

-Exopolysaccharide aus Cyanobakterien-
Untersuchungen zum strukturellen Aufbau und
zur biologischen Aktivität



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

vorgelegt von
Kathrin Venzke
Kiel 2005

Referent: Prof. Dr. W. Blaschek

Korreferent: Prof. Dr. W. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2005

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 04.05.2005

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Grotemeyer

(Dekan)

In Liebe meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. W. Blaschek

am Institut für Pharmazeutische Biologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, **Herrn Prof. Dr. W. Blaschek** für die vertrauensvolle Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas. Seine Anregungen, Ideen und Denkanstöße haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Neben seiner fachlichen Unterstützung danke ich ihm und seiner **Frau Heidi Blaschek** für zahlreiche, gesellige Abende und die nette familiäre Atmosphäre. In lieber Erinnerung werden mir immer die anstrengenden Wanderungen, Obstlerabende, Blämerlbestimmungen und die kleine Kieler Familie in Oberjoch bleiben.

Weiterhin danke ich **Frau Prof. Dr. S. Alban** für ihr „Know-how“ und ihre Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung des Komplementmodulationstests.

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1.	Historie	1
1.2.	Systematik	3
1.3.	Morphologie	5
1.4.	Symbiosen und Endosymbiontentheorie	10
1.5.	Lebensräume und Anpassungsmechanismen	11
1.6.	Panspermientheorie und Potential als Pioniere der Pflanzenbesiedlung	13
1.7.	Wasserblüten und toxische Sekundärstoffe	14
1.8.	Exopolysaccharide	15
1.9.	Zielsetzung der Arbeit	18

2. Material und Methoden

2.1.	Materialien	19
2.1.1.	Cyanobakterien	19
2.1.2.	Chemikalien	19
2.1.3.	Allgemeine Geräte	19
2.2.	Kultivierung	21
2.2.1.	Nährmedium	22
2.2.2.	Kultivierungsbedingungen	22
2.2.3.	Wachstumsüberwachung	23
2.2.3.1.	Bestimmung der Biomasse	23
2.2.3.2.	Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes	23
2.2.4.	Aberntung der 8L-Batchkulturen	23
2.3.	Aufreinigung der Exopolysaccharide	24
2.3.1.	Extraktion der Exopolysaccharide aus der Nährlösung	24

Inhaltsverzeichnis

2.3.2.	Gelpermeationschromatographie	25
2.3.2.1.	Bestimmung des hydrodynamischen Volumens	27
2.3.2.2.	Fraktionierung von Spaltungsprodukten	28
2.3.3.	Ionenaustausch-Chromatographie	29
2.3.3.1.	Auftrennung der EPS in Fraktionen mit unterschiedlichem Ladungsgrad	30
2.3.3.2.	Auftrennung von Spaltungsprodukten hinsichtlich ihres Ladungsgrads.....	30
2.4	Modifikationen	31
2.4.1.	Uronsäurereduktion	31
2.4.1.1.	Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad	32
2.4.2.2.	Uronsäurereduktion nach Fontaine	32
2.4.3.	Lithiumdegradation nach Lau	33
2.4.4.	Desulfatierung nach Alban.....	34
2.4.5.	Alkalimodifikation nach Craigie und Leigh.....	34
2.4.6.	Oxalsäurehydrolyse	35
2.5.	Analytische Methoden.....	36
2.5.1.	Photometrische Methoden.....	36
2.5.1.1.	Kohlenhydratgehalt nach Dubois	36
2.5.1.2.	Uronsäuregehalt nach Blumenkrantz	38
2.5.1.3.	Bestimmung des Pyruvatgehalts	40
2.5.1.3.1.	Pyruvatgehalt nach Sloeneker	41
2.5.1.3.2.	Pyruvatgehalt nach Hirase.....	42
2.5.1.4.	Bestimmung des Acetatgehalts	44
2.5.1.5.	Sulfatgehalt nach Craigie	46
2.5.2.	Chromatographische und Spektroskopische Verfahren	48
2.5.2.1.	Qualitative und quantitative Monosaccharidanalyse per GLC	48
2.5.2.1.1.	Neutralzuckeranalyse nach Blakeney.....	48

Inhaltsverzeichnis

2.5.2.1.2. Neutralzucker- und Uronsäureanalyse nach Preuß und Thier.....	51
2.5.2.2. Charakterisierung der Bindungsstellen nach vollständiger Methylierung per GC-MS	54
2.5.2.3. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	60
2.5.2.4. Kernresonanzspektroskopie	61
2.6. Elementaranalyse	62
2.7. Pharmakologische Testsysteme.....	62
2.7.1. Milzzell-Proliferationstest	62
2.7.2. Bestimmung der IGM-Produktion	63
2.7.3 Zytokininduktion (IL-6, TNF- α , GM-CSF und IFN- γ).....	63
2.7.4. Bestimmung der NO ₂ - -Produktion	64
2.7.5. Komplementmodulationstest (KMT)	64
2.7.5.1. Komplement-Test (klassischer Aktivierungsweg)	65
2.7.5.2. Komplement-Test (alternativer Aktivierungsweg)	67
3. Ergebnisse: <i>Nostoc insulare</i>	
3.1. Taxonomie und Merkmale	68
3.2. Wachstumskurven	69
3.2.1. Biomasse	69
3.2.2. Kohlenhydrate	71
3.3. Identifizierung unbekannter Zucker	73
3.4. Kontinuität der EPS-Zusammensetzung im Wachstumsverlauf	74
3.5. Elementaranalyse	75
3.6. Bestimmung des hydrodynamischen Volumens mittels Gelpermeationschromatographie	75

Inhaltsverzeichnis

3.7.	Fraktionierung des Exopolysaccharidgemisches mittels Ionenaustauschchromatographie	76
3.8.	Nachweis von Substituenten	78
3.8.1.	Pyruvatgruppen	78
3.8.2.	Acetatgruppen	78
3.8.3.	Sulfatgruppe	78
3.9.	Bestimmung des quantitativen Uronsäuregehalts	79
3.10.	Bestimmung des quantitativen und qualitativen Uronsäuregehalts	79
3.11.	Kombinierte Neutralzucker- und Uronsäurebestimmung	82
3.12.	Spaltung des Polysaccharides in definierte oder undefinierte Bruchstücke	83
3.12.1.	Oxalsäurehydrolyse	83
3.12.2.	Lithiumdegradation	84
3.13.	Bestimmung der Bindungstypen	85
3.13.1.	Bindungstypenanalyse des genuinen EPS und der IAC-Hauptfraktion	85
3.13.2.	Bindungstypenanalyse nach Uronsäurereduktion	86
3.13.3.	Bindungstypenanalyse nach Oxalsäurehydrolyse	88
3.13.4.	Bindungstypenanalyse nach Lithiumdegradation	90
3.14.	Quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	91
3.15.	Zusammenfassung	92
4.	Ergebnisse: <i>Chroococcus minutus</i>	
4.1.	Taxonomie und Merkmale	96
4.2.	Wachstumskurven	97
4.2.1.	Biomasse	97

Inhaltsverzeichnis

4.2.2.	Kohlenhydrate	99
4.3.	Identifizierung unbekannter Zucker	101
4.4.	Kontinuität der EPS-Zusammensetzung im Wachstumsverlauf	103
4.5.	Elementaranalyse	103
4.6.	Bestimmung des hydrodynamischen Volumens mittels Gelpermeationschromatographie	104
4.7.	Fraktionierung des Exopolysaccharidgemisches mittels Ionenaustauschchromatographie	105
4.8.	Nachweis von Substituenten	107
4.8.1.	Pyruvatgruppen	107
4.8.2.	Acetatgruppen	108
4.8.3.	Sulfatgruppe	108
4.9.	Bestimmung des quantitativen Uronsäuregehalts	108
4.10.	Bestimmung des quantitativen und qualitativen Uronsäuregehalts	109
4.11.	Kombinierte Neutralzucker- und Uronsäurebestimmung	111
4.12.	Spaltung des Polysaccharides in definierte oder undefinierte Bruchstücke	112
4.12.1.	Oxalsäurehydrolyse	112
4.12.2.	Lithiumdegradation	113
4.13.	Bestimmung der Bindungstypen	115
4.13.1.	Bindungstypenanalyse des genuinen EPS und der IAC-Hauptfraktion	115
4.13.2.	Bindungstypenanalyse nach Uronsäurereduktion	117
4.13.3.	Bindungstypenanalyse nach Oxalsäurehydrolyse	119
4.13.4.	Bindungstypenanalyse nach Lithiumdegradation	120
4.14.	Quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	121

4.15.	Zusammenfassung	122
5.	Ergebnisse: <i>Synechocystis aquatilis</i>	
5.1.	Taxonomie und Merkmale	126
5.2.	Wachstumskurven	127
5.2.1.	Biomasse	127
5.2.2.	Kohlenhydrate	129
5.3.	Kontinuität der EPS-Zusammensetzung im Wachstumsverlauf	131
5.4.	Elementaranalyse	131
5.5.	Bestimmung des hydrodynamischen Volumens mittels Gelpermeationschromatographie	132
5.6.	Fraktionierung des Exopolysaccharidgemisches mittels Ionenaustauschchromatographie	133
5.7.	Nachweis von Substituenten	135
5.7.1.	Pyruvatgruppen	135
5.7.2.	Acetatgruppen	135
5.7.3.	Sulfatgruppe	136
5.8.	Bestimmung des quantitativen Uronsäuregehalts	136
5.9.	Bestimmung des quantitativen und qualitativen Uronsäuregehalts	137
5.10.	Kombinierte Neutralzucker- und Uronsäurebestimmung	138
5.11.	Oxalsäurehydrolyse	139
5.12.	Bestimmung der Bindungstypen	140
5.12.1.	Bindungstypenanalyse des genuinen EPS	140
5.12.2.	Bindungstypenanalyse des modifizierten EPS	143
5.13.	Quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	144

Inhaltsverzeichnis

5.14.	Beeinflussung des Immunsystems	145
5.14.1.	Milzzellproliferation	145
5.14.2.	IgM-Produktion.....	149
5.14.3	Induktion der Zytokin-Ausschüttung	150
5.14.3.1.	GM-CSF-Produktion.....	150
5.14.3.2.	IL-6-Produktion.....	151
5.14.3.3.	IFN γ -Produktion.....	153
5.14.3.4.	TNF α -Produktion	154
5.14.4.	Nitrit –Produktion	156
5.14.5.	Beeinflussung des Komplementsystems	157
5.14.5.1.	Komplement-Test (klassischer Aktivierungsweg)	158
5.14.5.2.	Komplement-Test (alternativer Aktivierungsweg)	159
5.15.	Zusammenfassung.....	161
6.	Diskussion	
6.1.	Kultur	164
6.2.	Größenbestimmung und Fraktionierung	168
6.3.	Strukturaufklärung der EPS	172
6.4.	Immunmodulation	185
7.	Literatur	

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dem.	Aqua demineralisata
BIF	Formationen eisenreicher Erdschichten (banded iron formation)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbumin)
B-Zellen	Bursa-Äquivalent-abhängige Lymphozyten
ConA	Concanavalin A; Lektin aus <i>Canavalia ensiformis</i>
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
CPS	Kapselpolysaccharid (Capsular Polysaccharid)
D ₂ O	Deutertes Wasser
Da	Dalton (Molekulargewicht)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn/dc	Brechungsindex-Inkrement
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPS	Exopolysaccharid
EtOH	Ethanol
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HF	Hauptfraktion
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPS	humanes Poolserum
IAC	Ionenaustauschchromatographie
IFN- γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
LiDe	Lithiumdegradation
LPS	Lipopolysaccharide von <i>Escherichia coli</i>

Abkürzungsverzeichnis

MALLS	Multi-Angle-Laser-Light-Scattering
mb-Lektin	Mannan-bindendes Lektin (mannan-binding Lektin)
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichts-Ausschlussgrenze
NaBD ₄	Natriumbordeuterid
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Stickoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit-Ion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin aus Phaseolus vulgaris
PMAA	Partiell methylierte Alditolacetate
RI	Refraktionsindex
RPS	released Polysaccharid
SI	Stimulationsindex
SIM	Selective Ion Monitoring
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Totalionenchromatogramm
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
T-Zellen	Thymus-abhängige Lymphozyten
UA	Uronsäure
UF	Uronsäurereduktion nach Fontaine
UTC	Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad
λ	Lambda / Wellenlänge

Monosaccharide

Ara	Arabinose
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
Ino	myo-Inositol
Man	Mannose
Rha	Rhamnose
Xyl	Xylose

1. Einleitung

1.1. Historie

Der früheste Zweig des Baums des Lebens auf der Erde ist derjenige der Cyanobakterien; ihre Anfänge lassen sich bis in die urzeitliche Suppe der Proterozoen-Ära zurückverfolgen. (Schopf and Walter, 1982). Früheste fossile Cyanobakterien diverser Morphologien wurden in Gesteinen gefunden, die 3500 Millionen Jahre alt datiert wurden. Mit diesen Funden kann bisher nur das minimale Alter der biologischen Aktivität auf unserer Erde angegeben werden, aber es konnte noch nicht geklärt werden, wie viel länger es schon existiert haben mag. Die ältesten dokumentierten Fossilien wiesen schon, wie heutige Cyanobakterien-Arten, verschiedene Morphologien auf. Neben Einzellern in Kolonien oder frei lebenden Formen, die den heutigen Vertretern der Chroococaceen sehr ähnlich waren, wurden auch schon filamentöse, Oscillatoreaceen-ähnliche Formen, gefunden. Diese Fossilien, welche 1300 Millionen Jahre älter sind als vergleichbare Fossilien anderer Prokaryoten, deuten darauf hin, dass sauerstoffproduzierende Cyanobakterien einen fundamentalen Beitrag zu den frühesten Lebensprozessen auf unserem Planeten geleistet haben.

Die Fähigkeit, sauerstoffproduzierende Photosynthese zu betreiben, ist eine universelle Eigenschaft aller Cyanobakterien, die sie von allen anderen Prokaryonten abgrenzt. Es ist nachgewiesen, dass schon die ältesten bisher gefundenen Cyanobakterienfossilien diese Fähigkeit besaßen, da die Produkte der Photosynthese in den fossilen Gesteinen gefunden wurden (Strauss and Moore, 1992). Die Erdatmosphäre bestand zu dieser Zeit hauptsächlich aus Gasen vulkanischen Ursprungs wie Stickstoff und Kohlendioxid. Sauerstoff konnte erst in unsere Atmosphäre gelangen, als die ersten Organismen begannen, Photosynthese zu betreiben. Nach bisherigen Funden begannen Cyanobakterien wahrscheinlich vor 3500 Millionen Jahren, Sauerstoff an die Atmosphäre abzugeben. In den ersten 1500 Millionen Jahren hatte dies aber zunächst eine geringe Auswirkung auf die Zusammensetzung der Atmosphäre, da der größte Teil des Sauerstoffs bei der Reaktion mit Eisen zu Hematit (Fe_2O_3) und Magnetit (Fe_3O_4) abgefangen wurde. Diese Interaktion kann durch das weit verbreitete Auftreten von BIFs (banded iron formations) bewiesen werden, d.h. Streifungen von eisenreichen und -armen Lagen, die gut durch ihre rostrote Farbe zu erkennen sind, in Gesteinslagen, die zwischen 3500 Millionen und 2000 Millionen Jahre alt sind (Klein und Beukes, 1992).

Nach dieser Zeit begann sich der Sauerstoff in unserer Atmosphäre anzureichern, bis schließlich die ersten obligatorisch-aeroben Lebensformen möglich waren, und steigerte sich bis zu unserer heutigen, sauerstoffreichen Atmosphäre. Fundort dieser ältesten Fossilien waren erhaltene Stromatoliten sedimentärer Wüstengesteine Westaustraliens, deren Alter durch Kohlenstoff-Isotopen-Analytik und weitere etablierte Methoden auf 3500 Millionen Jahre taxiert wurde. Interessanterweise wurden aber auch lebende Analoga zu den fossilen Oscillatoreacean in Algentepichen der eisbedeckten Seen in den antarktischen Wüsten entdeckt (Walter and Bauld, 1983; Wharton, 1994). Es werden ständig neue solcher Ähnlichkeiten zwischen fossilen Cyanobakterien und lebenden Arten gefunden, so dass es allgemeine Praxis unter Paläobiologen geworden ist, die fossilen Taxa nach ihren modernen morphologischen Analoga zu benennen und ihnen ein Präfix wie paläo- oder eo- vorzustellen oder ein Suffix wie -opsis oder -ites anzuhängen. Mehr als 40 solcher Wortschöpfungen werden zurzeit weltweit genutzt.

1.2. Systematik

Die ersten taxonomischen Einteilungen der Cyanobakterien wurden um 1753 von Linnaeus vorgenommen, während des 19. und 20. Jahrhunderts wurden diese weiterentwickelt. Hierbei wurde, aufgrund der Fähigkeit zur sauerstoffproduzierenden Photosynthese, von einer Zugehörigkeit zu den Algen ausgegangen und somit die Regeln des International Code of Botanical Nomenclature benutzt. Da aufgrund ihrer Zellorganisation die Cyanobakterien aber den prokaryotische Lebensformen zugerechnet werden müssen, scheint eine Klassifizierung aufgrund der International Code of Nomenclature of Bacteria ebenfalls sinnvoll. Die beiden Nomenklatorsysteme werden im Augenblick parallel angewandt, als Konsequenz daraus besitzen viele Cyanobakterienarten mehrere Synonyme (Skulberg, 1993).

Die klassische Taxonomie der Cyanobakterien richtete sich nach morphologischen Gesichtspunkten und beschrieb an die 2000 verschiedenen Arten und 150 Gattungen (Geitler, 1932). Diese Einteilungen wurden häufig nur aufgrund kleiner Unterschiede, wie An- und Abwesenheit einer Schleimhülle oder leichter Unterschiede in Zellgröße und Form, vorgenommen, so dass wahrscheinlich viel zu viele Arten klassifiziert wurden (Komarek and Anagnostidis, 1986; 1989). In den Siebzigerjahren begann die Einteilung der Cyanobakterien nach dem bakteriologischen Aspekt. Hierbei bildeten physiologische Kriterien wie die Pigmentzusammensetzung, die Fettsäureanalytik und die Nitrogenaseaktivität, sowie genomische Aspekte wie Genomgröße und DNA-Zusammensetzung die Grundlage der Klassifizierung (Herdman, 1979a; Herdman, 1979b; Kenyon, 1972; Rippka, 1979). Aus diesen Daten ergibt sich auch die Einteilung nach Castenholz und Waterbury. Sie ist früheren Einteilungen nach dem botanischen System sehr ähnlich und gliedert sich in zwei Unterklassen mit sechs Ordnungen (Strassburger, 2002):

1.3. Morphologie

Cyanobakterien zeigen eine typische prokaryotische Zellorganisation. Das Cytoplasma ist nicht in Kompartimente eingeteilt, das heißt, es gibt keine klar abgegrenzten Organellen, sondern alle funktionellen Bestandteile der Zelle sind über das Cytoplasma verteilt. Trotzdem lässt sich das Cytoplasma grob in zwei Regionen einteilen, eine periphere und eine zentrale. Die zentrale Region, auch Nucleoplasma genannt, erscheint leicht granuliert durch die Anwesenheit von Ribosomen, weiterhin enthält sie die stark verdrillten ringförmigen Chromosomen. In der peripheren Region befindet sich das Photosynthese-Membransystem, welches sich durch Invaginationen der Plasmamembran ausbildet. Diese Region wird auch als Chromatoplasma bezeichnet.

Das Cytoplasma von Cyanobakterien enthält eine Reihe verschiedener Einschlüsse, welche meistens der Bevorratung mit Nährstoffen dienen, um unter extremen Umweltbedingungen zu überleben (Tandeau de Marsac, 1993). Kohlenstoff und Energiereserve bieten Glycogengranula, der Reservestoff wird Cyanophyceanstärke genannt und ist ein dem tierischen Glykogen ähnliches Glucan. Lipide werden in Lipidtröpfchen nahe der äußeren Membran gespeichert, sie dienen wahrscheinlich der Membransynthese. Cyanophycingranula bestehen aus einem einzigartigen Polypeptid, welches nur aus zwei Aminosäuren aufgebaut ist; Arginin und Asparaginsäure. Sie erfüllen ihre Funktion im Stickstoff-Umsatz. Der Phosphatvorrat wird in Polyphosphatkörpern oder Volutinkörpern eingelagert, und Enzyme der Photosynthese werden in so genannten Carboxysomen gespeichert. Das Cytoplasma ist von einer Membran, dem Plasmalemma begrenzt. Außerhalb des Plasmalemmas schließt eine gram-negative Zellwand an, die noch von einer schleimigen Kapsel umgeben sein kann.

Cyanobakterien umfassen Mikroorganismen, die morphologisch grob in zwei Gruppen eingeteilt werden können: die einzelligen coccoidalen Formen und die filamentösen Formen. Coccoidale Formen bestehen aus einfachen Einzelzellen, deren Form oval, kugelig oder zylindrisch sein kann. Sie liegen entweder als freie Zellen oder als Zellaggregate in einer schleimigen Matrix vor. Diese Verbindungen bezeichnet man als Kolonien, sie können definiert, z.B. plattenförmig oder kubisch, aber auch undefiniert vorkommen. Coccoidale Einzelzellen können einen Durchmesser von 0,4 bis über 40µm aufweisen. Dies zeigt eine weitere Besonderheit der Cyanobakterien im Vergleich zu anderen Prokaryonten. Für andere Prokaryonten ist ein Durchmesser von 0,4µm schon enorm groß, wohingegen Cyanobakterien mit einem Durchmesser von 0,4µm als Picocyanobakterien bezeichnet werden. Die Reproduktion der Cyanobakterien erfolgt durch Teilung. Sie teilen sich in einer, zwei oder in drei Ebenen. Bei Teilung in einer Ebene kann es zur asymmetrischen Teilung kommen. Die Teilungsraten von Cyanobakterien sind sehr unterschiedlich und hängen stark von den Umweltbedingungen ab. So teilen sich beispielsweise *Chroococidiopsis*-Arten in den Trockenwüsten der Antarktis aufgrund der extremen Umstände wahrscheinlich nur alle zehntausend Jahre (Nienow and Friedmann, 1993), wohingegen die schnellste Teilungsrate bei 2,1h für das aus texanischen Seen stammende Süßwasser-Cyanobakterium *Anacystis nidulans* liegt (Kratz and Myers, 1955).

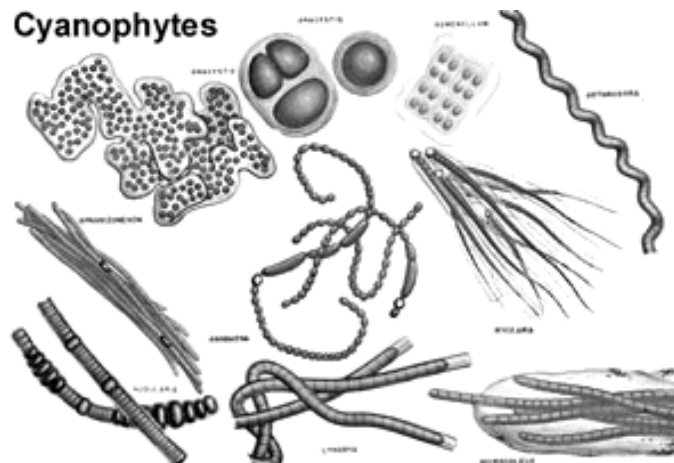


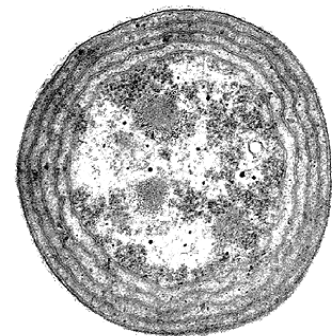
Abbildung 1.2: Morphologie verschiedener Cyanobakterien

Bei filamentösen Formen kann der Durchmesser bis zu 100µm betragen, in der diametralen Ebene jedoch weisen diese nur einen sehr geringen Durchmesser auf. Sie stellen somit kleine Scheiben dar, die sich zu einem langen Faden aneinander reihen. Das Volumen der einzelnen Zelle ist aber trotz des großen Durchmessers in einer Ebene kleiner als das der einzelligen Arten (Demoulin and Janssen, 1981).

Verzweigungen von Filamenten können echt oder unecht sein. Unechte Verzweigungen entstehen aus der Teilung eines Filamentes mit einer Schleimhülle, wobei das neue Filamentstück unabhängig vom Alten wächst, aber mit ihm durch die Schleimhülle verbunden ist. Echte Verzweigungen entstehen, wenn die Zellen des Filaments die Möglichkeit haben, sich in mehr als einer Ebene zu teilen und so Verzweigungen, die direkt mit dem Ausgangsfilament in Kontakt stehen, zu schaffen. Filamentöse Cyanobakterien können wie die coccoidalen Formen als Einzelfäden oder zusammengesprochen als Kolonien auftreten. Arten, die echte Verzweigungen ausbilden, bilden auch Hormogonien. Diese Strukturen wurden von Desikachary als kurze, bewegliche Ketten gleichgeformter Einzelzellen definiert (Desikachary, 1959), wobei nicht alle Hormogonien in dieses Schema passen. Hormogonien spielen eine entscheidende Rolle bei vielen wichtigen physiologischen Prozessen in Cyanobakterien (Tandeau de Marsac, 1994). Im Wesentlichen sind sie modifizierte Filamente, die der Reproduktion und Verbreitung dienen. Gerade in Formen mit Heterocysten sind sie morphologisch einfacher gebaut als andere Filamente, besitzen aber große Vorräte an Stickstoff, Phosphor anderen Nährstoffen (Rippka, 1979).

Das Photosynthese-System der Cyanobakterien liegt typischerweise in der peripheren Region des Cytoplasmas. In einzelligen Formen besteht es meistens aus ein paar Membranschichten, die konzentrisch um die zentrale Region angeordnet sind. In filamentösen Formen sind die Membranen komplizierter angeordnet. Das Membransystem erinnert an einen abgeflachten Saculus und wird Thylakoid genannt.

Abbildung 1.3: Coccoidales Cyanobakterium mit deutlich konzentrisch angeordneten Thylakoidmembranen



In die Lipiddoppelschicht der Thylakoidmembran sind die lipophilen Photosynthesepigmente, wie Chlorophyll a und verschiedene Carotenoide eingebaut. Chlorophyll a ist das einzige Chlorophyll, das Cyanobakterien synthetisieren. Es kommt in drei verschiedenen Unterformen mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima vor. P-Caroten ist anscheinend in allen Cyanobakterienarten anzutreffen, wohingegen das Vorkommen von verschiedenen Xanthophyllen, wie Zeaxanthin, Oscillaxanthin oder Myxoxanthophyll von Art zu Art unterschiedlich ist.

Eine weitere wichtige Rolle im Photosynthesesystem der Cyanobakterien spielen die Phycobilisomen. Sie bestehen aus wasserlöslichen Proteinen, den blauen Biliproteinen c-Phycocyanin und c-Allophycocyanin, und dem roten Biliprotein c-Phycoerythrin. Sie sind als Granula auf den Thylakoidmembranen lokalisiert. Das quantitative Verhältnis dieser Pigmente variiert in den verschiedenen Cyanobakterienarten und verursacht somit unterschiedliche Farben. Die Dominanz von Phycocyanin verleiht den meisten Cyanobakterien ihre bläuliche Farbe und prägte so die Namen „Cyanobakterien“ und „Blualgen“ für diese Organismen.

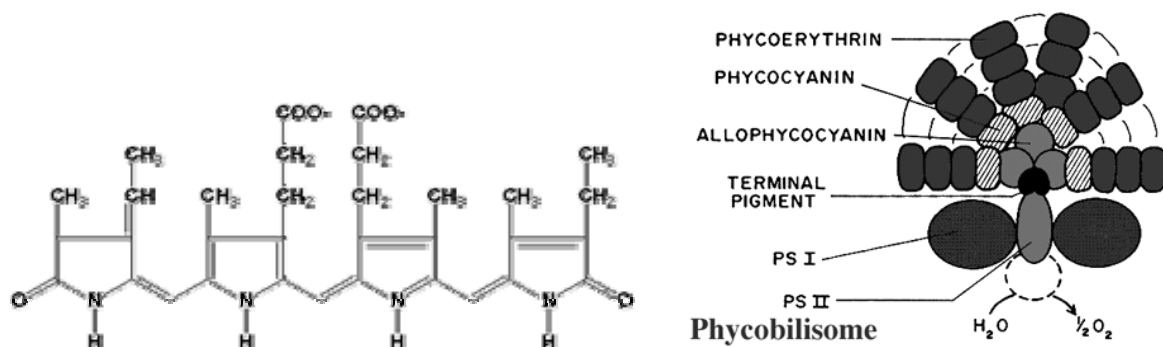


Abbildung 1.4: Aufbau eines Phycobilisoms (rechts); Struktur des Phycocyanins (links)

Akineten sind Zellen, die unter ungünstigen Umweltbedingungen gebildet werden, wobei es von Art zu Art verschieden ist, wie diese Umstände genau aussehen (Whitton, 1992). Typischerweise sind sie sehr viel größer und robuster als die vegetativen Zellen. Ihre Aufgabe ist es, die Art während Austrocknungs- oder Nährstoffmangelphasen zu erhalten, um später wieder vegetative Formen bilden zu können. Sie sind größtenteils auf Spezies mit Heterocysten beschränkt. Sie wurden aber auch in einigen nicht-filamentösen Arten gefunden, wobei nicht bekannt ist, ob diese ebenfalls stickstofffixierende Eigenschaft besitzen.

Cyanobakterien können Stickstoff in Form von Nitrat, Nitrit, Ammonium, Hydroxylamin, Harnstoff, Kasein, Aminosäuren und als elementarem Stickstoff assimilieren. Es ist von Art zu Art sehr unterschiedlich, welche Stickstoffquellen genutzt werden können; alle Cyanobakterienarten können jedoch mit Nitrat als Stickstoffquelle wachsen (Holm-Hansen, 1968). Von großer biologischer Bedeutung ist der Umstand, dass Cyanobakterien elementarem Stickstoff fixieren können (Carr und Whitton, 1982). Der Enzymkomplex Nitrogenase katalysiert hierbei die ATP-verbrauchende Reaktion, bei der elementarer Stickstoff zu zwei Ammonium-Molekülen reduziert wird.

Der Nitrogenase-Enzymkomplex ist extrem sauerstoffempfindlich und kann somit nur unter anaeroben Bedingungen funktionieren. Durch direkten Kontakt mit Sauerstoff wird der Enzymkomplex inaktiviert und es werden sogar begleitende Proteine zerstört (Fay, 1983). Darum findet dieser Vorgang normalerweise in so genannten Heterocysten statt. Dies sind spezialisierte Zellen, die in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen zwischen die vegetativen Zellen eingebaut werden. Sie sind dickwandiger und in ihnen findet keine Photosynthese statt, so dass sie als sauerstofffreier Raum der Stickstofffixierung dienen können (Flores, 1994). Manche Cyanobakterien haben Strategien entwickelt, um Stickstoff auch ohne Heterocysten zu fixieren, über die Mechanismen um hierbei den Nitrogenase-Komplex vor Sauerstoff zu schützen, ist wenig bekannt (Tandeau de Marsac, 1994).

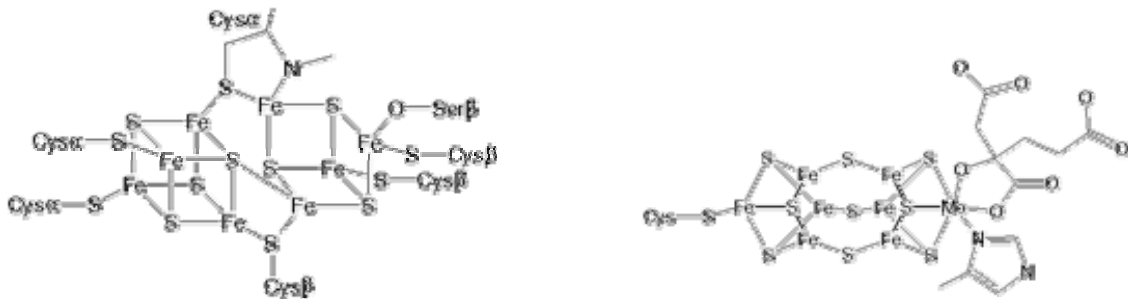


Abbildung 1.5: Der Nitrogenase-Komplex besteht aus zwei Teilen:

rechts: Komponente I [Nitrogenase Molybdän-Eisen (MoFe) Protein, bzw. Dinitrogenase]

links: Komponente II [Nitrogenase Eisen (Fe) Protein, bzw. Dinitrogenase Reduktase]

Heterocysten bilden sich gewöhnlicherweise in Labor-Kulturen erst aus, wenn die Konzentration von Stickstoffquellen im Medium minimalisiert wird (Fogg, 1944; Castenholz and Waterbury, 1989). Diese Beobachtung wird bestätigt durch die Tatsache, dass in vielen Freiland-Untersuchungen Heterocystenbildung nur in sehr stickstoffarmer Umgebung zu beobachten ist.

Viele fädige Cyanobakterien sind fähig, sich fortzubewegen, wenn sie sich in Kontakt zu einem Substrat befinden, auf dem es möglich ist zu gleiten. Die Organismen nutzen diese Fähigkeit einerseits um Zonen optimaler Bestrahlungsstärke in ihrer Umgebung aufzusuchen, aber auch um sich in Form von Hormogonien auf symbiotische Wirte zu zubewegen. Der Mechanismus dieser Fortbewegung ist noch nicht vollständig geklärt, der Stand der Forschung diskutiert zurzeit zwei Hypothesen. Angenommen wird, dass sich das Cyanobakterium durch den Ausstoß von Exopolysacchariden aus bestimmten Poren durch Scherkräfte auf einer Oberfläche bewegen kann (Bold and Wynne, 1985), oder dass es sich durch Kontraktion bestimmter Filamente fortbewegt (Halfen and Castenholz, 1971).

1.4. Symbiosen und die Endosymbiontentheorie

Es bestehen sehr vielseitige symbiotische Interaktionen zwischen bestimmten Cyanobakterienarten und eukaryotischen Organismen. Symbiotisch lebende Cyanobakterien sind größtenteils filamentös, die meisten gehören der Gattung *Nostoc* an. Sie besitzen eine einzigartige Kapazität, sich mit verschiedensten eukaryotischen Wirten, wie Pilzen, Lebermoosen, Schwämmen und höhere Pflanzen, zu verbinden (Fay, 1983). Die symbiotisch vorkommenden Cyanobakterien teilen einige Charakteristika wie das Ausbilden von Hormogonien, die oftmals aufgrund ihrer Fähigkeit zu gleiten, als erste Besiedler des Wirtes dienen. Es konnte nachgewiesen werden, dass manche Pflanzen chemische Botenstoffe produzieren, die die Cyanobakterien zur Bildung von Hormogonien anregt und die die Hormogonien chemotaktisch in das Gewebe der Pflanze locken (Campbell, 1998). Weiterhin bilden sie häufig Heterocysten, da die Fähigkeit zur Stickstofffixierung einen Vorteil für den Wirtsorganismus darstellt. In einigen der Lebensgemeinschaften steuern die Cyanobakterien sogar fast den gesamten Bedarf an Stickstoff und über die Photosynthese reduzierte Kohlenstoff in Form von Kohlenhydraten bei, der für das Wachstum der Wirtszellen nötig ist (Holm-Hansen, 1968). Als weiteren Schritt der Symbiose kann man die Cyanellen ansehen. Diese sind außerhalb der Wirtszelle nicht mehr überlebensfähig. Während Cyanellen weiterhin viele Gemeinsamkeiten mit Cyanobakterien teilen, umfasst ihr Genom dagegen nur noch etwa 5% des Cyanobakteriengenoms. Somit stellen sie das Bindeglied zwischen in Symbiose lebenden Cyanobakterien und den Chloroplasten in Pflanzen dar. Nach der Endosymbiontentheorie entstanden Chloroplasten und Mitochondrien durch eine intrazelluläre Symbiose zwischen einem Wirt und urtümlichen Prokaryoten. Diese Theorie kann heute durch zahlreiche Fakten als gesichert gelten. Die Chloroplasten entstanden hierbei durch Phagocytose von Cyanobakterien, die nach langer Co-Evolution mit der Wirtszelle schließlich bis zum Chloroplasten umgeformt wurden (Strassburger, 2002).

1.5. Lebensräume und Anpassungsmechanismen

Cyanobakterien leben in allen belichteten Ökosystemen. Manche Gattungen und Arten können unter extremen Umweltbedingungen überleben, wie in heißen und kalten Wüsten oder in heißen Quellen von über 70°C. Ihr Vorkommen wurde in Frischwasser, Salzwasser und bei stark alkalischen pH-Werten nachgewiesen; nur bei sehr saueren pH-Werten wurden noch keine Arten entdeckt (Flaibani et al., 1989). Sie wachsen als frei lebende Zellen oder Kolonien in Gewässern, auf Böden, Felsen, Baumrinden und ähnlichem. Sie tolerieren hohe Temperaturen, hohe UV-Strahlen-Belastung, Austrocknung und freie Sulfide. Sie haben die Möglichkeit, auch geringe Lichtintensitäten auszunutzen und können Luftstickstoff fixieren.

Gerade für Cyanobakterien in terrestrischen Lebensräumen spielen Mechanismen gegen Austrocknung durch akutes Wasserdefizit eine Schlüsselrolle. Cyanobakterien-Gemeinschaften in Wüstenlebensräumen tolerieren Austrocknung durch Akkumulation geeigneter Substanzen, welche osmotischen Stress neutralisieren, der durch den hohen Salzgehalt mit zunehmendem Wasserdefizit entsteht. Sie reichern zum Beispiel Trehalose an, ein Disaccharid, um ihren Turgor zu regulieren und die funktionale Einheit ihrer Membranen während einer Austrocknungsphase zu bewahren. Trehalose ersetzt dabei Wasser in den Membranen und bildet Wasserstoffbrücken mit den Phosphatköpfen der Phospholipidmembran (Crowe, 1992). Des Weiteren können Polyhydroxy-Substanzen wie Trehalose Proteine vor der Denaturierung unter extremem Wasserdefizit bewahren, indem sie sich anstatt der Hydrathülle um die Proteine legen. Diese Funktionen werden auch „Wasser-Ersatz-Mechanismus“ genannt (Potts, 1994). Als weitere wichtige Schutzfunktion bilden Cyanobakterien Exopolysaccharide. Sie können auf unterschiedliche Weise zur Stabilisierung der Zellen während lang anhaltender Austrocknungsphasen beitragen. Sie binden die letzten Wasservorräte über einen möglichst langen Zeitraum, verhindern das Verschmelzen der Zellmembranen (Hill, 1997), hemmen Schaden durch oxidativen Stress (Barbosa and Alterthum, 1992) und sie rehydrieren innerhalb von Minuten (Helm, 2000). Exopolysaccharide bieten den Cyanobakterien nicht nur während Austrocknungsphasen Schutz, darüber hinaus verhindern sie den Angriff von Viren oder Bakterien (Tease and Walker, 1987), binden Schwermetalle und Antibiotika und bilden somit eine Barriere gegen toxische Substanzen (Costerton, 1987). Des Weiteren akkumulieren sie Nähr- und Mineralstoffe, um möglichst günstige Umweltbedingungen zum Überleben und Vermehren herzustellen (Sutherland, 1988).

Die Fähigkeit von Cyanobakterien, sich vor exzessiver Sonneneinstrahlung durch Synthese von „Sonnenschutz-Chemikalien“ zu schützen, während sie auch die Möglichkeit besitzen, sich auf Schattensituationen umzustellen, macht sie ausgesprochen geeignet für die Besiedlung von verschiedenen extremen Lebensräumen. Schutz vor intensiver Sonneneinstrahlung und dem damit verbundenem Ausbleichen bietet eine stärkere Pigmentierung, unter anderem mittels Carotinoiden (Potts, 1987; Friedmann 1971). Schutzfunktionen gegen das besonders aggressive UVB-Licht, das nicht nur das Photosynthese-System, sondern auch essentielle Makromoleküle wie die DNA schädigt, bilden spezielle UV-absorbierende Pigmente wie das Scytomenin und Mykosporin-ähnliche Aminosäuren (MAAs) (Garcia-Pichel and Castenholz, 1991; Ehling-Schultz, 1997; Scherer, 1988). Diese Substanzen werden in der Exopolysaccharidschicht der Cyanobakterien akkumuliert. Ein Grund für den Erfolg der Cyanobakterien in sich während der Evolution wandelnden Lebensräumen ist wahrscheinlich ihre lange evolutionäre Geschichte. Bis heute ist eine hohe Toleranz gegenüber sauerstoffarmen Bedingungen bei vielen Cyanobakterien zu beobachten. Manche Arten können eine sehr viel höhere Sulphid-Konzentration vertragen als eukaryotische Algen-Arten (Padan and Cohen, 1982) und einige Cyanobakterien können sogar H_2S als Wasserstoffdonator anstatt Wasser zur Photosynthese verwenden (Cohen et al., 1975). Dies ist eine Eigenschaft, die selbst bei solchen Eukaryoten wie manchen Diatomen-Arten fehlt, die auch sehr hohe H_2S -Konzentrationen tolerieren können.

Cyanobakterien tolerieren extreme Temperaturen. Die maximale Temperatur bei der lebende Cyanobakterien angetroffen wurden, liegt bisher bei $73^{\circ}C$. Hierbei handelte es sich um eine *Synechococcus*-Art in thermalen Quellen im westlichen Nord-Amerika (Castenholz 1978). Im Gegensatz dazu sind Cyanobakterien aber auch die dominante Lebensform in kalten, polaren Lebensräumen wie Eisschollen, Gletschern oder eisbedeckten Seen. Weiterhin spielen sie eine große Rolle im Kohlen- und Stickstoffhaushalt der Böden in Tundren oder Polarregionen (Vincent, 2000). Ihre ubiquitäre Verbreitung auf dem Planeten und ihre Dominanz in heißen und kalten Wüsten ist ein Maß für ihre Unverwüstlichkeit und ihre Anpassungsfähigkeit.

1.6. Panspermie-Theorie und Potential als Pioniere in der Planetenbesiedlung

Als Panspermie bezeichnet man die Theorie, dass sich einfache Lebensformen über große Distanzen durch das Universum bewegen und so die Anfänge des Lebens auf die Erde brachten. Diese Theorie, dass Vorformen der Cyanobakterien durch einen Meteoriten oder den Sonnenwind auf unsere Erde gelangt sind, galt lange als Science Fiction. Nach neuesten Studien kann man diese Theorie aber nicht mehr ausschließen (www.panspermie.adlexikon.de). Britische wie deutsche Forscher konnten beweisen, dass Mikroorganismen den Aufschlag in einem Meteoriten überleben können. Weiterhin konnte während der amerikanischen Mondmission Surveyor 3 gezeigt werden, dass versehentlich auf den Mond gebrachte Bakterien nach der Rückkehr auf die Erde ihren Lebenszyklus fortsetzten. Das Biopan-Experiment des deutschen Luft- und Raumfahrtzentrums zeigt, dass Mikroorganismen im Weltall ohne jedweden Schutz überleben können (www.spiegel.de). Die NASA konnte durch einen Marsorbiter zeigen, dass der Mars vor rund 4000 Millionen Jahren Wasser in Form von Seen und Flüssen sowie eine kohlendioxidreiche Atmosphäre besessen hat. Unter diesen Umweltbedingungen hätte Leben auf dem Mars bestehen können- vor allen Dingen in Form von Cyanobakterien. Durch Abkühlung und Austrocknung wären diese Lebensformen in den nächsten 25000 Millionen Jahren ausgestorben (Carr, 1996). Aufgrund dieser Forschungsergebnisse kann nicht mehr ausgeschlossen werden, dass die ersten Cyanobakterien eventuell ihren Ursprung auf dem Mars oder einem anderen Planeten hatten. Aufgrund ihrer hohen Anpassungsfähigkeit und extremen Robustheit können Cyanobakterien auch unter Umweltbedingungen überleben, die den aktuellen Umweltbedingungen auf dem Mars sehr ähnlich sind, nämlich den antarktischen Wüsten (Vincent, 2000). Darum werden sie zurzeit für eine mögliche Besiedlung des Mars untersucht; insbesondere Chroococcidiopsis-Arten scheinen passende Pioniere abzugeben (Friemann and Ocampo-Friedmann, 1994)

1.7. Wasserblüten und toxische Sekundärstoffe

Toxische cyanobakterielle Wasserblüten sind weltweit anzutreffen, sie können in Seen, Flüssen und Küstengewässern vorkommen. Ihr Auftreten zeigt meistens eine schlechte Wasserqualität an, denn Cyanobakterien vermehren sich am besten in überdüngten, stickstoffreichen Gewässern. Wasserblüten sind gefürchtet durch die toxischen Verbindungen, die von den Cyanobakterien freigesetzt werden können. Durch die bei einer Wasserblüte ausgeschütteten Mengen an Toxinen verenden viele betroffene Tiere, sie stellen jedoch ebenfalls ein Risiko für den Menschen dar (Namikoshi, 1996). Ihre Auswirkung auf Mensch und Tier können neurotoxischer, hepatotoxischer, zytotoxischer oder anderer Natur sein (Crawford and Swoboda, 2000). Im Zuge der Untersuchungen der toxischen Substanzen, die bei einer Wasserblüte freigesetzt werden, konnten eine Reihe von Sekundärmetaboliten mit interessanten chemischen und biologischen Eigenschaften nachgewiesen werden. Diese Metaboliten ergaben wichtige Leitstrukturen zur Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe, Herbizide und Pestizide (Shin, 1996). Somit wurden Cyanobakterien in den letzten Jahre als Quelle für antivirale, algizide, fungizide, zytotoxische, immunmodulatorische und antibakterielle Stoffe entdeckt (Behrens, 1992). Die wichtigsten isolierten Leitstrukturen aus Cyanobakterien gehören zu den Alkaloiden, Peptiden, Nucleosiden und Laktonen. Es lässt sich der Standpunkt vertreten, dass Cyanobakterien die Algen-Gruppe mit dem größten Potential für kommerziell wertvolle Produkte von pharmazeutischem Interesse sind (Cannell, 1993).

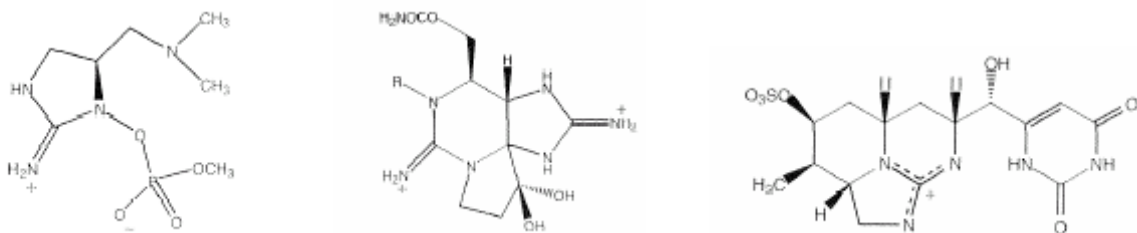


Abbildung 1.6: Anatoxin-a(s), ein Neurotoxin aus *Anabaena flos-aquae* (links),
(Neo-) Saxitoxin, ein Neurotoxin aus *Aphanizaomenon flos-aquae* (Mitte)
und Cylindrospermopsin, ein Hepatotoxin aus *Cylindrospermopsis raciborskii* (rechts)

1.8. Exopolysaccharide

Seit langem ist bekannt, dass Cyanobakterien große Mengen an Polysacchariden bilden können (Drews and Weckesser, 1982). Wie schon in den vorherigen Kapiteln erwähnt, dienen diese Polysaccharide den Cyanobakterien zu verschiedenen Zwecken. Sie spielen eine große Rolle in der Kolonienbildung und Fortbewegungsmöglichkeit durch Gleiten. Des Weiteren sind sie beteiligt an symbiotischen Prozessen, der Anpassung an verschiedene Lebensräume und den Überlebensstrategien bei Austrocknung (Bertocchi, 1990; Morvan, 1997; Painter, 1993; De Philippis and Vincenzini, 1998).

Viele Cyanobakterien sind von einer schleimigen Schicht umgeben, welche Kapsel, Scheide, Schleim oder Glycocalyx genannt wird. Dieses extrazelluläre Material besteht hauptsächlich aus so genannten Exopolysacchariden. Man kann drei Typen von Exopolysacchariden unterscheiden (Li, 2001):

- 1) Die Scheide, eine dünne einheitlich strukturierte Schicht, die direkt auf der äußeren Zellmembran aufliegt und die aus konzentrischen oder radialen Fibrillen besteht
- 2) Die Kapsel (CPS = capsulare polysaccharid), eine unstrukturiertere Zone, die aber noch eng mit der Zelloberfläche verbunden ist
- 3) Der Schleim (RPS = released polysaccharid), der entweder nur locker mit der Zelle assoziiert ist oder gelöst im Nährmedium vorliegt

Die Extraktion der Scheide wird zentrifugiert, nach Homogenisierung der Zellen, durch Saccharose Gradienten vorgenommen (Bertocchi, 1990). Die CPS erhält man durch eine Behandlung des Zellpellets mit warmem Wasser, Puffer oder Natriumchlorid-Lösung (Nakagawa, 1987; Vincenzini, 1990; Plude, 1991). RPS können durch Ethanol-fällung des biomassefreien Nährmediums gewonnen werden. Die meisten Studien beschäftigen sich entweder mit den CPS oder den RPS, da sie leichter zu isolieren sind und in wesentlich größeren Mengen vorhanden sind.

Im Allgemeinen ist zwischen den CPS und den RPS eines Cyanobakteriums kein signifikanter Unterschied in der Monosaccharidzusammensetzung zu beobachten. Dies wurde durch mehrere Arbeiten zu verschiedenen Cyanobakterienarten wie *Anabaena flos-aquae*, *Palmella mucosa* oder *Cyanospira capsulta* belegt (Moore and Tischer, 1964; Vincenzini, 1990; Nicolaus, 1999). Manche Arbeiten zeigten, dass für CPS und RPS die gleichen Monosaccharidbestandteile vorkamen, wenn auch in verschiedener quantitativer Verteilung (Gloaguen, 1995a). Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen CPS und RPS kann angenommen werden, dass es sich bei RPS nur um von der Zelloberfläche abgelöste CPS handelt, darum werden im Weiteren beide unter dem Begriff Exopolysaccharide (EPS) zusammengefasst.

Glucuron- und/oder Galacturonsäure sind in fast allen bisher untersuchten EPS vorhanden. Das EPS von *Microcystis wesenbergii* besteht nur aus Uronsäuren (Forni, 1997). In allen anderen EPS konnten zusätzlich bis zu neun verschiedenen Neutralzuckern nachgewiesen werden. Normalerweise ist Glucose das Hauptmonosaccharid, aber auch Uronsäuren, Xylose, Arabinose, Fucose, Rhamnose und Mannose können in großen Mengen vorhanden sein. Galactose wurde bisher nur in den EPS von *Anabaena sphaerica* als dominanter Zucker nachgewiesen. Weitere Bestandteile von EPS können Ribose, Osamine oder Methylzucker sein. Charakteristische Gruppen sind Pyruvat und Acetat. Es ist bemerkenswert, dass einige EPS ebenfalls Sulphat-Gruppen besitzen, von denen eigentlich angenommen wurde, sie könnten nur von Eukaryonten produziert werden (Sutherland, 1994). Weiterhin wurden in fast allen EPS Proteinanteile gefunden. Bisher konnte noch kein Zusammenhang zwischen der systematischen Einteilung der Cyanobakterien und ihren abgegeben Polysacchariden gefunden werden. Die meisten bisher vorliegenden Studien befassen sich nur mit der Zuckerzusammensetzung der Polysaccharide, strukturelle Daten liegen kaum vor. Dies liegt vor allem an der hohen strukturellen Komplexität der Cyanobakterienpolysaccharide. Es ist noch immer die Frage, ob sie überhaupt eine regelmäßige Struktur besitzen oder nach dem Zufallsprinzip zusammengesetzt werden (Liu, 2003). Strukturelle Untersuchungen von EPS aus *Cyanospira capsulata* konnten eine sich wiederholende Sequenz von acht oder zehn verzweigten Monosacchariden nachweisen (Marra, 1990; Garozzo, 1998). Für die Struktur des EPS von *Nostoc commune* wurde eine 1,4-verknüpfte Xylose-Galaktose Hauptkette mit Ribofuranose und 3-O-[-(R)-1-carboxyethyl-]-D-Glucuronsäure als Seitenketten vorgeschlagen (Helm, 2000). Für die Hauptfraktion des EPS von *Aphanocapsa halophytica* wurde eine Hauptkette aus Glucose, Arabinose, Fucose, Mannose und

Glucuronsäure mit Verzweigungspunkten an der Mannose nachgewiesen, als Seitenketten werden Glucose und Glucuronsäure angenommen (Li, 2001). Für das EPS von *Mastigocladus laminosus* wurde eine sich wiederholende Sequenz von fünfzehn Monosacchariden vorgeschlagen (Gloaguen, 1995b; 1997; 1999).

Wichtige rheologische Eigenschaften der Exopolysaccharide sind die Fähigkeit, stabile Gele zu formen, Suspensionen und Emulsionen zu stabilisieren und die Viskosität von wässrigen Lösungen zu erhöhen (Sutherland, 1996). Sie eignen sich somit zum vielfältigen Einsatz in der Lebensmittelchemie, als Dickungsmittel oder Stabilisator, aber auch in der Pharmazie zur Herstellung von Gelen oder als Stabilisator für Emulsionen und Suspensionen. Umweltechnologisch sind sie einsetzbar zur Klärung von Gewässern durch die Bindung von Schwebstoffen (Fattom and Shilo, 1984) und zur Entfernung von Schwermetallen (Liu and Li 1996).

Darüber hinaus wurden auch pharmakologisch interessante Eigenschaften für einige Polysaccharide aus Cyanobakterien nachgewiesen. Die Exopolysaccharide von *Nostoc commune* beeinflussen das Komplementsystem (Brüll, 2000). Studien an Crotonöl-induzierten Ödemen bei Mäusen belegen eine entzündungshemmende Wirkung für Exopolysaccharide von *Nostoc*- und *Phormidium*-Arten (Garbacki, 2000). Die Endopolysaccharide von *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* und *Chlorella pyrenoidosa* sind potente Stimulatoren des Immunsystems (Efmert, 1991; Pugh, 2001). Des Weiteren sind Daten über die antikoagulative Aktivität des sulphatierten Exopolysaccharids aus *Spirulina platensis* in einigen Studien veröffentlicht worden (Hayakawa and Hayashi, 1996; 1997; 2000).

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Exopolysaccharide von Cyanobakterien ein hohes Potential auch im Bereich der Pharmazie aufweisen. Bisherige Arbeiten am Institut für pharmazeutische Biologie in Kiel etablierten die Anzucht der Cyanobakterien in Batchkulturen, die Isolierung und Anreicherung von Pigmenten sowie toxischer Verbindungen (Volk, 1996, Schulze, 2000) und die Aufklärung der Monosaccharidzusammensetzung von Exopolysacchariden sowie ihrer rheologischen Eigenschaften (Fischer, 1996).

Die vorliegende Arbeit hat nun folgende Zielsetzungen:

- Anzucht der drei Cyanobakterien-Arten *Nostoc insulare*, *Chroococcus minutus* und *Synechocystis aquatilis*
- Isolierung der Exopolysaccharide aus den Nährlösungen
- Strukturelle Untersuchungen der Exopolysaccharide
- Etablierung und Vergleich verschiedener analytischer Verfahren
- Aktivität der Exopolysaccharide in biologischen Testsystemen

2.1. Materialien

2.1.1. Cyanobakterien

Chroococcus minutus (Kützing) Nägeli 41.79

Nostoc insulare Borzi B 54.79

Synechocystis aquatilis Sauvageau B 90.79

Alle Cyanobakterien wurden bezogen von der SAG-Sammlung von Algenkulturen, Universität Göttingen (Schlösser, 1994)

2.1.2. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Lösungsmittel in p.a. Qualität der Firma Sigma verwendet.

Instant Ocean® (Künstliches Meersalz) wurde von der Firma Aquarium Systems, Sarreboerg, Frankreich bezogen.

Die Pullulanstandarts P10-P800 (Shodex®) stammten von der Firma Macherey & Nagel, Düren.

2.1.3. Allgemeine Geräte

Autoklav: Dampfsterilisator VST 40/60 S, Fa. Zirbus

Autotitrator: 719 S Titrino, Fa Metrohm, Herisau Schweiz

Bioblock: Bioblock Scientific CODE 92607, Fa. Thermolyne Corp.

Dialyse-Schläuche: Spectra/Por® 4 Regenerated Cellulose Membrane, Ø 20 mm, MWCO 12.000-14.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.

Material und Methoden

Gefriertrocknung:	BETA 1-8 K, Fa. Christ Freeze Dry System Lyph-Lock 6, Fa. Labconco
Magnetrührer:	RET basic, Fa. IKA Labortechnik Ikamag RH, Fa. IKA Labortechnik
Rotationsverdampfer:	Vaccubrand Membranvakuumpumpe Rotavapor-R, Fa. Büchi
Sterilbank:	antair ZKH, Fa. Mahl
Trockenschrank:	Typ T 6060, Fa. Heraeus Instruments
Ultraschallbad:	Sonorex Super 10P Digital, Fa. Bandelin
Waage:	Satorius Genius
Wasserbad:	HB4 basic, Fa. IKA Labortechnik
Zentrifugen:	Megafuge 1.0, Fa. Heraeus Instruments Ultrazentrifuge Sigma 3K 30, Fa. Sigma CS-15 Centrifuge, Fa. Beckman Biofuge pico, Fa. Heraeus Instruments Durchlaufzentrifuge Sepatech Contifuge 17S Fa. Heraeus Instruments

2.2. Kultivierung

Das Wachstum der Cyanobakterien in einem geschlossenen, statischen System (Batch-Kultur) läuft nach einem festen Schema ab. Nach dem Animpfen beginnt, im Anschluss an eine kurze Anpassungsphase, die exponentielle Wachstumsphase. Hierbei teilen sich die Organismen sehr schnell und die Biomasse im System wächst stetig. Durch die limitierten Nährstoffe, den eingeschränkten Platz, den Lichtmangel durch Selbstbeschattung und die Anhäufung hemmender Ausscheidungsstoffe werden die Cyanobakterien gezwungen, in die stationäre Wachstumsphase überzugehen. In der stationären Phase kommt das Wachstum zum Stillstand. Daher bleibt die Biomasse relativ konstant. Diese Phase kann so lange aufrechterhalten werden, bis die Nährstoffe aufgebraucht sind. Danach beginnen die Organismen durch Nährstoffmangel abzusterben (Sommer, 1998). Die absterbenden Organismen könnten durch Auflösen ihrer Struktur die Exopolysaccharide mit Zellbaustoffen wie Cellulose und Stärke in zunehmender Masse verunreinigen. Darüberhinaus können aus absterbenden Organismen Enzyme freigesetzt werden, durch die es zum enzymatischen Abbau der EPS kommen kann. Darum sollte bei der Kultur der Zeitpunkt zur Abernte so gewählt werden, dass sich im System möglichst wenige abgestorbene Organismen befinden. Des Weiteren muss eine ökonomische Zeitspanne gewählt werden, das heißt ein akzeptabler Zeitaufwand bei einer möglichst hohen Ausbeute an Biomasse und Exopolysacchariden.

Die Wachstumszeit wurde nach einigen Vorversuchen auf 60 Tage festgelegt. Nach dieser Zeitspanne konnte eine zufrieden stellende Menge an Biomasse und an Exopolysacchariden bei einem akzeptablen Zeitaufwand abgeerntet werden. Die Organismen befinden sich nach dieser Zeit am Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Eine erste Abflachung der Kurve zur stationären Phase zeichnet sich in den letzten Werten schon ab. Somit kann eine Verunreinigung der Exopolysaccharide mit Zellbaustoffen auf einem Minimum gehalten werden.

2.2.1 Nährmedium

Als Nährmedium für die photoautotrophen Cyanobakterien diente ein anorganisches Nährmedium nach Pohl (Pohl, 1987) mit Zusatz von 10% Seewasser. Das Nährmedium enthielt folgende Spurenelemente:

MnCl ₂ * 4H ₂ O	50µg/l
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	12,5µg/l
CoSO ₄ * 7H ₂ O	12,5µg/l
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	12,5µg/l
CuSO ₄ * 5H ₂ O	1,25µg/l
FeCl ₃ * 6H ₂ O	0,5mg/l
Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	0,6875mg/l
K ₂ HPO ₄	50mg/l

Als Stickstoffquelle enthielt das Nährmedium KNO₃ 50mg/l

2.2.2 Kultivierungsbedingungen

Die Cyanobakterien wurden unter sterilen Bedingungen in 8L-Batchkulturen nach Pohl unter Dauerbelichtung (60 bis 150µmol Photonen/m²*s), ständiger Belüftung und häufigem Umschütteln gezüchtet. Die Temperierung der Batchkulturen erfolgte in einem klimatisierten Raum bei 27°C.

2.2.3. Wachstumsüberwachung

2.2.3.1. Bestimmung der Biomasse

Aus 8L-Batchkulturen der jeweiligen Cyanobakterien wurden in Abständen von 3-4 Tagen Proben mit einem Volumen von ca. 10ml gezogen. Zum Zeitpunkt der Probennahme wurde der Flüssigkeitsstand mit Hilfe einer am Glas angebrachten Skala bestimmt. Die Proben wurden photometrisch bei 440nm vermessen. Bei einer zu hohen Konzentrierung wurden die Proben mit dem. Wasser verdünnt. Nach einer Kultivierungszeit von 60 Tagen wurden Proben mit einem Volumen von 100ml abgenommen. Die Biomasse dieser Proben wurde bei 4000U/min abzentrifugiert, mit 10ml Aqua dem. gewaschen und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Biomasse wurde gravimetrisch ermittelt. Die gemessenen Werte wurden unter Zuhilfenahme der ermittelten Flüssigkeitsstände in Biomasse/ml-Werte umgerechnet. Weiterhin wurde die Biomasse nach 60 Tagen unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer-improved, Fa. Marienfeld) ausgezählt und die erhaltenen Werte zu den gravimetrisch- und photometrisch-bestimmten Werten in Bezug gesetzt.

2.2.3.2. Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes

Der nach der photometrischen Bestimmung der Biomasse verbleibende Rest der gezogenen Proben wurde bei 5000U/min zentrifugiert. Durch Abdekantieren wurde die Nährlösung von der Biomasse befreit. Im Anschluss wurden 3 Proben à 1ml gezogen und auf den Gehalt an Kohlenhydraten mittels photometrischer Bestimmung nach Dubois (Dubois, 1956) untersucht. Der wahre Gehalt an Kohlenhydraten/ml wurde mit Hilfe der ermittelten Flüssigkeitsstände ausgerechnet.

2.2.4. Aberntung der 8L-Batchkulturen

Nach einer Kultivierungszeit von 60 Tagen wurden die 8L-Batchkulturen mittels einer Durchlaufzentrifuge bei 12000U/min von der Biomasse befreit. Die Biomasse wurde gefriergetrocknet und gravimetrisch bestimmt. Die biomassefreie Nährlösung wurde bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3. Aufreinigung der Exopolysaccharide

2.3.1. Extraktion der Exopolysaccharide aus der Nährlösung

Die von der Biomasse befreite Nährlösung wurde am Rotationsverdampfer bei 35°C unter Vakuum auf ca. 1L eingeengt. Die derart eingeengte Nährlösung wurde in 50ml Portionen aufgeteilt und zur Fällung freier Proteine 10min im Wasserbad auf 94°C erhitzt. Die gefällten Proteine wurden bei 5000U/min abzentrifugiert, der Überstand wurde abdekantiert. Zur Fällung der Exopolysaccharide wurde der Überstand mit einer entsprechende Menge gekühltem Ethanol 96% auf eine Endkonzentration von 80% Ethanol gebracht und eine Stunde bei 4°C gekühlt. Die ausgefallenen Exopolysaccharide wurden bei 5000U/min abzentrifugiert und das Wasser-Ethanol-Gemisch abdekantiert. Anschließend wurden die Exopolysaccharide noch einmal mit Ethanol 96% gewaschen. Die ausgefallten Exopolysaccharide wurden in einer entsprechenden Menge dem. Wasser wieder aufgenommen und für 5 Tage dialysiert (Blaschek, 1991). Zum Abschluss wurde die Lösung gefriergetrocknet.

2.3.2. Gelpermeationschromatographie

Mittels Gelpermeationschromatographie können Moleküle verschiedener Größe voneinander getrennt werden. Das Prinzip der Trennung beruht darauf, dass kleinere Moleküle in den Kavitäten der Säulenmatrix stärker zurückgehalten werden als größere Moleküle. Infolgedessen werden große Moleküle bei geringen Elutionsvolumina, kleinere Moleküle bei höheren Elutionsvolumina von der Säule eluiert. Hierbei ist zu beachten, dass die wahre Größe eines Moleküls nicht nur von seiner Molmasse, sondern auch vom Aufbau des Moleküls abhängig ist. So können stark verzweigte, globuläre Moleküle schlechter in die Kavitäten der Säulenmatrix eindringen als lineare Moleküle und erscheinen somit größer. Moleküle die stark geladen sind, bilden eine große Hydrathülle aus und erscheinen somit größer als ungeladene Moleküle mit kleiner Hydrathülle. Diese Gegebenheiten erschweren die Bestimmung der wahren Molekülgröße. Bestimmt wird mit dieser Methode also nur das hydrodynamische Volumen, welches aufgrund der beschriebenen Einflussfaktoren die Molekülgröße nur annähernd beschreibt (Lecacheux, 1988). Zur Bestimmung müssten Standardsubstanzen mit einer ähnlichen Struktur wie die zu bestimmenden Moleküle verwendet werden, um eine möglichst genaue Bestimmung durchzuführen. Die in diesem Größenbereich zur Verfügung stehenden Pullulane entsprechen aufgrund ihrer linearen Struktur nur ungenügend den Anforderungen. Sie müssen aber mangels Alternativen verwendet werden. Zur Detektion wurde zum einen ein Brechungsindexdetektor, zum anderen ein Multi-Angel-Laser-Light-Scattering-Detektor (MALLS) verwendet. Der MALLS-Detektor misst die Ablenkung von eingestrahlttem Licht, wenn es auf ein Molekül auftrifft. Die Ablenkung des Lichtes ist hierbei abhängig von der Molekülgröße und -form und kann somit zur Berechnung des Molekulargewichts dienen (Danishefsky, 1970). Die Kombination beider Geräte ist sinnvoll, da der Brechungsindexdetektor sensibler auf kleine, der MALLS-Detektor sensibler auf große Moleküle reagiert. Das hydrodynamische Volumen wurde im folgendem mittels einer Kalibriergerade anhand von Pullulanstandards und das Molekulargewicht anhand der Berechnungen des MALLS-Detektors bestimmt.

