertreter der industriell genutzten Flavonoide ist das Dihydrochalcon Phloretin. Doch auch Phloretin steht lediglich in begrenztem Maße in natürlicher Form zur Verfügung und kann nur mit großem Aufwand aus natürlichen Rohstoffen gewonnen werden [7]. Die biokatalytische Gewinnung des Dihydrochalcon Phloretin aus kostengünstigeren Substraten stellt einen Lösungsansatz zur Überwindung der begrenzten Verfügbarkeit des Phloretins dar. Die Grundlage zur Realisierung eines biokatalytischen Systems bildet die Identifizierung geeigneter Biokatalysatoren.

Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluierung eines biokatalytischen Prozesses zur Produktion natürlicher Flavonoide, wobei hier die Dihydrochalcone aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen. Durch den Einsatz biokatalytischer Systeme soll die begrenzte Verfügbarkeit natürlicher Rohstoffe für industrielle Prozesse, im Rahmen des Clusters „Nachhaltige Biokatalyse auf neuen Wegen - BOKATALYSE2021“, überwunden werden. Hierbei dient die Produktion von Phloretin, das bereits in mehreren Bereichen der Kosmetik-, Lebensmittel- und Pharmaindustrie Anwendung findet, als Modellreaktion. Bevorzugt soll es sich hierbei um ein natürliches, genetisch nicht verändertes biokatalytisches System handeln.

Als potentiell Produktionssystem wurde das *Eubacterium ramulus* identifiziert, das im Weiteren in verschiedenen Reaktorsystemen zur anaeroben Fermentation kultiviert wurde und die Kultivierung in Hinblick auf maximale Biomassekonzentrationen optimiert wurde.

Die gewonnene Biomasse wurde für Untersuchungen zur biokatalytischen Phloretinproduktion eingesetzt. Dies erfolgte sowohl in Form einer Ganzzellkatalyse mit aktiven Zellen als auch in Form eines Multienzymgemisches mit frischem Zell-Rohextrakt. Weiterhin wurden Strategien zur Isolierung der an der Phloretinproduktion beteiligten Enzyme getestet, bzw. die Inhibition von Phloretinabbauenden Enzymen untersucht.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Flavonoide

Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und gehören zu den am häufigsten in der Nahrung enthaltenen Polyphenolen. Den Pflanzen dienen die Flavonoide in der Regel als Schutz gegen UV-Strahlung, Fressfeinde, mikrobielle Angriffe oder als Farbstoff [8]. Da es sich hierbei um äußere Einflüsse handelt, reichern sich Flavonoide vor allem in Blättern, Blüten und äußeren Randschichten wie Haut und Schale von Obst und Gemüse an [9]. Bekannt sind Flavonoide vor allem für ihre präventive und gesundheitsfördernde Wirkung, die zum Großteil auf ihre antioxidativen Eigenschaften zurückzuführen ist. Als Radikalfänger besitzen sie die Fähigkeit, schädliche Radikale zu reduzieren. Desweiteren werden ihnen antiinflammatorische, antivirale oder sogar anticancerogene Wirkungen beruhend auf antiproliferativen Eigenschaften nachgesagt [9-13]. Flavonoide scheinen bei einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt zu sein und können enzymatische Abläufe hemmen oder auch induzieren. Im Allgemeinen handelt es sich bei den Flavonoiden um eine sehr große Vielfalt bioaktiver Verbindungen, die unterschiedlichste Wirkungen aufweisen und für die Pharma- und Lebensmittelindustrie von großem Interesse sind.

Mit mittlerweile etwa 6500 bekannten Verbindungen stellen die Flavonoide die größte Verbindungsklasse unter den Polyphenolen dar [9]. Die Grundstruktur der Flavonoide beruht auf einem Flavanmolekül, das aus einem O-heterozyklischen Kohlenstoffring (C) und zwei aromatischen Kohlenstoffringen (A und B) besteht (Abbildung 2.1). Aufgrund unterschiedlicher Oxidationsstufen am heterozyklischen Kohlenstoffring und Modifizierungen der aromatischen Ringe lassen sich die in Abbildung 2.1 dargestellten sechs Hauptgruppen ableiten.

Eine Gruppe der Flavonoide stellen die Flavanole dar, deren bekanntester Vertreter das Catechin ist, das z.B. in Tee, Rotwein und Schokolade vorkommt. Eine weitere Gruppe bilden Anthocyanidine, die sich aufgrund ihrer pH-abhängigen Mesomerie durch eine große Farbvielfalt auszeichnen und Pflanzenfarbstoffe wie beispielsweise Malvidin und Cyanidin umfassen [9]. Flavone zeichnen sich durch eine Carbonylfunktion und eine 2,3-Doppelbindung am zentralen heterozyklischen C-

Ring aus. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind unter anderem das Luteolin, das in Paprika oder Petersilie vorkommt und Apigenin das in Kamille oder Sellerie enthalten ist [14].

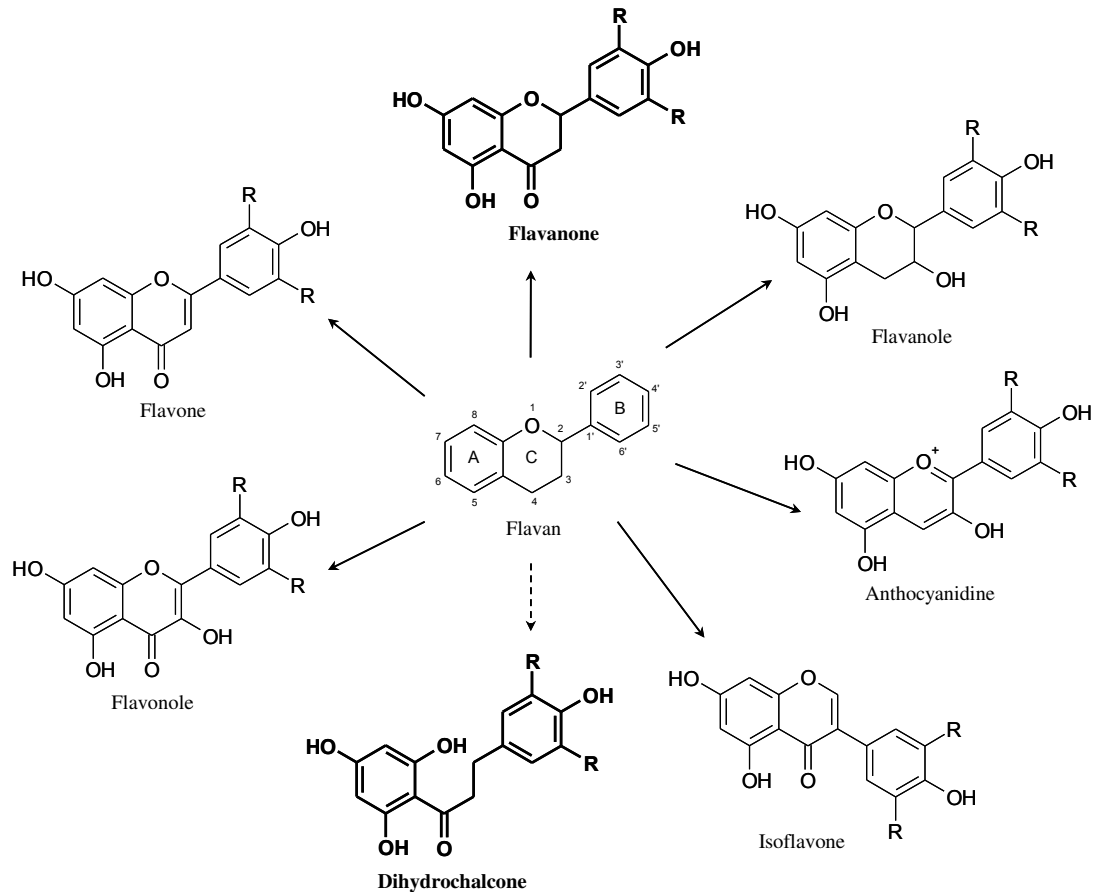


Abbildung 2.1: Strukturformel des Flavan-Grundgerüsts und davon abgeleitete Flavonoidklassen

Wie in Abbildung 2.1 zu sehen ist, liegt bei den Isoflavonen die Verknüpfung des Benzol-Rings (B) an der C-3-Position anstatt an der C-2-Position vor. Flavonole wie z.B. das Quercetin tragen an der C-3-Position eine Hydroxylgruppe. Flavanone besitzen hingegen nur eine Carbonylfunktion in der 4-Position. Ein Beispiel ist das Naringenin, das vor allem in Zitrusfrüchten wie Grapefruit vorkommt (Abbildung 2.2). Daneben existieren weitere kleinere Untergruppen wie beispielsweise die Chalcone von denen sich die in Abbildung 2.1 dargestellten Dihydrochalcone ableiten lassen.

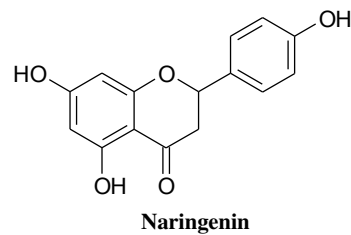


Abbildung 2.2: Strukturformel von Naringenin

Chalcone wie auch Dihydrochalcone unterscheiden sich durch einen geöffneten Pyran-Ring von den anderen Flavonoidklassen. In dieser Arbeit ist vor allem das in Äpfeln und Obstbaumrinden enthaltene Dihydrochalcon Phloretin von Bedeutung (Abbildung 2.3).

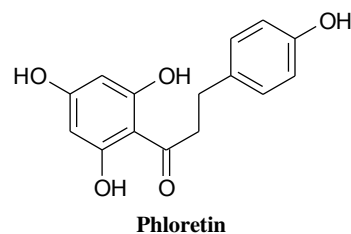


Abbildung 2.3: Strukturformel von Phloretin

Phloretin zählt zu einem der vielfältig bioaktiven Flavonoide. Neben seinem hohen antioxidativen Potential gilt es außerdem als antiinflammatorisch, immunosuppressiv, antimutagen, antitumoral und anticancerogen [15-17]. Aufgrund seiner besonderen Eigenschaften wird Phloretin bereits in mehreren Bereichen industriell genutzt und als Wirkstoff bzw. Zusatzstoff beispielsweise in Pharmaprodukten, Kosmetika oder Lebensmitteln verwendet [12-13, 18-20]. Die Gewinnung von natürlichem Phloretin durch Extraktionsverfahren ist allerdings recht arbeits- und kostenintensiv. Daneben stellt auch die begrenzte natürliche Verfügbarkeit einen limitierenden Faktor dar [21]. Zur alternativen Gewinnung sind insbesondere biokatalytische Verfahren von Interesse, da sie die Herstellung „natürlicher Produkte“ gewährleisten können. Voraussetzung hierfür ist allerdings ein kostengünstiger und in ausreichender Menge verfügbarer Ausgangsstoff, der zu dem gewünschten Produkt umgesetzt werden kann.

Das Flavanon Naringenin ist im Vergleich zu Phloretin relativ kostengünstig auch in größeren Mengen zu gewinnen. Es kommt, wie bereits erwähnt, vor allem in

Zitrusfrüchten vor. Naringenin und das Naringeninchalcon spielen als eine Art Vorstufe eine zentrale Rolle bei der Flavonoidbiosynthese [22-23]. Die im Rahmen dieser Arbeit umzusetzende Reaktion ist die Überführung eines Flavanons in ein Dihydrochalcon, hier durch Naringenin und Phloretin vertreten (Abbildung 2.4).

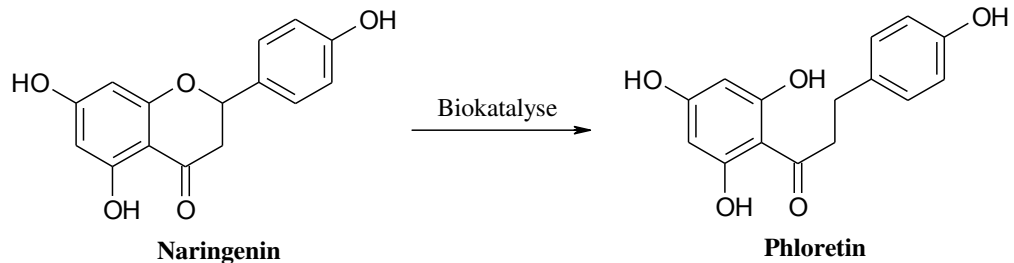


Abbildung 2.4: Biokatalytische Umsetzung von Naringenin zu Phloretin

Abbau von Flavonoiden durch Eubacterium ramulus

E. ramulus ist ein humanes obligat anaerobes, gram-positives Darmbakterium. Es wurde erstmals 1976 von Moore et al. beschrieben und konnte 1999 durch Schneider et al. aus humanem Fäzes isoliert werden [24-25]. Natürlicherweise kommt *E. ramulus* in großer Zahl im Darmtrakt vor und ist unter anderem an dem Abbau von Flavonoiden durch Deglycosylierung und Spaltung des Flavonoidgerüsts beteiligt. Die Zellzahl dieser Bakterienspezies im menschlichen Darm beträgt etwa 10^7 - 10^9 Zellen/g Fäzes und erhöht sich bei flavonoidreicher Ernährung [26]. *E. ramulus* ist vor allem dafür bekannt, vielfältige Flavonole und Flavanone zu verwerten. So zeigten Schneider et al. beispielsweise, dass *E. ramulus* auf Quercetin-3-glucosid als alleinige Kohlenstoffquelle wachsen kann [24]. Neben Quercetin werden auch Flavonoide wie Taxifolin, Luteolin, Kämpferol, Eriodictyol und Naringenin unter Ringspaltung zu Phenylcarbonsäuren abgebaut [27]. Die postulierten Abbauwege sind für Flavonole am Beispiel von Quercetin (A) und für Flavone am Beispiel von Apigenin (B) in Abbildung 2.5 dargestellt.

Das Flavonol Quercetin (Abbildung 2.5 A) wird dem Anschein nach zunächst an der C-2/C-3-Doppelbindung im C-Ring reduziert, was zu der Bildung des Dihydroflavonols Taxifolin führt. Dieses wird dann wiederum durch Isomerisierung zu den entsprechenden tautomeren Chalconen umgesetzt. Durch anschließende Hydrolyse unter Abspaltung von Phloroglucin entsteht das Phenylpyruvat. Nach anschließender Decarboxylierung und Hydrolyse wird das Endprodukt 3,4-

Dihydroxyphenyllessigsäure gebildet. Unterschiede zum Abbaumechanismus des Flavons Apigenin (Abbildung 2.5 B) liegen hier in einer weiteren Reduktion des entstandenen Naringeninchalcons zum Dihydrochalcon Phloretin.

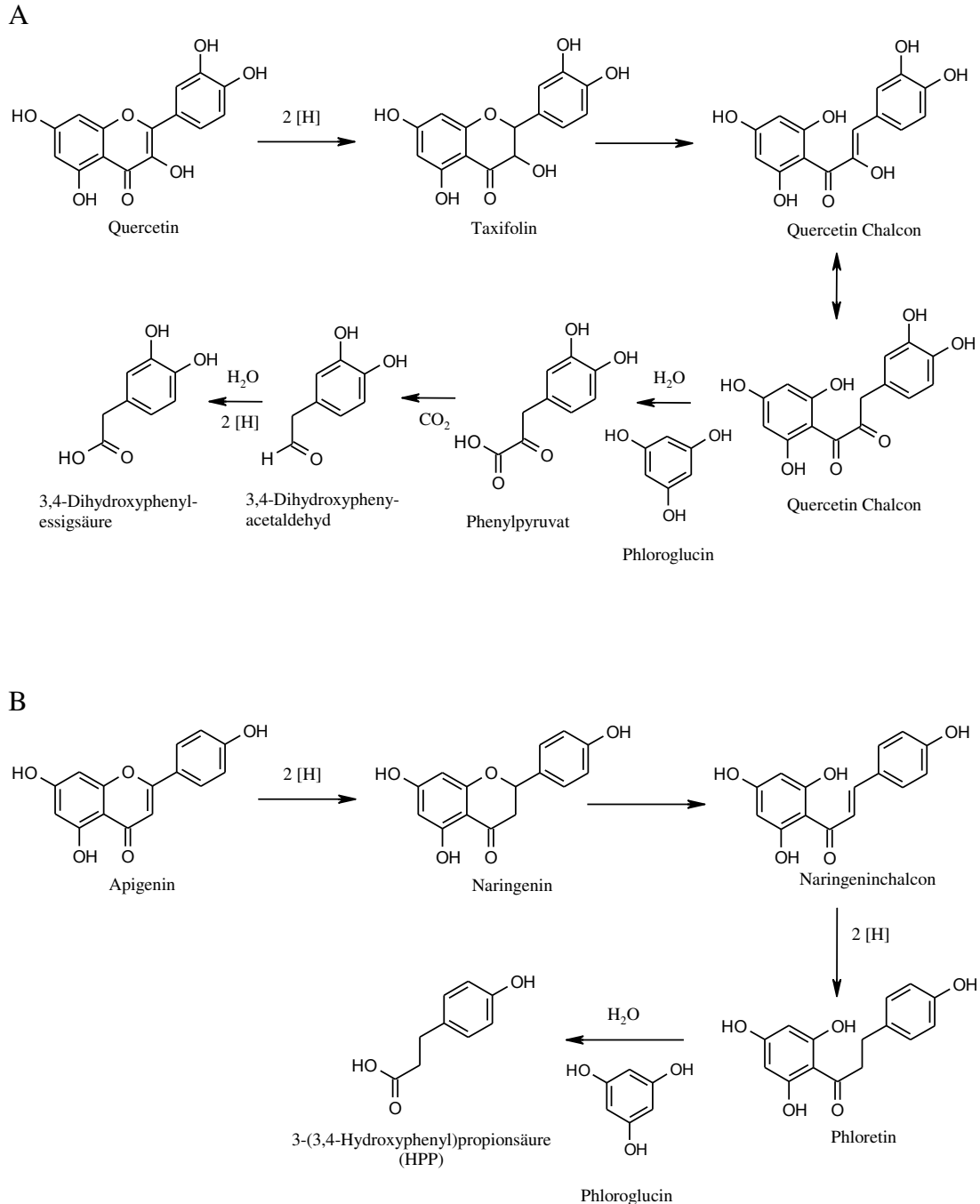


Abbildung 2.5: Postulierter Abbauweg verschiedener Flavonoide nach Schneider und Blaut; A: Quercetin, B: Apigenin [27]

So wird Apigenin ebenfalls zunächst reduziert was zur Bildung von Naringenin führt, das dann zum Naringenin Chalcon isomerisiert wird. Durch die Reduktion des

Chalcons entsteht anschließend das Dihydrochalcon Phloretin, das durch Hydrolyse zu Phloroglucin und 3-(3,4-Hydroxyphenyl)propionsäure (HPP) gespalten wird.

Eine durch Herles vorgeschlagene Ergänzung zum möglichen Abbaumechanismus des Naringenins und der beteiligten Enzyme wird in Abbildung 2.6 vorgestellt [28].

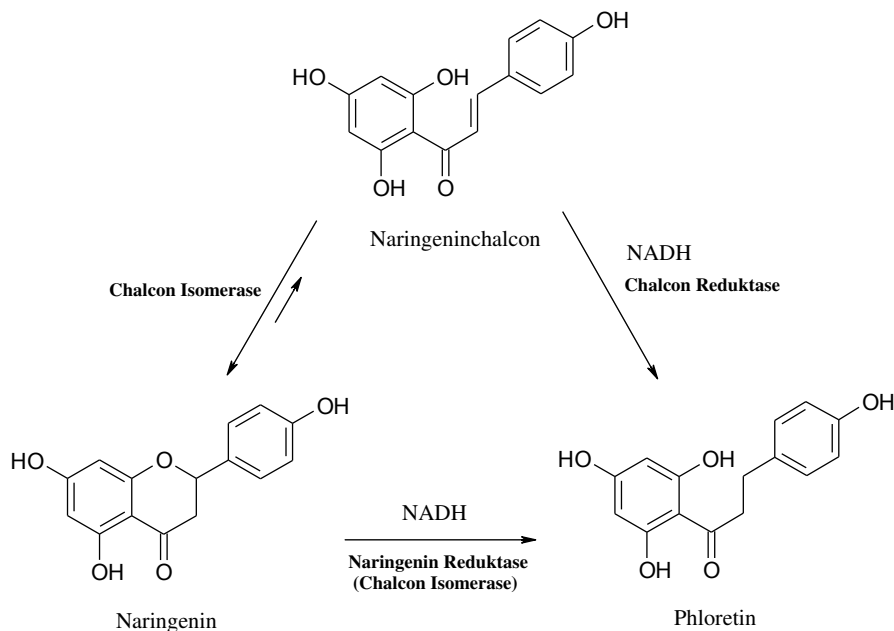


Abbildung 2.6: Möglicher Reaktionsmechanismus der Chalcon Isomerase (CHI) nach Herles [28]

Da es sich hierbei um postulierte und noch nicht eindeutig bestätigte Abbauewege handelt, sind auch andere Mechanismen nicht auszuschließen. Zur weiteren Betrachtung sollen die hier beschriebenen Wege aber zumindest als Anhaltspunkt dienen, wie auch die in der Literatur beschriebenen Enzyme, die an den entsprechenden Reaktionsschritten beteiligt sein sollen. Hierbei stehen vor allem die Chalcon Isomerase (CHI) und die Phloretinhydrolase (PhH) aus *E. ramulus* im Mittelpunkt der Betrachtungen.

Aufgrund des postulierten Abbauewegs nach Schneider und Blaut sowie Untersuchungen durch Herles kann angenommen werden, dass die CHI an der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin beteiligt ist. Es gibt allerdings Hinweise, dass diese die Reaktion nicht alleine katalysiert [24, 27-28]. Die CHI aus *E. ramulus* ist die erste beschriebene bakterielle CHI, während alle anderen bisher beschriebenen CHIs pflanzlichen Ursprungs sind [29]. Die pflanzlichen CHIs sind untereinander

sehr ähnlich und Bestandteil der Flavonoidbiosynthese. Sie sind monomere Proteine mit einer Größe von etwa 16-50 kDa. Die CHI aus *E. ramulus* ist mit einem Molekulargewicht von 129 kDa hingegen deutlich größer und aus vier gleichen Untereinheiten von etwa 30 kDa aufgebaut (Homotetramer) [28]. Homologien zu pflanzlichen CHIs konnten bislang nicht nachgewiesen werden. Welche Rolle die CHI genau bei dem Abbau oder der Umsetzung der Flavonoide in *E. ramulus* spielt, ist noch unklar. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die CHI in der Lage ist, verschiedene Flavonoide wie Naringenin, Taxifolin und Butein umzusetzen und nur eine eingeschränkte Substratspezifität vorliegt [28]. Für pflanzliche CHIs scheint jedoch eine Carbonylgruppe in C4-Position des C-Rings des Substrats essentiell zu sein. Offenbar wird die pflanzliche CHI hier koordiniert und somit den weiteren Reaktionsverlauf initiiert [30-31].

Genauere Untersuchungen gibt es hingegen bereits zur PhH, die 2004 durch Schoefer et al. aus *E. ramulus* isoliert und in *E. coli* kloniert und exprimiert werden konnte [32]. Sie besteht als Homodimer aus zwei 30 kDa Untereinheiten. Laut Literatur weist das native Protein ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 55 kDa auf (ermittelt mittels Gelfiltration) [32]. Die PhH katalysiert die Hydrolyse von Phloretin zu Phloroglucin und HPP.

2.2 Anaerobe Kultivierungstechniken

Bakterien lassen sich nach ihrem Bedarf an Sauerstoff grob in Aerobier und Anaerobier einteilen, wobei die Anaerobier hier im Mittelpunkt der Betrachtungen stehen sollen. Schaut man sich die Bedürfnisse an die Gasatmosphäre etwas genauer an, erfolgt eine Unterteilung in obligat aerob, fakultativ oder obligat anaerob sowie mikroaerophil und capnophil [33-34].

Obligat aerobe Bakterien benötigen zwingend Sauerstoff, um zu überleben und entsprechende Stoffwechselprozesse durchzuführen, während fakultativ anaerobe Bakterien sowohl mit als auch ohne die Anwesenheit von Sauerstoff wachsen können. Obligat anaerobe Bakterien benötigen keinen elementaren molekularen Sauerstoff und wachsen nur unter anoxischen Bedingungen. In der Regel wirkt Sauerstoff auf sie sogar toxisch oder zumindest wachstumshemmend, da Anaerobier keine Enzyme (wie Superoxiddismutase, Katalase oder Peroxidase) besitzen, um reaktive Sauerstoffradikale abzubauen [35]. Eine Ausnahme bilden die aerotoleranten Organismen, die zwar über einen anaeroben Stoffwechsel verfügen,

aber durch die Anwesenheit von Sauerstoff nicht beeinflusst werden. Desweiteren existieren zwei Kategorien, die fälschlicher Weise häufig als anaerob angesehen werden, obwohl sie dieses nicht sind. Hierbei handelt es sich zum einen um mikroaerophile Bakterien, die zwar nicht unter atmosphärischen Bedingungen wachsen können, aber dennoch geringe Konzentrationen von Sauerstoff bevorzugen und zum anderen um capnophile Bakterien, die zwingend eine erhöhte CO₂-Konzentration (etwa 5-10 %) zum Wachstum benötigen.

Anaerobier benötigen anoxische Wachstumsbedingungen. Um diese zu gewährleisten, kommen Techniken zum Einsatz die auf dem Ausschluss von Sauerstoff beruhen und im Allgemeinen auf die in den sechziger Jahren von Hungate beschriebenen Techniken zurückzuführen sind [36-37].

Grundsätzlich stehen hier zwei Varianten zur Wahl, die Hungate Technik und die Verwendung von Anaerobenkammern (Glove Box). Bei der Hungate Technik handelt es sich um die Erzeugung lokaler sauerstofffreier bzw. armer Bereiche zum Schutz der verschiedenen Arbeitsmaterialien und vorreduzierten Medien. Bei der Erzeugung eines lokalen anoxischen Bereichs werden die verschiedenen Arbeiten unter einem weitestgehend sauerstofffreiem Gasstrom durchgeführt. Hierbei können allerdings schnell zumindest geringe Mengen Sauerstoff eingetragen werden, die aber durch die Zugabe von Reduktionsmitteln entfernt werden können. Dennoch gilt die Hungate Technik bei exakter Durchführung nach wie vor als eine der zuverlässigsten anaeroben Methoden. Je nach Anwendung werden Wasserstoff, Helium, Argon, Stickstoff oder Kohlenstoffdioxid pur oder auch in definierten Mischungsverhältnissen verwendet.

Die Anaerobenkammer bietet hingegen einen komplett abgetrennten sauerstofffreien Arbeitsraum. Der Vorteil eines sauerstofffreien Arbeitsraumes ist, dass die Gefahr des Sauerstoffeintrags bei richtiger Handhabung minimiert werden kann. Innerhalb dieses Raumes kann problemlos z.B. auch mit offenen Gefäßen oder Agarplatten gearbeitet werden. Nachteil ist der hohe apparative Aufwand und die speziell erforderliche Arbeitsweise, so dass der Zutritt nur mit einer Sauerstoffmaske möglich ist oder der Zugriff von außen über entsprechende Handschuhe erfolgen muss (Glove Box). Eine Glove Box ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

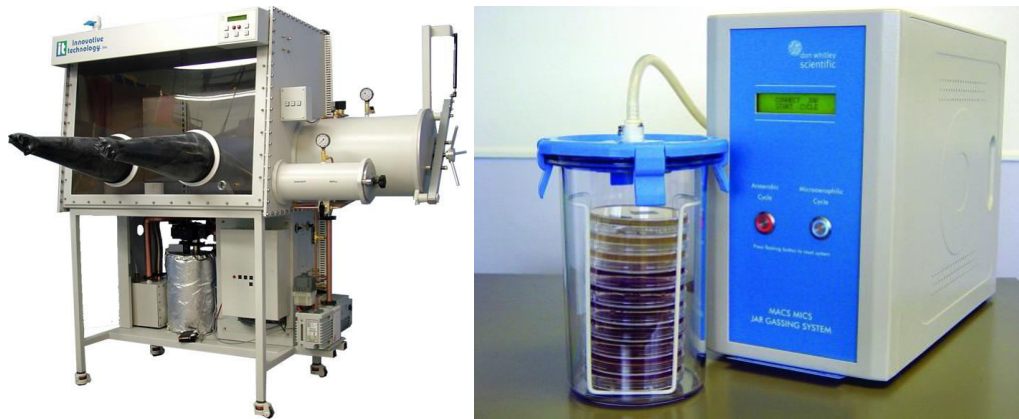


Abbildung 2.7: Glove Box (links) und Anaerobentopf mit Begasungseinheit (rechts) [38-39]

Voraussetzung für beide Verfahren ist die Verwendung sogenannter vorreduzierter Medien und Lösungen, aus denen der gelöste Sauerstoff durch starkes Erhitzen und anschließendes Abkühlen unter Begasung mit einem sauerstofffreien Gas (s.o.) entfernt wird. In den meisten Fällen sind zusätzlich Reduktionsmittel zur vollständigen Entfernung des Sauerstoffs enthalten.

Zur Handhabung einiger anaerober Bakterien sind auch Anaerobentöpfe weit verbreitet. Es existieren verschiedene Ausführungen mit und ohne direkte Begasung. Ein Beispiel mit aktiver Begasung ist in Abbildung 2.7 zu sehen. Zwar wird im Inneren ebenfalls eine weitestgehend anoxische Atmosphäre gewährleistet, problematisch ist jedoch der Zugriff auf die im Anaerobentopf befindlichen Materialien. Durch Öffnen des Deckels werden kurzzeitig die im Inneren herrschenden anoxischen Bedingungen beeinträchtigt, weshalb sich diese im Gegensatz zur Hungate Technik oder Anaerobenkammer auch nicht zur Kultivierung von sauerstoffsensitiven Anaerobiern eignen.

Die anaerobe Kultivierung stellt nicht nur besondere Anforderungen an die Arbeitstechniken, sondern auch an Reaktionsgefäße und -systeme zur Gewährleistung entsprechender anaerober Bedingungen. So müssen für die unterschiedlichsten Größenordnungen, von wenigen Millilitern bis zu mehreren Litern, verschiedene Modifizierungen zur Anpassung klassischer Kultivierungssysteme erfolgen, um sie auch unter anaeroben Bedingungen nutzbar zu machen.

Klassische Schüttelkolben sind meist für einen möglichst hohen Sauerstoffeintrag konzipiert und aufgrund ihrer zum Großteil luftdurchlässigen Verschlüsse nicht für den anaeroben Gebrauch geeignet. Hier kommen in der Regel Butylsepten, die eine

besonders geringe Sauerstoffdurchlässigkeit aufweisen, zum Einsatz. Diese werden zusätzlich durch Schraub- oder Krimpverschlüsse dicht verschlossen. Da durch anaerobe Bakterien häufig Gase gebildet werden, empfiehlt es sich druckstabile Flaschen zu verwenden, die auch im luftdicht verschlossenen Zustand dem entstehenden Innendruck standhalten. Diese sind meist bis zu einer Größe von einem Liter erhältlich. Bei größeren Volumina wird die Handhabung von Anaerobier jedoch zunehmend komplizierter.

Die hier vorgestellten Techniken können auch zur Kultivierung von Anaerobiern in Reaktorsystemen angewandt werden. Wichtig sind hierbei Modifikationen wie die Begasung mit einem sauerstofffreien Gas und die entsprechende Vorbereitung der zu verwendenden Medien und Lösungen. Spezielle Reaktorsysteme gibt es aufgrund der geringen Nachfrage für anaerobe Bakterien derzeit nicht.

Trotz ihrer vielfältigen Fähigkeiten stellen die anspruchsvolle Handhabung und die Toxizität vieler Anaerobier häufig ein Problem dar und verhindern den Einsatz im Großmaßstab. Desweiteren erschwert der meist geringe Kohlenstoff-Wachstumsertrag der meisten Anaerobier die Gestaltung eines ökonomischen Prozesses. Beruhend auf anaeroben Stoffwechselprozessen erfolgt nur ein vergleichsweise geringer Energiegewinn durch die Metabolisierung von C-Quellen, was in einem geringen Wachstumertrag resultiert [35]. Alle Prozesse in denen Biomasse und Produkt direkt miteinander verknüpft sind, können mit anaeroben Bakterien niemals ökonomische Vorteile gegenüber einem konventionellen Prozess bieten [33]. Daher ist die Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Isolierung von Enzymen aus Anaerobiern weit verbreitet. Viele industriell nutzbare Enzyme werden nach Möglichkeit in einen Produktionsstamm kloniert, der dann mit konventionellen Methoden kultiviert werden kann. Der direkte Einsatz von anaeroben Bakterien beschränkt sich auf wenige Produktions-Prozesse, die in der Regel eher im kleinen Maßstab Anwendung finden. Hierbei handelt es sich dann jedoch häufig um recht wertvolle Produkte wie spezielle Impfstoffe, biochemische Substanzen oder seltene Enzyme für die sich auch eine Produktion im small-Scale rentiert.

Beispiele für die Herstellung von Impfstoffen findet man häufig in der Gattung der Clostridien wie beispielsweise *Clostridium tetani* (Tetanus Erreger) [33]. Durch Identifizierung der anaeroben Krankheitserreger können diese wiederum genutzt

werden, um beispielsweise entsprechende Impfstoffe herzustellen. Hierbei dienen zum Teil die ganzen Zellen, Zellbestandteile oder auch produzierte Toxine zur Herstellung der Impfstoffe [40]. Clostridien bieten darüber hinaus eine große Stoffwechsellvielfalt und können zahlreiche Naturstoffe wie Polysaccharide (z.B. Stärke, Cellulose, Hemicellulosen, Pectine), Aminosäuren und Fette als Substrat nutzen [41]. Ein bedeutendes Beispiel aus der chemischen Produktion ist die Aceton-Butanol-Fermentation durch *Clostridium acetobutylicum*.

Insgesamt kommen fakultativ anaerobe bzw. aerotolerante Kulturen aufgrund der besseren Handhabbarkeit deutlich häufiger zum Einsatz als die obligat anaeroben. Hier sind Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder auch Milchsäurebakterien zu nennen, die in einer Vielzahl von Herstellungsprozessen in der Lebensmittelindustrie Anwendung finden oder wie *Lactobacillus casei* sogar als lebende Zellen als Zusatz in probiotischen Produkten dienen.

Der größte Nutzungsbereich für anaerobe Bakterien liegt im vielfältigen anaeroben Verdau. Hier finden Anaerobier vor allem in der Abfall-Wirtschaft Anwendung, zum einen zur Erzeugung einer besseren Umweltverträglichkeit durch den Abbau schädlicher Substanzen und zum anderen um Nebenprodukte wie beispielsweise Methan nutzbar zu machen [35, 42].

Tabelle 2.1: Ausgewählte Anwendungsbeispiele von anaeroben Bakterien in industriellen Prozessen

Organismus	Kultivierungsart	Produkt/Prozess
<i>Clostridium tetani</i> oder andere Krankheitserreger	anaerob	Tetanus-Impfstoff Impfstoff-Produktion
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	anaerob	Ethanol, Buttersäure, Butanol, Aceton
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	fakultativ anaerob	Ethanol Lebensmittelherstellung
Milchsäurebakterien	anaerob (aerotolerant)	Konservierung von Lebensmitteln, probiotische Lebensmittel
Methanogene Bakterien	anaerob	Methan, Abreicherung schädlicher Substanzen

Als Beispiel sind die methanogenen Bakterien der Gattung *Methanobacter* oder auch Methanokokken zu nennen die häufig in Klär- oder Biogasanlagen Anwendung finden. Dabei kommen Reaktoren in einer Größenordnung von 5000 m³-15000 m³ zum Einsatz. Eine kurze Zusammenfassung der verschiedenen Anwendungsbereiche ist in Tabelle 2.1 zusammengestellt.

Neben den direkten industriellen Anwendungen von Anaerobiern spielen anaerobe Bakterien in vielen Forschungsbereichen eine wichtige Rolle. Im medizinischen Bereich sind sie sowohl als Krankheitserreger, als auch zur Aufklärung verschiedener Stoffwechselprozesse von großer Bedeutung. Dabei ist nicht nur die Untersuchung ihrer speziellen metabolischen Fähigkeiten von Interesse, sondern auch die Beteiligung an essentiellen Stoffwechselprozessen des menschlichen Organismus. Die Darmflora, in der unter anderem auch das im vorherigen Kapitel beschriebene *E. ramulus* vorkommt, ist hier nur als ein Beispiel zu nennen. Untersuchungen dieser Art bildeten auch die Grundlage für die Anwendung von Probiotika (s.o.).

3 Experimenteller Teil

Durch die Untersuchung eines am Flavonoidabbau beteiligten Bakteriums, des *Eubacterium ramulus*, soll die biokatalytische Produktion des Dihydrochalcon Phloretin evaluiert und optimiert werden.

Dieser Prozess setzt zum einen die erfolgreiche Kultivierung des obligat anaeroben Bakteriums im Labormaßstab voraus und zum anderen müssen die Voraussetzungen für einen möglichen Produktionsmaßstab geschaffen werden.

Zur Absicherung und Charakterisierung des weitestgehend unbekanntem Reaktionsverlaufs wurden verschiedene Untersuchungen vorgenommen. Hierzu diente zum einen *E. ramulus* als Ganzzellkatalysesystem und zum anderen der durch Zellaufschluss und Zentrifugation erhaltene Rohextrakt des Bakteriums. Der Rohextrakt wurde außerdem durch Einsatz verschiedener (chromatographischer) Trennmethode fraktioniert und analysiert, um Hinweise auf die für verschiedene Reaktionsschritte verantwortlichen Enzyme zu erhalten. Darüber hinaus wurde versucht, den Reaktionsverlauf hinsichtlich der Produktion beispielsweise durch den Einsatz von Inhibitoren von Phloretin positiv zu beeinflussen.

Eine genaue Beschreibung der jeweiligen Versuche ist den nachfolgenden Kapiteln zu entnehmen.

3.1 Kultivierung von *Eubacterium ramulus*

Die Kultivierung von obligat anaeroben Bakterien und aerob wachsenden Bakterien unterscheidet sich deutlich voneinander. Während bei aerob wachsenden Bakterien häufig der Sauerstoffeintrag den limitierenden Faktor darstellt und starke Durchmischung erwünscht ist, muss das sauerstofffreie, vorreduzierte Medium bei obligat anaeroben Kulturen während des gesamten Prozesses trotz ausreichender Durchmischung sauerstofffrei gehalten werden. Lösungen, die dem Medium zugeführt werden, müssen ebenfalls anoxisch hergestellt werden. Generell erreichen Anaerobier bei weitem geringere Zelldichten als dies beispielsweise bei aeroben Bakterien wie *E. coli* der Fall ist. Dies ist auf den anaeroben Stoffwechsel und den damit zusammenhängenden geringen Kohlenstoff-Wachstumsertrag zurückzuführen (siehe auch Kapitel 2.2).

Im Folgenden wird die Kultivierung von *E. ramulus* in einem Maßstab von mehreren Litern angestrebt, um zum einen einen angepassten Kultivierungsprozess zu etablieren und zum anderen für die angestrebten Analysen ausreichend Biomasse zur Verfügung zu stellen. Bisher ist für *E. ramulus* ausschließlich die Kultivierung in Flaschen beschrieben, die auch im Rahmen dieser Arbeit bis zu einem maximalen Arbeitsvolumen von 400 mL durchgeführt wurde. Die Kultivierung erfolgte stets bei 37 °C. Eine entsprechende Kultur ist in Abbildung 3.1 dargestellt.



Abbildung 3.1: Flaschenkulturen von *E. ramulus*; links: 100 mL Serumflasche (40 mL Kulturvolumen), rechts: 1 L-Flasche (400 mL Kulturvolumen)

Die maximal erreichten OD_{600} -Werte liegen in einem Bereich von etwa 1,4-2 rel. AU, die maximale Wachstumsrate μ_{\max} bei etwa $0,35 \text{ h}^{-1}$ ($\pm 0,02$). Ausgehend von den in der Literatur empfohlenen Kultivierungsbedingungen und durch eigene Kultivierungen gesammelten Erfahrungen soll ein passendes Reaktorsystem aufgebaut bzw. angepasst werden. Zunächst werden durch Vorversuche einige relevante Rahmenbedingungen wie Glukosekonzentration und Schüttelgeschwindigkeit getestet, die dann in das Scale-up einfließen. Im Rahmen einer Masterarbeit wurden einige Schritte des vorgenommenen Scale-ups durchgeführt [43].

3.1.1 Vorversuche zu Glukosekonzentration und Schüttelgeschwindigkeit

In Hinblick auf ein Scale-up der Kultivierung von *E. ramulus* wurden verschiedene Bedingungen in Vorversuchen getestet. Zu diesem Zweck wurden Flaschenkulturen von bis zu 400 mL Arbeitsvolumen gezogen. Da viele Mikroorganismen durch zu hohe Glukosekonzentrationen in ihrem Wachstum gehemmt werden, wurde der Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen auf das Wachstum von *E. ramulus* getestet. Üblicherweise erfolgt die Kultivierung in Flaschen statisch ohne weitere

Durchmischung. Hierdurch wird zum einen zwar das Risiko eines möglichen Sauerstoffeintrags in das Medium verringert, andererseits aber auch der Stofftransport nicht gefördert. Im Allgemeinen wirkt sich eine intensive Durchmischung bei Anaerobiern negativ auf das Wachstum aus. In wieweit dies auch auf *E. ramulus* zutrifft, sollte durch die Betrachtung unterschiedlicher Schüttelgeschwindigkeiten gezeigt werden.

Glukose

Zur Untersuchung des Einflusses der Glukosekonzentration auf das Wachstum von *E. ramulus* wurden dem nach Kapitel 5.2.1 hergestelltem Medium Glukosekonzentrationen von jeweils 6, 12 und 16 g/L zugefügt. Die Kultivierung erfolgte in einem Mediumvolumen von 400 mL bei 37 °C. Zur Beurteilung des Wachstums wurde die Optische Dichte bei einer Extinktion von 600 nm (OD_{600}) gemessen und die Glukosekonzentration bestimmt. Eine Übersicht der aufgenommenen Wachstumskurven ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

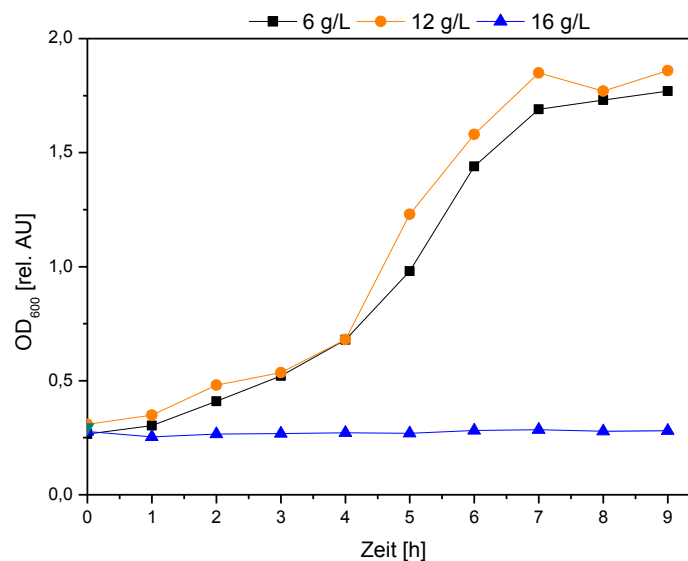


Abbildung 3.2: Kultivierung von *E. ramulus* unter Einfluss verschiedener Glukosekonzentrationen, OD_{600} als Funktion der Zeit

Betrachtet man den Verlauf der Optischen Dichte als Funktion der Zeit, so ist zu sehen, dass sich die aufgetragenen Kurven für die Kultivierungen mit 6 g/L und 12 g/L Glukose nur geringfügig unterscheiden. Nach etwa 4 Stunden Kultivierungsdauer erfolgt der Eintritt in die exponentielle Phase. Beide Kulturen

erreichen in der stationären Phase eine ähnliche maximale OD_{600} von 1,8 (6 g/L) und 1,9 (12 g/L) rel. AU. Diese Schwankungen bewegen sich in einem für Kultivierungen dieser Art üblichen Bereich. Insgesamt wurden jeweils etwa 1,5 g/L der eingesetzten Glukose metabolisiert, so dass auch bei einer Anfangskonzentration von 6 g/L keine Limitierung vorliegt. Im Gegensatz dazu führt eine Glukosekonzentration von 16 g/L zu einer vollständigen Hemmung des Wachstums von *E. ramulus*. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass Glukosekonzentrationen bis zu einer Konzentration von 12 g/L das Wachstum von *E. ramulus* nicht beeinflussen und in weiteren Untersuchungen bedenkenlos verwendet werden können.

Schüttelgeschwindigkeit

Ähnliche Betrachtungen wurden auch zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Schüttelgeschwindigkeiten vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden wiederum mehrere Flaschenkulturen mit einem Arbeitsvolumen von 400 mL unter den gleichen Bedingungen inokuliert und auf einer Schüttelplatte bei 0, 50, 75 und 100 rpm inkubiert.

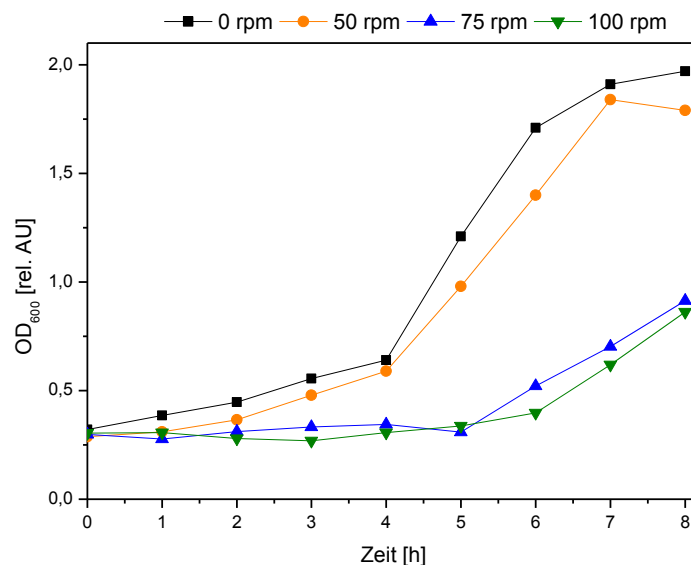


Abbildung 3.3: Wachstum von *E. ramulus* bei verschiedenen Schüttelgeschwindigkeiten von 0, 50, 75 und 100 rpm

Geringe Schüttelbewegungen (50 rpm) führen zwar zu einer leichten Abflachung der Wachstumskurve, lassen aber dennoch das Wachstum der Kultur bis zu einer OD_{600}

von 1,8 rel. AU zu. Eine Steigerung des Wachstums konnte im Vergleich zu der stehend kultivierten *E. ramulus* Kultur demnach nicht erzielt werden. Höhere Schüttelgeschwindigkeiten (≥ 50 rpm) haben allerdings offensichtlich einen starken Einfluss auf den Verlauf der Wachstumskurve. Nach einer deutlich verlängerten Lag-Phase zeigt sich auch nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ein geringerer Anstieg der optischen Dichte als dies bei 0 und 50 rpm der Fall ist. In Abbildung 3.3 ist die OD_{600} als Funktion der Zeit aufgetragen. Anhand der erhaltenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass *E. ramulus* nur bedingt mechanische Belastungen toleriert. Aus diesem Grund sollten zur weiteren Optimierung und Maßstabsvergrößerung vor allem scherstressarme Durchmischungen in Betracht gezogen werden.

3.1.2 Kultivierung in Beutelreaktoren

Beutelreaktoren lassen sich dem Bereich der „Disposable Bioreactors“ zuordnen. Diese Einwegreaktoren sind nicht wie klassische Reaktoren aus Glas oder Stahl gefertigt, sondern bestehen aus von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassenen Polymermaterialien, wie Polyethylen, Polypropylen, Polystyren, Ethylvinylacetat oder ähnlichem. Diese Kunststoffe sind in der Regel in Form einer dreilagigen Verbundfolie verarbeitet, bestehend aus einer Stützschiicht, einer für Gas impermeablen Barrierschicht und einer Kontaktschicht, wobei nur diese tatsächlich Kontakt zur Kultur hat [44]. Im Vergleich zu einem klassischen Stahlreaktor entfällt hier durch die Verwendung von γ -Strahlen behandelten Materialien sowohl die Sterilisation als auch die anschließende Reinigung des Reaktors. Aufgrund des vollständigen Austauschs des Kultivierungsbehälters entfallen lange Rüstzeiten durch Reinigung, Sterilisation oder Sterilkontrollen. Durch die ständige Erneuerung des Arbeitssystems verringern sich außerdem der erforderliche Wartungsaufwand sowie die Gefahr von Kreuzkontaminationen auf ein Minimum. Weitere Vorteile ergeben sich durch hohe Flexibilität bei wechselnden Produktchargen und niedrigere Anschaffungskosten der Einwegsysteme im Vergleich zu klassischen Stahlsystemen. Dies kann sich speziell bei nur kurzfristig genutzten Produktionsprozessen auszahlen. Darüber hinaus wird durch die Verwendung von Einwegsystemen eine gleichbleibende Qualität gewährleistet, die die Umsetzung gesetzlich vorgeschriebener Qualitätssicherungssysteme wie GMP (Good Manufacturing Practice) und GLP (Good Laboratory Practice) deutlich vereinfacht [45].

Nach der Art der Durchmischung können Beutelreaktoren grob in folgende Typen eingeteilt werden: statische oder gerührte Beutelreaktoren, wellen- oder orbitaldurchmischte Systeme sowie Beutelreaktoren mit Vibromixer oder Hybrid-System [46-47].

Am verbreitetsten sind derzeit gerührte Beutelreaktoren, die vom Grundprinzip einem klassischen Reaktor sehr nahe kommen und wellendurchmischte Systeme, die sich vor allem durch eine schonende Durchmischung mit geringer mechanischer Belastung (wie Scherstress) auszeichnen. Die Wellen-induzierte Durchmischung hat sich insbesondere zur Kultivierung Scherstress-sensitiver Organismen wie tierischen und humanen Zellen bewährt. Durch den im Vergleich zu gerührten Systemen nicht ganz so hohen Sauerstoffeintrag ist die Eignung speziell für aerobe mikrobielle Anwendungen jedoch nur eingeschränkt gegeben. Handelt es sich allerdings um fakultativ oder sogar obligat anaerobe Mikroorganismen spielt dieses keine Rolle und kann sogar von Vorteil sein.

Um nun ein Scale-up der Kultivierung von *E. ramulus* in den Reaktormaßstab zu erzielen, wurde ein Beutelreaktor mit Wellen-induzierter Durchmischung gewählt. Aufgrund der zuvor beschriebenen Vorteile, insbesondere der schonenden Durchmischung, scheint dieses Reaktorsystem die erforderlichen Eigenschaften zur Kultivierung von *E. ramulus* grundsätzlich zu erfüllen.

Es wurden verschiedene Modelle des BIOSTAT® CultiBag RM der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen getestet. Der BIOSTAT® CultiBag RM besteht aus einem Reaktorbeutel der in verschiedenen Arbeitsvolumina erhältlich ist, sowie aus einem Wippschüttler (Rocker) mit Temperaturregelung und einer digitalen Kontrolleinheit (siehe Abbildung 3.4). Je nach Ausstattung ist auch die Möglichkeit der pH-Regelung und pO₂-Messung über optische Sensoren gegeben [48]. Alle Kultivierungen wurden bei 37 °C durchgeführt. Der Soll-Wert wurde auf einen pH-Wert von 7 gesetzt.

Zunächst wurde mit dem Basismodell BIOSTAT® CultiBag RM 10 L basic (ohne pH-Wert-Regelung) gearbeitet. Das mögliche Arbeitsvolumen liegt hier zwischen 1-5 L, verwendet wurden 2 L. Das zunächst relativ kleine Volumen diente unter anderem zur grundlegenden Optimierung des anaeroben Prozesses, das heißt der Gewährleistung anoxischer Bedingungen und der Vorbereitung des vorreduzierten

Mediums. Die Entfernung des Sauerstoffs erfolgt unter anderem durch Kochen des Mediums (siehe Kapitel 5.2.1). Aufgrund des nur begrenzt hitzebeständigen Beutelmaterials (max. 50 °C) wurde die Vorbereitung des anaeroben vorreduzierten Mediums in einem gesonderten Prozess durchgeführt. Vor der Überführung des Mediums wurde der Beutel mehrfach mit Stickstoff gespült. Für den letzten Spülschritt wurde ein Stickstoff-CO₂-Gemisch (80:20, v:v) verwendet, das auch bei der Herstellung des Mediums benutzt wird (Kapitel 5.2.1).

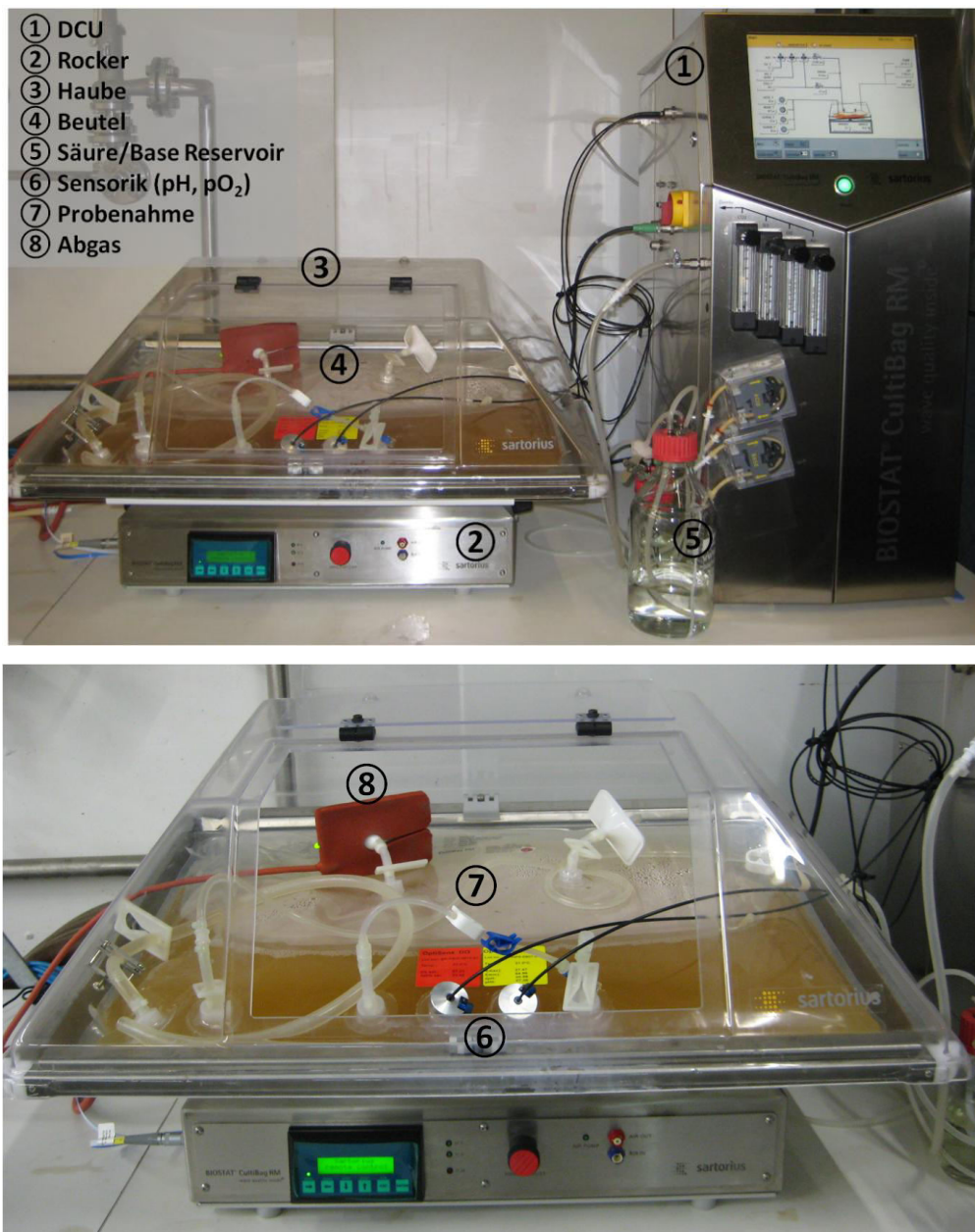


Abbildung 3.4: BIostat® CultiBag RM 20 L optical

Das Überführen des Mediums wird durchgeführt, während das Medium noch heiß ist, da sich so nur wenig Gas in der Flüssigkeit lösen kann und die Gefahr des Sauerstoffeintrags verringert wird. Um das Medium jedoch auf die maximal materialverträgliche Temperatur herunterzukühlen, wird die Überführung mittels Schlauchpumpe über einen in Eiswasser gelagerten Schlauch vorgenommen. Um die Sterilität sicherzustellen, wird bei diesem Prozess ein Sterilfilter eingesetzt. Falls nötig, dient ein zusätzliches Reduktionsmittel (Na_2S) zur Entfernung von eingetragenen Sauerstoffspuren, die durch den im Medium enthaltenen Indikator Resazurin durch Farbumschlag angezeigt werden. Alle weiteren benötigten Lösungen wie Säure und Base werden ebenfalls möglichst sauerstoffarm mit ausgekochtem und durch N_2/CO_2 begastem vollentsalztem Wasser hergestellt (Arium, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen).

Unter Verwendung des Arbeitsvolumens von 2 L im BIOSTAT® CultiBag RM 10 L basic konnte eine maximale OD_{600} von 3 rel. AU erreicht werden. Im Vergleich zu Kultivierungen von *E. ramulus* in Kulturflaschen mit einem Arbeitsvolumen von 400 mL bedeutet dies eine Steigerung um den Faktor 1,5. Der durch die Wellenbewegung verbesserte Stoffaustausch bringt unter den bestehenden Bedingungen also nur eine geringe Steigerung des Wachstums mit sich. Da am Ende der Kultivierung noch eine Glukosekonzentration von etwa 2 g/L vorhanden war, ist diese als limitierender Faktor auszuschließen.

Durch *E. ramulus* werden verschiedene organische Säuren gebildet, die den pH-Wert des Mediums zunehmend sinken lassen, bis dieser wachstumshemmend wirkt. Dementsprechend wurde zur weiteren Optimierung eine pH-Wert-Regelung implementiert und das Volumen auf das maximale Arbeitsvolumen von 5 L unter Verwendung des BIOSTAT® CultiBag RM 10 L optical erhöht. Durch diese Erweiterung konnte die maximale OD_{600} nochmals verdoppelt und Werte von über 6 rel. AU erreicht werden. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} beträgt hierbei $0,50 \text{ h}^{-1}$. Der Verlauf der optischen Dichte und der Glukosekonzentration als Funktion der Zeit sind Abbildung 3.5 zu entnehmen. Nach etwa 6 h Kultivierungsdauer geht die Glukosekonzentration gegen Null, so dass in diesem Fall die Glukose zur Limitierung des Wachstums von *E. ramulus* führt.

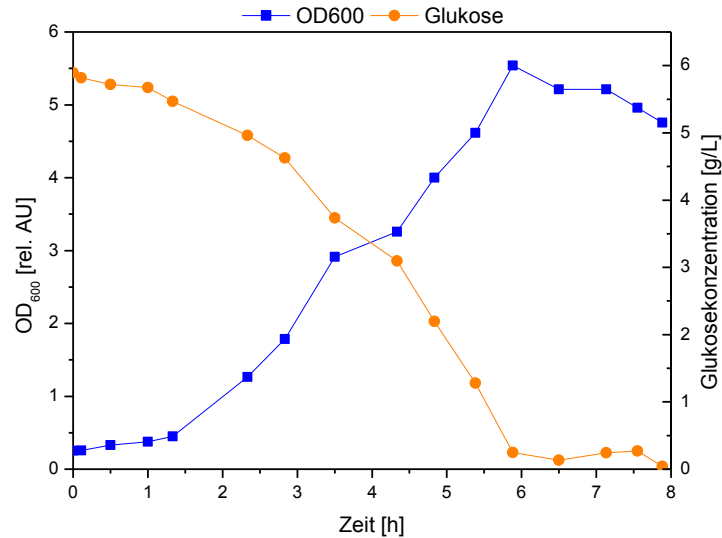


Abbildung 3.5: Kultivierung von *E. ramulus* im BIOSTAT® CultiBag RM 10 L optical mit einem Arbeitsvolumen von 5 L

Zur weiteren Erhöhung der Biomasseproduktion wurde als nächste Skalierungsstufe das Arbeitsvolumen unter Einsatz des nächstgrößeren Beutels BIOSTAT® CultiBag RM 20 L optical auf 10 L verdoppelt (maximales Arbeitsvolumen). Desweiteren wurde auch die Glukosekonzentration im Medium von etwa 6 g/L auf 12 g/L erhöht. Die Kultivierung ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

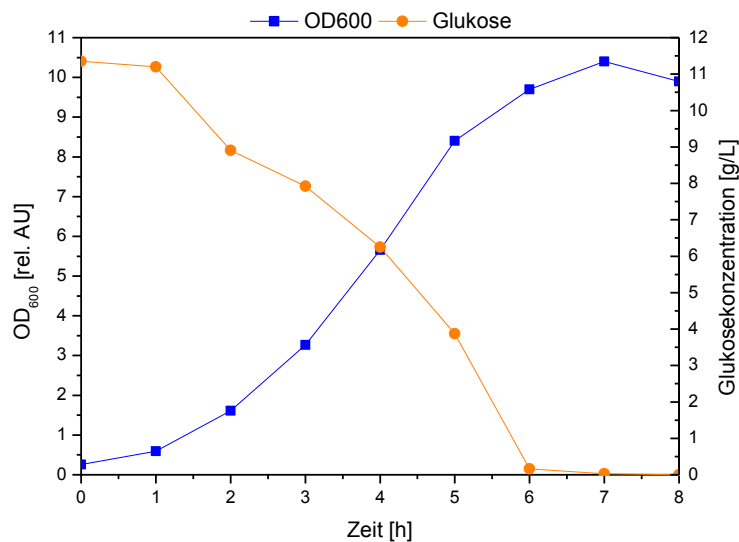


Abbildung 3.6: Kultivierung von *E. ramulus* im BIOSTAT® CultiBag RM 20 L optical mit einem Arbeitsvolumen von 10 L

Nach 7 h wird eine maximale OD_{600} von über 10 rel. AU erreicht, die maximale Wachstumsrate der Kultivierung liegt bei $0,55 \text{ h}^{-1}$. Der einzig limitierende Faktor scheint zu diesem Zeitpunkt die nach 5-6 Stunden vollständig verstoffwechselte Glukose zu sein.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist ein Ziel der beschriebenen Optimierungen die Bereitstellung ausreichender Mengen an Biomasse. Aus entsprechenden 10 L Kultivierungen kann am Ende eine Feuchtzellmasse (FZM) von ca. 70 g bzw. 7 g/L gewonnen werden. Die für die nachfolgenden Untersuchungen vorgesehene Biomasse von *E. ramulus* wurde allerdings bereits am Ende der exponentiellen Phase und nicht erst in der stationären Phase geerntet. Die Diagramme der entsprechenden Kultivierungen sind dem Anhang (Abbildung 5.3) zu entnehmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in der Literatur noch nicht beschriebene Realisierung anaerober Bedingungen in einem Beutelreaktor bis zu einem Arbeitsvolumen von 10 L gelungen ist. Die Kultivierung des obligat anaeroben Bakteriums *E. ramulus* konnte erfolgreich in einem wellendurchmischten System durchgeführt werden und lieferte eine 5-fache Erhöhung der erzeugten Biomasse im Vergleich zu Flaschenkulturen. Hierbei hat vor allem die Einführung einer pH-Wert-Regelung zum gewünschten Erfolg geführt. Da zurzeit die Glukose den einzig limitierenden Faktor darstellt, ist eine weitere Optimierung durchaus denkbar. Zu diesem Zweck könnte in fed-batch Verfahren in Betracht gezogen werden. Für ein weiteres Scale-up wäre beispielsweise der BIOSTAT® CultiBag RM 50 L optical erhältlich, dessen maximales Arbeitsvolumen 25 L umfasst. Eine Übertragbarkeit auf das nächstgrößere Modell sollte problemlos möglich sein. Möglicherweise sollte hierfür jedoch eine Anpassung der Mediumherstellung angestrebt werden, da diese bisher in 2-3 L Chargen erfolgte und für größere Volumina entsprechend zeitaufwendiger wird. Prinzipiell können aber durch beliebige Wiederholung des Herstellungsprozesses auch größere Volumina produziert werden (siehe Kapitel 5.2.1).