Säule:	Sephacryl S-400 HR, XK 16/60 Material: hydrophile Dextran-/Bisacrylamid-Matrix; Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden Länge 60cm, Ø 1cm Trennbereich für globuläre Proteine: 20.000 – 8 Mio. Da Trennbereich für Dextrane: 10.000 – 2 Mio. Da Sephacryl prep grade 30 Material: hydrophile Dextran-/Bisacrylamid-Matrix; Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden Länge 60 cm, Ø 1 cm Trennbereich für globuläre Proteine: bis 10.000Da Trennbereich für Dextrane: bis 10.000Da
Pumpe:	HPLC-Pumpe 64 Fa. Knauer, Bad Homburg
Detektoren:	RI-Detektor ERC-7515 A Fa. 000000000Erma, Tokio, Japan Parameter: Range 2, response slow, Temperatur 40°C MALLS-Detektor miniDAWN Fa. Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA
Injektionseinheit:	V7-Valve Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden
Elutionsmittel:	NaCl-Lösung 1,0molar oder Aqua dem.; filtriert und entgast
Filtrationseinheit:	Sartorius; 0,1µm Filter Celluloseacetat-Spritzenfilter, Poren-Ø 0,45µm, Fa. Nalgene
Entgaser:	Ultraschallbad
Software:	ASTRA for Windows 4.70.07 Parameter: $dn/dc = 0,145\text{ml/g}$ [99]

2.3.2.1 Bestimmung des hydrodynamischen Volumens

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Volumens wurde eine Eichreihe mit Pullulanen erstellt. Pullulane werden von dem imperfekten Pilz *Aureobasidium pullulans* gebildet und stellen lineare, unverzweigte Glucane dar, die aus α -1 \rightarrow 6-verknüpften Maltotriose-Einheiten bestehen (Sutherland, 1996). Als Elutionsmittel wurde 1,0molare NaCl-Lösung verwendet, um Aggregatbildung entgegen zu wirken. Die Trennung erfolgte auf einer Sephadex S-400 HR-Säule, da für die EPS eine relativ hohe Molekülgröße angenommen wurde. Die Pullulan-Standards mit definiertem relativen Molekulargewicht wurden mit einer Konzentration von 1g/ml im Elutionsmittel gelöst, durch einen Membranfilter der Porengröße 0,045 μ m filtriert und bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,9ml/min vermessen. Anhand der gemessenen Elutionsvolumina wurde eine Eichkurve erstellt. Die zu vermessenden Polysaccharide wurden wie die Pullulane aufbereitet und vermessen, die erhaltenen Elutionsvolumina wurden anhand der erstellten Eichkurve ausgewertet.

Pullulan-Standard	Molekulargewicht in Da	Elutionsvolumen in ml
P10	12200	104,77
P20	23700	98,86
P100	100000	82,39
P200	186000	74,43
P400	380000	64,09
P800	853000	54,77

Tabelle 2.1: Elutionsvolumen verschiedener Pullulan-Standards zur Erstellung einer Eichkurve

Die erstellte Eichkurve zeigte einen Regressionskoeffizienten von 0,9972.

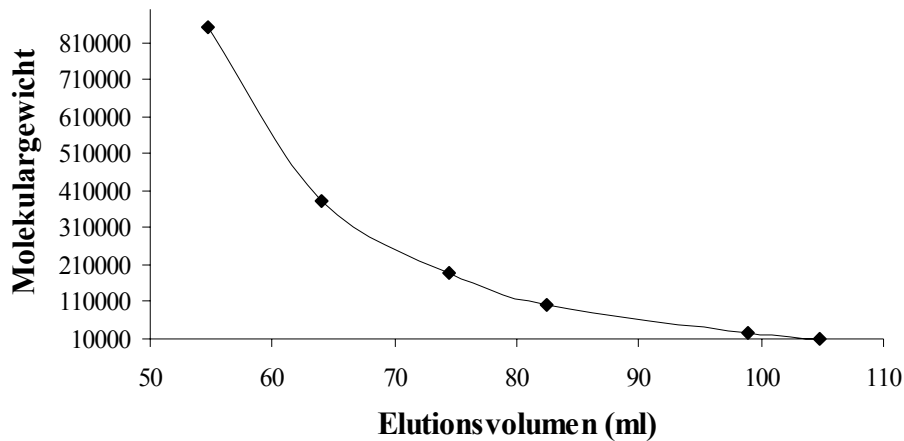


Diagramm 2.1: Eichkurve zur Bestimmung des hydrodynamischen Volumens

2.3.2.2. Fraktionierung von Spaltungsprodukten

Um Spaltungsprodukte hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Größe zu trennen, wurden sie über eine „Sephacryl prep grade 30“-Säulenmatrix mit einem Trennbereich bis ca. 10.000Da gegeben. Die Detektorsignale wurden während der Trennung mitverfolgt und dementsprechend verschiedene Fraktionen aufgefangen. Der Vorgang wurde mehrfach wiederholt, um eine ausreichende Menge an isolierten Spaltungsprodukten zu erhalten.

2.3.3. Ionenaustausch-Chromatographie

Mittels Ionenaustauschchromatographie ist es möglich, Moleküle mit verschiedenem Ladungsgrad voneinander zu trennen. Je nach Säulenmatrix werden positiv oder negativ geladene Moleküle an der Säulenmatrix gebunden. Im Falle eines Mischbett-Austauschers werden beide Ionen-Arten gebunden (Scherz, 1998). Im Folgenden wurde eine Q-Sepharose-Matrix verwendet, welche negative geladene Moleküle bindet. Um die Moleküle wieder von der Säule zu lösen, wird mit NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration gewaschen. Die negativ geladenen Chlorid-Ionen zeigen hierbei eine größere Affinität zu den Bindungsstellen und verdrängen die gebundenen Moleküle. Je nach Ladungsgrad der Moleküle ist die Bindung unterschiedlich stark, so dass leicht gebundene Moleküle mit geringem Ladungsgrad schon bei geringen Salzkonzentrationen von der Säulenmatrix verdrängt werden, Moleküle mit hohem Ladungsgrad aber erst bei hohen Salzkonzentrationen.

Säule:	HiLoad™ 16/10 Q-Sepharose High Performance, Fa. Pharmacia
Pumpe:	Pump P-1, Fa. Pharmacia
Fraktionssammler:	SuperFrac, Fa. Pharmacia
Filtrationseinheit:	Sartorius; 0,1µm Filter Celluloseacetat-Spritzenfilter, Poren-Ø 0,45µm, Fa. Nalgene
Entgaser:	Ultraschallbad

2.3.3.1. Auftrennung des EPS in Fraktionen mit unterschiedlichem Ladungsgrad

Die extrahierten, gefriergetrockneten Polysaccharide wurden mit Aqua dem. zu einer Endkonzentration von ca. 2mg/ml resolvasiert, durch einen 0,45µm Filter gegeben und mittels einer 5ml Dosierschleife auf eine Ionenaustauschersäule aufgebracht. Die Exopolysaccharide wurden mit folgendem Elutionsschema von der Säule eluiert:

50ml Aqua dem.

50ml 0,1molare wässrige NaCl-Lösung

50ml 0,5molare wässrige NaCl-Lösung

50ml 1,0molare wässrige NaCl-Lösung

100ml 2,0molare wässrige NaCl-Lösung

Waschschritte:

50ml 2,0molare wässrige NaCl-Lösung

50ml Aqua dem.

5ml Fraktionen wurden mittels eines Fraktionssammlers aufgefangen und auf Kohlenhydrate durch die photometrische Bestimmung nach Dubois (Dubois, 1956) untersucht. Die kohlenhydrathaltigen Fraktionen wurden aufgefangen, dialysiert und gefriergetrocknet.

2.3.3.2. Auftrennung von Spaltungsprodukten hinsichtlich ihres Ladungsgrad

Um Spaltungsprodukte hinsichtlich ihres Ladungsgrades zu trennen, wurden sie auf eine Ionenaustauschersäule aufgebracht. Ungeladene Spaltungsprodukte wurden zunächst mit 75ml Aqua dem. von der Säule gewaschen. Danach wurden die geladenen Fragmente mit 75ml 2molarer NaCl-Lösung eluiert. Die Säule wurde mit weiteren 50ml 2molarer NaCl-Lösung und 50ml Aqua dem. gewaschen. Mit der Absicht, eine ausreichende Menge Spaltungsprodukte zu erhalten, wurde die Prozedur mehrfach wiederholt.

2.4. Modifikationen

2.4.1. Uronsäurereduktion

Uronsäuren bilden aufgrund ihrer Elektronenstruktur an der 1-Position sehr starke glycosidische Bindungen aus. Daher werden sie bei einer sauren Hydrolyse nicht komplett gespalten, sondern liegen als Aldobiuronsäuren vor, einem Disaccharid aus einer Uronsäure und dem an der 1-Position der Uronsäure glycosidisch gebundenen Zucker (Blaschek, 1991). Damit die Uronsäuren für Bestimmungen mit saurer Hydrolyse zugänglich gemacht werden, wird ihre Carboxylfunktion zu einer einfachen Hydroxylgruppe reduziert. Um in anschließenden Versuchen die Position der Uronsäure noch identifizieren zu können, wird bei der Reduktion deuterierter Wasserstoff verwendet. Die Reduktion wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt: Zum einen mit der im Arbeitskreis etablierten Methode nach Taylor und Conrad (Taylor und Conrad, 1972) und zum anderen mit einer Methode nach Fontaine (Fontaine, 1994). Die Methode nach Taylor und Conrad beruht auf einer Aktivierung der Carboxylfunktion mit einem Carbodiimid; es entsteht eine Lactonstruktur. Die Reduktion erfolgt anschließend mit Natriumbordeuterid. Die Reaktion muss über den ganzen Verlauf bei pH 7 erfolgen, da die aktivierte Form im Basischen wieder zerstört wird, das Reduktionsmittel hingegen im Sauren deaktiviert wird. Aufgrund dieser Problematik läuft die Reduktion nach Taylor und Conrad oft nur unvollständig ab und muss über mehrere Zyklen komplettiert werden (Quintero, 1989). Die Nachteile der Methode sind der hohe Zeitaufwand und die Kosten durch die benötigten Mengen an Natriumbordeuterid. Bei der Methode nach Fontaine handelt es sich um eine schnellere und weniger kostenintensive Methode. Wie auch bei der Methode nach Taylor und Conrad wird zunächst die Carboxylfunktion aktiviert. Dies geschieht durch eine Veresterung mit Diazomethan in einem Dimethylsulfoxid/Methanol-Medium. Die entstandene aktive Verbindung ist sehr viel stabiler als die Lactonstruktur bei Taylor und Conrad; daher kann die anschließende Reduktion in einem Schritt in einem Puffermedium durchgeführt werden. Die Umsetzung der Uronsäuren soll nach Fontaine schon in einem Zyklus vollständig abgelaufen sein. Der hohe apparative Aufwand, sowie der Sicherheitsaufwand stellen die Nachteile dieser Methode dar. Weil Diazomethan ein hohes kanzerogenes Potential aufweist, muss es in einem dicht verschlossenen Spezialreaktor hergestellt werden. Die Reaktion muss unter Explosionsschutz und bei 15°C durchgeführt werden; daher wurde eine spezielle wasserbetriebene, kühlbare Röhreinheit konstruiert (Bock, 2004).

2.4.1.1. Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad

Durchführung:

Ca. 10mg Polysaccharid wurden in 20ml Aqua dem. gelöst. Der Autotitrator wurde mit 0,01molarer HCl befüllt und mit Pufferlösungen mit pH 7 und pH 4 kalibriert. Die Messelektrode und der Dosierer wurden so angebracht, dass beide in die Lösung eintauchten. Anschließend wurde 216mg N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat unter Rühren zugefügt. Die Einstellung des Autotitrators erfolgte dergestalt, dass der pH-Wert der Lösung 4h durch Titration mit 0,01molarer HCl konstant auf 4,75 gehalten wurde. Nach den 4h Reaktionszeit wurden 1-2 Tropfen Octanol zugefügt, um eventuelles Schäumen während der Reduktion zu verhindern. Der Autotitrator wurde mit 2molarer HCl befüllt. Unter Rühren wurden 4ml 1molarer; 5ml 2molarer und 5ml 4molarer wässriger NaBD₄-Lösung vorsichtig zugegeben. Hierbei wurde der pH-Wert durch Titration mit 2 molarer HCl 4h auf 7,0 gehalten. Abschließend wurde die Lösung durch Zugabe von Eisessig auf pH 6,5 gebracht. Die Lösung wurde dialysiert und gefriergetrocknet. Der gesamte Vorgang wurde noch mindestens einmal wiederholt, um möglichst alle Uronsäuren zu reduzieren.

2.4.2.2. Uronsäurereduktion nach Fontaine

Durchführung:

10mg Exopolysaccharid wurden in das äußere Gefäß des Diazomethan-Generators eingewogen und in 5ml DMSO und 0,5ml Methanol gelöst. 200mg MNNG wurden in das innere Gefäß des Diazomethan-Generators eingewogen und 400µl Aqua dem. zugefügt. Der Generator wurde verschlossen und in einen patentierten wasserbetriebenen Magnetrührer eingebaut. Das Wasser des Magnetrührers wurde auf 15°C abgekühlt. Mittels einer Hamiltonspritze wurden 450µl NaOH 5N durch das Septum tropfenweise zugegeben (ca. 450µl / 30min). Nachdem sämtliche Natronlauge zugefügt wurde, konnte die Reaktion über weitere 1,5h stattfinden. Die erhaltene Lösung wurde dialysiert und gefriergetrocknet. Das erhaltene Produkt wurde in Imidazol/HCl-Puffer gelöst (5mg / 1ml). Die Lösung wurde in einem Eisbad gekühlt, 1-2 Tropfen Octanol wurden zugesetzt. Zur Reduktion wurden 200mg NaBD₄ zugesetzt und 2h bei 0°C gerührt. Um überschüssiges NaBD₄ zu entfernen, wurde die Lösung mit Eisessig auf pH 6 eingestellt. Anschließend wurde die erhaltene Lösung dialysiert und gefriergetrocknet.

2.4.3. Lithiumdegradation nach Lau

Metallisches, in Ethylendiamin gelöstes Lithium ist fähig, Polysaccharide in definierte Oligosaccharide zu spalten (Mort und Bauer, 1982; Lau, 1984). Es greift hierbei die Uronsäuren des Polysaccharides an und spaltet es unter Degradation der Uronsäuren. Die Uronsäure erfährt dabei je nach Bindungstyp entweder eine Reduktion mit anschließender Ringkontraktion oder sie wird zerstört. Bei der Ringkontraktion, die wahrscheinlich nur bei 1,3,4-verknüpften Uronsäuren einsetzt, entsteht eine Tetrahydroxycyclopentansäure (Gloaguen, 1999). Hierbei wird die glycosidische Bindung am C1 der Uronsäure gespalten. Für anders gebundene Uronsäuren liegen noch keine Degradationsmechanismen vor. Die Degradations-Reaktion ist aber allgemein unabhängig von der Bindung der Uronsäuren und von den umgebenden Zuckern. Es entstehen Oligosaccharide, die den Sequenzen zwischen zwei Uronsäuren entsprechen. Darüber hinaus können Methylether gespalten werden und auch Pyruvat- und Acetatgruppen werden entfernt (Monneret, 1974). Glycosidische Bindungen werden nicht angegriffen, somit finden keine weiteren degradativen Prozesse außer an den Positionen der Uronsäuren statt (Lau, 1984 und 1987).

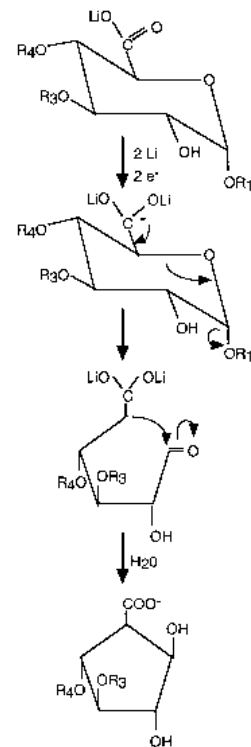


Abbildung 2.1: Reaktionsmechanismus der Ringkontraktion nach Gloaguen

Durchführung:

Es werden ca. 10mg Exopolysaccharid in ein verschraubbares Reagenzglas eingewogen. 1ml Ethylendiamin pro 5mg EPS wurden zugefügt und evtl. im Ultraschallbad gelöst. Unter ständigem Rühren wurden Lithium Stückchen zugegeben bis die Lösung eine blaue Färbung annahm. Die blaue Farbe wurde durch die Zugabe weiterer Lithium Stückchen über 2h erhalten. Danach wurde die Probe in einem Eisbad gekühlt und unter langsamen Rühren 5ml Aqua dem. zugefügt. Die erhaltene Lösung wurde in einen 50ml Spitzkolben überführt, 25ml Toluol zugefügt und am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 35°C zur Trockne einrotiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Der Rückstand wurde in 5ml Aqua dem. wieder aufgenommen und mit Essigsäure auf pH 6 eingestellt. Zur Entfernung der Lithiumionen wurde die Lösung über einen Amberlite Kationen-Austauscher gegeben.

2.4.4. Desulfatierung nach Alban

Um Sulfatgruppen ohne Degradation des Polysaccharids zu entfernen, wird eine Desulfatierung nach Alban durchgeführt (Alban, 1993). Die Sulfatgruppen werden zunächst an einem Ionenaustauscher in ihre freie Säure überführt und anschließend mit Pyridin in ihr Pyridiniumsalz umgesetzt. Die so aktivierten Sulfatgruppen werden durch eine DMF/Wasser-Mischung unter Erwärmung abgespalten.

Durchführung:

Ca. 10mg EPS wurden in 5ml Aqua dem. gelöst, über einen Amberlite Kationen-Austauscher gegeben und anschließend mit Pyridin auf pH 7 eingestellt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 35°C zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde in 1ml Aqua dem. aufgenommen und in ein Pyrexglas überführt. Nach Zugabe von 9ml DMF wurde das EPS im Bioblock über 24h bei 90°C desulfatiert. Die erhaltene Lösung wurde dialysiert und gefriergetrocknet.

2.4.5 Alkalimodifikation nach Craigie und Leigh

Die Alkalimodifikation ist eine etablierte Methode in der Strukturaufklärung von Carrageenanen und Agar (Rees, 1963). Durch das Erhitzen der Polysaccharide in einem basischen und reduzierenden Milieu werden Sulfatgruppen an der 3- oder 6-Position einer Hexose abgespalten; die Hexose wird zu ihrem Anhydrozucker reduziert. Des Weiteren werden im alkalischen Milieu Pyruvat- und Acetatgruppen vom Polysaccharid abgespalten. Die Methode wurde durchgeführt nach Craigie und Leigh (Craigie und Leigh, 1978).

Durchführung:

Ca 10mg PS werden in ein verschraubbares Reagenzglas eingewogen und 2ml Wasser dem. zugefügt. Es wurden 2mg NaBH₄ zugegeben und über Nacht gerührt. Anschließend wurden weitere 6mg NaBH₄ und 1ml NaOH 3M zugegeben und bis zur Lösung gerührt. Die erhaltene Lösung wurde 7h bei 80°C im Bioblock erhitzt. Zur Dialyse wurde die Lösung mit Aqua dem. auf 20ml verdünnt, dialysiert und gefriergetrocknet.

2.4.6. Oxalsäurehydrolyse

Die Hydrolyse mit Oxalsäure wird durchgeführt, um labilere glycosidische Bindungen zu spalten. Es entstehen Poly-, Oligo- und Monosaccharide, die weiteren Aufschluß über die Struktur des Gesamtpolysaccharids liefern. Zu den labileren glycosidischen Bindungen zählen vor allem Bindungen mit Pentosen. Etwas stabilere Bindungen bilden Desoxyhexosen (Adams, 1965). Das Polysaccharid wird also an den Stellen gespalten, wo Pentosen und Desoxyhexosen an der glycosidischen Bindung beteiligt sind. Diese Reaktion läuft unter den gewählten Bedingungen nicht quantitativ ab und einige Pentosen und Desoxyhexosen liegen auch nach der Oxalsäurehydrolyse noch gebunden vor. Es entstehen unterschiedliche Poly-, Oligo- und Monosaccharide, die durch eine Ethanol-fällung aufgrund ihrer Größe in Ethanol fällbare oder nicht fällbare Fraktionen getrennt werden können. Die Oxalsäurehydrolyse wurde durchgeführt in Anlehnung an die Methode nach Gleeson und Clarke (Gleeson und Clarke, 1979).

Durchführung:

Ca. 20mg der Proben wurden in ein Pyrex-Glas eingewogen und 3ml 12,5mM Oxalsäure zugesetzt. Die Proben wurden 15min im Ultraschallbad gelöst und anschließend 5h im Heizblock bei 100°C hydrolysiert. Um unlösliche Reste zu entfernen, wurden die Proben 5min bei 6000U zentrifugiert. Der Überstand wurde in 12ml kalten Ethanol 96% gegossen, so dass eine Ethanol-Endkonzentration von 80% entstand. Die Fällung wurde über Nacht im Kühlschrank vervollständigt. Am folgenden Tag wurde bei 6°C und 20000g für 10min abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 4 ml 80% Ethanol gewaschen. Die Überstände wurden mit den Waschlösungen vereinigt und zur Trockne einrotiert, der Rückstand mit 1ml Aqua bidest. aufgenommen und gefriergetrocknet.

2.5. Analytische Methoden

2.5.1. Photometrische Methoden

2.5.1.1. Kohlenhydratgehalt nach Dubois

Der Kohlenhydratanteil wurde bestimmt anhand des Phenol-Schwefelsäure-Tests nach Dubois (Dubois, 1956). Mono-, Oligo- und Polysaccharide reagieren mit Phenol und konzentrierter Schwefelsäure zu einer farbigen Substanz mit einem Absorptionsmaximum zwischen 480nm und 490nm. Die Etherbrücken der glykosidischen Bindungen der Oligo- und Polysaccharide werden hierbei zunächst mittels saurer Hydrolyse gespalten. Parallel werden die Zuckermoleküle dehydriert. Dabei entstehen Furfuralderivate. Diese kondensieren mit zwei Phenolmolekülen zu einem orange-rotem Triarylmethanderivat. Je nachdem, welcher Zucker an der Reaktion beteiligt ist, verschiebt sich das Absorptionmaximum leicht; es liegt für Pentosen, Methylpentosen und Uronsäuren bei 480nm und für Hexosen bei 490nm.

Durchführung:

Es wurde 1ml Eps-haltige Lösung in ein Reagenzglas pipettiert. Danach wurde 1ml 5%ige wässrige Phenollösung sowie 5ml konzentrierte Schwefelsäure zugefügt und auf einem Vortex-Gerät vermischt. Die Reaktionszeit betrug 10min bei Raumtemperatur und 20min bei 30°C in einem Wasserbad. Die Lösung wurde innerhalb der nächsten Stunde bei 490nm (Hexosen) und 480nm (Pentosen und Uronsäuren) photometrisch gegen einen Blindwert vermessen. Als Blindwert diente reine Nährlösung oder Aqua dem., welche ebenso wie die Proben behandelt wurden. Die Auswertung erfolgte anhand von Kalibriergeraden, die mittels einer Verdünnungsreihe aus einem 1:1 Gemisch von Arabinose:Glucose erstellt wurden.

Arabinose:Glucose $\mu\text{g/ml}$	480nm	490nm
10	0,098	0,09
20	0,205	0,197
30	0,289	0,29
40	0,358	0,377
50	0,533	0,496
60	0,622	0,565
70	0,677	0,625
80	0,798	0,742
90	0,835	0,79

Tabelle 2.2: Absorptionswerte verschiedener Arabinose:Glucose-Verdünnungen zur Erstellung einer Kalibriergerade

Die daraus erstellte Kalibriergerade zeigt für die Messung bei 480nm einen linearen Regressionskoeffizienten von 0,9883 mit der Geradengleichung $y=0,0096x-0,01$ und für die Messung bei 490nm einen linearen Regressionskoeffizienten von 0,9941 mit der Geradengleichung $y=0,0088x+0,0225$.

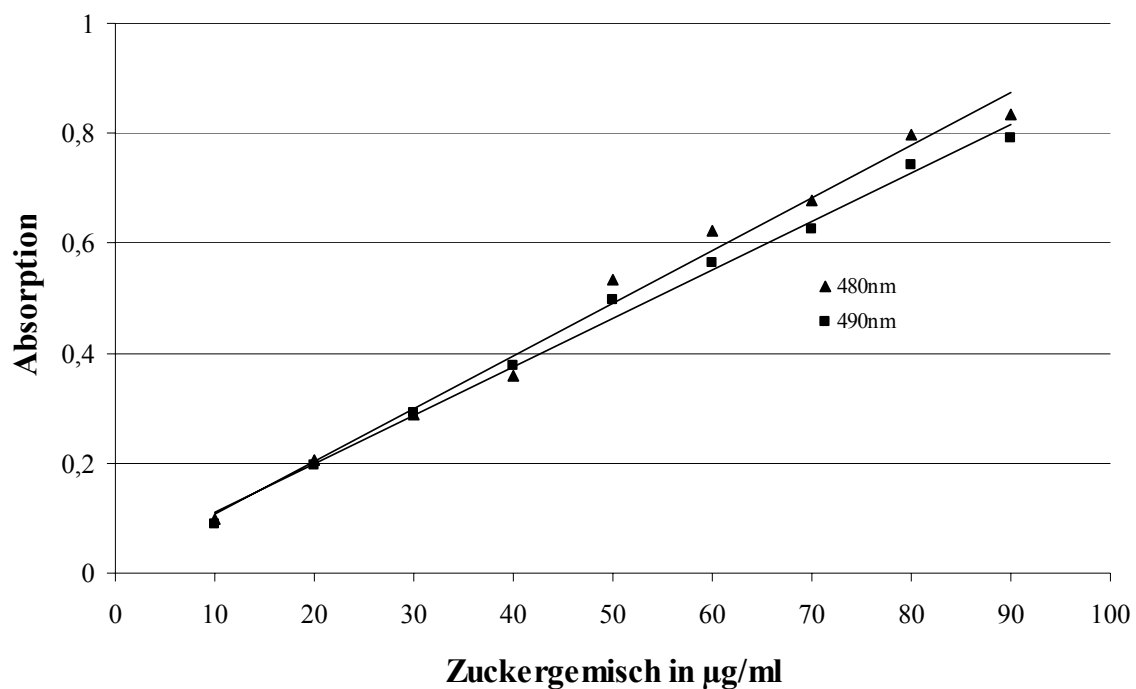


Diagramm 2.2: Kalibriergerade zur Kohlenhydratbestimmung bei 480nm und 490nm

2.5.1.2. Uronsäuregehalt nach Blumenkrantz

Der Uronsäuregehalt wurde quantitativ mit der photometrischen Methode nach Blumenkrantz ermittelt (Blumenkrantz und Asboe-Hansen, 1973). Hierzu werden die Uronsäuren mittels saurer Hydrolyse freigesetzt, mit Borax aktiviert und anschließend mit 3-Hydroxydiphenyl zu einem farbigen Produkt umgesetzt. Die Methode nach Blumenkrantz ist spezifisch für Uronsäuren. Neutralzucker stören den Nachweis erst ab 50µg (Scherz, 1998), somit ist die Methode wesentlich selektiver als beispielsweise die Umsetzung mit Carbozol (Dische, 1947) oder Anthron (Helbert, 1956), bei denen Neutralzucker schon in geringen Mengen zu falsch positiven Werten führen. Als nachteilig bei der angewendeten Methode erweist sich, dass die Uronsäuren nicht qualitativ von einander unterschieden werden können.

Durchführung:

Es wurde eine Eichreihe anhand eines 1:1 Gemisches aus Glucuron- und Galacturonsäure erstellt. Dazu wurden definierte Mengen des Uronsäuregemisches in konz. Schwefelsäure gelöst und 1h bei 121°C hydrolysiert. Anschließend wurde den Proben ein Gemisch aus Borax und konz. Schwefelsäure zugesetzt und 5min bei 100° im Wasserbad erwärmt. Nach Abkühlung im Eisbad wurde 3-Hydroxydiphenyl in NaOH zugesetzt. Unter den gleichen Bedingungen wurde ein Blindwert erstellt, jedoch wurde kein 3-Hydroxydiphenyl zugesetzt. Die Proben wurden gegen den Blindwert bei 520nm vermessen und eine Eichreihe erstellt. Die zu bestimmenden Polysaccharid-Proben wurden nun unter den gleichen Bedingungen vermessen und der Uronsäuregehalt anhand der Kalibriergeraden bestimmt.

Uronsäuren in μg	Absorption
1	0,056
2	0,114
4	0,267
6	0,387
8	0,517
10	0,607
12	0,766

Tabelle 2.3: Absorptionswerte verschiedener Uronsäurekonzentrationen eines 1:1 Glucuronsäure:Galacturonsäure-Gemisches zur Erstellung einer Kalibriergerade

Die daraus erstellte Kalibriergerade zeigt einen linearen Regressionskoeffizienten von 0,9968.

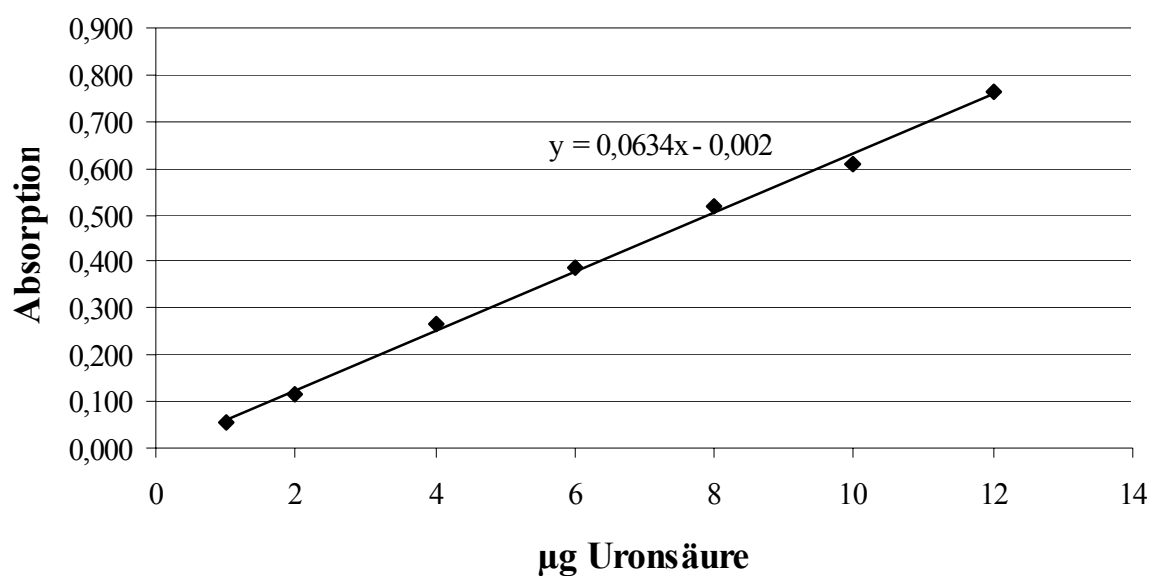


Diagramm 2.3: Kalibriergerade zur Uronsäurebestimmung bei 520nm

2.5.1.3. Bestimmung des Pyruvatgehalts

Pyruvatsubstituenten bilden mit dem Zucker, mit dem sie verknüpft sind, häufig einen zweiten Ringschluss. Dabei reagiert das Pyruvat mit zwei Hydroxylgruppen des Zuckermoleküls und bildet dabei eine Brücke mit einer freien Methyl- und Carboxylgruppe, eine 1-Carboxyethylene-Funktion (Hirase, 1957; Gorin und Ishikawa, 1967). Bei einer Hydrolyse kann der beteiligte Zucker zu einem Anhydro-Zucker oder weiter zu einer Ketosäure degradiert werden (Percival und McDowell, 1990).

Die Bestimmung des Pyruvatgehaltes wurde mit zwei verschiedenen photometrischen Methoden durchgeführt. Zum einem nach Sloenecker mittels einer Farbreaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin und mit der enzymatischen Reaktion nach Hirase, bei der photometrisch der Umsatz von NADH bestimmt wird. Bei der Farbreaktion nach Sloenecker (Sloenecker, 1962) wird das nach Hydrolyse freigesetzte Pyruvat mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin über die Hydrazingruppe gekoppelt. Im Alkalischen vertieft sich die Farbe durch Ausbildung einer chinoiden Elektronenstruktur. Diese Reaktion ist nicht nur für Pyruvatgruppen spezifisch, es können auch andere Ketosäuren reagieren. Somit kann eine falsch positive Reaktion durch degradierte Anhydrozucker oder andere Strukturen nicht ausgeschlossen werden (Duckworth and Yaphe, 1970). Vorteil dieser Methode ist jedoch der geringe Kostenaufwand. Die Methode nach Hirase (Hirase, 1972) ist wesentlich spezifischer, aber kostenaufwendiger. Sie beruht auf der Tatsache, dass Pyruvat durch die Lactathydrogenase zu Lactat umgesetzt wird. Der hierfür benötigte Wasserstoff wird einer definierten Menge NADH entzogen, dies wiederum lässt sich photometrisch verfolgen.

2.5.1.3.1. Pyruvatgehalt nach Sloenecker

Durchführung:

Ca. 1-5mg Polysaccharid wurden in 5ml HCl 1N gelöst und 3h bei 100°C hydrolysiert. Je 2ml der Lösung wurden in ein neues Pyrex-Glas überführt. Folgende Schritte wurden mit jeder Probe einzeln, nacheinander durchgeführt: Es wurde 1ml DNPH-Reagenz zugeben, gevortext und die Reaktion für 5min fortgesetzt. Anschließend wurden der Lösung 5ml Ethylacetat zugesetzt. Die gesamte Lösung wurde in einen Scheidetrichter überführt und die Wasserphase verworfen. Die Ethylacetatphase wurde dreimal mit 5ml Natriumcarbonatlösung ausgeschüttelt, die Natriumcarbonatphasen in einem 25ml Meßkolben vereinigt und auf 25ml mit Natriumcarbonatlösung verdünnt. Im Anschluss daran wurde die Lösung in einer Quarzküvette bei 375nm im Photometer vermessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibriergerade, die mit Pyruvatsäure unter gleichen Bedingungen erstellt wurde.

Pyruvatsäure µg/ml	Absorption
10,0	0,378
15,0	0,417
20,0	0,495
25,0	0,615
30,0	0,756
35,0	0,847

Tabelle 2.4: Absorptionswerte bei 375nm verschiedener Pyruvatkonzentrationen zur Erstellung einer Kalibriergerade nach Sloenecker

Die daraus erstellte Kalibriergerade zeigt einen linearen Regressionskoeffizienten von 0,9734.

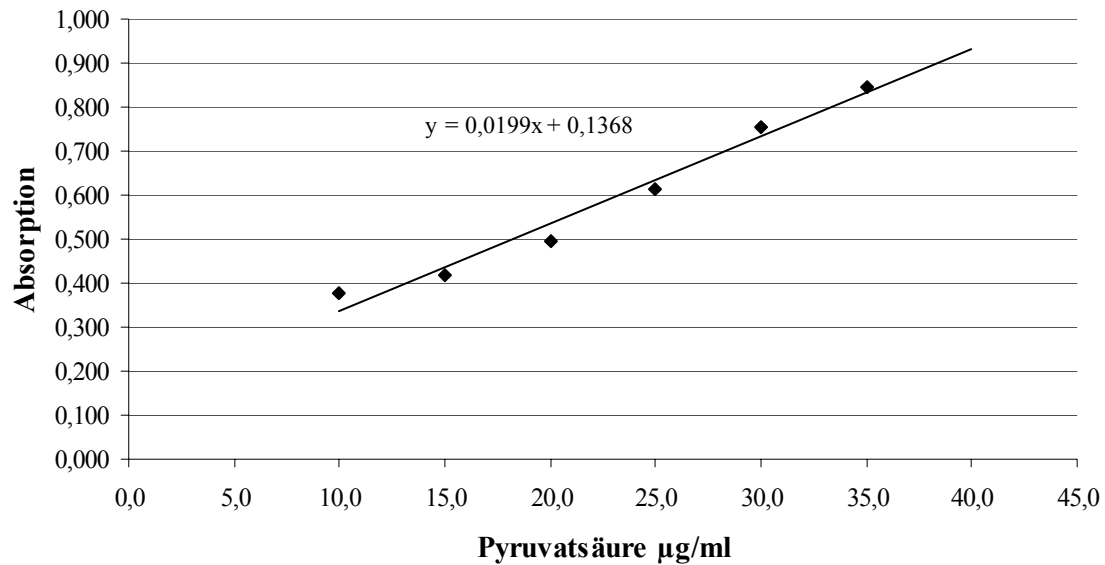


Diagramm 2.4: Kalibriergerade Pyruvatbestimmung nach Sloenecker

2.5.1.3.2. Pyruvatgehalt nach Hirase

Durchführung:

Es wurden 3-5mg Polysaccharid eingewogen und in 3ml Oxalsäure 0,04N gelöst. Die Lösung wurde 4h bei 100°C hydrolysiert. Der pH-Wert der Lösung wurde bestimmt und mit einer gesättigten Calciumcarbonatlösung auf pH7 neutralisiert. Die neutrale Lösung wurde in einen 10ml Weithals-Meßkolben filtriert und mit Aqua dem. auf 10ml verdünnt. 2ml der Lösung wurden in eine Quarzküvette abgenommen und 1ml Triethanolamin 0,3M und 300 μl NADH-Lösung zugefügt. Die Küvette wurde anschließend mit einem Küvettendeckelchen verschlossen und geschüttelt. Die Initial-Absorption wurden dann bei 340nm ablesen und 20 μl Lactatdehydrogenase zugefügt, kurz geschüttelt und die Absorptionsänderung bei 340nm beobachtet, bis der Wert konstant blieb. Dieser Wert entspricht der End-Absorption. Die Kalibriergerade wurde erstellt aus der Differenz der Endabsorption mit der Initialabsorption gegen die Pyruvatkonzentration.

Pyruvatsäure in µg/ml	Initialabsorption	Endabsorption	Endabsorption-Initialabsorption
10,0	0,000	0,169	0,169
15,0	0,005	0,259	0,254
20,0	0,002	0,353	0,351
30,0	0,018	0,480	0,462

Tabelle 2.5: Absorptionswerte bei 340nm verschiedener Pyruvatkonzentrationen zur Erstellung einer Kalibriergerade nach Hirase

Die daraus erstellte Kalibriergerade zeigt einen linearen Regressionskoeffizienten von 0,9824.

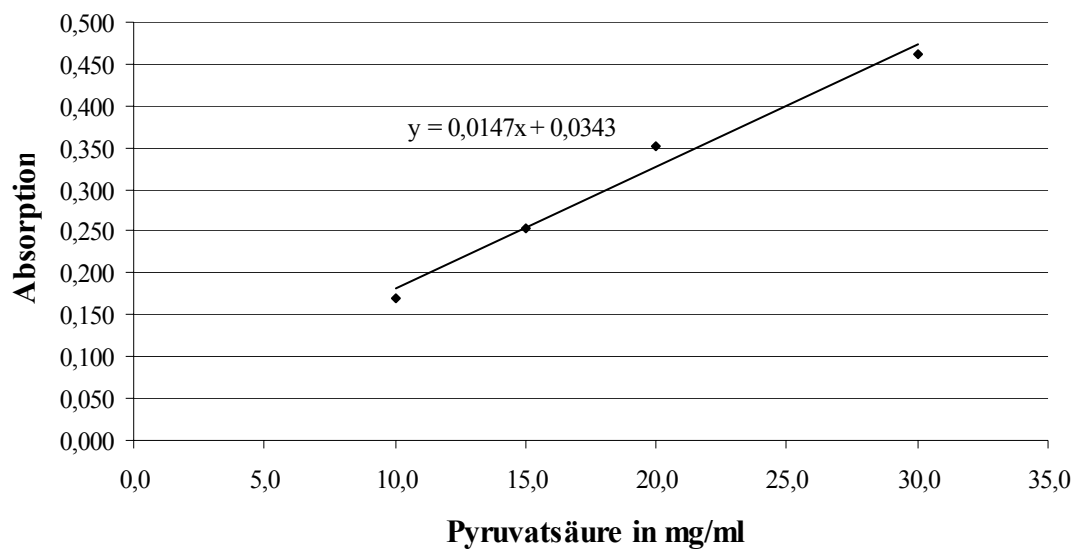


Diagramm 2.5: Kalibriergerade Pyruvatbestimmung nach Hirase

2.5.1.4. Bestimmung des Acetatgehalts

Der Acetatgehalt wurde photometrisch durch Bildung von Acetohydroxamsäure bestimmt (McComb und McCready, 1957). Die Verseifung der Acetylgruppen und Bildung der Hydroxamsäure erfolgte in einem Reaktionsschritt. Anschließend erfolgte eine Farbvertiefung durch Oxidation mittels Eisen(III)-chloridlösung. Die entstandene Acetohydroxamsäure kann bei 520nm vermessen werden.

Durchführung

Es wurden ca. 2mg Polysaccharid eingewogen und in 2ml Aqua dem. gelöst. Eine Standardreihe mit α -D-Glucosepentaacetat wurde erstellt und mit Aqua dem. auf 2ml verdünnt. Eine 1:1 Mischung aus einer 3,75%igen wässrigen Hydroxylammoniumchlorid-Lösung und einer 9,4%igen Natronlauge wurde erstellt und 800 μ l dieser Mischung den Proben zugesetzt. Nach einer 5minütigen Inkubation wurde die Reaktion mit 2ml einer methanolischen Perchlorsäure (35,2ml HClO₄ 70% ad 500ml Methanol) gestoppt. Nach 5 Minuten wurde langsam eine methanolische Eisen(III)-chloridlösung (1,158g FeCl₃ * 6 H₂O in 60ml Aqua dem. ad 500ml Methanol) zugegeben, bis ein Gesamtvolumen von 10ml erreicht war. Die Lösungen wurden gegen einen Blindwert bei 520nm vermessen.

Acetylgruppen in mmol	Absorption
0,001	0,081
0,002	0,19
0,003	0,279
0,004	0,38
0,005	0,48
0,006	0,555
0,007	0,629

Tabelle 2.6: Absorptionswerte bei 520nm verschiedener Acetatkonzentrationen zur Erstellung einer Kalibriergerade

Die daraus erstellte Kalibriergerade zeigt einen linearen Regressionskoeffizienten von 0,9962.

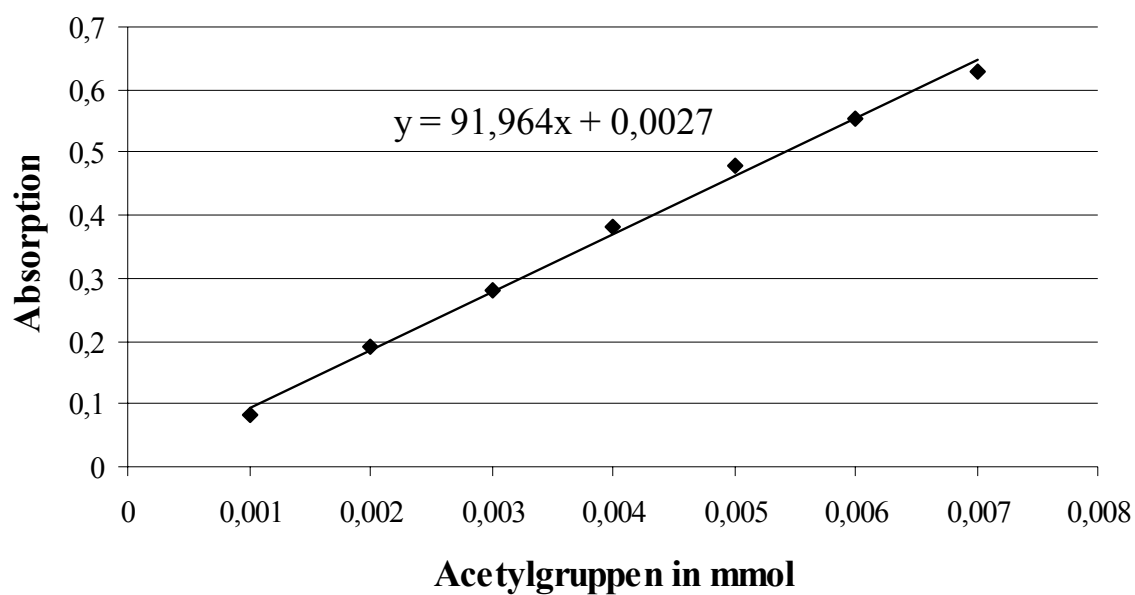


Diagramm 2.6: Kalibriergerade bei 520nm zur Acetatbestimmung

2.5.1.5. Sulfatgehalt nach Craigie

Der Sulfatgehalt wurde photometrisch nach Craigie (Craigie, 1984) bestimmt. Die Sulfatgruppen werden durch eine saure Hydrolyse freigesetzt. Durch Zugabe von Bariumchlorid wird das Sulfat als schwerlösliches Bariumsulfat gefällt. Die Suspension wird durch eine Viskositätserhöhung mittels Gelatine stabilisiert und photometrisch hinsichtlich ihres Trübungsgrades bei 550nm vermessen. Da auch einige andere Anionen mit Barium schwerlösliche Salze bilden und dadurch falsch positive Ergebnisse vortäuschen können, sollte der ermittelte Sulfatgehalt durch weitere Methoden verifiziert werden.

Durchführung:

Ca. 20mg Probe wurden in Reactivials mit 2ml Salzsäure 2N über 2h bei 100°C zur vollständigen Freisetzung der Sulfatgruppen hydrolysiert. Die Proben wurden in 10ml Meßkolben überführt und mit Aqua dem. auf 10ml verdünnt. 2ml dieser Lösung wurde abgenommen und in einem 25ml Meßkolben mit 18ml Aqua. dem und 2ml Salzsäure 0,5 N gemischt. Dieser Mischung wurde 1ml eines Bariumchlorid-Gelatine-Reagenz zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30min wurde die Lösung im Photometer bei 550nm vermessen. Die Auswertung erfolgte über eine mit Kaliumsulfat erstellte Kalibriergerade.

Schwefelgehalt in $\mu\text{g/ml}$	Absorption
5	0,153
10	0,309
15	0,442
20	0,578
25	0,684
30	0,801

Tabelle 2.7: Absorptionswerte bei 550nm verschiedener Schwefelkonzentrationen zur Erstellung einer Kalibriergerade

Die daraus erstellte Kalibriergerade zeigt einen linearen Regressionskoeffizienten von 0,9959.

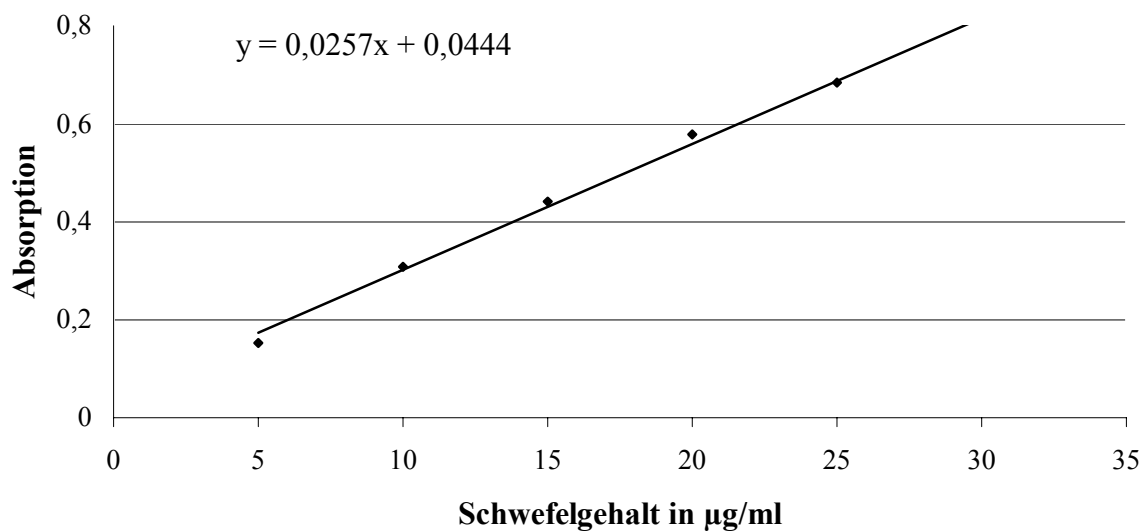


Diagramm 2.7: Kalibriergerade bei 550nm zur Sulfatbestimmung

2.5.2 Chromatographische und Spektroskopische Verfahren

2.5.2.1. Qualitative und quantitative Monosaccharidanalyse per GLC

2.5.2.1.1. Neutralzuckeranalyse nach Blakeney

Zur Bestimmung der Neutralzucker-Zusammensetzung der Exopolysaccharide wurde eine Acetylierungsanalyse nach Blakeney durchgeführt (Blakeney, 1983). Die vorliegenden Polysaccharide werden durch saure Hydrolyse in ihre Monosaccharidbestandteile gespalten. Hierfür eignet sich besonders Trifluoressigsäure, da sie leicht aus dem System durch Abrotation zu entfernen ist. Die Monosaccharide werden zu Zuckeralkoholen reduziert. Dabei werden die vorliegenden Ringstrukturen in ihre offenkettige Form überführt und Aldehyd- oder Ketogruppen zu Hydroxylgruppen umgewandelt. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass für jeden Zucker im Chromatogramm nur ein Peak erhalten wird, was die Auftrennung und Auswertung wesentlich erleichtert. Um die Zuckeralkohole in eine flüchtige Form zu überführen, werden sie mit Acetanhydrid und Methylimidazol als Katalysator acetyliert. Nachteil der Methode ist, dass stabilere glykosidische Bindungen, wie die Bindung an der 1-Position von Uronsäuren, nicht gespalten werden. Die Uronsäuren liegen nach der Hydrolyse als Aldobiuronsäuren vor, einem Disaccharid aus der Uronsäure und dem über das C1-OH der Uronsäure gebundenen Zucker. Diese Disaccharide werden bei der Methode nach Blakeney nicht mitbestimmt.

Durchführung:

Hydrolyse

1-5mg Exopolysaccharid wurde zusammen mit 0,5mg Inositol als interner Standard in ein Reactivial eingewogen, Nach Zugabe von 1ml 2molarer Trifluoressigsäure wurde eine Stunde im Bioblock bei 121°C hydrolysiert. Die Hydrolyse wurde gestoppt durch Zugabe von 5ml Aqua dem., die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 35°C unter Vakuum zur Trockne einrotiert. Zur vollständigen Entfernung der Trifluoressigsäure wurde dieser Vorgang noch zweimal wiederholt.

Reduktion

Der Rückstand wurde mit 200µl 1molarer Ammoniaklösung wieder aufgenommen. Nach Zugabe von 1ml 2%iger Natriumborhydridlösung in getrocknetem Dimethylsulfoxid wurde 90min bei 40°C im Trockenschrank reduziert. Überschüssiges Natriumborhydrid wurde durch Zugabe von 100µl Eisessig zerstört.

Acetylierung

Die entstandenen Alditole wurden durch Zugabe von 2ml getrocknetem (Molekularsieb 4Å) Acetanhydrid acetyliert. Die Reaktion fand unter Zugabe von Methylimidazol als Katalysator bei Raumtemperatur statt. Nach 20min wurde die Acetylierung mittels 10ml Aqua dem. gestoppt. Die Lösung wurde mit 1ml 0,1%iger Schwefelsäure angesäuert und anschließend mit 1ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde vorsichtig abpipettiert und unter Stickstoff auf etwa ein Drittel eingeeengt.

Die eingeengte Lösung wurde sowohl für gaschromatographische als auch für massenspektrometrische Untersuchungen verwendet.

GC:	HP 5890 Series II; Fa. Hewlett Packard, USA und HP 6890 Plus Series; Fa. Hewlett Packard, USA
Säule:	WCOT-Kapillarsäule (Fused Silica); Permabond OV-225-0.25; L 25m, ID 0,25mm; Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trägergas:	N ₂ oder Helium
Flussrate:	1ml/min
Injektor:	240°C, Split 1:30
Injektionsvolumen:	1µl
Temperatur:	230°C (isotherm)
Detektor:	FID 240°C
Software:	Programm HP GC Chemstation

Die gaschromatographische Auswertung erfolgte qualitativ vornehmlich anhand der Retentionszeiten im Vergleich zu Standards. Als Bezugspunkt diente hierbei myo-Inositol, das als interner Standard allen Proben in definierter Menge zugesetzt wurde. Bei unbekanntem Zuckern wurde ein Massenspektrum zur Identifizierung aufgenommen. Quantitativ wurde anhand der integrierten Peakflächen in Bezug zum definierten myo-Inositol-Peak ausgewertet. Hierzu wurden Korrekturfaktoren für die Standardzucker bestimmt. Zu unbekanntem Zuckern konnten keine Korrekturfaktoren ermittelt werden, da sie nicht als Standards vorlagen. Der Korrekturfaktor wurde für diese Zucker gleich 1 gesetzt.

Die Alditolacetate wurden aufgrund ihrer ansteigenden Hydrophilie in folgender Reihenfolge eluiert:

Desoxyhexosen:	Rhamnose (Rha), Fucose (Fuc)
Pentosen:	Arabinose (Ara), Xylose (Xyl)
Hexosen:	Mannose (Man), Galactose (Gal), Glucose (Glc),
Standard:	myo-Inositol (Ino)

Neutralzucker	Korrekturfaktor
Rhamnose	1,303
Fucose	1,162
Arabinose	1,015
Xylose	1,069
Mannose	1,082
Galactose	1,097
Glucose	1,164
myo-Inositol	1

Tabelle 2.8: Korrekturfaktoren der Neutralzuckerpeakflächen für die quantitative gaschromatographische Bestimmung im Bezug zu myo-Inositol

2.5.2.1.2. Neutralzucker- und Uronsäureanalyse nach Preuß und Thier

Zur Bestimmung der Monosaccharid-Zusammensetzung einschließlich der Uronsäuren wurde eine Methanolyse in Abwandlung nach Preuß und Thier (Preuß und Thier, 1982) mit anschließender Silylierung durchgeführt. Die Hydrolyse erfolgt hierbei mit wasserfreier, methanolischer Salzsäure. Mit dieser Methode werden auch stabilere Bindungen, wie die an der 1-Position von Uronsäuren gespalten. Gleichzeitig bleiben labile Verbindungen wie Anhydro-Zucker und Zucker mit labilen Substituen wie Pyruvat oder Acetat erhalten. Die Zucker werden bei der Hydrolyse an der 1-Position methyliert. Es erfolgt keine Reduktion, welche die labilen Zuckerverbindungen zerstören würde. Dies hat allerdings den Nachteil, dass für jeden Zucker mehrere Peaks im Chromatogramm erhalten werden. Pro Zucker können bis zu fünf verschiedene Peaks auftreten, für die α - und β -furanosidische, für die α - und β -pyranosidische und für die offenkettige Form (Curtius, 1968). Die große Anzahl der Peaks erschwert die Auftrennung und Auswertung der Chromatogramme. Durch die anschließende Silylierung werden die erhaltenen Monosaccharide in ihre flüchtige Form überführt. Vorteil der Silylierung ist, dass auch Oligosaccharide in eine flüchtige Form überführt werden und somit unvollständige Hydrolysen sichtbar gemacht werden. Als nachteilig erweist sich, dass silylierte Zucker sich im Detektor des Gaschromatographen absetzen und dieser häufiger gereinigt werden muss (Zürcher, 1975).

Durchführung:

Methanolyse

1-5mg Polysaccharid wurden in ein Reaktivial eingewogen und mit 1ml methanolischer Salzsäure 0,5molar versetzt. Die Lösung wurde 4h bei 100°C im Bioblock hydrolysiert. Nach Abkühlung wurden den Proben 50µl Pyridin und 50µl der Inositol-Standardlösung zugesetzt. Die Proben wurden in Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer bei 40°C unter Vakkum bis zu einem öligen Rückstand eingeengt.

Silylierung

Der ölige Rückstand wurde in 780µl Pyridin aufgenommen und mit 220µl TMSI-Reagenz versetzt. Die Reaktion erfolgte 30min bei 40°C im Trockenschrank.

Die Lösung wurde gaschromatographisch untersucht.

GC: HP 5890 Series II; Fa. Hewlett Packard, USA und

HP 6890 Plus Series; Fa. Hewlett Packard, USA

Säule: WCOT-Kapillarsäule (Fused Silica);

Supelco SPB-1; L 25m, ID 0,25mm;

Trägergas: N₂ oder Helium

Flussrate: 1ml/min

Injektor: 270°C, Split 1:30

Injektionsvolumen: 1µl

Temperatur: 170°C– 250°C mit 2°C/min

Detektor: FID 270°C

Software: Programm HP GC Chemstation

Die gaschromatographische Auswertung erfolgte qualitativ, vornehmlich anhand der Retentionszeiten im Vergleich zu Standards. Als Bezugspunkt diente hierbei myo-Inositol, das als interner Standard allen Proben in definierter Menge zugesetzt wurde. Quantitativ wurde anhand der integrierten Peakflächen in Bezug zum definierten myo-Inositol-Peak ausgewertet. Hierzu wurden Korrekturfaktoren für die Standardzucker bestimmt. Die Peakflächen der einzelnen Peaks, die einem Monosaccharid entsprechen, wurden hierzu addiert. Zu unbekanntem Zuckern konnten keine Korrekturfaktoren ermittelt werden, da sie nicht als Standards vorlagen. Zur Berechnung wurden die Korrekturfaktoren der korrespondierenden, nicht substituierten Zucker verwendet.

Die silylierten Monosaccharide ergaben folgendes Peakmuster mit den entsprechenden relativen Retentionszeiten, bezogen auf myo-Inositol, und Korrekturfaktoren:

Monosaccharid	Peakanzahl	rel. Retentionszeit	Korrekturfaktor
Fucose	4	0,272; 0,294; 0,315; 0,430	1,453
Rhamnose	2	0,269; 0,282	2,002
Arabinose	3	0,245; 0,253; 0,278	1,717
Xylose	2	0,336; 0,356	1,718
Mannose	2	0,490; 0,532	1,825
Galactose	4	0,490; 0,540; 0,546; 0,584	1,474
Glucose	2	0,620; 0,653	2,378
Glucuronsäure	3	0,419; 0,624; 0,639	4,012

Tabelle 2.9: Peakanzahl, rel. Retentionszeiten und Korrekturfaktoren der Monosaccharide für die qualitative und quantitative gaschromatographische Bestimmung im Bezug zu myo-Inositol

2.5.2.2. Charakterisierung der Bindungsstellen nach vollständiger Methylierung per GC-MS

Um die Bindungstypen der EPS zu bestimmen, wurde eine Methylierungsanalyse durchgeführt (Harris, 1984; Hakomori, 1964; Björndal, 1970; Carpita und Shea, 1989; Needs and Selvendran, 1993; Fontaine, 1994). Die freien Hydroxylgruppen des EPS werden hierbei zunächst mit einer Dimethylsulfinyl-Kalium-Lösung durch Deprotonierung aktiviert und anschließend mit Methyljodid methyliert. Um eine möglichst vollständige Methylierung zu erreichen, muss die gesamte Reaktion ohne den Einfluss von Wasser durchgeführt werden. Zu diesem Zweck werden alle Reagenzien zuvor getrocknet und die Reaktion zum Ausschluß von Luftfeuchtigkeit unter Argon durchgeführt. Des Weiteren wurde die Methylierung schrittweise vollzogen. Durch die anfängliche Anmethylierung werden schwerlösliche Polysaccharide besser löslich und somit verläuft die Methylierung vollständiger. Nach der Methylierung werden die Polysaccharide sauer hydrolysiert und reduziert; es resultieren teilmethylierte, offenkettige Alditole. Diese werden mit Acetanhydrid und Perchlorsäure als Katalysator an den noch freien Hydroxylgruppen acetyliert. Dabei entstehen partiell methylierte Alditolacetate (PMAAs), bei denen die Lage der Acetatgruppen Aufschluss über den im Polysaccharid vorliegenden Bindungstyp und die Ringtypen der ursprünglichen Monosaccharide geben. Beachtet werden muss bei der Auswertung, dass nicht nur der Ringschluss und die an glycosidischen Bindungen beteiligten Hydroxylgruppen nicht methyliert werden. Substituenten, die unter den gegebenen Bedingungen während der Methylierung nicht abgespalten werden, ergeben nach der Hydrolyse freie Hydroxylgruppen und täuschen somit Bindungsstellen vor. Zu diesen Substituenten zählen zum Beispiel Sulfat- und Phosphatgruppen. Pyruvat- und Acetatgruppen werden hingegen größtenteils während der Methylierung abgespalten (Chiovitti, 1999). Die Auswertung erfolgt über eine gaschromatographische Auftrennung mit anschließender massenspektrometrischer Auswertung.

Durchführung:

Vorbereitung

1-5mg Exopolysaccharid wurde in ein verschraubbares Reagenzglas mit Seitenansatz eingewogen und gefriergetrocknet. Acetanhydrid, Dimethylsulfoxid und n-Hexan wurden min. 3 Tage über einem Molekularsieb 4Å getrocknet.

Herstellung der Dimethylsulfinyl-Kalium-Lösung

Es wurde ca. 1g Kaliumhydrid-Suspension 35% in Paraffin in ein verschraubbares Reagenzglas mit Seitenansatz eingewogen. Um das Paraffin zu entfernen, wurde mit insgesamt 20ml n-Hexan gewaschen. Hierzu wurde n-Hexan in kleinen Anteilen der Kaliumhydrid-Paraffin-Suspension zugegeben und mit einem Vortex-Gerät gemischt. Anschließend wurde das überstehende n-Hexan-Paraffin-Gemisch mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Um eventuell mit abgenommenes Kaliumhydrid zu deaktivieren, wurde das abgenommene Paraffin-Hexan-Gemischen in Wasser überführt. Nachdem das gesamte Paraffin ausgewaschen wurde, wurde das Kaliumhydrid unter Argon getrocknet. Das getrocknete Kaliumhydrid wurde ausgewogen und pro Gramm wurden 13ml getrocknetes Dimethylsulfoxid unter Argon vorsichtig zugetropft und zwischendurch auf einem Vortex-Gerät gemischt. Hierbei wurde das Reagenzglas bei Bedarf in einem Eisbad gekühlt um starkes Schäumen zu verhindern. Nachdem die entsprechende Menge Dimethylsulfoxid zugegeben worden war, wurde die Lösung 30min mittels eines Magnetrührers gerührt.

Methylierung

Die gefriergetrockneten Proben wurden in 230µl Dimethylsulfoxid gelöst. Schwer lösliche Proben wurden leicht erwärmt und mit Ultraschall behandelt. Die Methylierung erfolgte schrittweise unter Argon. Folgende Methylierungsschritte wurden durchgeführt:

40µl Dimsyl-Kalium-Lösung, 10min Reaktionszeit

10µl Methyljodid, 5min Reaktionszeit

120µl Dimsyl-Kalium-Lösung, 10min Reaktionszeit

50µl Methyljodid, 5min Reaktionszeit

400µl Dimsyl-Kalium-Lösung, 30min Reaktionszeit

300µl Methyljodid, 10min Reaktionszeit

Die erhaltenen Lösungen wurden in Pyrexgläser überführt und mit 2ml einer Methanol/Chloroform-Lösung (2:1) versetzt. Es wurden 2ml Aqua dem. zugefügt. Zur besseren Phasentrennung wurden die Proben zentrifugiert (5min, 2500g). Es erfolgt eine Phasentrennung in zwei Phasen. Die obere Wasserphase wurde verworfen, die untere Phase wird in gleicher Weise noch viermal mit 2ml Aqua dem. gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend zur Entfernung des restlichen Wassers mit 2ml 2,2-Dimethoxypropan, 20µl Eisessig und einigen Siedeperlen versetzt und im Bioblock bei 90°C erwärmt. Anschließend wurde die Lösung in ein Wheaton-Reaktionsgefäß überführt und unter Argonbegasung vollständig eingengt. Alternativ zu diesem Schritt wurde bei der Methode nach Alban für sulfatierte EPS die erhaltene Lösung in einen Pyrexglas überführt, das Methyljodid unter Stickstoff abgeblasen und die Lösung anschließend dialysiert und gefriergetrocknet (Alban, 1993).

Hydrolyse:

Das methylierte EPS wurde im Bioblock mit 1ml 2molarer TFA 1 Stunde bei 121°C hydrolysiert. Die TFA-Lösung wurde in einen Spitzkolben überführt und bei 40°C im Wasserbad unter Stickstoff abgeblasen.

Reduktion:

Die partiell methylierten Monosaccharide wurden mit 2ml einer frisch hergestellten ammoniakalischen 0,5molaren Natriumborhydrid-Lösung 60min bei 60°C im Trockenschrank reduziert. Durch Zugabe von 0,5ml Aceton wurde die Reaktion gestoppt und das Lösungsmittel unter Stickstoffbegasung im Wasserbad bei 40°C bis zu einem viskösen Rückstand eingengt.

Acetylierung:

Die partiell methylierten offenkettigen Alditole wurden durch Zugabe von 200µl Eisessig, 1ml Ethylacetat, 3ml Acetanhydrid (Lagerung über Molekularsieb 4 Å) und 100µl Perchlorsäure (70 % m/V) als Katalysator 5min acetyliert. Danach wurde auf Eis gekühlt und überschüssiges Acetanhydrid durch fünfminütige Reaktion mit 10ml dem. Wasser und 200µl 1-Methylimidazol zersetzt. Die PMAAs wurden dreimal mit je 1ml Dichlormethan ausgeschüttelt und unter Stickstoff eingengt. 0,5µl dieser Lösung wurden für die gaschromatographische Trennung und massenspektroskopische Analyse eingesetzt.

GC:	HP 5890 Series II; Fa. Hewlett Packard, USA
Säule:	Permabond OV-1701 WCOT-Kapillarsäule (Fused Silica) Fa. Macherey & Nagel, Düren L 25m, ID 0, 25mm
Trägergas:	Helium
Flussrate:	0,7ml/min
Splitverhältnis:	1:35
Injektionsvolumen:	0,5-1µl
Temperaturprogramm:	2min 170°C, 1°C/min auf 210°C, 10min 210°C isotherm Injektor 250°C
EI-MS:	HP MS Engine 5898A; Fa. Hewlett Packard, USA

Die partiell methylierten Alditolacetate werden gaschromatographisch aufgetrennt. Die qualitative Auswertung erfolgt zum einen anhand der Retentionszeiten im Totalionenchromatogramm (TIC) und zum anderen über die Analyse der Massenspektren.

Die Fragmentierung der PMAA im Elektronenstrahl des Massenspektrometers folgt feststehenden Regeln: Die im Elektronenstrom zuerst entstehenden Molekülionen zerfallen durch Überschussenergie zu Fragmenten. Hierbei laufen verschiedene Zerfallsprozesse in Konkurrenz zueinander ab. Die relative Häufigkeit der entstehenden Bruchstücke ist abhängig von den Bindungsenergien der einzelnen Bindungen, der Stabilität der entstehenden Bruchstücke und den Geschwindigkeitskonstanten der Zerfallsreaktionen (Budzikiewicz, 1992).