3.1.3 Kultivierung im Stahlreaktor

Neben der erfolgreichen Anwendung von Beutelreaktoren sollte auch der klassische Stahlreaktor als Vergleichssystem zur anaeroben Kultivierung eingesetzt werden.

Der klassische Stahlreaktor ist in der Regel eher auf aerobe Organismen ausgelegt und für turbulente Durchmischung bei hohem Sauerstoffeintrag konzipiert, was für anoxische Anwendungen mit nur eingeschränkt Scherstress-toleranten Bakterien zum Problem werden könnte. Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt, wird das Wachstum von *E. ramulus* bereits durch Schüttelgeschwindigkeiten von > 50 rpm beeinträchtigt. So ist davon auszugehen, dass auch die mechanische Belastung durch ein Rührwerk nur in gewissem Maße möglich ist, ohne negative Auswirkungen auf das Wachstum auszuüben. Aus diesem Grund wurden an dem verwendeten Stahlreaktor, einem BIOSTAT® C (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen), verschiedene Anpassungen vorgenommen. Soweit möglich wurden alle Schikanen der Reaktorinnenwände demontiert und nur einer der drei möglichen Impeller eingebaut. Durch Einsatz eines Propellerrührers mit drei großen Rührblättern, soll für die nötige Durchmischung mit möglichst geringem Scherstress gesorgt werden. Hierfür wurde zudem die geringst mögliche Rührerdrehzahl von 18 rpm gewählt.

Die Präparation des anaeroben vorreduzierten Mediums kann direkt im Reaktor vorgenommen werden. Durch Autoklavieren des Mediums bei 121 °C und Begasung des Reaktorinnenraums mit Stickstoff wird die benötigte anoxische Atmosphäre geschaffen. Neben dem bereits im Medium enthaltenen Reduktionsmittel Cystein kann auch hier durch die Zugabe von Na_2S -Lösung nachreduziert werden, um letzte Sauerstoffspuren zu entfernen. Alle weiteren verwendeten Lösungen werden ebenfalls (wie in Kapitel 3.1.2) möglichst sauerstoffarm mit ausgekochtem und begastem (N_2/CO_2) Wasser hergestellt. Das maximal mögliche Arbeitsvolumen des eingesetzten BIOSTAT® C liegt bei 15 L. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zur Kultivierung im BIOSTAT® CultiBag RM 20 L zu gewährleisten (siehe Kapitel 3.1.2), wurde wie zuvor ein Arbeitsvolumen von 10 L verwendet. Alle anderen Bedingungen wurden ebenfalls wie in Kapitel 3.1.2 gewählt. Abbildung 3.7 zeigt den Verlauf einer anaeroben Kultivierung von *E. ramulus* im BIOSTAT® C.

Für die dargestellte Kultivierung wird ein μ_{\max} von $0,46\text{ h}^{-1}$ und nach 6 h für die OD_{600} ein maximaler Wert von 9,2 rel AU erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Glukose fast vollständig verbraucht, so dass nach 7 h der Eintritt in die stationäre Phase erfolgt. Nach 5,5 h wurden deutliche Zellablagerungen an den Reaktorwänden beobachtet, woraufhin die Rührerdrehzahl auf 25 rpm erhöht wurde. Ob dies unter Umständen Einfluss auf den Verlauf der Wachstumskurve hatte, kann anhand der gemessenen Werte nicht eindeutig beurteilt werden.

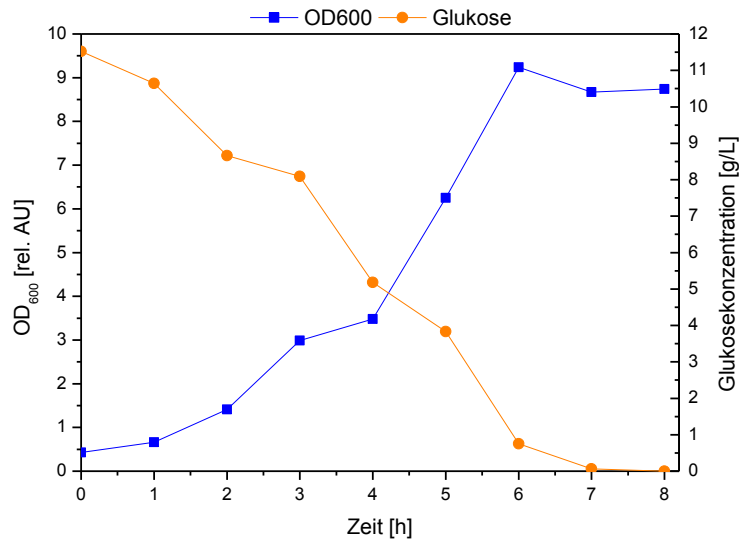


Abbildung 3.7: Kultivierung von *E. ramulus* im BIOSTAT® C mit einem Arbeitsvolumen von 10 L

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mit den entsprechenden Anpassungen auch in einem klassischen Stahlreaktor wie dem BIOSTAT® C eine erfolgreiche Kultivierung des strikt anaeroben Bakteriums *E. ramulus* möglich ist. Bei größeren Volumina könnte die Durchmischung mittels Rührer allerdings zum Problem werden. Eine Optimierung und die Ermittlung der maximal von *E. ramulus* tolerierten Rührerdrehzahl wären für weitere Kultivierungen im Stahlreaktor empfehlenswert. Ob dann eine ausreichende Durchmischung gewährleistet werden kann ohne das Wachstum von *E. ramulus* negativ zu beeinflussen, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilt werden.

3.1.4 Zusammenfassende Diskussion

Zur Kultivierung von *E. ramulus* wurden verschiedene Systeme und Bedingungen untersucht. So konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass Glukosekonzentrationen bis 12 g/L möglich sind, aber mechanische Belastungen durchaus hemmend auf das Wachstum von *E. ramulus* wirken. Aus diesem Grund wird *E. ramulus* auch in der Literatur standardmäßig in stehenden Kulturen gehandhabt [28, 49-50]. Unter Berücksichtigung der erhaltenen Kenntnisse wurden zwei mögliche Systeme für ein Scale-up der Kultivierung ausgewählt. Zum einen der durch welleninduzierte Durchmischung scherstressarme Beutelreaktor BIOSTAT® CultiBag RM (optical) und zum anderen ein klassischer Stahlreaktor, der BIOSTAT® C, mit

entsprechenden Anpassungen zur anaeroben Kultivierung (siehe Kapitel 3.1.3). Im Vergleich mit der Kultivierung im Beutelreaktor BIOSTAT® CultiBag RM 20 L optical wird im Stahlreaktor eine lediglich geringfügig niedrigere maximal OD_{600} erzielt. Auch die Glukose ist etwa zum gleichen Zeitpunkt vollständig verbraucht. Im direkten Vergleich der beiden Wachstumskurven erreicht die im Beutelreaktor inkubierte Kultur allerdings schneller höhere OD_{600} -Werte, was sich auch in den jeweils errechneten Werten von μ_{\max} widerspiegelt. Insgesamt scheinen jedoch beide Systeme, zumindest in dem verwendeten Maßstab, zur Kultivierung von *E. ramulus* geeignet. Im Vergleich zu einer Flaschenkultur konnte die $OD_{600\max}$ um den Faktor 5 gesteigert und die maximale Wachstumsrate um über 50 % verbessert werden. Eine Übersicht der erzielten Wachstumssteigerung ist anhand der Werte für μ_{\max} und die $OD_{600\max}$ Abbildung 3.8 zu entnehmen.

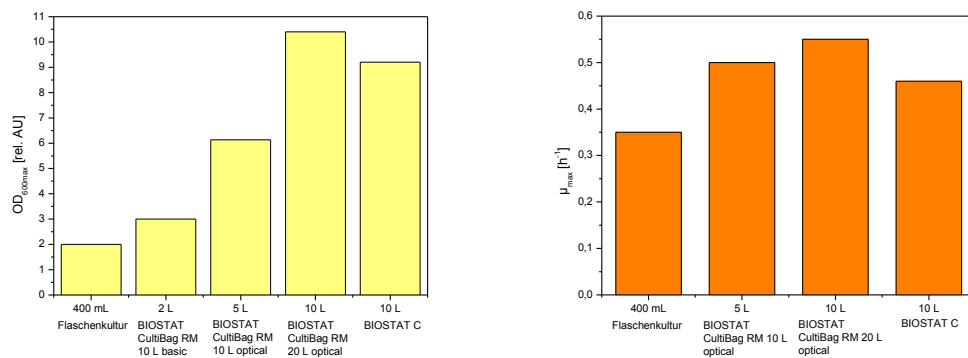


Abbildung 3.8: Vergleich der maximalen OD_{600} und Wachstumsraten μ_{\max} der durchgeführten Kultivierungen

Die größten Unterschiede lassen sich in der Handhabung der beiden Reaktoren feststellen. Während das Medium aufgrund des nicht hitzebeständigen Materials des Beutelreaktors gesondert vorbereitet und anschließend überführt werden muss, kann beim Stahlreaktor die vollständige Präparation des anaeroben vorreduzierten Mediums direkt im Innenraum vorgenommen werden. Durch den Wegfall der gesonderten Mediumherstellung und den daraus resultierenden Überführungsschritt liefert der Stahlreaktor an dieser Stelle eine deutliche Arbeits- und Zeitersparnis. Da aber dafür nach Prozessende eine aufwändige Reinigung des Stahlreaktors notwendig ist, die in dem Einweg-Beutelreaktorsystem vollständig entfällt, relativiert sich dieser Vorteil wieder. Durch das vorsterilisierte Einwegsystem bietet dieses zusätzlich den Vorteil eines dezentralen und reproduzierbaren Produktionsprozess sowie ein steriles

Lagerungs- oder Transportsystems. Der Beutelreaktor sorgt durch sein explizit auf Scherstress-sensitive Organismen ausgelegtes wellendurchmischtes System zudem für schonende aber dennoch zuverlässige Durchmischung. Durch die vorgenommenen Anpassungen, wie Entfernung der Schikanen, niedrige Rührerdrehzahl und Einsatz nur eines Rührers, ist die Durchmischung im Stahlreaktor eher gering und bedarf vor allem für größere Volumina weiterer Optimierungen. Ob eine Erhöhung der Rührerdrehzahl möglich ist und zur homogenen Durchmischung führt, ohne die Bakterien in ihrem Wachstum zu hemmen, erfordert weitere Untersuchungen. In Hinblick auf ein weiteres Scale-up stehen für den Beutelreaktor baugleiche Systeme mit verschiedenen Beutelgrößen bis zu einem Volumen von 600 L (Arbeitsvolumen 300 L) zur Verfügung. Das nächstgrößere System wäre der BIOSTAT® CultiBag RM 50 L optical mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 25 L. Auch bei dem Stahlreaktor stehen für ein Scale-up eine Vielzahl größerer Modelle zur Auswahl, wobei hier aber vermutlich wiederum die zuvor geschilderte Problematik der Anpassung und Durchmischung auftreten würde. Dennoch sind Stahlreaktoren immernoch deutlich verbreiteter als Beutelreaktoren und bieten bezüglich der Langzeitnutzung auch finanzielle Vorteile. Letzten Endes kommt es bei der Entscheidung zwischen Stahl- und Beutelreaktor auf die Art der Anwendung an. Insgesamt deuten die Ergebnisse jedoch darauf hin, dass der Einsatz eines Beutelreaktors auch für ein weiteres Scale-up vielversprechender wäre und schneller zum gewünschten Erfolg führen würde. Durch weitere Anpassungen und Optimierung sollte aber auch die Kultivierung *E. ramulus* in einem klassischen Stahlreaktor in einem größeren Maßstab möglich sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Grundlagen zur Kultivierung von *E. ramulus* im Produktionsmaßstab geschaffen werden. Anhand dieser Grundlagen sollten weitere Maßstabsvergrößerungen und Optimierungen ohne größere Schwierigkeiten durchführbar sein. Da an dieser Stelle die Kultivierung vor allem zur Produktion von Biomasse dienen sollte, die essenziell für die folgenden Untersuchungen von *E. ramulus* ist, fand keine weitere Optimierung statt. Das Erreichen von Biomassen um 70 g (FZM) pro Kultivierung deckte den Bedarf der benötigten Biomassemengen.

3.2 *E. ramulus* als potentielles Produktionssystem

3.2.1 Ganzzellkatalyse

Beruhend auf der in der Literatur beschriebenen Beteiligung von *E. ramulus* am Flavonoidabbau wurde zunächst die Fähigkeit des Bakteriums überprüft, verschiedene Flavonoide als Ganzzellkatalysesystem zu metabolisieren. Hierdurch soll eine erste Beurteilung von *E. ramulus* als mögliches Ganzzellkatalysesystem zur Herstellung des Dihydrochalcon Phloretin ermöglicht werden. Laut Literatur ist *E. ramulus* in der Lage, das Flavanon Naringenin zum gewünschten Produkt Phloretin umzusetzen (siehe Kapitel 2.1). Durch die erfolgreiche Kultivierung in Beutel- und Stahlreaktor konnten bereits die ersten Grundlagen für einen möglichen Produktionsprozess geschaffen werden, so dass der Einsatz von *E. ramulus* als Ganzzellkatalysesystem grundsätzlich denkbar wäre.

Zur Untersuchung der Umsetzung der Flavonoide oder deren Abbauprodukte wurden Flaschenkulturen mit einem Arbeitsvolumen von 40-400 mL verwendet. Die meisten Flavonoide weisen eine eher schlechte Wasserlöslichkeit auf. Um das Problem zu umgehen, wurden die Flavonoide als konzentrierte Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt und erst später dem Medium zugeführt. Die Endkonzentration des DMSO im Medium sollte unter 2 % (v:v) liegen. Die Sterilität wird wie bei der Glukoselösung durch Sterilfiltration sichergestellt (siehe auch Kapitel 5.2.1). Dadurch wurde nicht nur eine flexible und anaerobe Handhabung, sondern auch eine leichte Dosierbarkeit ohne thermische Belastung, gewährleistet. Gegenstand der Betrachtung sind Naringenin, sein Glykon Naringin, Phloretin, HPP und Phloroglucin. Zu deren Analyse wurden verschiedene HPLC-Methoden unter Verwendung unterschiedlicher Säulen und Eluenten getestet und optimiert (Tabelle 3.1). Bis auf Phloroglucin können alle Substanzen mittels der in Tabelle 3.1 grau unterlegten HPLC-Analytik detektiert und quantifiziert werden (siehe auch Kapitel 5.2.5). Da Phloroglucinol nicht durch die HPLC-Analytik erfasst werden konnte und laut Literatur weiter abgebaut werden kann, wurde es im Weiteren nicht berücksichtigt [49].

Tabelle 3.1: Testung verschiedener HPLC-Säulen und Eluenten

Säule	Eluent	Referenz
Supelco Supelcosil™ LC-18, 150 x 4,6 mm, 5 µM	0,1 % (v:v) TFA 0,1 % (v:v) TFA in ACN/H ₂ O (8:1, v:v), Gradient, 0,8 ml/min	Variation von [28]
Supelco Supelcosil™ LC-8, 150 x 4,6 mm, 5 µM	0,1 % (v:v) TFA 0,1 % (v:v) TFA in ACN/H ₂ O (8:1, v:v), Gradient, 0,8 ml/min	Variation von [28]
Agilent Zorbax sb-C8, 75 x 4,6 mm, 3,5 µM	0,1 % (v:v) Essigsäure 100 % (v:v) ACN, Gradient, 1,3 ml/min	Variation Methode Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden (Kooperation)
Supelco Supelcosil™ LC-8, 150 x 4,6 mm, 5 µM	0,1 % (v:v) Essigsäure 100 % (v:v) ACN, Gradient, 1,3 ml/min	Variation Methode Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden (Kooperation)
Supelco Supelcosil™ LC-18, 150 x 4,6 mm, 5 µM	0,1 % (v:v) Essigsäure 100 % (v:v) ACN, Gradient, 1,3 ml/min	Variation Methode Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden (Kooperation)
Agilent Zorbax sb-C18, 50 x 4,6 mm, 1,8 µM	0,1 % (v:v) Essigsäure 100 % (v:v) ACN, Gradient, 1,3 ml/min	Methode Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden (Kooperation)

Die verschiedenen Substanzen werden der *E. ramulus* Kultur in einem Konzentrationsbereich von etwa 100-500 µM zugefügt. Da Flavonoide auch für ihre antibakterielle Wirkung bekannt sind, sollte die Konzentration nicht zu hoch gewählt werden. Von größtem Interesse ist die Umsetzung von Naringenin zu dem gewünschten Produkt Phloretin. Dementsprechend wurden Kultivierungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Naringenin durchgeführt. Abbildung 3.9 zeigt eine Kultivierung unter Zugabe von 275 µM Naringenin. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen von Naringenin, HPP und Phloretin sowie die OD₆₀₀ als Funktion der Zeit.

Es erfolgt eine sofortige Umsetzung von Naringenin während Phloretin nur kurzzeitig und in sehr geringen Konzentrationen detektiert wird. Das eingesetzte Naringenin ist bereits nach 2 h, noch während der Lag-Phase vollständig von *E. ramulus* umgesetzt, was auf eine hohe Aktivität hinweist. Die Abbaugeschwindigkeit beträgt 162,2 µM/h. Hierbei ist zu beachten, dass die Abbaugeschwindigkeit in Abhängigkeit zur Zellzahl bzw. zum Zellwachstum steht. Aus diesem Grund erfolgte die Berechnung für den Bereich von 0,67-1,66 h.

Phloretin kann nur zu Beginn der Kultivierung (1 und 2 h) nachgewiesen werden und scheint entsprechend der postulierten Abbauwege (siehe Kapitel 2.1) unmittelbar zu HPP verstoffwechselt zu werden. Die Bildungsgeschwindigkeit von HPP beträgt $189,2 \mu\text{M/h}$. Die im Vergleich zur Abbaugeschwindigkeit des Naringenins ($162,2 \mu\text{M/h}$) höhere Bildungsgeschwindigkeit weist auf Messungenauigkeiten oder der Bildung von HPP aus weiteren im Medium enthaltenen Substraten hin.

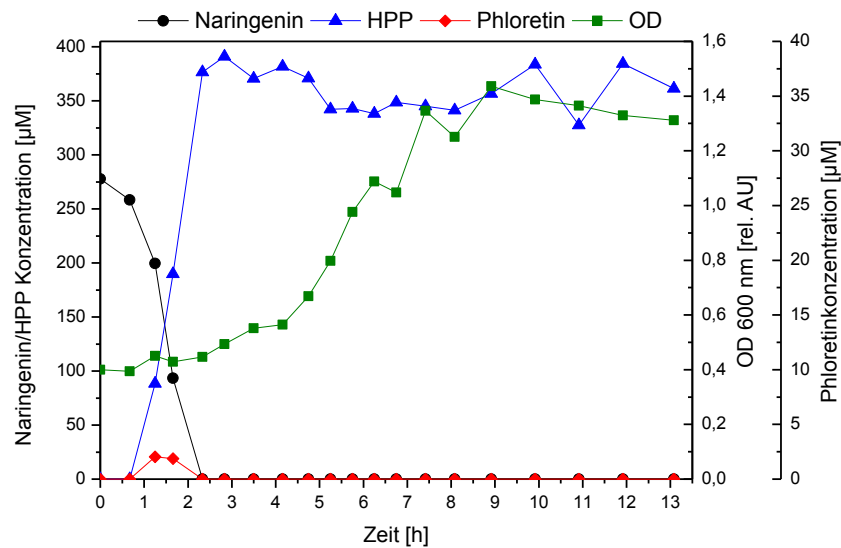


Abbildung 3.9: Kultivierung von *E. ramulus* unter Zugabe von $275 \mu\text{M}$ Naringenin

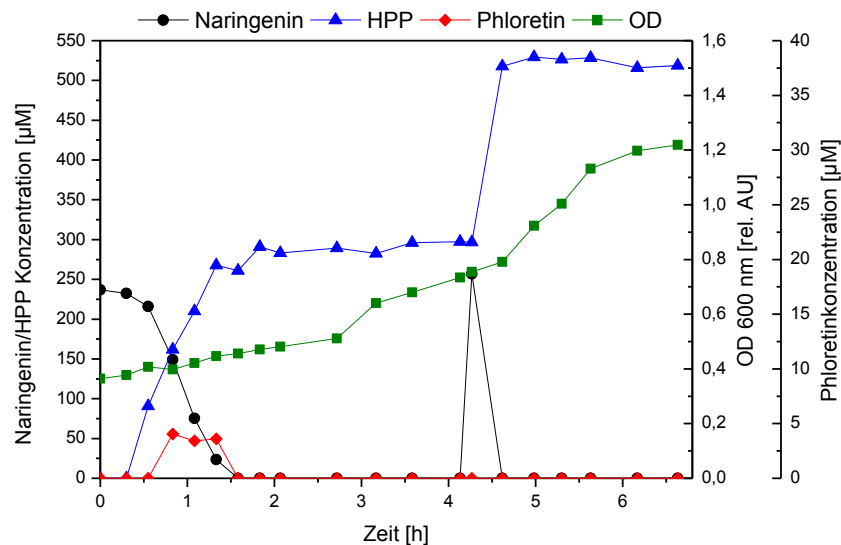


Abbildung 3.10: Kultivierung von *E. ramulus* unter zweifacher Zugabe von Naringenin (je $240 \mu\text{M}$)

Auch bei mehrfacher Zugabe von Naringenin resultiert dies nur in einem Anstieg der HPP-Konzentration ohne die nachweisbare und vor allem dauerhafte Bildung von Phloretin (Abbildung 3.10). Mit zunehmender Zellzahl scheint auch die Umsetzung entsprechend schneller abzulaufen, so dass Phloretin zwar entsteht, aber unmittelbar wieder abgebaut wird und bei wiederholter Zugabe von Naringenin gar nicht mehr detektierbar ist. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wurde im Folgenden nur Phloretin zu einer *E. ramulus* Kultur zugefügt. Wie erwartet wird dieses direkt von Beginn an zu HPP abgebaut. Der zeitliche Verlauf der Phloretin- und HPP-Konzentrationen sind Abbildung 3.11 zu entnehmen. Geht man davon aus, dass das gebildete Phloretin vollständig zu HPP umgesetzt wird und dieses nicht weiter metabolisiert wird, liefert die Bildung des HPPs einen Anhaltspunkt bezüglich des Reaktionspotentials von *E. ramulus*. Die Bildungsgeschwindigkeit des HPPs beträgt zu Beginn der Kultivierung (0-0,63 h) 303,9 $\mu\text{M}/\text{h}$, während die Abbaugeschwindigkeit des Phloretins bei 162,8 $\mu\text{M}/\text{h}$ liegt. Eine direkte Vergleichbarkeit zu der in Abbildung 3.9 dargestellten Kultivierung ist aufgrund der Abhängigkeit zum Zellwachstum nur eingeschränkt gegeben. Dennoch scheint der Abbau des Phloretins schneller abzulaufen als die Umsetzung von Naringenin.

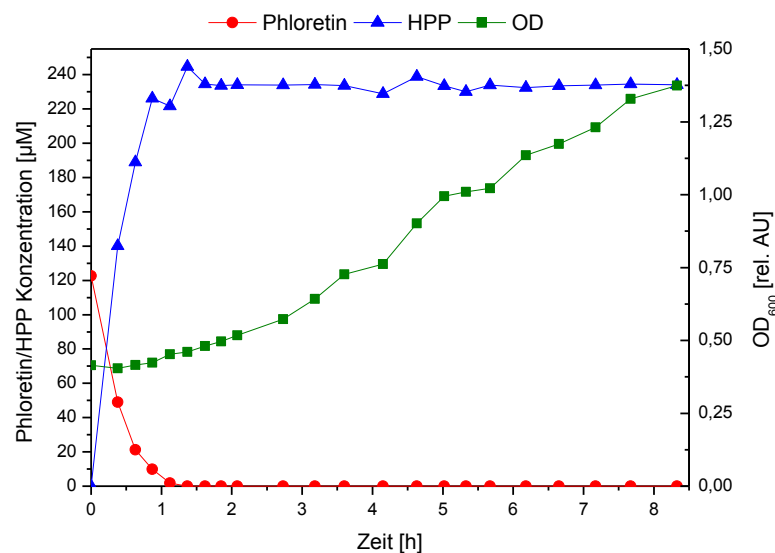


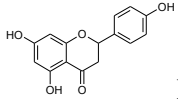
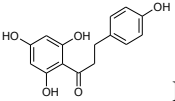
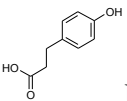
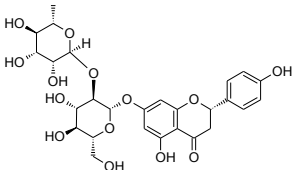
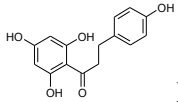
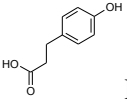
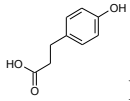
Abbildung 3.11: Kultivierung von *E. ramulus* unter Zugabe von 125 μM Phloretin

Wie in Abbildung 3.11 zu sehen, bleibt die HPP-Konzentration nach Erreichen eines Maximums über den weiteren Kultivierungszeitraum annähernd konstant. Zur Überprüfung wurde darüber hinaus eine Kultivierung unter Anwesenheit von HPP

durchgeführt. Auch bei der alleinigen Zugabe von HPP bleibt die HPP-Konzentration im Medium während der kompletten Kultivierung konstant (Daten nicht gezeigt). HPP wird also durch *E. ramulus* nicht metabolisiert.

Da Naringin, das Glykon des Naringenins, durch den Zuckerrest eine höhere Wasserlöslichkeit als sein Aglykon aufweist, wäre es von Vorteile dieses an Stelle des Naringenins einsetzen zu können. Wie sich jedoch bei der Kultivierung mit *E. ramulus* zeigte, kann Naringin nicht von dem Bakterium umgesetzt werden und verbleibt in unveränderter Konzentration im Medium (Daten nicht gezeigt). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist Tabelle 3.2 zu entnehmen

Tabelle 3.2: Untersuchung der Umsetzung verschiedener Substrate durch das Ganzzellkatalysesystem *E. ramulus*

Substrat	Produkt	Kommentar
 <p>Naringenin</p>	 <p>Phloretin</p>  <p>HPP</p>	<p>Entstehung von HPP</p> <p>Zwischenprodukt Phloretin</p>
 <p>Naringin</p>	kein Produkt	Naringin wird nicht umgesetzt
 <p>Phloretin</p>	 <p>HPP</p>	Bereits in der Lag-Phase erfolgt eine hocheffektive Umsetzung
 <p>HPP</p>	kein Produkt	HPP wird nicht metabolisiert

Desweiteren wurde durch Zugabe von HPP allein oder HPP und Phloroglucin versucht, das Gleichgewicht der Reaktion zu verschieben und somit eine dauerhafte

Bildung von Phloretin zu erzwingen. Trotz Einsatz von Konzentrationen bis 500 mM konnte keine Beeinflussung des Reaktionsverlaufs beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Untersuchungen mittels Rohextrakt

Ergänzend zu den Versuchen, Naringenin mit Hilfe des Ganzzellsystems *E. ramulus* zu Phloretin umzusetzen, wurden die katalytischen Eigenschaften aufgeschlossener Zellen in Form des Rohextrakts untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Methoden getestet, um einen zuverlässigen und effektiven Zellaufschluss sicherzustellen. Bei *E. ramulus* handelt es sich um ein gram-positives Bakterium, was bedeutet, dass eine dickere Zellwand als bei gram-negativen Bakterien aufgebrochen werden muss, dafür aber keine äußere Membran vorhanden ist. Untersucht wurden verschiedene mechanische Zellaufschlüsse unter Verwendung von Ultraschallsonde, Vibrationszelmühle, Ultra-Turrax, wiederholtes Einfrieren und Auftauen und der enzymatische Aufschluss mittels Lysozym. Eine erste Beurteilung der Methoden wurde anhand des freigesetzten Gesamtproteins im Überstand nach Zentrifugation vorgenommen. Die Bestimmung erfolgte nach Bradford [51]. Die Standardabweichungen liegen hierbei unter 0,05 %. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Abbildung 3.12 zu sehen.

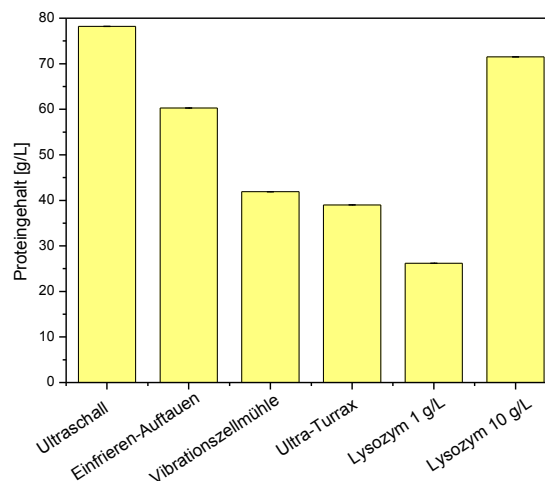


Abbildung 3.12: Erzielter Gesamtproteingehalt nach Bradford [51] im Rohextrakt durch verschiedene Zellaufschlüsse

Die höchsten Proteinkonzentrationen werden vor allem für kleine Volumina (1-6 mL) mittels Ultraschallsonde erzielt, so dass diese für die weiteren Untersuchungen die Methode der Wahl ist. Durch den Einsatz von 10 g/L Lysozym konnten zwar ähnlich hohe Konzentrationen des Gesamtproteins im Rohextrakt gemessen werden, jedoch war eine starke Beeinträchtigung der Aktivität des Rohextrakts zu beobachten.

Da kein entsprechender Schnelltest zur Verfügung stand, erfolgte die Beurteilung der Aktivität des erhaltenen Rohextrakts direkt anhand der gewünschten Umsetzungsreaktion. Zu diesem Zweck wurde dem Rohextrakt das Substrat Naringenin zugefügt und die Konzentrationen von Substrat und Produkt(en) mittels HPLC-Analytik zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Zunächst wurden verschiedene Untersuchungen zur Stabilität des Rohextrakts durchgeführt. Es erfolgte die Zugabe von 90 μ M Naringenin und Bestimmung der Konzentrationen nach 0 und 60 min. Zur vereinfachten Darstellung wird in Abbildung 3.13 der prozentuale Abbau des eingesetzten Naringenins aufgeführt und als Maß für die Aktivität verwendet.

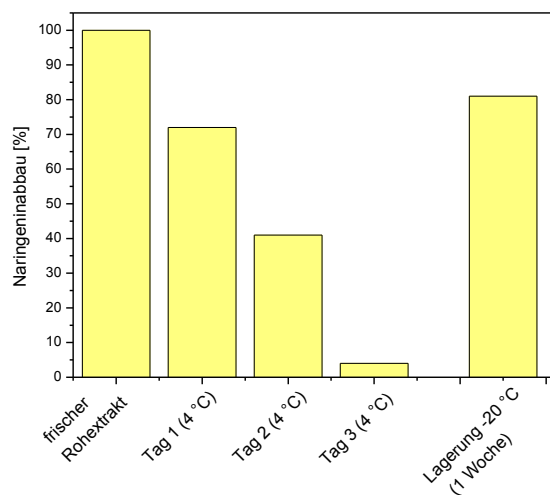


Abbildung 3.13: Langzeitstabilität des Rohextrakts nach Lagerung bei 4 °C und -20 °C. Vergleich des prozentualen Naringeninabbaus zum frischen Rohextrakt

Der Rohextrakt verliert durch die Lagerung bei 4 °C zunehmend an Aktivität und ist nur eingeschränkt haltbar. Die Aktivität ist bereits nach einem Tag auf 72 % abgesunken. Am zweiten Tag verbleibt eine Restaktivität von etwa 41 %. Nach drei Tagen ist kaum noch Aktivität messbar. Rohextrakt der bei -20 °C gelagert wurde,

zeigt lediglich eine Verringerung der Aktivität auf etwa 80 %. Dennoch wurde der Rohextrakt für alle Versuche frisch hergestellt.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand wie bereits zuvor die Umsetzung von Naringenin zu Phloretin. Für weiterführende Betrachtungen wurden auch Naringin, Phloretin und HPP als Substrat verwendet. Ergänzend zur Aktivitätsbestimmung wurden für verschiedene Umsetzungsreaktionen Abbau- bzw. Bildungsgeschwindigkeiten berechnet. Da diese bei enzymatischen Prozessen zu Beginn der Reaktion am größten sind, erfolgte die Berechnung jeweils für die ersten 5 min.

Wie in Abbildung 2.6 dargestellt, wird laut Literatur bei der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin der Cofaktor NADH zur Reduktion des Naringeninchalcons zu Phloretin benötigt. Es wurden verschiedene Reaktionsansätze mit und ohne Zusatz von NADH untersucht und miteinander verglichen (Abbildung 3.14).

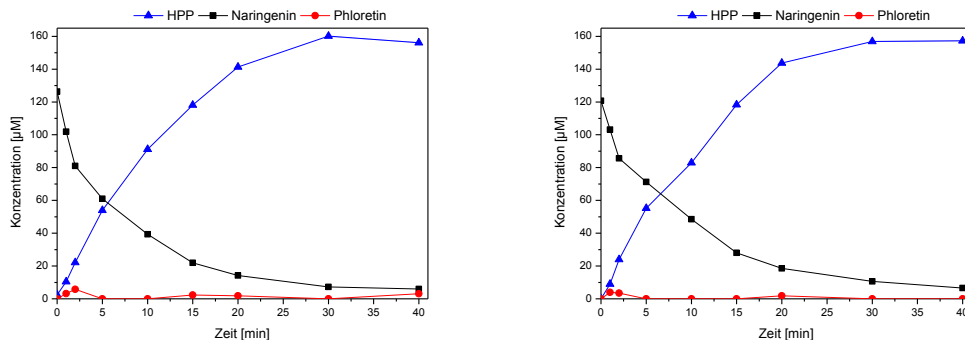


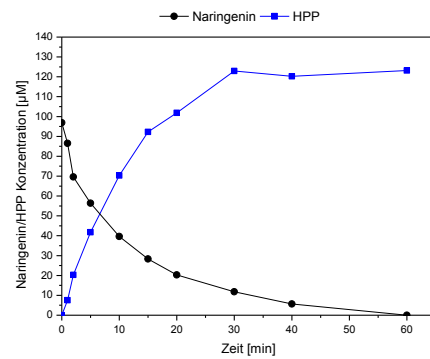
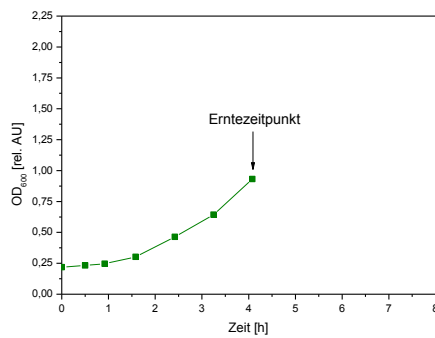
Abbildung 3.14: Umsetzung von Naringenin mittels Rohextrakt; links: mit NADH, rechts: ohne NADH

In beiden Reaktionsansätzen erfolgt die Umsetzung von Naringenin zum Endprodukt HPP. Der Verlauf beider Reaktionen ist im Rahmen der Fehlertoleranz identisch, so dass angenommen werden kann, dass eine zusätzliche Zugabe von NADH nicht zwingend erforderlich ist. Die Abbaugeschwindigkeit von Naringenin liegt ohne die Zugabe von NADH bei $12,2 \mu\text{M}/\text{min}$ und mit bei $9,3$, während die Bildungsgeschwindigkeit für HPP ohne NADH $11,2 \mu\text{M}/\text{min}$ und mit NADH $10,5 \mu\text{M}/\text{min}$ beträgt. Dies bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass kein NADH am Reaktionsablauf beteiligt ist. Möglicherweise wird NADH durch den Rohextrakt zur Verfügung gestellt und regeneriert. Um jedoch immer eine ausreichende NADH-Konzentration sicherzustellen, wurde auch in den weiteren

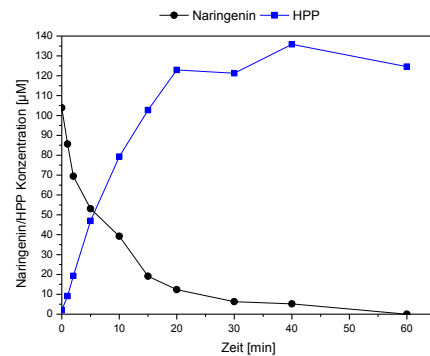
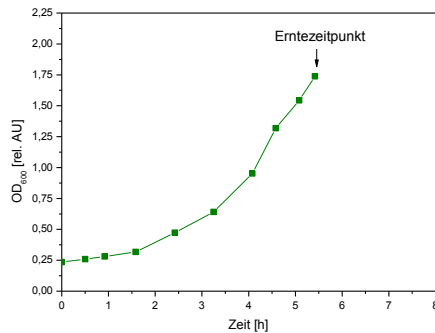
Untersuchungen NADH zugefügt. Dies kann vor allem bei der Verwendung von verdünnten Rohextrakten relevant sein.

Um zu überprüfen, ob der Zeitpunkt der Zellernte einen Einfluss auf die Aktivität des untersuchten Rohextrakts hat, wurden drei parallel angesetzte Kulturen in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet und der gewonnene Rohextrakt auf seine Aktivität getestet.

A



B



C

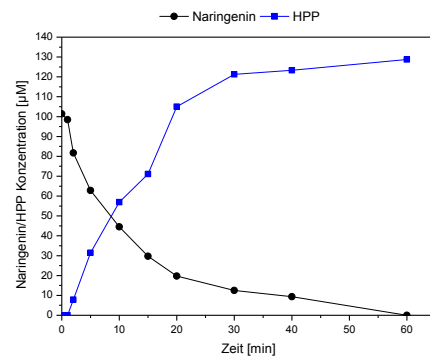
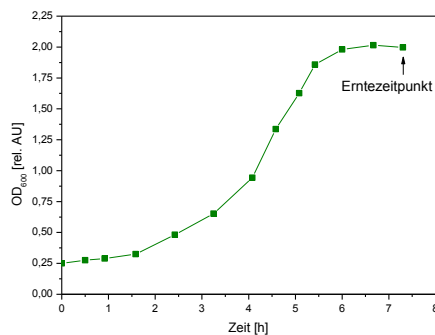


Abbildung 3.15: Zellernte in verschiedenen Wachstumsphasen mit anschließendem Aktivitätstest des aufgeschlossenen Rohextrakts

In allen Versuchsansätzen wurde der Zellaufschluss ausgehend von der gleichen Feuchtzellmasse (FZM) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Die Zellernte erfolgte während der exponentiellen Phase (A), zum Ende der exponentiellen Phase (B) und in der stationären Phase (C). Die genauen Zeitpunkte sind den Diagrammen zu entnehmen. Bei allen drei Versuchsansätzen erfolgt die Umsetzung von Naringenin zu Phloretin bzw. HPP wie bereits zuvor. Signifikante Unterschiede des Reaktionsverlaufs sind nicht erkennbar. Dies spiegelt sich auch in den berechneten Abbau- und Bildungsgeschwindigkeiten wieder, die für Naringenin in einem Bereich von 8-9,5 $\mu\text{M}/\text{min}$ bzw. 7-9 $\mu\text{M}/\text{min}$ für HPP liegen. Die niedrigsten Werte wurden für den Rohextrakt, der aus der in der stationären Phase geernteten Biomasse gewonnen wurde, erhalten. Insgesamt scheint der Zeitpunkt der Zellernte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Umsetzung von Naringenin zu Phloretin zu haben. Im Folgenden erfolgte die Zellernte für alle Untersuchungen zum Ende der exponentiellen Phase.

Im Folgenden wurden auch die zuvor im Ganzzellkatalysesystem eingesetzten Substrate Phloretin, Naringin und HPP mit ähnlichen Ergebnissen getestet. Phloretin wird durch den Rohextrakt sehr schnell vollständig zu HPP abgebaut. Die Abbaugeschwindigkeit beträgt 47,1 $\mu\text{M}/\text{min}$, die Bildungsgeschwindigkeit 39,5 $\mu\text{M}/\text{min}$. Abbildung 3.16 zeigt die Messdaten der Umsetzung von Phloretin mittels Rohextrakt.

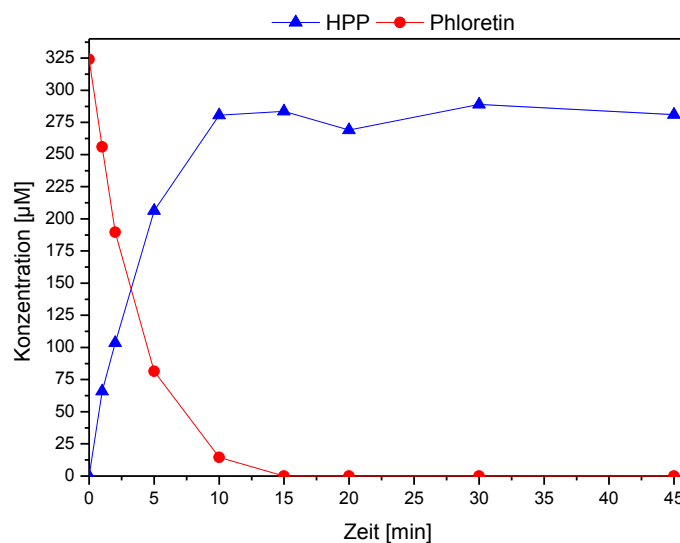
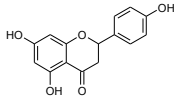
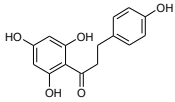
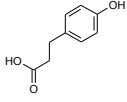
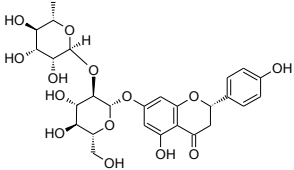
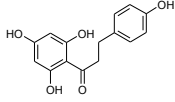
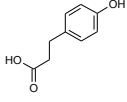
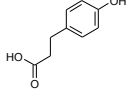


Abbildung 3.16: Umsetzung von Phloretin mittels Rohextrakt aus *E. ramulus*

Naringin und HPP können nicht umgesetzt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Untersuchung der Umsetzung verschiedener Substrate mittels Rohextrakt (*E. ramulus*)

Substrat	Produkt	Kommentar
 <p>Naringin</p>	 <p>Phloretin</p>  <p>HPP</p>	Entstehung von HPP, teilweise geringe Konzentrationen von Phloretin, NADH hat keinen messbaren Einfluss
 <p>Naringin</p>	kein Produkt	Naringin wird nicht umgesetzt
 <p>Phloretin</p>	 <p>HPP</p>	vollständige Umsetzung zu HPP
 <p>HPP</p>	kein Produkt	HPP wird nicht umgesetzt

Prinzipiell konnte auch hier gezeigt werden, dass *E. ramulus* die notwendigen Enzyme zur Umsetzung von Naringenin zu Phloretin bzw. HPP enthält. Ein besonders wichtiger Informationsgewinn ist hierbei, dass die Reaktion auch außerhalb der Zelle und unter oxidischen Bedingungen ablaufen kann. Es bleibt allerdings das Problem, dass das gewünschte Produkt Phloretin weiter abgebaut wird (Abbaugeschwindigkeit 47 $\mu\text{M}/\text{min}$) und das anscheinend sogar deutlich schneller als die Umsetzung von Naringenin erfolgt (Abbaugeschwindigkeit 8-12 $\mu\text{M}/\text{min}$).

Ausgehend von den postulierten Abbauwegen und Untersuchungen durch Schoefer et al. ist das Enzym PhH für den weiteren Abbau des Phloretins verantwortlich. Schoefer et al. beschreibt 2004 die Klonierung einer PhH aus *E. ramulus* [32]. Der dort beschriebene *E. coli* Stamm zur Expression der rekombinanten PhH wurde im Institut für Technische Mikrobiologie der TUHH kultiviert, das im Rahmen einer Kooperation Biomasse für die folgenden Untersuchungen bereitstellte.

Untersuchung der rekombinanten Phloretinhydrolase (PhH)

Wie zuvor erläutert, kann davon ausgegangen werden, dass das Enzym PhH für den unerwünschten Abbau von Phloretin verantwortlich ist. Um dies zu überprüfen und die Abbaureaktion weiter zu charakterisieren, wurde die Biomasse des beschriebenen Expressionsstamms genutzt. Analog zu den mit *E. ramulus* durchgeführten Versuchen erfolgte ein Zellaufschluss mittels Ultraschallsonde und anschließender Zentrifugation. Da die PhH-Aktivität des so gewonnenen Rohextrakts sehr hoch war, wurde dieser 1:10 mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) verdünnt. Der verdünnte Rohextrakt, der die rekombinante Phloretinhydrolase enthält, war Grundlage für die weiteren Untersuchungen mit verschiedenen Substraten wie Naringenin, Phloretin und HPP.

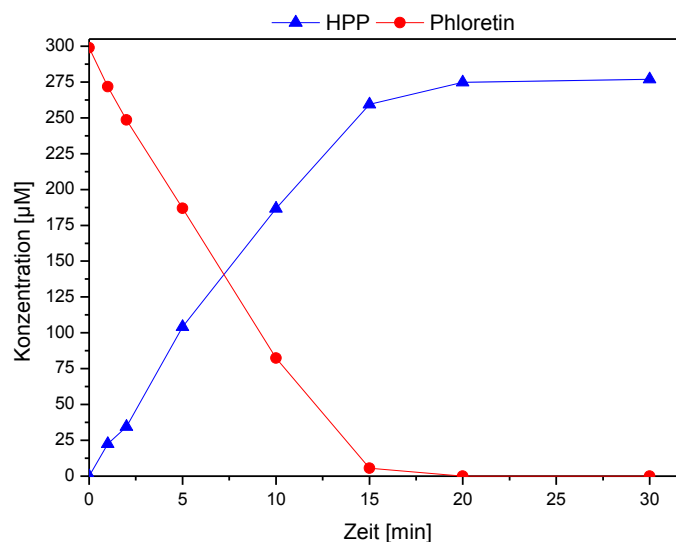


Abbildung 3.17: Abbau von Phloretin mittels rekombinanter Phloretinhydrolase

Bei der Zugabe von Naringenin ist keine Umsetzung des Flavanons messbar. Wird jedoch Phloretin dem Rohextrakt als Substrat zugesetzt, erfolgt, wie auch bei dem

Rohextrakt aus *E. ramulus* (s. o.), der sofortige Abbau zu HPP, während HPP selbst nicht weiter umgesetzt wird. Der Konzentrationsverlauf von Phloretin und HPP ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Für den Phloretin-Abbau wurde eine Abbaugeschwindigkeit von 22,0 $\mu\text{M}/\text{min}$ bzw. 20,7 $\mu\text{M}/\text{min}$ für die Bildung von HPP berechnet. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen, dass das Enzym PhH für den Abbau von Phloretin verantwortlich ist.

3.2.3 Zusammenfassende Diskussion

Durch die Untersuchungen der Eigenschaften von *E. ramulus* sowohl als Ganzzellkatalysesystem als auch des Rohextrakts hinsichtlich verschiedener Umsetzungsreaktionen konnte gezeigt werden, dass *E. ramulus* grundsätzlich in der Lage ist, das Flavanon Naringenin zu dem Dihydrochalcon Phloretin umzusetzen. Die Aktivität der für die Reaktion verantwortlichen Enzyme scheint auch nach Zellaufschluss unter oxidischen Bedingungen gegeben zu sein, was eine wichtige Voraussetzung für weitere Untersuchungen darstellt. Die Problematik des unerwünschten Abbaus von Phloretin zu HPP konnte desweiteren charakterisiert und die Phloretinhydrolase (PhH) als verantwortliches Enzym identifiziert werden. Dadurch, dass durch die PhH keine Umsetzung des Naringenins erfolgt, kann zunächst davon ausgegangen werden, dass diese nicht an der Bildung von Phloretin beteiligt ist und es sich um mindestens zwei verschiedene Reaktionsschritte und Enzyme handelt. Da HPP weder durch den Rohextrakt noch durch ganze Zellen weiter verstoffwechselt wird, kann dieses als Endprodukt zur Beurteilung der enzymatischen Aktivität herangezogen werden. Für die weitere Betrachtung bedeutet das, dass durch Abtrennung oder Ausschaltung der PhH eine Produktion von Phloretin ohne den weiteren Abbau zu HPP möglich sein müsste. Die schnelle Umsetzung von Naringenin und die relativ hohen Mengen an HPP lassen auf ein hohes katalytisches Potential schließen.

Bei den verschiedenen Umsetzungen von Naringenin fiel auf, dass in manchen Versuchsansätzen das entstandene Phloretin vollständig zu HPP abgebaut wurde und in anderen neben der Entstehung von HPP eine geringe Phloretinkonzentration (etwa 4-6 μM) bestehen blieb. Worauf diese Variationen zurückzuführen sind konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Unterschiedliche Zeitpunkte der Zellernte scheinen hierfür nicht verantwortlich zu sein. Der Gesamtproteingehalt des Rohextrakts nach Zellaufschluss lag in einem Bereich von

70-80 g/L. Die geringen Konzentrationsunterschiede können zu leichten Abweichungen der Reaktionsverläufe führen, sollten allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die grundsätzliche Umsetzungsreaktion haben.

Auf Grundlage der in diesem Kapitel erhaltenen Ergebnisse können weitere Anstrengungen unternommen werden, um *E. ramulus* als effizientes Produktionssystem von Phloretin nutzbar zu machen. Mögliche Ansatzpunkte, um diese Nutzung zu ermöglichen sind zum einen, die an der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin beteiligten Enzyme zu identifizieren und zu isolieren und zum anderen, die Phloretin-abbauende PhH zu entfernen oder zu inhibieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

3.3 Isolierung ausgewählter Enzyme

Bei den Arbeiten zur Isolierung ausgewählter Enzyme aus dem Rohextrakt von *E. ramulus* wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt, um eine mögliche Phloretinproduktion zu etablieren. Zum einen wurde die Identifizierung und Isolierung der für die Umsetzung von Naringenin zu Phloretin verantwortlichen Enzyme angestrebt. Da bisher aber unklar ist, ob es sich dabei um ein oder mehrere Enzyme oder sogar um einen Multienzymkomplex handelt, könnte dieses Vorgehen unter Umständen nicht zum Erfolg führen. Alternativ könnte die Abtrennung der für den Abbau von Phloretin verantwortlichen PhH zum Ziel führen und eine gesteigerte Produktion des Dihydrochalcon ermöglichen.

Beruhend auf den postulierten Abbauwegen von Naringenin durch *E. ramulus* nach Schneider und Blaut bzw. Herles (siehe Abbildung 2.5, Abbildung 2.6) kann angenommen werden, dass die Chalcon Isomerase (CHI) an dem Umsetzungsprozess von Naringenin zu Phloretin beteiligt ist. Ob möglicherweise weitere oder sogar vollkommen andere Enzyme an der Umsetzung zum Phloretin beteiligt sind, ist nicht geklärt. So existieren mehrere mögliche Varianten, wie die Umsetzung von Naringenin zu Phloretin ablaufen könnte. Die Isomerisierung von Naringenin zum Naringenin Chalcon mit anschließender Reduktion zu Phloretin ist nur eine Möglichkeit und auch hier ist bislang unsicher, ob die CHI nur die Reaktion bis zum Naringenin Chalcon oder auch bis zum Phloretin katalysiert [28-29].

Aus diesem Grund wird die CHI für die Entwicklung des Aufreinigungs- bzw. Fraktionierung zwar herangezogen, aber die nachweisbare Aktivität bezüglich der

gewünschten Reaktion als ausschlaggebend betrachtet. Neben der Isolierung des Zielenzym bzw. der Zielenzyme könnte, wie zuvor erwähnt, eine Abtrennung der PhH hilfreich sein. Während über die PhH bereits einige Details und sogar die komplette Aminosäuresequenz bekannt sind, ist die Datenlage zur CHI sehr gering. Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht der vorhandenen Eckdaten.

Tabelle 3.4: Gegenüberstellung CHI und PhH

<i>Chalcon Isomerase (CHI)</i>	<i>Phloretinhydrolase (PhH)</i>
MW: 129 kDa [29]	MW: 55 kDa [32]
Proteinuntereinheit: ca. 30 kDa [29]	Proteinuntereinheit: ca. 30 kDa [32]
Vermutlich Homotetramer [29]	Homodimer [32]
N-Terminus: ADFKFEPMRSLIAWK [29]	AS-Sequenz vollständig bekannt [32]

Bei der klassischen Aufreinigung kommen verschiedenste Methoden zum Einsatz. Diese müssen in der Regel speziell auf die Zielproteine zugeschnitten werden, um die biologische Aktivität zu bewahren und eine effektive Aufreinigung zu gewährleisten. Dabei ist es von Vorteil, die optimalen Bedingungen, wie beispielsweise pH-Optimum oder den pI-Wert der aufzureinigenden Proteine zu kennen. Da in dem vorliegenden Aufreinigungsproblem zum Teil sogar die aufzureinigenden Enzyme unbekannt sind, gestaltet sich die gezielte Prozessgestaltung recht schwierig. Im Folgenden wird versucht, allgemeingültige Bedingungen zu schaffen, unter denen die Aktivität des Rohextrakts bestehen bleibt. Da es sich um die Betrachtung intrazellulärer Proteine handelt, werden die Zellen zunächst, wie bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben, aufgeschlossen und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. Um eine grobe Vorreinigung zu erzielen, werden nach der Zentrifugation häufig Filtrationen oder Fällungen eingesetzt. Desweiteren kommen je nach Eigenschaften des Zielproteins verschiedene chromatographische Trennmethode wie die Ionenaustauschchromatographie (IEC), Größenausschlusschromatographie (SEC) oder Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) zum Einsatz. Die Eignung der einzelnen Methoden wird im Folgenden untersucht.

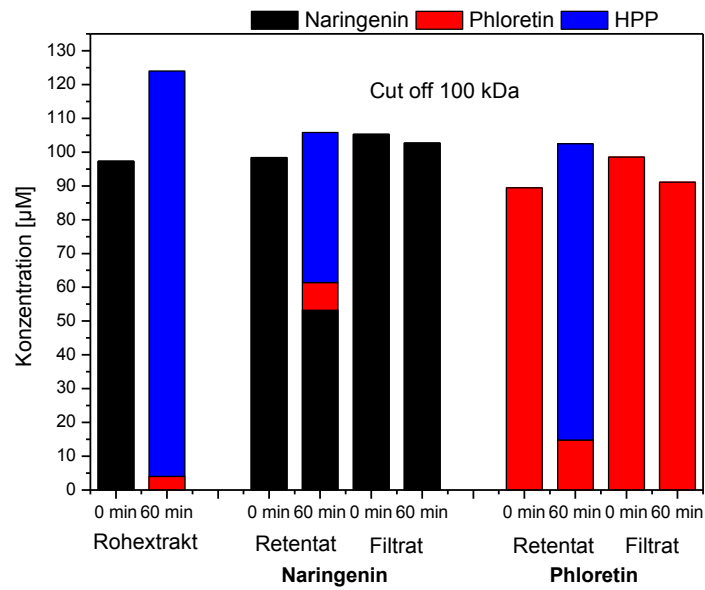
3.3.1 Ultrafiltration

Auf den ersten Blick erscheint eine Trennung aufgrund der Massenunterschiede mittels Ultrafiltration am einfachsten zu realisieren. Beruhend auf den unterschiedlichen molekularen Massen von 129 kDa (CHI) und 55 kDa (PhH) wurde versucht, eine erste Trennung der beiden Enzyme zu erzielen. Zu diesem Zweck wurden Filtrationseinheiten in Form von Zentrifugalkonzentratoren mit cut offs von 100 kDa bzw. 50 kDa und einem Fassungsvermögen von 2 mL ausgewählt. Bei dem eingesetzten Membranmaterial handelt es sich um Polyethersulfon (PES). Um eine zuverlässige Trennung sicherzustellen, empfiehlt der Hersteller die Verwendung eines cut offs, der 50 % unterhalb der molekularen Masse des Zielproteins liegt. Im Falle der CHI würde dies in einem cut off von 65 kDa resultieren. Da in dieser Größenordnung jedoch keine Produkte verfügbar sind, wurden die nächstgrößere und nächstkleinere Variante von 100 kDa und 50 kDa genutzt.

Der Rohextrakt aus *E. ramulus* wurde auf die Zentrifugalkonzentratoren aufgegeben und bis zum Minimalvolumen (etwa 200 μ L) abzentrifugiert. Durch mehrfaches Auffüllen mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer und Wiederholung des Zentrifugationsschritts sollte der Trenneffekt verstärkt werden.

Am Ende wurde das Retentat mit Kaliumphosphatpuffer auf das Anfangsvolumen aufgefüllt und versucht, an der Membran anhaftende Bestandteile vollständig abzulösen. Das Filtrat wurde nach dem ersten Durchlauf für weitere Untersuchungen entnommen, um eine Verdünnung zu verhindern. Die Proteinkonzentrationen von Retentat und Filtrat wurden mittels Bradford-Test [51] bestimmt und auf ihre Aktivität getestet. Der Aktivitätstest wurde wie in den vorherigen Kapiteln durchgeführt (Kapitel 5.2.4). Als Referenz diente der unbehandelte Rohextrakt. Die Konzentrationen von Naringenin, Phloretin und HPP wurden zu Beginn der Reaktion und nach 60 min bestimmt. Als Substrat wurden sowohl Naringenin als auch Phloretin eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.18 zu sehen. Während durch den unbehandelten Rohextrakt eine vollständige Umsetzung des zugesetzten Naringenins (ca. 95 μ M) erfolgt, weisen die Retentate beider Ultrafiltrationseinheiten eine deutlich verringerte Aktivität auf. Im Filtrat findet sowohl bei einem cut off von 100 kDa als auch von 50 kDa keine messbare Umsetzung statt. Betrachtet man die Abbaureaktion von Phloretin, wird dieses im Retentat (100 und 50 kDa cut off) fast vollständig zu HPP hydrolysiert.

A



B

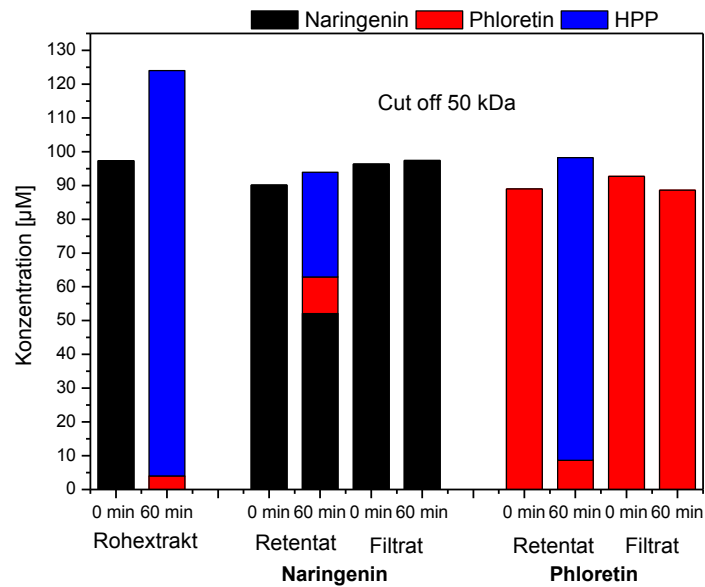


Abbildung 3.18: Aktivitätstest (Naringenin und Phloretin) von Retentat und Filtrat der verschiedenen Zentrifugalkonzentratoren nach 0 und 60 min; A: cut off 100 kDa, B: cut off 50 kDa im Vergleich zum eingesetzten Rohextrakt.

Im Filtrat erfolgt kein oder nur ein sehr geringer Abbau von Phloretin. Da kein HPP detektiert werden kann, lässt sich die minimale Konzentrationsabnahme (4-7 μM) nach 60 min nicht eindeutig bewerten. Auch der deutliche Unterschied des cut offs scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse zu haben.

Betrachtet man in Abbildung 3.19 die Gesamtproteinkonzentrationen im Filtrat zeigt sich, dass ein Teil der Proteine die Membran passiert und sich ein Anteil von etwa 12 % (cut off 100 kDa) bzw. 10 % (cut off 50 kDa) der Ausgangskonzentration im Filtrat wiederfindet. Ein Großteil der Proteine bleibt jedoch im Retentat zurück. Die lediglich geringen Abweichungen des Gesamtproteingehalts (Summe Retentat und Filtrat) liegen im Rahmen der Fehlertoleranz.

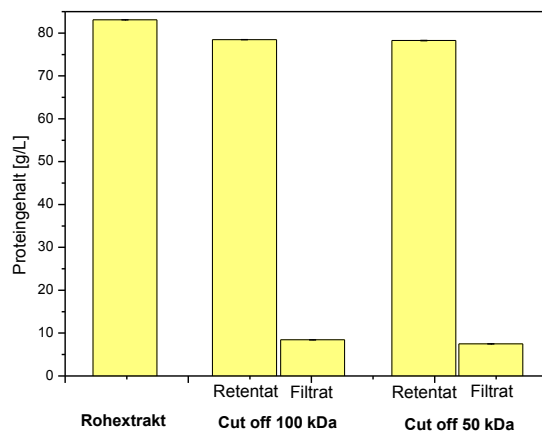


Abbildung 3.19: Gesamtproteingehalt des Rohextrakts und Retentat und Filtrat der verschiedenen Zentrifugalkonzentratoren

Anhand der erhaltenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die geringe Aktivität des Retentats bezüglich der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin nicht auf dem Verlust der CHI beruht. Eine mögliche Erklärung wäre die Abtrennung kleinerer Komponenten, wie Cofaktoren oder auch Enzymen, die ebenfalls an der Reaktion beteiligt sind. Desweiteren kann auch die kurzzeitige Aufkonzentrierung des Retentats Einfluss auf die Löslichkeit und Stabilität der Proteine haben.

Obwohl die PhH mit einer Größe von 55 kDa theoretisch zumindest die Membran mit einem cut off von 100 kDa passieren sollte, scheint dies hier nicht der Fall zu sein. Möglicherweise ist die PhH in einem Multienzymkomplex integriert oder bildet Cluster mit anderen Proteinen. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass die PhH aufgrund ihrer Konformation einen cut off von 50 oder auch 100 kDa nicht passieren kann. Da die Bestimmung der Größe von 55 kDa durch Schoefer et al. allerdings mittels Gelfiltration erfolgte, ist diese Annahme eher unwahrscheinlich [32]. Auch Wechselwirkungen mit der PES-Membran können nicht vollkommen ausgeschlossen

werden, obwohl die PhH im Retentat über den Aktivitätstest als aktives Enzym nachgewiesen werden kann.

Eine definierte Trennung mittels Ultrafiltration ist unter den getesteten Bedingungen demnach nicht möglich. Desweiteren führte die Ultrafiltration zu einer starken Verminderung der Aktivität und ist somit für weitere Anwendungen nicht geeignet.