Für die Zerfallsprozesse der hier untersuchten PMAAs gilt im Allgemeinen:

Primärfragmente entstehen bevorzugt durch Spaltung zwischen methoxylierten Kohlenstoffatomen, gefolgt von Spaltungen zwischen Methoxy- und Acetoxygruppen tragenden C-Atomen. Im ersten Fall entstehen zwei positiv geladene Fragmente, im zweiten Fall entstehen Kationen nur von dem Fragment mit der Methoxygruppe. Spaltungen zwischen zwei Kohlenstoffatomen, die Acetoxygruppen tragen, sind selten.

Sekundärfragmente werden aus Primärfragmenten bevorzugt durch ein- oder mehrmaliges Abspalten von Essigsäure oder Methanol, in geringerem Maße auch durch Abspaltung von Keten und Formaldehyd gebildet.

Durch diese Aufspaltungsregeln entstehen typische Fragmentierungsmuster. Bei der Auswertung sind besonders die großen Fragmente spezifisch für bestimmte Zucker. Über die Höhe des Ausschlags im Spektrum spiegeln die Fragmente ihre Häufigkeit im Molekül wieder und geben somit Auskunft über die Zusammensetzung des Moleküls. Kleine Fragmente wie das 43 z/m Fragment, das ein abgespaltenes Kohlenstoffatom mit Methoxygruppe darstellt, geben nur eine methylierte Verbindung an. Je größer die Fragmente werden, desto spezifischer werden sie für ein bestimmtes Molekül. Darum sollte bei der Auswertung der Massenspektren besonderer Wert auf die größeren Fragmente gelegt werden. Die Auswertung der Massenspektren erfolgt zumeist vergleichend über eine im Arbeitskreis selbst erstellte Spektrenbibliothek oder über Literaturspektren. Die selbst erstellte Spektrenbibliothek wurde durch gezielte Untermethylierung von Standards erstellt. Bei der Auswertung ist zu beachten, dass Zucker mit einer Grundstruktur, die sich nur durch die Stellung einer Hydroxylgruppe eines chiralen Kohlenstoffatoms unterscheiden, nahezu identische Massenspektren liefern. Um sie zu unterscheiden, muss die Retentionszeit herangezogen werden. Dies ist in manchen Fällen sehr schwierig, da auch die Retentionszeiten sehr nah beieinander liegen. Besonders die Auswertung von Polysacchariden, in denen verschiedene Hexosen im gleichen Bindungstyp vorliegen, fällt somit schwer.

Die quantitative Auswertung erfolgte über die integrierten Peakflächen im Totalionenchromatogramm (TIC). Die Peakflächen wurden hierbei nicht auf einen internen Standard bezogen. Es wurden also keine absoluten Werte bestimmt, sondern nur die Verhältnisse zwischen den PMAAs. Hierzu wurde bei der Auswertung die Molekülgröße der PMAAs mit einbezogen, da zum Beispiel die Peakfläche für Hexosen größer ist als für die gleiche Anzahl Pentosen. Diese Umstände werden auch durch die Korrekturfaktoren nach Sweet ausgedrückt (Sweet, 1975). Die Berechnung der PMMA-Verhältnisse nach beiden Methoden liefern nahezu identische Ergebnisse. Im Weiteren werden alle Berechnungen unter Einbeziehung der Molmassen durchgeführt.

PMAA	Molmasse
Mono-acetyl-tetra-methyl-Pentose	249
Di-acetyl-tri-methyl-Pentose	277
Tri-acetyl-di-methyl-Pentose	305
Mono-acetyl-penta-methyl-Hexose	294
Di-acetyl-tetra-methyl-Hexose	322
Tri-acetyl-tri-methyl-Hexose	350
Mono-acetyl-tri-methyl-desoxy-Hexose	263
Di-acetyl-di-methyl-desoxy-Hexose	291
Tri-acetyl-mono-methyl-desoxy-Hexose	319

Tabelle 2.10: Molmassen verschiedener PMAAs zur quantitativen Auswertung

2.5.2.3. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Um die Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils zu bestimmen, muss zuvor der Kohlenhydratanteil entfernt werden. Dies geschieht durch die unter den gegebenen Hydrolysebedingungen stattfindende Veraschung des Kohlenhydratanteils, wodurch er anschließend abzentrifugiert werden kann. Während der Veraschung der Kohlenhydrate werden gleichzeitig die Proteine hydrolysiert. Das Aminosäurehydrolysat wird über HPLC aufgetrennt und mittels einer Nachsäulen-Derivatisierung mit Ninhydrin detektiert. Aminosäuren bilden mit zwei Molekülen Ninhydrin einen farbigen Komplex, dessen Absorptionmaximum bei 560nm liegt. Die Ausnahme bilden die beiden Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin deren Ninhydrinkomplex ein Absorptionsmaximum von 440nm aufweist.

Durchführung:

Ca.10mg EPS wurden in ein Reactivial eingewogen, mit 1 ml 6molarer Salzsäure versetzt und mit Stickstoff begast. Die erhaltene Lösung wurde im Bioblock bei 110°C über 22 Stunden hydrolysiert. Nach dem Abkühlen der Probe wurden die verkohlten Kohlenhydrate abzentrifugiert (5.000g, 10min). Der Überstand wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einrotiert. Das einrotierte Aminosäure-Hydrolysat wurde in Pufferlösung aufgenommen, 30min stehen gelassen, damit nicht gelöste Partikel sedimentierten, und der Überstand für die Bestimmung verwendet.

Gerät:	Aminosäuren-Analysator A100 (K-044-02)
Trennsäule:	TS 56
Vorsäule:	V51
Flussrate:	0,2ml/min
Injektionsvolumen:	20µl
Detektionsmethode:	Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin $\lambda = 560\text{nm}$ und 440nm
Software:	aminoPeak 2.09
Standard:	interner Standard 100nmol/ml Norleucin

2.6. Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernresonanzspektroskopie kann weitere wichtige Daten zur Strukturaufklärung von Molekülen liefern. Hierzu werden Atome mit Kernspin wie ^1H und ^{13}C durch Absorption verschiedener Meßfrequenzen angeregt und ihre Relaxation in auswertbare Spektren übertragen. Je nach ihrer chemischen Umgebung besitzen die verschiedenen Atome hierbei unterschiedliche Anfangsenergiezustände, was sich auf ihre Verschiebung im Kernresonanzspektrum auswirkt. Aufgrund des Grades der Verschiebung kann den einzelnen Signalen des Spektrums die Atome des Moleküls zugeordnet werden. Die Auswertung kleiner Moleküle ist hierbei sehr viel effektiver, da sich bei Makromolekülen die Signale stark überlagern können. Bei Polysacchariden ist eine Auswertung nur möglich, wenn sie aus so genannten „repeating units“ aufgebaut sind und sich in noch ausreichendem Ausmaß im Lösungsmittel lösen. Das Problem der Cyanobakterien-EPS liegt hierbei in ihren schlechten Lösungseigenschaften und der noch bestehenden Ungewissheit über ihren Aufbau.

Durchführung:

Ca. 10mg der Haupt-IAC-Fractionen der EPS oder die IAC-Fractionen nach Oxalsäurehydrolyse der EPS wurden in ein Eppendorfgefäß eingewogen und in 600 μl D_2O gelöst. Als interner Standard diente Dioxan in einer Konzentration von 0,5 μl in 10ml D_2O .

Gerät: Kernresonanzspektrometer ARX 300; Fa. Bruker
Temperatur: 300 K (thermostatisiert)

^{13}C -NMR-Spektroskopie

CPD (Protonen entkoppelt)

Messfrequenz: 75,47 MHz
Interner Standard: Dioxan ($\delta = 66,1$ ppm)

^1H -NMR-Spektroskopie

Messfrequenz: 300,13 MHz
Interner Standard: Dioxan ($\delta = 3,76$ ppm)

2.7. Elementaranalyse

Die Elementaranalyse wurde durchgeführt an einem HEKAtech CHNS Analysator, es wurden die unfraktionierten EPS eingesetzt.

2.8. Pharmakologische Testsysteme

Als Positivkontrollen wurden je nach Testsystem drei verschiedene Antigene eingesetzt:

Phytohämagglutinin (PHA), ein Lektin aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*)

Concanavalin (ConA), ein Lektin aus der Schwertbohne (*Canavalia ensiformis*)

und ein Lipopolysaccharid (LPS) aus *Escherichia coli*

2.8.1 Milzzell-Proliferationstest

Durch den Einbau von ^3H -markiertem Thymidin in neusynthetisierte kann die Proliferationsrate von Milzzellen aus verschiedenen Mäusestämmen ermittelt werden. Die Auswertung des Testes erfolgt über die Messung des eingebauten Thymidins, dessen Menge direkt proportional zu der im Markierungszeitraum erfolgten Synthese und damit zur Proliferationsrate der Zellen ist (Shevach, 1997). Aus der Steigerung der Proliferationsrate in Anwesenheit der Testsubstanz kann ein immunstimulierender Effekt abgeleitet werden.

Durchführung

Den, durch CO_2 -Inhalation getöteten, Testmäusen wurden unter aseptischen Bedingungen die Milzen entnommen. Nach dem Dispergieren und der Übernahme auf ein Kulturmedium wurden die Zellen auf eine definierte Dichte eingestellt. Die Testung erfolgte auf einer Mikrotiterplatte in vier parallelen Ansätzen. Die Zellen wurden mit *Synechocystis aquatilis* EPS in verschiedenen Konzentrationen bzw. mit Referenzmitogenen [Lipopolysaccharide (LPS, 30 $\mu\text{g/ml}$), Concanavalin A (ConA, 2 $\mu\text{g/ml}$), Phytohämagglutinin (PHA, 10 $\mu\text{g/ml}$)] 48 Stunden inkubiert (Brutschrank 37°C, 5% CO_2), anschließend mit ^3H -markiertem Thymidin versetzt und weitere 24 Stunden inkubiert. Nach der Ernte der Milzzellen und dem Auswaschen der nicht eingebauten Markierung, wurde die Radioaktivität (cpm) im Szintillationszähler gemessen.

Aus den cpm-Werten der Vierfachbestimmungen wurde der arithmetische Mittelwert berechnet und der Stimulationsindex (SI) als Maß für die immunstimulatorische Aktivität nach folgender Formel berechnet (Bodinet, 1999).

$$\text{SI} = \frac{\text{Cpm behandelte Kulturen}}{\text{cpm unbehandelte Kulturen}}$$

Abbildung 2.2: Formel zur Berechnung des Stimulationsindex (SI)

2.8.2 Bestimmung der IgM-Produktion

Durchführung

Mausmilzzellen wurden auf eine Dichte von $7,5 \times 10^6$ c/ml eingestellt. Pro 1ml Suspension wurde 1ml *Synechocystis aquatilis*-EPS-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Positivkontrolle wurde LPS (30µg/ml), als Negativkontrolle das entsprechende Volumen an Zellkulturmedium eingesetzt. Der Gehalt an IgM in den Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe eines einfachen Sandwich-ELISAs bestimmt (Bodinet, 1999).

2.8.3 Zytokininduktion (IL-6, TNF- α , GM-CSF und IFN- γ)

Durchführung

Maus-Makrophagen können durch Inkubation mit einem Aktivator zur vermehrten Zytokinausschüttung aktiviert werden (Beuscher, 1989). Verwendet wurden je nach Zytokin NMRI-Milzzellen, alveoläre oder peritoneale Makrophagen, diese wurden nach Standardvorschrift (Scharper & Brümmer) aufgearbeitet und auf $7,5 \times 10^6$ c/ml in Zellkulturmedium eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in 24er Zellkulturplatten ausgesät (1ml/Kavität) und mit jeweils 1ml EPS-Lösung versetzt. Es wurden 4 Parallelmessungen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde LPS (30µg/ml) bzw. LPS (30µg/ml) sowie ConA (2µg/ml) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze. Nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden Inkubation bei 5% CO₂ und 37°C wurden die Überstände abgenommen, gepoolt, abzentrifugiert und eingefroren. Die Aktivität der Zytokine IL-6, TNF- α , GM-CSF und IFN- γ wurde im Kulturüberstand mit Hilfe spezifischer Bioassays (ELISA-Kits, Duo-Set R&D) bestimmt (Bodinet, 1999).

2.8.4 Bestimmung der NO₂⁻-Produktion

Durch die Aktivierung von Makrophagen und der damit einhergehenden vermehrten Ausschüttung von Zytokinen kommt es zur Induktion des reaktiven Stickstoffoxids (NO). Da Stickstoffoxid nicht sehr stabil ist wird sein Oxidationsprodukt Nitrit bestimmt.

Durchführung

Zur Testung wurden alveoläre Maus-Makrophagen (MH-S) in Zellkulturmedium auf eine Dichte von 1×10^6 c/ml eingestellt (Bodinet, 1999). Je 100 µl Suspension wurden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und 2 Stunden bei 37°C und 5 %CO₂ inkubiert. Anschließend wurde mit je 100 µl EPS-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Negativkontrolle wurde nur das Zellkulturmedium verwendet, als Positivkontrolle diente ein Gemisch aus LPS und IFN-γ (5 + 1 ng/ml). Anschließend wurde in den Zellkulturüberständen die Konzentration des stabilen Oxidationsproduktes Nitrit mit Hilfe des Griess-Assays (Green, 1997) bestimmt.

2.8.5 Komplementmodulationstest (KMT)

Die Beeinflussung des Komplementsystems durch die EPS von *Synechocystis aquatilis* wurde mittels des Komplementmodulationstests nach Alban (Alban, 2002) untersucht. Der Vorteil zum herkömmlichen Komplement-Assay besteht darin, dass durch gezielte Testung mit und ohne Vorinkubation zwischen einer Stimulation und einer Hemmung des Komplementsystems unterschieden werden kann. Hemmende Substanzen zeigen sowohl mit als auch ohne Vorinkubation einen gleichen Abfall der Hämolyse. Sie verhindern die Aktivierung von Komplementfaktoren, so dass die hämolytische Potenz verringert ist. Diese Reaktion ist unabhängig von der Vorinkubation. Stimulierende Substanzen aktivieren während der Vorinkubation Komplementfaktoren, da aktivierte Komplementfaktoren nur eine geringe Halbwertszeit besitzen, werden sie schon vor dem Testbeginn inaktiviert. Es stehen nun weniger Komplementfaktoren für die Hämolyse im Test zu Verfügung. Ohne Vorinkubation kann diese Reaktion nur in geringem Maße stattfinden, es findet eine ebenso starke oder stärkere Hämolyse wie ohne Probe statt.

2.8.5.1 Komplement-Test (klassischer Aktivierungsweg)

Hammelerythrozyten (50%ig in Alseverlösung) : Institut Virion, Würzburg

Ambozeptor : Institut Virion, Würzburg

Veronalpuffer (pH 7,3 ± 0,1) : Institut Virion, Würzburg

0,145M Natriumchlorid

1,82mM Barbital-Na

3,12mM Barbital

0,25mM Calciumchlorid

0,83mM Magnesiumchloridhexahydrat

Erythrozytenaufbereitung

5ml der Hammelerythrozytensuspension (50%ig in Alseverlösung) wurden dreimal mit Kochsalzlösung 0,9% (m/V) und anschließend einmal mit Veronalpuffer (pH 7,3 ± 0,1) gewaschen (1.000g, 10min, 20°C). Die gewaschenen Erythrozyten wurden in 5,0ml Veronalpuffer aufgenommen und 0,2ml dieser Suspension mit 2,8ml Wasser (reinst.) versetzt. Die optische Dichte des Hämolysates wurde nach Zentrifugation (1.000g, 10min, 20°C) bei 541 nm im Photometer bestimmt. Die Absorption der überstehenden Flüssigkeit sollte 0,62 ± 0,01 betragen. Um diesen Wert einzustellen, kann die Suspension mit Veronalpuffer nach folgender Gleichung verdünnt werden:

$$V_f = \frac{V_i * A}{0,62}$$

V_f = Endvolumen

V_i = Ausgangsvolumen

A = Absorption der ursprünglichen
Suspension bei 541 nm

Die so eingestellte Suspension enthält ca. $1 * 10^9$ Erythrozyten/ml und kann bei 4 °C über einen Zeitraum von 24h gelagert werden. Um für die Testung eine Suspension mit einer Konzentration von $2,5 * 10^8$ Erythrozyten/ml zu erhalten, wurde die Stammsuspension 1:4 mit Veronalpuffer verdünnt.

Herstellung der Komplementverdünnung

Um die optimale Konzentration der Komplementquelle zu ermitteln, wurde der klassische Komplementtest mit humanen Poolserum (HPS) durchgeführt. Diese Verdünnung von 1,7% wurde mit Veronalpuffer zubereitet und ist vor jedem Test frisch herzustellen.

Herstellung der „sensitivierten“ Erythrozytensuspension

Die gebrauchsfertige Erythrozytensuspension ($2,5 \cdot 10^8$ Erythrozyten/ml) wurde mit dem gleichen Volumen einer Ambozeptorlösung 15min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Ambozeptorlösung wurde vor jeder Testung frisch, durch Verdünnen (1:2.500) der Stammlösung mit Veronalpuffer, hergestellt.

Testdurchführung

In die Kavitäten einer V-Mikrotiterplatte wurden 75 μ l Probe (Testsubstanz gelöst in Veronalpuffer) vorgelegt und mit 25 μ l Komplementverdünnung (1,7% HPS) versetzt. Nach 30min Inkubation bei 37°C wurde pro Kavität 50 μ l der „sensitivierten“ Erythrozytensuspension ($1,25 \cdot 10^8$ Erythrozyten/ml) zupipettiert und anschließend weitere 45min bei 37 °C inkubiert. Bei der Testung ohne Vorinkubation wurden zunächst die Probe und die Erythrozytensuspension vorgelegt und dann die Komplementverdünnung zugegeben, anschließend wurde wie bei der Testung mit Vorinkubation 45min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Platte (1.000g, 15min, 4°C) wurden 100 μ l des Überstandes in eine F-Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe von 100 μ l Wasser (reinst.) pro Kavität wurde die Platte bei 405nm im ELISA-Reader vermessen. Zur Quantifizierung des Hemmeffektes wurde aus drei Einzelmessungen die mittlere Extinktion bestimmt und ins Verhältnis zu Positivkontrolle gesetzt. Bei der Positivkontrolle (0% Hemmung) wurde die Probe durch Veronalpuffer ersetzt. Im Gegensatz dazu wurde bei der Negativkontrolle (100% Hemmung) Poolserum verwendet, das zuvor bei 56°C für 30min hitzeinaktiviert wurde.

2.8.5.2. Komplement-Test (alternativer Aktivierungsweg)

Kaninchenerythrozyten (50%ig in Alseverlösung) : Charles River, Kißlegg

EGTA-Veronalpuffer (EGTA-VB)

0,142M	Natriumchlorid
4,95mM	5, 5-Diethylbarbitursäure
5,0mM	Magnesiumchlorid
8,0mM	Ethylenglykol-bis (2-aminoethyl)-N, N, N', N'- tetraessigsäure (EGTA)

mit 0,1M NaOH auf pH 7,2 einstellen

Erythrozytenaufbereitung

Die gebrauchsfertige Kaninchenerythrozytensuspension wurde analog zur Aufbereitung der Hammelerythrozyten im klassischen Komplementtest hergestellt. Anstelle des Veronalpuffers wurde EGTA-VB verwendet. Die gebrauchsfertige Kaninchenerythrozytensuspension hat eine Konzentration von $1,25 \cdot 10^8$ Erythrozyten/ml und ist bei 4°C für 24h stabil.

Herstellung der Komplementverdünnung

Als Komplementquelle diente HPS, das nach dem Auftauen bei RT 1:2 mit EGTA-VB verdünnt wurde. Diese Verdünnung wurde vor jedem Test frisch hergestellt.

Testdurchführung

Für die Testung ohne Vorinkubation wurden in den Kavitäten einer V-Mikrotiterplatte 75µl Probe (Testsubstanz gelöst in EGTA-VB) vorgelegt und 50µl Erythrozytensuspension ($1,25 \cdot 10^8$ Erythrozyten/ml) zugegeben. Direkt im Anschluss wurde 25µl Komplementverdünnung (50% HPS) hinzugefügt und die Platte 45min bei 37°C inkubiert. Mit Vorinkubation wurde zunächst die Probe mit der Komplementverdünnung 30min inkubiert und dann erst die Erythrozytensuspension zugesetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1.000g, 20min, 4°C) wurden 100µl des Überstandes in die Kavitäten einer F-Mikrotiterplatte überführt, mit 100µl Wasser (reinst.) gemischt und bei 405nm im ELISA-Reader vermessen. Die Werte der Positivkontrolle (0% Hemmung) wurden mit EGTA-VB anstelle der Probe ermittelt. Bei der Negativkontrolle (100% Hemmung) wurde hitzeinaktiviertes Poolserum (56°C, 30min) verwendet.

3. Ergebnisse: *Nostoc insulare*

3.1. Taxonomie und Merkmale

Ordnung	<i>Nostocales</i>
Familie	<i>Nostocaceae</i>
Gattung	<i>Nostoc</i> L.
Art	<i>Nostoc insulare</i> L.

Nostoc insulare ist ein trichombildendes Cyanobakterium. Die ausgebildeten Trichome können bis zu 1mm lang werden und liegen immer unverzweigt vor. Im mikroskopischen Bild erscheinen sie als rosenkranz-ähnliche Fäden. Pro Faden werden ein oder zwei Heterocysten ausgebildet, man erkennt sie am größeren Zelldurchmesser und der schwächeren Färbung. Durch die Heterocysten sind *Nostoc*-Arten zur Stickstofffixation befähigt. Die Vermehrung erfolgt durch Hormogonien. Die Gattung *Nostoc* ist im Wasser oder auf feuchtem Boden (Tintenstriche) anzutreffen, sie bildet kugelige oder unregelmäßig lappige Kolonien, die von Gallerten zusammengehalten werden.

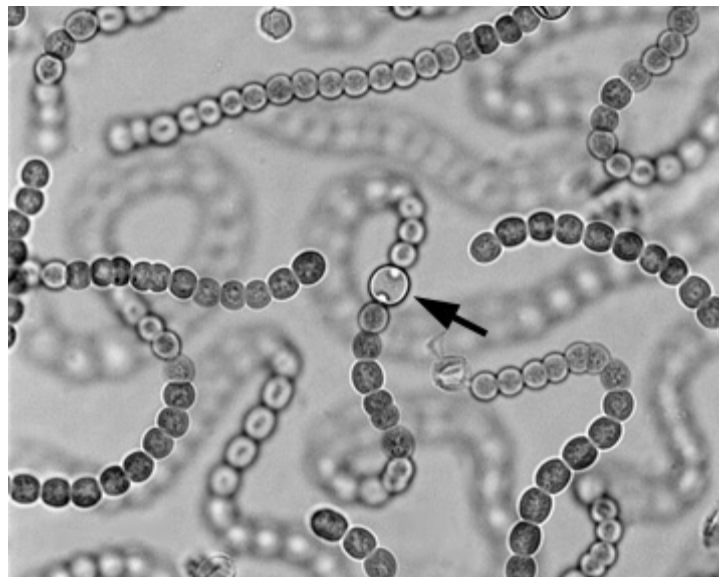


Abbildung 3.1: *Nostoc* sp. Trichome, die Markierung zeigt einen Heterozysten
(Photo: silicasecchidisk.conncoll.edu)

3.2. Wachstumskurven

3.2.1. Biomasse

Die vorliegenden Daten zeigen den Wachstumsverlauf einer 8L-Batchkultur von *Nostoc insulare* über 60 Tage. Die Biomasse wurde hierbei als Trockenmasse bestimmt:

Tag	Stand in cm	Absorbtion	Verdünnung	Restvolumen in ml	Biomasse in µg/ml	korr. Biomasse in µg/ml
1	0	0,01		8000,0	2,7	2,7
4	0,6	0,03		7778,8	8,0	7,8
8	1,3	0,266		7520,7	71,3	67,0
11	1,9	0,576		7299,5	154,4	140,9
15	2,4	0,781		7115,2	209,3	186,2
18	3,1	0,466	1+1	6857,1	249,8	214,1
22	3,9	0,762	1+1	6562,2	408,4	335,0
25	4,8	0,492	1+2	6230,4	395,6	308,1
29	6,3	0,77	1+2	5677,4	619,1	439,3
32	7,4	0,414	1+4	5271,9	554,8	365,6
36	8,4	0,468	1+4	4903,2	627,1	384,4
39	9,2	0,543	1+4	4608,3	727,6	419,1
43	10,2	0,671	1+4	4239,6	899,1	476,5
46	10,7	0,57	1+5	4055,3	916,6	464,6
50	11,6	0,623	1+5	3723,5	1001,8	466,3
53	12,1	0,855	1+5	3539,2	1374,8	608,2
57	12,9	0,631	1+7	3244,2	1352,9	548,6
60	13,7	0,59	1+10	2949,3	1581,2	582,9

Tabelle 3.1: Auswertung der photometrischen Bestimmung der Biomasse bei 440nm

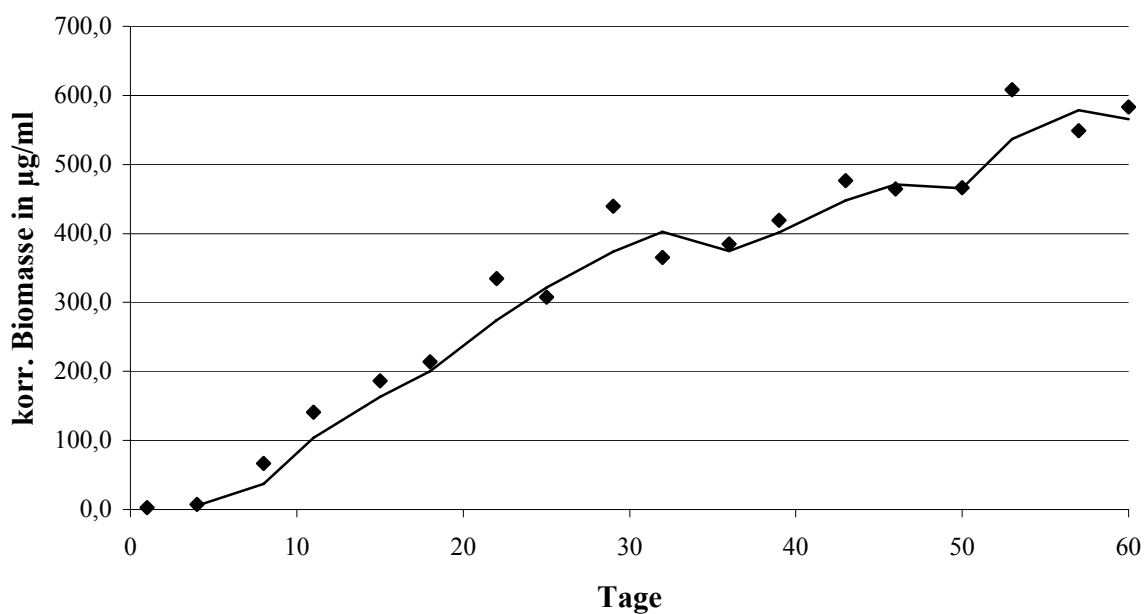


Diagramm 3.1: Wachstumskurve von *Nostoc insulare*

Ergebnisse

Nach 60 Tagen betrug die Gesamtbio­masse 51,29g Trockengewicht auf 8L Nährlösung, dies entspricht 6,4g/L.

Die Auszählung der Individuen mittels einer Neubauer-improved Zählkammer der 0,004µl Quadrate ergab folgende Verteilung

Quadrat 1	Individuen	Quadrat 2	Individuen	Quadrat 3	Individuen	Quadrat 4	Individuen
1.1	14	2.1	30	3.1	1	4.1	13
1.2	5	2.2	13	3.2	3	4.2	15
1.3	5	2.3	8	3.3	10	4.3	3
1.4	1	2.4	15	3.4	7	4.4	1
1.5	14	2.5	8	3.5	7	4.5	9
1.6	0	2.6	16	3.6	10	4.6	0
1.7	5	2.7	2	3.7	0	4.7	0
1.8	8	2.8	8	3.8	1	4.8	2
1.9	10	2.9	6	3.9	0	4.9	1
1.10	2	2.10	14	3.10	1	4.10	0
1.11	0	2.11	11	3.11	9	4.11	0
1.12	0	2.12	8	3.12	7	4.12	8
1.13	2	2.13	0	3.13	1	4.13	11
1.14	14	2.14	12	3.14	0	4.14	9
1.15	9	2.15	3	3.15	4	4.15	3
1.16	11	2.16	11	3.16	9	4.16	11
Summe	100	Summe	165	Summe	70	Summe	86

Tabelle 3.2: Auszählung einer *Nostoc insulare*-Kultur nach 60 Tage

Aufgrund der fädigen Struktur der Cyanobakterien ergab sich eine hohe Diversität in der Auszählung der einzelnen Unter-Quadrate, die sich bei der Addition auf die 0,004µl Quadrate auf ein gut auswertbares Maß ausglich.

Der Mittelwert ergibt eine Individuenzahl von 26312,5 Individuen/µl, hochgerechnet ergibt sich eine Individuenanzahl von $1,843 \cdot 10^{10}$ in der Gesamtkultur von 8L, dies entspricht $2,3 \cdot 10^9$ Individuen/L.

3.2.2. Kohlenhydrate

Die vorliegenden Daten zeigen die Zunahme an Kohlenhydraten in der Nährlösung über 60 Tage bei einer 8L-Batch-Kultur von *Nostoc insulare*. Der Kohlenhydratgehalt wurde photometrisch nach Dubois ermittelt.

Tage	Stand in cm	Restvolumen in ml	Absorbtion 480nm	Verdünnung	Kohlenhydrate in µg/ml	korrr. Kohlenhydrate in µg/ml
1	0	8000,0	0,135		11,3	11,3
4	0,6	7778,8	0,14		11,9	11,5
8	1,3	7520,7	0,387		36,7	34,5
11	1,9	7299,5	0,653		62,9	57,4
15	2,4	7115,2	0,46	1+1	85,9	76,4
18	3,1	6857,1	0,647	1+1	130,2	111,6
22	3,9	6562,2	0,989	1+1	201,0	164,9
25	4,8	6230,4	0,442	1+3	167,4	130,4
29	6,3	5677,4	0,555	1+3	212,3	150,7
32	7,4	5271,9	0,66	1+3	256,8	169,2
36	8,4	4903,2	0,808	1+4	397,6	243,7
39	9,2	4608,3	0,661	1+6	432,2	249,0
43	10,2	4239,6	0,602	1+9	539,7	286,0
46	10,7	4055,3	0,765	1+9	680,8	345,1
50	11,6	3723,5	0,54	1+15	819,0	381,2
53	12,1	3539,2	0,56	1+15	886,6	392,2
57	12,9	3244,2	0,787	1+15	1201,2	487,1
60	13,7	2949,3	0,743	1+17	1259,4	464,3

Tabelle 3.4: Auswertung der photometrischen Kohlenhydratbestimmung nach Dubois bei 480nm

Tage	Stand in cm	Restvolumen in ml	Absorbtion 490nm	Verdünnung	Kohlenhydrate in µg/ml	korrr. Kohlenhydrate in µg/ml
1	0	8000,0	0,134		11,3	11,3
4	0,6	7778,8	0,139		11,9	11,6
8	1,3	7520,7	0,363		38,9	36,6
11	1,9	7299,5	0,598		67,2	61,4
15	2,4	7115,2	0,419	1+1	91,3	81,2
18	3,1	6857,1	0,618	1+1	139,3	119,4
22	3,9	6562,2	0,937	1+1	216,2	177,3
25	4,8	6230,4	0,409	1+3	177,9	138,5
29	6,3	5677,4	0,51	1+3	226,6	160,8
32	7,4	5271,9	0,61	1+3	274,7	181,1
36	8,4	4903,2	0,748	1+4	426,6	261,4
39	9,2	4608,3	0,588	1+6	462,3	266,3
43	10,2	4239,6	0,518	1+9	576,0	305,3
46	10,7	4055,3	0,645	1+9	729,0	369,6
50	11,6	3723,5	0,493	1+15	873,4	406,5
53	12,1	3539,2	0,531	1+15	946,7	418,8
57	12,9	3244,2	0,708	1+15	1287,9	522,3
60	13,7	2949,3	0,662	1+17	1349,1	497,4

Tabelle 3.5: Auswertung der photometrischen Kohlenhydratbestimmung nach Dubois bei 490nm

Graphisch übertragen ergab sich folgendes Diagramm für die Zunahme der Kohlenhydrate im Nährmedium:

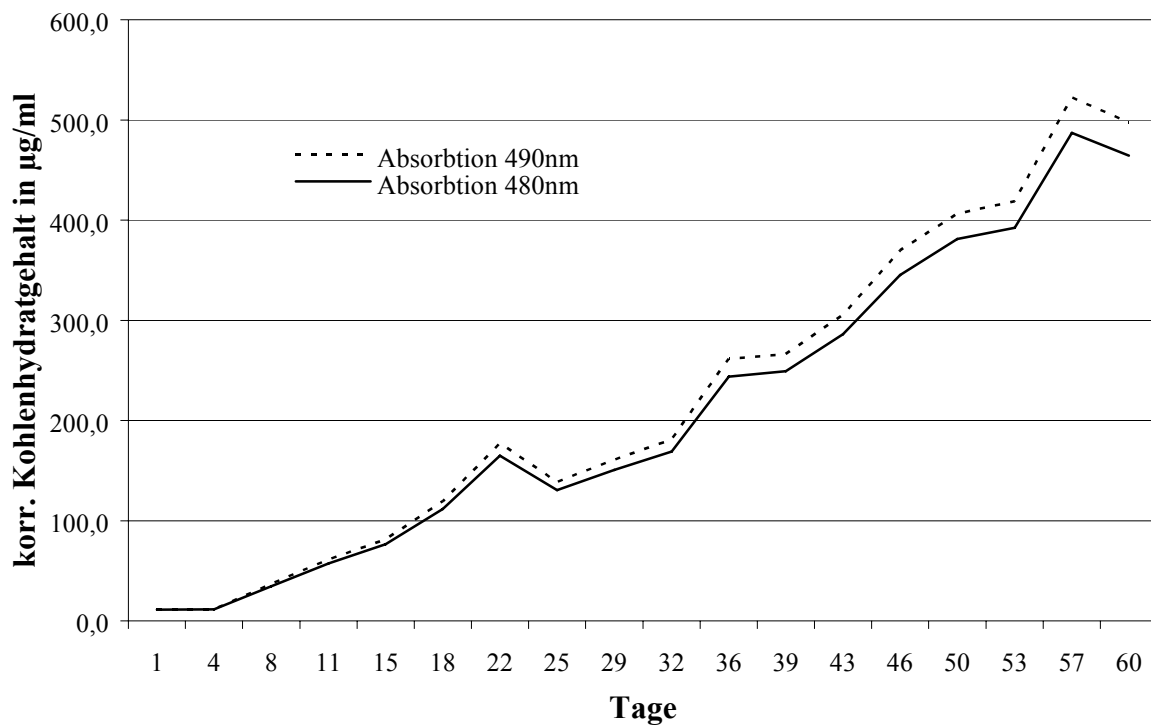


Diagramm 3.2: Zunahme des Kohlenhydratgehalts einer *Nostoc insulare* 8L-Batch-Kultur

Die von der Biomasse befreite Nährlösung wurde dialysiert und gefriergetrocknet. Es ergab sich ein Roh-EPS-Gehalt von 32,392g für eine 8L-Kultur, dies entspricht 4,05g/L.

10g der von der Biomasse befreiten Nährlösung wurden in Wasser solvatisiert und zur Proteinfällung erhitzt. Es wurden 0,97g Proteine gefällt. Das EPS wurde per Ethanol-fällung von den Salzen, Monosacchariden und Oligosacchariden getrennt. Der Überstand der Ethanol-fällung ergab 5,3g. Die Fällung wurde dialysiert. Es konnten 2,23g aufgereinigtes EPS erhalten werden. Damit beträgt der EPS-Gehalt 2,23% des Roh-EPS-Gehaltes.

3.3. Identifizierung unbekannter Zucker

Nach ersten Untersuchungen der Neutralzuckerzusammensetzung konnte ein Peak (P1) bei einer relativen Retentionszeit zu Inositol von 0,348 keinem Standard zugeordnet werden. Die relative Retentionszeit zu myo-Inositol lag unter der für Rhamnose, es muss sich demnach um ein lipophileres Monosaccharid handeln. Durch die Auswertung eines Massenspektrums der acetylierten Verbindung konnte der Peak als 3-O-Methyl-Arabinose identifiziert werden.

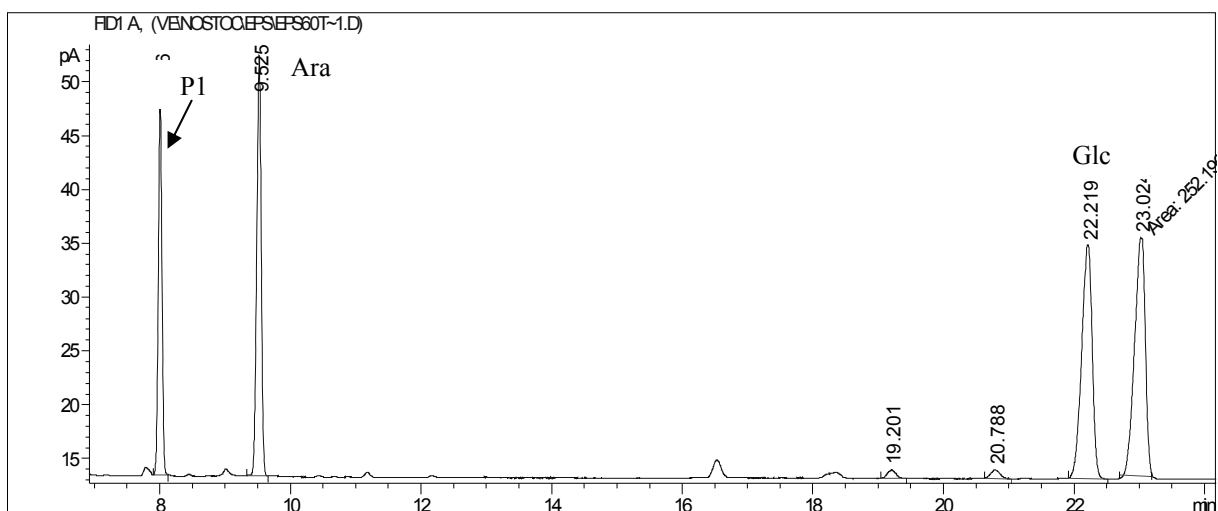


Abbildung 3.2: Gaschromatogramm eines acetylierten, aufgereinigten EPS aus einer 60 Tage alten Kultur

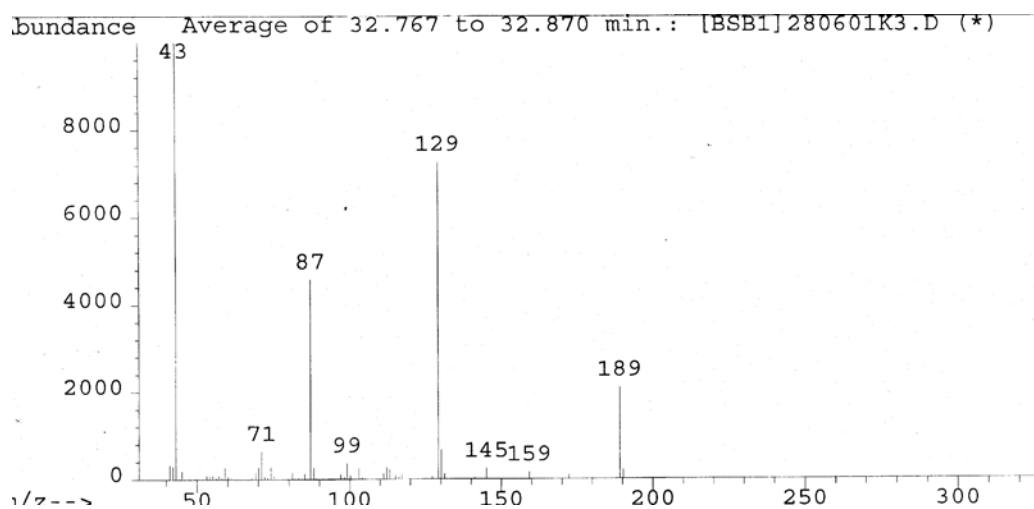


Abbildung 3.3: Massenspektrum der acetylierten 3-O-Methyl-Arabinose

3.4. Kontinuität der EPS im Wachstumsverlauf

Zur Kontrolle, ob sich die abgegebenen EPS stark mit der Wachstumszeit verändern, wurden weitere Batchkulturen angesetzt. Die erste wurde nach 30 Tagen abgeerntet, die andere nach 100 Tagen. Die Nährlösungen wurden aufgearbeitet. Zum Vergleich wurden die verschiedenen EPS mittels der Methode nach Blakeney auf ihre Neutralzuckerzusammensetzung untersucht.

Neutralzucker	EPS 30Tage	EPS 60Tage	EPS 100Tage
3-O-Methyl-Arabinose	22,7%	22,6%	19,1%
Arabinose	32,9%	30,7%	26,9%
Mannose	0,0%	0,0%	2,8%
Glucose	44,4%	46,7%	51,2%

Tabelle 3.6.: Vergleich des Neutralzuckerhältnisses in EPS unterschiedlich alter Batch-Kulturen

Die Neutralzuckerhältnisse der EPS bleiben über den Wachstumsverlauf von 100 Tagen relativ konstant. Es ist ein leichter Anstieg der Glucoseanteile zu beobachten und nach 100 Tagen ist erstmals ein geringer Anteil Mannose nachzuweisen.

3.5. Elementaranalyse

Die Elementaranalyse der aufgereinigten 60 Tage alten EPS ergab einen Kohlenstoffanteil von 37,853%, einen Wasserstoffanteil von 6,202% und einen Stickstoffanteil von 0,518%. Es wurde kein Schwefel nachgewiesen.

3.6. Bestimmung des hydrodynamischen Volumens mittels Gelpermeationschromatographie

Mittels Gelpermeationschromatographie sollten das hydrodynamische Volumen des isolierten EPS anhand einer Eichreihe mit Pullulanen sowie das Molekulargewicht anhand der Berechnungen des MALLS-Detektors bestimmt werden. Die Trennung erfolgte an einer Sephadex SR-400-Säule, die einen Trennbereich von 20.000-8.000.000Da für globuläre Moleküle und 10.000-2.000.000Da für Dextrane aufweist.

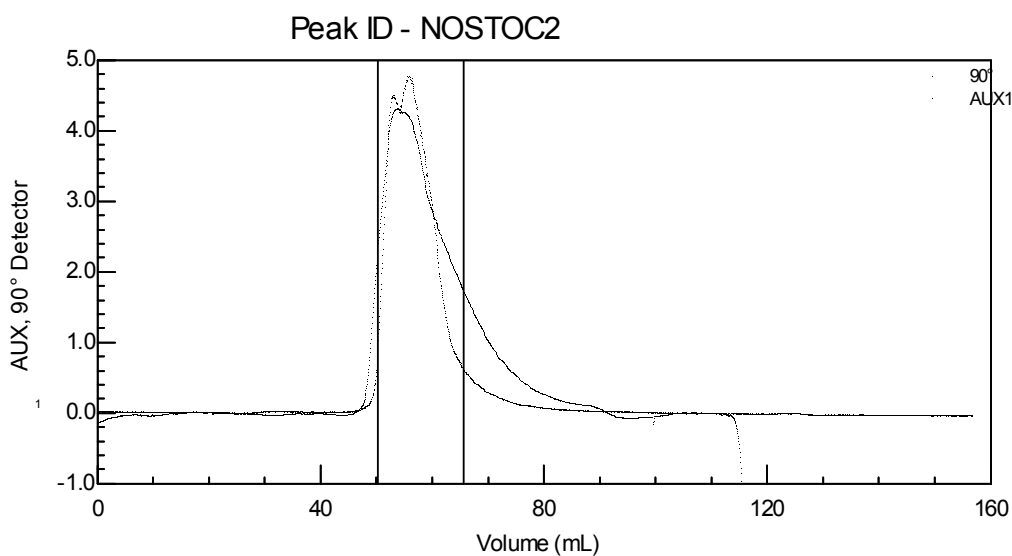


Abbildung 3.4: Gelpermeations-Chromatogramm des isolierten EPS von *Nostoc insulare* bei 0,694ml/min Detektion über MALLS-Detektor (obere Linie) und RI-Detektor (untere Linie)

Bei einer normalen Flußgeschwindigkeit von 1ml/min ergab sich ein Chromatogramm mit einem Peak bei einem mittleren Elutionsvolumen von 59,0ml. Bei geringerer Flußgeschwindigkeit (bis zu 0,3ml/min) spalteten sich die Peakspitze auf, aber auch bei sehr niedriger Flußgeschwindigkeit konnten keine fraktionierbaren Peaks erhalten werden. Das abgebildete Chromatogramm wurde bei einer relativ niedrigen Flußgeschwindigkeit von 0,694ml/min aufgezeichnet. Es ist festzuhalten, dass es sich bei dem isolierten EPS um ein heterogenes Gemisch handelt, das aber am vorliegenden Säulenmaterial nicht getrennt werden kann. Die Berechnung des hydrodynamischen Volumens ergab einen Mittelwert von 1.081.000Da. Damit liegt das hydrodynamische Volumen der EPS außerhalb der Pullulan-Eichreihe, mit Sicherheit kann also nur ein hydrodynamisches Volumen von über 800.000Da angenommen werden. Die Berechnungen des MALLS-Detektors ergaben ein mittleres Molekulargewicht von 2.799.000Da.

3.7. Fraktionierung des Exopolysaccharidgemisches mittels Ionenaustauschchromatographie

Die Fraktionierung des Exopolysaccharidgemisches erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie. Die aufgefangenen Fraktionen wurden photometrisch nach Dubois auf Kohlenhydrate untersucht. Die erhaltenen Daten ergaben folgenden Kurvenverlauf.

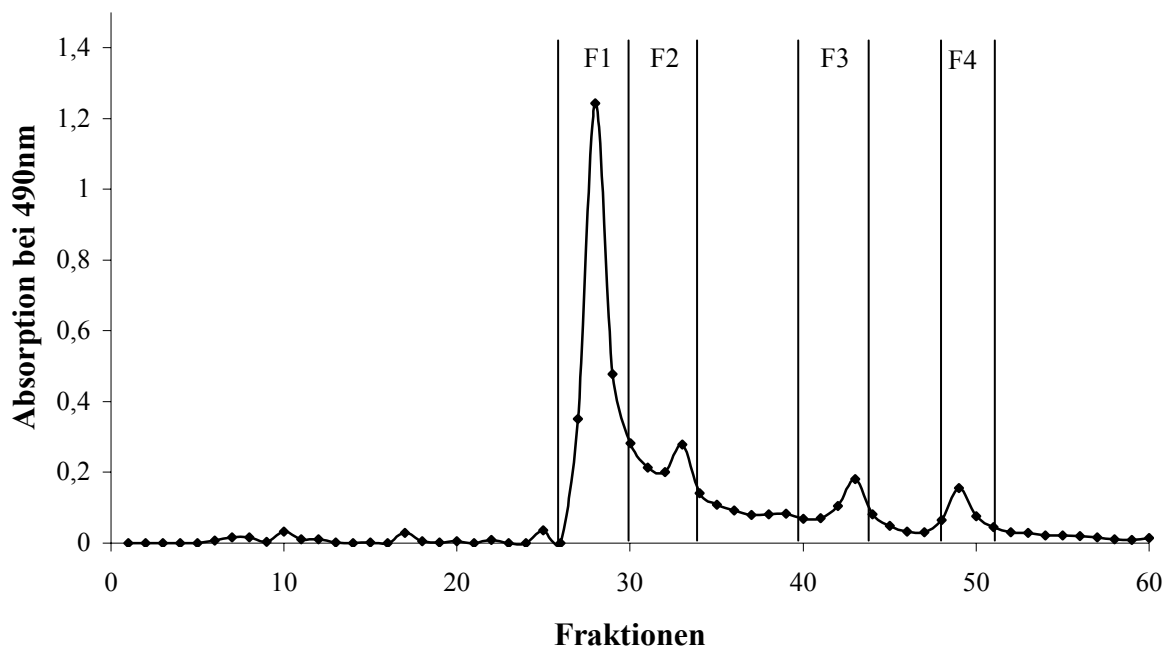


Diagramm 3.3: Graphische Übertragung der photometrischen Messwerte des Kohlenhydratgehaltes der aufgefangenen IAC-Fraktionen

Die kohlenhydratreichen Fraktionen wurden wie im Diagramm dargestellt zu vier Fraktionen vereinigt. Es finden sich ausschließlich saure Polysaccharide. Der größte Teil lässt sich mit einer 0,5molaren NaCl-Lösung vom Ionenaustauscher waschen. Eine weitere Fraktion wird mit 1,0molarer NaCl-Lösung eluiert und zwei weitere Fraktionen folgen bei 2,0molarer NaCl-Lösung. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt, um eine ausreichende Menge an Polysacchariden pro Fraktion zu erhalten. Insgesamt wurden 200mg EPS eingesetzt.

Nach Dialyse und Gefriertrocknung ergaben sich folgende Ausbeuten:

Fraktion 1: 58,33mg

Fraktion 2: 46,40mg

Fraktion 3: 28,45mg

Fraktion 4: 21,06mg

Der Verlust von 45,76mg EPS erklärt sich dadurch, dass beim Filtrieren der EPS-Lösung sowie beim luftblasenfreien Befüllen der Dosierschleife ein Teil der EPS verloren geht. Des Weiteren gehen EPS durch das fraktionierte Auffangen verloren, da auch Fraktionen mit geringem Kohlenhydratgehalt verworfen werden.

Die erhaltenen Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer Neutralzuckerzusammensetzung ihrer Alditolacetate mittels gaschromatischer Analyse untersucht:

Neutralzucker	IAC-Fraktion 1	IAC-Fraktion 2	IAC-Fraktion 3	IAC-Fraktion 4
3-O-Methylarabinose	20,0%	16,6%	19,9%	22,2%
Arabinose	30,6%	28,5%	27,9%	34,1%
Glucose	49,4%	54,9%	52,2%	43,7%

Tabelle 3.7: Neutralzuckerverteilung der IAC-Fraktionen von *Nostoc insulare*

Die Fraktionen 1 bis 3 unterscheiden sich in ihrer Neutralzuckerzusammensetzung nicht signifikant. Fraktion 2 und 3 zeigen leicht erhöhte Glucoseanteile im Vergleich zu Fraktion 1. Fraktion 4 weist einen im Schnitt um ca. 10% niedrigeren Glucoseanteil auf. Fraktion 1 wurde aufgrund der größten Ausbeute als Hauptfraktion weiter untersucht. Im Vergleich mit dem unfraktioniertem EPS zeigt die Hauptfraktion einen etwas geringeren 3-O-Methyl-Arabinoseanteil und einen etwa um den gleichen Betrag geringfügig erhöhten Glucoseanteil, der Arabinoseanteil ist konstant.

Neutralzucker	Hauptfraktion	EPS	Vergleich
3-O-Methylarabinose	20,0%	22,6%	+/- 2,6%
Arabinose	30,6%	30,7%	+/- 0,1%
Glucose	49,4%	46,7%	+/- 2,7%

Tabelle 3.8: Vergleich der Neutralzuckerverteilung der IAC-Hauptfraktionen und des unfraktionierten EPS

3.8. Nachweis von Substituenten

3.8.1. Pyruvatgruppen

Der Pyruvatgehalt wurde photometrisch über die Methode nach Sloenecker (Sloenecker, 1962) und über die Methode nach Hirase (Hirase, 1972) bestimmt. Der Mittelwert der Absorptionsmessungen der Methode nach Sloenecker ergab 0,187 bei einer Einwaage von 5,34mg der IAC-Hauptfraktion, der über die Kalibriergerade errechnete Pyruvatgehalt liegt bei 0,24% (m/m). Der Mittelwert der Absorptionsmessungen der Methode nach Hirase ergab 0,056 bei einer Einwaage von 5,21mg der IAC-Hauptfraktion, der über die Kalibriergerade errechnete Pyruvatgehalt liegt bei 0,09% (m/m). Die gemessenen Werte liegen so niedrig, dass sie nicht mehr im Bereich der Kalibriergeraden liegen. Faktisch kann angenommen werden, dass der Pyruvatgehalt gleich null ist und die gemessenen Werte nur Messungenauigkeiten sind.

3.8.2. Acetatgruppen

Der Acetatgehalt wurde photometrisch über die Bildung von Acetohydroxamsäure bestimmt (McComb und McCready, 1957). Der Mittelwert der Absorptionsmessungen ergab 0,038 bei einer Einwaage von 2,24mg der IAC-Hauptfraktion, der über die Kalibriergerade errechnete Acetatgehalt liegt bei 0,7% (m/m). Der gemessene Wert liegt so niedrig, dass er nicht mehr im Bereich der Kalibriergeraden liegt.

3.8.3. Sulfatgruppen

Der Sulfatgehalt wurde nach der Bildung von Bariumsulfat photometrisch bei 550nm bestimmt (Craigie, 1984). Der Mittelwert der Absorptionsmessungen ergab 0,026 bei einer Einwaage von 19,30mg der IAC-Hauptfraktion. Der mit der Kalibriergerade ausgerechnete Schwefelgehalt liegt theoretisch im extrapolierten, negativen Bereich. Demnach ist kein Sulfat vorhanden. Dieses Ergebnis wird durch die Elementaranalyse bestätigt.

3.9. Bestimmung des quantitativen Uronsäuregehalts

Die Uronsäurebestimmung (Blumenkrantz und Asboe-Hansen, 1973), erfolgte photometrisch bei 520nm. Untersucht wurden die IAC-Hauptfraktion und das unfraktionierte EPS.

IAC-Hauptfraktion	unfraktioniertes EPS
25,21%	26,44%

Tabelle 3.9: Quantitativer Uronsäuregehalt in % (m/m) der IAC-Hauptfraktion und des unfraktioniertem EPS

Das unfraktionierte EPS enthält geringfügig mehr Uronsäuren als die IAC-Hauptfraktion. Diese Tendenz war zu erwarten, da die IAC-Hauptfraktion den geringsten Ladungsgrad der IAC-Fraktionen aufweist. Aufgrund der Verteilung der Fraktion im IAC-Diagramm würde man jedoch einen größeren Unterschied erwarten, da der größere Anteil des unfraktionierten EPS aus den Fraktionen mit höherem Ladungsgrad besteht.

3.10. Bestimmung des quantitativen und qualitativen Uronsäuregehalts

Die differenzierte Uronsäurebestimmung erfolgte nach Reduktion der Säurefunktion unter Einbau von Deuterid. Zum einem wurde die Zunahme der Neutralzucker bei der gaschromatographischen Auftrennung der Alditolacetate ausgewertet und zum anderen die Zunahme der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs) nach der Methylierungsanalyse. Zur Verifizierung kann das Massenspektrum der PMAAs herangezogen werden. Durch den Einbau von Deuterid bei der Reduktion kann die Uronsäure im Massenspektrum durch doppelte Signale mit einer Massendifferenz von $2z/m$ identifiziert werden.

Die Auswertung der Alditolacetate vor und nach der Reduktion ergab folgende Verhältnisse:

Neutralzucker	EPS	EPS UF	EPS UTC
3-O-Methylarabinose	22,6%	18,8%	11,8%
Arabinose	30,7%	29,7%	29,9%
Glucose	46,7%	51,6%	58,3%

Tabelle 3.10: Neutralzuckerverhältnis des unfraktionierten EPS vor und nach einer Uronsäurereduktion
EPS UF=Uronsäurereduktion nach Fontaine; EPS UTC=Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad

Nach der Uronsäurereduktion nach Fontaine nimmt der Anteil der Glucose um 4,9% zu, nach der Methode nach Taylor und Conrad um 11,6%. Auffällig ist, dass bei beiden Methoden die Werte der Arabinose und der 3-O-Methyl-Arabinose nicht gleichmäßig abnehmen. Der Anteil der Arabinose bleibt nahezu gleich, wohingegen der Wert der 3-O-Methyl-Arabinose stark abnimmt. Da die errechneten Uronsäureanteile unterhalb der nach Blumenkrantz erwarteten Werte lagen, wurde eine weitere Auswertungsmethode verwandt. Das nach Taylor und Conrad uronsäurereduzierte EPS wurde massenspektrometrisch untersucht. Um die deuterierten Fragmente hervorzuheben, wurde das Massenspektrum im Selective Ion Mode (SIM) aufgenommen. Es wurden die nicht deuterierten und die deuterierten Fragmente einzeln aufgenommen. Zur Auswertung wurde das Ionenpaar 289/291m/z herangezogen. Es ergab sich ein Anteil von 21,86% deuterierter Glucose. Bezogen auf den Gesamtzuckeranteil ergibt sich ein Wert von 12,75% deuterierter Glucose. Dieser Wert korreliert bei einer geringen Abweichung von 1% mit dem zuvor errechneten Wert.

Neutralzucker	Hauptfraktion	Hauptfraktion UF
3-O-Methylarabinose	20,0%	17,3%
Arabinose	30,6%	26,0%
Glucose	49,4%	56,7%

Tabelle 3.11: Neutralzuckerverhältnis der IAC-Hauptfraktion vor und nach einer Uronsäurereduktion
Hauptfraktion=UF-Uronsäurereduktion nach Fontaine

Die IAC-Hauptfraktion wurde mittels der Methode nach Fontaine reduziert. Der Anteil der Glucose nimmt um 7,3% zu. Im Gegensatz zur Reduktion des EPS nehmen die Anteile der Arabinose und 3-O-Methyl-Arabinose gleichmäßig ab.

Die Auswertung der gaschromatischen Auftrennung der PMAAs ergab folgende Daten:

PMAA	EPS	EPS UTC	EPS UF
1,4-Glucose (p)	2,0%	15,3%	21,7%

Tabelle 3.12: Verhältnis des deuterierten PMAAS des unfractionierten EPS
EPS UF=Uronsäurereduktion nach Fontaine; EPS UTC=Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad

Durch die Auswertung der Massenspektren konnte die 1,4-Glucose (p) als deuteriert identifiziert werden. Daraus ist zu schließen, dass sie vor der Reduktion als Glucuronsäure vorlag. Im Vergleich zum nicht-reduzierten EPS nimmt sie nach der Reduktion nach Taylor und Conrad um 13,3% zu; nach der Reduktion nach Fontaine sogar um 19,7%.

PMAA	Hauptfraktion	Hauptfraktion UF
1,4-Glucose (p)	1,2%	10,0%

Tabelle 3.13: Verhältnis des deuterierten PMAAS der IAC-Hauptfraktion
Hauptfraktion UF=Uronsäurereduktion nach Fontaine

Auch die Auswertung der Massenspektren der reduzierten IAC-Hauptfraktion identifizierte 1,4-Glucose (p) als deuteriert. Im Vergleich zur nicht reduzierten IAC-Hauptfraktion ergab sich ein Anstieg des 1,4-Glucose-Anteils um 8,8%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die nach der Reduktion ermittelten Werte nicht mit den photometrisch bestimmten Werten korrelieren. Sie liegen alle niedriger, einzig der Wert der 1,4-Glucose in der Auswertung der PMAAs nach der Reduktionsmethode nach Fontaine liegt in einem akzeptablen Bereich.

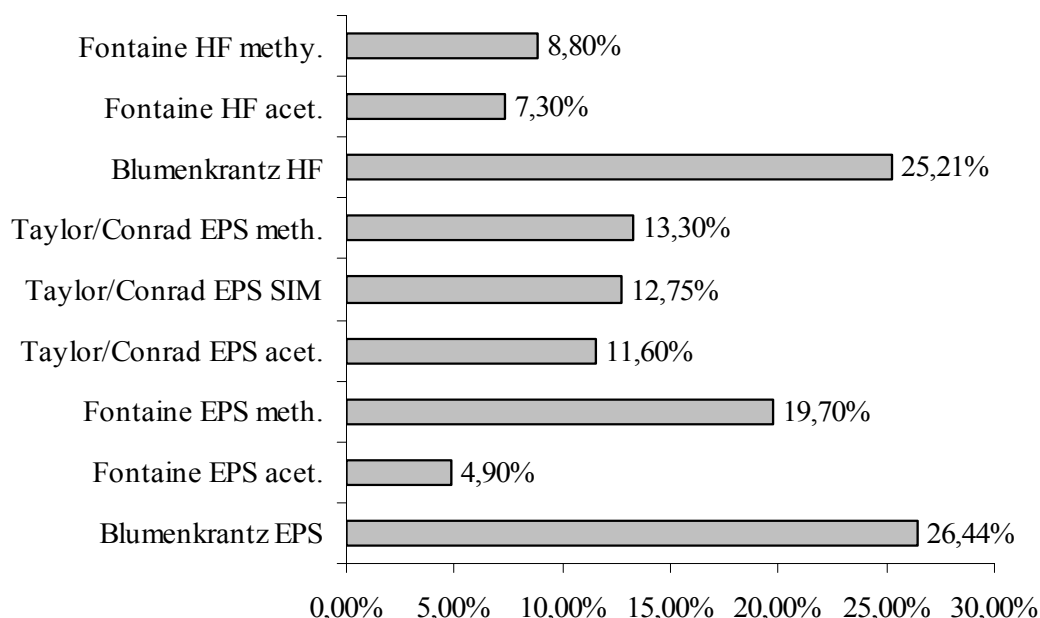


Abbildung 3.5: Vergleich des nach verschiedenen Methoden erhaltenen Uronsäuregehalts
meth.=Auswertung über die PMAAs; acet.=Auswertung über die Alditolacetate

3.11. Kombinierte Neutralzucker und Uronsäurebestimmung

Mittels Methanolyse und anschließender Silylierung können Uronsäuren parallel zu den Neutralzuckern in einer gaschromatischen Untersuchung bestimmt werden. Die Methanolyse wurde mit 0,5molarer und 2molarer methanolischen HCl durchgeführt. Untersucht wurde das unfraktionierte EPS.

Monosaccharid	0,5molare meth. HCl	2,0molare meth. HCl
3-O-Methyl-Arabinose	16,63%	16,24%
Arabinose	24,07%	18,51%
Glucose	42,10%	45,15%
Glucuronsäure	17,20%	20,11%

Tabelle 3.14: Monosaccharidzusammensetzung des unfraktionierten EPS

Die gefundenen Werte korrelieren mit denen aus der Acetylierungsanalyse nach Blakeney. Die 3-O-Methyl-Arabinose- und Arabinose-Anteile nehmen im Verhältnis stärker ab, als der Glucose-Anteil. Dies lässt darauf schließen, dass die Glucuronsäure am C1 an eine Glucose gebunden vorliegt und diese deshalb bei der Acetylierungsanalyse nicht miterfasst wurde. Aufgrund der hohen Korrekturfaktoren und der Tatsache, dass die Peaks der Glucose und der Glucuronsäure sich teilweise überlagern, können die erhaltenen Werte nur als Anhaltspunkt dienen.

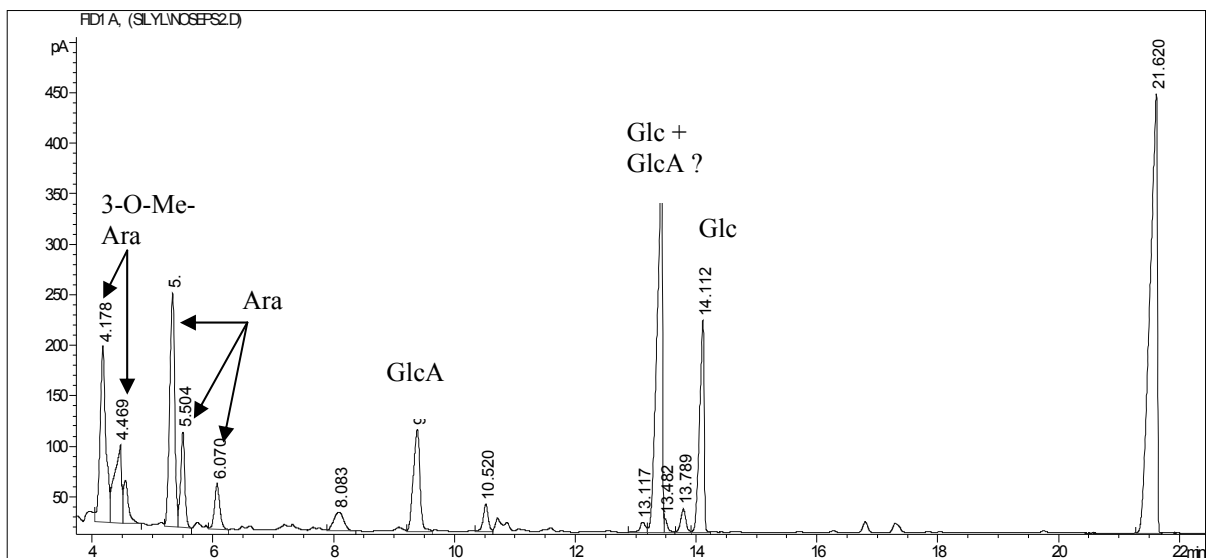


Abbildung 3.6: Gaschromatogramm des silylierten EPS nach Hydrolyse mit 2molare meth. HCl

3.12. Spaltung des Polysaccharides in definierte oder undefinierte Bruchstücke

3.12.1. Oxalsäurehydrolyse

Es wurde eine milde saure Hydrolyse mit Hilfe von Oxalsäure durchgeführt (Gleeson and Clarke, 1979). Die erhaltenen Bruchstücke wurden getrennt durch eine Ethanol-fällung in größere, mit Ethanol fällbare und kleine Bruchstücke, die sich in Ethanol lösen. Eingesetzt wurden 21,75mg des unfraktionierten EPS; nach der Hydrolyse blieb ein unlöslicher Rückstand von 7,83mg. Es konnten 0,6mg mit Ethanol gefällt werden. Der Überstand ergab 12,78mg, der Anteil an Oxalsäure sollte theoretisch 4,725mg betragen. Es ergibt sich ein Anteil von 8,055mg Bruchstücke im Überstand.

Die Auswertung erfolgte zunächst über die gaschromatische Auswertung der Alditolacetate. Der Überstand wurde hierbei zur Unterscheidung der Mono- und Oligosaccharide mit TFA hydrolysiert oder direkt reduziert und acetyliert.

Neutralzucker	EPS	Ethanol-fällung	Überstand	Überstand hydrolysiert
3-O-Methyl-Arabinose	22,6%	0,00%	83,29%	22,76%
Arabinose	30,7%	50,97%	12,20%	28,46%
Glucose	46,7%	49,03%	4,51%	48,78%

Tabelle 3.15: Neutralzuckerzusammensetzung der mit Ethanol fällbaren und nicht fällbaren Bruchstücke

Das Polysaccharid wird durch die Oxalsäure stark gespalten. Nur ein sehr kleiner Anteil der entstandenen Bruchstücke lässt sich mit Ethanol fällen. Sie bestehen aus ungefähr gleichen Anteilen Arabinose und Glucose, 3-O-Methyl-Arabinose ist nicht enthalten. Der größte Teil der 3-O-Methyl-Arabinose findet sich als Monosaccharid im Überstand, auch Arabinose und Glucose liegen in kleineren Anteilen als Monosaccharid im Überstand vor. Der nicht hydrolysierte Überstand ergab in der quantitativen Auswertung einen Neutralzuckeranteil von 14,87%. Nach der Hydrolyse ergab sich ein Neutralzuckeranteil von 75,43%; ca. 60% des Überstandes liegt somit als Oligosaccharide vor. Rechnet man die Monosaccharidanteile aus den Werten des hydrolysierten Überstands heraus, ergibt sich ein Anteil von 59,4% Glucose, 32,3% Arabinose und 8,3% 3-O-Methyl-Arabinose für die vorliegenden Oligosaccharide.