3.3.2 Ammoniumsulfatfällung

Schoefer et al. beschreibt bereits ein Aufreinigungsprotokoll für die in Kapitel 3.2.2 beschriebene rekombinante PhH. Hierbei ist einer der ersten Schritte eine klassische stufenweise Ammoniumsulfatfällung von 55 % auf 60 % Sättigung [32]. Um eine grobe Fraktionierung des Rohextrakts aus *E. ramulus* zu erzielen und auf diese Weise möglicherweise die CHI oder weitere an der Umsetzung beteiligte Enzyme von der PhH zu trennen, wurde hier ebenfalls eine stufenweise Ammoniumsulfatfällung durchgeführt [52]. Der untersuchte Bereich erstreckt sich von 10 % bis 80 % Sättigung. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt und das erhaltene Pellet in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) resuspendiert. Überstand und resuspendiertes Pellet wurden jeweils mittels SDS-PAGE [53] analysiert und einem Aktivitätstest unter Zugabe von 75 µM Naringenin bzw. Phloretin unterzogen. Zur Beurteilung der Aktivität wurde jeweils nach 0 und 60 min eine Probe entnommen und anschließend mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse sind Tabelle 3.5 zu entnehmen. Hierbei werden nur die Fraktionen aufgeführt, bei denen prinzipiell Aktivität nachgewiesen werden konnte. Eine Einteilung erfolgt wie folgt:

- hohe Aktivität ++
- geringe Aktivität +
- keine Aktivität -

Bei hoher Aktivität findet eine annähernd vollständige Umsetzung statt. Als eine geringe Aktivität wird eine geringe, aber eindeutig zuzuordnende Umsetzung unter Entstehung deutlicher HPLC-Peaks verstanden.

Bis zu einer Ammoniumsulfatsättigung von 40 % bleibt die Aktivität des Rohextrakts sowohl für die Umsetzung von Naringenin, als auch für den Abbau von Phloretin weitestgehend im Überstand erhalten. Ab einer Sättigung von 40 % verringert sich die Umsetzung von Naringenin zunehmend, bis bei Erreichen von 45 % Sättigung keine Aktivität mehr im Überstand messbar ist.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Ergebnisse des Aktivitätstests nach Ammoniumsulfatfällung bei verschiedenen Sättigungskonzentration [%]

Fraktion	Umsetzung von Naringenin	Umsetzung von Phloretin
Ü 10 %	++	++
Ü 20 %	++	++
Ü 30 %	++	++
Ü 40 %	+	++
Ü 45 %	-	+
P 40 %	-	++
P 45 %	-	++
P 50 %	+	++

Ü: Überstand, P: Pellet, ++: hohe Aktivität, +: geringe Aktivität, -: keine Aktivität

Ähnlich verhält es sich auch mit dem Abbau von Phloretin. Hier wird die Aktivität im Überstand allerdings erst bei einer Sättigung von 45 % deutlich gemindert. Ab einer Ammoniumsulfatsättigung von 40 % kann auch im Pellet ein hoher Abbau von Phloretin detektiert werden, der sich bis zu Sättigungen von 50 % erstreckt. Die Umsetzung von Naringenin lässt sich im Pellet nur bei einer Sättigung von 50 % eindeutig nachweisen. Ab 55 % Sättigung kann für beide Reaktionen weder im Pellet noch im Überstand Aktivität festgestellt werden.

Insgesamt scheint das Fällungsverhalten der für die Naringenin- und Phloretin-Umsetzung verantwortlichen Enzyme sehr ähnlich zu sein. Es konnten keine Fraktionen erhalten werden, in denen eine eindeutige Trennung der beiden Reaktionen erfolgte. Desweiteren führen Ammoniumsulfatkonzentration ab 40 % Sättigung zu einer deutlich verringerten Umsetzung von Naringenin. Die durchgeführte SDS-PAGE zeigte keine ergänzenden Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Beruhend auf den erhaltenen Ergebnissen erscheint eine Ammoniumsulfatfällung zur Vorreinigung des Zielenzym oder der Zielenzyme ungeeignet. Die Gefahr, eventuell Enzyme, die in weiteren Untersuchungen von Interesse sein könnten, von vornherein abzutrennen oder irreversibel zu denaturieren, wurde hierbei als zu groß erachtet. Zudem konnte die Abtrennung von PhH mittels Ammoniumsulfatfällung nicht erreicht werden.

3.3.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Wie bereits erwähnt, ist über die CHI und die weiteren im Rohextrakt enthaltenen Proteine nur sehr wenig bekannt. Um sich einen besseren Überblick zu verschaffen und Kenntnisse über den pI-Wert der CHI oder anderer Proteine zu erhalten, wurde mit dem Rohextrakt aus *E. ramulus* eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden Gelstreifen mit einem linearen pH-Gradienten von pH 3 bis pH 10 verwendet. Die Proteine wurden durch Silberfärbung visualisiert [54].

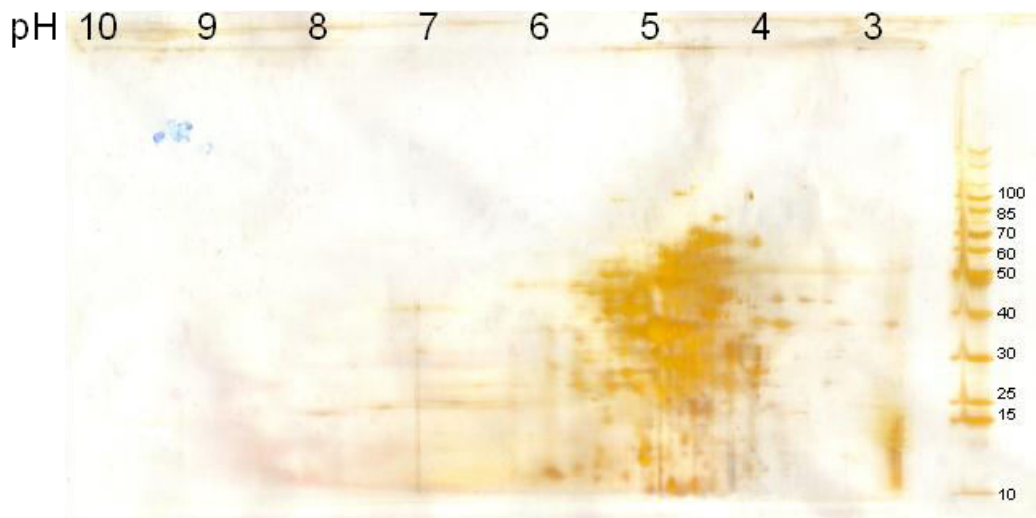


Abbildung 3.20: 2D-Gelelektrophorese des Rohextrakts aus *E. ramulus*

Wie auf dem Gel in Abbildung 3.20 zu sehen ist, befinden sich beinahe alle Proteine in einem sehr engen pI-Bereich von pH 4-6. Eine eindeutige Zuordnung der Spots ist bei der Vielzahl der Proteine in dieser Form nicht möglich. Um aussagekräftige Informationen zu den verschiedenen pI-Werten zu erhalten, wäre eine Vorreinigung nötig, um die Anzahl der Proteine zu verringern. Eine weitere Möglichkeit wäre die Zugabe von Standardproben der verschiedenen Proteine um einzelne Proteine zu identifizieren. Da diese jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung standen, konnte zunächst nur eine grobe Einschätzung erfolgen.

Ergänzend wurde auch eine präparative IEF durchgeführt, bei der ebenfalls eine Trennung nach Ladung erfolgt, die aber im Gegensatz zur 2D-Gelelektrophorese native Proteinfractionen liefert, die dann auf ihre Aktivität untersucht werden können. Die Durchführung erfolgte mit einem Rotofor® System der Firma Bio-Rad Laboratories Inc. (siehe auch Kapitel 5.2.7) [55]. Bei der Trennung fielen in mehreren Fraktionen Proteine aus. Aufgrund der Versuchsbedingungen ist dies nicht

unbedingt ungewöhnlich, da Proteine bei ihrem pI-Wert eine verringerte Wasserlöslichkeit aufweisen. Die Präzipitation muss nicht zwingend zur irreversiblen Denaturierung der Proteine führen, ist aber grundsätzlich unerwünscht und als negativ zu bewerten. Durch späteres Einstellen des pH-Werts der Fraktionen (pH 7) konnten die Proteine wieder in Lösung gebracht werden. Im Anschluss wurden die Fraktionen wie bereits in den vorausgegangenen Kapiteln auf ihre Aktivität getestet. Keine der Fraktionen zeigte eine Umsetzung von Naringenin.

Zur Stabilisierung der Proteine können Detergenzien wie beispielsweise Triton X eingesetzt werden, um eine Präzipitation zu verhindern. Da aber eine Optimierung an dieser Stelle als wenig sinnvoll erachtet wurde, wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt.

3.3.4 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Um weitere Informationen über die mögliche Trennung der im Rohextrakt enthaltenen Proteine, beruhend auf ihrer unterschiedlichen Ladung, zu erhalten, wurden Anionen- und Kationenaustauscher bei verschiedenen pH-Werten getestet. Zur Untersuchung der unterschiedlichen Bedingungen dienten Vivawell 8-strips (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) mit Q- (starker Anionenaustauscher) und S- (starker Kationenaustauscher) Membranen.

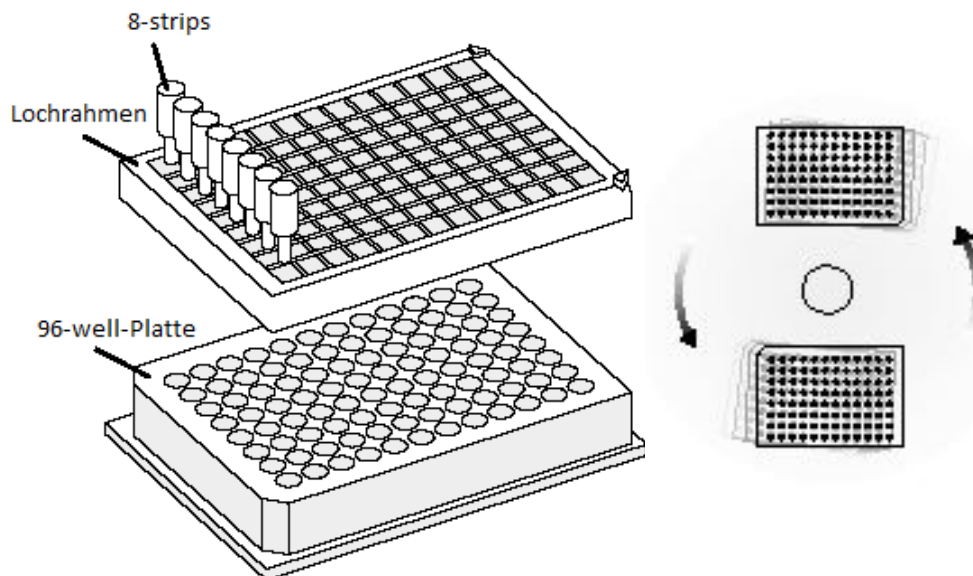


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung von 8-strips; Trennung durch Zentrifugation [56]

8-strips sind Screening-Module, die die parallele Untersuchung unterschiedlicher Bedingungen im Mikrolitermaßstab ermöglichen. 8-strips bestehen aus acht nebeneinander angeordneten Kartuschen, die über einen Lochrahmen mit 96-well-Platten kombiniert werden können (siehe Abbildung 3.21). Durch Zentrifugation (oder Anlegen eines Über- bzw. Unterdrucks) erfolgt dann der konvektive Transport der Probe durch die Poren der Membran.

Mit der Q Membran (Anionenaustauscher) wurden die pH-Werte 6, 7, 8, 9 und 10 und mit der S Membran (Kationenaustauscher) die pH-Werte 5, 6 und 7 getestet. Die Elution erfolgte jeweils stufenweise mit drei verschiedenen Salzkonzentrationen: 200 mM, 400 mM und 1000 mM NaCl. Bei keinem der untersuchten pH-Werte erfolgte eine messbare Bindung bzw. Elution der Proteine an der S-Membran (Daten nicht gezeigt). Eine Bindung und nachfolgende Elution war mit dem Anionenaustauscher bei einem pH-Wert von 6, 7 und 8 möglich. Bei einem pH-Wert von 9 erfolgt nur noch eine schwache Elution, bei einem pH-Wert von 10 findet anscheinend keine Bindung mehr statt, so dass auch keine Proteine eluieren. Die entsprechenden Gele (Coomassie-Färbung [57]) sind in Abbildung 3.22 dargestellt.

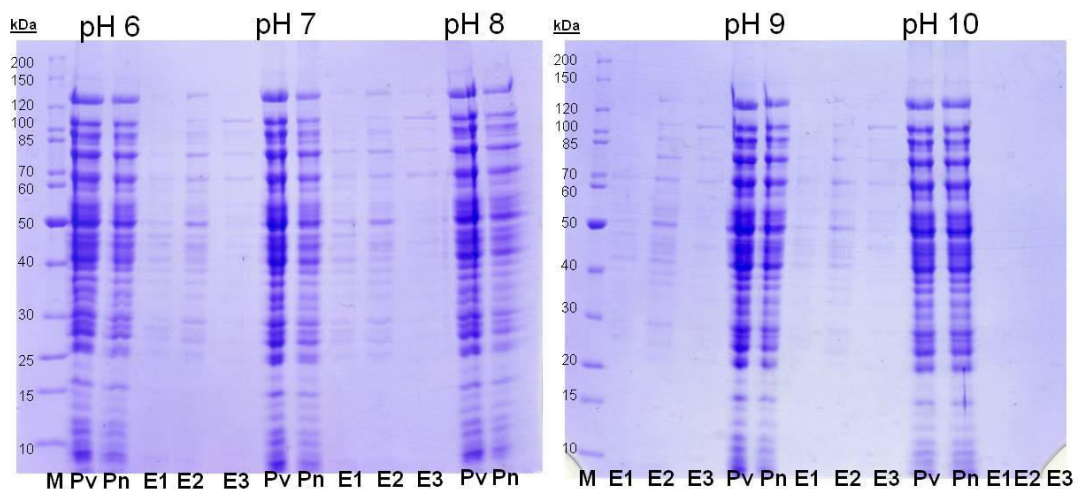


Abbildung 3.22: Untersuchung verschiedener pH-Werte mittels 8-strips (Q Membran, Anionenaustauscher); M: Marker, Pv: Probe vor Bindung, Pn: Probe nach Bindung, E1: Elution bei 200 mM NaCl, E2: Elution bei 400 mM NaCl, E3: Elution bei 1000 mM NaCl

Soweit eine Beurteilung anhand der SDS-PAGE möglich ist, wurden die besten Ergebnisse bei pH 7 erzielt. Hier erfolgt die stärkste Bindung (Vergleich P_v zu P_n)

und effektivste Elution. Analog zu Untersuchungen von Herles wurde im Folgenden der dort als optimal angegebene pH-Wert von 6,8, auch hinsichtlich der Aktivität des Rohextrakts, übernommen [28]. Da jedoch alle Proteine unter sehr ähnlichen Bedingungen binden und eluieren, kann noch nicht beurteilt werden, ob eine Trennung der Proteine mittels Anionenaustauscher möglich ist.

Zur weiteren Untersuchung wurde ein Sartobind-Modul mit einer Membranfläche (Q-Membran) von 75 cm² eingesetzt. Dieses wurde an einer FPLC-Anlage im Gradienten-Verfahren getestet, zunächst mit einem linearen Gradienten und im Weiteren mit verschiedenen Stufengradienten. Als Bindungspuffer wurde ein 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) verwendet. Zur Elution durch Erzeugung von Gradienten diente Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) mit 1 M KCl [28]. Eine detaillierte Beschreibung zur Durchführung der Anionenaustauschchromatographie ist im Anhang unter Kapitel 5.2.8 beschrieben.

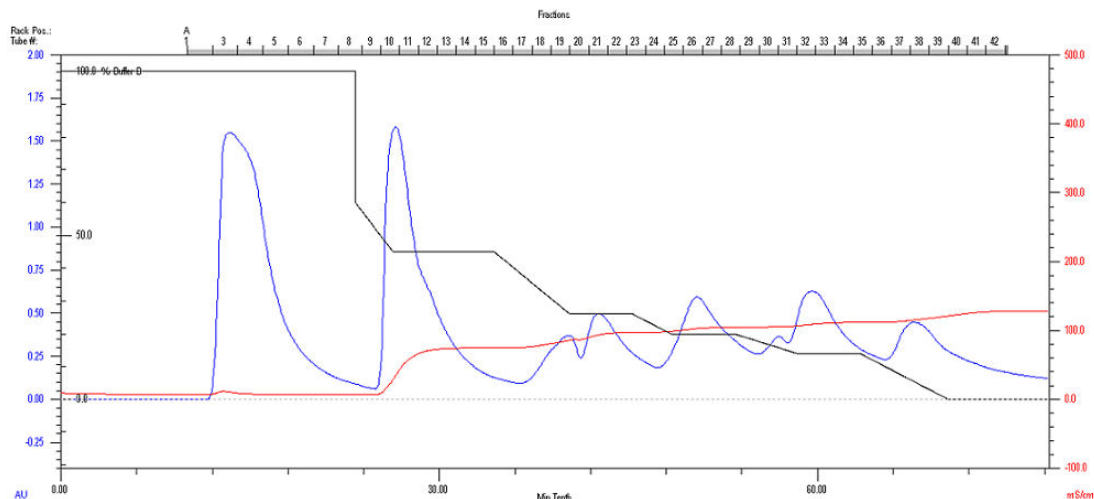


Abbildung 3.23: Chromatogramm einer Anionenaustauschchromatographie; Sartobind® Q 75 (Absorption: blau, Leitfähigkeit: rot)

Durch Anpassung der Gradienten konnten mehrere Peaks erhalten werden, ein entsprechendes Chromatogramm ist in Abbildung 3.23 zu sehen. Eine vollständige Trennung der einzelnen Peaks konnte auch nach mehrfacher Optimierung nicht erzielt werden.

Wie bereits aufgrund der Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese zu erwarten war, stellte sich eine Trennung, beruhend auf Ladungsunterschieden der einzelnen Proteine, als schwierig heraus. Da die im Rohextrakt enthaltenen Proteine einen sehr ähnlichen pI-Wert aufweisen, werden sie auch unter sehr ähnlichen Bedingungen

gebunden und eluiert, was durch die durchgeführte SDS-PAGE bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). In allen Fraktionen lässt sich eine Vielzahl verschiedener Proteine nachweisen, ein deutlicher Trenneffekt ist nicht erkennbar. Auch durch die Testung der Aktivität in den einzelnen Fraktionen konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erhalten werden.

3.3.5 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Wie bereits zuvor erwähnt, unterscheiden sich die CHI (129 kDa) und PhH (55 kDa) deutlich in ihrer Molekülgröße. Beruhend auf dieser Eigenschaft wird eine Trennung mittels Größenausschlusschromatographie getestet.

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Sephacryl-Säule mit einem Trennbereich von 10-1500 kDa und einem Bettvolumen von 320 mL eingesetzt. Es wurde ein Kaliumphosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH 6,8) mit dem vom Hersteller empfohlenen Volumenstrom von 1,3 ml/min verwendet (Kapitel 5.2.8). Zur besseren Zuordnung der Molekülgrößen wurden zunächst Modellproteine eingesetzt und deren Retentionszeit bestimmt. Abbildung 3.24 zeigt ein Chromatogramm von β -Galaktosidase aus *Kluyveromyces lactis* (124 kDa) und BSA (66 kDa).

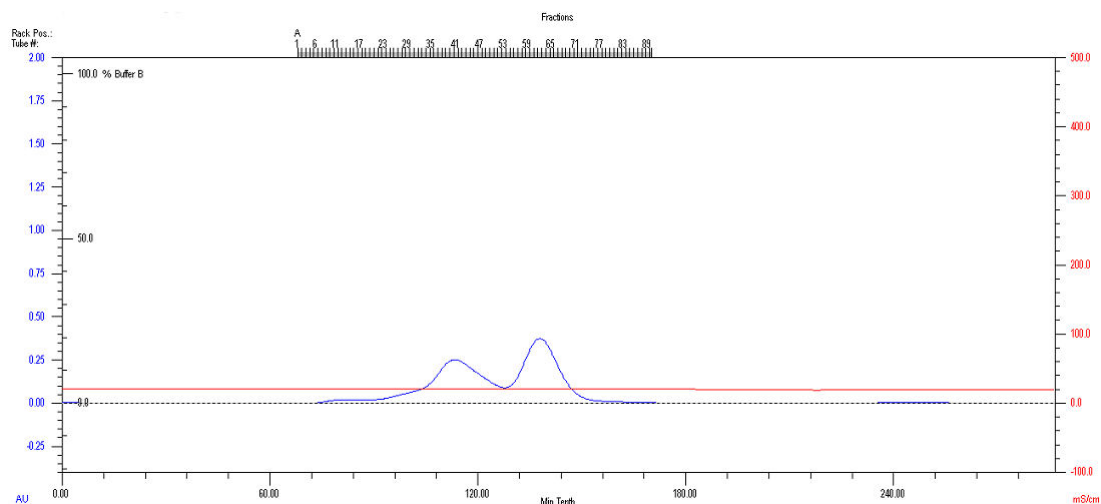


Abbildung 3.24: SEC-Chromatogramm der Modellproteine β -Galaktosidase aus *Kluyveromyces lactis* (124 kDa) und BSA (66 kDa), (Absorption: blau, Leitfähigkeit: rot)

Es ist zu erkennen, dass eine Trennung der beiden Modellproteine mit der verwendeten Methode erzielt werden kann. Im Folgenden ist ein Chromatogramm des Rohextrakts dargestellt (Abbildung 3.25). Durch Abschätzungen der Größe

wurde hier eine grobe Einteilung in vier Größenbereiche vorgenommen: > 129 kDa ①, ca. 129 kDa ②, ca. 55 kDa ③ und < 55 kDa ④, wobei die Bereiche 2 und 3 von besonderem Interesse sind.

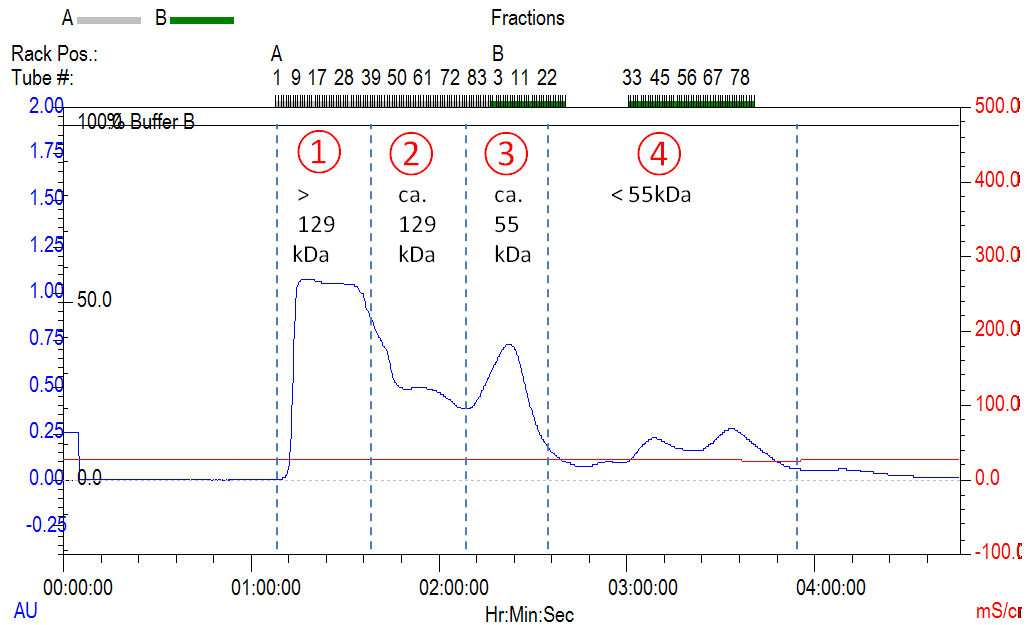


Abbildung 3.25: SEC-Chromatogramm des Rohextrakts aus *E. ramulus*

Die durch die SEC erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und einem Aktivitätstest unter Zugabe von Naringenin und Phloretin mit anschließender HPLC-Analytik unterzogen um möglicherweise PhH- oder CHI-haltige Fraktionen zu detektieren. Da aufgrund der Methodik eine starke Verdünnung der Proben auftritt und nur geringe Proteinkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen zu erwarten sind, erfolgte die Inkubation mit Naringenin und Phloretin über Nacht. Eine Aufkonzentrierung der Fraktionen war nicht zielführend, da diese im vollständigen Aktivitätsverlust resultierte. Als Referenz für die Aktivität diente, wie bereits zuvor, eine Probe des Rohextrakts, die analog getestet wurde.

Nach 15 h Inkubation (RT) konnte in mehreren Fraktionen ein Abbau von Phloretin zu HPP detektiert werden, eine Umsetzung von Naringenin fand allerdings in keiner der getesteten Fraktionen statt. In den einzelnen Fraktionen ist auch nach der SEC eine Vielzahl verschiedener Proteine enthalten. Eine Verbesserung der Trennung konnte auch durch die Verringerung des Volumenstroms auf bis zu 0,5 ml/min nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Da aber an dieser Stelle nicht die Trenneffizienz sondern die fehlende Aktivität das wesentliche Problem darstellt, ist die Trenneffizienz der Säule an dieser Stelle nebensächlich.

Bei den Phloretin-abbauenden Fraktionen wird angenommen, dass die PhH mit einer molekularen Masse von 55 kDa enthalten ist. Erstaunlich ist jedoch, dass sich die Phloretin-abbauenden Fraktionen über den Größenbereich 2, der etwa im Bereich von 129 kDa liegen müsste, erstreckt. So sind nur wenige Fraktionen des Bereichs 3 (Fraktion A78 bis B15, Abbildung 3.25), aber vor allem der fast vollständige Bereich 2 (Fraktion A52 bis A77, Abbildung 3.25) positiv getestet worden. Ungeachtet dessen konnten die Ergebnisse genutzt werden, um die PhH-abbauenden Fraktionen zu identifizieren und zu entfernen, um den Phloretin-Abbau möglicherweise zu verhindern.

Im Folgenden wurden alle nicht-Phloretin-abbauenden Fraktionen vereint und wiederum auf ihre Aktivität bezüglich der gewünschten Umsetzung von Naringenin zu Phloretin untersucht. Auch hier erfolgte keine Umsetzung von Naringenin. Zur weiteren Überprüfung wurden alle Fraktionen vereint und ebenfalls auf ihre Aktivität getestet. Durch die Vereinigung aller Fraktionen erfolgte zumindest noch eine sehr geringe Umsetzung von Naringenin (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse muss angenommen werden, dass die verwendete SEC zu einem hohen Aktivitätsverlust des aufgegeben Rohextrakts bezüglich der Naringenin-Umsetzung führt. Ob dies auf der hohen Verdünnung oder der nur geringen Stabilität des Rohextrakt bzw. der Zielenzyme beruht, kann nicht beurteilt werden.

3.3.6 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Um eine Fraktionierung aufgrund hydrophober Wechselwirkungen der Proteine im Rohextrakt aus *E. ramulus* zu erreichen, wurde die hydrophobe Interaktionschromatographie getestet. Hierbei werden die unpolaren Oberflächenregionen eines Proteins bei hohen Salzkonzentrationen an eine schwach hydrophobe stationäre Phase gebunden. Die Elution erfolgt dann durch Verringerung der Salzkonzentration [52]. Als stationäre Phase diente eine Phenylmembran, die bei einer Salzkonzentration von 1,5 M Ammoniumsulfat beladen wurde.

Eine Beurteilung der Fraktionen erfolgte wiederum zum einen nach der Proteingröße mittels SDS-PAGE und zum anderen nach der Aktivität bezüglich der Umsetzung von Naringenin bzw. Phloretin. Die Zugabe von 1,5 M Ammoniumsulfat hat dabei keinen maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität des Rohextrakts, was auch den Ergebnissen aus Kapitel 3.3.2 entspricht (1,5 M \approx 33 % Sättigung). Durch die Testung unterschiedlicher Gradienten wurde die Trennwirkung optimiert. Hierbei

waren zwei Bereiche aufgrund ihrer Größenverteilung oder Aktivität von besonderem Interesse. Es konnten durch die HIC zum einen Fraktionen gewonnen werden, in denen mittels SDS-PAGE ausschließlich Proteine mit einer Größe von etwa 30 kDa nachgewiesen wurden. Dies entspricht sowohl den Untereinheiten der CHI als auch der PhH. Durch Testung der entsprechenden Fraktionen konnte allerdings weder für die Umsetzung von Naringenin zu Phloretin noch von Phloretin zu HPP ein Aktivitätsnachweis erbracht werden. Das Chromatogramm sowie die SDS-PAGE des markierten Bereichs (erster Peak) werden in Abbildung 3.26 gezeigt.

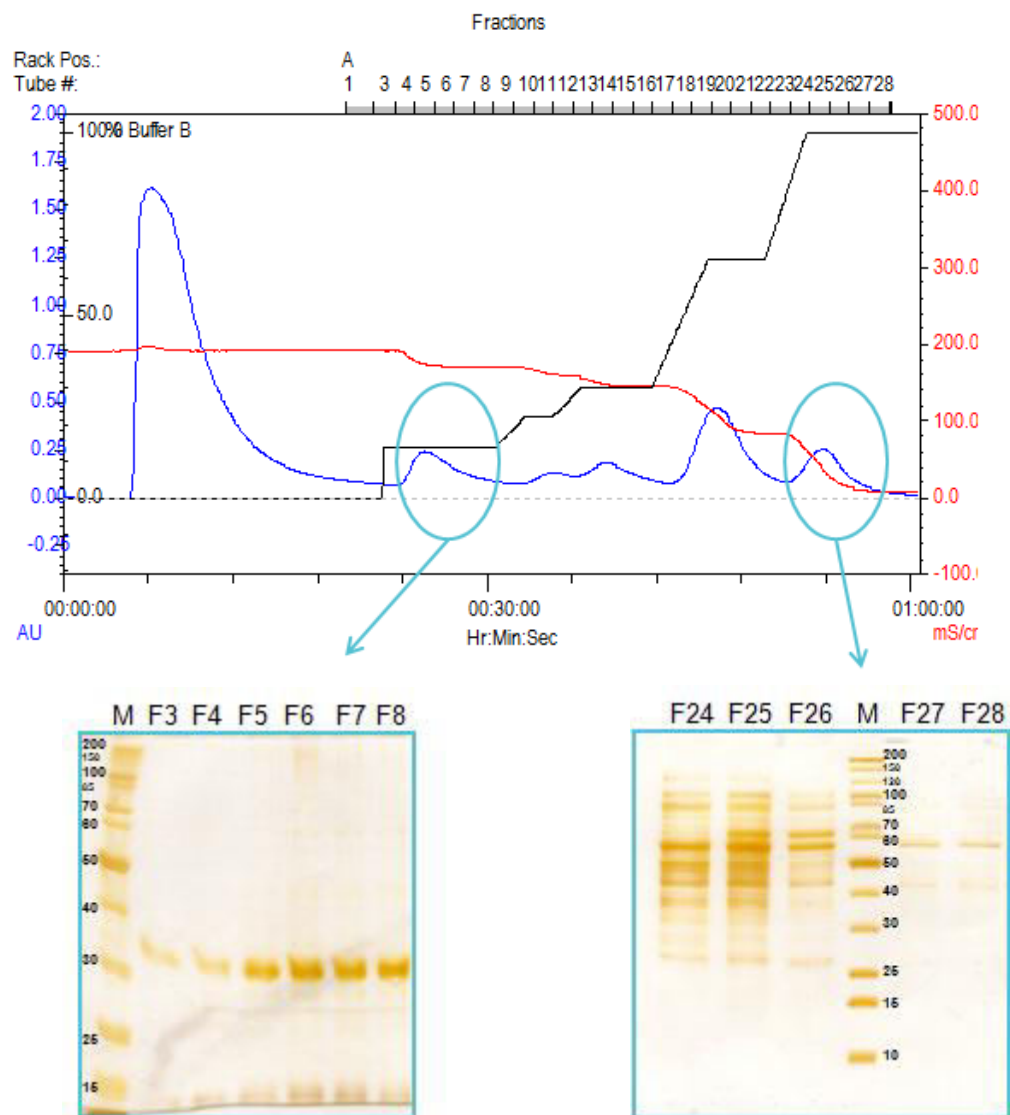


Abbildung 3.26: Chromatogramm der HIC und SDS-PAGE der gekennzeichneten Bereiche; F3-F8: Einzelbande, F24-F28: Phloretin- und Naringenin-abbauende Fraktionen

Anhand der SDS-PAGE wird für die Fraktionen 3-8 eine deutliche Einzelbande bei 30 kDa detektiert. Die Einzelbande wurde für weitere Untersuchungen mittels MALDI-MS aus einem Coomassie-gefärbten Gel [57] ausgeschnitten und am Institut für Biochemie der Universität Greifswald analysiert. Die Analyse ergab allerdings, dass es sich hierbei weder um die CHI noch um die PhH handelt. Es wurden jedoch Homologien zu einer β -HydroxybutyrylCoA-Dehydrogenase aus *Butyrivibrio fibrisolvens*, einem ruminalen Bakterium, gefunden [58].