3.12.2. Lithiumdegradation

Metallisches, in Ethylendiamin gelöstes Lithium ist fähig, Polysaccharide in definierte Oligosaccharide zu spalten (Mort und Bauer, 1982; Lau, 1984). Es greift hierbei die Uronsäuren des Polysaccharides an und spaltet unter Degradation der Uronsäuren. Als Ausgangsmaterial wurden 10mg der IAC-Hauptfraktion verwendet. Die erhaltenen Bruchstücke wurden über eine Sepadex prep grade 30-Säule nach ihrem hydrodynamischen Volumen getrennt. Es wurden entsprechend des Eluationsverlaufes fünf Fraktionen aufgefangen.

Fraktion	Auffangvolumen	Auswertung nach Gefriertrocknung
1	0-40ml	kein Rückstand
2	40-65ml	1,66mg
3	100-108ml	kein Rückstand
4	108-111ml	97,77mg
5	111-155ml	hygroskopischer Rückstand

Tabelle 3.16: Gravimetrische Auswertung der aufgefangenen GPC-Fraktionen

Fraktion 2 und 4 enthielten Zuckeranteile und wurden für weitere Untersuchungen verwendet, wobei Fraktion 4 noch Lithiumanteile enthielt. Fraktion 5 enthielt nur Lithiumsalze und wurde daher nicht weiter berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte zunächst über die gaschromatische Auswertung der Alditolacetate.

Neutralzucker	Hauptfraktion	LiDe-Fraktion 2	LiDe-Fraktion 4
3-O-Methyl-Arabinose	24,14%	17,81%	3,30%
Arabinose	31,05%	24,10%	41,74%
Glucose	44,81%	58,09%	54,96%

Tabelle 3.17: Neutralzuckerzusammensetzung der LiDe-Fraktionen

LiDe=Lithiumdegradation

Der Anteil an Glucose ist in beiden LiDe-Fraktionen um ca. 10% höher als im Ausgangsmaterial, dies kann darauf hindeuten, dass die Uronsäuren hauptsächlich an Glucosen gebunden vorliegen und diese somit vor der Degradation nicht miterfasst wurden. Der Anteil an Arabinose ist in LiDe-Fraktion 4 deutlich größer als in LiDe-Fraktion 2; die 3-O-Methyl-Arabinose scheint in LiDe-Fraktion 4 zu Arabinose degradiert worden zu sein.

3.13. Bestimmung der Bindungstypen

3.13.1. Bindungstypanalyse der genuinen EPS und der IAC-Hauptfraktion

Die Bindungstypenanalyse wurde mittels Methylierung und anschließender gaschromatographischer und massenspektrometrischer Auswertung der erhaltenen PMAAs durchgeführt. Es wurden die Bindungstypen des unfraktionierten EPS und der IAC-Hauptfraktion bestimmt. Weiterhin wurden verschiedene Modifikationen des EPS und der IAC-Hauptfraktion untersucht.

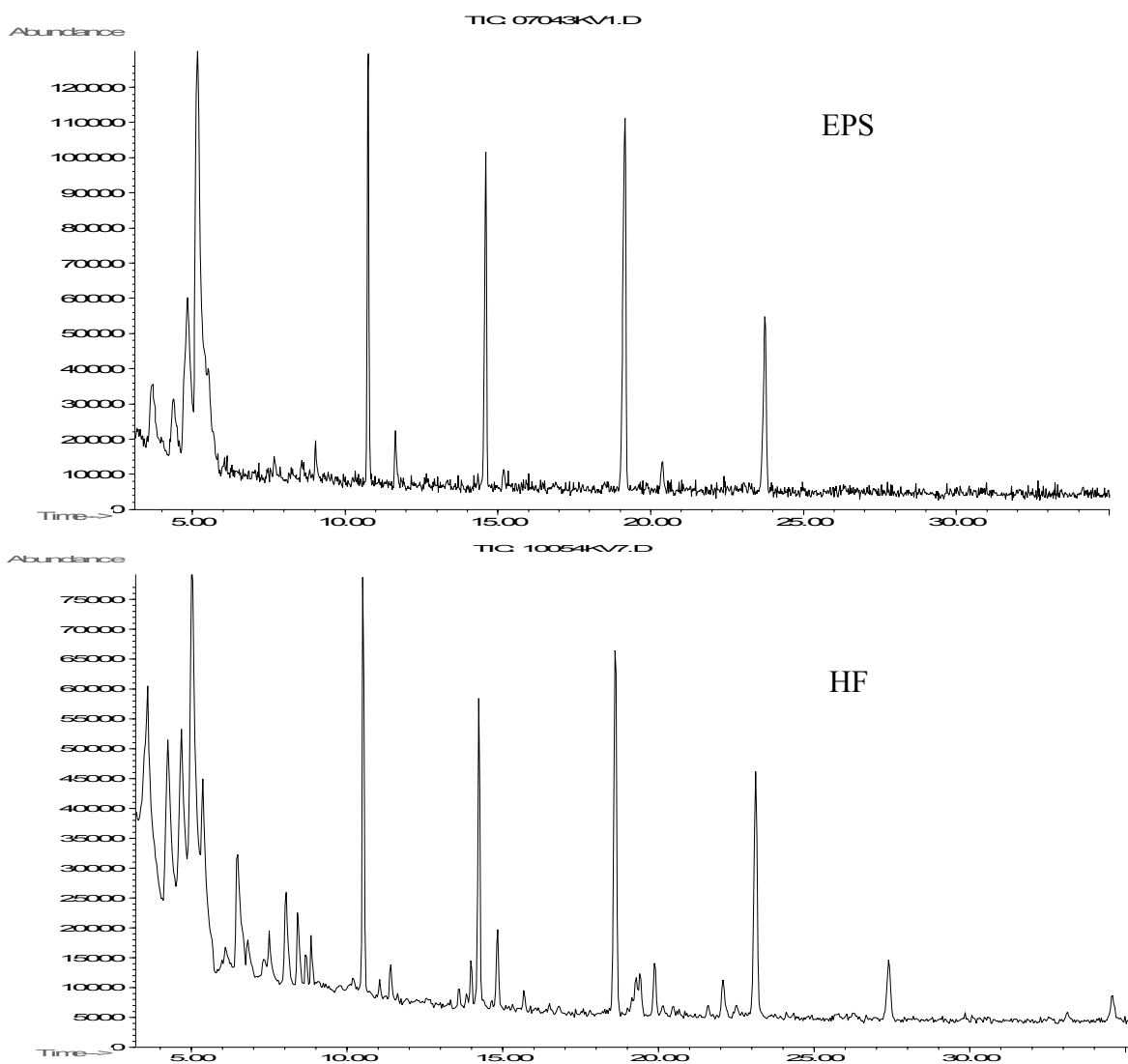


Abbildung 3.7: Darstellung der TICs des unfraktionierten EPS (EPS) und der IAC-Hauptfraktion (HF) nach Derivatisierung der Neutralzucker zu PMAAs und gaschromatographischer Trennung

PMAA	Hauptfraktion	EPS
1-Arabinose (f)	23,6%	26,0%
1-Arabinose (p)	5,4%	3,4%
1,5-Arabinose (f)	20,5%	22,0%
1-Glucose (p)	2,5%	0,0%
1,3-Glucose (p)	34,0%	32,1%
1,4-Glucose (p)	1,2%	2,0%
1,6-Glucose (p)	0,0%	0,0%
1,3,4-Glucose (p)	12,8%	14,5%

Tabelle 3.18: Bindungstypanalyse des unfraktionierten EPS und der IAC-Hauptfraktion

Die Bindungstypanalysen des unfraktionierten EPS und der IAC-Hauptfraktion zeigen nur geringe Unterschiede. Der Anteil an Arabinose ist für das EPS leicht erhöht. Dieses Ergebnis korreliert mit den in der Acetylierungsanalyse erhaltenen Werten. Das Verhältnis der Endgruppen zu den Verzweigungspunkten liegt für das EPS bei 2,46:1 und für die IAC-Hauptfraktion bei 2,03:1. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich das unfraktionierte EPS und die IAC-Hauptfraktion nicht signifikant unterscheiden.

3.13.2. Bindungstypanalyse nach Uronsäurereduktion

PMAA	EPS	EPS UTC	EPS UF
1-Arabinose (f)	26,0%	17,3%	17,0%
1-Arabinose (p)	3,4%	2,6%	0,0%
1,5-Arabinose (f)	22,0%	19,5%	17,2%
1-Glucose (p)	0,0%	0,0%	0,0%
1,3-Glucose (p)	32,1%	27,6%	14,8%
1,4-Glucose (p)	2,0%	15,3%	21,7%
1,6-Glucose (p)	0,0%	1,3%	4,8%
1,3,4-Glucose (p)	14,5%	16,6%	24,5%

Tabelle 3.19: Bindungstypanalyse des unfraktionierten EPS im Vergleich mit den EPS nach Uronsäurereduktion
 EPS UF=Uronsäurereduktion nach Fontaine; EPS UTC=Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad

Im Vergleich zum nichtreduzierten EPS zeigen die reduzierten EPS eine deutliche Erhöhung des 1,4- und 1,3,4-Glucose(p)-Anteils. Weiterhin wird erstmals ein geringer Anteil 1,6-Glucose(p) detektiert. Das nach Taylor und Conrad reduzierte EPS weist einen geringeren Anteil an 1,4- und 1,3,4-Glucose(p) auf als das nach Fontaine reduzierte EPS, dafür ist der 1,3-Glucose(p)-Anteil erhöht. Aufgrund des Massenspektrums konnte 1,4-Glucose(p) als Träger der Deuterierung identifiziert werden; es handelte sich vor der Reduktion also um Glucuronsäure. Bei allen anderen PMAAs lag keine Deuterierung vor. Nach der Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad ergibt sich somit ein Anteil von 39,4% Arabinose und 60,6% Glucose. Diese Werte entsprechen ungefähr den durch die Acetylierung erhalten Werten. Nach der Uronsäurereduktion nach Fontaine ergibt sich ein Anteil von 34,2% Arabinose und 65,8% Glucose. Die Acetylierung ergab hingegen einen Gehalt von 48,4% Arabinose und 51,6% Glucose. Das Verhältnis der Endgruppen zu den Verzweigungspunkten liegt für das nach Taylor und Conrad reduzierte EPS bei 1,2:1 und für das nach Fontaine reduzierte EPS bei 0,7:1 und damit näherungsweise bei dem theoretisch zu erwartenden Wert von 1:1.

PMAA	Hauptfraktion	Hauptfraktion UF
1-Arabinose (f)	23,6%	17,9%
1-Arabinose (p)	5,4%	4,1%
1,5-Arabinose (f)	20,5%	17,4%
1-Glucose (p)	2,5%	3,3%
1,3-Glucose (p)	34,0%	29,5%
1,4-Glucose (p)	1,2%	10,0%
1,6-Glucose (p)	0,0%	0,0%
1,3,4-Glucose (p)	12,8%	17,9%

Tabelle 3.20: Bindungstypanalyse des unfraktionierten EPS im Vergleich mit den EPS nach Uronsäurereduktion Hauptfraktion UF-Uronsäurereduktion nach Fontaine;

Die Bindungstypanalyse der uronsäurereduzierten IAC-HF zeigt ähnliche Verhältnisse wie die des uronsäurereduzierten EPS, nur die Zunahme an 1,4- und 1,3,4-Glucose(p) ist geringer. Auch in der Hauptfraktion zeigt nur das Massenspektrum der 1,4-Glucose(p) eine Deuterierung. Nach der Uronsäurereduktion ergibt sich ein Gehalt von 39,4% Arabinose und 60,6% Glucose. Die Acetylierungsanalyse ergab einen geringeren Glucose-Anteil von 56,7%. Das Verhältnis der Endgruppen zu den Verzweigungspunkten liegt bei 1,41:1.

3.13.3. Bindungstypanalyse nach Oxalsäurehydrolyse

Die bei der Oxalsäurehydrolyse erhaltenen Bruchstücke wurden in mit Ethanol fällbare und nichtfällbare Bruchstücke getrennt. Als Ausgangsprodukte wurden das unfraktionierte EPS sowie das nach Taylor und Conrad uronsäurereduzierte EPS verwendet.

PMAA	EPS	Ethanol-fällung	Ethanol-fällung UTC
1-Arabinose (f)	26,0%	3,9%	8,9%
1-Arabinose (p)	3,4%	0,0%	1,6%
1,5-Arabinose (f)	22,0%	21,2%	19,7%
1-Glucose (p)	0,0%	24,7%	7,4%
1,3-Glucose (p)	32,1%	38,7%	29,5%
1,4-Glucose (p)	2,0%	11,4%	24,8%
1,6-Glucose (p)	0,0%	0,0%	0,0%
1,3,4-Glucose (p)	14,5%	0,0%	8,0%

Tabelle 3.21: Bindungstypanalyse der mit Ethanol fällbaren Bruchstücke des unfraktionierten EPS mit und ohne Uronsäurereduktion

Die Ethanol-fällung zeigt eine deutliche Abnahme der terminalen Arabinosen und der 1,3,4-Glucose(p), wobei die Abnahme beim uronsäurereduzierten EPS nicht so stark ausgeprägt ist wie beim genuinen EPS. Der Anteil an 1,4-Glucose(p) erhöht sich deutlich, ebenso der Anteil an terminaler Glucose(p). Die Verhältnisse der Zunahme sind bei der Ethanol-fällung des genuinen EPS und der des uronsäurereduzierten EPS entgegengesetzt, da der Anteil der reduzierten Glucuronsäure ebenfalls im 1,4-Glucosepeak liegt.

PMAA	EPS	Überstand	Überstand UTC
1-Arabinose (f)	26,0%	17,6%	17,5%
1-Arabinose (p)	3,4%	14,2%	6,7%
1,5-Arabinose (f)	22,0%	16,6%	17,3%
1-Glucose (p)	0,0%	22,7%	7,8%
1,3-Glucose (p)	32,1%	17,9%	21,0%
1,4-Glucose (p)	2,0%	6,6%	23,0%
1,6-Glucose (p)	0,0%	2,0%	0,0%
1,3,4-Glucose (p)	14,5%	2,3%	6,6%

Tabelle 3.22: Bindungstypanalyse der nicht mit Ethanol fällbaren Bruchstücke des unfraktionierten EPS mit und ohne Uronsäurereduktion

Der Anteil der terminalen Komponenten überwiegt bei der Bindungstypanalyse der nicht mit Ethanol fällbaren Bruchstücke, da ein größerer Anteil als Monosaccharide vorliegt. Die Oligosaccharide enthalten anscheinend vorwiegend 1,5-Arabinose(f), 1,3-Glucose(p) und 1,4-Glucose(p), wobei der Anteil an 1,4-Glucose(p) im uronsäurereduzierten Überstand erwartungsgemäß wesentlich größer ist.

3.13.4. Bindungstypanalyse nach Lithiumdegradation

Die bei der Lithiumreduktion der Uronsäuren erhaltenen Bruchstücke wurden über eine Sephadex prep grade 30 Säule aufgetrennt. Als Ausgangsmaterial diente die IAC-Hauptfraktion.

PMAA	Hauptfraktion	LiDe-Fraktion 2	LiDe-Fraktion 4
1-Arabinose (f)	23,6%	12,6%	20,5%
1-Arabinose (p)	5,4%	0,0%	0,0%
1,5-Arabinose (f)	20,5%	11,3%	0,0%
1-Glucose (p)	2,5%	10,9%	0,0%
1,3-Glucose (p)	34,0%	25,8%	53,1%
1,4-Glucose (p)	1,2%	0,0%	0,0%
1,6-Glucose (p)	0,0%	28,1%	26,5%
1,3,4-Glucose (p)	12,8%	11,2%	0,0%

Tabelle 3.23: Bindungstypanalyse der Lithiumdegradations-Bruchstücke der IAC-Hauptfraktion

Beide LiDe-Fractionen bestehen hauptsächlich aus Glucose; der Arabinose-Anteil beträgt um 20%. Die Analyse der Alditolacetate ergab hingegen für beide Fraktionen einen Arabinose-Anteil von über 40%. Gegenüber den bisherigen Bindungsanalysen kann erstmals ein hoher Anteil von 1,6-Glucose(p) nachgewiesen werden. Er beträgt für LiDe-Fraktion-2 28,1% und für LiDe-Fraktion-4 26,5%. Insgesamt lässt sich folgern, dass der 1,6-Glucose-Anteil durch die Degradation entstanden ist und eventuell durch die Acetylierungsanalyse nicht mit erfasst wurde. LiDe-Fraktion 2 besteht aus Oligosacchariden, die noch 11,2% Verzweigungspunkte besitzen, im Unterschied zu LiDe-Fraktion-4 kommen auch 1,5-Arabinose(f)- und terminale Glucose(p)-Anteile vor. LiDe-Fraktion-4 ist weniger komplex aufgebaut und besteht zum Großteil aus 1,3-Glucose(p) sowie aus 1,6-Glucose(p) und terminaler Arabinose(f).

3.14. Quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils wurde mittels HPLC-Analytik mit Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin durchgeführt. Als Ausgangsprobe wurde die IAC-Hauptfraktion verwendet. Norleucin diente als interner Standard.

Aminosäure	Mengenanteil [mg/g]	Prozentgehalt (m/m) am Proteinanteil des EPS
Asparaginsäure	1,1	16,7
Threonin	0,4	6,1
Serin	0,8	12,1
Glycin	0,4	6,1
Glutaminsäure	1,1	16,7
Alanin	0,5	7,6
Valin	0,3	4,5
Cystin	n.v.	0,0
Methionin	0,1	1,5
Isoleucin	0,2	3,0
Leucin	0,4	6,1
Norleucin	Interner Standard	Interner Standard
Tyrosin	0,1	1,5
Phenylalanin	0,2	3,0
Histidin	0,1	1,5
Lysin	0,2	3,0
Arginin	0,1	1,5
Hydroxyprolin	n.v.	0,0
Prolin	0,6	9,1
Gesamt	5,9	0,66

Tabelle 3.25: Quantitative Aminosäurezusammensetzung der IAC-Hauptfraktion von *Nostoc insulare*

Es ergibt sich bezogen auf das Gesamt-EPS ein Proteinanteil von 0,66% (m/m). Hauptkomponenten sind Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin und Prolin. Mit Ausnahme von Hydroxyprolin und Cystin sind alle anderen Aminosäuren in kleineren Anteilen vorhanden.

3.15. Zusammenfassung

Das von *Nostoc insulare* gebildete EPS wird, den gefundenen Werten zufolge, während des gesamten Wachstumsverlaufs von 60 Tagen regelmäßig gebildet. Die Zunahme der Kohlenhydrate im Nährmedium erfolgt im beobachteten Wachstumszeitraum nahezu linear. Die Neutralzuckerzusammensetzung ändert sich über 100 Tage hinweg kaum. Das EPS besteht aus drei Neutralzuckern, namentlich 3-O-Methyl-Arabinose, Arabinose und Glucose und weiterhin aus einem größeren Anteil Glucuronsäure. Das hydrodynamische Volumen ist größer als 800.000Da, das mittlere Molekulargewicht beträgt 2.799.000Da. Bei der Bestimmung dieser Daten durch Gelpermeationschromatographie fiel auf, dass es sich nicht um ein einheitliches Polymer handelt. Bei langsamer Fließgeschwindigkeit spaltete sich die Peakspitze, am vorhandenen Säulenmaterial konnte aber keine ausreichende Trennung erfolgen. Die Trennung wurde folglich über eine andere Methode versucht. Es wurde die Ionenaustauschchromatographie angewandt und das EPS über seine unterschiedlichen Ladungsdichten aufgetrennt. Es konnten vier Fraktionen getrennt werden. Sie unterschieden sich kaum hinsichtlich ihrer Neutralzuckerzusammensetzung. Auch konnte nur ein sehr geringer Unterschied zwischen der Hauptfraktion und dem unfraktionierten EPS hinsichtlich des Uronsäuregehaltes festgestellt werden. Auch in weiteren Untersuchungen verhielt sich die Hauptfraktion ebenso wie das unfraktionierte EPS. Es kann darum angenommen werden, dass es sich bei den aufgetrennten Fraktionen nur um unterschiedliche Polymerisationsgrade, aber nicht um unterschiedliche Polymere handelt. Substituenten wie Pyruvat, Acetat oder Sulfat konnten nicht oder nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Die Bindungstypenanalysen des EPS und der Hauptfraktion zeigten, dass das Polymer im Wesentlichen aus terminaler Arabinose(f), 1,5-Arabinose(f), 1,3-Glucose(p) und 1,3,4-Glucose(p) besteht. Das Verhältnis der terminalen Zucker zu den Verzweigungszuckern liegt bei 2:1. Normalerweise sollte es ungefähr 1:1 betragen, da für jede Verzweigung ein terminaler Zucker hinzukommt. Die Bestimmung des Uronsäuregehaltes über verschiedene Methoden lieferte sehr unterschiedliche Werte. Besonders die Ergebnisse der Acetylierungsanalyse der uronsäurereduzierten EPS ergaben sehr niedrige Uronsäureanteile, die nur durch eine unvollständige Hydrolyse zu erklären sind. Diese könnte aus der schlechten Löslichkeit der EPS und ihrer Neigung zur Gelbildung herrühren. Nach der Methylierungsanalyse der uronsäurereduzierten EPS ergaben sich Uronsäureanteile, die wesentlich höher lagen. Die Bindungstypenanalyse des uronsäurereduzierten EPS zeigte durch die Deuterierung deutlich, dass die Uronsäure im EPS als 1,4-Glucuronsäure(p)

vorliegt. Der Anstieg des 1,3,4-Glucose(p)-Anteils weist darauf hin, dass diese im Polysaccharid unter anderem an das C1 der Uronsäure gebunden vorliegt (Abbildung 5.6: 1), und dieser Anteil daher ohne Reduktion vorher nicht miterfasst wurde. Das Verhältnis der terminalen Zucker zu den Verzweigungspunkten verschiebt sich auf den erwarteten Wert von ungefähr 1:1. Durch Aufspaltung der Polysaccharide in kleinere Bruchstücke sollten weitere Erkenntnisse über ihren Aufbau gewonnen werden. Es wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Bei der Oxalsäurehydrolyse wurden labilere Bindungen, an denen Arabinose beteiligt war, gespalten. Das Polysaccharid wurde hierbei nahezu vollständig in so kleine Oligosaccharide gespalten, dass diese nicht mehr mit Ethanol fällbar waren. Es kann festgehalten werden, dass die Arabinose-Anteile nicht nur als Seitenketten vorliegen, sondern in kontinuierlicher Abfolge im Polysaccharid vorkommen. Der 3-O-Methyl-Arabinose-Anteil wurde hauptsächlich als Monosaccharid abgespalten. Im mit Ethanol fällbaren Anteil ist keine 3-O-Methyl-Arabinose nachweisbar. In der Methylierungsanalyse zeigt sich, dass die Oligosaccharide des mit Ethanol fällbaren Anteils kaum terminale Arabinose aufweisen, aber in etwa noch den gleichen Anteil 1,5-Arabinose(f). Aus diesen Fakten lässt sich schließen, dass die 3-O-Methyl-Arabinose größtenteils terminal-gebunden vorliegt und die Arabinose an C1 und an C5 gebunden vorkommt. Zu beachten ist, dass die 1,5-Arabinose(f) nach der Oxalsäurehydrolyse wahrscheinlich nur noch am C5 gebunden ist. Da das Polysaccharid in Oligosaccharide gespalten wurde, müssen in der Hauptkette Spaltungen vorgenommen worden sein. Diese finden bei der Oxalsäurehydrolyse fast ausschließlich an Pentosen und Desoxyhexosen statt; daher muss in diesem Fall die Spaltung an den Arabinosen stattgefunden haben. Durch Abspaltung der terminalen Arabinosen werden hauptsächlich Verzweigungen abgespalten. Somit müssen die 1,5-Arabinosen(f) der Angriffspunkt für die Spaltung in Oligosaccharide sein. Da aufgrund der instabilen Bindung des Methylrestes am C1 der Methylrest bei der Acetylierung wieder abgespalten wird, wird eine Bindung am C1 vorgetäuscht. Diese Position muss folglich durch die Oxalsäurehydrolyse gespalten worden sein, woraus sich der Zerfall des Polysaccharids in kleinere Oligosaccharide ergibt. Wegen der Abnahme der 1,3-Glucose(p) und der Zunahme von 1-Glucose nach der Spaltung ist anzunehmen, dass die 1,5-Arabinose(f) genuin über C1-OH an das C3-OH der 1,3-Glucose(p) gebunden vorlag (Abbildung 3.6: 5). Fraglich ist warum die Bindungen der Arabinosen am C5 nicht auch gespalten wurden, offensichtlich ist diese stabiler und wird eventuell durch besondere Gegebenheiten im Polysaccharid stabilisiert. Die Verzweigungen in Form von 1,3,4-Glucose(p) nehmen in beiden Oligosaccharid-Fractionen ab. In der mit Ethanol fällbaren Fraktion sind sogar keine Verzweigungen mehr nachzuweisen. Dieser Umstand lässt

darauf schließen, dass die Verzweigungen hauptsächlich durch 3-O-Methylarabinose gebildet wurden, da sie in dieser Fraktion ebenfalls fehlen. Die Verzweigung zur 3-O-Methyl-Arabinose befand sich wahrscheinlich am C3 der 1,3,4-Glucose(p), da der 1,4-Glucose(p)-Anteil in beiden Oligosaccharid-Fractionen zunimmt (Abbildung 3.6: 2). Sowohl in den fällbaren Oligosacchariden als auch in den Oligosacchariden des Überstandes kann nach der Uronsäurereduktion deuterierte 1,4-Glucose(p) nachgewiesen werden. In beiden Fällen geht der Anstieg der 1,4-Glucose(p) mit einem Anstieg der 1,3,4-Glucose(p) einher. Des Weiteren kann nach der Reduktion auch wieder ein größerer Anteil terminaler Arabinose(f) nachgewiesen werden. Die Bindung der 1,3,4-Glucose(p) an das C1 der Uronsäure stabilisiert somit anscheinend auch die Bindung der terminalen Arabinose an die 1,3,4-Glucose(p) (Abbildung 3.6: 3). Als weitere degradative Methode wurde die Lithiumdegradation eingesetzt, über die definierte Bruchstücke durch die Spaltung an den Stellen der Uronsäuren erhalten werden sollten. Über die Auftrennung an einer Gelpermeationssäule für Oligosaccharide konnten zwei Fraktionen mit verschiedenem hydrodynamischem Volumen aufgefangen werden. Beide Fraktionen enthalten einen Anteil von annähernd 25% 1,6-Glucose(p), dieser Bindungstyp konnte in den Methylierungsanalysen des genuinen EPS und in den anderen Modifikationen bisher nur in Spuren nachgewiesen werden. Daher ist anzunehmen, dass es sich um die degradierte Uronsäure handelt. Diese liegt nach Gloaguen nach der Degradation je nach genuinem Bindungstyp als Tetrahydroxycyclopentansäure oder zerstört vor. Fraglich ist, ob diese während der Methylierungsanalyse unter den gegebenen Bedingungen eine Umlagerung erfährt und eventuell anschließend als 1,6-Glucose(p) erscheint. Diese These wird unterstützt von der Tatsache, dass bei der Acetylierungsanalyse noch ein um 20% größerer Anteil Arabinose nachgewiesen wird. Hierbei würden Tetrahydroxycyclopentansäure oder kleinere Degradationsprodukte aufgrund ihrer Struktur nicht miterfasst werden, da sie sehr früh, wahrscheinlich mit den Lösungsmitteln, eluiert würden. Eine Umlagerung während der Acetylierungsanalyse ist aufgrund der Reaktionsbedingungen unwahrscheinlich. Für die Auswertung wird daher angenommen, dass es sich bei der 1,6-Glucose(p) um die vormalige Glucuronsäure handelt. Die Fraktion mit dem kleineren hydrodynamischen Volumen zeigte einen entsprechend wenig komplexen Aufbau aus terminaler Arabinose, 1,3-Glucose(p) und 1,6-Glucose(p) im annähernden Verhältnis 1:2:1. Die Fraktion mit dem größeren hydrodynamischen Volumen zeigt einen komplexeren Aufbau aus terminaler Arabinose(f), 1,5-Arabinose(f), terminaler Glucose(p), 1,3-Glucose(p), 1,6-Glucose(p) und 1,3,4-Glucose(p) im annähernden Verhältnis 1:1:1:2:2:1. Aufgrund des Verhältnisses der

einzelnen Bestandteile zueinander ist nicht zu klären, ob es sich nur um ein Oligosaccharid handelt oder um ein Gemisch aus verschiedenen. 1,6-Glucose(p) kann durch die Degradationsreaktion in jedem Oligosaccharid nur einmal, nämlich am reduzierenden Ende vorkommen. Daher muss sich bei der zweiten Fraktion um ein Gemisch handeln. Aus vorherigen Versuchen ging hervor, dass ein Großteil der Glucuronsäure an 1,3,4-Glucose(p) gebunden vorliegt; die Bindung erfolgt hierbei über das C1 der Glucuronsäure und über das C4 der 1,3,4-Glucose(p). Bei der Degradation entsteht daher aus der 1,3,4-Glucose(p) eine 1,3-Glucose(p), die am C3 an eine terminale Arabinose gebunden ist. Diese Verhältnisse finden sich in den Fraktionen der Lithiumdegradation wieder. Aus den molekularen Verhältnissen in Fraktion 4 kann weiterhin eine Bindung einer 1,3-Glucose(p) an die ehemalige 1,3,4-Glucose(p) gefolgert werden (Abbildung 5.6: 4). Die Interpretation der Fraktion 2 stellt sich schwieriger dar, da nicht klar ist, welche Bindungstypen zu welchem Oligosaccharid gehören.

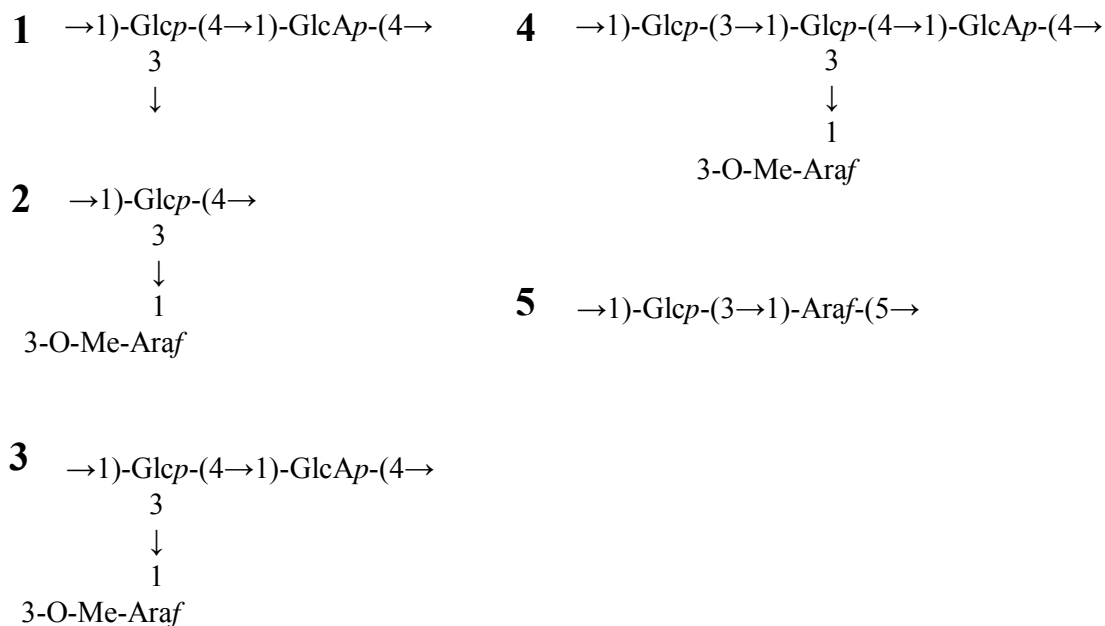


Abbildung 3.8: Strukturmerkmale des EPS von *Nostoc insulare*

Der Proteinanteil aus der Aminosäure-Analyse errechnet liegt mit 0,66% sehr niedrig, so dass nicht von einem Glykoprotein gesprochen werden kann. Es handelt sich bei dem von *Nostoc insulare* produzierten EPS also um ein Polysaccharid. Bei dem geringen Proteinanteil handelt es sich wahrscheinlich um assoziiertes Protein, dass bei der Aufreinigung nicht abgetrennt wurde.

4. Ergebnisse: *Chroococcus minutus*

4.1. Taxonomie und Merkmale

Ordnung	<i>Chroococcales</i>
Familie	<i>Chroococaceae</i>
Gattung	<i>Chroococcus</i> L.
Art	<i>Chroococcus minutus</i> L.

Chroococcus minutus ist ein coccoidales Cyanobakterium. Die Zellen liegen als Coenobien vor, das heißt es liegen immer zwei Zellen durch eine Gallerthülle miteinander verbunden vor und täuschen somit eine kurze Kettenbildung vor. Die Vermehrung erfolgt durch Teilung, die entstandenen jungen Tochterzellen sind halbkugelig. *Chroococcus minutus* hat nicht die Fähigkeit Stickstoff zu fixieren. *Chroococcus*-Arten gehören zu den größten Cyanobakterien, ihr Durchmesser ist bis zu 50mal größer als etwa der der Zellen von *Nostoc*-Trichomen. *Chroococcus*-Arten sind häufig anzutreffen in gallertartigen Überzügen an feuchten Felsen und Mauern (Tintenstriche).

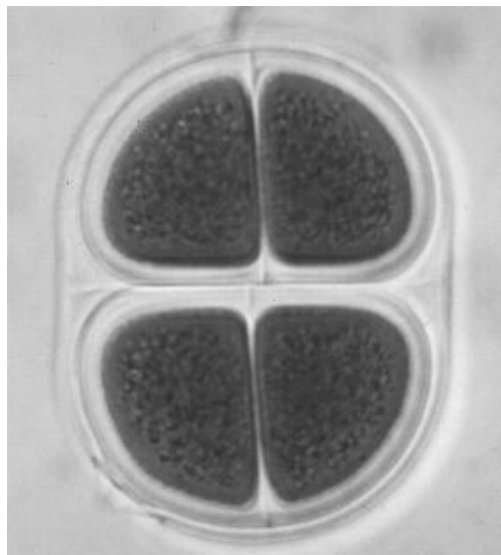


Abbildung 4.1: Teilung einer zweizelligen Coenobie einer *Chroococcus* sp.
(Photo: www.uni-marburg.de)

4.2. Wachstumskurven

4.2.1. Biomasse

Die vorliegenden Daten zeigen den Wachstumsverlauf einer 8L-Batchkultur von *Chroococcus minutus* über 60 Tage. Die Biomasse wurde hierbei als Trockenmasse bestimmt:

Tage	Stand in cm	Absorbtion	Verdünnung	Restvolumen in ml	Biomasse in µg/ml	korr. Biomasse in µg/ml
1	0	0,021		8000,0	9,0	9,0
4	0,8	0,044		7706,4	18,8	18,1
8	1,8	0,235		7339,5	100,6	92,3
11	2,3	0,427		7156,0	182,8	163,5
15	3	0,606		6899,1	259,4	223,7
18	3,3	0,384	1+1	6789,0	328,7	278,9
22	3,9	0,447	1+1	6568,8	382,6	314,2
25	4,5	0,562	1+1	6348,6	481,1	381,8
29	5,3	0,659	1+1	6055,0	564,1	427,0
32	5,7	0,484	1+2	5908,3	621,5	459,0
36	6,7	0,615	1+2	5541,3	789,7	547,0
39	7,3	0,528	1+3	5321,1	903,9	601,2
43	7,9	0,616	1+3	5100,9	1054,6	672,4
46	8,5	0,551	1+4	4880,7	1179,1	719,4
50	9,6	0,495	1+5	4477,1	1271,2	711,4
53	10,2	0,584	1+5	4256,9	1499,7	798,0
57	10,9	0,531	1+6	4000,0	1590,9	795,4
60	11,8	0,387	1+10	3669,7	1822,0	835,8

Tabelle 4.1: Auswertung der photometrisch erhaltenen Daten einer 8L-Batchkultur von *Chroococcus minutus*

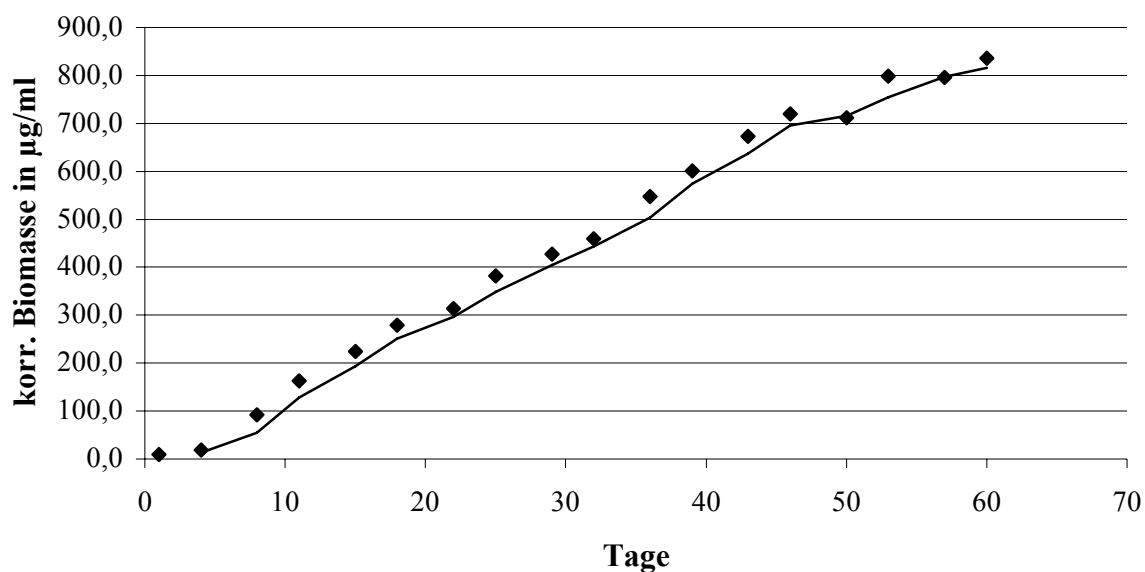


Diagramm 4.1: Wachstumskurve von *Chroococcus minutus*

Ergebnisse

Nach 60 Tage betrug die Gesamtbio­masse 66,65g Trockengewicht auf 8L Nährlösung, dies entspricht 8,33g/L.

Die Auszählung der Individuen mittels einer Neubauer-improved Zählkammer der 0,1µl Quadrate ergab folgende Verteilung

Quadrat 1	Individuen	Quadrat 2	Individuen	Quadrat 3	Individuen	Quadrat 4	Individuen
1.1	34	2.1	32	3.1	38	4.1	31
1.2	38	2.2	34	3.2	36	4.2	42
1.3	43	2.3	28	3.3	23	4.3	21
1.4	30	2.4	38	3.4	37	4.4	23
1.5	35	2.5	29	3.5	21	4.5	36
1.6	32	2.6	34	3.6	35	4.6	38
1.7	29	2.7	28	3.7	34	4.7	34
1.8	31	2.8	27	3.8	30	4.8	23
1.9	24	2.9	23	3.9	37	4.9	35
1.10	31	2.10	31	3.10	39	4.10	39
1.11	22	2.11	26	3.11	27	4.11	27
1.12	37	2.12	33	3.12	42	4.12	23
1.13	35	2.13	24	3.13	29	4.13	30
1.14	29	2.14	36	3.14	32	4.14	31
1.15	29	2.15	34	3.15	24	4.15	34
1.16	27	2.16	30	3.16	29	4.16	36
Summe	506	Summe	487	Summe	513	Summe	503

Tabelle 4.2: Auszählung einer *Chroococcus minutus*-Kultur nach 60 Tage

Der Mittelwert ergibt eine Individuenzahl von 5022,5 Individuen/µl, hochgerechnet ergibt sich eine Individuenanzahl von $7,76 \cdot 10^{10}$ in der Gesamtkultur von 8L, dies entspricht $9,7 \cdot 10^9$ Individuen/L.

4.2.2. Kohlenhydrate

Die vorliegenden Daten zeigen die Zunahme an Kohlenhydraten in der Nährlösung über 60 Tage einer 8L-Batch-Kultur von *Chroococcus minutus*. Der Kohlenhydratgehalt wurde photometrisch nach Dubois ermittelt.

Tage	Stand in cm	Restvolumen in ml	Absorbtion 490nm	Verdünnung	Kohlenhydrate in µg/ml	korr. Kohlenhydrate in µg/ml
1	0	8000,0	0,177		16,5	16,5
4	0,8	7706,4	0,268		27,5	26,5
8	1,8	7339,5	0,23		22,9	21,0
11	2,3	7156,0	0,308		32,3	28,9
15	3	6899,1	0,425		46,4	40,0
18	3,3	6789,0	0,559		62,5	53,1
22	3,9	6568,8	0,694		78,8	64,7
25	4,5	6348,6	0,361	1+1	77,4	61,4
29	5,3	6055,0	0,411	1+1	89,4	67,7
32	5,7	5908,3	0,448	1+1	98,3	72,6
36	6,7	5541,3	0,556	1+1	124,4	86,1
39	7,3	5321,1	0,62	1+1	139,8	93,0
43	7,9	5100,9	0,415	1+3	180,8	115,3
46	8,5	4880,7	0,449	1+3	197,2	120,3
50	9,6	4477,1	0,455	1+3	200,0	112,0
53	10,2	4256,9	0,471	1+3	207,8	110,6
57	10,9	4000,0	0,564	1+3	252,6	126,3
60	11,8	3669,7	0,643	1+3	290,7	133,3

Tabelle 4.3: Auswertung der photometrischen Kohlenhydratbestimmung nach Dubois bei 490nm

Tage	Stand in cm	Restvolumen in ml	Absorbtion 480nm	Verdünnung	Kohlenhydrate in µg/ml	korr. Kohlenhydrate in µg/ml
1	0	8000,0	0,176		16,1	16,1
4	0,8	7706,4	0,265		26,2	25,2
8	1,8	7339,5	0,228		22,0	20,2
11	2,3	7156,0	0,307		30,6	27,4
15	3	6899,1	0,426		43,6	37,6
18	3,3	6789,0	0,537		58,5	49,7
22	3,9	6568,8	0,689		73,5	60,4
25	4,5	6348,6	0,359	1+1	73,0	58,0
29	5,3	6055,0	0,41	1+1	84,2	63,7
32	5,7	5908,3	0,454	1+1	92,4	68,2
36	6,7	5541,3	0,543	1+1	116,4	80,6
39	7,3	5321,1	0,64	1+1	130,6	86,9
43	7,9	5100,9	0,394	1+3	170,1	108,5
46	8,5	4880,7	0,468	1+3	185,2	113,0
50	9,6	4477,1	0,465	1+3	187,9	105,1
53	10,2	4256,9	0,475	1+3	195,0	103,7
57	10,9	4000,0	0,59	1+3	236,3	118,2
60	11,8	3669,7	0,675	1+3	271,4	124,5

Tabelle 4.4: Auswertung der photometrischen Kohlenhydratbestimmung nach Dubois bei 480nm

Graphisch übertragen ergab sich folgendes Diagramm für die Zunahme der Kohlenhydrate im Nährmedium:

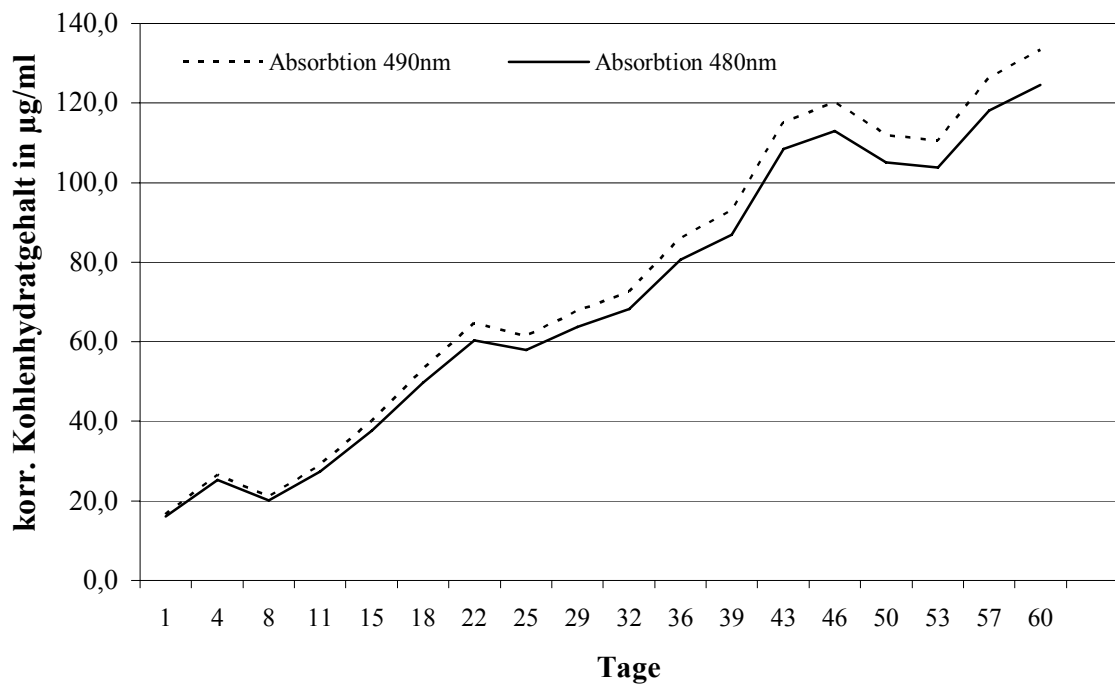


Diagramm 4.2: Zunahme des Kohlenhydratgehalts einer *Chroococcus minutus* 8L-Batch-Kultur

Die von der Biomasse befreite Nährlösung wurde dialysiert und gefriergetrocknet. Es ergab sich ein Roh-EPS-Gehalt von 14,689g für eine 8L-Kultur, dies entspricht 1,84g/L.

10g der von der Biomasse befreiten Nährlösung wurden in Wasser solvatisiert und zur Proteinfällung erhitzt. Es wurden 0,53g Proteine gefällt. Das EPS wurde per Ethanol-fällung von den Salzen, Monosacchariden und Oligosacchariden getrennt. Der Überstand der Ethanol-fällung ergab 7,51g. Die Fällung wurde dialysiert. Es wurden 1,26g aufgereinigtes EPS erhalten. Damit beträgt der EPS-Gehalt 1,26% des Roh-EPS-Gehaltes.

4.3. Identifizierung unbekannter Zucker

Nach ersten Untersuchungen der Neutralzuckerzusammensetzung konnten fünf Peaks keinem Standard zugeordnet werden. Die relative Retentionszeit zu myo-Inositol lag für zwei dieser Peaks unter der von Rhamnose (P1 und P2). Drei Peaks lagen unterhalb von Mannose, aber überhalb von Xylose (P3, P4 und P5).

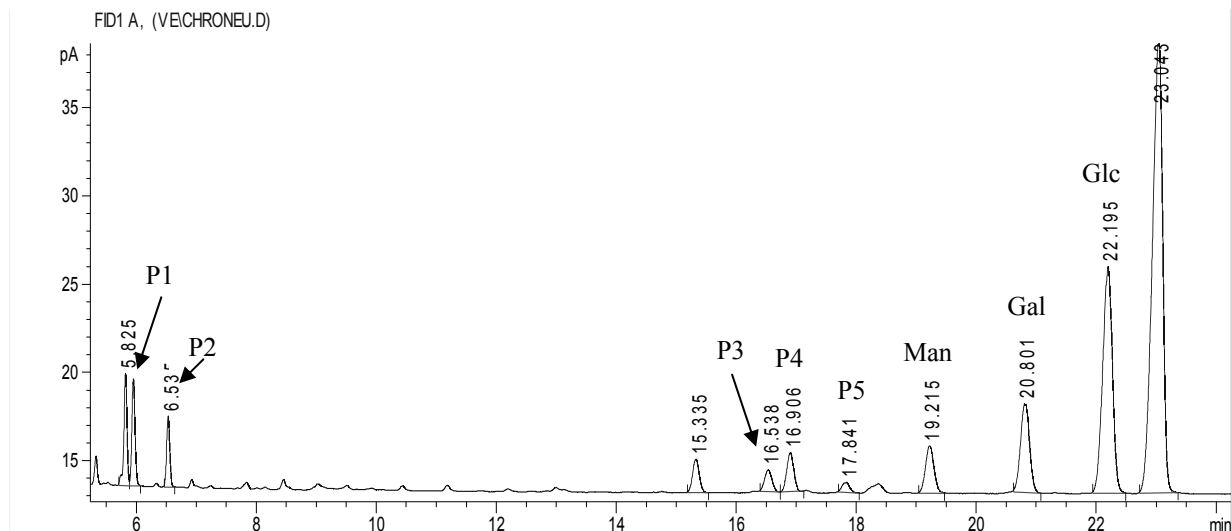


Abbildung 4.2: Gaschromatogramm eines acetylierten, aufgereinigten, EPS aus einer 60tägigen Batch-Kultur

Die zwei im Chromatogramm auftretenden Peaks bei der Retentionszeit von 5,825 und 15,335 wurden durch Auswertung ihrer Massenspektren als keine Zucker identifiziert, sie stellen wahrscheinlich Verunreinigungen durch Reagenzien dar. Durch die Auswertung der Massenspektren der acetylierten Verbindungen konnte Peak P2 als 2-O-Methyl-Rhamnose, Peak P3 als eine 2-O-Methyl-Hexose, Peak P4 ebenfalls als eine 2-O-Methyl-Hexose und Peak P5 als 3-O-Methyl-Hexose identifiziert werden. Eine genaue Zuordnung der verschiedenen Hexosen konnte aufgrund der sich stark ähnelnden Massenspektren nicht vorgenommen werden. Peak 1 konnte nicht identifiziert werden, aufgrund des Massenspektrums kann aber davon ausgegangen werden, dass es sich um einen Zucker handelt. Aufgrund der Retentionszeit ist davon auszugehen, dass es sich um einen mit lipophilen Komponenten substituierten Zucker handelt. Weiterhin kann man aufgrund der Retentionszeit von einer Pentose oder einem Desoxyzucker ausgehen.

Ergebnisse

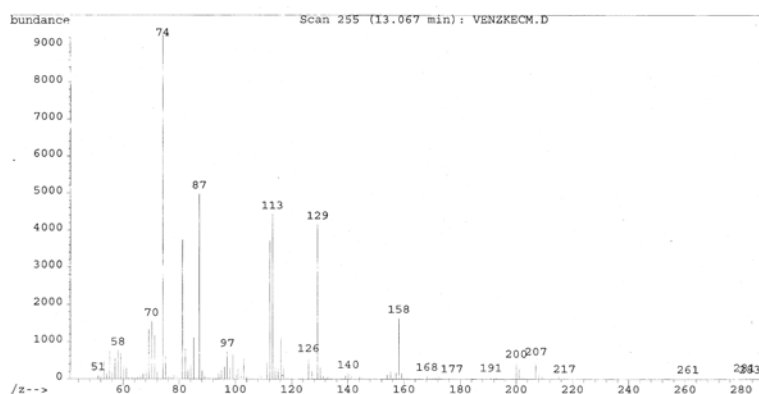


Abbildung 4.3: Massenspektrum des acetylierten unbekanntes Monosaccharids P1

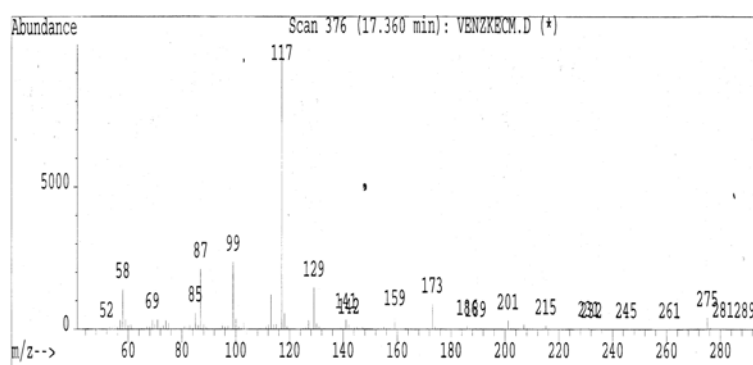


Abbildung 4.4: Massenspektrum der acetylierten 2-O-Methyl-Rhamnose

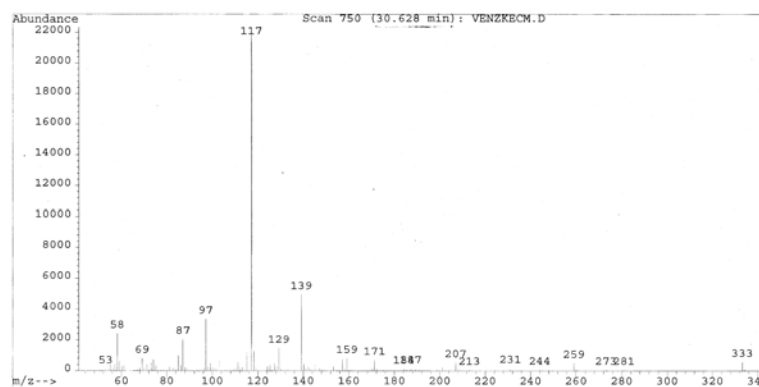


Abbildung 4.5: Massenspektrum der acetylierten 2-O-Methylhexose

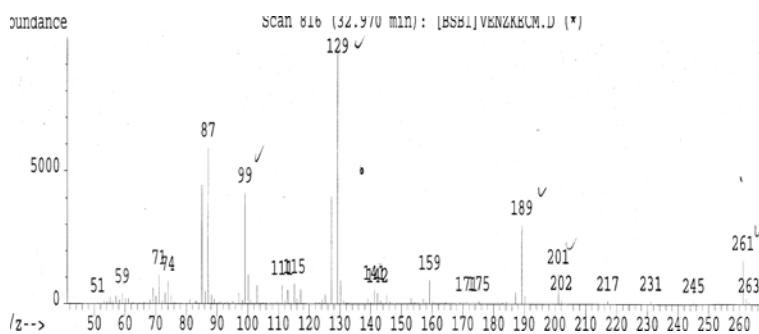


Abbildung 4.6: Massenspektrum der acetylierten 3-O-Methylhexose

4.4. Kontinuität der EPS-Zusammensetzung im Wachstumsverlauf

Zur Kontrolle, ob sich die abgegeben EPS in ihrer Zusammensetzung stark mit der Wachstumszeit verändern, wurden weitere Batchkulturen angesetzt; eine wurde nach 30 Tagen abgeerntet, die andere nach 100 Tagen. Die Nährlösungen wurden aufgearbeitet. Zum Vergleich wurden die verschiedenen EPS mittels der Methode nach Blakeney auf ihre Neutralzuckerzusammensetzung untersucht.

Neutralzucker	EPS 30Tage	EPS 60Tage	EPS 100Tage
unknown	6,3%	6,9%	10,7%
2-O-Methyl-Rhamnose	5,4%	4,5%	11,1%
2-O-Methylhexose	0,0%	4,5%	14,7%
2-O-Methylhexose	3,4%	5,4%	9,1%
3-O-Methylhexose	1,3%	1,6%	4,6%
Mannose	12,4%	8,6%	4,2%
Galactose	18,2%	16,9%	5,4%
Glucose	52,9%	51,6%	40,3%

Tabelle 4.5: Vergleich des Neutralzuckerhältnisses in EPS unterschiedlich alter Batch-Kulturen

Die Neutralzuckerhältnisse des EPS aus *Chroococcus minutus* verändern sich kontinuierlich über den Wachstumsverlauf. Nach 30 Tagen besteht das EPS noch hauptsächlich aus den Neutralzuckern Mannose, Galactose und Glucose, ein geringer Anteil methylierter Monosaccharide von 16,4% ist schon vorhanden. Der methylierte Anteil an Monosacchariden steigt im weiteren Wachstumsverlauf auf bis zu 50,2% nach 100 Tagen an. Einen besonders starker Anstieg erfolgt bei der ersten 2-O-Methylhexose, sie ist nach 30 Tagen noch gar nicht vorhanden, nach 100 Tagen hat sie einen Anteil von 14,7%.

4.5. Elementaranalyse

Die Elementaranalyse der aufgereinigten 60 Tage alten EPS ergab einen Kohlenstoffanteil von 37,382%, einen Wasserstoffanteil von 6,621% und einen Stickstoffanteil von 0,584%, es wurde kein Schwefel nachgewiesen.

4.6. Bestimmung des hydrodynamischen Volumens mittels Gelpermeationschromatographie

Mittels Gelpermeationschromatographie sollten das hydrodynamische Volumen des isolierten EPS anhand einer Eichreihe mit Pullulanen sowie das Molekulargewicht anhand der Berechnungen des MALLS-Detektors bestimmt werden. Die Trennung erfolgte an einer Sephadex SR-400-Säule, die einen Trennbereich von 20.000-8.000.000Da für globuläre Moleküle und 10.000-2.000.000Da für Dextrane aufweist.

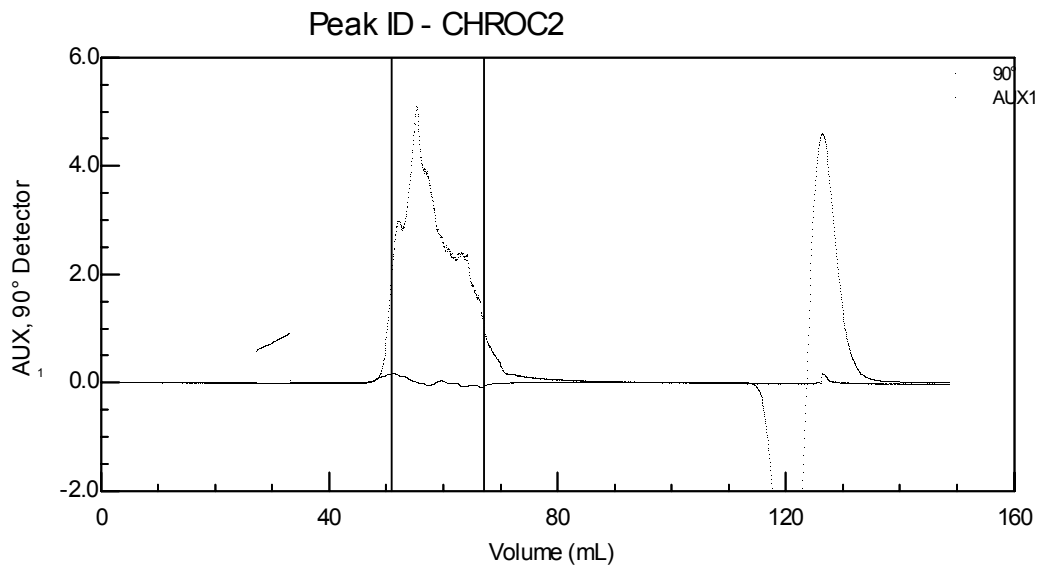


Abbildung 4.7: Gelpermeations-Chromatogramm des isolierten EPS von *Chroococcus minutus* bei 0,688ml/min Detektion über MALLS-Detektor (obere Linie) und RI-Detektor (untere Linie)

Bei einer normalen Flußgeschwindigkeit von 1ml/min ergab sich ein Chromatogramm mit einem Peak bei einem mittleren Elutionsvolumen von 55,0ml. Bei geringerer Fließgeschwindigkeit (bis zu 0,3ml/min) spalteten sich die Peakspitze auf, aber auch bei sehr niedriger Flußgeschwindigkeit konnten keine fraktionierbaren Peaks erhalten werden. Das abgebildete Chromatogramm wurde bei einer relativ niedrigen Fließgeschwindigkeit von 0,688ml/min aufgezeichnet, der zweite Peak bei einem Elutionsvolumen von 130ml ist ein Luftartefakt. Es ist festzuhalten, dass es sich bei dem isolierten EPS um ein heterogenes Gemisch handelt, das aber am vorliegenden Säulenmaterial nicht getrennt werden kann. Die Berechnung des hydrodynamischen Volumens ergab einen Mittelwert von 995.000Da, damit liegt das hydrodynamische Volumen der EPS außerhalb der Pullulan-Eichreihe, mit Sicherheit kann also nur hydrodynamisches Volumen von über 800.000Da angenommen werden. Die Berechnungen des MALLS-Detektors ergaben ein mittleres Molekulargewicht von 3.316.000Da.

4.7. Fraktionierung des Exopolysaccharidgemisches mittels Ionenaustauschchromatographie

Die Fraktionierung des Exopolysaccharidgemisches erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie, die aufgefängenen Fraktionen wurden photometrisch nach Dubois auf Kohlenhydrate untersucht. Die erhaltenen Daten ergaben folgenden Kurvenverlauf.

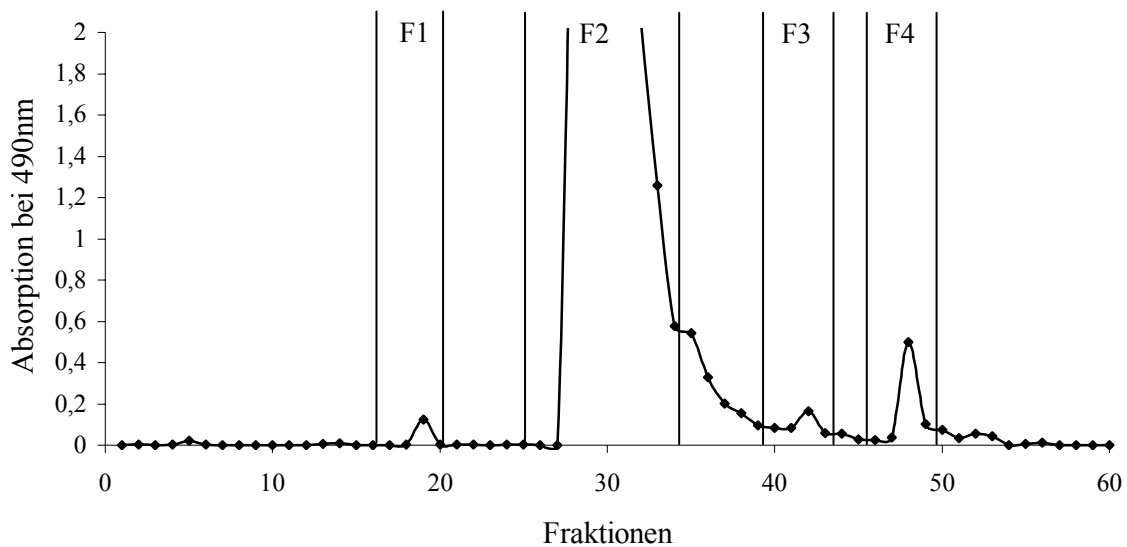


Diagramm 4.3: Graphische Übertragung der photometrischen Messwerte des Kohlenhydratgehaltes der aufgefängenen IAC-Fractionen

Die kohlenhydratreichen Fraktionen wurden wie im Diagramm dargestellt zu vier Fraktionen vereinigt. Es finden sich ausschließlich saure Polysaccharide, die mengenmäßig größte Fraktion wird während des Übergangs von 0,5molarer NaCl-Lösung zu 1,0molarer NaCl-Lösung eluiert. Drei kleine Fraktionen werden bei 0,1molarer NaCl-Lösung und bei 2,0molarer NaCl-Lösung eluiert. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt um eine ausreichende Menge an Polysacchariden pro Fraktion zu erhalten. Insgesamt wurden 130mg EPS eingesetzt.

Nach Dialyse und Gefriertrocknung ergaben sich folgende Ausbeuten:

Fraktion 1: 5,24mg

Fraktion 2: 68,54mg

Fraktion 3: 6,99mg

Fraktion 4: 8,37mg

Der Verlust von 40,86mg EPs erklärt sich dadurch, dass beim Filtrieren der EPS-Lösung sowie beim luftblasenfreien Befüllen der Dosierschleife ein Teil der EPS verloren gehen. Des Weiteren gehen EPS durch das fraktionierte Auffangen verloren, da auch Fraktionen mit geringem Kohlenhydratgehalt verworfen werden.

Die erhaltenen Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer Neutralzuckerzusammensetzung mittels Acetylierung mit anschließender gaschromatischer Analyse untersucht.

Neutralzucker	IAC-Fraktion 1	IAC-Fraktion 2	IAC-Fraktion 3	IAC-Fraktion 4
unknown	12,77%	9,79%	5,39%	0,00%
2-O-Methyl-Rhamnose	12,52%	8,99%	6,45%	0,00%
2-O-Methylhexose	6,33%	6,99%	8,39%	0,00%
2-O-Methylhexose	6,99%	8,53%	6,08%	0,00%
3-O-Methylhexose	8,80%	4,90%	4,04%	0,00%
Mannose	9,05%	3,94%	9,50%	25,16%
Galactose	4,98%	6,25%	11,53%	22,95%
Glucose	38,56%	50,61%	48,62%	51,89%

Tabelle 4.6: Neutralzuckerverteilung der IAC-Fraktionen von *Chroococcus minutus*

Die Fraktionen unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihres Gehalts an methylierten Zuckern. Fraktion 1 weist einen Gehalt an methylierten Zuckern von 47,41% auf. Bei den folgenden Fraktionen mit höherem Ladungsgrad nimmt der Anteil immer weiter ab, bis zu Fraktion 4, die gar keine methylierten Zucker enthält. Auch das Verhältnis der Hexosen Mannose, Galactose und Glucose schwankt in den Fraktionen. Fraktion 1 enthält im Verhältnis deutlich weniger Glucose und Galactose, aber mehr Mannose als Fraktion 2 und 3. Fraktion 4 enthält deutlich mehr Mannose und Galactose.

Fraktion 2 wurde aufgrund der größten Ausbeute als Hauptfraktion weiter untersucht. Im Vergleich zum unfraktioniertem EPS ist der Gehalt an methylierten Zuckern größer, der Anteil an Mannose und besonders Galactose kleiner. Nur der Gehalt an Glucose ist relativ konstant.

Neutralzucker	Hauptfraktion	EPS	Vergleich
unknown	9,79%	6,90%	+/- 2,89%
2-O-Methyl-Rhamnose	8,99%	4,50%	+/- 4,49%
2-O-Methylhexose	6,99%	4,50%	+/- 2,49%
2-O-Methylhexose	8,53%	5,40%	+/- 3,13%
3-O-Methylhexose	4,90%	1,60%	+/- 3,3%
Mannose	3,94%	8,60%	+/- 2,66%
Galactose	6,25%	16,90%	+/- 10,65%
Glucose	50,61%	51,60%	+/- 0,99%

Tabelle 4.7: Vergleich der Neutralzuckerverteilung der IAC-Hauptfraktionen und des unfraktionierten EPS

4.8. Nachweis von Substituenten

4.8.1. Pyruvatgruppen

Der Pyruvatgehalt wurde photometrisch über die Methode nach Sloenecker (Sloenecker, 1962) und über die Methode nach Hirase (Hirase, 1972) bestimmt. Der Mittelwert der Absorptionsmessungen der Methode nach Sloenecker ergab 0,116 bei einer Einwaage von 4,89mg der IAC-Hauptfraktion. Der über die Kalibriergerade errechnete Pyruvatgehalt liegt damit im extrapolierten, negativen Bereich. Der Mittelwert der Absorptionsmessungen der Methode nach Hirase ergab 0,048 bei einer Einwaage von 5,41mg der IAC-Hauptfraktion. Der über die Kalibriergerade errechnete Pyruvatgehalt liegt bei 0,051% (m/m). Die gemessenen Werte liegen entweder so niedrig, dass sie nicht mehr im Bereich der Kalibriergeraden liegen oder liefern sogar negative Werte. Faktisch kann angenommen werden, dass keine Pyruvatsubstitution vorliegt und die gemessenen Werte nur Messungenauigkeiten sind.

4.8.2. Acetatgruppen

Der Acetatgehalt wurde photometrisch über die Bildung von Acetohydroxamsäure bestimmt (McComb und McCready, 1957). Der Mittelwert der Absorptionsmessungen ergab 0,077 bei einer Einwaage von 2,57mg der IAC-Hauptfraktion; der über die Kalibriergerade errechnete Acetatgehalt liegt bei 1,35% (m/m). Der gemessene Wert liegt im extrapolierten Bereich der Kalibriergerade, die Genauigkeit des Messergebnisses ist damit fraglich.

4.8.3. Sulfatgruppen

Der Sulfatgehalt wurde nach der Bildung von Bariumsulfat photometrisch bei 550nm bestimmt (Craigie, 1984). Der Mittelwert der Absorptionsmessungen ergab 0,022 bei einer Einwaage von 24,38mg der IAC-Hauptfraktion von *Chroococcus minutus*. Der mit der Kalibriergerade ausgerechnete Schwefelgehalt liegt theoretisch im extrapolierten, negativen Bereich. Demnach ist keine Sulfatierung vorhanden.

4.9. Bestimmung des quantitativen Uronsäuregehalts

Die Uronsäurebestimmung (Blumenkrantz und Asboe-Hansen, 1973), erfolgte photometrisch bei 520nm. Untersucht wurden die IAC-Hauptfraktion und das unfraktionierte EPS.

IAC-Hauptfraktion	unfraktioniertes EPS
5,68%	7,05%

Tabelle 4.8: Quantitativer Uronsäuregehalt in % (m/m) der IAC-Hauptfraktion und des unfraktioniertem EPS

Das unfraktionierte EPS enthält 1,37% mehr Uronsäuren als die IAC-Hauptfraktion. Diese Tendenz war zu erwarten, da die IAC-Hauptfraktion den zweitgeringsten Ladungsgrad der IAC-Fractionen aufweist. Weil die Hauptfraktion 76,9% des unfraktionierten EPS ausmacht, waren nur geringe Unterschiede zu erwarten.

4.10. Bestimmung des quantitativen und qualitativen Uronsäuregehalts

Die differenzierte Uronsäurebestimmung erfolgte nach Reduktion der Säurefunktion unter Einbau von Deuterid. Zum einem wurde die Zunahme der Neutralzucker bei der gaschromatographischen Auftrennung der Alditolacetate ausgewertet und zum anderen die Zunahme der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs) nach der Methylierungsanalyse. Zur Verifizierung kann das Massenspektrum der PMAAs herangezogen werden. Durch den Einbau von Deuterid bei der Reduktion kann die Uronsäure im Massenspektrum durch doppelte Signale mit einer Massendifferenz von $2z/m$ identifiziert werden.

Die Auswertung der Alditolacetate vor und nach der Reduktion ergab folgende Verhältnisse:

Neutralzucker	EPS	EPS UF	EPS UTC
unknown	6,9%	7,8%	1,5%
2-O-Methyl-Rhamnose	4,5%	6,4%	2,5%
2-O-Methylhexose	4,5%	11,2%	4,6%
2-O-Methylhexose	5,4%	3,6%	1,4%
3-O-Methylhexose	1,6%	7,8%	0,0%
Mannose	8,6%	10,1%	16,7%
Galactose	16,9%	11,3%	21,1%
Glucose	51,6%	41,7%	52,1%

Tabelle 4.9: Neutralzuckerverhältnis des unfraktionierten EPS vor und nach einer Uronsäurereduktion
EPS UF=Uronsäurereduktion nach Fontaine; EPS UTC=Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad

Nach der Uronsäurereduktion nach Fontaine nimmt der Anteil an methylierten Zucker deutlich zu, bei der Methode nach Taylor und Conrad nimmt er hingegen ab. Die Anteile der Neutralzucker verschieben sich damit ebenfalls. Eine Auswertung kann somit über einen einfachen Vergleich der Neutralzucker vor und nach der Uronsäurereduktion nicht vorgenommen werden. Zur Identifizierung der Uronsäure wurde das nach Taylor und Conrad uronsäurereduzierte EPS massenspektrometrisch untersucht. Um die deuterierten Fragmente hervorzuheben, wurde das Massenspektrum im Selective Ion Monitoring Modus (SIM-Modus) aufgenommen. Zur Auswertung wurde das Ionenpaar 289/291m/z herangezogen. Es ergab sich für den Glucosegehalt ein Anteil von 5,9% deuterierter Glucose. Bezogen auf den Gesamtzuckeranteil ergibt sich ein Wert von 3,07% deuterierter Glucose.

Neutralzucker	Hauptfraktion	Hauptfraktion UF
unknown	9,8%	4,7%
2-O-Methyl-Rhamnose	9,0%	8,5%
2-O-Methylhexose	7,0%	13,2%
2-O-Methylhexose	8,5%	3,7%
3-O-Methylhexose	4,9%	7,8%
Mannose	3,9%	7,5%
Galactose	6,2%	6,4%
Glucose	50,6%	48,2%

Tabelle 4.10: Neutralzuckerverhältnis der IAC-Hauptfraktion vor und nach einer Uronsäurereduktion
Hauptfraktion UF=Uronsäurereduktion nach Fontaine

Auch nach der Uronsäurereduktion der Hauptfraktion kann mittels der Acetylierungsanalyse keine Aussage über die Uronsäure gemacht werden. Zu erkennen ist ein leichter Anstieg der ersten 2-O-Methylhexose, der 3-O-Methylhexose und der Mannose.

Die Auswertung der gaschromatographisch aufgetrennten PMAAs ergab bei Beurteilung der Massenspektren, dass die 1,4-Hexose(p)3 deuteriert vorliegt. Aus diesem Ergebnis und der Auswertung des SIM der acetylierten Probe ist zu schließen, dass es sich vor der Reduktion um eine 1,4-verknüpfte Glucuronsäure gehandelt haben muss. Im Vergleich zum nicht reduzierten EPS nimmt sie nach der Reduktion nach Taylor und Conrad um 4,1% zu, nach der Reduktion nach Fontaine sogar um 17,9%. Auch die Auswertung der Massenspektren der reduzierten IAC-Hauptfraktion identifizierte die 1,4-Hexose(p)3 als deuteriert. Im Vergleich zur nicht reduzierten IAC-Hauptfraktion ergab sich ein Anstieg des 1,4-Hexose(p)3-Anteils um 10,5%. Die Werte nach der Reduktion nach Fontaine liegen sehr hoch, da andere PMAAs, wie besonderes die terminale Rhamnose, im Vergleich zum Ausgangspolymer stark abnehmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die nach der Taylor und Conrad-Reduktion ermittelten Werte sowohl mit den photometrisch und den über die Acetylierungsanalyse bestimmten Werten weitgehend korrelieren. Die nach der Fontaine-Reduktion ermittelten Werte sind vergleichsweise sehr hoch.

4.11. Kombinierte Neutralzucker- und Uronsäurebestimmung

Mittels Methanolyse und anschließender Silylierung können Uronsäuren parallel zu den Neutralzucker in einer gaschromatischen Untersuchung bestimmt werden. Die Methanolyse wurde mit 0,5molarer und 2molarer methanolischen HCl durchgeführt. Untersucht wurde das unfraktionierte EPS.

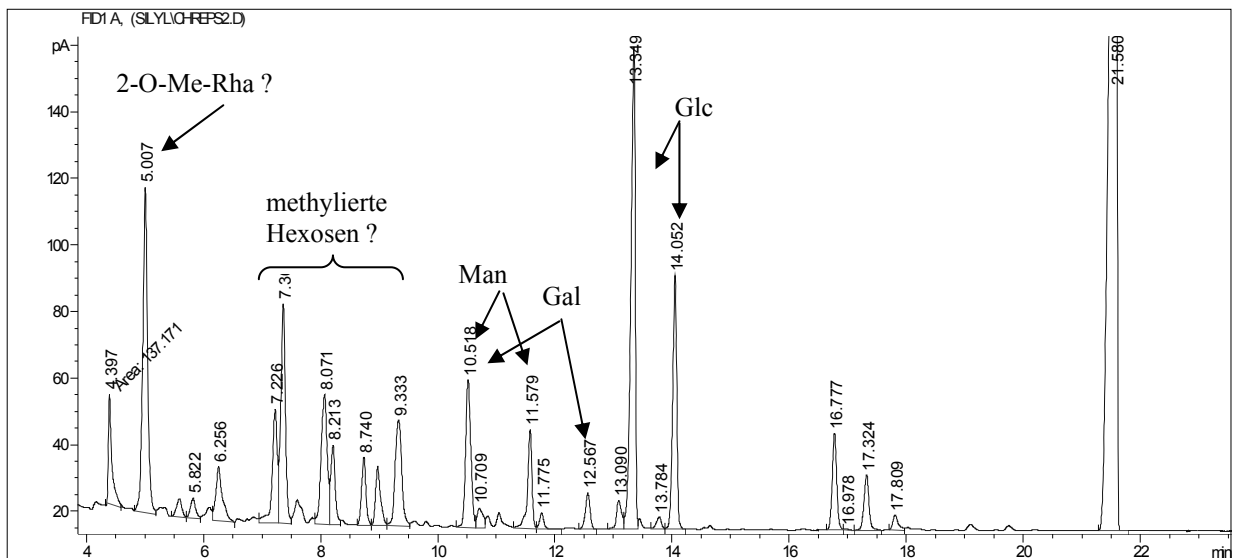


Abbildung 4.8: Gaschromatogramm des silylierten EPS nach Hydrolyse mit 2molarer meth. HCl

Aufgrund der sich überlagernden Peaks kann für das EPS von *Chroococcus minutus* keine Bestimmung der Monosaccharid-Anteile mittels Methanolyse und anschließender Silylierung vorgenommen werden. Besonders Mannose, Galactose und die methylierten Hexosen sind schlecht bis gar nicht voneinander zu trennen.

4.12. Spaltung des Polysaccharides in definierte oder undefinierte Bruchstücke

4.12.1. Oxalsäurehydrolyse

Es wurde eine milde saure Hydrolyse mit Hilfe von Oxalsäure durchgeführt (Gleeson and Clarke, 1979). Die erhaltenen Bruchstücke wurden durch eine Ethanol-fällung getrennt in größere, mit Ethanol fällbare und kleine Bruchstücke, die sich in Ethanol lösen. Eingesetzt wurden 22,33mg des unfraktionierten EPS, nach der Hydrolyse blieb ein unlöslicher Rückstand von 11,08mg. Es konnten 3,56mg mit Ethanol gefällt werden. Der Überstand ergab 7,15mg, der Anteil an Oxalsäure sollte theoretisch 4,725mg betragen. Es ergibt sich ein Anteil von 2,425mg Bruchstücke im Überstand.

Die Auswertung erfolgte zunächst über die gaschromatische Auswertung der Alditolacetate. Der Überstand wurde hierbei zur Unterscheidung der Mono- und Oligosaccharide mit TFA hydrolysiert oder direkt reduziert und acetyliert.

Neutralzucker	EPS	Ethanol-fällung	Überstand	Überstand hydrolysiert
unknown	6,89%	0,00%	0,00%	13,55%
2-O-Methyl-Rhamnose	4,46%	0,00%	0,00%	17,16%
2-O-Methylhexose	4,47%	0,00%	0,00%	0,00%
2-O-Methylhexose	5,39%	0,00%	0,00%	13,43%
3-O-Methylhexose	1,64%	0,00%	0,00%	5,91%
Mannose	8,65%	17,06%	0,00%	0,00%
Galactose	16,87%	28,19%	0,00%	0,00%
Glucose	51,63%	54,75%	0,00%	49,95%

Tabelle 4.11: Neutralzuckerzusammensetzung der mit Ethanol fällbaren und nicht fällbaren Bruchstücke

Die Bruchstücke der Ethanol-fällung bestehen aus Glucose, Galactose und Mannose, es sind keine methylierten Zucker vorhanden. Im Verhältnis zum genuinen EPS steigen besonders die Mannose- und Galactose-Anteile an, der Glucose-Anteil bleibt hingegen relativ konstant. Die methylierten Zucker finden sich im Überstand wieder, Glucose macht den Hauptteil des Überstandes aus. Auffällig ist, dass nicht alle methylierten Zucker, wie die erste 2-O-Methylhexose, im Überstand wiederauftauchen. Bei der Hydrolyse wurden keine Monosaccharide abgespalten, alle Bruchstücke im Überstand mussten erst durch TFA-Hydrolyse für den Nachweis zugänglich gemacht werden.

4.12.2. Lithiumdegradation

Metallisches, in Ethylendiamin gelöstes Lithium ist fähig, Polysaccharide in definierte Oligosaccharide zu spalten (Mort und Bauer, 1982; Lau, 1984). Es greift hierbei die Uronsäuren des Polysaccharides an und spaltet es unter Degradation der Uronsäuren. Als Ausgangsmaterial wurden 10mg der IAC-Hauptfraktion verwendet. Die erhaltenen Bruchstücke wurden über eine Sepadex prep grade 30 Säule nach ihrem hydrodynamischen Volumen getrennt. Es wurden entsprechend des Eluationsverlaufes sieben Fraktionen aufgefangen.

Fraktion	Auffangvolumen	Auswertung nach Gefriertrocknung
1	0-49ml	kein Rückstand
2	49-72ml	4,35mg
3	72-79ml	kein Rückstand
4	79-92ml	kein Rückstand
5	92-102ml	2,28mg
6	102-112ml	25,97mg
7	112-150ml	hygroskopischer Rückstand

Tabelle 4.12: Gravimetrische Auswertung der aufgefangenen GPC-Fraktionen

Fraktion 2, 5 und 6 enthielten Zuckeranteile und wurden für weitere Untersuchungen verwendet, wobei Fraktion 6 noch Lithiumanteile enthielt. Fraktion 7 enthielt nur Lithiumsalze und wurde daher nicht weiter berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte zunächst über die gaschromatische Auswertung der Alditolacetate (Blakeney, 1983).

Neutralzucker	Hauptfraktion	LiDe-Fraktion 2	LiDe-Fraktion 5	LiDe-Fraktion 6
unknown	5,82%	3,54%	4,02%	0,00%
2-O-Methyl-Rhamnose	7,31%	0,00%	3,18%	0,00%
2-O-Methylhexose	1,19%	0,00%	0,00%	0,00%
2-O-Methylhexose	7,05%	0,00%	0,00%	0,00%
3-O-Methylhexose	1,33%	0,00%	0,00%	0,00%
Mannose	7,64%	1,66%	0,95%	0,00%
Galactose	11,14%	3,68%	1,38%	8,03%
Glucose	58,51%	91,12%	90,47%	91,97%

Tabelle 4.13: Neutralzuckerzusammensetzung der Lithiumdegradations-Fraktionen

LiDe=Lithiumdegradation

Alle drei LiDe-Fraktionen bestehen fast ausschließlich aus Glucose. In LiDe-Fraktion 2 liegen noch kleine Anteile des unbekanntes Monosaccharids, Mannose und Galactose vor. In LiDe-Fraktion 5 zusätzlich noch 2-O-Methyl-Rhamnose. LiDe-Fraktion 6 enthält nur Glucose und Galactose. Methylierte Zucker werden durch die Lithiumdegradation demethyliert und sind somit kaum vorhanden.

4.13. Bestimmung der Bindungstypen

4.13.1. Bindungstypanalyse der genuinen EPS und der IAC-Hauptfraktion

Die Bindungstypenanalyse wurde mittels Methylierung und anschließender gaschromatographischer und massenspektrometrischer Auswertung der erhaltenen PMAAs durchgeführt. Es wurden die Bindungstypen des unfraktionierten EPS und der IAC-Hauptfraktion bestimmt. Weiterhin wurden verschiedene Modifikationen des EPS und der IAC-Hauptfraktion untersucht.

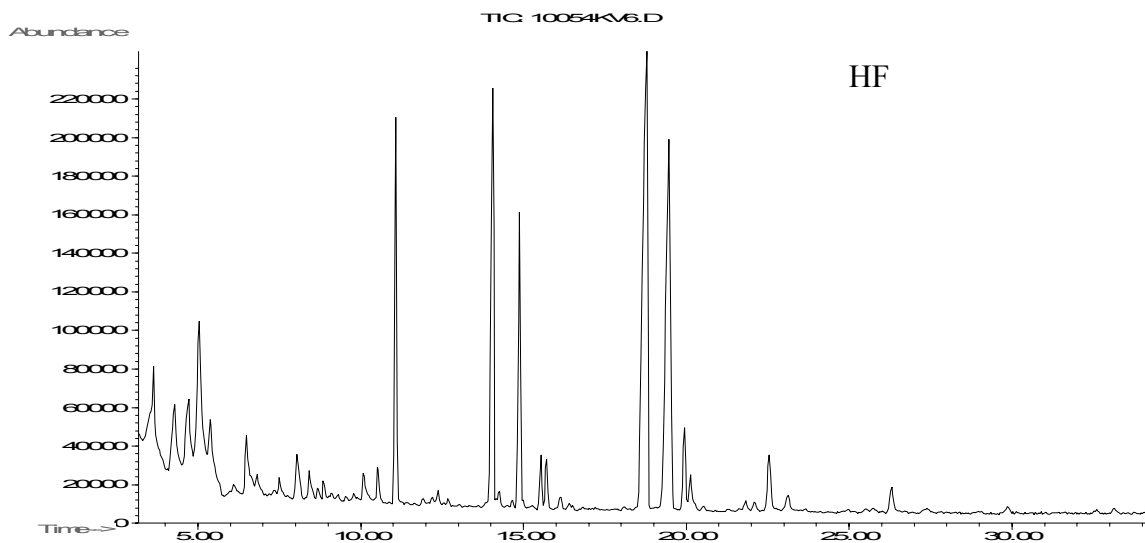
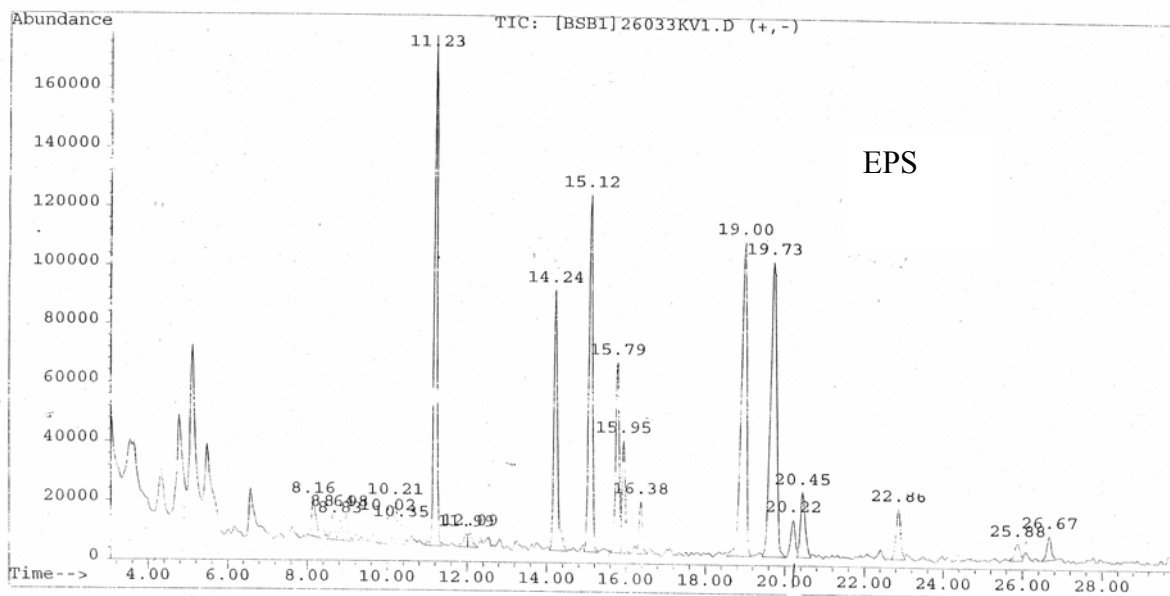


Abbildung 4.9: Darstellung der TICs des unfraktionierten EPS (EPS) und der IAC-Hauptfraktion (HF) nach Derivatisierung der Neutralzucker zu PMAAs und gaschromatographischer Trennung

PMAA	EPS	Hauptfraktion
1-Rhamnose(p)	20,4%	13,0%
1,4-Rhamnose(p)	11,3%	16,7%
1-Glucose(p)	16,3%	10,0%
1-Galactose(p)	4,4%	0,0%
1,3-Glucose(p)	18,4%	29,0%
1,4-Hexose(p)1	20,4%	22,9%
1,4-Hexose(p)2	0,0%	0,0%
1,4-Hexose(p)3	1,8%	3,2%
1,6-Hexose(p)	3,5%	1,6%
1,2,3-Mannose(p)	2,3%	2,3%
1,3,6-Glucose(p)	1,1%	1,3%

Tabelle 4.14: Bindungstypenanalyse des unfraktionierten EPS und der IAC-Hauptfraktion

Die Bindungstypenanalyse des unfraktionierten EPS und der Hauptfraktion zeigt, dass beide zwar aus den gleichen Bausteinen aufgebaut sind, diese aber im Verhältnis zueinander deutlich variieren. Das EPS enthält 18,1% mehr terminale Bausteine als die Hauptfraktion. Die Anteile der kettenbildenden Zucker liegen daher im EPS niedriger. Auffallend ist der geringe Verzweigungsgrad. Das Verhältnis der Endgruppen zu den Verzweigungspunkten liegt für das EPS bei 12,08:1 und für die IAC-Hauptfraktion bei 6,39:1.

4.13.2. Bindungstypanalyse nach Uronsäurereduktion

PMAA	EPS	EPS UF	EPS UTC
1-Rhamnose(p)	20,4%	7,4%	2,4%
1,4-Rhamnose(p)	11,3%	24,9%	11,9%
1-Glucose(p)	16,3%	1,0%	19,9%
1-Galactose(p)	4,4%	0,0%	4,3%
1,3-Glucose(p)	18,4%	6,6%	15,9%
1,4-Hexose(p)1	20,4%	26,9%	10,8%
1,4-Hexose(p)2	0,0%	11,5%	9,1%
1,4-Hexose(p)3	1,8%	19,7%	5,9%
1,6-Hexose(p)	3,5%	0,0%	8,7%
1,2,3-Mannose(p)	2,3%	0,0%	7,0%
1,3,6-Glucose(p)	1,1%	2,0%	4,1%

Tabelle 4.15: Bindungstypanalyse des unfraktionierten EPS im Vergleich mit den EPS nach Uronsäurereduktion
EPS UF=Uronsäurereduktion nach Fontaine; EPS UTC=Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad

Im Vergleich zum nichtreduzierten EPS zeigen die reduzierten EPS drei anstatt zwei verschiedene 1,4-Hexosen(p). Der Peak der 1,4-Hexose(p)2 kommt hinzu, es erfolgt keine Basislinientrennung zu dem Peak der 1,4-Hexose(p)1. Die Aufklärung, bei welchem Peak es sich um welches Monosaccharid handelt, konnte nicht erfolgen. Mittels methylierter Standards wurde versucht, eine Retentionszeitabfolge für die drei Hexosen festzulegen; dies war weder für die 1,4-Hexosen noch für die 1,3-Hexosen möglich. Die Retentionszeiten und Abfolgen änderten sich, je nachdem welche Hexosen, und in welchem molaren Verhältnis sie nebeneinander vorlagen. Aufgrund des Massenspektrums konnte eine der 1,4-Hexosen als Träger der Deuterierung identifiziert werden: es handelte sich vor der Reduktion also um eine Uronsäure. Bei allen anderen PMAAs lag keine Deuterierung vor. Die Deuterierung lag bei beiden Uronsäurereduktionen bei der 1,4-Hexose(p)3 vor. Da durch die Auswertung der Massenspektren der uronsäurereduzierten Alditolacetate festgestellt wurde, dass die Deuterierung an der Glucose vorliegt, kann festgehalten werden, dass es sich bei der 1,4-Hexose(p)3 um 1,4-Glucose(p) handelt. Da die 1,4-Hexose(p)2 erst nach der Reduktion auftritt, muss diese an der 1-Position der Uronsäure gebunden gewesen sein. Der Vergleich der Neutralzuckerhältnisse der Alditolacetate vor und nach der Uronsäurereduktion zeigt einen verhältnismässigen Anstieg des Mannoseanteils. Es könnte daraus theoretisch geschlossen

werden, dass es sich bei der 1,4-Hexose(p)2 um Mannose und somit bei der 1,4-Hexose(p)1 um Galactose handelt. Das Verhältnis der Endgruppen zu den Verzweigungspunkten liegt für das nach Taylor und Conrad reduzierte EPS bei 2,4:1 und für das nach Fontaine reduzierte EPS bei 4,2:1.

PMAA	Hauptfraktion	Hauptfraktion UF
1-Rhamnose(p)	13,0%	8,5%
1,4-Rhamnose(p)	16,7%	29,8%
1-Glucose(p)	10,0%	0,0%
1-Galactose(p)	0,0%	0,0%
1,3-Glucose(p)	29,0%	8,7%
1,4-Hexose(p)1	22,9%	15,8%
1,4-Hexose(p)2	0,0%	23,5%
1,4-Hexose(p)3	3,2%	13,7%
1,6-Hexose(p)	1,6%	0,0%
1,2,3-Mannose(p)	2,3%	0,0%
1,3,6-Glucose(p)	1,3%	0,0%

Tabelle 4.16: Bindungstypanalyse des unfractionierten EPS im Vergleich mit den EPS nach Uronsäurereduktion
Hauptfraktion UF=Uronsäurereduktion nach Fontaine;

Die Bindungstypenanalyse der uronsäurereduzierten IAC-Hauptfraktion zeigt ähnliche Verhältnisse wie die uronsäurereduzierten EPS. Auffallend ist auch hier die Abnahme der terminalen Monosaccharide, einhergehend mit der Zunahme der kettenbildenden Monosaccharide, besonders des 1,4-Hexose(p)2-Anteils. In der Hauptfraktion zeigt ebenfalls das Massenspektrum der 1,4-Hexose(p)3 eine Deuterierung. Verzweigungspunkte liegen nicht vor.

4.13.3. Bindungstypanalyse nach Oxalsäurehydrolyse

Die bei der Oxalsäurehydrolyse erhaltenen Bruchstücke wurden in mit Ethanol fällbare und nichtfällbare Bruchstücke getrennt. Als Ausgangsprodukte wurde das unfraktionierte EPS verwendet.

PMAA	EPS	Ethanol fällung	Überstand
1-Rhamnose(p)	20,4%	3,7%	22,3%
1,4-Rhamnose(p)	11,3%	1,9%	14,3%
1-Glucose(p)	16,3%	33,8%	13,2%
1-Galactose(p)	4,4%	14,0%	2,0%
1,3-Glucose(p)	18,4%	17,3%	15,4%
1,4-Hexose(p)1	20,4%	11,7%	25,2%
1,4-Hexose(p)2	0,0%	0,0%	0,0%
1,4-Hexose(p)3	1,8%	0,0%	3,2%
1,6-Hexose(p)	3,5%	6,4%	3,0%
1,2,3-Mannose(p)	2,3%	7,3%	0,0%
1,3,6-Glucose(p)	1,1%	3,9%	1,4%

Tabelle 4.17: Bindungstypanalyse der mit Ethanol fällbaren und nicht fällbaren Bruchstücke des unfraktionierten EPS

Der Hauptteil der Rhamnose liegt im Überstand vor, in der Ethanol fällung sind nur noch Spuren vorhanden. Der Überstand besteht, außer der terminalen und 1,4-Rhamnose(p), hauptsächlich aus terminaler Glucose(p), 1,3-Glucose(p) und der 1,4-Hexose(p)1. Nach der aufgestellten Theorie, dass es sich bei der 1,4-Hexose(p)1 um Galactose handeln müsste, sollte bei der Auswertung der Acetylierungsanalyse ein größerer Anteil Galactose im Überstand nachgewiesen worden sein. In der Acetylierungsanalyse lag keine unsubstituierte Galactose vor, damit kann angenommen werden, dass es sich bei den im Überstand vorliegenden, in 2- und 3-Position methylierten Hexosen um Galactosen handelt. Die Ethanol fällung setzt sich im Wesentlichen aus terminaler Glucose(p), terminaler Galactose(p), 1,3-Glucose(p) und der 1,4-Hexose(p)1 zusammen. Ihre Verhältnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Acetylierungsanalyse. Der Mannose-Anteil von 17,6% in der Acetylierungsanalyse findet sich in der 1,2,3-Mannose(p) nur zu 7,3% wieder. Somit ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der 1,6-Hexose(p) um Mannose handelt.

4.13.4. Bindungstypanalyse nach Lithiumdegradation

Die bei der Lithiumreduktion der Uronsäuren erhalten Bruchstücke wurden über Sephadex prep grade 30 Säule aufgetrennt. Als Ausgangsmaterial diente die IAC-Hauptfraktion.

PMAA	Hauptfraktion	LiDe-Fraktion 2	LiDe-Fraktion 5	LiDe-Fraktion 6
1-Rhamnose(p)	13,0%	15,4%	0,0%	0,0%
1,4-Rhamnose(p)	16,7%	9,8%	8,9%	0,0%
1-Glucose(p)	10,0%	9,8%	17,6%	73,4%
1-Galactose(p)	0,0%	0,0%	0,0%	26,6%
1,3-Glucose(p)	29,0%	17,2%	6,4%	0,0%
1,4-Hexose(p)1	22,9%	15,0%	0,0%	0,0%
1,4-Hexose(p)2	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
1,4-Hexose(p)3	3,2%	0,0%	0,0%	0,0%
1,6-Hexose(p)	1,6%	29,2%	59,1%	0,0%
1,2,3-Mannose(p)	2,3%	0,0%	0,0%	0,0%
1,3,6-Glucose(p)	1,3%	3,6%	8,0%	0,0%

Tabelle 4.18: Bindungstypanalyse der Lithiumdegradations-Bruchstücke der IAC-Hauptfraktion

Die drei LiDe-Fractionen bestehen hauptsächlich aus Glucose; der Rhamnose-Anteil liegt für LiDe-Fraktion-2 bei 25% und für LiDe-Fraktion-5 bei 9%. Die Analyse der Alditolacetate ergab hingegen für beide Fraktionen einen geringeren Rhamnose-Anteil. Die bei der Analyse der Alditolacetate ermittelten geringen Anteile Mannose und Galactose werden bei der Methylierungsanalyse nicht wiedergefunden. Gegenüber den bisherigen Bindungsanalysen kann erstmals ein hoher Anteil von 1,6-Glucose(p) nachgewiesen werden. Er beträgt für LiDe-Fraktion-2 29,2% und für LiDe-Fraktion-5 59,1%. Insgesamt lässt sich folgern, dass der 1,6-Glucose(p)-Anteil durch die Degradation entstanden ist und eventuell durch die Acetylierungsanalyse nicht mit erfasst wurde. LiDe-Fraktion 2 und 5 bestehen aus Oligosacchariden, die noch 3,8% bzw. 8% Verzweigungspunkte besitzen, wobei LiDe-Fraktion 2 einen größeren Anteil kettenbildender Zucker aufweist. LiDe-Fraktion-6 besteht nur aus Monosacchariden, die nach der Methylierungsanalyse als terminale Glucose und Galactose vorliegen.

4.14. Quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils wurde durchgeführt mittels HPLC-Analytik mit Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin. Als Ausgangsprobe wurde die IAC-Hauptfraktion verwendet. Norleucin diente als interner Standard.

Aminosäure	Mengenanteil [mg/g]	Prozentgehalt (m/m) am Proteinanteil des EPS
Asparaginsäure	1,9	14,5
Threonin	1,3	9,9
Serin	1	7,6
Glycin	0,7	5,3
Glutaminsäure	1,5	11,5
Alanin	0,7	5,3
Valin	0,6	4,6
Cystin	n.v.	0,0
Methionin	n.v.	0,0
Isoleucin	0,6	4,6
Leucin	1	7,6
Norleucin	Interner Standard	Interner Standard
Tyrosin	0,2	1,5
Phenylalanin	0,5	3,8
Histidin	0,1	0,8
Lysin	0,5	3,8
Arginin	1,1	8,4
Hydroxyprolin	n.v.	0,0
Prolin	1,4	10,7
Gesamt	13,1	1,31

Tabelle 4.19: Quantitative Aminosäurezusammensetzung der IAC-Hauptfraktion von *Chroococcus minutus*

Es ergibt sich bezogen auf das Gesamt-EPS ein Proteinanteil von 1,31% (m/m), Hauptkomponenten sind Asparaginsäure, Glutaminsäure, Threonin und Prolin. Nicht vorhanden sind Hydroxyprolin, Methionin und Cystin. Serin, Leucin und Arginin sind mengenmäßig deutlich stärker vertreten als alle weiteren Aminosäuren.

4.15. Zusammenfassung

Das von *Chroococcus minutus* gebildete EPS wird, den gefundenen Werten zufolge, während des gesamten Wachstumsverlaufs von 60 Tagen regelmäßig gebildet. Die Zunahme der Kohlenhydrate im Nährmedium erfolgt im beobachteten Wachstumszeitraum nahezu linear. Das isolierte EPS besteht aus maximal acht Neutralzuckern und Glucuronsäure. Der Neutralzuckeranteil setzt sich zusammen aus Mannose, Galactose und Glucose, sowie fünf substituierten Zuckern. Vier der substituierten Zucker konnten aufgrund ihrer Retentionszeiten und Massenspektren zugeordnet werden. Es handelt sich um eine 3-O-Methylhexose, zwei 2-O-Methylhexosen und 2-O-Methyl-Rhamnose. Der fünfte substituierte Zucker mit der geringsten Retentionszeit konnte bisher nicht zugeordnet werden. Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um eine methylierte Desoxyhexose oder Pentose handelt. Aufgrund den erhöhten Rhamnose-Anteile bei der Bindungstypanalyse kann gefolgert werden, dass es sich entweder um eine andersartig substituierte Rhamnose oder einen Zucker handelt, der nach der Methylierungsanalyse ein gleiches Spaltungsmuster wie Rhamnose aufweist. Die Neutralzuckerzusammensetzung ändert sich über 100 Tage deutlich. Der Anteil der substituierten Zucker nimmt mit der Kulturdauer deutlich von 16% auf 50% zu. Die Lipophilie des EPS nimmt also mit der Kulturdauer zu. Das hydrodynamische Volumen ist größer als 800.000Da, das mittlere Molekulargewicht beträgt 2.799.000Da. Bei der Bestimmung dieser Daten durch Gelpermeationschromatographie fiel auf, dass es sich nicht um ein einheitliches Polymer handelt. Bei langsamer Fließgeschwindigkeit spaltete sich die Peakspitze, am vorhandenen Säulenmaterial konnte aber keine ausreichende Trennung erfolgen. Die Trennung wurde folglich über eine andere Methode versucht. Es wurde die Ionenaustauschchromatographie verwandt und das EPS über seine unterschiedlichen Ladungsdichten aufgetrennt. Es konnten vier Fraktionen getrennt werden, wobei Fraktion 2 den größten mengenmäßigen Kohlenhydratanteil besaß. Die Fraktionen unterschieden sich, wie die EPS aus verschiedenen alten Kulturen, hinsichtlich ihrer Neutralzuckerzusammensetzung. Der Anteil der substituierten Zucker nahm mit zunehmender Ladungsstärke ab. Der Unterschied zwischen der Hauptfraktion und dem unfraktionierten EPS bestand dann auch folglich im größeren Anteil der substituierten Zucker in der Hauptfraktion. Hinsichtlich des Uronsäuregehaltes konnte zwischen der Hauptfraktion und dem unfraktionierten EPS nur ein geringer Unterschied festgestellt werden. Die Hauptfraktion enthält erwartungsgemäß einen etwas geringen Uronsäureanteil, da sie den zweitgeringsten Ladungsgrad bei den IAC-Fraktionen aufwies. *Chroococcus minutus* scheint somit in

verschiedenen Stadien der Entwicklung oder unter verschiedenen Umweltbedingungen, wie zum Beispiel Nährstoff- oder Lichtmangel durch die anwachsende Population, verschiedene EPS zu bilden. Der Nachweis eventueller Substituenten wie Pyruvat, Acetat oder Sulfat ergab, dass kein Sulfat und kein Pyruvat im EPS vorliegen. Acetat liegt mit 1,35% in geringer Menge vor. Die Bindungstypenanalysen des EPS und der Hauptfraktion zeigten, dass das Polymer im Wesentlichen aus terminaler Rhamnose(p), 1,4-Rhamnose(p), terminaler Glucose(p), 1,3-Glucose(p) und einer 1,4-Hexose(p) besteht. In kleineren Anteilen liegen noch eine weitere 1,4-Hexose(p), eine 1,6-Hexose(p), 1,2,3-Mannose(p) und 1,3,6-Glucose(p) vor. Aufgrund der Tatsache, dass der bei der Methylierungsanalyse ermittelte Rhamnoseanteil bei ungefähr 30% liegt, der Anteil der 2-O-Methyl-Rhamnose bei der Acetylierungsanalyse aber nur bei ungefähr 9%, ist anzunehmen, dass das unbekannte Monosaccharid nach der Methylierungsanalyse als Rhamnose vorliegt. Das Verhältnis der terminalen Zucker zu den Verzweigungszuckern liegt für das EPS bei 12:1 und für die IAC-Hauptfraktion bei 6:1. Normalerweise sollte es ungefähr 1:1 betragen, da für jede Verzweigung ein terminaler Zucker hinzukommt. Aus diesen Verhältnissen könnte man schließen, dass es sich nicht um ein Polysaccharid sondern um mehrere lineare Oligosaccharide handelt. Gegen diese Theorie spricht jedoch das ermittelte Molekulargewicht. Möglich wäre eine Degradation des Polysaccharids während der Methylierungsanalyse, oder dass bestimmte Verzweigungspunkte nicht erfasst werden. Der Uronsäureanteil des EPS und der Hauptfraktion beträgt, ermittelt durch die photometrische Bestimmung nach Blumenkrantz, ungefähr 6,5%. Das über den SIM-Modus des acetylierten EPS ermittelte Ergebnis entspricht einem Glucuronsäure-Anteil von 3%. Die Methylierungsanalyse des nach Taylor und Conrad uronsäurereduzierten EPS ergab einen Anteil von 4,1%. Nach der Methylierungsanalyse des nach Fontaine uronsäurereduzierten EPS sowie der nach dieser Methode reduzierten Hauptfraktion ergaben sich Uronsäureanteile, die wesentlich höher lagen. Diese Werte erklären sich hauptsächlich dadurch, dass die Anteile der terminalen Rhamnose(p) und Glucose(p) sowie die 1,3-Glucose(p) stark abnehmen und daher sich die Verhältnisse insgesamt verschieben. Die Bindungstypenanalyse des uronsäurereduzierten EPS zeigt durch die Deuterierung in Kombination mit der Auswertung der Acetylierungsanalyse, dass die Uronsäure im EPS als 1,4-Glucuronsäure(p) vorliegt. Sie liegt im ursprünglichen EPS wahrscheinlich an eine 1,4-Mannose(p) gebunden vor, da der Peak dieser Verbindung erst nach der Uronsäurereduktion nachzuweisen ist, wobei aber die Zuordnung der 1,4-Hexosen(p) aufgrund ihrer sich überschneidenden Retentionszeiten schwer fällt und es somit zu keiner endgültigen Bestimmungen kommen kann. Beim Vergleich der beiden unterschiedlichen

Uronsäurereduktionen fällt auf, dass bei der Methode nach Taylor und Conrad der Anteil an terminaler Rhamnose(p) sowie der Anteil der 1,4-Hexose(p)1 stark abnimmt und alle anderen Bestandteile eher zunehmen. Bei der Methode nach Fontaine hingegen nehmen alle 1,4-Hexosen(p) und die 1,4-Rhamnose(p) stark zu, alle anderen Bestandteile stark ab. Die erhaltenen Daten sind damit sehr fragwürdig, da nicht klärbar ist, ob während einer der beiden Reduktionen das EPS degradiert wurde und dadurch andere Bindungstypen-Verhältnisse entstehen. Durch Aufspaltung der Polysaccharide in kleinere Bruchstücke sollten weitere Erkenntnisse über ihren Aufbau gewonnen werden. Es wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Bei der Oxalsäurehydrolyse wurden labilere Bindungen, an denen Rhamnose beteiligt war, gespalten. Das Polysaccharid konnte über eine Ethanol-fällung in zwei Fraktionen getrennt werden. Der fällbare Anteil bestand aus Mannose, Galactose und Glucose. Die Bindungstypenanalyse ergab einen ungewöhnlich hohen Anteil an terminaler Glucose(p) und Galactose(p) von insgesamt 48%, als weitere Bestandteile konnten 1,3-Glucose(p), 1,4-Hexose(p)1, 1,6-Hexose(p), 1,2,3-Mannose(p) und 1,3,6-Glucose(p) nachgewiesen werden. Auch kleine Anteile Rhamnose konnten nachgewiesen werden. Da diese Fraktion mit Ethanol fällbar war, sollte sie einen noch relativ hohen Polymerisationsgrad aufweisen. Dagegen spricht der hohe Anteil an terminalen Komponenten. Im Überstand findet sich erwartungsgemäß der größte Anteil der Rhamnose wieder. Bemerkenswert ist, dass alle methylierten Zucker zusammen mit Glucose sich im Überstand wieder finden. Aufgrund der Acetylierungsanalyse kann festgehalten werden, dass keine Monosaccharide abgespalten worden sind, sondern nur Oligosaccharide. Diese bestehen hauptsächlich aus terminaler Rhamnose(p) und Glucose(p), 1,3-Glucose(p) und der 1,4-Hexose(p)1. Als weitere degradative Methode wurde die Lithiumdegradation eingesetzt, über die definierte Bruchstücke durch die Spaltung an den Stellen der Uronsäuren erhalten werden sollten. Über die Auftrennung an einer Gelpermeationssäule für Oligosaccharide konnten drei Fraktionen mit verschiedenem hydrodynamischem Volumen aufgefangen werden. Fraktion 6 enthielt nur Glucose und Galactose als Monosaccharid. Fraktion 2 und 5 waren hingegen komplexer zusammengesetzt. Beide Fraktionen enthalten einen größeren Anteil 1,6-Glucose(p); dieser Bindungstyp konnte in den Methylierungsanalysen des genuinen EPS und in den anderen Modifikationen bisher nur in kleineren Anteilen nachgewiesen werden. Daher ist wie schon bei der Auswertung von *Nostoc insulare* anzunehmen, dass es sich um die degradierte Uronsäure handelt, die während der Methylierungsanalyse unter den gegebenen Bedingung eine weiteren Umlagerung erfährt und eventuell anschließend als 1,6-Glucose(p) erscheint. Die Fraktion mit dem kleineren hydrodynamischen Volumen zeigte einen

entsprechend weniger komplexen Aufbau aus 1,4-Rhamnose(p), terminaler Glucose(p), 1,3-Glucose(p), 1,6-Glucose(p) und 1,3,6-Glucose(p) im annähernden Verhältnis 1:2:1:6:1. Die Fraktion mit dem größeren hydrodynamischen Volumen zeigt einen komplexeren Aufbau aus terminaler Rhamnose(p), 1,4-Rhamnose(p), terminaler Glucose(p), 1,3-Glucose(p), 1,4-Hexose(p) und 1,6-Glucose(p) und 1,3,6-Glucose(p) im annähernden Verhältnis 3:2:2:3:3:6:1. Aufgrund des Verhältnisses der einzelnen Bestandteile zueinander ist nicht zu klären, ob es sich jeweils nur um ein Oligosaccharid handelt oder um ein Gemisch aus verschiedenen. Die Interpretation stellt sich somit schwieriger dar, da nicht klar ist, welche Bindungstypen zu welchem Oligosaccharid gehören. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass der Aufbau des von *Chroococcus minutus* abgegeben EPS sehr komplex ist. Weiterhin ist aufgrund der ungewöhnlich großen Anteile an terminalen Zuckern anzunehmen, dass das EPS anscheinend nicht stabil unter den Methylierungsbedingungen ist und darum degradiert wird. Diese Faktoren bedingen, dass Vorschläge zur Struktur des EPS mit den bisherigen Methoden nicht ohne weiteres möglich sind. Der Proteinanteil, aus der Aminosäure-Analyse errechnet, liegt mit 1,31% sehr niedrig, so dass wohl kaum von einem Glykoprotein gesprochen werden kann. Es handelt sich bei dem von *Chroococcus minutus* produzierten EPS also um ein Polysaccharid. Bei dem geringen Proteinanteil handelt es sich wahrscheinlich um assoziiertes Protein, dass bei der Aufreinigung nicht abgetrennt wurde.

5. Ergebnisse: *Synechocystis aquatilis*

5.1. Taxonomie und Merkmale

Ordnung	<i>Chroococcales</i>
Familie	<i>Chroococaceae</i>
Gattung	<i>Synechocystis</i> L.
Art	<i>Synechocystis aquatilis</i> L.

Synechocystis aquatilis gehört zu den Picocyanobakterien, dies sind einzellige Cyanobakterien, die kleiner als 5µm sind. Ihrer Gestalt ist relativ unscheinbar und damit sind sie schwierig voneinander zu unterscheiden. Pycocyanobakterien dominieren die Zusammensetzung des Phytoplanktons mit bis zu 50%. *Synechocystis aquatilis* ist häufig in Lebensgemeinschaften verschiedener Phytoplankton-Arten unterhalb der Wasseroberfläche anzutreffen. Die geringe Größe der Picocyanobakterien führt zu einer großen Zell-Oberfläche bei einem kleinen Zell-Volumen, was sie zu einer effektiven Nährstoffaufnahme befähigt. Dies garantiert ihnen eine genügende Versorgung mit Stickstoff und anderen essentiellen Nährstoffen auch in nährstoffarmen Gewässerschichten im Ozean.

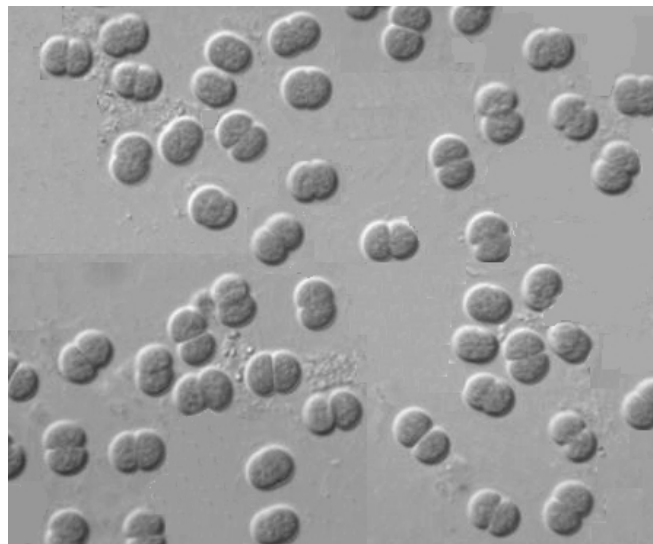


Abbildung 5.1: Zellen in verschiedenen Teilungsstadien einer *Synechocystis* sp.
(Photo: Mihoko Takahashi)

5.2. Wachstumskurven

5.2.1. Biomasse

Die vorliegenden Daten zeigen den Wachstumsverlauf einer 8L-Batchkultur von *Synechocystis aquatilis* über 60 Tage. Die Biomasse wurde hierbei als Trockenmasse bestimmt:

Tage	Stand in cm	Absorption	Verdünnung	Restvolumen in ml	Biomasse in µg/ml	korr. Biomasse in µg/ml
1	0	0,026		8000,0	2,8	2,8
4	0,4	0,032		7849,8	3,5	3,4
8	1,3	0,109		7511,7	11,9	11,2
11	1,8	0,222		7323,9	24,2	22,2
15	2,7	0,516		6985,9	56,2	49,1
18	3,1	0,432	1+1	6835,7	94,2	80,5
22	3,5	0,595	1+1	6685,4	129,7	108,4
25	4,1	0,838	1+1	6460,1	182,7	147,5
29	4,9	0,754	1+2	6159,6	246,6	189,8
32	5,5	0,637	1+4	5934,3	347,2	257,5
36	6	0,56	1+5	5746,5	366,2	263,1
39	6,7	0,555	1+6	5483,6	423,5	290,3
43	7,6	0,624	1+6	5145,5	476,1	306,2
46	8,1	0,588	1+7	4957,7	512,7	317,8
50	8,9	0,702	1+7	4657,3	612,1	356,4
53	9,6	0,523	1+10	4394,4	627,1	344,5
57	9,9	0,595	1+10	4281,7	713,4	381,8
60	10,3	0,58	1+10	4131,5	695,4	359,1

Tabelle 5.1: Auswertung der photometrisch erhaltenen Daten einer 8L-Batchkultur von *Synechocystis aquatilis*

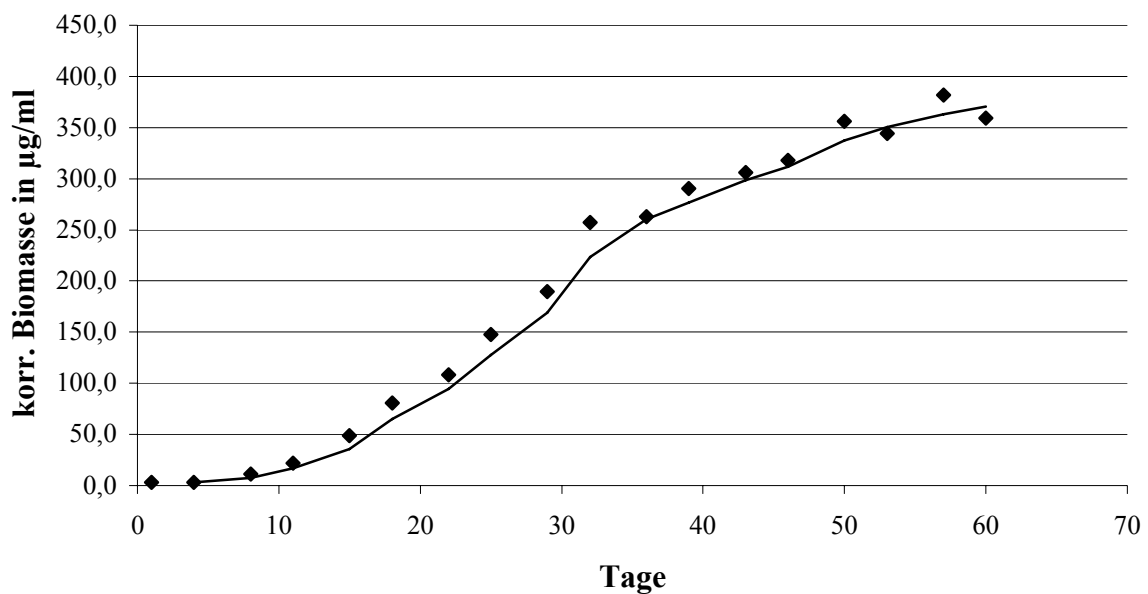


Diagramm 5.1: Wachstumskurve von *Synechocystis aquatilis*

Ergebnisse

Nach 60 Tage betrug die Gesamtbio­masse 28,73g Trockengewicht auf 8L Nährlösung, dies entspricht 3,6g/L.

Die Auszählung der Individuen mittels einer Neubauer-improved Zählkammer der 0,004µl Quadrate ergab folgende Verteilung

Quadrat 1	Individuen	Quadrat 2	Individuen	Quadrat 3	Individuen	Quadrat 4	Individuen
1.1	12	2.1	7	3.1	23	4.1	18
1.2	16	2.2	8	3.2	7	4.2	24
1.3	18	2.3	17	3.3	9	4.3	16
1.4	7	2.4	24	3.4	14	4.4	7
1.5	17	2.5	16	3.5	21	4.5	25
1.6	18	2.6	18	3.6	18	4.6	13
1.7	19	2.7	24	3.7	20	4.7	27
1.8	9	2.8	23	3.8	21	4.8	9
1.9	22	2.9	17	3.9	10	4.9	16
1.10	19	2.10	13	3.10	25	4.10	14
1.11	13	2.11	23	3.11	24	4.11	27
1.12	15	2.12	19	3.12	17	4.12	17
1.13	28	2.13	35	3.13	23	4.13	15
1.14	25	2.14	22	3.14	24	4.14	25
1.15	11	2.15	12	3.15	21	4.15	21
1.16	12	2.16	17	3.16	12	4.16	19
Summe	261	Summe	295	Summe	289	Summe	293

Tabelle 5.2: Auszählung einer *Synechocystis aquatilis*-Kultur nach 60 Tage

Der Mittelwert ergibt eine Individuenzahl von 71125 Individuen/µl, hochgerechnet ergibt sich eine Individuenanzahl von $2,939 \cdot 10^{11}$ in der Gesamtkultur von 8L, dies entspricht $3,67 \cdot 10^{10}$ Individuen/L.

5.2.2. Kohlenhydrate

Die vorliegenden Daten zeigen die Zunahme an Kohlenhydraten in der Nährlösung über 60 Tage einer 8L-Batch-Kultur von *Synechocystis aquatilis*. Der Kohlenhydratgehalt wurde photometrisch nach Dubois ermittelt.

Tage	Stand in cm	Restvolumen in ml	Absorbtion 480nm	Verdünnung	Kohlenhydrate in µg/ml	korr. Kohlenhydrate in µg/ml
1	0	8000,0	0,09		6,7	6,7
4	0,4	7849,8	0,068		4,0	3,9
8	1,3	7511,7	0,091		6,7	6,3
11	1,8	7323,9	0,091		6,6	6,1
15	2,7	6985,9	0,116		8,6	7,5
18	3,1	6835,7	0,18		16,3	13,9
22	3,5	6685,4	0,215		20,1	16,8
25	4,1	6460,1	0,29		27,9	22,5
29	4,9	6159,6	0,397		37,9	29,1
32	5,5	5934,3	0,448		41,9	31,0
36	6	5746,5	0,685		67,7	48,7
39	6,7	5483,6	0,444	1+1	78,8	54,0
43	7,6	5145,5	0,482	1+1	87,0	56,0
46	8,1	4957,7	0,602	1+1	106,8	66,2
50	8,9	4657,3	0,332	1+3	113,2	65,9
53	9,6	4394,4	0,348	1+3	119,4	65,6
57	9,9	4281,7	0,389	1+3	129,2	69,1
60	10,3	4131,5	0,461	1+3	167,4	86,5

Tabelle 5.3: Auswertung der photometrischen Kohlenhydratbestimmung nach Dubois bei 480nm

Tage	Stand in cm	Restvolumen in ml	Absorption 490nm	Verdünnung	Kohlenhydrate in µg/ml	korr. Kohlenhydrate in µg/ml
1	0	8000,0	0,093		6,4	6,4
4	0,4	7849,8	0,068		3,4	3,3
8	1,3	7511,7	0,093		6,4	6,0
11	1,8	7323,9	0,092		6,3	5,7
15	2,7	6985,9	0,11		8,4	7,4
18	3,1	6835,7	0,179		16,8	14,3
22	3,5	6685,4	0,213		20,9	17,4
25	4,1	6460,1	0,283		29,3	23,7
29	4,9	6159,6	0,373		40,1	30,9
32	5,5	5934,3	0,409		44,5	33,0
36	6	5746,5	0,642		72,5	52,1
39	6,7	5483,6	0,387	1+1	83,6	57,3
43	7,6	5145,5	0,424	1+1	92,6	59,5
46	8,1	4957,7	0,513	1+1	114,0	70,6
50	8,9	4657,3	0,287	1+3	119,1	69,3
53	9,6	4394,4	0,301	1+3	125,8	69,1
57	9,9	4281,7	0,323	1+3	136,4	73,0
60	10,3	4131,5	0,409	1+3	177,9	91,9

Tabelle 5.4: Auswertung der photometrischen Kohlenhydratbestimmung nach Dubois bei 490nm

Graphisch übertragen ergab sich folgendes Diagramm für die Zunahme der Kohlenhydrate im Nährmedium:

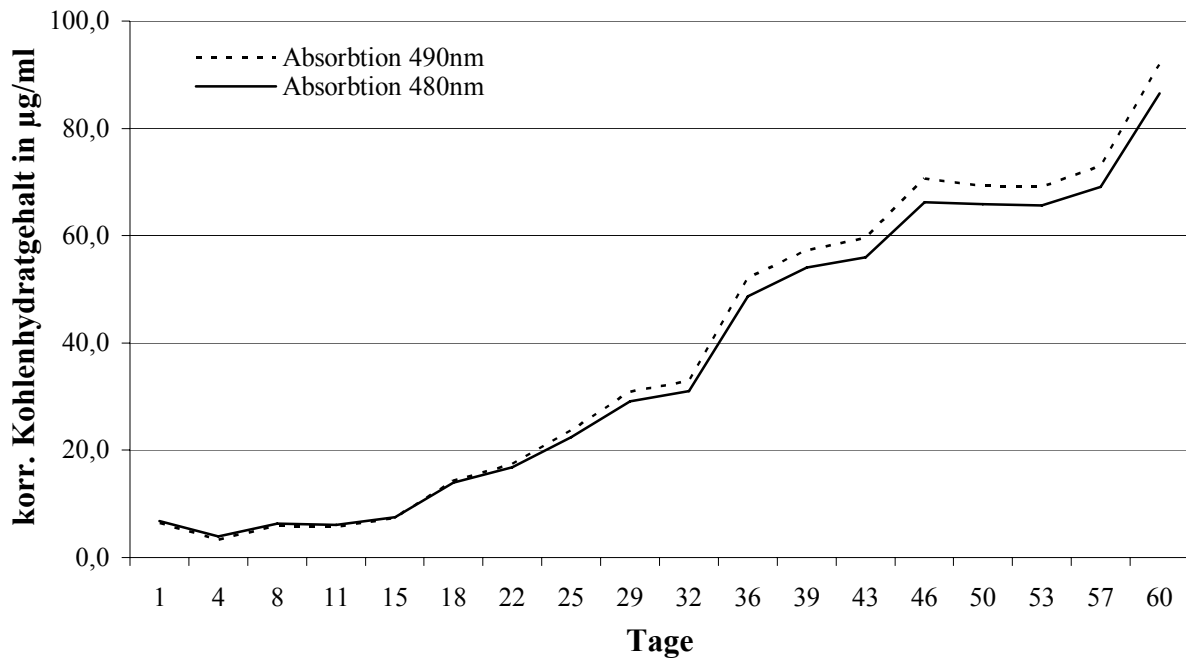


Diagramm 5.2: Zunahme des Kohlenhydratgehalts einer *Synechocystis aquatilis* 8L-Batch-Kultur

Die von der Biomasse befreite Nährlösung wurde dialysiert und gefriergetrocknet. Es ergab sich ein Roh-EPS-Gehalt von 24,033g für eine 8L-Kultur, dies entspricht 3,0g/L.

10g der von der Biomasse befreiten Nährlösung wurden in Wasser solvatisiert und zur Proteinfällung erhitzt. Es wurden 0,45g Proteine gefällt. Das EPS wurde per Ethanol-fällung von den Salzen, Monosacchariden und Oligosacchariden getrennt. Der Überstand der Ethanol-fällung ergab 6,21g. Die Fällung wurde dialysiert. Es wurden 1,58g aufgereinigtes EPS erhalten. Damit beträgt der EPS-Gehalt 1,58% des Roh-EPS-Gehaltes.

5.3. Kontinuität der EPS-Zusammensetzung im Wachstumsverlauf

Zur Kontrolle, ob sich die Zusammensetzung der abgegebenen EPS stark mit der Wachstumszeit verändern, wurden weitere Batchkulturen angesetzt; eine wurde nach 30 Tagen abgeerntet, die andere nach 100 Tagen. Die Nährlösungen wurden aufgearbeitet. Zum Vergleich wurden die verschiedenen EPS mittels der Methode nach Blakeney auf ihre Neutralzuckerzusammensetzung untersucht.

Neutralzucker	EPS 30Tage	EPS 60Tage	EPS 100Tage
Fucose	49,57%	47,84%	53,97%
Arabinose	50,43%	52,16%	46,03%

Tabelle 5.5: Vergleich des Neutralzuckerhältnisses in EPS unterschiedlich alter Batch-Kulturen

Die Neutralzuckerhältnisse der EPS bleiben über den Wachstumsverlauf von 100 Tagen relativ konstant. Es sind nur leichte Schwankungen der Neutralzucker-Anteile um ca 5% zu beobachten.

5.4. Elementaranalyse

Die Elementaranalyse der aufgereinigten 60 Tage alten EPS ergab einen Kohlenstoffanteil von 22,973%, einen Wasserstoffanteil von 5,346%, einen Stickstoffanteil von 1,194% und einen Schwefelanteil von 6,934%.

5.5. Bestimmung des hydrodynamischen Volumens mittels Gelpermeationschromatographie

Mittels Gelpermeationschromatographie sollten das hydrodynamische Volumen des isolierten EPS anhand einer Eichreihe mit Pullulanen sowie das Molekulargewicht anhand der Berechnungen des MALLS-Detektors bestimmt werden. Die Trennung erfolgte an einer Sephadex SR-400-Säule, die einen Trennbereich von 20.000-8.000.000Da für globuläre Moleküle und 10.000-2.000.000Da für Dextrane aufweist.

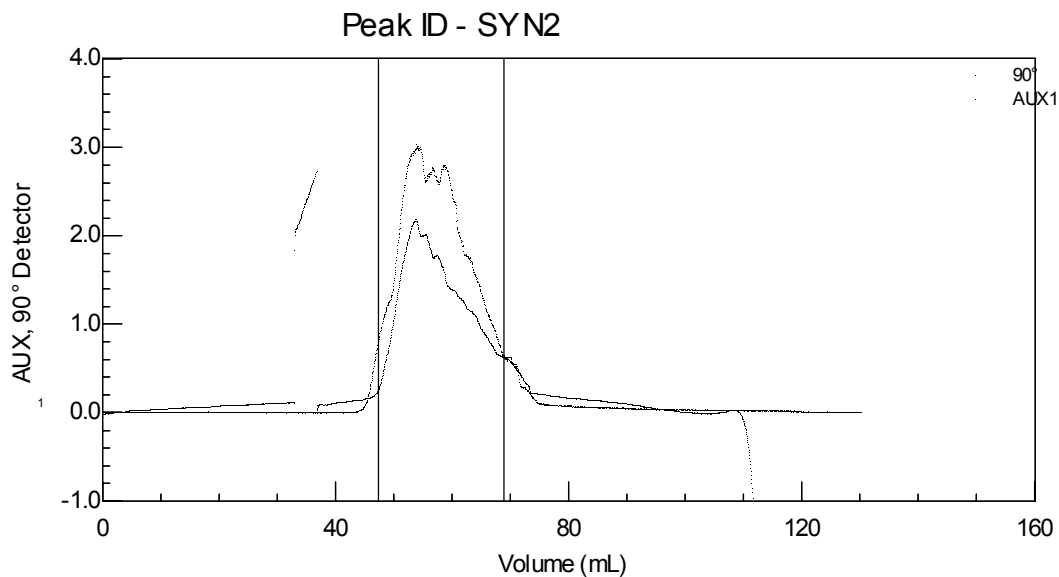


Abbildung 5.2: Gelpermeations-Chromatogramm des isolierten EPS von *Synechocystis aquatilis*, bei 0,633ml/min Detektion über MALLs-Detektor (obere Linie) und RI-Detektor (untere Linie)

Bei einer normalen Flußgeschwindigkeit von 1ml/min ergab sich ein Chromatogramm mit einem Peak bei einem mittleren Elutionsvolumen von 57,0ml. Bei geringerer Fließgeschwindigkeit (bis zu 0,3ml/min) spalteten sich die Peakspitze auf, aber auch bei sehr niedriger Fließgeschwindigkeit konnten keine fraktionierbaren Peaks erhalten werden. Das abgebildete Chromatogramm wurde bei einer relativ niedrigen Flußgeschwindigkeit von 0,633ml/min aufgezeichnet. Es ist festzuhalten, dass es sich bei dem isolierten EPS um ein heterogenes Gemisch handelt, das aber am vorliegenden Säulenmaterial nicht getrennt werden kann. Die Berechnung des hydrodynamischen Volumens ergab einen Mittelwert von 996.000Da. Damit liegt das hydrodynamische Volumen der EPS außerhalb der Pullulan-Eichreihe, mit Sicherheit kann also nur ein hydrodynamisches Volumen von über 800.000Da angenommen werden. Die Berechnungen des MALLS-Detektors ergaben ein mittleres Molekulargewicht von 3.513.000Da.

5.6. Fraktionierung des Exopolysaccharidgemisches mittels Ionenaustauschchromatographie

Die Fraktionierung des Exopolysaccharidgemisches erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie. Die aufgefangenen Fraktionen wurden photometrisch nach Dubois auf Kohlenhydrate untersucht. Die erhaltenen Daten ergaben folgenden Kurvenverlauf.