In einem weiteren Bereich, der ebenfalls in Abbildung 3.26 gekennzeichnet ist (letzter Peak), konnten mittels Aktivitätstest unter Zugabe von Naringenin oder Phloretin aktive Fraktionen detektiert werden. Durch Fraktion 24-26 wurde Phloretin zu HPP abgebaut. In den gleichen Fraktionen wurde darüber hinaus auch ein geringer Naringenin-Abbau nachgewiesen. Da bei der Umsetzung von Naringenin weder HPP noch Phloretin detektiert werden konnten, bleibt zu klären, ob es sich hierbei überhaupt um die gewünschte Reaktion handelt. Mittels SDS-PAGE kann nur eine sehr schwache Bande im Bereich von 30 kDa nachgewiesen werden.

Der Aktivitätstest wurde mit einer höheren Anfangskonzentration (150 μ M) an Naringenin wiederholt und die Inkubationszeit auf 24 h verlängert, um die Konzentration möglicher gebildeter Produkte zu erhöhen und somit die Detektion zu erleichtern. Doch auch bei höheren Naringeninkonzentrationen ist keine HPP- oder Phloretinbildung messbar und der Abbau bleibt nach wie vor sehr gering. Demnach handelt es sich zwar anscheinend nicht um die gewünschte Umsetzung von Naringenin zu Phloretin, dennoch wäre aber die Beteiligung der CHI denkbar. Wenn beispielsweise eine Umsetzung von Naringenin zum Naringeninchalcon ohne weitere Reaktion zum Phloretin stattfinden würde (siehe Abbildung 2.6), würde das Naringeninchalcon nicht durch die HPLC-Analytik erfasst werden. Da für das Naringeninchalcon kein käuflicher Standard erhältlich ist, konnte an dieser Stelle jedoch keine weitere Charakterisierung vorgenommen werden.

Durch Zusammenführen aller Fraktionen erfolgte eine, wenn auch sehr geringe Umsetzung von Naringenin unter Bildung von HPP. Unter Verwendung der Fraktionen 2-22, also ohne die Phloretin/Naringenin-abbauenden Fraktionen, konnte dies nicht beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass die CHI oder andere für die Umsetzung benötigte Enzyme in den abgetrennten Fraktionen (23-28) enthalten sind, aber in Abwesenheit der anderen Fraktionen nicht aktiv sind. Dies würde für die Beteiligung mehrerer Enzyme an dem gewünschten Umsetzungsprozess sprechen.

Es wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Trennleistung im Bereich der aktiven Fraktionen zu verbessern. Eine Verfeinerung der Auftrennung konnte jedoch auch durch Verlängerung des Gradienten, weitere Stufengradienten oder Veränderung des Fraktionsvolumens nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.7 Zusammenfassende Diskussion

Die Aufreinigung ausgewählter Enzyme wie der CHI, PhH oder anderer an der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin beteiligter Enzyme war nicht erfolgreich. Die für die gewünschte Reaktion verantwortlichen Enzyme konnten weder identifiziert noch isoliert werden. Auch die Abtrennung der PhH von den anderen Enzymen zur Verbesserung der Phloretinproduktion konnte nicht realisiert werden. Die beste Trennleistung konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels HIC erzielt werden. Generell standen sehr wenige Informationen bezüglich der Zielenzyme zur Verfügung, die zur Entwicklung einer Aufreinigungsstrategie von Nutzen gewesen wären. Eine Orientierung erfolgte zum Großteil an den Arbeiten von Herles [28]. Diese beschäftigt sich unter anderem mit der Aufreinigung der CHI. Die Ergebnisse von Herles deuten darauf hin, dass die CHI zwar unter Umständen an dem Umsetzungsprozess von Naringenin zu Phloretin beteiligt sein könnte, diese die Reaktion aber nicht alleine katalysiert. Da also davon ausgegangen werden musste, dass auch andere Enzyme als die CHI in den angestrebten biokatalytischen Prozess involviert sind, wurden die Untersuchungen breitflächig ausgelegt. Dies bedeutet, dass stets alle Fraktionen auf ihre Aktivität bezüglich der Naringenin- und auch Phloretinumsetzung getestet wurden sowie auch verschiedene Kombinationen der Fraktionen. Neben der zeitintensiven Arbeitsweise wurden die Untersuchungen durch die eingeschränkte Stabilität des Rohextrakts erschwert (siehe Kapitel 3.2.2). Durch Lagerung bei 4 °C oder Einfrieren der Proben verringerte sich die Aktivität, so dass die Untersuchungen soweit wie möglich direkt vorgenommen werden mussten. Unter diesen Voraussetzungen wurden die verschiedenen chromatographischen Trennmethode in Anlehnung an die Arbeiten von Herles angepasst und optimiert. Die erhaltenen Ergebnisse liefern nur wenige Informationen bezüglich der Zielenzyme bzw. des Zielenzyms. Dennoch gibt es auch hier Hinweise darauf, dass es sich vermutlich um eine Beteiligung mehrerer Enzyme oder zumindest eines Enzyms mit Abhängigkeit zu einem Cofaktor handelt. Bereits bei der Durchführung einer Ultrafiltration (cut off von 50 und 100 kDa) wurde die Aktivität des Retentats

hinsichtlich der Umsetzung von Naringenin deutlich gemindert, ohne dass Aktivität im Filtrat festgestellt werden konnte. Dies lässt vermuten, dass unter Umständen kleinere Bestandteile des Rohextrakts abgetrennt wurden, die ebenfalls an dem Reaktionsablauf beteiligt sind. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass beispielsweise Wechselwirkungen mit der Ultrafiltrationsmembran zu einer Aktivitätsverringerung geführt haben. Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung mehrerer Enzyme oder Komponenten lieferten die Aktivitätstests verschiedener Kombinationen der durch SEC oder HIC erhaltenen Fraktionen. So ist in den Einzelfractionen der verschiedenen chromatographischen Trennmethode keine Aktivität bezüglich der Umsetzung von Naringenin nachweisbar, aber teilweise zumindest eine geringe Aktivität bei der Wiedervereinigung aller Fraktionen.

Bezüglich der PhH fiel auf, dass das Trennverhalten sowohl bei der Ultrafiltration als auch bei der SEC nicht der durch Schoefer et al. angegebenen Molekülgröße von 55 kDa entsprach [32]. In beiden Fällen erscheint sie, zumindest nach ihrem Trennverhalten zu beurteilen, deutlich größer. Die Bestimmung der molekularen Masse erfolgte nach Schoefer et al. durch Gelfiltration, dessen Ergebnis im Widerspruch zu den im Rahmen dieser Arbeit durch SEC erhaltenen Ergebnissen steht. Da bei Schoefer et al. jedoch die rekombinante PhH zur Bestimmung zum Einsatz kam, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich diese anders verhält, als die im Rohextrakt von *E. ramulus* enthaltene PhH. So besteht die Möglichkeit, dass die PhH beispielsweise mit Proteinen des Rohextrakts interagiert oder sogar in einen Multienzymkomplex eingebunden ist und so eine scheinbare Erhöhung der Masse erfolgt, die in der veränderten Umgebung der rekombinanten PhH nicht möglich ist.

Obwohl verschiedene Versuche zur Stabilität des Rohextrakts unter den verwendeten Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, lässt sich nur schwer beurteilen, ob diese die beobachteten Verringerungen der Enzymaktivität verursachen. Auch wenn unter den verschiedenen Versuchsbedingungen grundsätzlich die Aktivität des Rohextrakts abgesichert werden konnte (z.B. Ammoniumsulfatkonzentration), kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei der Durchführung der verschiedenen Trennmethode dennoch zum Aktivitätsverlust der entsprechenden Enzyme kommt. Hierbei könnten beispielsweise die Beanspruchung durch die Methode oder Verdünnungseffekte eine Rolle spielen. Da die beschriebenen Aktivitätstests die Basis für die Beurteilung der Methoden und die weitere Vorgehensweise bilden,

hätte ein Aktivitätsverlust maßgeblichen Einfluss. Ohne weiterführende Informationen zu den gesuchten Enzymen erscheint eine weitere Untersuchung mittels chromatographischer Trennmethoden wenig aussichtsreich.

3.4 Unterdrückung der Phloretinhydrolase-Aktivität

Aufgrund der zuvor erhaltenen Ergebnisse in der Ganzzellkatalyse (Kapitel 3.2.1) und Untersuchungen des Rohextrakts von *E. ramulus* (Kapitel 3.2.2) kann angenommen werden, dass durch die „Ausschaltung“ der PhH eine signifikante Erhöhung der Phloretinkonzentration ermöglicht werden sollte.

Bisher konnte gezeigt werden, dass *E. ramulus* zwar in der Lage ist, die Umsetzung von Naringenin zu Phloretin zu katalysieren, aber auch, dass das gebildete Phloretin unmittelbar weiter abgebaut wird. Für den weiteren Abbau ist das Enzym PhH verantwortlich, ohne dessen Aktivität das Produkt Phloretin bestehen bleiben sollte. Da durch die Fraktionierungsversuche (Kapitel 3.3) keine Abtrennung der PhH erzielt werden konnte ohne auch die bildende Reaktion zu beeinflussen, wurde eine Inhibierung angestrebt. Zu diesem Zweck werden verschiedene potentielle Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen auf ihre Eignung getestet. Die Schwierigkeit liegt hier in der selektiven Hemmung der PhH, ohne die an der Umsetzung zum Phloretin beteiligten Enzyme zu beeinträchtigen. Die Untersuchungen erfolgen sowohl an der rekombinanten PhH, dem Rohextrakt oder auch dem Ganzellsystem.

3.4.1 Testung verschiedener Inhibitoren

In der Literatur gibt es bereits einige Hinweise auf die Wirksamkeit verschiedener Inhibitoren bezüglich der PhH und zum Teil auch der CHI. Beruhend auf den Eigenschaften der getesteten Inhibitoren wird für beide Enzyme eine katalytische Beteiligung von Tryptophan und Eisen vermutet, während Cysteinseitenketten bei der PhH eine bedeutendere Rolle spielen sollten als für die CHI [28, 32]. Daher wurden gruppenspezifische Inhibitoren wie N-Bromosuccinimid (NBS), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), N-Ethylmaleimid (NEM) und o-Phenanthrolin eingesetzt. Desweiteren wurde der Einfluss verschiedener Abbauprodukte untersucht. Eine Übersicht der eingesetzten Inhibitoren ist Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6: Übersicht der getesteten Inhibitoren für PhH

Inhibitor	Details	Konzentration
Protease Inhibitor Cocktail (Zusammensetz. Sigma-Aldrich)	AEBSF EDTA Bestatin Pepstatin A E-64	nach Herstellerangaben
N-Bromosuccinimid (NBS)	unspez. Bromierung Tryptophan-oxidierend	1-5 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor	(1-40 mM) bzw. n.b.
o-Phenanthrolin Monohydrat	Metallproteaseinhibitor, Chelatbildner	2,5-100 mM
N-Ethylmaleimid (NEM)	Kovalente Veränderung von Cysteinresten	1-5 mM
HPP u. Phloroglucinol	Produktthemmung	500 mM
EDTA-Dinatriumsalz	Chelatbildner	1-10 mM

AEBSF = 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl Fluorid Hydrochlorid

EDTA = Ethylendiamintetraacetat

E-64 = *trans*-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido(4-Guanidino)Butan

Die Handhabung der verwendeten Inhibitoren stellte sich aufgrund ihrer meist geringen Wasserlöslichkeit zum Teil problematisch für die Versuchsdurchführung dar. So mussten die Inhibitoren teilweise in organischen Lösemitteln wie Methanol, Ethanol oder DMSO vorgelöst und dann mit Wasser verdünnt werden, um hinreichende Löslichkeit zu gewährleisten. Zur Überprüfung des Einflusses dieser Lösemittel auf die Aktivität der Enzyme, wurden dem Rohextrakt als entsprechende Menge des jeweils verwendeten Lösemittels zugesetzt. Als problematisch stellte sich hierbei der Einsatz bereits geringer Mengen Ethanol dar, das beispielweise zur Handhabung des Inhibitors PMSF verwendet wurde. Ein Einsatz von PMSF ohne den kompletten Verlust der Aktivität war dementsprechend nicht möglich. Als ebenfalls problematisch erwies sich NBS, das laut Schoefer et al. zu einer annähernd vollständigen Inhibierung der PhH führen soll, laut Herles allerdings auch die CHI inhibieren soll [28, 32]. Da aber sowohl Phloretin als auch Naringenin selbst durch NBS bromiert werden, konnten diese mittels HPLC-Analytik nicht mehr erfasst werden. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass neben der PhH auch weitere

Enzyme von der unspezifischen Bromierungsreaktion betroffen sind und NBS somit als ungeeignet zur selektiven Hemmung betrachtet werden kann.

Der Chelatbildner o-Phenanthrolin wurde zunächst an der rekombinanten PhH untersucht. Hierzu wurde wie bereits in Kapitel 3.2.2 die von der TUHH zur Verfügung gestellte Biomasse aufgeschlossen und durch Zentrifugation der PhH-haltige Rohextrakt gewonnen. Im Vergleich zum unbehandelten Rohextrakt des PhH exprimierenden *E. colis* zeigte sich eine deutliche Verringerung der PhH-Aktivität durch Zugabe von 2,5 mM o-Phenanthrolin. Die Abnahme der Phloretinkonzentration verläuft langsamer, was sich auch anhand der berechneten Abbaugeschwindigkeiten zeigt. Bei der Referenz wird in den ersten 5 min eine Abbaugeschwindigkeit von 45,5 $\mu\text{M}/\text{min}$ erreicht, die durch o-Phenanthrolin auf 31,4 $\mu\text{M}/\text{min}$ verringert wird. Die Phloretinkonzentration bleibt nach 30 min annähernd konstant, desweiteren wird kein HPP detektiert, was ebenfalls für die erfolgreiche Hemmung der PhH spricht (siehe Abbildung 3.27).

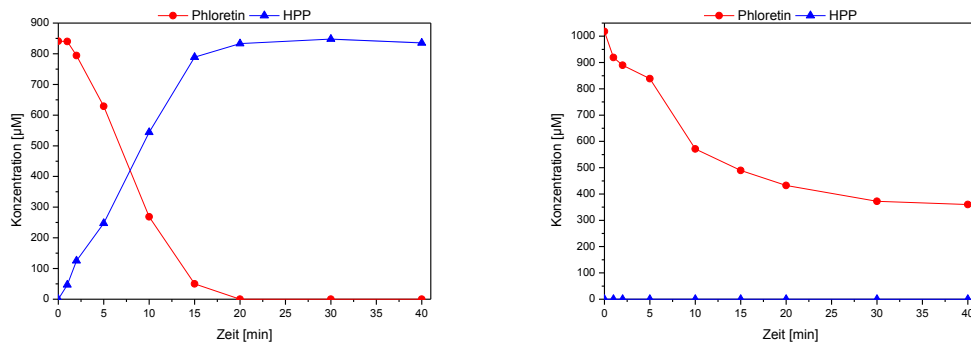


Abbildung 3.27: Einfluss des Inhibitors o-Phenanthrolin auf den Phloretin-Abbau durch die rekombinante PhH; links: Referenz (ohne Inhibitor), rechts: mit Inhibitor (2,5 mM)

Bei der Testung von o-Phenanthrolin am Rohextrakt von *E. ramulus* konnte dieser Effekt jedoch nicht festgestellt werden. Auch bei einer Zugabe von bis zu 100 mM des Inhibitors war kein Einfluss auf den Reaktionsverlauf erkennbar (Daten nicht gezeigt). Hierbei war allerdings zu beobachten, dass das zugefügte o-Phenanthrolin teilweise wieder ausfiel und sich somit die tatsächlich gelöste Konzentration verringerte.

Durch den Einsatz eines Protease-Inhibitor-Cocktails (Sigma-Aldrich) wurde eine leichte Verzögerung des Phloretinabbaus durch die rekombinante PhH erzeugt. Die

entsprechenden Daten sind Abbildung 3.28 zu entnehmen. Die Abbaugeschwindigkeit des Phloretins wird durch den Protease-Inhibitor-Cocktail von 33,1 $\mu\text{M}/\text{min}$ auf 21,4 $\mu\text{M}/\text{min}$ gesenkt.

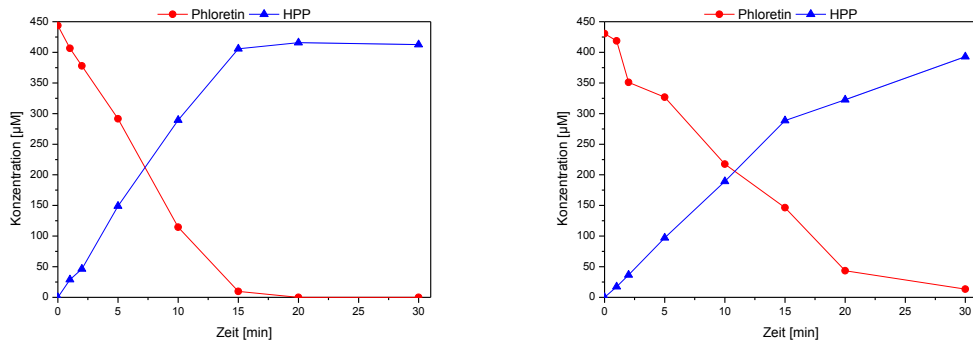


Abbildung 3.28: Einfluss des Protease-Inhibitor-Cocktails auf den Phloretin-Abbau durch die rekombinante PhH; links: Referenz, rechts: mit Protease-Inhibitor-Cocktail

Unter anderem war auch EDTA enthalten, das einen ähnlichen Wirkmechanismus wie o-Phenanthrolin besitzt. Durch Chelatisierung werden Metallionen gebunden, die möglicherweise für die Aktivität der Enzyme essentiell sind. Ist dies der Fall, kann durch Chelatisierung der Metallionen eine Hemmung der Aktivität erzeugt werden. Das EDTA wurde aufgrund der besseren Wasserlöslichkeit als Dinatriumsalz in den Konzentrationen 1 mM, 5 mM und 10 mM am Rohextrakt aus *E. ramulus* getestet. Die entsprechenden Ergebnisse unter Einsatz von 1 mM und 10 mM EDTA-Dinatriumsalz sind in Abbildung 3.29 dargestellt.

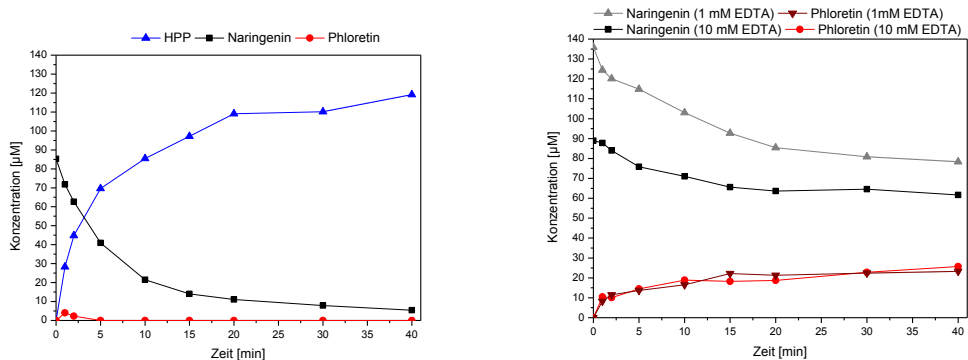


Abbildung 3.29: Einfluss des Inhibitors EDTA-Dinatriumsalz auf die Naringenin-Umsetzung durch den Rohextrakt aus *E. ramulus*; links: Referenz, rechts: mit 1mM und 10 mM EDTA-Dinatriumsalz

Im Vergleich zu der Referenz ohne Inhibitor wird zwar deutlich weniger Naringenin umgesetzt, aber dafür entsteht das gewünschte Produkt Phloretin ohne den weiteren Abbau zu HPP. Nach 40 min sind etwa 24 μM (1 mM EDTA) bzw. 26 μM (10 mM EDTA) Phloretin messbar. Eine weitere Umsetzung zu HPP wurde nicht beobachtet. Insgesamt wurden 57 μM (1mM EDTA) bzw. 27 μM Naringenin (10 mM EDTA) umgesetzt.

Unter der Annahme, dass aus 1 M Naringenin im Idealfall auch 1 M Phloretin gebildet werden kann, entspricht das einer Ausbeute (bezogen auf Naringenin) von etwa 42 % bzw. 96 %. Mit 5 mM EDTA-Dinatriumsalz wird eine Ausbeute von 47 % erreicht und 25 μM Phloretin gebildet (siehe Anhang Abbildung 5.5). Durch Erhöhung der EDTA-Konzentration erhöht sich auch die Ausbeute bezogen auf das verbrauchte Naringenin. Dies deutet darauf hin, dass durch Zugabe von 10 mM EDTA-Dinatriumsalz eine vollständige Inhibierung der PhH erzielt wurde, die in einer vollständigen Umsetzung des verbrauchten Naringenins zu Phloretin resultiert. Bereits durch die Zugabe von 1 mM EDTA-Dinatriumsalz ist ein deutlicher Effekt zu sehen. Der höhere Verbrauch an Naringenin bei geringeren Inhibitor-konzentrationen könnte auf einer unvollständigen Hemmung der PhH beruhen, so dass geringe Mengen des gebildeten Phloretins abgebaut werden. Da es sich hierbei um sehr geringe Konzentrationen handelt, kann das unter Umständen entstandene HPP nicht nachgewiesen werden.

Ergänzend sind in Abbildung 3.30 die berechneten Abbau- und Bildungsgeschwindigkeiten für die Umsetzung von Naringenin dargestellt.

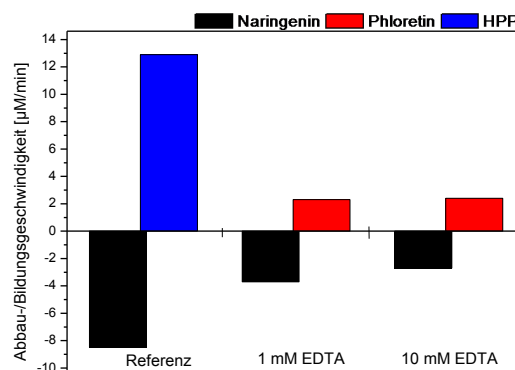


Abbildung 3.30: Abbau- und Bildungsgeschwindigkeiten der Umsetzung von Naringenin mit und ohne EDTA-Dinatriumsalz

Die Abbaugeschwindigkeit von Naringenin durch den unbehandelten Rohextrakt (Referenz) beträgt 8,5 $\mu\text{M}/\text{min}$. Unter Anwesenheit von 1 mM bzw. 10 mM EDTA-Dinatriumsalz werden nur noch Abbaugeschwindigkeiten von 3,7 bzw. 2,7 $\mu\text{M}/\text{min}$ erreicht. Die Bildungsgeschwindigkeit von Phloretin ist mit 2,3 $\mu\text{M}/\text{min}$ (1 mM EDTA) bzw. 2,4 $\mu\text{M}/\text{min}$ (10 mM EDTA) fast identisch.

Die Zugabe von EDTA-Dinatriumsalz hat Einfluss auf die Gesamtreaktion, so dass das zur Verfügung stehende Naringenin nicht mehr vollständig umgesetzt wird. Da auch durch mehrfache Zugabe des Cofaktors NADH keine Veränderung des Reaktionsverlaufs beobachtet wurde, scheint NADH nicht limitierend zu wirken (Daten nicht gezeigt). Die trotz unterschiedlicher Naringeninumsetzung fast identischen Konzentrationen des jeweils gebildeten Phloretins deuten auf eine mögliche Produktinhibierung bei Phloretinkonzentrationen $\geq 20 \mu\text{M}$ hin. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das EDTA-Dinatriumsalz eine inhibierende Wirkung auf die an der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin beteiligten Enzyme hat. Laut Herles führt eine Konzentration von 10 mM EDTA zu einer Reduktion der CHI-Aktivität um 25 % [28]. Wären Metallionen an der Aktivität des Enzyms beteiligt, würden diese durch EDTA chelatisiert werden. Zu der Inhibierung der PhH durch EDTA lagen im Vorfeld keine Informationen vor.

Insgesamt konnte eine deutliche Erhöhung der gebildeten Phloretinkonzentrationen erzielt werden. Vor allem die fast 100 %-ige Ausbeute bezogen auf das umgesetzte Naringenin bei Zugabe von 10 mM EDTA-Dinatriumsalz weist auf ein großes Potential der Reaktion hin.

Ergänzend wurde auch die Wirkung einiger Inhibitoren auf das Ganzzellkatalysesystem *E. ramulus* untersucht. Die Zugabe der Inhibitoren in das Kultivierungsmedium resultierte entweder in einer vollständigen Inhibierung des Wachstums oder hatte keinen Effekt. Eine Beeinflussung der Umsetzungsreaktion konnte nicht erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Untersuchung von *E. ramulus* als potentielles Produktionssystem wäre eine vollständige Abschaltung der PhH ohne weitere Beeinflussung anderer beteiligter Enzyme wünschenswert. Dies ließe sich beispielsweise durch Deletion des für die PhH kodierenden Gens erzielen. Da es sich bei *E. ramulus* um ein

weitestgehend unerforschtes Bakterium handelt, wäre die Konstruktion einer Deletionsmutante jedoch sehr zeit- und kostenintensiv.

3.4.2 siRNA

Die *short interfering RNA* oder auch siRNA zählt zu den sogenannten regulatorischen RNAs, die an dem Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi) beteiligt sind. Der Einsatz von siRNA bietet die Möglichkeit des gezielten *Gen-silencings* oder auch *knock down*. Hierbei wird die Expression eines bestimmten Gens runterreguliert, ohne dieses jedoch vollständig auszuschalten (*knock out*). Die Regulation erfolgt posttranskriptional, also ohne dauerhafte Veränderungen auf genetischer Ebene. siRNA besteht aus doppelsträngigen RNA-Molekülen (dsRNA) mit einer Länge von etwa 21-23 Nukleotiden [59].

Bei der RNA-Interferenz handelt es sich um einen natürlichen Abwehrmechanismus höherer Eukaryonten gegen Pathogene wie beispielsweise Viren. Dringt pathogene dsRNA in die Zelle ein, führt dieses zu einer sequenzspezifischen Degradation der fremden RNA. Eine vereinfachte Darstellung des Mechanismus ist in Abbildung 3.31 zu sehen.

Gelangt doppelsträngige RNA in eine Zelle, wird die fremde dsRNA durch das Enzym Dicer in kürzere Fragmente gespalten. Die so entstandene siRNA wird in dem Enzymkomplex RISC ATP-abhängig in Einzelstränge getrennt, was eine Aktivierung des RISC (RNA-induced silencing complex) zur Folge hat, der an die Ziel-mRNA bindet und zu deren Degradation beiträgt [59-60].

Durch Einbringen von synthetischer siRNA in eine Zelle kann dieser Mechanismus aktiviert werden, um ein selektives *knock down* bzw. *silencing* eines unerwünschten Proteins hervorzurufen. Unter Verwendung der entsprechenden siRNA wird die Translation verhindert und der Proteingehalt deutlich verringert. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass die Kenntniss über die Sequenz des runterzuregulierenden Gens ausreicht, um die siRNA zu entwerfen. Diese Informationen liegen im Falle der PhH vor.

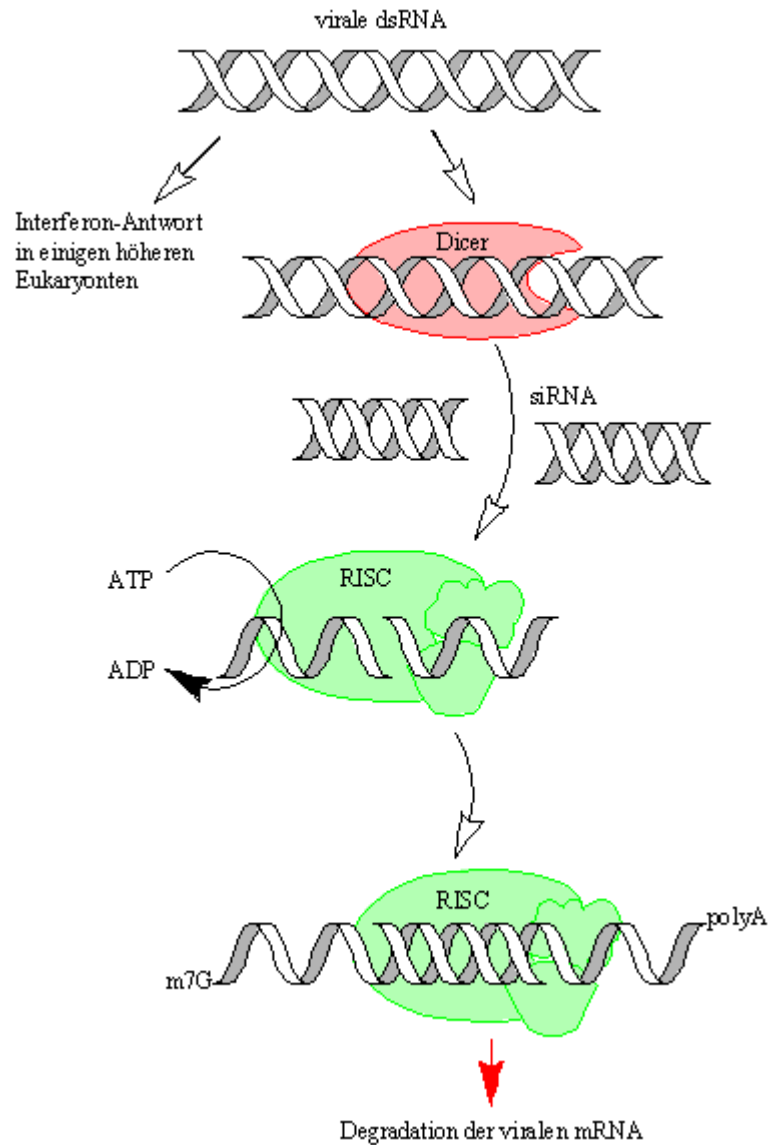


Abbildung 3.31: Mechanismus der natürlichen RNA Interferenz (nach [59])

Da es sich bei der RNA-Interferenz um einen eukaryotischen Mechanismus handelt, ist die Anwendbarkeit von siRNA zum Gen-*silencing* auf Prokaryoten nicht unbedingt gegeben. Unter anderem exprimieren Bakterien RNase III, Enzyme, die ebenfalls doppelsträngige RNA spaltet. Wenn dennoch unter Umständen eine Wirkung erzielt werden könnte, wäre diese von nur kurzer Dauer.

Somit erschienen die Erfolgsaussichten, mit herkömmlicher siRNA in *E. ramulus* einen Effekt auf die PhH-Expression zu erzielen, sehr gering. Dennoch wurde die Methode als Chance gesehen, die vorhandenen genetischen Informationen zur gezielten Verringerung der PhH-Aktivität zu nutzen. Es wurde der prinzipielle Nachweis angestrebt, dass durch selektive Abschaltung der PhH die effiziente

Produktion möglich wäre. Alternative Methoden wie beispielsweise Antisense-RNA waren aufgrund fehlender Voraussetzungen zu diesem Zeitpunkt nicht durchführbar.

Um den Mechanismus der RNA-Interferenz auszulösen, muss die siRNA in die Zellen eingebracht werden. Dies erfordert unter anderem die Permeabilisierung der Zellen. Da es sich bei *E. ramulus* um ein obligat anaerobes Bakterium handelt, muss hier zusätzlich die Transformation unter anoxischen Bedingungen vorgenommen werden. Bei Anarobiern wird als Methode der Wahl häufig die Elektroporation angewandt, um genetisches Material in die Zelle einzubringen [40]. Da hier aber keine Salze enthalten sein dürfen, bedarf es einer vollständigen Abtrennung des Mediums sowie entsprechender Waschschriffe. Ohne eine anaerobe Kammer (Glove Box) ist eine entsprechende Durchführung so gut wie unmöglich.