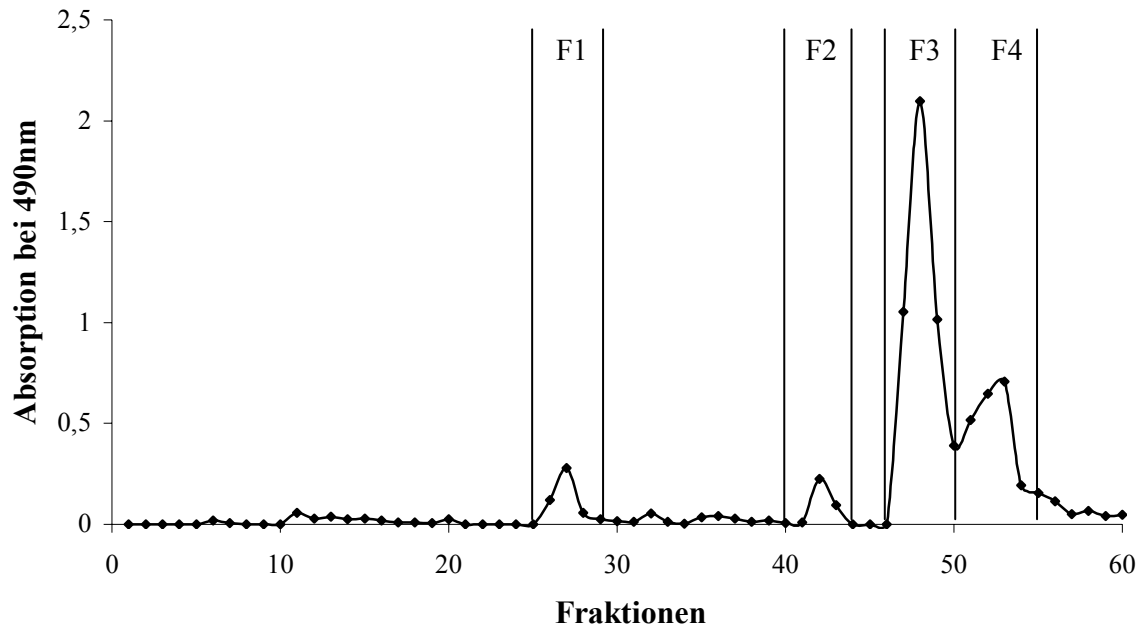


Diagramm 5.3: Graphische Übertragung der photometrischen Messwerte des Kohlenhydratgehaltes der aufgefangenen IAC-Fraktionen

Die kohlenhydratreichen Fraktionen wurden wie im Diagramm dargestellt zu vier verschiedenen Fraktionen vereinigt. Es finden sich ausschließlich saure Polysaccharide, ein kleiner Teil lässt sich mit einer 0,5molaren NaCl-Lösung vom Ionenaustauscher waschen, eine weitere kleine Fraktion wird anfangs mit 2,0molarer NaCl-Lösung eluiert, zwei weitere Fraktionen folgen später bei 2,0molarer NaCl-Lösung. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt, um eine ausreichende Menge an Polysacchariden pro Fraktion zu erhalten. Insgesamt wurden 112,36mg EPS eingesetzt.

Nach Dialyse und Gefriertrocknung ergaben sich folgende Ausbeuten:

Fraktion 1: 3,17mg

Fraktion 2: 1,51mg

Fraktion 3: 33,61mg

Fraktion 4: 15,90mg

Der Verlust von 58,17mg EPs erklärt sich dadurch, dass beim Filtrieren der EPS-Lösung sowie beim luftblasenfreien Befüllen der Dosierschleife ein Teil der EPS verloren gehen. Des Weiteren gehen EPS durch das fraktionierte Auffangen verloren, da auch Fraktionen mit geringem Kohlenhydratgehalt verworfen werden.

Die erhaltenen Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer Neutralzuckerzusammensetzung als Alditolacetate mittels gaschromatischer Analyse untersucht:

Neutralzucker	IAC-Fraktion 1	IAC-Fraktion 2	IAC-Fraktion 3	IAC-Fraktion 4
Fucose	7,07%	46,37%	49,67%	48,69%
Arabinose	15,97%	49,82%	50,33%	39,72%
Mannose	3,92%	0,00%	0,00%	0,00%
Galactose	21,10%	0,00%	0,00%	0,00%
Glucose	51,94%	3,81%	0,00%	11,59%

Tabelle 5.6: Neutralzuckerverteilung der IAC-Fraktionen von *Synechocystis aquatilis*

Fraktion 1 unterscheidet sich wesentlich von den anderen drei Fraktionen. Sie besteht hauptsächlich aus Arabinose, Galactose und Glucose. Im Gegensatz dazu sind die Hauptbausteine der drei anderen Fraktionen Fucose und Arabinose. Fraktion 2 und 4 enthalten zudem Glucose. Fraktion 3 wurde aufgrund der größten Ausbeute weiter untersucht. Im Vergleich unterscheiden sich das unfraktionierte EPS und die Hauptfraktion kaum.

Neutralzucker	Hauptfraktion	EPS	Vergleich
Fucose	49,67%	47,84%	+/- 1,83%
Arabinose	50,33%	52,16%	+/- 1,83%

Tabelle 5.7: Vergleich der Neutralzuckerverteilung der IAC-Hauptfraktionen und des unfraktionierten EPS

5.7. Nachweis von Substituenten

5.7.1. Pyruvatgruppen

Der Pyruvatgehalt wurde photometrisch über die Methode nach Sloenecker (Sloenecker, 1962) und über die Methode nach Hirase (Hirase, 1972) bestimmt. Der Mittelwert der Absorptionsmessungen nach Sloenecker ergab 0,571 bei einer Einwaage von 4,75mg der IAC-Hauptfraktion von *Synechocystis aquatilis*. Anhand der Kalibriergerade wurde eine Pyruvatkonzentration von 2,23% (m/m) errechnet, dies entspricht einem Substitutionsgrad von 0,04 Pyruvatmoleküle/Zuckermolekül, der Substitutionsgrad wurde mit der Annahme einer Zuckerverteilung von 1:1 Arabinose zu Fucose ausgerechnet. Der Mittelwert der Absorptionsmessungen nach Hirase ergab 0,195 bei einer Einwaage von 5,2mg der IAC-Hauptfraktion von *Synechocystis aquatilis*. Anhand der Kalibriergerade wurde eine Pyruvatkonzentration von 0,67% (m/m) errechnet, dies entspricht einem Substitutionsgrad von 0,012 Pyruvatmoleküle/Zuckermolekül, der Substitutionsgrad wurde mit der Annahme einer Zuckerverteilung von 1:1 Arabinose zu Fucose ausgerechnet.

Die Methode nach Sloenecker liefert mit 2,23% Pyruvat einen sehr viel höheren Wert, als die Methode nach Hirase mit 0,67%. Somit kann gefolgert werden, dass durch die Hydrolyse des EPS weitere Ketosäuren entstehen, die eine falsch positive Reaktion geben. Die preiswertere Methode nach Sloenecker kann hier folglich nur als grobe Orientierung dienen; der wahre Gehalt an Pyruvat wird durch die Methode nach Hirase sehr viel genauer bestimmt.

5.7.2. Acetatgruppen

Der Acetatgehalt wurde photometrisch über die Bildung von Acetohydroxamsäure bestimmt (McComb und McCready, 1957). Der Mittelwert der Absorptionsmessungen ergab 0,044 bei einer Einwaage von 2,86mg der IAC-Hauptfraktion, der über die Kalibriergerade errechnete Acetatgehalt liegt bei 0,68% (m/m). Der gemessene Wert liegt so niedrig, dass er nicht mehr im Bereich der Kalibriergeraden liegt.

5.7.3. Sulfatgruppen

Der Sulfatgehalt wurde nach der Bildung von Bariumsulfat photometrisch bei 550nm bestimmt (Craigie, 1984). Der Mittelwert der Absorptionmessungen ergab 0,457 bei einer Einwaage von 23,97mg der IAC-Hauptfraktion. Anhand der Kalibriergerade wurde eine Schwefelkonzentration von 7% (m/m) errechnet, dies entspricht einer Sulfatkonzentration von 21% (m/m). Der Substitutionsgrad wurde unter der Annahme einer Zuckerverteilung von Arabinose zu Fucose 1:1 berechnet und beträgt 0,43 Sulfatmoleküle/Zuckermolekül. Dieses Ergebnis wird durch die Elementaranalyse mit einer Schwefelkonzentration von 6,934% bestätigt.

5.8. Bestimmung des quantitativen Uronsäuregehalts

Die Uronsäurebestimmung (Blumenkrantz und Asboe-Hansen, 1973) erfolgte photometrisch bei 520nm. Untersucht wurden die IAC-Hauptfraktion und das unfraktionierte EPS.

IAC-Hauptfraktion	unfraktioniertes EPS
0,83%	1,75%

Tabelle 5.8: Quantitativer Uronsäuregehalt in % (m/m) der IAC-Hauptfraktion und des unfraktioniertem EPS

Das unfraktionierte EPS wie auch die IAC-Hauptfraktion enthält bestenfalls geringe Mengen an Uronsäuren. Es ist fraglich, ob die erhaltenen Messwerte valide sind.

5.9. Bestimmung des quantitativen und qualitativen Uronsäuregehalts

Die differenzierte Uronsäurebestimmung erfolgte nach Reduktion der Säurefunktion unter Einbau von Deuterid. Zum einen wurde die Zunahme der Neutralzucker bei der gaschromatographischen Auftrennung der Alditolacetate ausgewertet. Da keine Veränderung der Neutralzuckerverhältnisse festzustellen war, wurde eine weitere Auswertungsmethode verwendet. Das nach Taylor und Conrad uronsäurereduzierte EPS wurde massenspektrometrisch untersucht. Um die deuterierten Fragmente hervorzuheben wurde das Massenspektrum im Selective Ion Monitoring Modus (SIM-Modus) aufgenommen. Durch den Einbau von Deuterid bei der Reduktion kann die Uronsäure im Massenspektrum durch doppelte Signale mit einer Massendifferenz von $2z/m$ identifiziert werden. Es konnte keine Deuterierung festgestellt werden. Damit kann festgehalten werden, dass keine Uronsäuren im Polymer vorliegen und es sich bei den photometrisch bestimmten Werten nur um Meßungenauigkeiten handelt.

5.10. Kombinierte Neutralzucker und Uronsäurebestimmung

Mittels Methanolyse und anschließender Silylierung können Uronsäuren parallel zu den Neutralzucker in einer gaschromatischen Untersuchung bestimmt werden. Die Methanolyse wurde mit 0,5molarer und 2molarer methanolischen HCl durchgeführt. Untersucht wurde das unfraktionierte EPS.

Monosaccharid	0,5molare meth. HCl	2,0molare meth. HCl
Fucose	45,34%	49,59%
Arabinose	54,66%	50,41%

Tabelle 5.9: Monosaccharidzusammensetzung des unfraktionierten EPS

Die gefundenen Werte korrelieren mit denen aus der Acetylierungsanalyse nach Blakeney. Es wurden keine weiteren Monosaccharide nachgewiesen, die mittels der Acetylierungsanalyse nicht zugänglich gemacht werden konnten. Aufgrund der hohen Korrekturfaktoren und der Tatsache, dass die Peaks sich teilweise überlagern, können die erhaltenen Werte nur als Anhaltspunkt dienen.

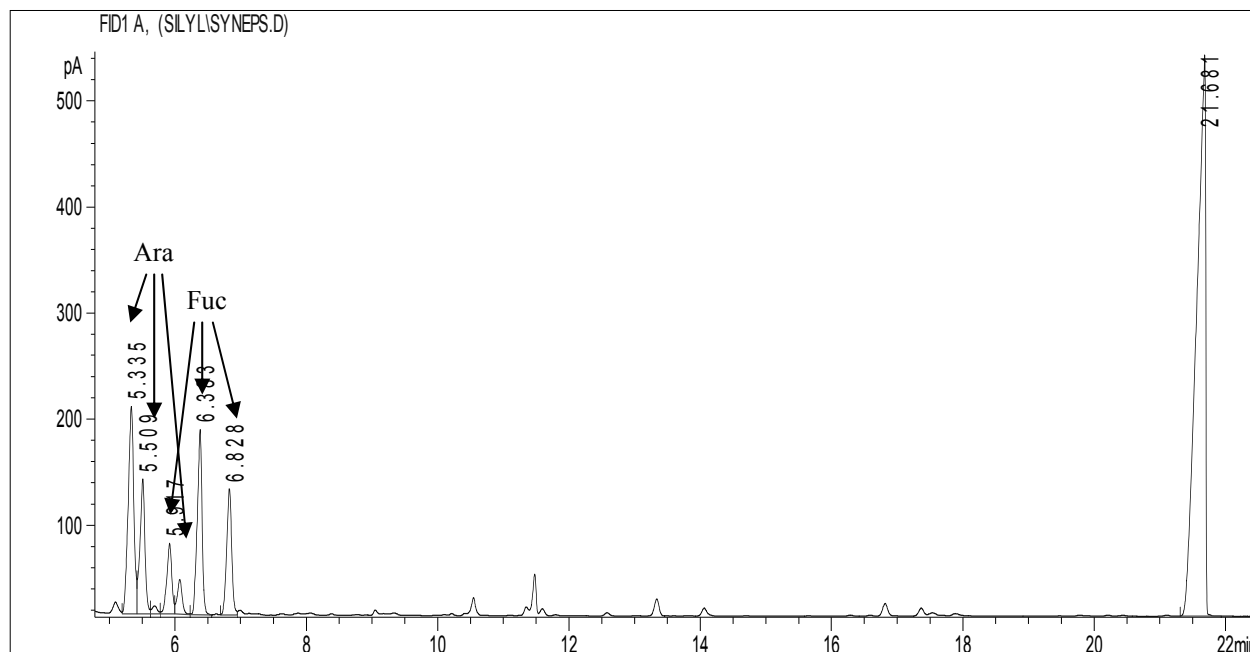


Abbildung 5.3: Gaschromatogramm des silylierten EPS nach Hydrolyse mit 0,5molarer meth. HCl

5.11. Oxalsäurehydrolyse

Es wurde eine milde saure Hydrolyse mit Hilfe von Oxalsäure durchgeführt (Gleeson and Clarke, 1979). Die erhaltenen Bruchstücke wurden durch eine Ethanol-fällung getrennt in größere, mit Ethanol fällbare und kleine Bruchstücke, die sich in Ethanol lösen. Eingesetzt wurden 25,12mg des unfraktionierten EPS, nach der Hydrolyse blieb ein unlöslicher Rückstand von 1,32mg. Es konnten 0,82mg mit Ethanol gefällt werden. Der Überstand ergab 15,59mg, der Anteil an Oxalsäure sollte theoretisch 4,725mg betragen. Es ergibt sich ein Anteil von 10,865mg Bruchstücke im Überstand.

Die Auswertung erfolgte zunächst über die gaschromatische Auswertung der Alditolacetate. Der Überstand wurde hierbei zur Unterscheidung der Mono- und Oligosaccharide mit TFA hydrolysiert oder direkt reduziert und acetyliert.

Neutralzucker	EPS	Ethanol-fällung	Überstand	Überstand hydrolysiert
Fucose	47,16%	32,01%	31,02%	51,30%
Arabinose	52,84%	67,99%	68,98%	48,70%

Tabelle 5.10: Neutralzuckerzusammensetzung der mit Ethanol fällbaren und nicht fällbaren Bruchstücke

Das Polysaccharid wird durch Oxalsäure stark gespalten. Nur ein sehr kleiner Anteil der entstandenen Bruchstücke lässt sich mit Ethanol fällen; sie bestehen überwiegend aus Arabinose. Die Auswertung der gaschromatographischen Trennung des nicht hydrolysierten Überstandes ergab nur sehr geringe Neutralzuckeranteile; das heißt es werden nur kleine Teile als Monosaccharide abgespalten, der größte Anteil liegt nach der Oxalsäurehydrolyse als kleine Oligosaccharide vor. Diese sind wie das Ausgangspolymer annähernd im Verhältnis 1:1 aus Arabinose und Fucose zusammengesetzt.

5.12. Bestimmung der Bindungstypen

5.12.1. Bindungstypanalyse der genuinen EPS

Die Bindungstypenanalyse wurde mittels Methylierung und anschließender gaschromatographischer und massenspektrometrischer Auswertung der erhaltenen PMAAs durchgeführt. Die Methylierung des genuinen EPS gestaltete sich hierbei schwierig. Nach der Methylierungsmethode in Anlehnung an Harris (Harris, 1984) konnte kein Ergebnis erhalten werden. Um zu beurteilen, ob eine Methylierung erfolgt war, das EPS aber noch zu hydrophil war, um mittels Chloroform ausgeschüttelt zu werden, wurde das Waschwasser dialysiert und gefriergetrocknet. Es ergab sich ein Rückstand von 3,14mg, der ungefähr einem Drittel der zur Methylierungsanalyse eingesetzten EPS entsprach. Der Rückstand wurde mittels der Acetylierungsanalyse nach Blakeney untersucht. Es konnte Fucose und Arabinose im Verhältnis 1:1 nachgewiesen werden, methylierte Zucker lagen keine vor. Die Chloroformphase wurde entsprechend weiter behandelt und anschließend mittels GC-MS analysiert. Das erhaltene Chromatogramm zeigt Abbildung 5.4.

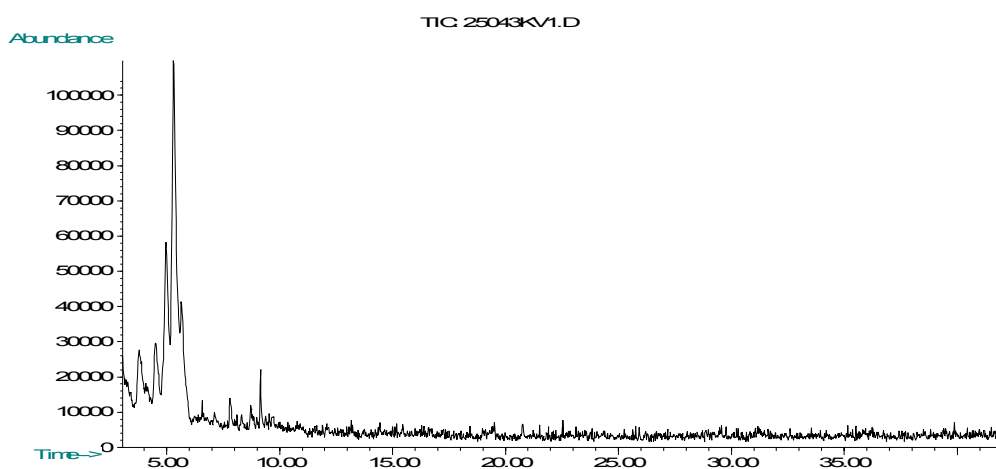


Abbildung 5.4: Totalionenchromatogramm des methylierten EPS

Die Probe wurde anschließend im SIM-Modus vermessen. Hierbei wurden zwei verschiedene Ionen-Zusammenstellungen verwendet; zum einen die Ionen mit einem m/z von 118, 131 und 143, welche besonders bei der Fragmentierung von partiell acetylierten und partiell methylierten Desoxyhexosen entstehen, und zum anderen die Ionen mit einem m/z von 101, 117 und 129, welche besonders bei der Fragmentierung von partiell acetylierten und partiell methylierten Pentosen entstehen. Der Vorteil der SIM-Messung liegt darin, dass auch kleinste Mengen an PMAAs durch die selektive Aufnahme nachgewiesen werden können

Ergebnisse

Die erhalten Chromatogramme zeigen, dass kleine Mengen EPS methyliert und auch mittels Chloroform ausgeschüttelt werden. Eine quantitative wie auch qualitative Auswertung kann über diese Chromatogramme nicht erfolgen, da nicht die gesamten Massenspektren, sondern nur die Verhältnisse der ausgewählten Ionen im SIM aufgenommen werden.

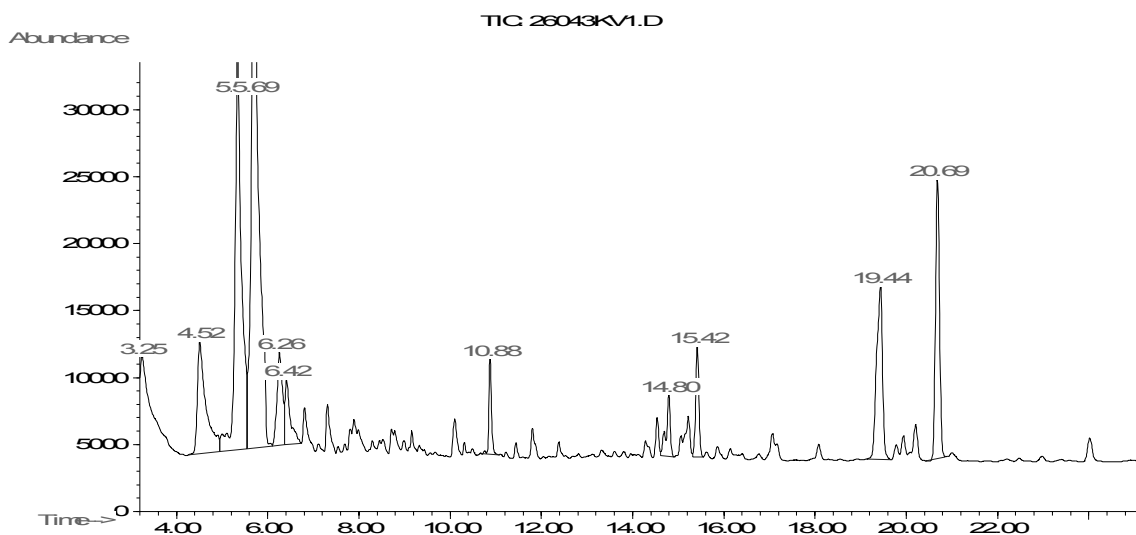


Abbildung 5.5: SIM-Modus-Ionenchromatogramm mit den Ionen 101, 117 und 129

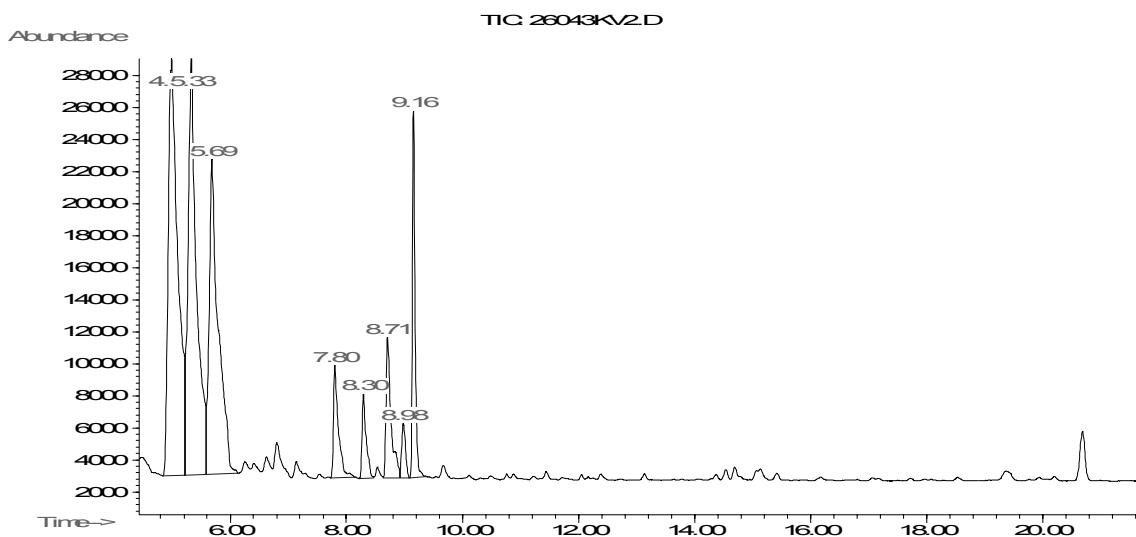


Abbildung 5.6: SIM-Modus-Ionenchromatogramm mit den Ionen 118, 131 und 143

Da das EPS einen relativ hohen Anteil an Sulfatgruppen besitzt, ist anzunehmen, dass seine schlechte Methylierbarkeit auf die relativ geringe Anzahl freier Hydroxylgruppen und deren elektrostatische Abschirmung durch benachbarte Sulfatgruppen zurückzuführen ist. Ein weiteres Problem stellt die schlechte Löslichkeit von sulfatierten Polysacchariden in DMSO dar. Diesem Problem sollte durch die Überführung der Sulfatgruppen in die freie Säure und anschließende Herstellung des Pyridiniumsalzes entgegen gewirkt werden. Da das entstehende partiell methylierte, sulfatierte Polysaccharid nicht lipophil genug für eine Ausschüttlung mit Chloroform sein sollte, wurde die weiteren Schritte nach einer modifizierten Methode nach Alban vollzogen (Alban, 1993). Das erhaltene Chromatogramm zeigt zwei Hauptpeaks, diese besitzen eine relative hohe Retentionszeit. Die Interpretation des Chromatogramms muss provisorisch nach den Retentionszeiten erfolgen, da das Massenspektrometer nicht mehr zur Verfügung stand. Es ist sicher, dass es sich bei den zwei Hauptpeaks um Verzweigungszucker handelt. Bei dem ersten Peak könnte es sich um 1,3,5-Arabinose(f) handeln, bei dem zweiten Peak müsste es sich somit um eine verzweigte Fucose handeln, eine genaue Zuordnung kann nicht erfolgen.

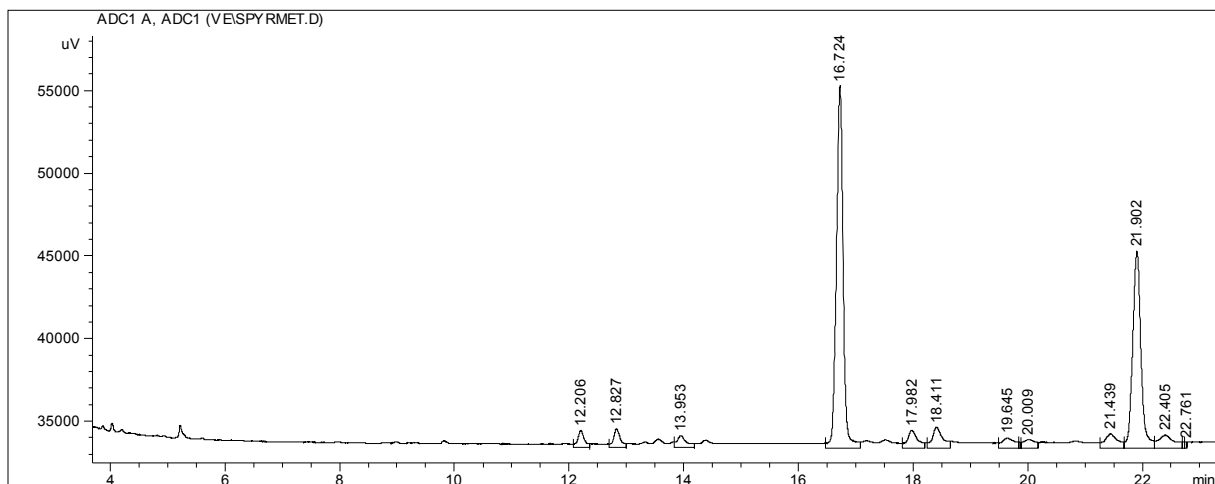


Abbildung 5.7: Gaschromatogramm des methylierten EPS

5.12.2. Bindungstypanalyse des modifizierten EPS

Zunächst wurde versucht, das EPS durch eine Alkalimodifikation (Craigie und Leigh, 1978) zugänglicher für eine Methylierung zu machen. Es werden Sulfatgruppen am C3- oder C6 einer Hexose abgespalten; die Hexose wird zu ihren Anhydrozucker reduziert. Des Weiteren werden im alkalischen Milieu Pyruvat- und Acetatgruppen vom Polysaccharid abgespalten. Somit sollten nach der Alkalimodifikation mehr freie Hydroxylgruppen für die Methylierung vorhanden sein. Es konnte kein verbessertes Ergebnis erreicht werden. Dies lässt darauf schließen, dass der Hauptteil der Sulfatgruppen nicht an das C3 der Fucose gebunden vorliegt, oder dass das EPS unter diesen Reaktionsbedingungen nicht für eine Desulfatierung zugänglich ist.

Um eine vollständige Ablösung der Sulfatgruppen zu erreichen, wurde eine Desulfatierung (Alban, 1993) durchgeführt. Anschließend wurde eine Methylierungsanalyse durchgeführt. Das erhaltene Chromatogramm zeigt zwei Hauptpeaks und sechs kleinere Peaks. Die Interpretation des Chromatogramms muss provisorisch nach den Retentionszeiten erfolgen, da das Massenspektrometer nicht mehr zur Verfügung stand. Bei den drei Peaks mit einer Retentionszeit größer als 20min handelt es sich wahrscheinlich um untermethylierte Zucker, bestenfalls um eine stark verzweigte Fucose. Die beiden Hauptpeaks liegen bei einer Retentionszeit von 14min, es handelt sich bei dem mit der geringeren Retentionszeit mit großer Wahrscheinlichkeit um 1,5-Arabinose(f) und bei dem mit größerer Retentionszeit um 1,4-Fucose(p). Bei den beiden kleinen Peaks mit geringer Retentionszeit handelt es sich vermutlich um terminale Fucose(p).

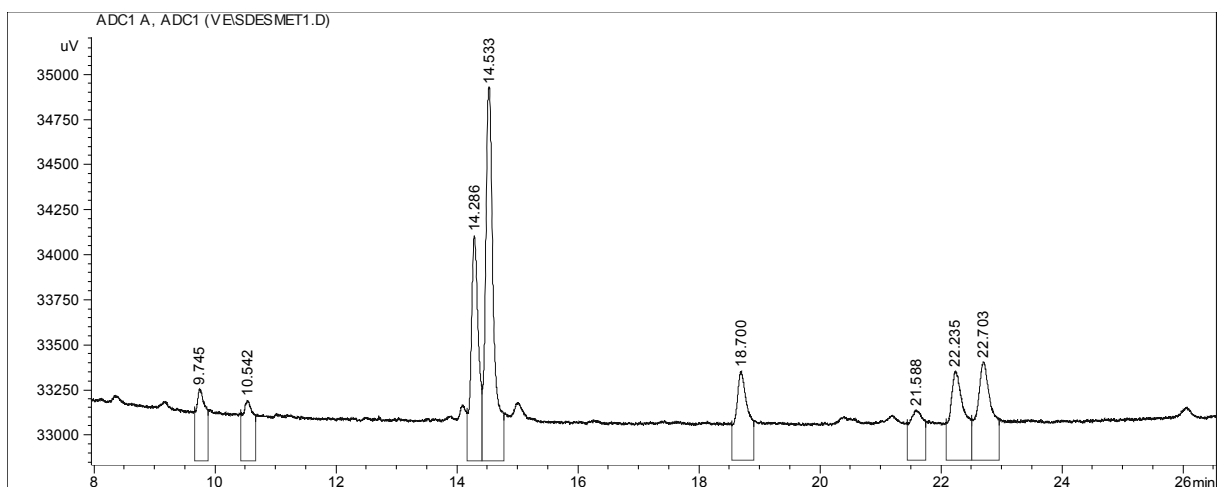


Abbildung 5.8: Gaschromatogramm des desulfatierten EPS

5.13. Quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils wurde durchgeführt mittels HPLC-Analytik mit Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin. Als Ausgangsprobe wurde die IAC-Hauptfraktion des EPS von *Synechocystis aquatilis* verwendet. Norleucin wurde als interner Standard verwendet.

Aminosäure	Mengenanteil [mg/g]	Prozentgehalt (m/m) am Proteinanteil des EPS
Asparaginsäure	0,4	10,5
Threonin	0,1	2,6
Serin	0,5	13,2
Glycin	0,3	7,9
Glutaminsäure	0,8	21,1
Alanin	0,2	5,3
Valin	0,1	2,6
Cystin	n.v.	0,0
Methionin	n.v.	0,0
Isoleucin	0,1	2,6
Leucin	0,2	5,3
Norleucin	Interner Standard	Interner Standard
Tyrosin	0,1	2,6
Phenylalanin	0,1	2,6
Histidin	0,1	2,6
Lysin	0,1	2,6
Arginin	0,1	2,6
Hydroxyprolin	n.v.	0,0
Prolin	0,6	15,79
Gesamt	3,8	0,38

Tabelle 5.13: Quantitative Aminosäurezusammensetzung der IAC-Hauptfraktion von *Synechocystis aquatilis*

Es ergibt sich bezogen auf das Gesamt-EPS ein geringer Proteinanteil von 0,38% (m/m), Hauptkomponenten sind Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin und Prolin. Nicht vorhanden sind Hydroxyprolin, Methionin und Cystin. Glycin, Leucin und Alanin sind mengenmäßig deutlich stärker vertreten als alle weiteren Aminosäuren.

5.14. Beeinflussung des Immunsystems

Die Beeinflussung des Immunsystems durch *Synechocystis aquatilis*-EPS wurde in verschiedenen Testsystemen untersucht.

5.14.1. Milz Zellproliferation

Die Milz ist ein peripheres lymphatisches Organ. Sie sammelt und baut alte Blutkörperchen ab, speichert Blutplättchen und baut auch diese ab, klärt das Blut von Gerinnungsprodukten und ist an spezifischen Abwehrvorgängen beteiligt. Sie ist aufgebaut aus der weißen und der roten Pulpa. Die weiße Pulpa besteht im inneren Bereich, der so genannten PALS-Region (periarteriolar lymphoid sheath) aus lymphatischem Gewebe, das vor allem T-Lymphozyten enthält und aus peripher angeordneten Lymphfollikeln, die hauptsächlich B-Lymphozyten aufweisen. In der roten Pulpa werden durch Makrophagen alte Blutkörperchen abgebaut. Die Lymphozyten stellen den zentralen Teil der spezifischen Abwehr des Immunsystems dar. Die Lymphozyten-Vorläuferzellen entstehen aus den lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks. T-Lymphozyten werden anschließend im Thymus geprägt, B-Lymphozyten hingegen im Knochenmark. B-Lymphozyten besitzen nach ihrer Prägung Oberflächenrezeptoren für ein spezifisches Antigen. Nach der Erstbegegnung eines B-Lymphozyten mit seinem spezifischen Antigen differenziert sich der B-Lymphozyt in Plasmazellen, die Antikörper gegen das Antigen bilden und in Gedächtniszellen, die im Blut kreisen, um beim eventuellen erneuten Kontakt mit dem Antigen schnell eine große Menge Plasmazellen auszubilden. B-Lymphozyten sind somit zusammengefasst verantwortlich für die spezifische humorale Abwehr durch Antikörper. T-Lymphozyten hingegen bilden die spezifische zelluläre Abwehr. Sie werden ebenfalls durch spezifische Antigene aktiviert, wobei diese auf Oberflächen von dendritischen Zellen zusammen mit MHC-Molekülen präsentiert werden müssen. Nach dem Antigenkontakt werden verschiedene Tochterzellen gebildet. Zum einen werden, wie bei den B-Lymphozyten, Gedächtniszellen, für eine schnellere Reaktion bei einem erneuten Antigenkontakt gebildet. Des Weiteren werden zytotoxische T-Zellen gebildet, die durch Perforine die antigentragende Zelle lysieren und somit zu deren Zelltod führen. Außerdem entstehen T-Helferzellen, die Zytokine freisetzen, um weitere zelluläre Bestandteile des Immunsystems zu aktivieren (Janeway, 2001; Thews, 1999). Zusammengefasst führt eine Proliferationssteigerung der Lymphozyten auf verschiedenen Wegen zu einer stärkeren Immunantwort auf das Eindringen eines Antigens.

Der Mausstamm C3H/HeJ besitzt die Besonderheit, dass durch Punktmutation, der Toll-like Rezeptor 4 keine Signale mehr durch LPS-vermittelte Stimulation auslösen kann. Dieser Mausstamm ist dadurch besonders resistent gegen LPS (Beutler, 2004).

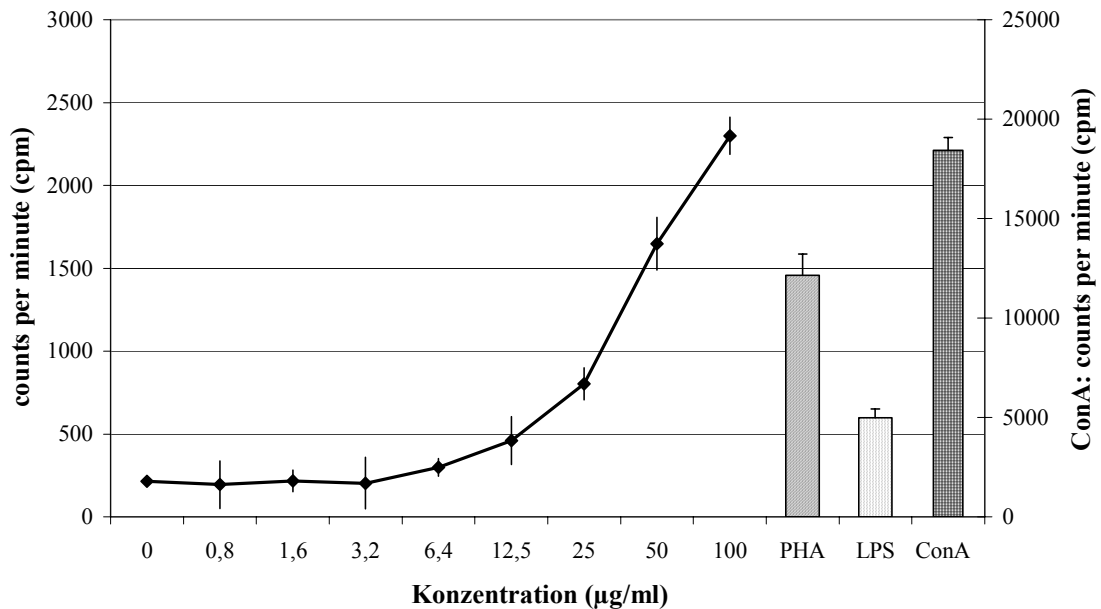


Diagramm 5.4: Steigerung der Lymphocytenproliferation in C3H/HeJ-Maus-Milzzellkulturen in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

Bis zu einer Zugabe von 3,2µg/ml EPS kann keine Proliferationssteigerung beobachtet werden. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Proliferation. Es konnte ein maximaler Stimulationsindex (SI) von 9 erreicht werden. Als Positivkontrollen wurden 10µg/ml PHA, 30µg/ml LPS und 2µg/ml ConA eingesetzt. Die LPS-Resistenz des Mäusestammes zeigt sich in dem geringen SI von 2 für die relativ hohe Konzentration von 30µg/ml LPS.

Der NMRI-Mausstamm stellt einen genetisch besonders einheitlichen Teststamm dar.

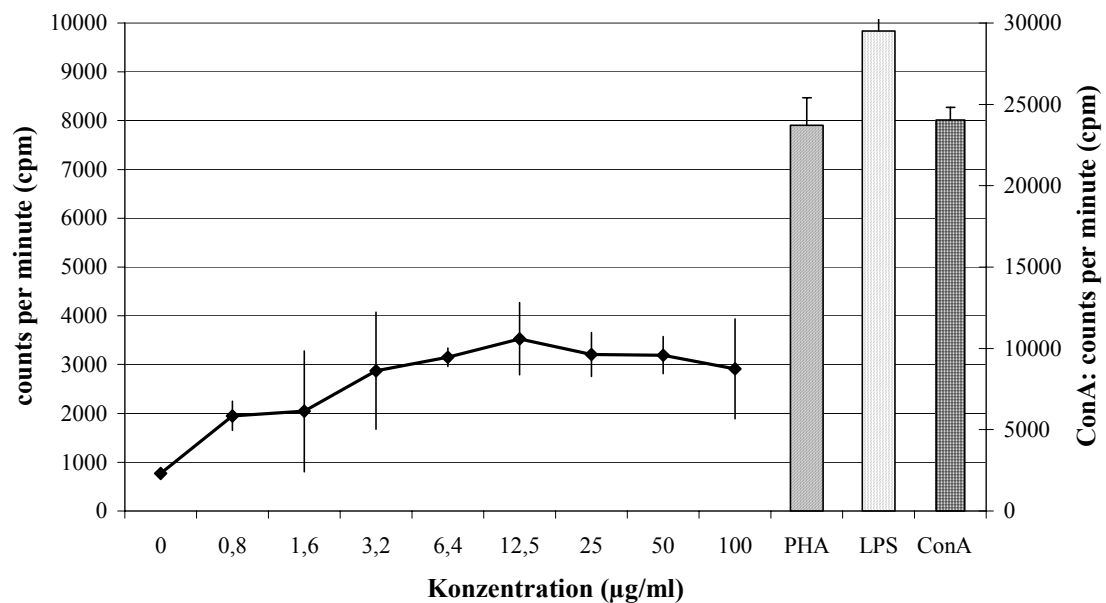


Diagramm 5.5: Steigerung der Lymphocytenproliferation in NMRI-Maus-Milzzellkulturen in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

Der Zusatz von *Synechocystis aquatilis*-EPS bewirkt nur eine geringe Proliferationsteigerung bei NMRI-Maus-Milzzellen. Der Effekt nimmt bei geringen Konzentrationen konzentrationsabhängig zu, stagniert und ist sogar rückläufig bei Konzentrationen größer als 12,5µg/ml. Es wird ein maximaler SI von 4 bei einer EPS-Konzentration von 12,5µg/ml erreicht. Als Positivkontrolle dienten 10µg/ml PHA, 30µg/ml LPS und 2µg/ml ConA.

Die Mäuse des Balb/c-Stammes sind wie die NMRI-Mäuse genetisch einheitlich.

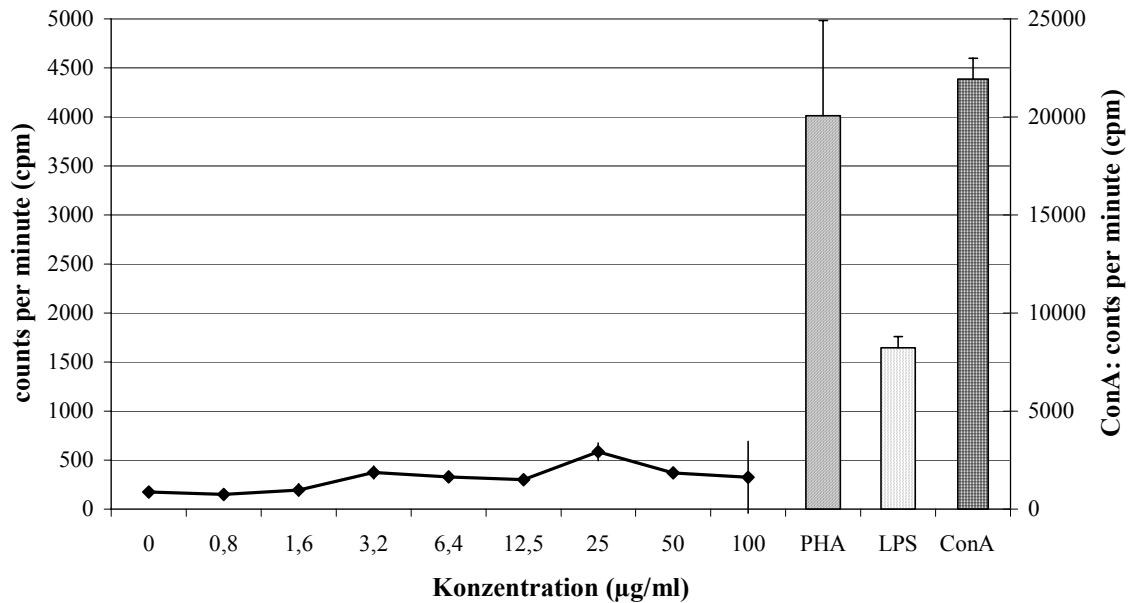


Diagramm 5.6: Steigerung der Lymphocytenproliferation in Balb/c-Maus-Milzzellkulturen in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

Der Zusatz von *Synechocystis aquatilis*-EPS besitzt keinen Effekt auf die Proliferationsrate von Balb/c-Maus-Milzzellen. Bis zu einer Konzentration von 100µg/ml ist keine signifikante Proliferationsteigerung zu beobachten. Als Positivkontrolle dienten 10µg/ml PHA, 30µg/ml LPS und 2µg/ml ConA.

5.14.2. IgM-Proliferation

IgM gehört zu den Immunglobulinen, also den Antikörpern, die von B-Lymphozyten bei Antigenkontakt gebildet werden. Immunglobuline sind Glykoproteine, die in 5 Klassen eingeteilt werden können. Sie sind symmetrisch aufgebaut aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die jeweils eine variable und eine nicht variable Region besitzen. IgM ist der größte dieser Antikörper und tritt bei der Erstimmunisierung auf. Er ist somit zuständig für die erste Abwehr, danach sinkt der IgM-Plasmaspiegel schnell wieder ab und andere Immunglobuline werden gebildet. Jeder Antikörper besitzt zwei Antigenbindungsstellen, da IgM-Antikörper im Plasma als Pentamere vorliegen, sind sie theoretisch in der Lage 10 Antigene zu binden, was aber aufgrund der sterischen Gegebenheiten nicht eintritt. Gebundene Antikörper können von Makrophagen erkannt und vernichtet werden. B-Zellen tragen IgM als antigen-spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Agglutinine gehören zu den IgM-Antikörpern; sie sind spezifische Antigene gegen Substanzen fremder Blutgruppen.

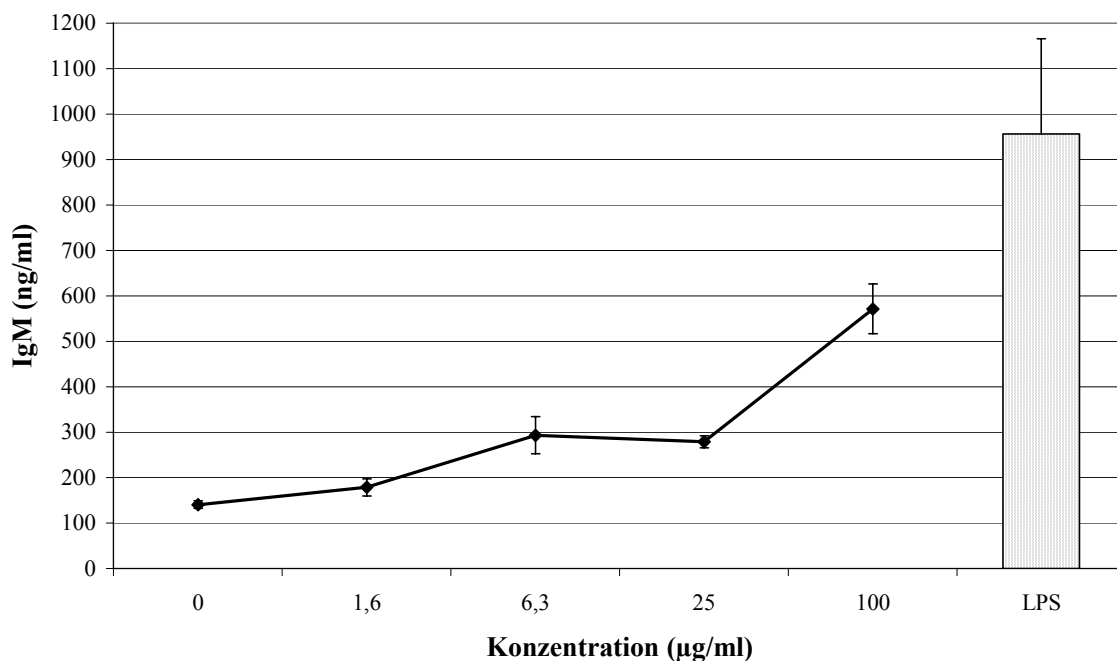


Diagramm 5.7: Steigerung der IGM-Produktion in NMRI-Maus-Milzzellkulturen in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

Der Zusatz von *Synechocystis aquatilis*-EPS steigert die IgM-Produktion. Bei einer Konzentration von 100µg/ml kann eine maximale Steigerung auf das 5fache der Produktion ohne Zusatz erreicht werden. Die Positivkontrolle von 30µg/ml LPS steigert die Produktion auf das 9fache.

5.14.3. Induktion der Zytokin-Ausschüttung

Zytokine sind Proteine, die das Verhalten oder die Eigenschaften der sezernierenden oder anderer Zellen beeinflussen, wenn diese die entsprechenden Rezeptoren besitzen. Sie werden nach einem Antigenkontakt unter anderem von Makrophagen oder T-Helferzellen ausgeschüttet, um weitere Reaktionen des Immunsystems hervorzurufen oder diese zu verstärken. Darum werden sie auch als Effektormoleküle bezeichnet (Janeway, 2001).

5.14.3.1. GM-CSF-Produktion

Der Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) ist an Wachstums und Differenzierungsprozessen zellulärer Bestandteile des Immunsystems beteiligt. Er stimuliert z.B. die Bildung von Makrophagen und Granulozyten im Knochenmark.

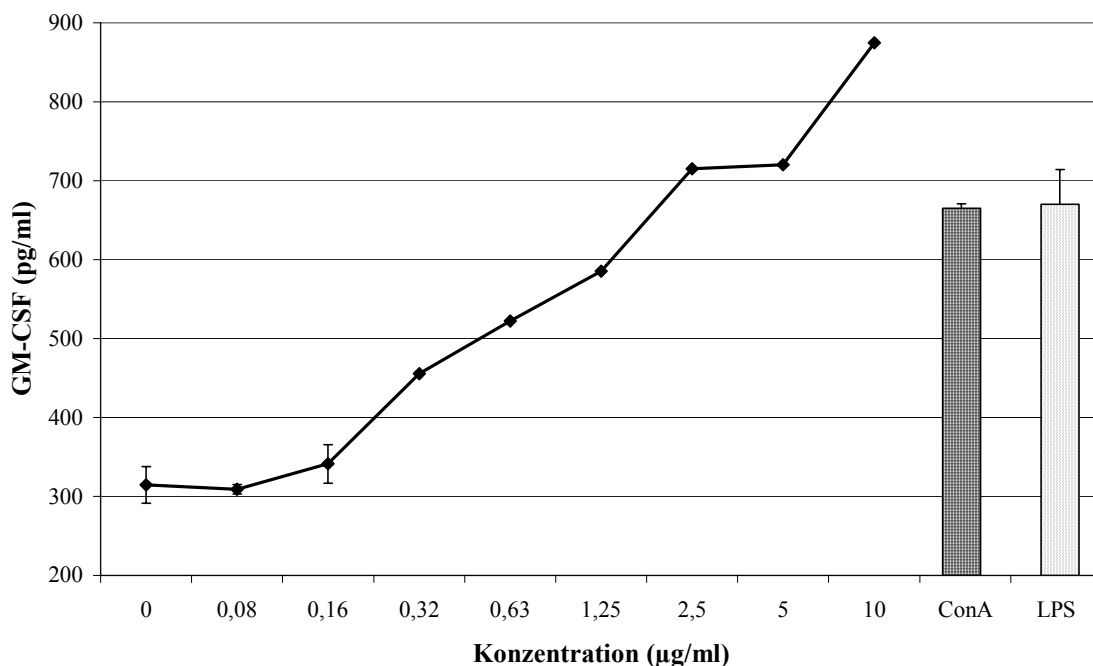


Diagramm 5.8: Steigerung der GM-CSF-Produktion in NMRI-Maus-Milzzellkulturen in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

Die Ausschüttung von GM-CSF lässt sich durch Inkubation mit *Synechocystis aquatilis*-EPS signifikant steigern. Die Steigerung erfolgt konzentrationsabhängig und erhöht den GM-CSF-Titer bei einer eingesetzten Konzentration von 10µg/ml ungefähr um das dreifache. Durch die Positivkontrollen mit 30µg/ml LPS und 2µg/ml ConA konnte nur eine Steigerung um das zweifache des Wertes erreicht werden.

5.14.3.2. IL 6-Produktion

Interleukin ist im Allgemeinen die übergeordnete Bezeichnung für die von Leukozyten produzierten Cytokine. Bestimmte Cytokine werden als Interleukine benannt und durch angehängte Zahlen voneinander unterschieden. Interleukin 6 gehört aufgrund seiner Struktur zur Familie der Hämatoetine. Es vermittelt Wachstums- und Differenzierungsprozesse von T- und B-Zellen und stimuliert die Bildung von Thrombozyten durch vermehrte Differenzierung der myeloischen Stammzellen zu Megakaryozyten. Weiterhin verstärkt es die Produktion von akute Phasen-Proteinen. Diese sind Eiweiße wie Proteaseinhibitoren, Gerinnungsfaktoren, Komplementsystemkomponenten und Transportproteine. IL 6 gehört zu den endogenen Pyrogenen. Es bindet an Rezeptoren im Hypothalamus, löst dadurch die Arachidonsäurekaskade aus und induziert somit Fieber. Darüber hinaus kann es auch von Osteoblasten nach Stimulation durch Parathormon freigesetzt werden und im folgenden Osteoklasten aktivieren.

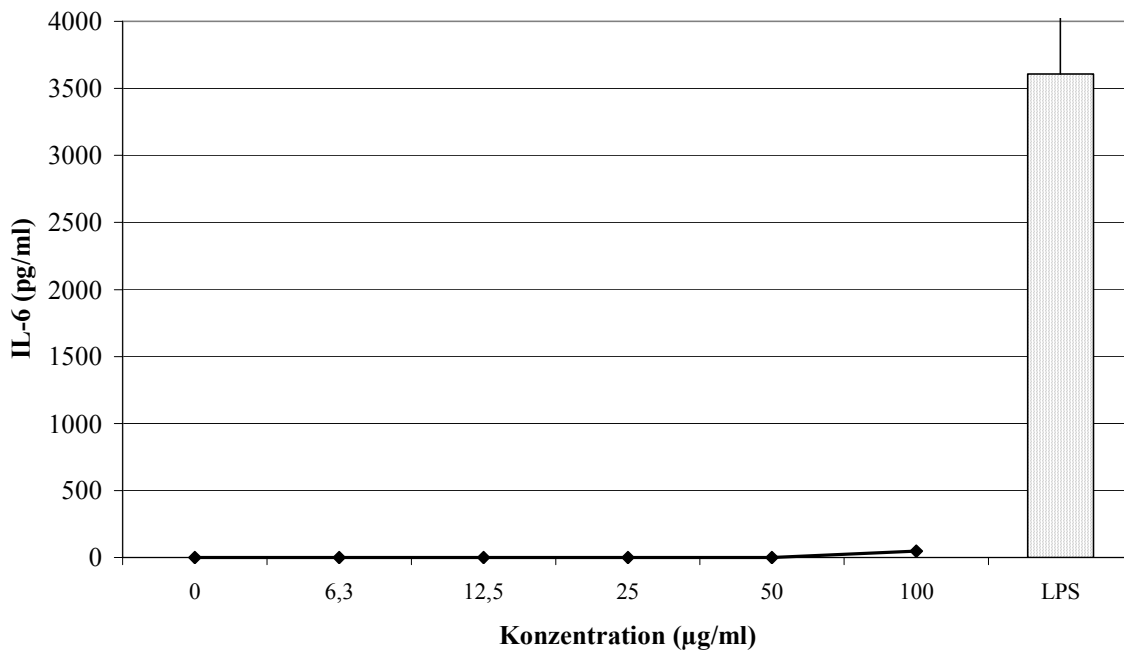


Diagramm 5.9: Steigerung der IL 6-Produktion in alveolären Maus-Makrophagen (MH-S) in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

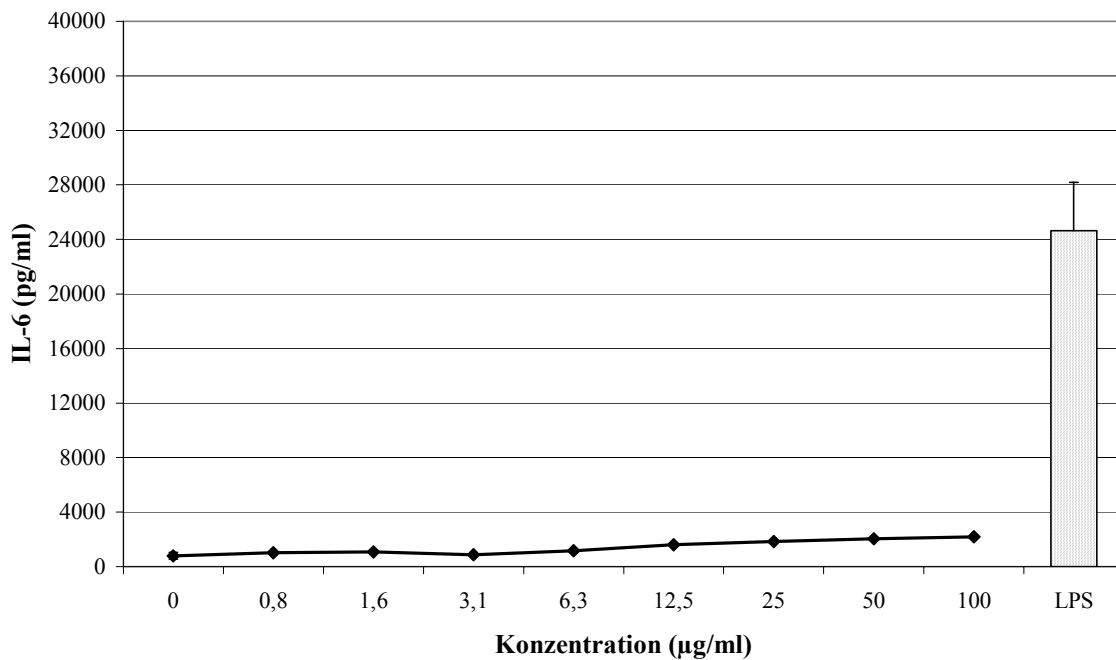


Diagramm X.: Steigerung der IL 6-Produktion in peritonealen Maus-Makrophagen
in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

Die IL 6-Produktion wird durch *Synechocystis aquatilis*-EPS in beiden Testsystemen nicht beeinflusst. Bis zu einer Konzentration von 100µg/ml ist kein Effekt vorhanden. Als Positivkontrolle wurde LPS in einer Konzentration von 10µg/ml bei peritonealen Mausmakrophagen, und von 30µg/ml bei alveolären Mausmakrophagen eingesetzt. Sie steigert die IL 6-Ausschüttung in peritonealen Mausmakrophagen auf 24.000pg/ml und in alveolären Mausmakrophagen auf 3500pg/ml. Da auch bei der hohen EPS-Konzentration von 100µg/ml jegliche IL 6-Ausschüttung ausbleibt, kann eine Verunreinigung des EPS mit LPS nahezu ausgeschlossen werden.

5.14.3.3. IFN γ -Produktion

Interferone werden in 3 Gruppen eingeteilt, α -, β - und γ -Interferone. γ -Interferone werden von T-Zellen gebildet. Sie aktivieren Makrophagen und natürliche Killerzellen. Dies kann zum einen zur Vernichtung von Tumoren führen und ist zum anderen ein entscheidendes Element der Immunantwort gegen bestimmte Erreger. IFN γ stimuliert die Bildung von MHC I z.B. auf virusbefallenen Zellen, um diese als Ziel für cytotoxische Reaktionen zu markieren, und MHC II-Molekülen z.B. auf antigenpräsentierenden Zellen. Des Weiteren hemmt IFN γ direkt die Virus-Replikation in befallenen Zellen.

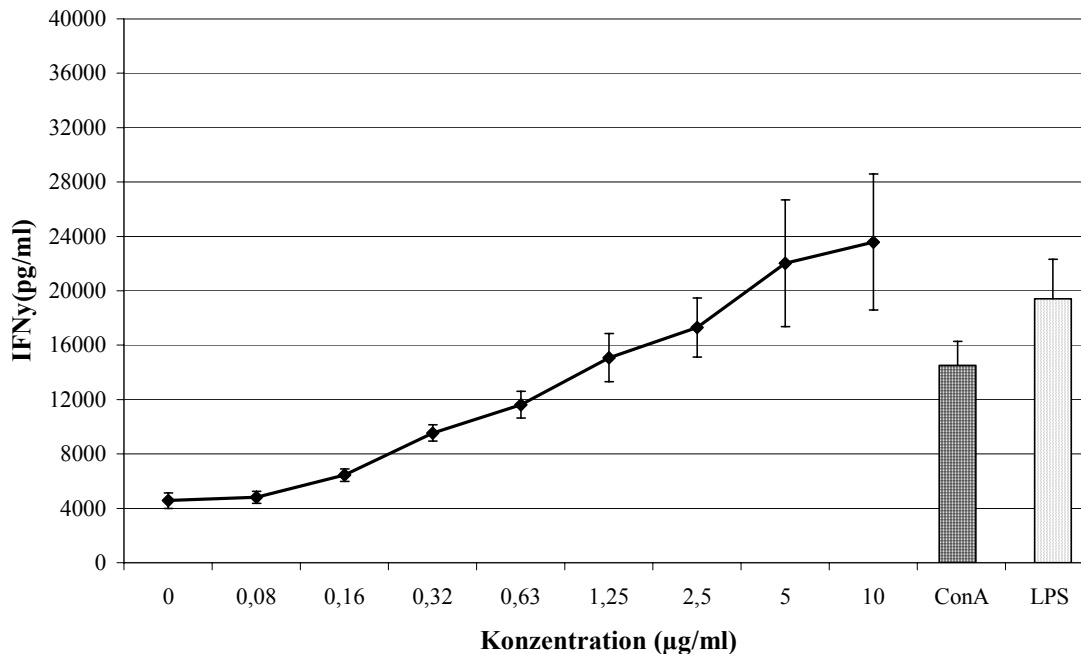


Diagramm 5.11: Steigerung der IFN γ -Produktion in NMRI-Maus-Milzzellkulturen
in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

Die Freisetzung von IFN γ konnte durch den Zusatz von *Synechocystis aquatilis*-EPS stark gesteigert werden. Die Steigerung erfolgt konzentrationsabhängig und liegt bei einem Einsatz von 10 µg/ml EPS bei einer Konzentration von 24.000 pg/ml IFN γ . Als Positivkontrolle diente LPS mit 30 µg/ml und ConA mit 2 µg/ml. Die Ausschüttung von IFN γ lag für 30 µg/ml LPS bei 20.000 pg/ml. Da 10 µg EPS die Ausschüttung stärker steigern als 30 µg LPS, kann eine Wirkung durch starke LPS-Verunreinigung ausgeschlossen werden.

5.14.3.4. TNF α -Produktion

TNF α wird unter anderem von Makrophagen gebildet. Es hilft dabei, lokale Infektionen einzudämmen und die Verbreitung von Erregern im Körper zu verhindern. Dazu löst es zum einen die Akute-Phase Reaktion einer Entzündung aus, zum anderen ist es ein starker Aktivator von Endothelzellen. Es bewirkt die Expression von Selektinen an der Oberfläche von Endothelzellen. Dies führt zu einem vermehrten Eintritt von Leukozyten in das umliegende Gewebe. Darüber hinaus verursacht es eine lokale Gerinnung des Blutes, um Entzündungen zu begrenzen und den Transport von Erregern zu verhindern. Bei einer systemischen Blutvergiftung führen diese Reaktionen jedoch zum lebensbedrohlichen Schock. TNF α kann auch von Tumoren gebildet werden. Es stimuliert dann die Lipolyse und den Muskelabbau und führt somit zu einem unerwünschten Gewichtsverlust. Es führt aber auch zur Zytolyse von Tumorzellen.

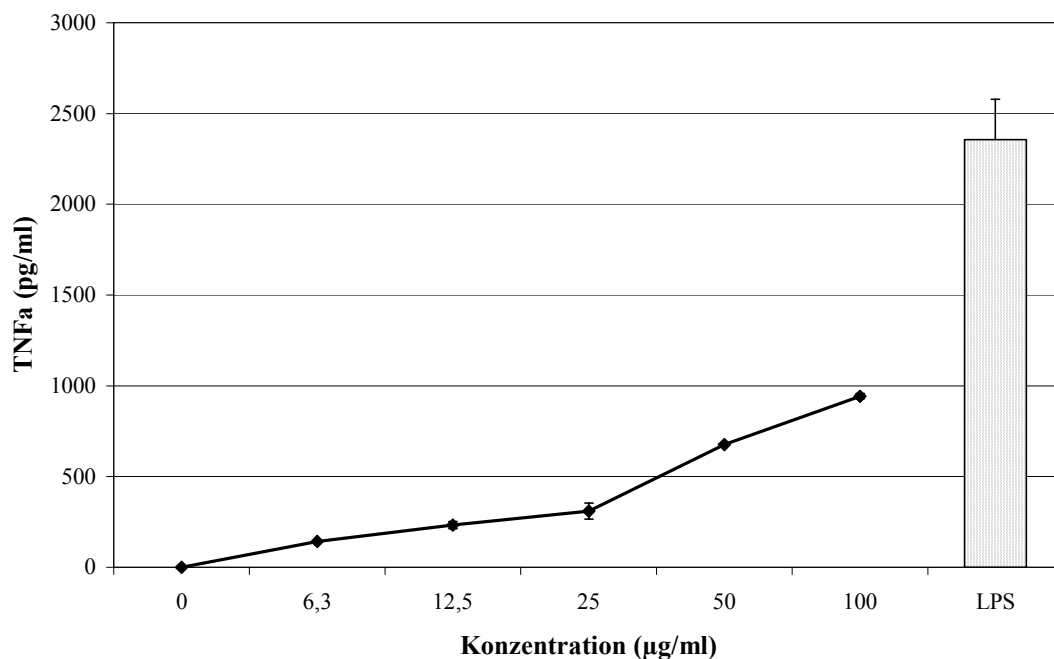


Diagramm 5.12: Steigerung der TNF α -Produktion in alveolären Maus-Makrophagen (MH-S) in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

Die Steigerung der TNF α -Produktion in alveolären Maus-Milzzellen erfolgt durch *Synechocystis aquatilis*-EPS konzentrationsabhängig nahezu linear. Die Produktion konnte maximal mit 100µg/ml bis auf nahezu 1000pg/ml TNF α gesteigert werden. Als Positivkontrolle diente LPS mit 30µg/ml.

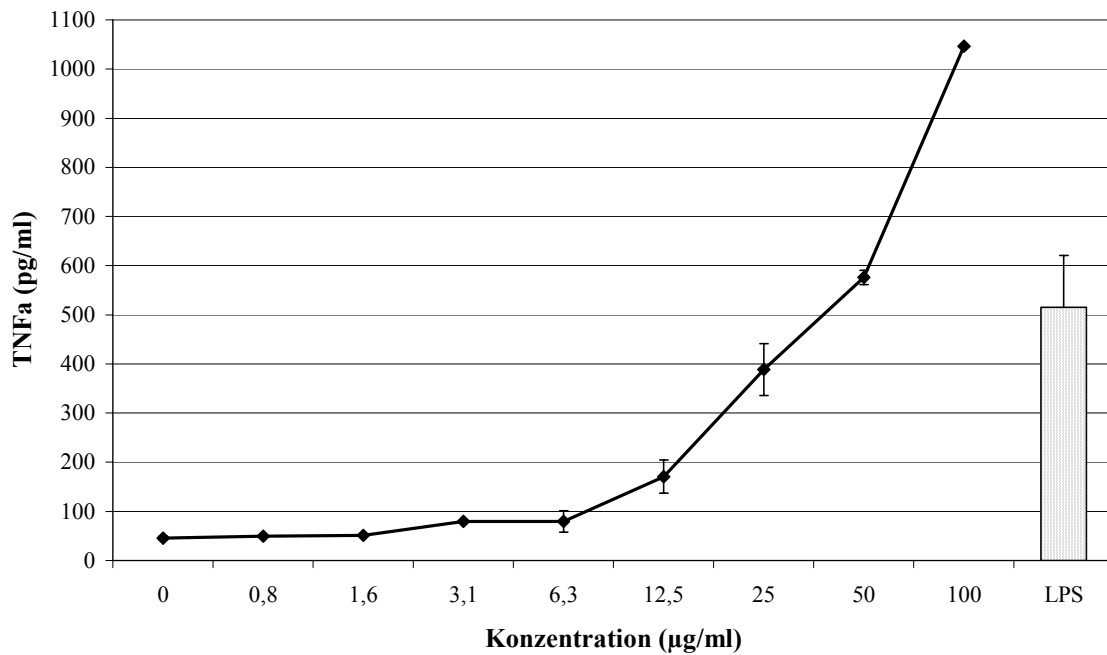


Diagramm 5.13: Steigerung der TNF α -Produktion in peritonealen Maus-Makrophagen in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

Die Steigerung der TNF α -Produktion in peritonealen Maus-Makrophagen beginnt ab einem Zusatz von 3,1µg/ml *Synechocystis aquatilis*-EPS um den Faktor 2. Bis zu einem Zusatz von 100µg/ml steigert sich die TNF α -Produktion auf einen Faktor von 21. Ab der Konzentration von 6,3µg/ml EPS erfolgt die Steigerung konzentrationsabhängig und nahezu linear. Als Positivkontrolle diente LPS in einer Konzentration von 10µg/ml.

5.14.4. Nitrit-Produktion

Aktivierete Makrophagen sind fähig, aktive Sauerstoff-Spezies, unter anderem Stickstoffmonoxid, zu bilden. Dieses ist in der Lage, Membranen von eingedrungen Erregern zu schädigen und somit ihre Abtötung zu erleichtern. Dieser Mechanismus ist besonders wichtig bei der Abwehr großer Parasiten, die nicht phagozytiert werden können. Stickstoffmonoxid führt aber auch an körpereigenen Geweben zu Schädigungen; seine Freisetzung muss daher stark reguliert sein (Janeway, 2001).

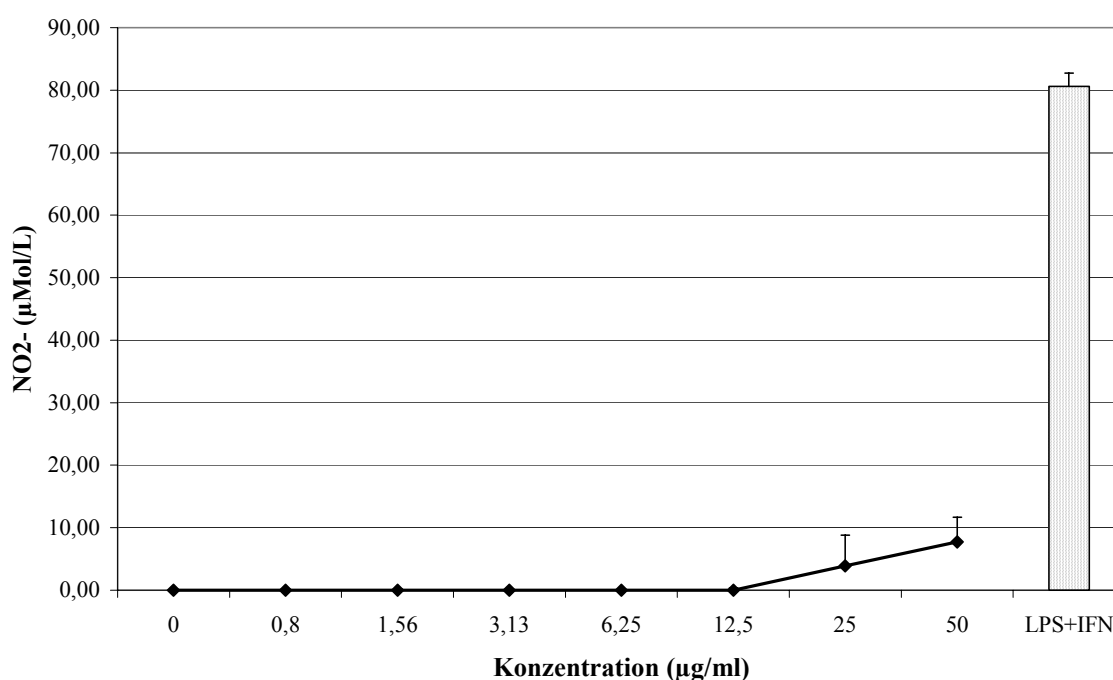


Diagramm 5.14: Steigerung der Nitrit-Produktion in alveolären Maus-Makrophagen (MH-S) in Anwesenheit von *Synechocystis aquatilis*-EPS

Eine Steigerung der Stickstoffoxid-Produktion findet durch *Synechocystis aquatilis*-EPS nicht statt. Bis zum Einsatz von 12,5µg/ml ist keine Reaktion zu beobachten; bei 25µg/ml und 50µg/ml ist eine geringe Nitritkonzentration von unter 10µMol/L nachzuweisen. Als Positivkontrolle wurde LPS+IFN in einer Konzentration von 5+1ng/ml eingesetzt.

5.14.5. Beeinflussung des Komplementsystems

Das Komplementsystem stellt einen wichtigen Teil der unspezifischen, humoralen Abwehr des menschlichen Immunsystems dar. Es besteht aus einer Vielzahl von Plasmaproteinen, die in der Lage sind, miteinander zu reagieren und dadurch Krankheitserreger zu opsonisieren und eine Reihe von Entzündungsreaktionen auszulösen. Ein Teil der Komplementkomponenten sind Proteasen, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden, die so genannte Zymogene. Da sie im ungespaltenen Zustand keine Aktivität besitzen, können sie im Blut vorliegen ohne schädliche Reaktionen hervor zu rufen. Das Komplementsystem wird über eine „triggered enzyme“-Kaskade aktiviert. Hierbei spaltet jeweils eine aktivierte Komponente eine weitere Komponente und überführt sie damit in ihre aktivierte Form. Die Komplementkaskade kann über drei Wege aktiviert werden, den klassischen Weg, den MB-Lektin Weg und den alternativen Weg. Beim klassischen und MB-Lektin Weg (mannan-binding Lektin) bindet zunächst ein spezifisches Lektin, im ersten Fall an einen dort lokalisierten Antigen-Antikörperkomplex, im zweiten Fall direkt an die Oberfläche von Bakterien oder Viren. Dadurch wird eine Reihe von Reaktionen in Gang gesetzt, die zur Spaltung der ersten Komponente führt und somit die Kaskade auslöst. Der alternative Weg stellt einen Verstärkungsmechanismus dar, er wird entweder über eine spontane Hydrolyse der Komplementkomponente C3 oder als über die auf Pathogenoberflächen opsonisierten C3b Komponenten, die durch den klassischen oder MB-Lektin-Weg aktiviert wurden, ausgelöst. Das Komplementsystem schützt den Körper auf drei verschiedene Weisen vor Infektionen. Erstens markiert es die Pathogene durch aktivierte Komponenten, damit sie von den Makrophagen erkannt und vernichtet werden. Zweitens werden bei den Spaltungsreaktionen kleine Fragmente freigesetzt, die Anaphylatokine, die chemotaktisch wirken. Und drittens zerstört der Membran-Attack-Komplex, das Endprodukt der Kaskade, die Zielzellen, indem er Poren in deren Lipidmembranen ausbildet (Janeway, 2001). Diese Zellyse wird in den folgenden Testsystemen zur Bestimmung der Komplementaktivität genutzt. Die verwendeten Erythrozyten aktivieren hierbei Komplementkomponenten, welche am Ende der ausgelösten Kaskade zu einer Porenbildung in der Zellmembran der Erythrozyten führen und diese zerstört, das austretende Hämoglobin kann dann photometrisch vermessen werden. Der qualitative Unterschied der Hämolyse mit und ohne Vorinkubation gibt dabei Aufschluss über den Einfluss der eingesetzten Substanz auf das Komplementsystem.

5.14.5.1. klassischer Aktivierungsweg

Die Beeinflussung des Komplementsystems über den klassischen Aktivierungsweg wurde zum einen nach 30minütiger Vorinkubation und zum anderen ohne Vorinkubation bestimmt. Getestet wurde der Einfluss des unfraktionierten EPS und der IAC-Fractionen. Das unfraktionierte EPS und die IAC-Fractionen 3 und 4 zeigten in allen Testungen eine starke Modulation des Komplementsystems. Es kann hierbei von einer Hemmung des Komplementsystems ausgegangen werden, da mit und ohne Vorinkubation eine gleich starke Modulation vorliegt. Die Testungen der IAC-Fractionen 1 und 2 gaben chargenabhängig unterschiedliche Werte, so dass über ihre Aktivität nicht ohne weitere Untersuchungen keine Aussage getroffen werden kann. Die IAC-Fractionen 1 und 2 einer Charge zeigten keinen Effekt auf das Komplementsystem, diese Fractionen einer anderen Charge zeigten einen ähnlichen Effekt wie die IAC-Fractionen 3 und 4 und das unfraktionierte EPS.

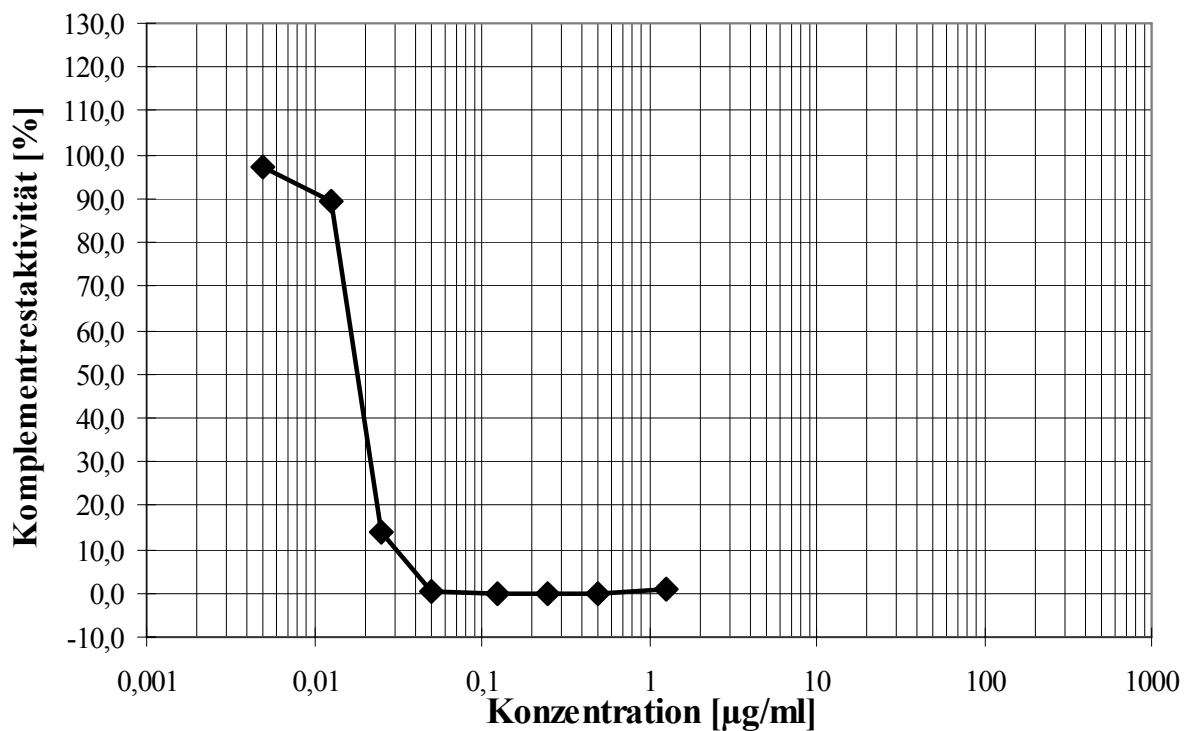


Abbildung 5.9: Effekt des unfraktionierten EPS nach 30minütiger Vorinkubation auf die Komplement-induzierte Hämolyse im klassischen Aktivierungsweg

Es konnten folgende, mittlere IC₅₀-Werte ermittelt werden:

	IC ₅₀ -Werte in µg/ml	
	mit Vorinkubation	ohne Vorinkubation
unfraktioniertes EPS	0,020	0,046
IAC-Fraktion 3	0,035	0,151
IAC-Fraktion 4	0,037	0,168

Tabelle 5.14: IC₅₀-Werte des unfraktionierten EPS und zwei IAC-Fraktionen im klassischen Aktivierungsweg

Die IC₅₀-Werte des unfraktionierten EPS, aber auch die der IAC-Fraktion liegen außergewöhnlich niedrig. Das von *Synechocystis aquatilis* abgegebene EPS bewirkt eine sehr starke Hemmung des Komplementsystems über den klassischen Signalweg schon in geringsten Konzentrationen. Das unfraktionierte EPS zeigt dabei stärkere Aktivität als die Fraktionen 3 und 4. Dies kann eventuell auf eine Desulfatierung oder Degradation der Polymere während der Auftrennung am Ionenaustauscher zurückgeführt werden.

5.14.5.2. alternativer Aktivierungsweg

Die Beeinflussung des Komplementsystems über den alternativen Signalweg wurde ebenfalls mit einer 30minütiger Vorinkubation und ohne Vorinkubation bestimmt. Getestet wurde der Einfluss des unfraktionierten EPS und der IAC-Fraktionen. Das unfraktionierte EPS und die IAC-Fraktionen 3 und 4 zeigten in allen Testungen kaum eine Modulation des Komplementsystems.

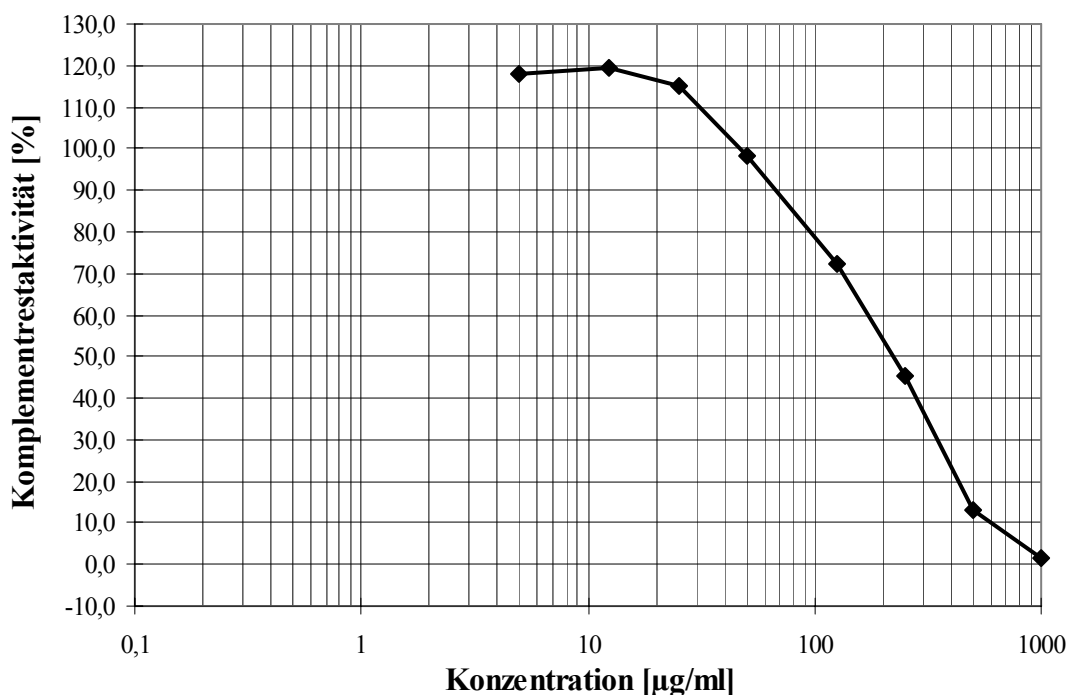


Abbildung 5.10: Effekt des unfraktionierten EPS nach 30minütiger Vorinkubation auf die Komplement-induzierte Hämolyse im alternativen Aktivierungsweg

Es konnten folgende, mittlere IC_{50} -Werte ermittelt werden:

	IC₅₀-Werte in µg/ml	
	mit Vorinkubation	ohne Vorinkubation
unfraktioniertes EPS	377	426
IAC-Fraktion 3	n.d.	n.d.
IAC-Fraktion 4	280	374

Tabelle 5.15: IC_{50} -Werte des unfraktionierten EPS und zwei IAC-Fractionen im alternativen Signalweg

Das Komplementsystem wird über den alternativen Signalweg erst durch hohe Konzentrationen der eingesetzten Proben beeinflusst. Es ist zu erwarten, dass beim alternativen Aktivierungsweg mehr Substanz zur Beeinflussung des Systems eingesetzt werden müssen, da auch eine 30fach höhere Serumkonzentration eingesetzt wird. Die erhaltenen IC_{50} -Werte liegen aber um mehr als das 100.000fache höher als die beim klassischen Aktivierungsweg nötige Konzentration. Es kann daher von einer selektiven Beeinflussung des klassischen Aktivierungswegs gesprochen werden.

3.15. Zusammenfassung

Das von *Synechocystis aquatilis* gebildete EPS wird, den gefundenen Werten zufolge, während des gesamten Wachstumsverlaufs von 60 Tagen regelmäßig gebildet. Die Zunahme der Kohlenhydrate im Nährmedium erfolgt im beobachteten Wachstumszeitraum nahezu linear. Die Neutralzuckerzusammensetzung ändert sich über 100 Tage hinweg kaum. Das EPS besteht aus zwei Neutralzuckern, namentlich Fucose und Arabinose. Das hydrodynamische Volumen ist größer als 800.000Da, das mittlere Molekulargewicht beträgt 3.513.000Da. Bei der Bestimmung dieser Daten durch Gelpermeationschromatographie fiel auf, dass es sich nicht um ein einheitliches Polymer handelt. Bei langsamer Fließgeschwindigkeit spaltete sich die Peakspitze, am vorhandenen Säulenmaterial konnte aber keine ausreichende Trennung erfolgen. Die Trennung wurde folglich über eine andere Methode versucht. Es wurde die Ionenaustauschchromatographie angewandt und das EPS über seine unterschiedlichen Ladungsdichten aufgetrennt. Es konnten vier Fraktionen getrennt werden. Besonders Fraktion 1 mit der geringsten Ladungsdichte unterschied sich deutlich von den anderen Fraktionen, da sie hauptsächlich aus Arabinose, Galactose und Glucose besteht. Im Gegensatz dazu sind die Hauptbausteine der drei anderen Fraktionen Fucose und Arabinose. Fraktion 2 und 4 besitzen zudem einen gewissen Anteil an Glucose. Zwischen der Hauptfraktion und dem unfraktionierten EPS bestand kaum ein Unterschied. Besonders hervorzuheben ist der Nachweis von 21% Sulfat im EPS und der sich daraus ergebene Substitutionsgrad von 0,43 Sulfatmolekülen/Zuckermolekül. Weiterhin konnten geringe Mengen Pyruvat (0,67%) und Acetat (0,68%) nachgewiesen werden. Der Sulfatanteil des EPS beeinflusst das Verhalten des EPS stark. Es verleiht dem Molekül den sauren Charakter und erklärt die hohe Ladungsdichte der IAC-Fraktionen. Uronsäuren konnten mittels der photometrischen Bestimmung nur in Spuren und über die Markierung mit Deuterium gar nicht nachgewiesen werden. Daher ist anzunehmen, dass das EPS keine Uronsäuren enthält, die zum sauren Charakter des Moleküls beitragen. Durch Aufspaltung der Polysaccharide in kleinere Bruchstücke sollten weitere Erkenntnisse über die Struktur gewonnen werden. Es wurde nur eine der zwei verschiedenen Degradations-Methoden angewandt. Da keine Uronsäuren im EPS vorlagen, wäre eine Lithiumdegradation sinnlos gewesen. Bei der Oxalsäurehydrolyse wurden labilere Bindungen, an denen Arabinose und Fucose beteiligt waren, gespalten. Das Polysaccharid wurde hierbei nahezu vollständig in so kleine Oligosaccharide gespalten, dass diese nicht mehr mit Ethanol fällbar waren. Theoretisch wäre eine vollständige Spaltung in Monosaccharide denkbar gewesen, da das EPS nur aus

Neutralzuckern besteht, die labile Bindungen bilden. Tatsächlich wurde aber nur ein sehr geringer Teil an Fucose und Arabinose als Monosaccharid abgespalten. Die entstandenen Oligosaccharide befanden sich fast vollständig im Überstand der Ethanolfällung, nur ein sehr geringer Anteil konnte gefällt werden. Dieser Teil bestand zu 70% aus Arabinose und zu 30% aus Fucose. Im Gegensatz dazu wiesen die im Überstand verbliebenen Oligosaccharide wieder ein ungefähres 1:1-Verhältnis von Fucose zu Arabinose auf. Das EPS wurde als Pyridiumsalz und im desulfatierten Zustand methyliert. Die Interpretation kann erst nur vorläufig erfolgen, da kein Massenspektrometer zu Verfügung stand. Die Ergebnisse zeigen aber deutlich, dass nach der Desulfatierung Verzweigungspunkte verschwinden, die zuvor durch die Sulfatgruppen vorgetäuscht wurden. Das EPS scheint relativ wenige Verzweigungen aufzuweisen und eine eher einfache Struktur mit nur zwei Hauptkomponenten zu besitzen. Nach einer Interpretation der Retentionszeiten handelt es dabei wahrscheinlich um 1,5-Arabinose(f) und 1,4-Fucose(p), bei den wenigen Verzweigungspunkten handelt es sich möglicherweise um 1,3,5-Arabinose(f), wobei diese eventuell von nicht abgespaltenen Sulfatgruppen herrühren könnten. Eine weitere Untersuchung der Ergebnisse durch Massenspektren ist für eine endgültige Interpretation der Ergebnisse unerlässlich. Das EPS von *Synechocystis aquatilis* besitzt den erfolgten Testungen zufolge eindeutig immunmodulierende Eigenschaften. Eine Auswirkung auf die zelluläre Reaktion der spezifischen Immunantwort, die mit Hilfe von Milzzellproliferationsassays bestimmt wurde, ist augenscheinlich abhängig von der verwendeten Mausart. So zeigen Milzzellen des NMRI- und des Balb/c-Stammes nur eine sehr geringe bis gar keine Reaktion auf den Zusatz von *Synechocystis aquatilis*-EPS. Der Mausstamm C3H/HeJ hingegen, der eine Punktmutation des Toll-like Rezeptors 4 (TLR-4) besitzt und damit LPS-insensitiv ist, zeigt eine deutliche Proliferationssteigerung unter Zusatz von *Synechocystis aquatilis*-EPS. Die Stimulation der Proliferation muss demnach auf der veränderten Signalkaskade im C3H/HeJ-Mausstamm beruhen. Der Test wurde mit nicht aufgereinigten Milzzellsuspensionen durchgeführt; dadurch sollte die interzelluläre Signaltransduktion zwischen den verschiedenen Immunzellen erhalten bleiben. Daher sind sowohl T-Zellen, B-Zellen als auch Makrophagen/Monozyten in der Zellsuspension vorhanden. Um nun eine Aussage über den Weg der Stimulation zu treffen und darüber, welche Zellart zur Proliferation angeregt wird, muss berücksichtigt werden, welche Zellen bei einer TLR-4-Mutation verändert vorliegen. Der TLR-4-Rezeptor ist vorwiegend auf Makrophagen anzutreffen und vermittelt, nach Stimulation durch LPS über eine Aktivierung von NFκB, dass Gene aktiviert werden, die verschiedene Abwehrmechanismen auslösen. Eine Proliferationssteigerung der in der Suspension

vorhanden Makrophagen durch *Synechocystis aquatilis* ist somit am wahrscheinlichsten. *Synechocystis aquatilis*-EPS besitzt aber auch eine Auswirkung auf B-Zellen, da gezeigt werden konnte, dass eine Inkubation von NMRI-Mausmilzzellen mit *Synechocystis aquatilis*-EPS eine erhöhte Ausschüttung von Immunglobulin M zur Folge hat. Dieser Effekt kann sowohl aus einer direkten Stimulation der B-Zellen, aber auch aus einer IL-6 vermittelten Stimulation herrühren (Le und Vilcek, 1990). Da im Folgenden aber gezeigt werden kann, dass *Synechocystis aquatilis*-EPS keine Auswirkung auf die IL-6 Produktion besitzt, kann von einer direkten Stimulation der B-Zellen ausgegangen werden. Der Einfluss auf T-Helferzellen wurde anhand der Interferon- γ -Produktion getestet. Es konnte gezeigt werden, dass durch Inkubation einer NMRI-Mausmilzellsuspension mit *Synechocystis aquatilis*-EPS die INF γ -Produktion signifikant gesteigert werden kann. Der Einfluss auf die Makrophagenaktivität wurde anhand der GM-CSF-, TNF α - und IL-6-Freisetzung sowie der Produktion von NO bestimmt. Hierbei ließ sich wie bei den Zellproliferationsassays eine spezifische Stimulation feststellen. Während die IL-6-Freisetzung weder aus alveolären noch aus peritonealen Milzzellen beeinflusst wurde, konnte durch eine Inkubation mit *Synechocystis aquatilis*-EPS die Freisetzung von GM-CSF und TNF α signifikant gesteigert werden, wobei die peritonealen Milzzellen mit einer stärkeren TNF α -Freisetzung reagierten als die alveolären. Die NO-Produktion wird hingegen auch in Anwesenheit hoher Konzentrationen an *Synechocystis aquatilis*-EPS nur geringfügig gesteigert. Diese Ergebnisse weisen auf eine spezifische Beeinflussung der Zytokinausschüttung und nicht auf eine generelle Makrophagenaktivierung hin. Auf welchem Mechanismus diese Reaktionen beruhen, müsste noch durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Ein weiterer spezifischer Effekt des *Synechocystis aquatilis*-EPS auf das Immunsystem lässt sich im Komplementmodulationstest nachweisen. Er zeigt für den klassischen Signalweg eine äußerst potente Hemmung des Komplementsystems durch *Synechocystis aquatilis*-EPS. Über den alternativen Signalweg ist hingegen kaum ein Effekt zu erreichen. Der Effekt auf das Komplementsystem muss daher in der Aktivierungsphase über den klassischen Signalweg zu suchen sein und somit die Faktoren C1, C4 oder C2 betreffen. Der Effekt lässt sich sowohl für das unfraktionierte EPS sowie auch für die beiden Fraktionen mit der höchsten Ladungsdichte nachweisen. Für die beiden Fraktionen mit geringer Ladungsdichte lagen widersprüchliche Werte vor. Es ist anzunehmen, dass der Effekt auf das Komplementsystem abhängig vom Substitutionsgrad mit Sulfationen ist, da andere potente Hemmstoffe des Komplementsystems ebenfalls eine Abhängigkeit vom Sulfatierungsgrad zeigen (Alban, 1993).

6. Diskussion

Exopolysaccharide (EPS) aus Cyanobakterien besitzen aufgrund ihrer teilweise interessanten rheologischen sowie pharmakologischen Eigenschaften als auch aufgrund ihrer problemlosen Kultivierungsbedingungen ein großes Potential für eine Verwendbarkeit in Pharmazie und Technologie. Als Problem stellt sich bisher nur dar, dass noch wenig über ihren strukturellen Aufbau bekannt ist. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich daher mit der strukturellen Untersuchung der EPS dreier verschiedener Cyanobakterienarten, in deren Zuge verschiedene Methoden angewandt wurden. Ein weiteres Augenmerk lag auf der Untersuchung der immunmodulierenden Eigenschaften des EPS aus *Synechocystis aquatilis*. Gegenstand der vorliegenden Diskussion ist der Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit dem bisherigen Stand der Forschung über die Kultivierung von Cyanobakterien, die analytische Aufklärung der EPS-Strukturen und die pharmakologischen Eigenschaften der EPS. Die im Ergebnisteil zusammengefassten Erkenntnisse über die untersuchten EPS von *Nostoc insulare*, *Chroococcus minutus* und *Synechocystis aquatilis* werden im Folgenden sowohl untereinander gegenübergestellt, als auch mit Daten anderer Forschungsarbeiten verglichen. Insbesondere sollen auch die verwendeten Methoden für mögliche weitere Untersuchungen auf ihrer Aussagekraft und Zweckmäßigkeit hin untersucht werden.

6.1. Kultur

Die Anzucht der Cyanobakterien erfolgte nach standardisierten Bedingungen. Diese wurden festgelegt nach eingehenden Untersuchungen der optimalen Anzucht der Cyanobakterien unter verschiedenen Gesichtspunkten, unter anderem derjenigen der Exopolysaccharidproduktion (Fischer, 1996). Das hier verwendete Anzuchtmedium erwies sich als ideal für ein gutes Wachstum verschiedener Cyanobakterienarten und für eine gesteigerte Exopolysaccharidproduktion. Der Problembereich des besten Anzuchtmediums und der Anzuchtbedingungen für eine maximale Exopolysaccharidproduktion wird in der Literatur stark diskutiert. Eines der ersten untersuchten Exopolysaccharide von Cyanobakterien stammt von *Anabaena cylindrica*. Bishop züchtete 11-Kulturen über 49 Tage mit Nitrat als Stickstoff- und Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle. Es konnten 150mg/L EPS isoliert werden (Bishop, 1954). Schon die Veränderung von physikalischen Parametern kann die EPS-Produktion beeinflussen. So wird sie im Fall von *Anabaena* sp. ATCC 33047 mit Anstieg der Temperatur merklich gesteigert (Moreno, 1998). Im Gegensatz dazu verringert

sich die EPS-Produktion in *Spirulina platensis*-Kulturen bei Temperaturanstieg (Nicolaus, 1999). Die Art und Intensität der Belichtung können die EPS-Produktion ebenfalls beeinflussen. So steigert eine stärkere Lichteinstrahlung die EPS-Produktion in *Anabaena* sp. ATCC 33047-Kulturen. Der Wechsel von Dauerbelichtung zu einem Licht-Dunkelheitszyklus bewirkt bei *Phormidium*- und *Anabaena*-Arten einen dramatischen Rückgang der EPS-Produktion (Nicolaus, 1999). Hingegen bewirkt die Bestrahlung mit UV-B-Licht einen extremen Anstieg der EPS-Produktion (Ehling-Schulz, 1997). Aufgrund dieser Datenlage und den vorliegenden Untersuchungen (Fischer, 1996) wurden zur Anzucht eine Dauerbelichtung mit 60 bis 150 $\mu\text{mol Photonen/m}^2\text{s}$ und eine Temperatur von 27°C gewählt. Die Belichtung mit UV-B-Licht konnte im verwendeten Maßstab der 8L-Kulturen nicht verwendet werden, da keine UV-B durchlässigen Quarzgefäße in dieser Größe vorhanden waren. Die gesteigerte EPS-Produktion bei steigender Temperatur und Belichtung ergibt sich eventuell aus der EPS-Funktion, die Cyanobakterien vor Austrocknung und Belichtungsschäden, durch Einlagerung von Sonnenschutz-Substanzen in die EPS-Matrix, zu schützen. Des Weiteren sind die Cyanobakterien bei einer stärkeren Belichtung in der Lage mehr Photosynthese zu betreiben und somit größere Mengen EPS auszuschütten. Viele Arbeiten beschäftigen sich auch mit der Frage der Stickstoffzufuhr. Einige Cyanobakterienarten produzieren in Folge einer Stickstofflimitation größere Mengen an Exopolysacchariden. Dies konnte unter anderem für *Cyanothece* sp. 16Som2, *Anabaena* sp. ATCC 33047 und *Spirulina platensis* nachgewiesen werden (De Philippis, 1993; Moreno, 1998; Nicolaus, 1999). Andere Arten reagieren hingegen mit einem Rückgang der Produktion (De Philippis, 1998). Tischer und Moore untersuchten den Zusammenhang von unterschiedlichen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen auf die Produktion und die Monosaccharidzusammensetzung der Exopolysaccharide von *Palmella mucosa*-Kulturen. Nach 14 Tagen befanden sich die Kulturen noch in der exponentiellen Wachstumsphase. Sie produzierten um die 400mg/L an Exopolysacchariden, deren Zusammensetzung sich qualitativ und quantitativ je nach Stickstoff- und Kohlenstoffquelle veränderte. Als besonders gute Stickstoffquellen erwiesen sich Kalium- und Calciumnitrat. Die größte Ausbeute an Exopolysacchariden lieferten Kulturen mit Kohlendioxid oder Glucose als Kohlenstoffquellen (Tischer and Moore, 1964). Im Gegensatz dazu konnte mit Natriumnitrat als Stickstoffquelle in Untersuchungen mit *Cyanophyceae* sp. ATCC 51142 die beste EPS-Ausbeute erlangt werden (Shah, 1999). Manche Arten, wie zum Beispiel *Anabaena flos-aquae*, werden von der Art der Stickstoffquelle nicht beeinflusst (Tischer and Davis, 1971). In der hier vorliegenden Arbeit wurde Natriumnitrat als Stickstoffquelle eingesetzt mit einer relativ geringen Konzentration von 50mg/L.

Weitere beeinflussende Faktoren sind die Salz- und die Phosphationenkonzentration. Hierbei verhält sich der Einfluss der Phosphatkonzentration auf die EPS-Produktion ähnlich unterschiedlich wie bei der Stickstoffkonzentration. Manche Arten, wie *Anabaena* WSAF, *Anabaena torulosa* und *Anabaena cylindrica* 10C, zeigen kaum eine Beeinflussung der Phosphatkonzentration auf die EPS-Produktion; nur bei völliger Abwesenheit von Phosphat ist ein starker Rückgang der EPS-Produktion zu beobachten (Nicolaus, 1999; Lama, 1996). *Spirulina platensis* hingegen zeigt bei Abwesenheit von Phosphat einen starken Anstieg der EPS-Produktion (Nicolaus, 1999), wohingegen Phosphatmangel keinen Einfluss auf die EPS-Produktion von *Cyanospira capsulata* aufweist (De Philippis, 1991). Die Salzkonzentration scheint insgesamt einen geringeren Effekt auf die EPS-Produktion zu besitzen; ihr Konzentrationsoptimum liegt für die meisten Arten zwischen 3 und 5% (Sudo, 1995; Shah, 1999). Im hier verwendeten Nährmedium wurde eine mittlere Phosphatkonzentration in Form von 50mg/L Kaliumphosphat gewählt. Die Salzkonzentration wurde durch Zugabe von 10% Seewasser eingestellt. Insgesamt lässt sich für den Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die EPS-Produktion zusammenfassen, dass wohl jede Art unterschiedlich auf verschiedene Einflüsse reagiert. Die optimale Ausbeute an EPS kann darum nur durch vorherige Wachstumsbeobachtungen unter verschiedenen Bedingungen erreicht werden. Für eine standardisierte Anzucht verschiedener Arten sollten die Bedingungen so gewählt werden, dass sie in einem für die meisten Arten akzeptablen Bereich liegen.

Die Anzucht erfolgt in vielen Arbeiten im kleineren Maßstab zwischen 100ml-Kulturen und 1l-Kulturen. Die Kulturdauer ist somit aufgrund des Nährstoff und Platzmangels ebenfalls begrenzt; sie erfolgt in einer Zeitspanne von wenigen Tagen bis zu einem Monat. Nach dieser Kulturdauer befinden sich die Cyanobakterien häufig schon am Ende der stationären Phase. In wenigen Arbeiten werden die Cyanobakterien auch im Großmaßstab bis zu 500L gezüchtet. Die Animpfung erfolgt meist mit größeren Anteilen einer vorgezüchteten Kultur, um möglichst schnell die stationäre Phase zu erreichen, da für einige Cyanobakterien gezeigt werden konnte, dass die EPS-Produktion bevorzugt in der stationären Wachstumsphase abläuft (Moreno, 2000). Andere Arten wiederum scheinen unbeeinflusst von der Wachstumsphase kontinuierlich EPS freizusetzen (Vincenzini, 1990; Lupi, 1994).

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit nur kleinen Mengen einer Vorkultur angeimpft. Im beobachteten Zeitraum befanden sich die Cyanobakterien folglich noch in der exponentiellen Wachstumsphase. Wie die Ergebnisse zeigen, wurden kontinuierlich über den beobachteten Zeitraum EPS ins Nährmedium abgegeben. Das Ausmaß der EPS-Abgabe unterschied sich zwischen den Arten ebenso wie die Zunahme der Biomasse.

Wachstumsparameter	<i>Nostoc insulare</i>	<i>Chroococcus minutus</i>	<i>Synechocystis aquatilis</i>
Biomasse	6,4g/L	8,3g/L	3,6g/L
Individuen (Zellzahl)	2,3*10 ⁹ Individuen/L	9,7*10 ⁹ Individuen/L	3,67*10 ¹⁰ Individuen/L
EPS-Ausbeute (roh)	4,0g/L	1,8g/L	3,0g/L

Tabelle 6.1: Wachstumsparameter nach einer Kultivierungszeit von 60 Tagen in 8L-Batch-Kulturen

Der stärkste Zuwachs an Biomasse ist bei *Chroococcus minutus* zu beobachten, die EPS-Freisetzung ist hier aber am geringsten. Die höchste EPS-Freisetzung kann bei *Nostoc insulare* erreicht werden, aber auch *Synechocystis aquatilis* bildet unter den gegebenen Bedingungen große Mengen an EPS. Da *Synechocystis aquatilis* zu den Picocyanobakterien zählt, werden hier besonders viele Individuen bezogen auf die relativ geringe Biomasse gezählt. Mit einer Ausbeute von 1,8g/L bis 4g/L Roh EPS konnte ein sehr zufrieden stellendes Ergebnis unter den gegebenen Wachstumsbedingungen erreicht werden. De Philippis erreicht für *Cyanothece* sp. Kulturen im 200ml-Maßstab nach 21 Tagen in der stationären Phase eine EPS-Produktion von 610mg/L (De Philippis, 1993). In 2L-Kulturen von *Spirulina platensis* entsprach die EPS-Produktion in der stationären Phase nach 30 Tagen 0,17g/L (Filali, 1993). Nicolaus untersuchte 16 verschiedene Arten auf ihr Wachstumsverhalten und die EPS-Produktion. Es wurden 1L-Kulturen über 4 Wochen gezüchtet. Die Biomasse betrug nach dieser Wachstumszeit zwischen 1,0g für *Nostoc linckia* und 13,0g für *Spirulina* sp., gemessen als feuchte Zellmasse. Die EPS-Produktion schwankte zwischen 15µg/L für *Nostoc linckia* und 55,2mg/L für *Anabaena* sp. 7120, gemessen im gefriergetrockneten Zustand (Nicolaus, 1999). Besonders hohe EPS-Ausbeuten wurden mit 4g/L nach 30tägiger Kultur von *Cyanospira capsulata* erreicht (Vincenzini, 1990).

Als weiterer Punkt wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Wachstumsdauer die Zusammensetzung des EPS beeinflusst. Für *Nostoc insulare* und *Synechocystis aquatilis* konnte für die Monosaccharidzusammensetzung des EPS unterschiedlich alter Kulturen keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Für das EPS aus *Chroococcus minutus* war eine eindeutige Veränderung der EPS-Zusammensetzung mit der Kulturdauer zu beobachten. Mit zunehmender Kulturdauer wurde ein deutlicher Anstieg im Gehalt an methylierten Zuckern

beobachtet. Nur wenige Literaturdaten liegen zu diesem Thema vor. In Untersuchungen einer *Cyanospira capsulata*-Kultur konnte kein Unterschied in der Monosaccharidzusammensetzung in verschiedenen alten Kulturen nachgewiesen werden (Vincenzini, 1990). Panoff untersuchte die EPS zweier unterschiedlicher *Synechocystis*-Arten hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzung. Er verglich 15 Tage alte Kulturen mit 60 Tage alten Kulturen. Für *Synechosystis* 6803 konnte eine Abnahme des Uronsäureanteils von 10% für die ältere Kultur nachgewiesen werden. Bei der Kultur von *Synechocystis* 6714 wurde nach 15 Tagen ein einzelnes EPS durch Ethanol-fällung isoliert, nach der 60-tägigen Kultur wurden ein aufschwimmendes und ein gefälltes EPS isoliert. Während das gefällte EPS keine Unterschiede zum EPS der jüngeren Kultur aufwies, unterschied sich das aufschwimmende deutlich in seiner Zusammensetzung durch wesentlich größere Anteile an einer 4-O-Methylhexose sowie an Fucose, Rhamnose und Galactosamin (Panoff, 1988). Eine gesicherte Aussage über die Veränderung von Exopolysacchariden mit der Kulturdauer lässt sich aus den wenigen vorliegenden Daten nicht treffen. Als Tendenz ist aber Folgendes zu erkennen: wenn eine Änderung der EPS-Zusammensetzung mit der Kulturdauer erfolgt, werden später gebildete EPS hydrophober gestaltet, und zwar entweder durch Zunahme des Anteils an methylierten Zuckern und Desoxyzuckern oder durch die Abnahme des Uronsäuregehalts.

6.2. Größenbestimmung und Fraktionierung

In der Literatur finden sich wenige Daten zur Molekulargewichtsbestimmung sowie zur Fraktionierung der EPS von Cyanobakterien. Häufig erfolgt die Aufreinigung des isolierten EPS lediglich durch eine Ethanol-fällung und in manchen Fällen durch eine anschließende Fällung oder enzymatische Zersetzung der Proteine. Eine Aufreinigung über Säulenchromatographie ist selten. Wurde eine Untersuchung des EPS an einer Gelpermeationssäule vorgenommen, wurde häufig beobachtet, dass es sich um polydisperse und heterogene Polymere handelt, die zu einem breiten Peak führen (Bender, 1994; Huang, 1998; Hokputsa, 2003; Matulewicz, 1984). Die Untersuchungen wurden an unterschiedlichen Säulenmaterialien vorgenommen; häufig fand eine Sephadex G-200-Säule Verwendung. Die ermittelten hydrodynamischen Volumina sind sehr unterschiedlich und reichen von Ca-Spirulan, einem EPS aus *Spirulina platensis*, mit 74.600Da (Lee, 1998) bis zu 1.350.000Da für das EPS von *Anabaena* sp. ATCC 33047 (Moreno, 2000). Die Detektion erfolgt meist über fraktioniertes Auffangen mit anschließender

Diskussion

photometrischer Bestimmung nach Dubois oder anhand von Refraktometern. Zur Kalibrierung der Säulen wird als Ein-Punkt-Bestimmung gerne Dextran-Blau mit einem Molekulargewicht von 2.000.000Da verwendet (Bender, 1994) oder eine Eichgerade mit Pullulanen oder Dextranen erstellt (Lee, 1998; Moreno, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden das hydrodynamische Volumen und das Molekulargewicht der isolierten EPS mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie bestimmt. Es wurde eine Sephacryl S-400 HR Säule zur Auftrennung der EPS verwendet. Diese ist mit einem Trennbereich für globuläre Proteine von 20.000–8 Mio. Da und für Dextrane von 10.000–2 Mio. Da geeigneter für hochmolekulare Polysaccharide als das häufig verwendete Sephadex G-200-Material, das nur einen guten Trennbereich bis 200.000Da aufweist. Die Detektion erfolgte zum einen durch einen Brechungsindexdetektor, zum anderen durch einen Multi-Angel-Laser-Light-Scattering-Detektor (MALLS). Es ergab sich für jedes EPS ein Peak, der am Rande des Ausschlußvolumens von 50ml lag. Die Peaks erstrecken sich über einen breiten Bereich und zeigen bei niedrigen Flußraten eine Aufspaltung der Peakspitze. Dies spricht dafür, dass es sich bei den vorliegenden EPS, wie auch in der Literatur für andere EPS beschrieben, um ein polydisperses, heterogenes Gemisch an Polymeren handelt. Das hydrodynamische Volumen wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden berechnet, die anhand von Pullulanen mit verschiedenen Molekulargewichten erstellt wurde. Das Molekulargewicht wurde mit dem Multi-Angel-Laser-Light-Scattering-Detektor (MALLS) bestimmt. Hokputsa verwandte diese Technik ebenfalls zur Bestimmung des Molekulargewichtes der EPS von *Microcoleus vaginatus*, *Phormidium tenue* und einer *Nostoc* sp.. Es wurden Molekulargewichte von 4000Da für *Phormidium tenue*, 33.000Da für eine *Nostoc* sp., 38.000Da und 250.000Da für *Microcoleus vaginatus* ermittelt (Hokputsa, 2003). Diese Werte sind verglichen mit den ermittelten Werten für die EPS von *Chroococcus minutus*, *Nostoc insulare* und *Synechocystis aquatilis* relativ niedrig.

EPS Molekülgröße	<i>Nostoc insulare</i>	<i>Chroococcus minutus</i>	<i>Synechocystis aquatilis</i>
Hydrodynamisches Volumen	1.081.000Da	995.000Da	996.000Da
Molekulargewicht	2.799.000Da	3.316.000Da	3.513.000Da

Tabelle6.2: Molekülgrößen der drei untersuchten EPS

Das hydrodynamische Volumen des EPS von *Anabaena* sp. ATCC 33047 entspricht mit 1.350.000Da am ehesten den hier ermittelten Werten. Es wurde ebenfalls über eine Sephacryl S-400-HR-Säule bestimmt, die Detektion erfolgte nach Dubois. Als Standard wurden Dextrane mit einem Molekulargewicht zwischen 71.000Da und 2.000.000Da

verwendet (Moreno, 2000). Die Verwendung von Dextran-Standards bietet den Vorteil, dass die Struktur des Standards besser mit der Struktur der EPS übereinstimmt. Dextrane sind, im Gegensatz zu Pullulanen, wie die meisten EPS verzweigte Polysaccharide. Durch den bei Dextranen möglichen Eichbereich bis 2.000.000Da wäre weiterhin eine exaktere Bestimmung des hydrodynamischen Volumens möglich, da die Berechnung des hydrodynamischen Volumens der EPS nicht durch Extrapolation der Eichgerade erfolgen müsste. Der MALLS-Detektor misst die Ablenkung von eingestrahltm Licht, wenn es auf ein Molekül auftrifft. Die Ablenkung des Lichtes ist hierbei abhängig von Molekülgröße und -form und kann somit zur Berechnung des Molekulargewichts dienen (Danishefsky, 1970). Zur Berechnung des absoluten Molekulargewichts wird das Verhältnis des Radius der Gyration zum hydrodynamischen Radius verwendet, welches ebenfalls strukturabhängig ist. Durch unterschiedliche räumliche Ausdehnung schwankt der Wert für diese Konstante zwischen 0,3 für globuläre, 0,5 für helikale und 1,0 für stabförmige Formen. Zur Molekulargewichtsbestimmung der EPS ist eine allgemeine Bestimmung dieser polymerabhängigen Konstanten schwierig, da die Struktur der EPS nach den vorliegenden Daten sehr unterschiedlich sein kann. Es wurde die Konstante von 0,3 für globuläre Formen verwendet, da verzweigte Polysaccharide häufig eine globuläre Gestalt aufweisen. Um das heterogene Gemisch weiter aufzureinigen, wurde eine Fraktionierung nach dem Ladungsgrad über eine Ionenaustauschersäule vorgenommen. Jedes der drei isolierten EPS konnte in vier Fraktionen getrennt werden. Die Fraktionen des *Nostoc insulare*-EPS unterschieden sich nur geringfügig. Nur der Uronsäuregehalt der Hauptfraktion und des EPS waren etwas unterschiedlich. Ein ähnliches Ergebnis ergab die Aufarbeitung des EPS von *Phormidium foveolarum*. Auch in diesem Fall konnten am Ionenaustauscher vier Fraktionen aufgefangen werden, welche sich nur durch die Zunahme im Uronsäuregehalt unterschieden (Matulewicz, 1984). Nach der Fraktionierung des EPS von *Synechocystis aquatilis* unterschied sich Fraktion 1 wesentlich von den anderen drei Fraktionen durch eine Monosaccharidzusammensetzung aus hauptsächlich Arabinose, Galactose und Glucose, wohingegen die anderen Fraktionen hauptsächlich aus Arabinose und Fucose bestanden. Für die Fraktionen des EPS von *Chroococcus minutus* war ein noch deutlicherer Unterschied zu erkennen. Die Fraktionen unterschieden durch den Anteil der substituierten Zucker, der mit zunehmender Ladungsdichte der Fraktionen abnahm. In anderen Arbeiten erfolgte die Fraktionierung der EPS an der Ionenaustauschchromatographie nur in eine neutralen und in eine saure Fraktion. Das EPS von *Anabaena flos-aquae* zeigte nach der Fraktionierung in eine neutrale und eine saure Fraktion über Ionenaustauschchromatographie hauptsächlich den

Unterschied des Vorkommens von Uronsäure in der sauren Fraktion; ansonsten unterschieden sich die Fraktionen kaum (Wang und Tischer, 1973). Die EPS von *Microcoleus vaginatus*, *Scytonema javanicum*, *Phormidium tenue* und einer *Nostoc* sp. wurden ebenfalls zur Aufreinigung über eine Ionenaustauschersäule gegeben. Das EPS von *Scytonema javanicum* konnte nicht aufgetrennt werden, da es zu viskos war und das Ionenaustauschergel nicht passierte. Die EPS von *Phormidium tenue* und *Nostoc* sp. ergaben nur eine saure Fraktion, das EPS von *Microcoleus vaginatus* konnte in zwei saure Fraktionen getrennt werden. Größtenteils waren nur geringe Unterschiede zwischen den aufgereinigten Fraktionen und den unfraktionierten EPS zu erkennen; die verschiedenen Fraktionen von *Microcoleus vaginatus* zeigten jedoch Unterschiede in der Neutralzuckerzusammensetzung (Hokputsa, 2003). Huang trennte am Ionenaustauscher drei isolierte EPS von drei verschiedener *Nostoc*-Arten ebenfalls in jeweils eine neutrale und eine saure Fraktion. Die Zusammensetzung der Fraktionen untereinander und zum ursprünglichen Polysaccharid zeigte nur leichte Unterschiede (Huang, 1998). In den meisten Fällen unterscheiden sich die Fraktionen nur geringfügig, der Materialverlust beträgt bis zu 50% und eine Kontaminierung des Materials durch Fremdorganismen und deren Polymere ist nicht auszuschließen, da das Matrixmaterial des Ionenaustauschers einen guten Nährboden für Mikroorganismen bieten kann. Eine regelmäßige Desinfizierung der Säule mit Natriumazid ist darum anzuraten. Die Sinnhaftigkeit einer Aufreinigung durch Ionenaustauschchromatographie muss daher durch Vorversuche geklärt werden.

6.3. Strukturaufklärung der EPS

Das grundlegende gemeinsame Merkmal von EPS aus Cyanobakterien ist, dass es sich bei ihnen um komplexe, anionische Heteropolymere handelt. Rund 80% der bisher untersuchten EPS bestehen aus sechs bis zehn verschiedenen Monosacchariden. Andere Polysaccharide prokaryotischer, aber auch eukaryotischer Herkunft sind meist aus sehr viel weniger Monosacchariden aufgebaut (Sutherland, 1990). Der Vorteil, der sich aus der hohen Monosacchariddiversität der Cyanobakterien-EPS ergibt, ist, dass mit der größeren Anzahl unterschiedlicher Monosaccharide auch viele verschiedene Strukturen des EPS ermöglicht werden (Atkins, 1986). Damit ergibt sich auch eine größere Chance ein Polymer mit ungewöhnlichen, eventuell neuen Eigenschaften zu entdecken und es nutzbar zu machen. Der Nachteil des komplexen Aufbaus der Cyanobakterien-EPS liegt hingegen darin, dass eine konkrete Strukturaufklärung sehr schwierig ist und Struktur-Wirkungsbeziehungen sehr komplex sind. Die zehn Monosaccharide, die in Cyanobakterien-EPS am häufigsten anzutreffen sind, sind die Hexosen Glucose, Galactose und Mannose, die Pentosen Arabinose, Xylose und Ribose, die Desoxyhexosen Fucose und Rhamnose, sowie die Uronsäuren Glucuronsäure und Galacturonsäure (De Philippis, 2001). In 60% aller untersuchten EPS ist Glucose das dominierende Monosaccharid. Sporadisch wurden auch methylierte Zucker und Aminozucker nachgewiesen (Tease, 1991; Huang, 1998, Panoff, 1988; Moreno, 2000).

Die Monosaccharidzusammensetzung der untersuchten EPS wurde durch verschiedene Methoden ermittelt. Zum einen wurde die Neutralzuckerzusammensetzung durch die Derivatisierungsmethode mit anschließender gaschromatographischen Vermessung nach Blakeney bestimmt. Bei dieser Methode werden die glycosidische Bindungen des C1-OH der Uronsäuren nicht gespalten, und daher werden die Uronsäuren und die über das C1-OH gebunden Zucker nicht miterfasst. Um diese Aldobiuronsäuren für die Bestimmung zugänglich zu machen, wurden die Uronsäuren zu ihren korrespondierenden Neutralzuckern reduziert. Um sie später noch von den Neutralzuckern unterscheiden zu können, wurden sie während der Reduktion mit Deuterid markiert. Für die Reduktion wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die Methode nach Fontaine erwies sich als einfacher und weniger zeitaufwendig. Bei der Reduktion der Uronsäuren im EPS von *Nostoc insulare* konnten mit dieser Methode auch eindeutig bessere Ergebnisse erzielt werden, indem mehr Uronsäuren reduziert wurden. Bei der Reduktion des EPS aus *Chroococcus minutus* konnten ebenfalls mehr reduzierte Uronsäuren nachgewiesen werden. Die Werte können aber nicht als valide angesehen werden, da anscheinend andere Monosaccharide während der Reduktion zerstört

wurden und sich somit die Verhältnisse der Zucker zueinander verschoben. Bei der Reduktion des EPS aus *Chroococcus minutus* konnten somit die besseren, da valideren Ergebnisse, mit der Reduktionsmethode nach Taylor und Conrad erzielt werden. Es kann somit noch keine Aussage getroffen werden, welche Methode für die Strukturaufklärung von Cyanobakterien-EPS geeigneter ist. In der Literatur liegen dazu bisher auch kaum Daten vor; beispielsweise wurde das EPS von *Nostoc commune* nach der Methode nach Taylor und Conrad reduziert. In diesem Fall konnten nach den vorliegenden Daten die Uronsäuren quantitativ reduziert werden (Brüll, 2000). Um die Neutralzucker direkt zusammen mit den Uronsäuren bestimmen zu können, wurde weiterhin eine andere Hydrolyse- und Derivatisierungsmethode gewählt. Durch eine wasserfreie Methanolyse werden auch die stabilen glycosidischen Bindungen am C1-OH der Uronsäuren gespalten; die entstandenen Monosaccharide wurden nun durch Silylierung für die gaschromatographische Bestimmung zugänglich gemacht (Preuß und Thier, 1982). Da die Methode im Arbeitskreis neu eingeführt wurde, musste eine Bestimmung von Korrekturfaktoren zur Quantifizierung erfolgen. Diese erzielt für alle Neutralzucker relativ zufriedenstellende Ergebnisse sowohl bezogen auf die Höhe der Korrekturfaktoren als auch auf die erreichten Standardabweichungen. Bei den ermittelten Werten für die Glucuronsäure waren allerdings sowohl der Korrekturfaktor mit einem Wert von 4 und die damit verbundene Standardabweichung von 0,76 nicht akzeptabel. Weitere Schwierigkeiten ergaben sich bei der Auswertung der erhaltenen EPS-Chromatogramme. Da bei dieser Methode die Monosaccharide nicht reduziert werden, ergeben sich für jedes Monosaccharid mehrere Peaks. Besonders die Überlappung der Peaks von Mannose und Galactose sowie von Glucose und Glucuronsäure führen dazu, dass die Chromatogramme der EPS, in denen diese Monosaccharide nebeneinander vorliegen, nicht ausgewertet werden können. Besonders im Chromatogramm des EPS aus *Chroococcus minutus* zeigte sich, dass diese Methode nicht an komplexen EPS mit einer Vielzahl verschiedener Hexosen angewandt werden kann. Seltsamerweise wird diese Methode in vielen Veröffentlichungen als Methode angegeben, auch wenn mehrere Hexosen nebeneinander vorliegen. Obwohl gleiche oder sehr ähnliche Säulenmaterialien und Temperaturprogramme eingesetzt wurden, wird in diesen Veröffentlichungen nie von derartigen Schwierigkeiten berichtet (Flaibani, 1989; Hill, 1994; Hokputsa, 2003). Um die Methode nach Preuß und Thier sinnvoll für die Strukturaufklärung von Cyanobakterien-EPS zu nutzen, müssten noch weitere Versuche erfolgen, um die genannten Schwierigkeiten zu beseitigen. Eine sinnvolle Kombination wäre möglicherweise die der Methanolyse mit anschließender Reduktion und Derivatisierung zu Alditolacetaten. Die in bisher veröffentlichten Arbeiten am häufigsten angewandte Methode zur Bestimmung

Diskussion

des Monosaccharidgehaltes ist die Kombination der Neutralzuckerbestimmung nach Blakeney und der kolorimetrischen Bestimmung der Uronsäuren nach Blumenkrantz. Um die Uronsäuren qualitativ zu bestimmen, wird häufig eine Dünnschichtchromatographie genutzt (Filali, 1993; Panoff, 1988, Sangar und Dugan, 1972). In anderen Arbeiten erfolgt die Bestimmung der Neutralzucker und der Aldobiuronsäuren mittels einer HPLC-Methode (De Philippis, 1998a; Sudo, 1995). Die in Tabelle 6.3 gezeigten Ergebnisse zur Monosaccharidzusammensetzung der in dieser Arbeit untersuchten EPS wurden durch Kombination der kolorimetrischen Bestimmung der Uronsäuren nach Blumenkrantz und der gaschromatographischen Analyse der Alditolacetate ermittelt. Die anderen angewandten Methoden ergaben ähnliche Ergebnisse, die nur im Uronsäureanteil schwankten.

Monosaccharid	<i>Nostoc insulare</i>	<i>Chroococcus minutus</i>	<i>Synechocystis aquatilis</i>
Fucose	-	-	48%
Arabinose	23%	-	52%
Mannose	-	8%	-
Galactose	-	16%	-
Glucose	35%	49%	-
2-O-Methyl-Rhamnose	-	4%	-
3-O-Methyl-Arabinose	17%	-	-
verschiedene O-Methylhexosen	-	11%	-
nicht identifiziertes Monosaccharid (eventuell methylierter Zucker)	-	6%	-
Glucuronsäure	25%	6%	-

Tabelle 6.3: Monosaccharidzusammensetzung der untersuchten EPS (gerundete Werte)

Im Vergleich zu Literaturdaten konnten drei eher ungewöhnliche EPS aus den drei verschiedenen Cyanobakterienarten isoliert werden. Besonders das EPS von *Synechocystis aquatilis* zeigt mit Fucose und Arabinose eine außergewöhnliche Monosaccharidzusammensetzung. So weisen nur 10% der bisher untersuchten EPS keine Uronsäuren auf. Das Fehlen von Glucose ist weiterhin ein seltenes Merkmal; nur 3 bisher untersuchte weitere EPS besitzen keinen Glucoseanteil; das EPS aus *Microcystis wesenbergii* zum Beispiel setzt sich nur aus Uronsäuren zusammen (Forni, 1997). Das EPS aus *Cyanothece* sp. CH1 besitzt als dominanten Zucker ähnlich wie das EPS aus *Synechocystis aquatilis* Fucose, aber auch einen großen Anteil Uronsäure und als weitere Bestandteile Xylose, Rhamnose, Galactose und Mannose (De Philippis, 1998a). Das EPS aus *Phormidium* sp. strain J-1 besteht zum größten Teil aus Mannose- und Rhamnose-, Galactose- und Uronsäureanteilen (Bar-Or and Shilo, 1987). Als Cyanobakterien-EPS mit weniger als drei

verschiedenen Monosacchariden war bisher nur das schon Erwähnte aus *Microcystis wesenbergii* bekannt. Die Kombination von wenigen verschiedenen Monosacchariden zusammen mit der Abwesenheit von Uronsäure zeigte sich mit den Monosacchariden Mannose, Galactose und Glucose in den EPS von *Anacystis nidulans* und *Scytonema hofmanni* (Sangar and Dugan, 1972; Nicolaus, 1999). Das EPS aus *Nostoc insulare* liegt mit seinem Uronsäureanteil von 25% im durchschnittlichen Bereich für Cyanobakterien-EPS; ca. 25% aller untersuchten Cyanobakterien-EPS besitzen zwischen 20% und 30% Uronsäuren. Ungewöhnlich ist an der Zusammensetzung der hohe Anteil der 3-O-Methyl-Arabinose mit 17%. Methylierte Zucker kommen eher selten in Cyanobakterien-EPS vor und wenn, dann häufig nur in geringen Mengen. Das EPS aus *Nostoc commune* HB261 enthält hingegen einen Anteil von 20% 2-O-Methyl-Glucose (Brüll, 2000). In einer anderen *Nostoc*-Art konnten 9% 2-O-Methyl-Glucose nachgewiesen werden (Hokputsa, 2003). De Philippis konnte hingegen in 25 anderen *Nostoc*-Arten keine methylierten Zucker nachweisen, so dass nicht von einer gemeinsamen Merkmal dieser Gattung ausgegangen werden kann (De Philippis 1998). Einen größeren Anteil an methylierten Zuckern zeigen auch die EPS aus *Microcoleus vaginatus* und *Scytonema javanicum* mit 20% und 11% 2-O-Methyl-Rhamnose (Hokputsa, 2003). Die EPS aus den *Synechocystis*-Arten PC 6803 und PC 6714 enthalten verschiedene methylierte Zucker, wie 3-O-Methyldesoxyhexose und zwei O-Methylhexosen in geringen Mengen von je 5% (Panoff, 1988). Das EPS aus *Spirulina platensis* „Ca-spirulan“ ist das bisher am stärksten methylierte EPS aus Cyanobakterien, es besteht zu 42% aus methylierten Zucker, wobei 3-O-Methyl-Rhamnose (Acofriose) am dominantesten ist (Lee, 1998). Das EPS aus *Chroococcus minutus* besitzt ebenfalls ungewöhnlich große Mengen an methylierten Zuckern mit 21%. Die im EPS aus *Chroococcus minutus* gefunden methylierten Zucker mit 2-O-Methyl-Rhamnose, zwei 2-O-Methylhexosen und einer 3-O-Methylhexose entsprechen zum Teil denen, die auch in anderen Cyanobakterien-EPS gefunden wurden. Eine 3-O-Methyl-Arabinose wie im EPS aus *Nostoc insulare* wurde hingegen bisher noch nicht in anderen Cyanobakterien-EPS gefunden. Der Uronsäuregehalt des EPS aus *Chroococcus minutus* ist relativ niedrig mit 6%. Nur 15% aller bisher untersuchten EPS zeigten einen relativ niedrigen Uronsäuregehalt zwischen 0,5% und 10%. Aus den vorliegenden Literaturdaten und den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen ist zu erkennen, dass die Monosaccharidzusammensetzung der EPS nicht im Zusammenhang mit der taxonomischen Einordnung der Cyanobakterien steht. Selbst Unterarten wie die von *Nostoc commune* (DRH-1, HB261, Vaucher) unterscheiden sich in ihrer Monosaccharidzusammensetzung (Helm, 2000; Brüll, 2000; Huang, 2003). Plude verglich die

Diskussion

EPS zweier nah verwandter Arten, *Microcystis flos-aquae* und *Microcystis aeruginosa* K-3A. Das EPS aus *Microcystis flos-aquae* enthielt kein Protein und sechs Monosaccharide, namentlich Rhamnose, Xylose, Mannose, Galactose, Glucose und Galacturonsäure im Verhältnis 3:2:3:1:1:43 (Plude, 1991). Das EPS von *Microcystis aeruginosa* K-3A hingegen enthielt zusätzlich Fucose und Arabinose sowie einen Proteinanteil. Galacturonsäure, Rhamnose und Xylose machen mit jeweils ca 25% die Hauptanteile aus (Nakagawa, 1987). Plude postulierte, dass der Unterschied in der Zusammensetzung der EPS sich in den gebildeten Kolonien widerspiegelt. *Microcystis aeruginosa* K-3A bildet sehr viel kompakter Kolonien, die Kolonien von *Microcystis flos-aquae* sind hingegen diffuser und leichter durch Scherung aufzulösen. Diese Unterschiede führte Plude auf den lipophileren Charakter des EPS aus *Microcystis aeruginosa* K-3A zurück, der durch die geringeren Uronsäureanteile und die höheren Desoxyzuckeranteile sowie auf das Vorkommen von einem eventuell lipophilen Proteinanteil zurückzuführen ist. Der teilweise lipophile Charakter der EPS ergibt für die Cyanobakterien eine bessere Überlebenschance, da er zum Zusammenhalt der Kolonien beiträgt und es Kolonien ermöglicht, sich an Oberflächen wie Felswänden festzuheften und Biofilme auszubilden. Um eine Aussage über die Lipophilie der in dieser Arbeit untersuchten EPS zu machen, werden zunächst die dazu beitragenden Monosaccharidbestandteile gegenübergestellt:

Anteil in % (bezogen auf den Kohlenhydratanteil)	<i>Nostoc insulare</i>	<i>Chroococcus minutus</i>	<i>Synechocystis aquatilis</i>
Desoxyzucker	0,0%	11,0%*	50,0%
Uronsäuren	26,0%	6,5%	0,0%
methylierte Zucker	22,0%	23,00%*	0,0%

Tabelle 6.4: Gegenüberstellung der zur Lipo- oder Hydrophilie beitragenden Monosaccharide

*=inklusive des nicht identifizierten Monosaccharids

Desoxyzucker und methylierte Zucker tragen zur Lipophilie des Polysaccharids bei, wohingegen Uronsäuren die Hydrophilie steigern. Demnach wären die EPS von *Chroococcus minutus* und *Synechocystis aquatilis* in der Summe lipophiler als das EPS von *Nostoc insulare*. Weil es sich bei *Synechocystis aquatilis* und *Chroococcus minutus* um koloniebildende einzellige Cyanobakterien handelt, wäre für sie die Ausbildung eines lipophileren EPS zur kompakteren Koloniebildung essentieller als für das trichombildende *Nostoc insulare*. Tatsächlich lässt sich diese Hypothese aber nicht anhand von Literaturdaten belegen, da auch besonders hydrophile EPS bei chroococcalen Cyanobakterien und

besonders lipophile EPS bei trichombildenden Cyanobakterien nachgewiesen wurden (De Philippis, 2001). Ein eventueller Zusammenhang von Umweltbedingungen, wie zum Beispiel fließende gegen stehende Gewässer und die damit auf den Kolonien lastenden Scherkräfte, mit der Lipophilie der abgegebenen EPS könnte gegeben sein, wurde aber bisher noch nicht untersucht.