Da zur Anwendung der Elektroporation die entsprechenden Voraussetzungen fehlten, musste eine Alternative zur Permeation der Zellwand gefunden werden. Um eine möglichst einfache Handhabung unter vollständigem Ausschluss von Sauerstoff zu gewährleisten, wurde die Behandlung der *E. ramulus* Kultur mittels Ultraschallbad gewählt. So können die Kulturen ohne Überführungsschritte behandelt werden und die Zugabe der siRNA-Lösung problemlos über das Septum erfolgen.

Zur Überprüfung der Zellpermeation wurde in Vorversuchen der Zellüberstand mittels PCR analysiert. Da bei starker Zellschädigung ein Austritt von DNA zu erwarten ist, würde diese in einem PCR Produkt resultieren. Im Idealfall sollten die Zellen für die siRNA durchlässig gemacht werden, ohne sie jedoch zu stark zu schädigen. Es wurde nach 0, 5, 10, 15, 20, 30 und 40 min Beschallung im Ultraschallbad eine Probe entnommen und zur Beurteilung des Zellzustandes eine PCR durchgeführt [61]. Die verwendeten Primer und die genaue Durchführung der PCR sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 5.2.10). Da bereits bei der Negativkontrolle ein deutliches PCR-Produkt entsteht, erwies sich diese Überlegung allerdings als wenig aussagekräftig. Ob die DNA durch bereits abgestorbene Bakterienzellen aus der Kultur freigesetzt wurde oder die Zellen durch den Kontakt mit Sauerstoff nach der Probenahme lysieren, lässt sich nicht genau feststellen. Ob die Behandlung mittels Ultraschallbad zum gewünschten Effekt der Permeation führt, bleibt somit unsicher. Dennoch wurde davon ausgegangen, dass ein entsprechender Effekt auf *E. ramulus* ausgeübt wird und die Methode grundsätzlich geeignet sein müsste.

In verschiedenen Versuchsansätzen wurde die siRNA sowohl einer Kultur in der exponentiellen Phase zugegeben als auch einer frisch angeimpften Kultur in der Lag-Phase (Kapitel 5.2.11). Die Behandlung durch Ultraschall wurde für 15 min durchgeführt, um die zugefügte RNA selbst nicht zu beschädigen. Die exponentielle Kultur wurde außerdem genutzt, um einen weiteren Kulturansatz anzupfen. Den so erzeugten *E. ramulus* Kulturen wurde dann zur Überprüfung eines möglichen *silencings* der PhH Naringenin zugefügt und die Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. In allen Kulturen erfolgte eine unveränderte Umsetzung von Naringenin zu HPP, wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Eine erhöhte Phloretinproduktion konnte nicht beobachtet werden.

Aufgrund der bereits beschriebenen Schwierigkeiten zur Durchführung von RNA Interferenz in Bakterien, waren die erhaltenen Ergebnisse zu erwarten. Die Verwendung eines bakteriellen Systems ist zum Einsatz von siRNA zum Gen-*silencing* bisher nicht geeignet bzw. kaum erforscht. Es gibt Untersuchungen zum Einsatz von sogenannten siHybriden (siHybrids), die auch in Bakterien wirksam sein sollen. siHybride bestehen aus einem DNA- und einem RNA-Strang, was zu einer Erhöhung der Stabilität führt [62]. Desweiteren konnten keine abgesicherten, optimalen Rahmenbedingungen zur Permeabilisierung von *E. ramulus* geschaffen werden.

Mit entsprechenden Kenntnissen zur Genomsequenz von *E. ramulus*, könnte auch der Einsatz der für bakterielle Systeme geeigneten Antisense-RNA in Betracht gezogen werden. Diese Methode beruht auf einem ähnlichen Mechanismus wie die siRNA. Durch die Verwendung eines Vektors ist die RNA vor unerwünschtem enzymatischem Abbau geschützt und deutlich stabiler. Der Entwurf eines geeigneten Vektors und dessen stabile Integration in *E. ramulus* setzen allerdings weitere genetische Informationen voraus.

3.4.3 Zusammenfassende Diskussion

In diesem Kapitel sollte eine Methode gefunden werden, um die PhH-Aktivität zu unterdrücken und dadurch eine Verbesserung der Phloretinproduktion zu erzielen. Vor allem durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. Die Wirkung einiger in der Literatur beschriebener PhH-Inhibitoren wie beispielsweise o-Phenanthrolin konnte nur zum Teil bestätigt

werden. Laut Schoefer et al. wird die PhH-Aktivität durch o-Phenathrolin auf 20 % vermindert [32]. Bei der Testung an der rekombinaten PhH konnte im Rahmen dieser Arbeit ein deutlicher Effekt beobachtet werden. Bei Untersuchungen an dem Rohextrakt aus *E. ramulus* wurde jedoch keine Verringerung der PhH-Aktivität bzw. des Phloretin-Abbaus gemessen. Allerdings handelte es sich im Rahmen dieser Arbeit durch die Verwendung des Rohextrakts um ein Enzymgemisch, bei dem nicht nur auf eine entsprechende Selektivität des Inhibitors geachtet werden muss, sondern im Gegenzug auch ein Einfluss auf den Inhibitor durch weitere enthaltene Proteine möglich ist. Am erfolgreichsten war der Einsatz von EDTA-Dinatriumsalz. Durch Zugabe von 10 mM wurde der Abbau von Phloretin zu HPP anscheinend vollständig inhibiert, bei der Umsetzungsreaktion wurde kein HPP detektiert. Das verbrauchte Naringenin wird zu annähernd 100 % zu Phloretin umgesetzt, allerdings wird nur noch ein geringer Anteil des gesamten Naringenins verwertet. Die Verringerung der Gesamt-Umsetzung könnte durch eine Produkthemmung bedingt sein, da durch die erfolgreiche Inhibierung der PhH nun höhere Konzentrationen von Phloretin erzielt werden als zuvor. Laut Herles haben bereits sehr geringe Phloretinkonzentrationen und auch Naringeninkonzentrationen von 1 μM einen Einfluss auf die CHI-Aktivität [28]. Hier werden allerdings Anfangskonzentrationen von über 100 μM Naringenin eingesetzt und Phloretinkonzentrationen von über 20 μM erreicht, bevor die Reaktion zum Erliegen kommt. Eine Substrathemmung durch Naringenin wird unter anderem auch aufgrund der in den vorausgegangenen Kapiteln durchgeführten Untersuchungen zumindest in den verwendeten Konzentrationsbereichen ausgeschlossen. Eine Produkthemmung wäre an dieser Stelle aber möglich. Ein Einfluss des EDTA-Dinatriumsalzes auf die für die Umsetzungsreaktion verantwortlichen Enzyme ist ebenfalls denkbar, vor allem bei Beteiligung der CHI, deren Aktivität durch EDTA reduziert wird [29]. Prinzipiell konnte jedoch zunächst gezeigt werden, dass die Inhibierung der PhH eine gesteigerte Bildung von Phloretin mit sich bringt.

Der Versuch dieses Phänomen auch ohne negative Auswirkungen auf die gewünschte Reaktion mittels siRNA zu erzeugen, blieb ohne Erfolg. Sobald eine Genomsequenzierung von *E. ramulus* vorläge, bestünde die Möglichkeit einen Vektor mit entsprechender Antisense-RNA zu gestalten und diesen in *E. ramulus* zu integrieren. Desweiteren könnte auch eine Deletionsmutante ohne das PhH-Gen zum

gewünschten Ziel der Phloretinproduktion führen, wobei es sich dann allerdings nicht mehr um ein natürliches System handeln würde.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Zur biokatalytischen Gewinnung des Dihydrochalcon Phloretin wurde das strikt anaerobe Bakterium *E. ramulus*, das natürlicherweise an dem mikrobiellen Verdau von Flavonoiden beteiligt ist, als potentielles Produktionssystem untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die anaerobe Kultivierung von *E. ramulus* bis zu einem Arbeitsvolumen von 10 L etabliert (Kapitel 3.1). Ausgehend von Flaschenkulturen bis zu einem Arbeitsvolumen von 400 mL und einer maximalen OD_{600} um die 2 rel. AU wurde ein Scale-up vorgenommen. Dies erforderte zunächst die Erarbeitung verschiedener Rahmenbedingungen wie die Herstellung des anoxischen, vorreduzierten Mediums oder auch die Untersuchung der verträglichen Glukosekonzentrationen und Auswirkungen mechanischer Belastung durch Schütteln oder Rühren. Es zeigte sich, dass *E. ramulus* das zumeist stehend und ohne Durchmischung kultiviert wird, nur sehr geringen mechanischen Belastungen standhält. Bereits bei Schüttelgeschwindigkeiten über 50 rpm wurde das Wachstum der Kulturen deutlich gehemmt (Kapitel 3.1.1). Dementsprechend wurde zum Scale-up ein Reaktorsystem gewählt, das zum einen den Anforderungen der anoxischen Umgebung genügt und zum anderen eine schonende Durchmischung sicherstellt. Das System der Wahl ist ein wellendurchmischer Beutelreaktor mit der Bezeichnung BIOSTAT® CultiBag RM 20 L optical (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen). Unter Anwendung der Hungate Technik wurde eine anoxische Atmosphäre in dem mit 10 L (maximales Arbeitsvolumen) vorreduziertem Medium befüllten Beutelreaktor geschaffen. Die wellen-induzierte Durchmischung und die Implementierung einer pH-Wert Regelung ermöglichten die Kultivierung von *E. ramulus* bis zum Auftreten einer Glukoselimitierung bis zu einer OD_{600} von 10 rel. AU (Kapitel 3.1.2). Desweiteren konnten die erhaltenen Ergebnisse ähnlich erfolgreich auf einen Stahlreaktor übertragen werden (Kapitel 3.1.3).

Im Rahmen dieser Arbeit diente die Kultivierung vor allem zur Produktion der für weitere Untersuchungen benötigten Biomasse bzw. des daraus gewonnenen Rohextrakts, was durch Feuchtzellmassen von bis zu 7 g/L sichergestellt werden konnte. Da der Schwerpunkt auf den nachfolgenden Untersuchungen zur Umsetzung von Naringenin zu Phloretin lag, fand keine weitere Optimierung der Kultivierungen statt. Dennoch wurden die bestmöglichen Grundlagen für eine weitere

Maßstabsvergrößerung gelegt. Zurzeit stellt die Glukose-Versorgung den limitierenden Faktor dar, was beispielsweise durch ein fed-batch Verfahren optimiert werden könnte. Desweiteren birgt auch der innovative Einsatz eines Beutelreaktors zur anaeroben Kultivierung für andere anaerobe Bakterien ein großes Potential.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Untersuchung der Eigenschaften des potentiellen Produktionssystems *E. ramulus*. Hierbei wurden sowohl das Ganzzellkatalysesystem als auch die cytoplasmatischen Enzyme in Form des Rohextrakts analysiert.

Zunächst wurde getestet, in wie weit *E. ramulus* in der Lage ist, verschiedene Substanzen, die an der Zielreaktion beteiligt sind, umzusetzen. Hierbei kamen Naringenin, sein Glykon Naringin, Phloretin und HPP zum Einsatz (Kapitel 3.2.1). Während Naringenin und Phloretin von *E. ramulus* vollständig umgesetzt werden, erfolgt kein Abbau von Naringin oder HPP. Das besser wasserlösliche Glykon Naringin kommt somit nicht als alternatives Substrat für Naringenin in Frage. Da HPP durch *E. ramulus* nicht weiter abgebaut wird, kann es als Endprodukt angesehen werden und dient zur Beurteilung verschiedener Reaktionsabläufe. Die für das Ganzzellsystem in Kultivierungen erhaltenen Ergebnisse ließen sich auch auf die Untersuchungen mittels Rohextrakt übertragen (Kapitel 3.2.2). So werden auch hier Naringenin und Phloretin umgesetzt, während bei Naringin und HPP keine Reaktion detektiert werden konnte. Ein entscheidender Fakt ist, dass die Umsetzung mittels Rohextrakt auch unter oxidischen Bedingungen abläuft. Bei beiden Systemen, ganzen Zellen und Rohextrakt, trat das Problem auf, dass Phloretin zwar prinzipiell gebildet, aber auch unmittelbar zu HPP abgebaut wird.

Auf Grundlage verschiedener Literaturstellen und ergänzenden Untersuchungen konnte das Enzym Phloretinhydrolase (PhH) eindeutig als Phloretin-abbauendes Enzym identifiziert werden. PhH katalysiert den Abbau von Phloretin zum Endprodukt HPP und Phloroglucin (Abbildung 2.5 B) [32].

Zur Identifizierung und Isolierung der an der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin beteiligten Enzyme wurden vielfältige Anstrengungen unternommen (Kapitel 3.3). Dennoch lieferten die durchgeführten Untersuchungen wie IEF oder die Anwendung chromatographischer Trennmethode wie IEC, SEC, HIC nur wenige weiterführende Ergebnisse. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der

Hauptteil der im Rohextrakt von *E. ramulus* enthaltenen Proteine in einem pI-Bereich von pH 4-5,5 liegt (Kapitel 3.3.3). Beruhend auf Aktivitätstests einzelner und kombinierter Fraktionen gibt es Hinweise darauf, dass mehr als ein Enzym an der Umsetzungsreaktion beteiligt ist oder zumindest eine Cofaktor-Abhängigkeit besteht (Kapitel 3.3.5, 3.3.6). Ein Mangel an NADH kann als Ursache für den Aktivitätsverlust ausgeschlossen werden. Möglicherweise liegt eine Beteiligung von Metallionen vor, die durch die verschiedenen Trennmethoden abgetrennt wurden. Ob die Chalcon Isomerase (CHI) eine entscheidende Rolle bei der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin spielt, bleibt weiterhin fraglich. Bei einer Beteiligung der CHI wird davon ausgegangen, dass diese die Reaktion nicht alleine katalysiert. Ohne weitere Anhaltspunkte bezüglich der Zielenzyme werden weitere Aufreinigungsversuche als wenig sinnvoll erachtet.

Eine weitere Strategie zur Erhöhung der Phloretinproduktion war neben der Identifizierung und Isolierung der verantwortlichen Enzyme die Abtrennung der PhH zur Verhinderung des durch sie katalysierten Phloretinabbaus. Eine Realisierung ohne Verlust der Aktivität für die gewünschte Umsetzung von Naringenin zu Phloretin war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich.

Zur Verhinderung der unerwünschten Abbaureaktion wurden im Folgenden verschiedene Inhibitoren zur Hemmung der PhH am Rohextrakt von *E. ramulus* getestet (Kapitel 3.4.1). Durch den Einsatz von EDTA-Dinatriumsalz konnte der Abbau von Phloretin vollständig verhindert werden, so dass eine annähernd 100 %-ige Umsetzung des verbrauchten Naringenins zu Phloretin erfolgte. Allerdings fand die Umsetzung des Naringenins nur noch eingeschränkt statt. Neben dem direkten Einfluss des EDTA-Dinatriumsalzes auf die Gesamtreaktion wäre auch eine Produktinhibierung durch das entstandene Phloretin denkbar. In diesem Fall müsste eine kontinuierliche Entfernung des gebildeten Phloretins erfolgen, um die weitere Umsetzung von Naringenin zu gewährleisten. Hier wäre möglicherweise die Anwendung von Zweiphasen-Systemen zur direkten Extraktion des Produkts denkbar. In diesem Fall stehen zum einen wässrig-organische Zweiphasen-Systeme oder auch wässrige Zweiphasen-Systeme (ATPS, Aqueous Two-Phase Systems) zur Auswahl. Eine bessere Kompatibilität zum Erhalt der Enzymaktivität wäre mit einem ATPS zu erwarten, da es sich bei Phloretin jedoch um eine schlecht wasserlösliche

Substanz handelt, sollte auch ein wässrig-organisches Zweiphasen-System in Betracht gezogen werden.

Prinzipiell bietet *E. ramulus* die gewünschten biokatalytischen Fähigkeiten, das Flavanon Naringenin zu dem Dihydrochalcon Phloretin umzusetzen. *E. ramulus* verfügt also über die notwendigen Enzyme, um einen Produktionsprozess aufzubauen, auch wenn eine eindeutige Identifizierung und vor allem die Isolierung der Enzyme bisher nicht erfolgreich waren. Ein ökonomisches Ganzzellkatalysesystem zur Produktion von Phloretin basierend auf dem Wildstamm muss allerdings verworfen werden. Alternative Organismen, die in der Lage wären, als Wildstamm das gewünschte Produkt Phloretin zu produzieren, gibt es nicht.

Auch wenn bisher der Einsatz eines genetisch unveränderten biokatalytischen Systems angestrebt wurde, geben die erhaltenen Ergebnisse Anlass, zumindest die Zuhilfenahme gentechnischer Methoden in Betracht zu ziehen. Zur Weiterführung dieser Arbeit wurde die Genomsequenzierung von *E. ramulus* in Auftrag gegeben. Auf Grundlage der genetischen Sequenz könnten gezielte Untersuchungen einzelner Enzyme durchgeführt und Rückschlüsse auf ihre Funktion gezogen werden. Ergänzend könnten die erhaltenen Sequenzdaten zur schnellen und effizienten Identifizierung aufgereinigter Proteine herangezogen werden. In einem weiteren Schritt bestünde die Möglichkeit, die identifizierten Enzyme in einen Produktionsstamm zu klonieren und so beispielsweise eine Überexpression des Zielenzym oder der Zielenzyme zu erhalten.

An Stelle der Verwendung von Inhibitoren wäre ebenfalls ein Lösungsansatz auf genetischer Ebene denkbar. Auf Grundlage der in Auftrag gegebenen Genomsequenzierung bestünde die Möglichkeit, eine Deletionsmutante ohne PhH-Aktivität zu erzeugen, so dass eine Phloretinproduktion durch *E. ramulus* ohne weiteren Abbau zu HPP erfolgen könnte. Auf diese Weise wäre eine selektive Abschaltung der Phloretin-abbauenden PhH möglich, ohne die weiteren beteiligten Enzyme zu beeinflussen und vor allem sogar ohne diese kennen zu müssen.

5 Anhang

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

Analysenwaage, Analytik AC 210S, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Anionenaustauschermembran, Sartobind Q75, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Autoclav, Systec V-150, Systec GmbH, Deutschland
Bioreaktor, BIOSTAT C, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Bioreaktor, BIOSTAT Cultibag RM optical, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Crimp-Zange, Ochs GmbH, Deutschland
Dispensette, 100 mL, Brand, Deutschland
FPLC-Anlage, Biologic DuoFlow, Biorad, USA
FPLC-Fraktionssammler, Biologic BioFrac Collector, Biorad, USA
Gelelektrophoreseapparatur, Mini ProteanSystem, Biorad
Gelelektrophoreseapparatur, Multiphor II Flachbettsystem, Pharmacia Biotech, USA
Gelfiltrationssäule, Sephacryl S300 Säule, GE Healthcare LifeSciences, USA
Glucosemessgerät, YSI 2700 Select Analyzer, YSI incorporated, USA
HPLC, Merck Hitachi HPLC System, Japan
 Diode Array Detector L-7455
 Interface D-7000
 Säulenofen L-7350
 Pumpe L-7100
 Autosampler L-7200
HPLC-Säule, ZORBAX SB-C18, Agilent, USA
IEF-Streifen und Puffer, Immobiline DryStrip Kit, Pharmacia Biotech, USA
Kolbenhubpipetten, Eppendorf AG, Deutschland
kontinuierliche Zentrifuge, Contifuge stratos, Heraeus, ThermoScientific, USA
Photometer UVICON922, Kontron Instruments
Photometer, Multiskan Spectrum, Thermolabs, USA
Reinstwasseranlage, Arium ProVF, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Ultraschallsonde, LABsonic, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Vibrationszelmühle, FastPrep FP120, Qbiogene Inc., Illkirch, Frankreich

Vortex, Gemmy industrial corp., Taiwan

Zentrifuge Eppendorf 5415C, Eppendorf AG, Deutschland

Zentrifuge FRESCO17, Heraeus, ThermoScientific, USA

Zentrifuge mit Kühlaggregat, Megafuge, 1.0 RS, Heraeus, ThermoScientific, USA

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alu-Bördelkappen, Ochs GmbH, Deutschland

Butylgummisepten, Ochs GmbH, Deutschland

Einmalhandschuhe, Latex, Semperguard, Semperit AG Holding, Wien

Einmalhandschuhe, Nitril, Ansell Protective Products, Aalst

Einmalspritzen, Omnifix, Braun, Deutschland

Einmalspritzen, Teruma Europe NV, Leuven

Halbmikroküvette, Sarstedt, Deutschland

Pipettenspitzen, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Reaktionsgefäße, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Serumflaschen 50-100 mL, Glasgerätebau Ochs, Laborfachhandel e.K., Bovenden

Sterilfiler, Minisart 0,25 µm, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Ultrafiltrationsmembranen, VIVASPIN, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Zentrifugenröhrchen, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

5.1.3 Reagenzien und Chemikalien

1,10-Phenanthrolin Hydrochlorid Monohydrat, Sigma-Aldrich

3-(3,4-Hydroxyphenyl)propionsäure 98 %, Sigma-Alrich

Acetonitril, HPLC grade. Merck KGaA, Darmstadt

Ammoniumsulfat, AppliChem

BSA, Bovines Serum Albumin, Pierce

Cystein HCl, Merck KGaA, Darmstadt

Cystin, Fluka Chemie AG

D-Glucose, Sigma Aldrich Chemie GmbH

di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ (>95 %), Merck KGaA, Darmstadt

DMSO (max. 0,05% Wasser), Merck KGaA, Darmstadt

EDTA-Dinatriumsalz, Fluka

Essigsäure 100%, AppliChem
Ethanol (96 %), VWR International GmbH
Fleischextrakt, Biotechnica internacional S.A. DE C.V., Mexico
Fleischpepton, Biotechnica internacional S.A. DE C.V., Mexico
HCl (konz.), Fluka Chemie AG
Hefeextrakt, Fluka Chemie AG
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 (>99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt
KCl, Fluka Chemie AG
Marker für SDS-PAGE: PageRuler™ Protein Ladder, Fermentas
Methanol, HPLC grade, Merck KGaA, Darmstadt
 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Riedel-De-Häen, Hannover
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fluka Chemie AG
 Na_2HPO_4 , Fluka Chemie AG
 Na_2S , Merck KGaA, Darmstadt
NADH, Fluka Chemie AG
Naringenin, Symrise GmbH
Natriumchlorid, NaCl (>99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid, Fluka Chemie AG
N-Bromosuccinimid, Sigma-Aldrich
N-Ethylmaleimide, Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid, Sigma-Aldrich
Phloretin, Symrise GmbH
Protease-Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich
Proteosepepton, Fluka Chemie AG
SDS, Sigma Aldrich Chemie GmbH
Tween 80, Fluka Chemie AG

5.1.4 Kulturmedien und Puffer

50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 (KPP)

3,70 g/L KH_2PO_4 und 3,94 g/L K_2HPO_4 mit deionisiertem Wasser lösen. Ggf. den pH-Wert auf pH = 6,8 einstellen.

Resazurin-Lösung

0,1 g Resazurin in 10 mL 0,1 N NaOH lösen und mit deionisiertem Wasser auf 250 mL auffüllen.

Salzlösung

10,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,5 g NaCl (34 mM)

0,34 g $\text{MnSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

mit deionisiertem Wasser auf 250 mL auffüllen.

konzentrierte Glukose-Lösung

14,85 g Glukose mit deionisiertem Wasser auf 25 mL auffüllen. Zur vollständigen Lösung der Glukose kurz erwärmen (Mikrowelle). Über einen Sterilfilter wird die Glukoselösung in eine sterile mit N_2/CO_2 (Gasgemisch 80:20) befüllte Serumflasche überführt.

Stamm-Medium (Zusammensetzung)

9 g/L Fleischpepton

1 g/L Proteose Peptone

3 g/L Fleischextrakt

4 g/L Hefeextrakt

3 g/L NaCl

0,5 ml Tween 80

2,5 ml Salzlösung

und 2-3 ml Resazurin-Lösung

0,25 g/L Cystine

2 g/L Na_2HPO_4

0,25 g Cysteine-HCl

(6 g Glukose, wird gesondert als konzentrierte Lösung zugefügt)

Bradford-Reagenzlösung

10 mg Coomassie Brilliant Blau G250, 5 mL Ethanol (96%), 10 mL Phosphorsäure (85 %) mit deionisiertem Wasser auf 100 mL auffüllen

SDS-Laufpuffer für die SDS-PAGE (1 x TGS-Puffer)

0,3 g Tris Base (25 mM), 14 g Glycin (192 mM) und 1 g SDS (0,1 %) werden in 1 L deionisiertem Wasser gelöst (pH 8,2)

SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE

0,315 g Tris/HCl (20 mM), 58 mg EDTA (2 mM), 5 g SDS (5 %) und 20 mg Bromphenolblau (0,02 %) in 80 mL deionisiertem Wasser lösen.

Entfärber/Fixierer-Lösung für die Silberfärbung

400 mL Ethanol, 400 mL deionisiertes Wasser und 80 mL Essigsäure werden miteinander vermischt.

Farmers Reducer-Lösung für die Silberfärbung

Eine Spatelspitze $K_3[Fe(CN)_6]$ und eine Spatelspitze $Na_2S_2O_3$ werden in 100 mL deionisiertem Wasser gelöst.

Bindungs- und Elutionspuffer 8-strips

Die verwendeten Bindungspuffer sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.

Tabelle 5.1: Bindungspuffer (pH 5-10)

pH Wert	Puffer	Bemerkungen
pH 5	25 mM Acetat	Natriumacetat, mit Essigsäure auf pH 4 einstellen
pH 6	25 mM KPP	KH_2PO_4 und K_2HPO_4
pH 7	25 mM KPP	KH_2PO_4 und K_2HPO_4
pH 8	25 mM Tris	Tris base
pH 9	25 mM Tris	Tris base
pH 10	25 mM Carbonat	Natriumcarbonat

Elutionspuffer

Als Elutionspuffer dienen die Bindungspuffer unter Zugabe der entsprechenden NaCl Konzentration (200 mM, 400 mM, 1000 mM).

5.2 Methoden

5.2.1 Kultivierungstechniken

Herstellung des vorreduzierten Stamm-Mediums

Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist Kapitel 5.1.4 zu entnehmen.

Bis auf Cystine, Na_2HPO_4 und Cystein werden alle Bestandteile in deionisiertem Wasser gelöst und unter rühren zum Sieden gebracht. Anschließend etwa 15 min kochen bis der Farbumschlag des enthaltenen Indikators Resazurin (von rot nach farblos) vollständig ist. Durch die anderen Bestandteile ist das Medium dann gelb. Im Anschluss erfolgt die Zugabe des Cystins bevor das Medium unter Begasung mit einem N_2/CO_2 (80:20 v:v) auf Eis heruntergekühlt wird. Unmittelbar bevor das jeweilige Gefäß luftdicht verschlossen wird, werden Na_2HPO_4 und Cysteine zugesetzt.

Befüllen von Kulturgefäßen

- Serumflaschen: Zur Befüllung von Serumflaschen (Medienvolumen 5-40 mL) wird zunächst ein größeres Volumen wie zuvor beschrieben in einem Erlenmeyer- oder Rundkolben präpariert. Das Verschließen des Kolbens erfolgt dann durch einen entsprechenden Aufsatz mit einer Dispensette über die das gewünschte Volumen des Mediums in die einzelnen Serumflaschen überführt werden kann. Da der Kolben dabei luftdicht verschlossen ist, sollte dieser nur zu etwa 40 % befüllt werden, um einen entsprechenden Gasraum zu gewährleisten. Die Serumflaschen werden vor und während der Überführung des Mediums mit dem N_2/CO_2 -Gasgemisch begast und anschließend mit Butylsepten und Bördelkappen verschlossen. Auch diese dürfen nur bis etwa 40 % des ihres Fassungsvermögens befüllt werden.
- Druckgeprüfte Schott-Flaschen (1 L): Zur Befüllung von druckgeprüften 1 L Flaschen wird das entsprechende Volumen von 400 mL wie zuvor beschrieben in einem Erlenmyerkolben erhitzt. Das kochende Medium wird dann zügig in die bereits zuvor begaste Flasche überführt und dort im Weiteren wie beschrieben behandelt. Zum verschließen der Flaschen dienen Butylsepten mit entsprechenden Lochkappen.

Die luftdicht verschlossenen Flaschen werden im Anschluss 30 min bei 121 °C autoklaviert.

Die Zugabe der gewünschten Glukosekonzentration erfolgt durch Zugabe der konzentrierten Glukoselösung mittels Spritze durch das Septum. Standardmäßig wird diese in einer Endkonzentration von 6 g/L eingesetzt.

Befüllen eines Beutelreaktors

Das Medium wird bis zum Erhitzungsschritt wie zuvor beschrieben in einem begasten Kolben vorbereitet. Da das Medium nicht autoklaviert sondern während des Überführungsprozesses sterilfiltriert wird, kann die Glukose bereits zugesetzt werden. Dem noch heißen Medium werden auch alle noch fehlenden Bestandteile zugefügt, bevor es mittels Schlauchpumpe in den mehrfach mit N₂ bzw. im letzten Schritt N₂/CO₂ gespülten Beutelreaktor überführt wird. Zum Abkühlen des Mediums wird der Schlauch über ein Eisbad zum Beutel geführt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 5.1 dargestellt.



Abbildung 5.1: Befüllung eines Beutelreaktors

Stamm

Alle Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit *Eubacterium ramulus* (DSM 16296; DSMZ, Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Das strikt anaerobe humane Darmbakterium wurde erstmals 1976 von Moore et al. beschrieben und 1999 von Schneider et al. aus humanem Faeces isoliert [24-25].

Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

Das vorreduzierte Medium wurde 5-10 %-ig mit einer Vorkultur beimpft und stehend bei 37 °C inkubiert.

Zur Stammhaltung von *E. ramulus* wurde mindestens einmal pro Woche eine Kultur überimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen der exponentiellen Phase wurde

die Kultur bei 4 °C gelagert. Die Reinheit der Kultur wurde regelmäßig durch lichtmikroskopische Untersuchungen überprüft.

5.2.2 Zellaufschluss

Die Biomasse wird mit 1,5 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) pro g FZM resuspendiert.

Ultraschallsonde

Die Zellsuspension wird auf 2 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und auf Eis gekühlt. Der Zellaufschluss erfolgt bei einer Amplitude von 100 % mit 0,6 Cycle. Die Zellsuspension wird 4-mal 1,5 min mit jeweils mind. 2 min Pause beschallt.

Einfrieren-Auftauen

Die Zellsuspension wird in 2 mL Reaktionsgefäßen 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 10 min in einem 20 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Der Gefrier-Tau-Zyklus wird 4-mal wiederholt.

Ultra-Turrax

Die Zellsuspension wird unter Kühlung 5-mal für 30 s mit einem Ultra-Turrax gehandelt.

Vibrationsszelmühle

Die Zellsuspension wird in 1,5 mL Probengefäße mit Ø 0,5 mm Glaskugeln gefüllt und bei 5,5 m/s für 30 s mit 3 Wiederholungen im FastPrep FP120 behandelt.

5.2.3 Herstellung des Rohextrakts

Zur Herstellung des Rohextrakts werden 1,5 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) pro g FZM zur Resuspendierung verwendet. Der Aufschluss erfolgt in 2 mL Reaktionsgefäßen mit einem Füllvolumen von etwa 1,5 mL unter Einsatz einer Ultraschallsonde mit anschließender Zentrifugation (s.o.). Die Zentrifugation wird bei 4 °C für 60 min bei maximaler Leistung durchgeführt. Der erhaltene Überstand wird abgenommen und für weitere Untersuchungen verwendet.

5.2.4 Aktivitätstest

Der Aktivitätstest beruht auf der Zugabe verschiedener Substrate und anschließender Detektion der Substrat- und Produktkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten mittels HPLC-Analytik.

Die Substrate (Naringenin, Phloretin, Naringin, HPP, Phloroglucin) werden je nach Bedarf als 10-50 mM Lösung in DMSO angesetzt und der zu untersuchenden Probe maximal 2 %-ig zugesetzt. In der Regel wurden Endkonzentrationen zwischen 100 und 300 μM verwendet.