Verschiedene Substituenten tragen zur weiteren Komplexität der EPS bei. Einige wie Sulfat- und Pyruvatgruppen bilden oder verstärken den sauren Charakter der EPS, andere wie Acetatgruppen oder Proteinanteile geben dem EPS einen lipophileren Charakter. Die Bestimmung dieser Substituenten erfolgt nach einer Hydrolyse des EPS entweder über kolorimetrische Nachweise, Infrarotspektren oder HPLC-Analyse. Besonders der Nachweis von Sulfatgruppen erfolgt in vielen Arbeiten über Infrarotspektren. Daher wird der Sulfatanteil häufig nicht quantifiziert. Die kolorimetrischen Bestimmungen haben häufig den Nachteil, dass sie durch andere Verbindungen gestört werden und somit häufig falsch positive Werte ergeben. In den meisten vorliegenden Arbeiten wird zum Beispiel der Pyruvatanteil mittels der Methode nach Sloenecker bestimmt. Diese liefert meistens aufgrund störender Verbindung zu hohe Ergebnisse; die Bewertung dieser Daten kann somit nur unter Vorbehalt getroffen werden. Die sicherlich beste Methode zur Bestimmung der Substituenten wäre die HPLC-Analytik über eine Ionenaustauschersäule. Hierbei wäre auch eine gleichzeitige Bestimmung von Sulfat-, Pyruvat und Acetatgruppen möglich (Kao, 2004). Die Bestimmung des Sulfatanteils erfolgt in der vorliegenden Arbeit über die turbidimetrische Bestimmung von Bariumsulfat und die Elementaranalyse. Der Pyruvatanteil wurde zum einem nach Sloenecker mittels einer Farbreaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin und mit der genaueren, enzymatischen Reaktion nach Hirase bestimmt. Der Acetatgehalt wurde photometrisch durch Bildung von Acetohydroxamsäure bestimmt. Die Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils wurde über eine HPLC-Methode bestimmt, der Proteinanteil wurde aus dieser Bestimmung hochgerechnet.

Diskussion

Substituenten in % (m/m) (bezogen auf den Kohlenhydratanteil)	<i>Nostoc insulare</i>	<i>Chroococcus minutus</i>	<i>Synechocystis aquatilis</i>
Pyruvatanteil (Sloenecker/Hirase)	0,24% / 0,09%	0,00% / 0,051%	2,23% / 0,67%
Acetatanteil	0,70%	1,35%	0,68%
Sulfatanteil	0,00%	0,00%	21,00%
Proteinanteil	0,66%	1,31%	0,38%

Tabelle 6.5: Prozentualer Anteil von Substituenten der untersuchten EPS

Pyruvatsubstituenten bilden mit dem Zucker, mit dem sie verknüpft sind, häufig einen zweiten Ringschluss. Dabei reagiert das Pyruvat mit zwei Hydroxylgruppen des Zuckermoleküls und bildet dabei eine Brücke mit einer freien Methyl- und Carboxylgruppe, eine 1-Carboxyethylene-Funktion (Hirase, 1957; Gorin und Ishikawa, 1967). Die Carboxylfunktion trägt damit zum Ladungsgrad des EPS bei. Pyruvatgruppen haben somit Auswirkung auf die dreidimensionale Struktur, die rheologischen Eigenschaften und auf die immunologische Reaktivität. Pyruvat ist ein häufig in Rotalgen-Polysacchariden anzutreffender Substituent. λ -Carragen enthält 1,5% Pyruvat, eine Pyruvatgruppe an jedem zwanzigsten Zucker. K-Carragen hingegen enthält kein Pyruvat (Duckworth and Yaphe, 1970). Hohe Pyruvatanteile wurden für *Callophycus*-Arten mit über 8,0% nachgewiesen (Chiovitti, 1997). Aber auch in verschiedenen Cyanobakterien-Polysacchariden sind Pyruvatanteile belegt worden. Die Bestimmung des Pyruvatanteils wird in Strukturuntersuchungen von Polysacchariden aus Rotalgen standardmäßig durchgeführt; hierzu wird in den meisten neueren Arbeiten die enzymatische Methode nach Hirase verwendet (Chiovitti, 1996; 2001). In den meisten bisherigen Untersuchungen zur Zusammensetzung der EPS aus Cyanobakterien hingegen wurde der Pyruvatanteil nicht bestimmt. In denjenigen Arbeiten, in welchen er bestimmt wurde, wurde die kolorimetrische Methode nach Sloenecker verwendet. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die angegebenen Werte ungefähr um den Faktor 2 zu hoch sein müssten (Duckworth and Yaphe, 1970). Für das EPS aus *Cyanospira capsulata* wurde in verschiedenen Arbeiten der Pyruvatgehalt ermittelt, er variierte von 1,5-3% (Vincenzini, 1990; Marra, 1990). Die Untersuchung der EPS 15 verschiedener *Cyanothece*-Arten auf ihren Pyruvatanteil ergab, dass in fast allen untersuchten EPS Pyruvat in einem quantitativen Anteil von 0,2% bis 3,9% vorhanden war (De Philippis, 1998a). De Philippis untersuchte weiterhin die EPS von 25 verschiedenen *Nostoc*-Arten; auch hier konnte

in den meisten EPS ein geringer Pyruvatanteil (0,2% bis 6%) nachgewiesen werden (De Philippis, 2000). In den in dieser Arbeit untersuchten EPS konnte nur im EPS von *Synechocystis aquatilis* ein valider Pyruvatanteil nachgewiesen werden. Er lag nach der Methode nach Sloeneker bei 2,23%, womit er in adäquater Weise mit den in anderen Arbeiten ermittelten Pyruvatanteilen von Cyanobakterien-EPS korreliert. Verglichen mit den nach Hirase ermittelten Werten für Rotalgen-EPS liegt er mit 0,67% im unteren Bereich.

Sulfatgruppen wurden früher nur in eukaryotischen Polysacchariden vermutet. Es konnte aber gezeigt werden, dass sie auch in wenigen prokaryotischen Polymeren vorkommen. Bisher wurden Sie in Polysacchariden von Archae- und Cyanobakterien nachgewiesen. Sulfatgruppen tragen zum anionischen Charakter der EPS bei und sind damit für viele physikalische und pharmakologische Eigenschaften der Polysaccharide mitverantwortlich (Sutherland, 1994). Rotalgen-Polysaccharide liegen meistens sulfatiert vor; sie können einen Sulfatanteil von bis zu 30% besitzen (Chiovitti, 1996). Der Nachweis von Sulfat in Cyanobakterien-EPS erfolgt häufig nur qualitativ über Infrarotspektren. So wurden in 15 verschiedenen untersuchten *Cyanothece*-Arten Sulfatanteile in fast allen EPS nachgewiesen, aber nicht quantifiziert (De Philippis, 1998a). Gleiches erfolgte für 25 verschiedene *Nostoc*-Arten. In den meisten EPS war ein Sulfatanteil vorhanden, es wurden aber keine quantitativen Angaben gemacht (De Philippis, 2000). Für das EPS aus *Cyanospira capsulata* hingegen wurde die Anwesenheit von Sulfat aufgrund des Infrarotspektrums ausgeschlossen (Vincenzini, 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde der Sulfatanteil quantitativ bestimmt: es ergab sich für das EPS aus *Synechocystis aquatilis* ein Sulfatanteil von 21%. In den beiden anderen untersuchten EPS konnte kein Sulfat nachgewiesen werden. Der ermittelte Sulfatanteil von 21% im EPS aus *Synechocystis aquatilis* ist von den bisher vorliegenden Untersuchungen der höchste, der in einem Cyanobakterien-EPS bisher nachgewiesen wurde. Bisher war der in Ca-Spirulan einem EPS aus *Spirulina platensis* nachgewiesene Schwefelanteil von 5,7% und der sich daraus ergebene Sulfatanteil von 17% der höchste Sulfatanteil (Lee, 1998). Aber auch weitere untersuchte EPS aus *Synechocystis*-Arten wie PCC 6803 und 6714 besitzen mit 16% einen hohen Sulfatanteil (Panoff, 1988). Im EPS von *Aphanocapsa halophytica* konnten immerhin noch 12% Sulfat bestimmt werden (Suda, 1995). Der Nachweis von Sulfat- und Pyruvatanteilen erklärt den anionischen Charakter des EPS aus *Synechocystis aquatilis*, der am Ionenaustauscher nachgewiesen wurde, obwohl keine Uronsäuren im EPS nachgewiesen wurden. Der lipophile Charakter des EPS durch den hohen Fucoseanteil wird somit durch den Sulfat- und Pyruvatanteil ausgeglichen.

Acetatgruppen hingegen verleihen dem EPS einen lipophilen Character. Christensen fand heraus, dass für die Adhäsionsfähigkeit an Felswände einer marinen *Pseudomonas* sp. ein EPS mit einem hohen Acetatanteil verantwortlich ist (Christensen, 1987). Bisher untersuchte nur De Philippis Cyanobakterien-EPS auf Acetatgruppen. In 15 untersuchten *Cyanothece*-Arten waren in über der Hälfte der EPS Acetatgruppen vorhanden, allerdings meistens nur in geringer Menge von 0,3% bis 1% (De Philippis, 1998). In zwei EPS wurden größere Mengen mit 2,5% und 4,2% nachgewiesen. In den EPS von 25 verschiedenen *Nostoc*-Arten konnten in fast allen Fällen Acetatgruppen nachgewiesen werden; der Anteil war hier sogar relativ hoch mit 0,5% bis 7% (De Philippis, 2000). Die Acetatanteile der in dieser Arbeit untersuchten EPS lagen relativ niedrig mit 0,68% bis 1,31%.

Fast alle untersuchten Cyanobakterien-EPS weisen einen Proteinanteil auf; der mengenmäßige Anteil schwankt dabei stark von Spuren unter 1% bis hin zu 70%. Der Proteinanteil kann abhängig von seiner Aminosäurezusammensetzung zum lipophilen Charakter des EPS beitragen. Zu den hydrophoben Aminosäuren zählen unter anderem Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Phenylalanin. Das EPS aus *Nostoc calcicola* besteht aus einem Gemisch verschiedener Proteoglycane, deren Proteinanteil von 3-30% reicht. 35% des Proteinanteils besteht aus hydrophoben Aminosäuren; Hauptkomponenten des Proteins sind Asparagin, Glutamin und Arginin. Das Gesamt-EPS ist insgesamt so lipophil, dass es in Wasser keine echte Lösung bildet, sondern in Microgel-Partikeln dispergiert vorliegt (Flaibani, 1989). Das EPS aus *Cyanospira capsulata* besitzt einen Proteinanteil von 2%; die Aminosäurezusammensetzung zeigt große Anteile an Asparagin- und Glutaminsäure, Glycin, Alanin und Threonin, es überwiegt der Anteil der hydrophoben Aminosäuren (Marra, 1990). Die Proteinanteile der drei untersuchten EPS lagen relativ niedrig und in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden sie sich kaum; zu ungefähr 30% bestehen sie aus hydrophoben Aminosäuren, Hauptkomponenten sind aber Asparagin- und Glutaminsäure sowie Prolin.

Die durch die verschiedenen Merkmale ausgelöste leichte Lipophilie der EPS zeigte sich während der Strukturaufklärung im schlechten Löslichkeitsverhalten der EPS. Um eine ausreichende Lösung in wässrigen Medien zu erreichen, mussten die EPS über ca. 12h vorgequollen und anschließend eine entsprechende Zeit gerührt oder im Ultraschallbad behandelt werden. Die Löslichkeit in lipophileren Lösungsmittel war ebenfalls mangelhaft, häufig musste mit Suspension der EPS am Anfang des Versuches vorlieb genommen werden. Meistens konnte aber im Laufe des Versuches und der damit einhergehenden Modifikation des EPS die Löslichkeit gesteigert werden. Auch in der Literatur findet man Hinweise auf die

schlechte Löslichkeit der EPS von Cyanobakterien. So beschreibt z.B. Morris, dass eine adäquate Lösung des EPS von *Aphanothece halophytica* GR02 nach Testung verschiedenster Lösungsmittel nur nach mehrtägigem Rühren bei Raumtemperatur in Guanidinhydrochlorid erreichbar ist (Morris, 2001). Die schlechte Löslichkeit kann aufgrund ihrer Funktion für das Cyanobakterium erklärt werden. Das EPS dient dem Cyanobakterium unter anderem zur Koloniebildung, zur Fortbewegung und zur Einlagerung verschiedener Substanzen, eine Löslichkeit des EPS wäre damit für das Cyanobakterium konterproduktiv. Infolgedessen sind die EPS evolutionär wahrscheinlich so gestaltet worden, dass sie besonders im wässrigen Medium zwar quellfähig, aber nicht löslich sind.

Zur Strukturaufklärung der EPS wurden verschiedene Methoden miteinander kombiniert. Die Bindungstypen wurden durch eine Methylierungsanalyse mit anschließender Analyse über Gaschromatographie und Massenspektrometrie bestimmt. Zum einen wurden die ursprünglichen EPS auf ihre Bindungstypen untersucht. Um weitere Erkenntnisse über die Struktur zu erlangen, wurden weiterhin verschiedene Derivate der EPS untersucht. Häufig wird zur Strukturaufklärung die NMR-Analyse genutzt, besonders bei der Strukturaufklärung von Spaltungsprodukten wurden gute Ergebnisse erzielt (Gloaguen, 1999; Helm, 2000). Zur Durchführung einer NMR-Analyse wurde zunächst versucht, eine größtmögliche Menge der genuinen EPS in D₂O zu lösen. Die normalerweise benötigte Mindestmenge von 10mg in 600µl konnte nicht erreicht werden. Eine Menge von 2mg EPS in 600µl D₂O war maximal einsetzbar für eine annähernde Lösung. Es konnte kein NMR-Spektrum aufgezeichnet werden, wahrscheinlich aufgrund des hohen Molekulargewichtes des EPS und der Neigung zur Gelbildung. Zur Vermessung von kleineren Oligosacchariden wurde eine Oxalsäurehydrolyse durchgeführt und die Mono- und Oligosaccharide über eine Ionenaustauschersäule in saure und neutrale Mono- und Oligosaccharide getrennt. Die sauren Fraktionen wurden über eine Gelpermeationssäule von den Salzen befreit. Die verschiedenen Fraktionen (je ca. 6mg) wurden in 600µl D₂O gelöst. Es traten erneut Löslichkeitsprobleme auf, so dass kein Spektrum aufgezeichnet werden konnte. Die NMR-Analyse konnte somit nicht zur Strukturaufklärung genutzt werden. Die Ergebnisse der Bindungstypenanalyse der untersuchten EPS werden in Tabelle 6.6 zusammengefasst, wobei zu beachten ist, dass manche Angaben nicht völlig abgesichert sind.

Diskussion

Monosaccharid	Im EPS vorkommende Bindungstypen		
	<i>Nostoc insulare</i>	<i>Chroococcus minutus</i>	<i>Synechocystis aquatilis</i>
Fucose	-	-	event. 1,4-
Rhamnose	-	terminal; 1,4-	-
Arabinose	terminal; 1,5-	-	1,5-, event 1,3,5-
Mannose	-	1,4-; 1,6-; 1,2,3-	-
Galactose	-	terminal; 1,4-	-
Glucose	1,3-; 1,4-; 1,3,4-	terminal; 1,3-; 1,4-; 1,3,6-	-
Glucuronsäure	1,4-	1,4-	-

Tabelle 6.6: Zusammenfassung der Bindungstypanalyse

Auffällig ist, dass die Hexosen vorwiegend in 1,4-Verknüpfung oder 1,3-Verknüpfung vorliegen, 1,6-Verknüpfungen traten nur in Spuren, 1,2-Verknüpfungen gar nicht auf. Pentosen traten bevorzugt in 1,5-Verknüpfung auf. Entsprechende Ergebnisse finden sich zum Teil auch in der Literatur wieder. Das EPS von *Nostoc sphaeroides* zeigte, ermittelt durch Methylierung und Massenspektrometrie folgende strukturellen Merkmale: Glucose und Galactose lagen 1,4-gebunden vor; Mannose, Galactose und Xylose als terminale Gruppen; Verzweigungspunkte waren 1,3,4- und 1,3,6-Glucose; Xylose lag in pyranosidischer Form 1,4- und 1,3,4-verküpft vor; der Bindungstyp der Uronsäuren wurde nicht bestimmt (Huang, 1998). Das EPS aus *Cyanospira capsulata* besteht ebenfalls zum Großteil aus 1,4-verknüpften Hexosen, nämlich 1,4-Glucose und 1,4-Mannose. Weitere Bestandteile sind terminale Galacturonsäure, terminale Arabinose, 1,3,6-Galacturonsäure und 1,3,4-Fucose (Marra, 1990). Im EPS aus *Mastigocladus laminosus* liegen Fucose, Mannose und Galactose wiederum größtenteils 1,4-verknüpft vor; Fucose auch 1,3-, Galacturonsäure 1,2- und Galactose auch 1,6-verknüpft; Verzweigungspunkte bilden 1,2,3-Rhamnose und 1,3,4-Glucose und 1,3,4-Glucuronsäure; Glucose, Glucuronsäure und Xylose bilden die terminalen Zucker. (Gloaguen, 1999). Die Methylierungsanalyse des EPS aus *Phormidium foveolarum* ergab ein stark verzweigtes Molekül, das hauptsächlich aus 1,3-Glucose und 1,4-Galactose besteht. Glucose liegt auch 1,3,4 und 1,2,3-gebunden vor. Mannose liegt wiederum 1,4-gebunden vor; Xylose, Arabinose und Rhamnose hauptsächlich terminal und Fucose terminal und 1,3,4-verknüpft. (Matulewicz, 1984). Das EPS aus *Nostoc commune* HB261 setzt sich hauptsächlich aus 1,3-Glucose und 1,4-Xylose zusammen, weitere Bestandteile sind 1,5-Arabinose, 1,3,4-Xylose, 1,4-Galactose, 1,3,4-Galactose, 1,4-Glucose, 1,3,6-Glucose und terminale Glucuronsäure (Brüll, 2000).

Relativ ungewöhnliche Bindungstypen besitzt Ca-Spirulan, das EPS aus *Spirulina platensis*. Das genuine EPS zeigt 1,2-, 1,3-, 1,2,4- und 1,2,3-Rhamnose als Hauptkomponenten, sowie terminale Xylose und 1,4-Xylose. Das desulfatierte EPS besteht zum Großteil aus 1,3-Rhamnose und 1,2-Rhamnose, terminaler Xylose und 1,4-Xylose. Verzweigungen sind nur noch in Spuren vorhanden. Die Sulfatgruppen sind somit am C3-OH und C4-OH der Rhamnose lokalisiert und täuschen im genuinen EPS Verzweigungen vor. Der Bindungstyp der Uronsäuren wurde nicht bestimmt (Lee, 1998).

Als gemeinsame Merkmale der bisher untersuchten EPS kann somit festgehalten werden: Xylose liegt meistens pyranosidisch vor als terminaler Zucker oder 1,4-gebunden. Zu Arabinose liegen wenige Daten vor, in den untersuchten Fällen liegt sie entweder terminal oder 1,5-verknüpft vor. Hauptkomponenten der EPS sind meistens 1,4-verknüpfte Hexosen und/oder Desoxyhexosen. Verzweigungspunkte besitzen häufig den 1,3,4-Verknüpfungstyp, weitere sind 1,3,6- und 1,2,3-Verknüpfungstypen. Die Uronsäuren liegen häufig terminal vor, aber auch in verschiedenen Bindungstypen.

Um eine sich eventuell wiederholende Monosaccharidabfolge im EPS strukturell aufzuklären, wurden zwei verschiedene Degradationsmethoden verwendet. Mittels Lithiumdegradation sollten definierte Bruchstücke des EPS erhalten werden, die den Monosaccharidabfolgen zwischen zwei Uronsäuren entsprechen. Gloaguen konnte durch diese Methode eine sich wiederholende stark verzweigte Oligosaccharidstruktur aus 15 Monosacchariden für das EPS aus *Mastigocladus laminosus* aufklären. Durch die Lithiumdegradation erfolgte eine Spaltung des EPS in 5 verschiedene Oligosaccharide, deren Struktur durch NMR- und GC-MS-Analytik aufgeklärt wurde (Gloaguen, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde das erhaltene Oligosaccharidgemisch über eine Gelpermeationschromatographie aufgetrennt. Probleme bereiteten dabei die noch im Gemisch vorhandenen Lithiumionen, die trotz mehrmaliger Aufreinigung am Kationenaustauscher nicht vollständig aus dem System zu entfernen waren. Daher waren die letzten Oligosaccharidfraktionen mit Lithiumionen verunreinigt. Die Strukturaufklärung der Oligosaccharidfraktionen erfolgte über eine Methylierungsanalyse mit anschließender GC-MS-Analytik. Auffällig war in fast allen erhaltenen Fraktionen der hohe Anteil an 1,6-Glucose, die nicht oder nur in Spuren in den ursprünglichen EPS vorhanden war. Die ursprüngliche 1,4-Glucuronsäure sollte nach Untersuchung von Lau eigentlich nicht mehr an die Oligosaccharide gebunden vorliegen und wahrscheinlich komplett zerstört werden, ein Reaktionsmechanismus wurde nicht postuliert (Lau, 1987a; 1987b). Gloaguen postulierte einen Reaktionsmechanismus für die Degradation der 1,3,4-Glucuronsäure zu einer Tetrahydroxycyclopentaensäure, für die Degradation 1,4-gebundener Uronsäuren

zitierte er nur die Ergebnisse nach Lau. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stellen diese Theorie in Frage; es bedürfte jedoch weiterer Untersuchungen, um zu beweisen, ob die auftauchende 1,6-Glucose aus der 1,4-Glucuronsäure während der Degradation entsteht. Die Lithiumdegradation ist eine eher unübliche Methode, da sie auch nur sinnvoll ist, wenn die Uronsäure nicht nur terminal gebunden vorliegt. Üblicherweise wird die Degradation der EPS in Oligosaccharide mit einer milden wässrigen Hydrolyse durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu Oxalsäure verwendet. Häufig werden aber auch andere Säuren, wie TFA, Salzsäure oder Schwefelsäure eingesetzt. Es werden labile Bindungen gespalten; vornehmlich werden diese von Pentosen und Desoxyhexosen gebildet. Das EPS von *Nostoc commune* DRH-1 wurde mittels milder TFA-Hydrolyse in Oligosaccharide gespalten. Diese wurden über Gelpermeationchromatographie in ein Disaccharid, ein Trisaccharid und mehrere Oligosaccharide getrennt und deren Struktur über NMR-Analytik weitgehend aufgeklärt (Helm, 2000). Aus dem EPS von *Nostoc commune* HB261 konnten nach Partialhydrolyse 12 Oligosaccharidfraktionen aufgetrennt werden. Sie wurden mit tandem-MS-MS untersucht. Es konnte eine sich wiederholende Struktur von Glucuronsäure (1→4 bzw 6) Glucose (1→4) Galactose (1→4) Glucose (1→4) Xylose aufgeklärt werden (Brüll, 2000). Nach Partialhydrolyse des EPS aus *Cyanospira capsulata* konnten am Ionenaustauscher eine neutrale und drei saure Fraktionen getrennt werden. Die neutrale Fraktion konnte durch NMR-Analytik als Disaccharid mit der Struktur Fucose (1→4) Mannose bestimmt werden. Die drei sauren Fraktionen waren heterogen, konnten auch nicht weiter aufgereinigt werden und wurden somit nicht weiter analysiert (Marra, 1990). Auch die Struktur von Ca-Spirulan wurde durch Partialhydrolyse weiter aufgeklärt. Die entstandenen Oligosaccharide wurden über einen Ionenaustauscher in eine neutrale und eine saure Fraktion getrennt. Die Strukturaufklärung erfolgte über eine Methylierungsanalyse und tandem-MS-MS. Es konnte ein Polymerisationsgrad zwischen 2 und 7 für die neutrale Fraktion ermittelt werden, für die saure Fraktion ein Di-, ein Tri- und ein Hexasaccharid. Durch tandem-MS-MS wurden die Oligosaccharide weiter aufgeklärt. Die neutralen Oligosaccharide bestanden aus verschiedenen großen Bruchstücken mit einer sich wiederholenden Abfolge von 1,2-Acofriose und 1,3-Rhamnose. Die sauren Oligosaccharide bestanden aus verschiedenen großen Bruchstücken mit einer sich wiederholenden Abfolge von Rhamnose und Uronsäure als Aldobiuronsäuren (Lee, 2000). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Schwierigkeit nach einer Partialhydrolyse in der Auftrennung der entstandenen Oligosaccharide liegt, da sich aufgrund der mangelnden Selektivität der Spaltung viele unterschiedliche Oligosaccharide bilden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Oligosaccharide durch eine

Ethanol-fällung getrennt. Es lag somit nur eine ungenügende Trennung der Oligosaccharide vor und die erhaltenen Daten können somit nur als Anhaltspunkt zur Strukturaufklärung dienen. Die Strukturaufklärung der Oligosaccharide erfolgte über eine Methylierungsanalyse. Durch eine NMR- und tandem-MS-MS-Analytik könnten noch weitere Erkenntnisse über die Struktur der Oligosaccharide erlangt werden.

Insgesamt gestaltet sich die Strukturaufklärung von Cyanobakterien-EPS aufgrund ihrer Komplexität als schwierig, was die wenigen dazu vorliegenden Daten erklärt. Erste strukturelle Daten konnten für die untersuchten EPS aus *Nostoc insulare*, *Chroococcus minutus* und *Synechocystis aquatilis* geliefert werden. Um weitere detaillierte Aussagen über die Struktur dieser EPS, wie eventuelle sich wiederholende Monosaccharidabfolgen, treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen folgen.

6.4. Immunmodulation

Das EPS aus *Synechocystis aquatilis* wurde in der vorliegenden Arbeit auf seine Fähigkeit untersucht, das Immunsystem zu beeinflussen. Es konnte ein Effekt, sowohl auf die unspezifische Abwehr in Form einer Komplementsystemhemmung und Induktion der Ausschüttung bestimmter Zytokine, als auch auf die spezifische Abwehr in Form einer Lymphozytenproliferationssteigerung gezeigt werden. Besonders herauszustellen ist hierbei die Hemmung des Komplementsystems über den klassischen Weg, die schon mit einem hundertstel der Heparindosierung erreicht werden kann. Brüll testete die neutrale und saure Fraktion des EPS aus *Nostoc commune* in einem Komplementmodulationstest, eine Unterscheidung zwischen dem klassischen und dem alternativen Aktivierungsweg wurde nicht vorgenommen. Es erfolgte nur eine Testung nach einer Inkubationszeit von 30min, daher kann keine Aussage über die Art der Modulation getroffen werden. Die IC_{50} betrug für die saure Fraktion ca. 80 μ g/ml und für die neutrale Fraktion ca. bei 350 μ g/ml (Brüll, 2000). Die erreichbare Hemmung des klassischen Aktivierungsweges bei einer IC_{50} von 0,02 μ g/ml für das hier untersuchte EPS aus *Synechocystis aquatilis* zeigt, dass das hier untersuchte EPS um ein vielfaches aktiver ist. Strukturelle Ähnlichkeiten der beiden EPS sind kaum zu finden, das EPS aus *Nostoc commune* besitzt keine Sulfatgruppen und besteht hauptsächlich aus Xylose, Glucuronsäure und 2-O-Methyl-Glucose. Ein weiterer direkter Vergleich mit anderen Arbeiten fällt schwer, da bisher noch keine weiteren vergleichbaren Tests mit anderen Cyanobakterien-EPS durchgeführt worden sind. Tests auf eine Immunsystemmodulation wurden nur mit drei verschiedenen Polysacchariden durchgeführt, die aus der

Cyanobakterienbiomasse isoliert wurden. Es handelte sich hierbei um drei hochmolekulare Polysaccharide aus den Cyanobakterienarten *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* und *Chlorella pyrenoides*. Es wurde die Aktivierung von isolierten Makrophagen untersucht. Bestimmt wurde anhand einer Polymerasekettenreaktion (PCR) die mRNA-Menge, die mit der Genausschüttung für IL-1 β und TNF α einhergeht. Es konnte gezeigt werden, dass im Konzentrationsbereich von 20-110ng/ml des Polysaccharidzusatzes eine signifikante Steigerung der mRNA-Produktion erfolgte. Eine Strukturähnlichkeit zum isolierten EPS aus *Synechocystis aquatilis* besteht nicht (Pugh, 2001). Es existieren einige Studien zur Aktivität des von *Spirulina platensis* gebildeten EPS Ca-Spirulan, welches eine gewisse Strukturähnlichkeit zum EPS aus *Synechocystis aquatilis* aufweist. Wie bei dem EPS aus *Synechocystis aquatilis* handelt es sich um ein sulfatiertes Polysaccharid mit einem großen Anteil an Desoxyzuckern. Ca-Spirulan zeigt antithrombotische Aktivität, indem es den Heparin-Kofaktor II aktiviert (Hayakawa, 1996; 2000). Es stimuliert weiterhin die Synthese des Gewebe-Plasminogen-Aktivators in vaskulären Endothelzellen (Hayakawa, 1997, Yamamoto, 2003). Außerdem wurden weitere Effekte von Ca-Spirulan auf vaskuläre Endothelzellen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Ca-Spirulan die Proliferation der Endothelzellen und deren Proteinsynthese hemmt, ohne den vorhandenen Zellen einen unspezifischen Schaden zuzufügen (Kaji, 2002). Es konnte in allen Veröffentlichungen gezeigt werden, dass die Sulfatgruppen essentiell für die Aktivität des Polysaccharides sind. Nach Desulfatierung zeigte es keinen Effekt mehr. Der Effekt von Sulfatgruppen auf die Aktivität der EPS konnte auch in einer Studie auf die antiadhesive Aktivität von Cyanobakterien EPS auf die Adhäsionsfähigkeit von *Helicobacter pylori* an Magenzellen gezeigt werden. Es wurden EPS aus verschiedenen *Cyanothece*-Arten auf ihre antiadhesive Aktivität getestet. Die größte Aktivität zeigten die EPS, für die der größte Sulfatanteil nachgewiesen wurde (Ascencio, 2004). Die Sulfatierung des EPS scheint somit essentiell für seine biologische Aktivität zu sein. Diese Abhängigkeit konnte auch schon für Polysaccharide anderen Ursprungs nachgewiesen werden. Alban zeigte, dass ein gewisser Sulfatierungsgrad bei Laminarin essentiell für die gerinnungshemmende Aktivität ist (Alban, 1993). Des Weiteren konnte durch Substitution mit anderen anionischen Substituenten, wie Phosphat- oder Sulfonsäureresten nachgewiesen werden, dass nicht nur der anionische Charakter, sondern speziell die Sulfatgruppen für die Aktivität essentiell sind (Demleitner, 1992; Engelskirchen, 1987).

Insgesamt ist zu erwarten, dass das EPS aus *Synechocystis aquatilis* aufgrund seiner Struktur mit einem relativ hohen Sulfatierungsgrad noch weitere biologische Aktivitäten aufweist. Weitere Untersuchungen, besonders in Hinblick auf das Gerinnungssystem, müssten noch durchgeführt werden. Eingehende Untersuchungen der Wirkungen sowie der Struktur-Wirkungsbeziehungen könnten eventuell zu einem potenten neuen Wirkstoff in der Immuntherapie oder auch anderen Therapiefeldern führen.

8. Literaturangaben

Adams, G.A. 1965

Methods in Carbohydrate Chemistry Vol.5; S.209-276

Alban, S. 1993

Synthese und physiologische Testung neuartiger Heparinoide
Dissertation

Atkins, E.D.T. 1986

Biomolecular structures of naturally occurring carbohydrate polymers
International Journal of biological Macromolecules Vol.8; S.323-329

Barbosa, H.R. and Alterthum A. 1992

The role of extracellular polysaccharide in cell viability and nitrogenase activity of
Beijerinckia dextrii
Canadian Journal of Microbiology Vol.38; S.986-988

Bar-Or Y. and Shilo, M. 1987

Characterization of macromolecular flocculants produced by *Phormidium* sp. Strain J-1 and
by *Anabaenopsis circularis* PCC 6720
Applied Environmental Microbiology Vol.53/9; S.2226-2230

Behrens, P.W. 1992

New Drugs from Natural Sources
Microalgae as a Source of Bioactive Products S.166-175

Bender, J.; Rodriguez-Eaton, S.; Ekanemesang, U.M. and Phillips P. 1994

Characterization of Metal-Binding Biofloculants Produced by the Cyanobacterial
Component of Mixed Microbial Mats
Applied and Environmental Microbiology Vol.60/7; S.2311-2315

Bertocchi, C.; Navarini, L. and Cesàro, A. 1990

Polysaccharides from Cyanobacteria
Carbohydrate Polymers Vol.12; S.127-153

Beuscher, N. ; Scheit, K.H.; Bodinet, C. and Kopanski, L. 1989

Immunologically active glycoproteins from *Baptisia tinctoria*
Planta Medica Vol.55/4; S.358-363

Bishop, C.T.; Adams, G.A. and Hughes, E.O. **1954**

A Polysaccharide from the blue-green alga, *Anabaena cylindrica*

Canadian journal of chemistry Vol.32/11; S.999-1004

Björndal, H.; Hellerqvist; C.G.; Lindberg, B. and Svensson, S. **1970**

Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides

Angewandte Chemie Vol.9/9; S.610-619

Blakeney, A.B.; Harris, P.J. and Stone, B.A. **1983**

A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis

Carbohydrate Research Vol.113; S.291-299

Blaschek, W. 1991

Isolierung und Analytik von Polysacchariden

Polysaccharide S.17-47

Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. **1973**

New quantitative determination of uronic acids

Analytical Biochemistry Vol.54; S.484-489

Bodinet, C. 1999

Immunpharmakologische Untersuchungen an einem pflanzlichen Immunmodulator

Dissertation

Bold, H.C. and Wynne, M.J. **1985**

Introduction to the algae (second edition) Chapter 2

Brüll,L.; Huang,Z.; Thomas-Oates, J.E.; Paulsen, B.S.; Cohen, E.H: and Michaelsen, T.E. **2000**

Studies of Polysaccharides from three edible Species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony Morphologies: Structural Characterization and Effect on the Complement System of

Polysaccharides from *Nostoc commune*

Journal of Phycology Vol.36; S.871-881

Budzikiewicz, H. 1992

Interpretation der Fragmentierungsmuster organischer Verbindungen

Massenspektrometrie S.73-81

Campbell, E.L.; Brahamsha, B. and Meeks, J.C. **1998**

Mutation of an alternative sigma factor in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* results in increased infection of its symbiotic plant partner, *Anthoceros punctatus*

Journal of Bacteriology Vol.180; S.4938-4941

Cannell, R.J.P. 1993

Algae as a Source of Biologically Active Products.

Pesticide Science Vol.39; S.147-153

Carpita, N.C. and Shea, E.M. 1989

Analysis of Carbohydrates by GLC and MS S.157-216

Carr, M.H. 1996

Water on Mars S.229pp

Carr, N.G. and Whitton, B.A. 1982

Cyanobacteria: current perspectives

The biology of cyanobacteria S.1-8

Castenholz, R.W. and Waterbury, J.B. 1989

Group 1. Cyanobacteria

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.3; S.1710-1727

Castenholz, R.W. 1978

The biogeography of hot spring algae through enrichment cultures

Mitteilungen, Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie

Vol.21; S.296-315

Chiovitti, A.; Bacic, A.; Kraft, G.T.; Craik, D.J.; Liao, M.-L. 1999

Pyruvated carragens from *Solieria robusta* and its adelphoparasite *Tikvahielliella candida*

Hydrobiologia Vol.398/399; S.401-409

Chiovitti, A.; Liao, M.-L.; Kraft, G.T.; Munro, S.L.A.; Craik, D.J.; Bacic, A. 1996

Cell Wall Polysaccharides from Australian Red Algae of the family Solieriaceae

Botanica Marina Vol.39; S.47-59

Chiovitti, A.; Bacic, A.; Craik, D.J.; Munro, S.L.A.; Kraft, G.T.; Liao, M.-L. 1997

Cell-wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carragenans from the genus *Callopycus*

Carbohydrate Research Vol.299; S.229-243

Chiovitti, A.; Kraft, G.T.; Bacic, A.; Craik, D.J.; Munro, S.L.A.; Liao, M.-L. 2001

Chemistry, Properties and Phylogenetic Implications of the methylated carrageenans from red algae of the genus *Areschougia*

Journal of Phycology Vol.37; S.1127-1137

Christensen, B.E.; Trømborg, H. and Smidsrød **1987**

Polysaccharide Production by a marine, filmforming Bacterium (*Pseudomonas* sp. NCMB 2021)
Proceeding of the Conference on Recent Developments in Industrial Polysaccharides S.119-128

Cohen, Y.J.; Padan, E. and Shilo, M. **1975**

Facultative anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*
Journal of Bacteriology Vol.123; S.855-863

Costerton, J.W.; Cheng, K.J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nickel, J.C.; Dasgupta, M. and Marrie, T.J. **1987**

Bacterial biofilms in nature and disease
Annual Review of Microbiology Vol.41; S.435-464

Craigie, J.S. and Leigh, C. **1978**

Carrageenans and agars
Handbook of phycological methods S.110-129

Craigie, J.S.; Wen, Z.C. and van der Meer, J.P. **1984**

Interspecific, Intraspecific and Nutritionally-Determined Variations in the Composition of Agars from *Gracilaria* spp.
Botanica Marina Vol.27; S.55-61

Crawford, S.D. and Swoboda, U.K. **2000**

Cyanotoxins
The Ecology of Cyanobacteria S.613-632

Crowe, J.H.; Hoekstra, F.A. and Crowe, L.M. **1992**

Anhydrobiosis
Annual Review of Physiology Vol.54; S.579-599

Curtius, H.C.; Völlmin, J.A. and Müller, M. **1968**

Determination of the mutarotation of monosaccharides by gaschromatography. Elucidation of different forms of fructose and sorbose by gas chromatography, infrared and mass spectrometry
Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie S.243-341

Danishefsky, J.; Whistler, R.L. and Bettelheim, F.A. **1970**

The Carbohydrates S.388-391

De Philippis, R. and Vincenzini, M. **1998**

Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications
FEMS Microbiological Review Vol.22; S.151-175

De Philippis, R.; Margheri, M.C.; Pelosi, E. and Ventura, S. **1993**

Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat
Journal of Applied Phycology Vol.5; S.387-394

De Philippis, R.; Margheri, M.C. ; Materassi, R. ; Vincenzini, M. **1998a**

Potential of Unicellular Cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers
Applied and Environmental Microbiology Vol.64/3; S.1130-1132

De Philippis, R.; Sili, C.; Tassinato, G.; Vincenzini, M. and Materassi, R. **1991**

Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulata*
Bioresource technology Vol.38; S.101-104

De Philippis, R.; Ena, A.; Paperi, R.; Sili,C. and Vincenzini, M. **2000**

Assessment of the potential of *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection for the production of polysaccharides of applied interest
Journal of Applied Phycology Vol.12; S.401-407

Demleiter, S.; Kraus, J. and Franz, G. **1992**

Synthesis and antitumor activity of sulfoalkyl derivatives of curdlan and lichenan
Carbohydrate Research Vol.226; S.247-252

Demoulin, V. and Janssen, M.P. **1981**

Relationship between diameter of the filament and cell shape in blue-green algae
Br Phycol J Vol.16, S.55-58

Desikachary,T.V. 1959

Cyanophyta

Indian Council of Agricultural Research

Dische, Z. 1947

A new specific color reaction of hexuronic acids.
Journal of Biological Chemistry Vol.167; S.189-198

Drews, G. and Weckesser, J. **1982**

Function, structure and composition of cell walls and external layer
The Biology of Cyanobacteria S.333-358

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. **1956**

Colorimetric Method for Determination of Sugars
Analytical Chemistry Vol.28/3; S.350-356

Duckworth, M. and Yaphe, W. **1970**

Definitive assay for pyruvic acid in agar and other algal polysaccharides
Chemistry and Industry S.747-748

Ehling-Schultz, M.; Bilger, W. and Scherer, S. **1997**

UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*

Journal of Bacteriology Vol.179; S.1940-1945

Engelskirchen, K. 1987

Makromolekulare Stoffe

Methoden der Organischen Chemie Vol.20/3; S.2161-2162

Fattom, A. and Shilo, M. 1984

Phormidium J-1 bioflocculant: production and activity

Archives of Microbiology Vol.139; S.421-426

Fay, P. 1983

The Blue-Greens (Cyanophyta-Cyanobacteria).Vol.160; S.30-46

Filali Mouhim, R.; Cornet, J.-F.; Fontaine, T.; Fournet, B.; Dubertret, G. **1993**

Production, Isolation and preliminary Characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*

Biotechnology Letters Vol.15/6; S.567-572

Fischer, D. 1996

Untersuchungen über den Einfluß von Züchtungsfaktoren auf die Bildung, Zusammensetzung und das rheologische Verhalten der Exopolysaccharide ausgewählter Cyanobakterien

Dissertation

Flaibani, A.; Olsen, Y. and Painter, T.J. **1989**

Polysaccharides in desert reclamations: Compositions of exocellular Proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae

Carbohydrate Research Vol.190; S.235-248

Flores, E. and Herrero, A. 1994

Assimilatory Nitrogen Metabolism and its Regulation

The Molecular Biology of Cyanobacteria

Fogg, G.E. 1944

Growth and heterocyst production in *Anabaena cylindrica* Lemm.

New Phytologist Vol.43; S.164-175

Fontaine, T.; Fournet, B. and Karamanos, Y. **1994**

A new procedure for the reduction of uronic acid containing polysaccharides

Journal of Microbiological Methods Vol.20; S.149-157

Forni, C.; Telo, F.R. and Cailola, M.G. **1997**

Comparative analysis of the polysaccharides produced by different species of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanophyta)

Phycologia Vol.36; S.181-185

Friedmann, E.I. **1971**

Light and scanning electron microscopy of endolithic desert habitat

Phycologia Vol.10; S.411-428

Friedmann, E.I. and Ocampo-Friedmann, R. **1995**

A primitive cyanobacterium as pioneer microorganism for terraforming Mars

Advanced Space Research Vol.15; S.143-246

Garcia-Picel, F. and Castenholz, R.W. **1991**

Characterization and biological implications of scytomenin, a cyanobacterial sheath pigment

Journal of Phycology Vol.27; S.395-409

Geitler, L. **1932**

Cyanophyceae; Blaualgen von Europa unter Berücksichtigung der anderen Kontinente

Rabenhorst's Kryptogamenforschung in Deutschland, Österreich und der Schweiz Vol.19/30

Gleeson, P.A. and Clarke A.E. **1979**

Structural studies on the major component of *Gladiolus* style mucilage, an arabinogalactan-protein

Biochemical Journal Vol.181; S.607-621

Gloaguen, V.; Morvan, H. and Hoffmann, L. **1995a**

Released and capsular polysaccharides of Oscillatoriaceae (Cyanophyceae, Cyanobacteria)

Algological Studies Vol.78; S.53-69

Gloaguen, V.; Wieruszeski, J.; Strecker, G.; Hoffmann, L. and Morvan, H. **1995b**

Identification by NMR spectroscopy of oligosaccharides obtained by acidolysis of the capsular polysaccharides of thermal biomass

International Journal of Biological Macromolecules Vol.17; S.387-393

Gloaguen, V.; Plancke, Y.; Strecker, G.; Vebret, L.; Hoffmann, L. and Morvan, H. **1997**

Structural Characterization of three aldobiuronic acids derived from the capsular polysaccharide produced by the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*

International Journal of Biological Macromolecules Vol.21; S.73-79

Gloaguen, V.; Morvan, M.; Hoffmann, L.; Plancke, Y.; Wieruszeski, J.-M.; Lippens, G. and Strecker, G. **1999**

Capsular polysaccharide produced by the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*

European Journal of Biochemistry Vol.266/3; S.762-770

Gorin, P.A. and Ishikawa, T. **1967**

Configuration of pyruvic acid acetals, 4,6-O-linked to D-galactose units, in bacterial and algal polysaccharides.

Canadian Journal of Chemistry Vol.45/5; S.521-532

Hakomori, S. 1964

A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxid

Journal of Biochemistry Vol.55; S.205-208

Halfen, L.N. and Castenholz, R.W. **1971**

Gliding motility in the blue-green alga *Oscillatoria princeps*

Journal of Phycology Vol.7; S.133-145

Harris, P.J.; Henry, R.J.; Blakeney, A.B. and Stone, B.A. **1984**

An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides
Carbohydrate Research Vol.127; S.59-73

Hayakawa, Y.; Hayashi, T.; Hayashi, K.; Ozawa, T.; Niiya, K. and Sakuragawa, N. **1996**

Heparin cofactor II-dependent antithrombin activity of calcium spirulan

Blood Coagulation & Fibrinolysis Vol.7; S.554-560

Hayakawa, Y.; Hayashi, T.; Hayashi, K.; Ozawa, T.; Niiya, K. and Sakuragawa, N. **1997**

Calcium spirulan as an inducer of tissue-type plasminogen activator in human fetal lung fibroblasts

Biochimica et Biophysica Acta Vol.1355; S.241-247

Hayakawa, Y.; Hayashi, T.; Lee, J.B.; Ozawa, T. and Sakuragawa, N. **2000**

Activation of heparin cofactor II by calcium spirulan

The Journal of biological Chemistry Vol.275; S.11379-11382

Helbert, J. R. and Brown, K. D. **1956**

Color reaction of hexuronic acids with anthrone

Analytical Chemistry Vol.28; S.1098-1100

Helm, R.F.; Huang, Z.; Edwards, D.; Leeson, H.; Peery, W. and Potts, M. **2000**

Structural Characterization of the released Polysaccharide of Desiccation-Tolerant *Nostoc commune* DRH-1

Journal of Bacteriology Vol.182/4; S.974-982

Herdman, M. 1979a

Deoxyribonucleic Acid Base Composition of Cyanobacteria.

Journal of genetic Microbiology Vol.111; S.63-71

Herdman, M.; Lanvier, M., Rippka, K. and Stanier, R. Y. **1979b**

Genom Size of Cyanobacteria

Journal of genetic Microbiology Vol.111; S.73-85

Hill, D.R.; Keenan, T:W.; Helm, R.F.; Potts, M.; Crowe, L.M. and Crowe, J.H. **1997**

Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation

Journal of Applied Phycology Vol.9; S.237-248

Hirase, S. 1957

Chemical constitution of agar-agar. XIX. Pyruvic acid as a constituent of agar-agar.

3. Structure of the pyruvic acid-linking disaccharide derivative isolated from the methanolysis products of agar.

Bulletin of the Chemical Society of Japan Vol.30; S.75-79

Hirase, S. and Watanabe, K. 1972

The Presence of Pyruvate residues in λ -Carrageenan and a Similar Polysaccharide

Bulletin of Industrial and Chemical research Kyoto University Vol.50; S.332-336

Hokputsu, S.; Hu, C.; Paulsen, B.S. and Harding, S.E. **2003**

A physico-chemical comparative study on extracellular carbohydrate polymers from five desert algae

Carbohydrate Polymers Vol.54; S.27-32

Holm-Hansen, O. 1968

Ecology, Physiology, and Biochemistry of Blue-Green Algae.

Annual Review of Microbiology Vol.22; S.47-70

Huang, Z.; Liu, Y.; Paulsen, B.S. and Klaveness, D. **1998**

Studies on Polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony Morphologies: Comparison of Monosaccharide Compositions and Viscosities of Polysaccharides from field colonies and suspension cultures

Journal of Phycology Vol.34; S.962-968

Kaji, T.; Fujiwara, Y.; Hamada, C.; Yamamoto, C.; Shimada, S.; Lee, J.-B. and Hayashi, T. **2002**

Inhibition of cultured bovine aortic endothelial cell proliferation by Sodium Spirulan, a new sulfated Polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*

Planta Medica Vol.68; S.505-509

Kao, G. and Tsai, C.-M. 2004

Quantification of O-acetyl, N-acetyl and phosphate groups and determination of the extent of O-acetylation in bacterial vaccine polysaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with conductivity detection (HPAEC-CD)

Vaccine Vol.22; S.335-344

Kenyon, C. N.; Rippka, R. and Stanier, R. Y. 1972

Fatty Acid Composition and Physiological Properties of some Filamentous Blue-Green Algae
Archivs of Microbiology Vol.83; S.216-236

Klein, C. and Buekes, N.j. 1992

Time distribution, stratigraphy, sedimentologic settings, and geochemistry of Precambrian ironformations

The Proterozoic Biosphere, A multidisciplinary Study S.136-146

Komarek, J. and Anagnostidis, K. 1986

Modern Approach to the Classification System of Cyanophytes, 2-Chroococcales
Archiv Hydrobiological Vol.73/43; S.157-226

Komarek, J. and Anagnostidis, K. 1989

Modern Approach to the Classification System of Cyanophytes, 4-Nostocales
Archiv Hydrobiological Vol.823/56; S.247-345

Kratz, W.A. and Myers, J. 1955

Nutrition and growth of several blue-green algae

American Journal of botany Vol.42; S.275-280

Lama, L.; Nicolaus, B.; Calandrelli, V.; Manca, M.C.; Romano, I. and Gambacorta, A. 1996

Effect of growth conditions on endo- and exopolymer biosynthesis in *Anabaena cylindrical* 10C
Phytochemistry Vol.42; S.655-659

Lau, J.M.; McNeill, M.; Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1984

Selective Degradation of the Glycosyluronic Acid Residues of complex Carbohydrates by lithium dissolved in Ethylenediamine

Carbohydrate Research Vol.168; S.221-243

Lau, J.M.; McNeill, M.; Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1987a

Treatment of Rhamnogalacturonan I with Lithium in Ethylenediamine

Carbohydrate Research Vol.169; S.245-274

- Lau, J.M.;** McNeill, M.; Darvill, A.G. and Albersheim, P. **1987b**
Selective Degradation of the Glycosyluronic Acid Residues of complex Carbohydrates by lithium dissolved in Ethylenediamine
Carbohydrate Research Vol.168; S.221-243
- Le, J. and Vilcek, J. 1990**
Pathology reviews S.97-111
- Lecacheux, D. 1988**
Preparative Fractionation of Natural Polysaccharides by Size Exclusion Chromatography
Carbohydrate Polymers S.119-130
- Lee, J.-B.;** Hayashi, T.; Hayashi, K.; Sanakawa, U.; Maeda, M.; Nemoto, T. and Nakanishi, H. **1998**
Further Purification and Structural Analysis of Calcium Spirulan from *Spirulina platensis*
Journal of Natural Products Vol.61; S.1101-1104
- Lee, J.-B.;** Hayashi, T.; Hayashi, K. and Sanakawa, U. **2000**
Structural analysis of Calcium Spirulan (Ca-SP)-derived Oligosaccharides using Electrospray Ionization Mass Spectrometry
Journal of Natural Products Vol.63; S.136-138
- Li, P.;** Harding, S.E. and Liu, Z. **2001**
Cyanobacterial Exopolysaccharides: Their Nature and Potential Biotechnological Applications
Biotechnology and Genetic Engineering Reviews Vol.18; S.375-404
- Li, P.;** Liu, Z. and Xu, R. **2001**
Chemical characterization of the released polysaccharide from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica*GR02
Journal of Applied Phycology Vol.13; S.71-77
- Liu, Z. and Li, P. 1996**
A simulation test of copper ore biomineralization by the algae
Organic Matter Mineralization S.198-206
- Lupi, F.M.;** Fernandes, H.M.L.; Tome, M.M.; Correia, I. and Novais, J.M. **1994**
Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalgae *Botryococcus braunii* UC58
Enzyme Microbial Technology Vol.16; S.546-550

- Marra, M.;** Palmeri, A.; Ballio, A.; Segre, A. and Slodki, M.E. **1990**
Structural characterization of the exopolysaccharide from *Cyanospira capsulata*
Carbohydrate Research Vol.197; S.338-344
- Matulewicz, M.C.;** Percival, E.E. and Weigel, H. **1984**
Water-soluble Polysaccharides of antarctic and cultured *Phormidium* species of the
Cyanophyceae
Phytochemistry Vol.23/1; S.103-105
- Monneret, C.;** Florent, I.; Kaboré, I. and Khuong-Huu, Q. **1974**
Novel method for methylation of methoxy-sugars
Journal of Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides Vol.1/2 S.161-168
- Moore, B.G.** and Tischer, R.G. **1965**
Biosynthesis of extracellular polysaccharides by the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*
Canadian Journal of Microbiology Vol.11; S.877-885
- Moreno, J.;** Vargas, M.A.; Olivares, H.; Rivas, J. and Guerrero, M.G. **1998**
Exopolysaccharide production by cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and
continuous culture
Journal of Biotechnology Vol.60; S.175-182
- Moreno, J.;** Vargas, M.A. ; Madieo, J.M. ; Muñoz, J. ; Rivas, J. and Guerrero, M.G. **2000**
Chemical and Rheological Properties of an Extracellular Polysaccharide produced by the
Cyanobacterium *Anabaena* sp.ATCC 33047
Biotechnology and Bioengineering Vol.67/3; S.283-290
- Morris, G.A.;** Li, P. ; Puaud, M. ; Liu, Z. ; Mitchell, J.R. ; Harding, S.E. **2001**
Hydrodynamic characterisation of the exopolysaccharide from the halophilic cyanobacterium
Aphanothece halophytica GR02: a comparison with xanthan
Carbohydrate Polymers Vol.44; S.261-268
- Mort, A.J.** and Bauer, W.D. **1982**
Application of two new Methods for Cleavage of Polysaccharides into Oligosaccharide
Fragments
The Journal of Biological Chemistry Vol.257/4; S.1870-1875
- Morvan, H.;** Gloaguen, V.; Vebret, L.; Joset, F. and Hoffmann, L. **1997**
Structure-function investigations on capsular polymers as a necessary step for new
biotechnological applications: The case of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*
Plant Physiology Vol.35; S.671-683

Nakagawa, M.; Takamura, Y. and Yagi, O. **1987**

Isolation and Characterization of the slime from a cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* K-3A
Agricultural and Biological Chemistry Vol.51; S.329-337

Namikoshi, M. and Rinehart, K.L. **1996**

Bioactive Compounds Produced by Cyanobacteria
Industrial Microbiology and Biotechnology Vol.17; S.373-384

Needs, P.W. and Selvendran, R.R. **1994**

A critical assessment of a one-tube procedure for the linkage analysis of polysaccharides as partially methylated alditol acetates
Carbohydrate Research Vol.254; S.229-244

Nicolaus, B.; Panico, A.; Lama, L.; Romano, I.; Manca, C.; De Giulio, A. and Gambacorta, A. **1999**

Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria
Phytochemistry Vol.52; S.639-647

Nienow, J.A. and Friedmann, E.I. **1993**

Terrestrial lithophytic (rock) communities
Antarctic Microbiology S.353-412

Padan, E. and Cohen, Y. **1982**

Anoxygenic photosynthesis
The Biology of Cyanobacteria S.215-235

Painter, T.J. **1993**

Carbohydrate polymers in desert reclamation: the potential of microalgal biofertilizers
Carbohydrate Polymers Vol.20; S.77-86

Panoff, J.-M.; Priem, B.; Morvan, H. and Joset, F. **1988**

Sulphated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803 and 6714
Archiv für Mikrobiologie Vol.150; S.558-563

Percival, E. and McDowell, R.H. **1990**

Algal Polysaccharides
Methods in Plant Biochemistry Vol.2; S.523-547

Plude, J.L.; Parker, D.L.; Schemmer, O.J.; Timmerman, R.J.; Hagstrom, S.A.; Joers, J.M. and Hnasko, R. **1991**

Chemical characterization of polysaccharide from slime layer of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40

Applied and Environmental Microbiology Vol.57; S.1696-1700

Pohl, P.; Kohlhase, M. and Krautwurst, S. **1987**

An inexpensive inorganic medium for mass cultivation of freshwater microalgae

Phytochemistry Vol.26/6; S1657-1659

Potts, M. 1994

Desiccation resistance of prokaryotes

Microbial Review Vol.58; S.755-805

Potts, M.; Olie, J.J.; Nickels, J.S.; Parsons, J. and White, D.C. **1987**

Variation in phospholipid ester-linked fatty acid and carotenoids of desiccated *Nostoc commune* (Cyanobacteria) from different geographic locations

Applied Environmental Microbiology Vol.53; S.4-9

Preuß, A. and Thier, H.-P. 1982

Quantitative Analyse natürlicher Dickungsmittel durch Methanolyse und Capillargaschromatographie

Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung Vol.175; S.93-100

Quintero, E.; Ishida, K.; Gordon, G. and Gusey, G. **1989**

Comparison of reduction methods for gas chromatography-mass spectrometric. Identification and quantification of uronic acids in acidic polysaccharides

Journal of Microbiological Methods Vol.9; S.309-322

Rees, D.A. 1963

The carrageenan system of polysaccharides. The relation between the κ - and λ -components

Journal of the Chemical Society S.1821-1832

Rippka, R.; Deruelles, R.; Waterbury, J. B.; Herdman, M. and Stanier, R. Y. **1979**

Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria.

Journal of genetic Microbiology Vol.111; S.1-61

Sangar, V.K. and Dugan, P.R. 1972

Polysaccharide Produced by *Anacystis nidulans*: Its Ecological implication

Applied Microbiology Vol.24/5; S.732-734

Scherer, S.; Chen, T.W. and Böger, P. **1988**

A new UV-A/B protecting pigment in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*
Plant Physiology Vol.88; S.1055-1057

Scherz, H. and Bonn, G. **1998**

Chromatographic Methods
Analytical Chemistry of Carbohydrates S.105-260

Schopf, J.W. and Walter, M.R. **1983**

Archean microfossils: New evidence of ancient microbes
Earth's earliest Biosphere, It's Origin and Evolution S.214-384

Schulze, C. **2000**

Gewinnung und Identifizierung von nutzbaren Verbindungen aus den Nährlösungen und
Biomassen von Mikroalgen
Dissertation

Shah, V.; Garg, N.; and Madamwar, D. **1999**

Exopolysaccharide production by a marine cyanobacterium *Cyanothece* sp
Applied Biochemistry and Biotechnology Vol.82; S.81-90

Shevach, E.M. **1997**

Current Protocols in Immunology

Shin, H.J.; Murakami, M.; Matsuda, H. and Yamaguchi, K. **1996**

Microviridins D-F, Serine Protease Inhibitors from the Cyanobacterium *Oscillatorin agardhii*
(NIES-204).
Tetrahedron Vol.52; S.8159-8168

Skulberg, O.M.; Carmichel, W.W.; Codd, G.A. and Skulberg, R. **1993**

Taxonomy of Toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria)
Algal Toxins in Seafood and Drinking Water

Sloneker, J.H. and Orentas, D.G. **1962**

Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial Polysaccharide
Nature Vol.4827; S.478-479

Sommer, U. **1998**

Populationsbiologie
Biologische Meereskunde S.109-132

Strassburger **2002**

Autothrophe Gruppen; Organisationstyp: Prokaryotische Algen
Lehrbuch der Botanik S.531pp

Strauss, H. and Moore, T.B. **1992**

Abundances and isotopic composition of carbon and sulfur species in whole rock and kerogen samples

The Proterozoic Biosphere, A multidisciplinary Study S.117-127

Sudo, H.; Burgess, J.G.; Takemasa, H.; Nakamura, N. and Matsunaga, T. **1995**

Sulfated Exopolysaccharide Production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytica*

Current Microbiology Vol.30; S.219-222

Sutherland, I.W. 1988

Bacterial surface polysaccharides: structure and function

International Review of Cytology Vol.113; S.187-321

Sutherland, I.W. 1990

Biotechnology of Microbial Polysaccharides

Cambridge University Press S.163pp

Sutherland, I.W. 1994

Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides

Biotechnology Advances Vol.12; S.393-448

Sutherland, I.W. 1996

Extracellular Polysaccharides

Products of primary metabolism S.615-657

Sweet, D.P.; Shapiro, R.H. and Albersheim, P. **1975**

Quantitative analysis by various g.l.c. response factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates

Carbohydrate Research Vol.40; S.217-225

Tandeau de Marsac, N. and Houtnard, J. **1993**

Adaption of Cyanobacteria to Environmental Stimuli: New Steps towards Molecular Mechanism

FEMS Microbiological Review S.104 / 119

Tandeau de Marsac, N. 1994

Differentiation of hormogonia and relationship with other biological processes

The Molecular Biology of Cyanobacteria S.825-842

Taylor, R.L. and Conrad, H.E. **1972**

Stoichiometric depolymerization of Polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl-group
Biochemistry Vol.11/8; S.1383-1388

Tease, B.E. and Walker, R.W. **1987**

Comparative composition of the sheath of the cyanobacteria *Gloethece* ATCC 27152 cultured with and without combined nitrogen
Journal of genetic Microbiology Vol.133; S.3331-3339

Tease, B.E.; Jürgens, U.J.; Golecki, J.R.; Heinrich, U.R.; Rippka, R. and Weckesser, J. **1991**

Fine-structural and chemical analysis on inner and outer sheath of the cyanobacterium *Gloethece* sp. PCC 6909
Antonie van Leeuwenhoek-International Journal of general and molecular microbiology Vol.59; S.27-34

Tischer, R.G. and Moore, B.G. **1964**

An Extracellular Polysaccharide produced by *Palmella mucosa* Kütz.
Archiv für Mikrobiologie Vol.49; S.158-166

Tischer, R.G. and Davis, E.B. **1971**

The effect of various nitrogen sources upon the production of extracellular polysaccharide by the blue-green alga *Anabaena flos-aquae* A-37
Journal of Experimental Botany Vol.22; S.546-551

Vincent, W.F. **2000**

Cyanobacterial Dominance in the Polar regions
The Ecology of Cyanobacteria S.321-340

Vincenzini, M.; De Philippis, R.; Sili, C. and Materassi, R. **1990**

Studies on exopolysaccharide release by diazotrophic batch culture of *Cyanospira capsulata*
Applied Microbiology and Biotechnology Vol.34; S.392-396

Volk, R.-B. **1996**

Kontrollierte Massenzucht von Mikroalgen unter zwei Gesichtspunkten
Dissertation

Walter, M.R. and Bauld, J. **1983**

The association of sulphate evaporites, stromatolitic carbonates and glacial sediments: examples from the proterozoic of Australia and the Cainozoic of Antarctica
Precambrian Research Vol.21; S.129-148

Wang, W.S. and Tischer, R.G. **1973**

Study of the Extracellular Polysaccharides produced by a blue-green Alga,
Anabaena flos-aquae A-37

Archives of Microbiology Vol.91; S.77-81

Wharton, R.A. **1994**

Stromatolitic mats in Antarctic lakes

Phanerozoic Stromatolites 2 S.53-70

Whitton, B.A. **1992**

Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria: current perspectives

The Biology of Cyanobacteria S.1-8

Yamamoto, C.; Nakamura, A.; Shimada, S.; Kaji, T.; Lee, J.-B. and Hayashi, T. **2003**

Differential Effects of Sodium Spirulan on the Secretion of fibrinolytic Proteins from vascular endothelial Cells: Enhancement of plasminogen activator Activity

Journal of Health Science Vol.49/5; S.405-409

Zürcher, K. Hadorn, H. and Strack, C. **1975**

Simplified method of preparing sugar oxim-silyl derivates for gas chromatography analysis

Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene Vol.66/1 S.92-116

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Insbesondere möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Dr. (in spe) Sebastian Thude, Herrn Dr. Jörn Nemetz und Frau Dr. Maren Wack für ihre Freundschaft, gruppensdynamische Frustbewältigung, die Förderung meiner Fußballkompetenz, für konstruktive fachliche und auch nicht-fachliche Gespräche bei Cappu und Tee und für die gemeinsame Unschlagbarkeit in Kicker- und Fußballturnieren.

Frau Dr. Birgit Classen für die grundlegende Einführung in die Kohlenhydratanalytik und für die liebe Wegbegleitung der ersten Schritte ins Doktorandenleben. Weiterhin gilt besonders ihr mein Dank für die Förderung meiner fachlichen Kompetenz in Systematik, Morphologie und Pharmakognosie.

Herrn Dr. R. B. Volk für die Einführung in die Welt der Cyanobakterien, die Planung diverser Praktika und den besten selbst destillierten Cointreau der Welt.

Herrn Kalle Bock für die technische Unterstützung und die Pflege und Wartung aller Geräte des Instituts, besonders für das unermüdliche Reparieren der Pumpen die ich zur Strecke gebracht habe und natürlich für die geniale Konstruktion des wasserbetriebenen, kühlenden und explosions sicheren Magnetührers.

Frau Helle Lund für ihren Humor und ihre Fürsorge, die Betreuung der Cyanobakterien und ihre Hilfe bei Pyruvat- und Uronsäurebestimmung.

Frau Frauke Rodde für die unermüdliche Hilfe beim Methylieren und ihr und **Frau Kirsten Signus** für das gemeinsame Sinnieren über die Schlechtigkeit der Welt im Rahmen der morgendlichen Teerunde.

Den Jungdoktoranden **Frau Jana Partschefeld**, **Herrn Andreas Bossy**, **Herrn Niels Grünewald**, **Herrn Ulrich Breit** und **Frau Inken Groth** unter anderem für Gänseessen, Schwabenwitze und Verschwörungstheorien.

Frau Susanne Köppen und **Herrn Heinke Wübbenhorst** für die Durchführung des Komplementmodulationstests.

Unseren Gärtnern **Herrn Carsten thor Straten** und **Herrn Dietrich Christiansen** für die liebevolle Pflege unseres schönen Gartens.

Herrn Dr. Ulrich Girreser danke ich für die Aufnahme von GC-MS- und NMR-Spektren und entschuldige mich für den ganzen Frust mit meinen häufig nicht auswertbaren Proben.

Frau Dr. Cornelia Bodinet, Mitarbeiterin der Firma Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, möchte ich für die Durchführung der immunologischen Testungen danken.

Herrn Dr. Jörg Mehnert, danke ich für die „finanzielle Unterstützung“ und ihm und **allen Mitarbeitern der Gorch-Fock-Apotheke** danke ich für eine schöne Zeit in einem tollen Team und den immer lustigen Ausklang einer Woche.

Dank gilt auch meinen Kommilitoninnen und Freundinnen **Frau Martina Berg**, **Frau Claudia Weiß**, **Frau Inga Keminar**, **Frau Svenja Pfeifer**, **Frau Irina Buss**, **Frau Karin Meyer** und **Frau Birte Schlee** für eine schöne Studienzeit, gemeinsame Lernsessions und viele lustige Partys.

Ein besonderer Dank gilt **Herrn Dirk Smolka** für seine Unterstützung, das Ertragen meiner Launen, das unermüdliche Korrigieren meiner Kommafehler und für die lückenlose Versorgung mit Tee und Cappu während der anstrengenden Schreibphasen.

Nicht genug danken kann ich **meiner Mutter**, das sie immer für mich da ist, an mich glaubt und mir immer Inspiration und Vorbild ist. **Meinem Bruder** einfach für das „großer Bruder“ sein. Und **meinem Vater**, der hoffentlich sehr stolz auf mich wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kathrin Venzke
Geburtsdatum: 28. September 1977
Geburtsort: Wolfsburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1989-1996 Ratsgymnasium Wolfsburg

Hochschulausbildung:

WS1996/1997-SS1998 Pharmaziestudium an der Martin-Luther Universität zu Halle
08/1998 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
WS1998/1999-SS2000 Pharmaziestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
11/2000 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
01/2001-07/2001 Pharmaziepraktikum
Hirsch-Apotheke in Friedrichsort Kiel
07/2001-01/2002 Pharmaziepraktikum
Pharmazeutischen Institut der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
01/2002 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Promotion:

Seit 07/2001 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Pharmazeutischen Institut der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von
Prof. Dr. W. Blaschek

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Kiel, am 07.03.05

Kathrin Venzke