Zur Untersuchung des Rohextrakts wurde die Inkubation nach etwa 60 min beendet. Zur Untersuchung der Fraktionen verschiedener chromatographischer Trennmethode erfolgte die Inkubation für 15-16 h über Nacht.

Um die Reaktion der jeweiligen Probe zu stoppen wurde diese 1:1 mit eiskaltem Methanol versetzt und zur Ausfällung der Proteine mind. über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Im Anschluss erfolgt die Abtrennung aller unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation. Der Überstand wird mittels HPLC analysiert.

5.2.5 HPLC

Als Trennsäule wurde eine Zorbax SB-C18, $1,8\text{ }\mu\text{M}$ (50 x 4,6 mm) verwendet. Als wässrige Phase dient deionisiertes Wasser mit 0,1 % Eisessig (A) und als organische Phase reines Acetonitril (B). Vor Verwendung werden beide mittels Ultraschallbad für 15 min engast. Der eingesetzte Gradienten-Modus ist in Tabelle 5.2 aufgeführt.

Tabelle 5.2: HPLC-Methode

Zeit [min]	A: 0,1 % Essigsäure [%]	B: Acetonitril [%]
0,00	90	10
2,50	90	10
15,00	60	40
17,00	0	100
20,00	0	100
20,10	90	10
23,00	90	10
Flussrate	1,3 mL/min	
Temperatur	40 $^{\circ}\text{C}$	

Detektion	UV bei 280 nm
Einspritzvolumen	5 µL

5.2.6 Sonstige Trennverfahren

Ammoniumsulfatfällung

Zur stufenweisen Ammoniumsulfatfällung wurde der Rohextrakt wie in 5.2.3 beschrieben mittels Ultraschall-Aufschluss und anschließender Zentrifugation hergestellt. Die jeweils benötigte Menge des Ammoniumsulfats ist aus einem Nomogramm abzulesen (Abbildung 5.2). Das zuvor gemörserte Ammoniumsulfat wird dem gekühlten Rohextrakt langsam zugefügt und vollständig gelöst. Die Fällung erfolgt 30 min auf Eis. Die präzipitierten Proteine werden durch Zentrifugation (13000 g, 20 min) bei 4 °C abgetrennt und der Überstand zur weiteren Fällung verwendet. Das Pellet wird in 500 µL Kaliumphosphatpuffer gelöst und dient weiteren Untersuchungen mittels Aktivitätstest und SDS-PAGE. Analog wird auch jeweils vom Überstand eine Probe entnommen.

		Endkonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
		Zugegebenes Ammoniumsulfat (mg/L)																
Anfangskonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	50										33	66	101	137	176	214	302	392
	55											33	67	103	141	179	264	353
	60												34	69	105	143	227	314
	65													34	70	107	190	275
	70														35	72	153	237
	75															36	115	198
	80																77	157
90																	79	

Abbildung 5.2: Nomogramm zur Ammoniumsulfatfällung

Ultrafiltration

Als Ultrafiltrationseinheiten dienen die Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin 2 (2 mL-8 µL), Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, mit einem cut off von 50 kDa und 100 kDa. Der Rohextrakt wird zuvor mit einem 0,2 µm Filter filtriert und

anschließend 2 mL auf den jeweiligen Zentrifugalkonzentrator aufgegeben. Die Zentrifugation erfolgt nach Herstellerangaben bis zum minimalen Volumen von 200 μ L (Deadstop-Reservoir).

Nach dem ersten Durchlauf werden die Proben vom Filtrat entnommen und dienen zur weiteren Untersuchung (Aktivitätstest, SDS-PAGE, Bradford-Test). Das Retentat wird wiederum mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer auf das Anfangsvolumen aufgefüllt und der Vorgang zweimal wiederholt, bevor die weiteren Untersuchungen folgen.

5.2.7 Elektrophoretische Trennmethoden

SDS-PAGE

Zur Vorbereitung der Proben wird der SDS-Probenpuffer mit Mercaptoethanol und 55 %-igem Glycerin im Verhältnis 70:20:30 gemischt und anschließend 1:1 mit der Probe versetzt. Im Anschluss wird das Probengemisch 5 min bei 95 °C erhitzt und bei maximaler Zentrifugenleistung 3 min zentrifugiert.

Das Polyacrylamid-Gel wird in eine mit Laufpuffer (1 x TGS) gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und mit dem Probengemisch beladen. Je nach gewählter Größe der Geltaschen werden 12-18 μ L Probengemisch und 3 μ L Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ unstained Protein Ladder, Fermentas) verwendet. Die Gelelektrophorese wird durch anlegen einer Spannung von 80 V gestartet und nach etwa 20 min auf 200 V erhöht. Der Endpunkt wird anhand der Bromphenolblau-Front des Probenpuffers beurteilt. Die Proteinbanden werden im Anschluss durch entsprechende Färbungen mit Silber oder Coomassie visualisiert.

Silberfärbung

Das Gel wird für mindestens 30 min in Entfärber/Fixierer-Lösung inkubiert und anschließend zweimal kurz mit entionisiertem Wasser gewaschen. Danach wird es für 2,5 min in frisch angesetzter Farmers Reducer Lösung geschwenkt und im Anschluss solange mit entionisiertem Wasser gewaschen bis vollständig entfärbt ist. Zur Komplexierung der Silberionen erfolgt eine 30 minütige Inkubation in frisch angesetzter Silbernitrat-Lösung (etwa 0,1 %). Nach Entfernung der Silbernitrat-Lösung erfolgen wiederum zwei Waschschritte mit deionisiertem Wasser und 2,5 %-iger Na_2CO_3 -Lösung (jeweils 30 s). Zur Entwicklung wird das Gel in 100 mL einer 2,5 %-igen Na_2CO_3 -Lösung mit 250 μ L CH_2O -Lösung bis zum gewünschten

Färbungsintensität inkubiert. Durch eine 5 %-ige Essigsäure-Lösung wird die Reaktion gestoppt und durch eine etwa 10 minütige Inkubation fixiert. Zur kurzzeitigen Aufbewahrung kann das Gel in deionisiertem Wasser gelagert werden.

Kolloidale Coomassie-Färbung (Blue Silver Stain)

Das Gel wird für 1-2 h oder über Nacht in der Blue Silver Stain Lösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgt durch deionisiertes Wasser.

Coomassie-Färbung

Das Gel wird für 1-2 h oder über Nacht in der Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend mit Coomassie-Entfärbter bis zur gewünschten Intensität entfärbt.

2D-Gelelektrophorese

Es wurden 30 µg Protein (absolut) in Form des verdünnten Rohextrakts auf den Gelstreifen aufgetragen.

Für beide Schritte der 2-D-Elektrophorese werden Polyacrylamidgele verwendet. Für die IEF verwendet man vorgefertigte schmale Gelstreifen mit einem pH-Gradienten von 3 bis 10 in der Matrix. In der zweiten Dimension werden Polyacrylamidgele mit einer Konzentration von 6 bis 15% verwendet.

Zunächst muss der Gelstreifen in einem Puffer rehydriert werden (Rehydrierungspuffer: 8M Urea, 2% CHAPS, 0,5% IPG-Buffer, 0,002% Bromphenolblau, dest. Wasser.). Die Probe wurde schon während des Rehydrierens aufgetragen, dazu wurde Probe mit dem Rehydrierungspuffer versetzt. Es werden 340 µL Rehydrierungspuffer zugegeben. Die Rehydrierung dauert 10 bis 12 h.

Die IEF wird mittels eines Gradientenprogramms durchgeführt. Zunächst wird mit 500 V gestartet, innerhalb von 90 min wird die Spannung auf 3500 V erhöht und dann für 330 min bei 3500 V belassen. Der Gelstreifen wird anschließend für 12 h bei -20 °C gelagert. Danach kann der Gelstreifen equilibriert werden. Hierzu werden zunächst 10 mL Puffer mit 100 mg DTT versetzt, der Gelstreifen wird 15 min darin equilibriert. Danach wird der Gelstreifen mit destilliertem Wasser gespült, und dann in 10 mL Puffer (+100 mg Iodacetamid) für 15 min belassen. Es erfolgt abermals ein Spülvorgang. Der Gelstreifen ist nun für die zweite Dimension einsatzfähig.

Für die zweite Dimension wird der Gelstreifen auf ein Fertiggel gelegt. Es wird Proteinmarker (PageRuler unstained Protein Ladder, Fermentas) auf das Gel

aufgetragen. Es wird ein vom Hersteller angegebenes Laufprogramm für die Elektrophorese verwendet. Die Färbung des zwei-Dimensionalen Gels erfolgt über eine Silberfärbung.

Präparative Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur präparativen IEF wurde die Standard Rotofor Kammer (35-60 mL) des Rotofor® Systems (Bio-Rad) mit einem Volumen von 50 mL verwendet. Als Elektrolytlösungen dienen 0,5 M Essigsäure und 0,1 M NaOH. Der Rohextrakt wird auf einen Proteingehalt von etwa 2 mg/mL verdünnt und entsprechend die empfohlene Ampholyt-Konzentration von 2 % eingesetzt. Die Lösung wird luftblasenfrei in die Kammer eingefüllt und anschließend mit Klebeband abgedichtet. Die Trennung erfolgt bei 15 W und ist abgeschlossen, wenn nach etwa 4 h eine konstante Spannung erreicht wird (Startwert etwa 420 V, Endwert 785 V).

Durch Anlegen der durch eine Vakuum-Pumpe betriebenen Ernteapparatur können die 20 erhaltenen Fraktionen parallel geerntet werden. Zur Bestimmung des jeweiligen pI-Werts wird der pH-Wert der einzelnen Fraktionen mittel pH-Elektrode ermittelt.

Agarosegel für die PCR-Produkte

Zur Herstellung eines 1,5 %-igen Agarosegels werden 1,5 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer für 120 s bei 800 W in der Mikrowelle erhitzt. Vor der Zugabe von 20 µL Ethidiumbromid das Ganze auf etwa 45 °C abkühlen lassen. Im Anschluss wird das noch flüssige Gel in eine Gelkammer gegossen und der Kamm eingesetzt.

Zur Überprüfung der entstandenen PCR-Produkte werden diese 1:1 mit Ladepuffer gemischt und auf das feste 1,5 %-ige Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt 45 min bei 100 V.

Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid färbt die DNA und erlaubt eine anschließende UV-Detektion der PCR-Produkte.

5.2.8 Chromatographische Trennmethode

Untersuchungen verschiedener pH-Werte mittels 8-strips

Der Rohextrakt wird zunächst 1:5 (v:v) in den entsprechenden Bindungspuffern verdünnt.

Zum Equilibrieren der Membranen werden zweimal 300 µL Bindungspuffer auf die Membran gegeben und jeweils 3 min bei 500 g zentrifugiert.

Zur Probenbeladung werden zweimal je 300 µL des verdünnten Rohextrakts auf die Membran gegeben und ebenfalls jeweils 3 min bei 500 g zentrifugiert.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wird wiederum zweimal mit je 300 µL des Bindungspuffers gespült und 3 min bei 500 g zentrifugiert.

Die Elution erfolgt mit steigender Ionenstärke des Elutionspuffers (200 mM, 400 mM und 1000 mM) in drei Schritten mit jeweils 300 µL und 3 min Zentrifugation bei 500 g.

Anionenaustauschchromatographie an Sartobind® Q 75

Als Bindungspuffer wird ein 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) verwendet (B). Zur Elution durch Erzeugung von Gradienten dient der Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) mit 1 M KCl (A). Die Gradienten-Methode ist in Tabelle 5.3 aufgeführt.

Tabelle 5.3: Methode Anionenaustauschchromatographie

Zeit [min]	Gradient	Fluss
0	0 % A 100 % B	10,0 min 1,0 mL/min
10,0	Sample Injection 100 % B	10 mL 0,75 mL/min
23,3	40 % → 55 % A 60 % → 45 % B	3,0 min 1,0 mL/min
26,3	55 % A 45 % B	8 min 1,0 mL/min
34,3	55 % → 74 % A 45 % → 26 % B	5,0 min 1,0 mL/min
40,3	74 % A 26 % B	5 min 1,0 mL/min
45,3	74 % → 80 % A 26 % → 20 % B	3,0 min 1,0 mL/min
48,3	80 % A 20 % B	5,0 min 1,0 mL/min
53,3	80 % → 86 % A 20 % → 14 % B	5,0 min 1,0 mL/min
58,3	86 % A 14 % B	5,0 min 1,0 mL/min
63,3	86 % → 100 % A 14 % → 0 % B	7,0 min 1,0 mL/min
70,3	100 % A 0 % B	8,0 min 1 mL/min

Größenausschlusschromatographie (SEC) an Sephacryl S-300

Als Trennsäule diente die HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 High Resolution, GE Healthcare, mit einem Trennbereich von 10-1500 kDa.

Als Puffer wurde ein 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) mit 100 mM KCl eingesetzt. Bei einer Flussrate von 1,3 mL/min wurden 1-1,4 mL-Fractionen gesammelt.

Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Phenylmembran

Als Bindungspuffer wird ein 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,8) mit 1,5 M Ammoniumsulfat (A) verwendet. Zur Erzeugung des Gradienten dient der Kaliumphosphatpuffer ohne Ammoniumsulfat (B). Die Gradienten-Methode ist in Tabelle 5.4 aufgeführt.

Tabelle 5.4: Methode Hydrophobe Interaktionschromatographie

Zeit [min]	Gradient	Fluss
0,0	100 % A 0 % B	4,0 mL 1,0 mL/min
4,0	Sample Injection 100 % A	14,0 mL 0,75 mL/min
18,0	86 % A 14 % B	8,0 mL 1,0 mL/min
26,0	86 % → 70 % A 14 % → 30 % B	3,0 mL 1,0 mL/min
29,0	70 % A 30 % B	5,0 mL 1,0 mL/min
34,0	70 % → 35 % A 30 % → 65 % B	4,0 mL 1,0 mL/min
38,0	35 % A 65 % B	4,0 mL 1,0 mL/min
42,0	35 % → 7 % A 65 % → 93 % B	5,0 mL 1,0 mL/min
47,0	7 % → 0 % 93 % → 100 %	3,0 mL 1,0 mL/min
50,0	0 % A 100 % B	6,0 mL 1,0 mL/min

5.2.9 Testung verschiedener Inhibitoren

Die verschiedenen Inhibitoren werden dem Rohextrakt zugesetzt und für ca. 20 min vorinkubiert. Im Anschluss erfolgt der in 5.2.4 beschriebene Aktivitätstest.

5.2.10 PCR

Oligo dT-Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

Upper Primer: 5'-AGGCGGCTTACTGGACGACTACTG-3'

T_m [°C]: 66,1; MW [g/mol]: 7393; GC-Gehalt: 58,3 %

Lower Primer: 5'-CTGGCTACTGGGGATAAGGGTTGC-3'

T_m [°C]: 66,1; MW [g/mol]: 7464; GC-Gehalt: 58,3 %

Reaktionsansatz

10 µL 5 x M-MLV-Puffer

4 µL dNTP's

1 µL Upper Primer

1 µL Lower Primer

1 µL cDNA

0,25 µL Polymerase

32,75 µL RNase freies Wasser

Bei 95 °C 5 min denaturieren der Probe.

Bei 95 °C 30 s denaturieren, 30 s Anlagerungstemperatur der Primer (66 °C),

30 s Temperaturoptimum der Polymerase (72 °C) mit 38 Cyclen

5.2.11 siRNA

siRNA (HPLC gereinigt, Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

Sense: 5'-GCAAGAGCAUAUCCGGCAUCUUAUGUC-3'

Antisense: 5'-GACAUAAGAUGCCGGGAUAUGCUCUUGC-5'

Die siRNA wird nach Herstellerangaben in dem mitgelieferten siMAX Universal Puffer gelöst. Es werden pro 5 mL Kulturansatz 418 µg si RNA eingesetzt.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Beutelt kultivierungen

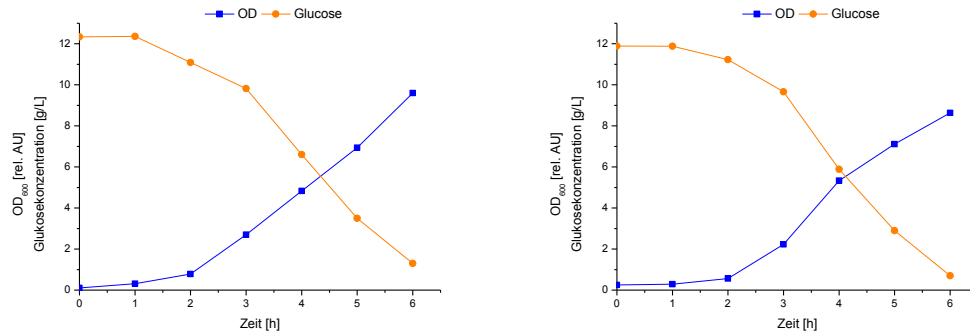


Abbildung 5.3: weitere Kultivierungen von *E. ramulus* im BIOSTAT® CultiBag RM 20 L optical mit einem Arbeitsvolumen von 10 L

5.3.2 Ganzzellkatalyse

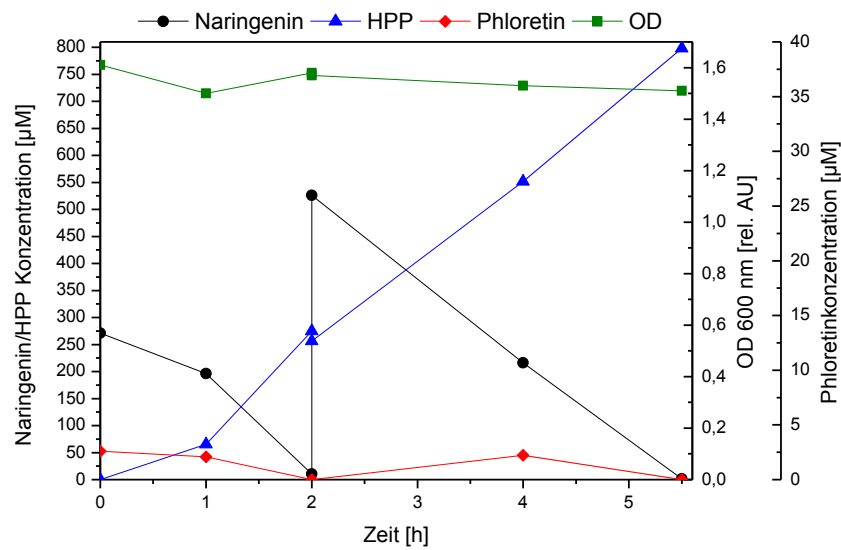


Abbildung 5.4: Zweifache Zugabe von Naringenin (275 μ M und 550 μ M) zu einer *E. ramulus* Kultur in der stationären Phase

5.3.3 Testung verschiedener Inhibitoren

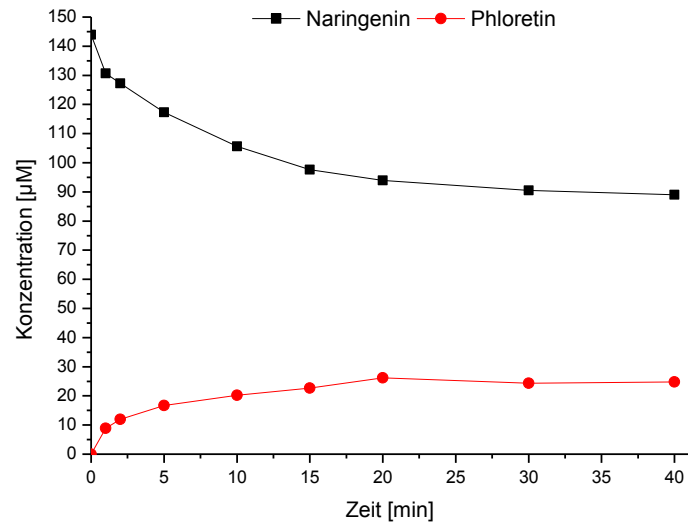


Abbildung 5.5: Einfluss des Inhibitors EDTA-Dinatriumsalz (5 mM) auf die Naringenin-Umsetzung durch den Rohextrakt aus *E. ramulus*

6 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl Fluorid Hydrochlorid
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovines serum albumin</i>)
CHI	Chalcon Isomerase
DCU	digitale Steuereinheit (<i>digital control unit</i>)
dsRNA	doppelsträngige (double-stranded) RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. ramulus</i>	<i>Eubacterium ramulus</i>
E-64	trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido(4-Guanidino)Butan
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GLP	good laboratory practice
GMP	good manufacturing practice
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HPP	3-(3,4-Hydroxyphenyl)propionsäure
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
KPP	Kaliumphosphat-Puffer
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NBS	N-Bromosuccinimid
NEM	N-Ethylmaleimid
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
PhH	Phloretinhydrolase
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rel. AU	relative Absorptionsunit
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie
siRNA	<i>short interfering</i> RNA
μ_{\max}	maximale Wachstumsrate

7 Literaturverzeichnis

- [1] Linden, G., Lorient, D., *New ingredients in food processing*, CRC Press, Boca Raton, FL 1999.
- [2] Brody, A. L., Lord, J. B., *Developing new food products for a changing marketplace*, Technomic Pub. Co., Lancaster, Pa. 2000.
- [3] Schrader, J., Etschmann, M. M., Sell, D., Hilmer, J. M., Rabenhorst, J., Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds--current industrial processes and future prospects. *Biotechnol Lett* 2004, 26, 463-472.
- [4] Hultin, H. O., Current and Potential Uses of Immobilized Enzymes. *Food Technol-Chicago* 1983, 37, 66-84.
- [5] Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N., Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 2009, 26, 1001-1043.
- [6] Lin, J.-K., Weng, M.-S., Flavonoids as Nutraceuticals, in: Grotewold, E. (Ed.), *The Science of Flavonoids*, Springer Science+Business Media, LLC, New York 2008.
- [7] Marston, A., Hostettmann, K., Separation and Quantification of Flavonoids, in: Andersen, O. M., Markham, K. R. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006.
- [8] Gould, K. S., Lister, C., Flavonoid Functions in Plants, in: Andersen, O. M., Markham, K. R. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton 2006.
- [9] Watzl, B., Rechkemmer, G., Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 2001, 48, 498-502.
- [10] Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., *et al.*, Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food Hum Nutr* 2004, 59, 113-122.
- [11] Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Alcaraz, M., Vicente, V., *et al.*, Beneficial action of Citrus flavonoids on multiple cancer-related biological pathways. *Curr Cancer Drug Tar* 2007, 7, 795-809.
- [12] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004, 79, 727-747.
- [13] Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., *et al.*, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J of Clin Nutr* 2001, 74, 418-425.
- [14] Veitch, N. C., Grayer, R. E. J., Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat Prod Rep* 2008, 25, 555-611.

- [15] Nakamura, Y., Watanabe, S., Miyake, N., Kohno, H., Osawa, T., Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *J Agric Food Chem* 2003, *51*, 3309-3312.
- [16] Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J., Lee, C. Y., Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 2003, *51*, 6516-6520.
- [17] Boyer, J., Liu, R. H., Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J* 2004, *3*, 5.
- [18] Auner, B., Wirth, M., Valenta, C., Antioxidative activity and cytotoxicity of four different flavonoids for dermal applications. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY* 2005, *15*, 227-232.
- [19] Valenta, C., Nowak, M., Hadgraft, J., Influence of phloretin and 6-ketocholestanol on the permeation of progesterone through porcine skin. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS* 2001, *217*, 79-86.
- [20] Scalbert, A., Williamson, G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 2000, *130*, 2073s-2085s.
- [21] Xu, K., Lu, H. T., Qu, B. H., Shan, H., Song, J. Y., High-speed counter-current chromatography preparative separation and purification of phloretin from apple tree bark. *Sep Purif Technol* 2010, *72*, 406-409.
- [22] Dooner, H. K., Belachew, A., Chromosome Breakage by Pairs of Closely Linked Transposable Elements of the Ac-Ds Family in Maize. *Genetics* 1991, *129*, 855-862.
- [23] Davies, K. M., Schwinn, K. E., Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis, in: Andersen, O. M., Markham, K. R. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006.
- [24] Schneider, H., Schwiertz, A., Collins, M., Blaut, M., Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *ARCHIVES OF MICROBIOLOGY* 1999, *171*, 81-91.
- [25] Moore, W. E. C., Johnson, J. L., Holdeman, L. V., Emendation of Bacteroidaceae and Butyrivibrio and Descriptions of Desulfomonas Gen-Nov and 10 New Species in Genera Desulfomonas, Butyrivibrio, Eubacterium, Clostridium, and Ruminococcus. *Int J Syst Bacteriol* 1976, *26*, 238-252.
- [26] Simmering, R., Kleessen, B., Blaut, M., Quantification of the flavonoid-degrading bacterium Eubacterium ramulus in human fecal samples with a species-specific oligonucleotide hybridization probe. *Appl Environ Microb* 1999, *65*, 3705-3709.
- [27] Schneider, H., Blaut, M., Anaerobic degradation of flavonoids by Eubacterium ramulus. *ARCHIVES OF MICROBIOLOGY* 2000, *173*, 71-75.

- [28] Herles, C., *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*, Universität Potsdam, Potsdam 2003.
- [29] Herles, C., Braune, A., Blaut, M., First bacterial chalcone isomerase isolated from *Eubacterium ramulus*. *ARCHIVES OF MICROBIOLOGY* 2004, *181*, 428-434.
- [30] Jez, J., Bowman, M., Noel, J., Role of hydrogen bonds in the reaction mechanism of chalcone isomerase. *BIOCHEMISTRY* 2002, *41*, 5168-5176.
- [31] Jez, J., Noel, J., Reaction mechanism of chalcone isomerase - pH dependence, diffusion control, and product binding differences. *J Biol Chem* 2002, *277*, 1361-1369.
- [32] Schoefer, L., Braune, A., Blaut, M., Cloning and expression of a phloretin hydrolase gene from *Eubacterium ramulus* and characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microb* 2004, *70*, 6131-6137.
- [33] Holland, K. T., Knapp, J. S., Shoosmith, J. G., *Anaerobic bacteria*, Blackie; Chapman and Hall, Glasgow, New York 1987.
- [34] Schlegel, H. G., *Allgemeine Mikrobiologie*, Thieme, Stuttgart 1992.
- [35] Levett, P. N., *Anaerobic bacteria : a functional biology*, Open University Press, Milton Keynes ; Philadelphia 1990.
- [36] Hungate, R. E., The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev* 1950, *14*, 1-49.
- [37] Bryant, M. P., Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr* 1972, *25*, 1324-1328.
- [38] Glove-Box, Glove Box, PureLab Inert Gloveboxes; Online im Internet: <http://www.gloveboxes.com/img/glovebox-1.jpg> [22.02.2011].
- [39] Anaerobentopf, Online im Internet: http://www.stag.be/files/s/65/Image/MACSmics%20+%20Jar_resized.jpg [22.02.2011].
- [40] Levett, P. N., *Anaerobic microbiology : a practical approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford ; New York 1991.
- [41] Mehrke, G., Hochschule-Ulm, Ulm 2005.
- [42] Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Harada, H., Recent advances in methane fermentation technology. *Curr Opin Biotech* 2001, *12*, 277-282.
- [43] Jonczyk, P., *Institut für Technische Chemie*, Leibniz Universität Hannover, Hannover 2010.
- [44] Barbaroux, M., Sette, A., Properties of materials used in single-use flexible containers: requirements and analysis. *Biopharm International* 2006, *11*.

- [45] Eibl, R., Löffelholz, C., Eibl, D., Single-Use Bioreactors - An Overview, in: Eibl, R., Eibl, D. (Eds.), *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2011.
- [46] Eibl, R., Kaiser, S., Lombriser, R., Eibl, D., Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biot* 2010, 86, 41-49.
- [47] Schoop, K.-M., Hass, V. C., Studien zur Anwendung von "disposable-bag" (Einweg)-Bioreaktoren zur Produktion therapeutischer oder diagnostischer Agentien mit Zellkulturen. *s & h Ingenieurgesellschaft mbH* 2008.
- [48] Lindner, P., Endres, C., Bluma, A., Höpfner, T., *et al.*, Disposable Sensor System, in: Eibl, R., Eibl, D. (Eds.), *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2011.
- [49] Schneider, H., *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*, Universität Potsdam, Potsdam 1999.
- [50] Schoefer, L., *Mathematische-Naturwissenschaftliche Fakultät*, Universität Potsdam, Potsdam 2002.
- [51] Bradford, M. M., Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976, 72, 248-254.
- [52] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München 2006.
- [53] Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 1970, 227, 680-&.
- [54] Blum, H., Beier, H., Gross, H. J., Improved Silver Staining of Plant-Proteins, Rna and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* 1987, 8, 93-99.
- [55] Bio-Rad, Rotofor System Instruction Manual. *Bio-Rad Laboratories, Inc., USA*.
- [56] Kökpinar, Ö., *Institut für Technische Chemie*, Leibniz Universität Hannover, Hannover 2004.
- [57] Westermeier, R., Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue Staining of polyacrylamide gels. *Proteomics* 2006, 61-64.
- [58] Asanuma, N., Ishiwata, M., Yoshii, T., Kikuchi, M., *et al.*, Characterization and transcription of the genes involved in butyrate production in *Butyrivibrio fibrisolvens* type I and II strains. *Curr Microbiol* 2005, 51, 91-94.
- [59] Eggert, C., RNA-Interferenz: Ein Werkzeug der Analyse zur Genfunktion. *Biospektrum* 2003, 4, 372-374.

-
- [60] Hammond, S. M., Dicing and slicing - The core machinery of the RNA interference pathway. *Febs Lett* 2005, 579, 5822-5829.
- [61] Mullis, K. B., Faloona, F. A., Specific Synthesis of DNA Invitro Via a Polymerase-Catalyzed Chain-Reaction. *Method Enzymol* 1987, 155, 335-350.
- [62] Sherman, M. S., *Science & Technology Review* 2004, pp. 10-11.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2008 bis März 2011 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter Leitung von Professor Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich herzlich für seine Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen, danken.

Für die Übernahme des Korreferats gilt mein Dank PD Dr. Ursula Rinas.

Ich bedanke mich bei Dr. Jens-Michael Hilmer und Egon Gross der Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden für die Schaffung des Projektrahmens und die interessante Zusammenarbeit, auch durch die weiteren Projektpartner der Universität Greifswald und der TU-Hamburg-Harburg.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Sascha Beutel für die wissenschaftliche und moralische Unterstützung während der Promotionszeit, seine hilfreichen Tips und das Korrekturlesen nicht nur dieser Arbeit sondern auch unzähliger Berichte und schriftlicher Dokumente unterschiedlichster Art.

Weiterhin möchte ich mich bei Olga Kysil und Patrick Jonczyk für ihre wissenschaftliche Unterstützung sowie ihre interessierte Mitarbeit während ihrer Diplom- bzw. Masterarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Martina Weiß und Martin Pähler die einem immer mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn es darum ging praktische Versuchsprobleme zu lösen. Ich danke allen Instituts-Angehörigen für das angenehme Arbeitsklima und viele fröhliche Stunden. Insbesondere der „alten“ und „neuen“ Büro-Combo verdanke ich eine schöne Zeit.

Mein herzlicher Dank geht an Fabienne Anton und Tobias Harcke die mich beide auf ihre eigene und ganz besondere Art bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, ebenso wie meine Eltern, die immer für mich da waren.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anne Schmidt
Geburtsdatum	30.06.1982
Geburtsort	Bad Pyrmont

Schulische Ausbildung

1988-1982	Grundschule Grohnde
1992-1994	Orientierungsstufe Emmerthal
1994-2001	Schiller-Gymnasium Hameln

Hochschulausbildung

2001-2005	Studium im Dipl.-Ing.-Studiengang Lebensmitteltechnologie an der Fachhochschule Lippe und Höxter
2005-2007	Studium im Masterstudiengang Life Science an der Universität Hannover
seit 02/2008	Promotionsstudium an der Leibniz Universität Hannover unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

Beruflicher Werdegang

02/2008-12/2008	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Technische der Leibniz Universität Hannover
01/2009-02/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover