

**Cyanobakterielle Exopolysaccharide von
Synechocystis aquatilis und *Synechocystis pevalekii*:
Untersuchungen zur Struktur und
Inhibition des humanen Komplementsystems**



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

vorgelegt von
Daniela Flamm

Kiel 2012

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Blaschek
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Rüdiger Schulz
Tag der mündlichen Prüfung:	22.11.2012
Zum Druck genehmigt:	29.11.2012

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl
(Dekan)

Sivananda sagt:

„Jede Schwierigkeit ist eine Gelegenheit

Willenskraft zu entwickeln.“

In Liebe meiner ganzen Familie

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	7
II.	Abkürzungsverzeichnis	11
1	Einleitung	13
1.1	Systematik	13
1.2	Zytologie und Morphologie	14
1.3	Cyanobakterielle Stoffwechselprodukte	17
1.4	Cyanobakterielle Exopolysaccharide	21
1.4.1	Funktion cyanobakterieller Exopolysaccharide	21
1.4.2	Zusammensetzung cyanobakterieller Exopolysaccharide	23
1.4.3	Einfluss der Kultivierung auf Cyanobakterien und EPS-Bildung	24
1.5	Komplementsystem	27
2	Zielsetzung	30
3	Materialien und Methoden	32
3.1	Allgemein verwendete Chemikalien und Materialien	32
3.2	Cyanobakterien-Stämme	33
3.3	Kultivierung	35
3.3.1	Allgemeine Kultivierungsbedingungen	35
3.3.2	Nährmedium	35
3.3.3	Kultivierung in Kleinkulturen	36
3.3.4	Kultivierung in Batch-Kulturen	37
3.3.5	Wachstumsdokumentation	38
3.3.5.1	Probennahme	38
3.3.5.2	Chlorophyllabsorption	38
3.3.5.3	EPS-Bildung	39
3.3.5.3.1	Kritische Betrachtung der Methode	40
3.3.6	Abernten von Batch-Kulturen	41
3.3.7	Aufreinigung der Exopolysaccharide	42
3.3.8	Bezeichnung der Kultivierungsansätze und EPS	43
3.4	Polysaccharid-Analytik	44
3.4.1	Bestimmung der Zusammensetzung der Neutralzucker	44
3.4.1.1	Neutralzuckeranalyse mittels Acetylierungsanalyse	44
3.4.1.2	Synthese von Fukosamin Hydrochlorid	46
3.4.2	Elementaranalyse	46
3.4.3	Bestimmung des Acetatgehaltes	46
3.4.3.1	Kritische Betrachtung der Methode	47

3.4.4	Bestimmung des Pyruvatgehaltes.....	47
3.4.5	Bestimmung des Sulfatgehaltes.....	47
3.4.5.1	Konduktometrische Sulfatbestimmung	48
3.4.5.2	Berechnung des Sulfatgehaltes aus dem Schwefelgehalt	48
3.4.6	Bestimmung des Uronsäuregehaltes	48
3.5	Spektroskopische Methoden	49
3.5.1	IR-Spektroskopie	49
3.5.2	Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR).....	49
3.6	Partialhydrolytische Methoden	50
3.6.1	Oxalsäurehydrolyse	50
3.6.2	Alkalische Hydrolyse.....	50
3.7	Desulfatierung von EPS	51
3.7.1	Solvolyse	51
3.7.2	Desulfatierung mit Chlortrimethylsilan.....	52
3.8	Bindungstyp-Analyse	53
3.8.1	Methylierung mit Dimethylsulphanyl-Carbanionen-Aktivierung	54
3.8.2	Methylierung mit Natriumhydroxid-Aktivierung	57
3.8.2.1	Methylierung nach Ciucanu	57
3.8.2.2	Methylierung nach Kim.....	57
3.8.2.3	Methylierung mit NaOH-Brei.....	59
3.9	Protein-Analytik.....	61
3.9.1	Proteinquantifizierung	61
3.9.1.1	Berechnung des Proteingehaltes aus dem Stickstoffgehalt	61
3.9.1.2	Proteingehaltsbestimmung mit Coomassie Brilliantblau	61
3.9.1.3	Proteingehaltsbestimmung mit Folin-Ciocalteau-Reagenz.....	62
3.9.1.4	Proteingehaltsbestimmung mit Ninhydrin	62
3.9.2	Proteinzusammensetzung	64
3.9.2.1	Aminosäure-HPLC	64
3.10	Chromatographische Verfahren	65
3.10.1	Fraktionierung mit Ionenaustauschchromatographie.....	65
3.10.2	Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)	67
3.10.3	HPTLC.....	68
3.10.3.1	Aminosäure-HPTLC.....	68
3.10.3.2	Zucker-HPTLC.....	69
3.11	Biologische Aktivität	71
3.11.1	Testung auf antimikrobielle Aktivität.....	71
3.11.2	Testung der Komplementaktivität.....	71
3.11.3	Testung der Zytotoxizität.....	73

4	Ergebnisse <i>Synechocystis aquatilis</i>	74
4.1	Kultivierung.....	74
4.2	Polysaccharid-Analytik.....	85
4.2.1	Neutralzuckerzusammensetzung	85
4.2.2	Elementaranalyse	94
4.2.3	Acetatgehalt	94
4.2.4	Pyruvatgehalt	95
4.2.5	Sulfatgehalt	95
4.2.6	Uronsäuregehalt.....	97
4.3	Spektroskopische Methoden	98
4.3.1	IR-Spektroskopie.....	98
4.3.2	NMR-Spektroskopie	99
4.4	Partialhydrolytische Methoden.....	103
4.4.1	Oxalsäurehydrolyse	103
4.5	Desulfatierung	107
4.6	Bindungstyp-Analyse.....	116
4.6.1	Methylierungsanalyse.....	116
4.6.2	NMR.....	126
4.7	Protein-Analytik	127
4.8	Chromatographische Verfahren.....	128
4.8.1	Fraktionierung mittels IAC	128
4.8.2	GPC	132
4.8.3	HPTLC	134
4.9	Biologische Aktivität.....	137
4.9.1	Testung auf antimikrobielle Wirkung.....	137
4.9.2	Komplementaktivität	137
4.9.3	Testung der Zytotoxizität	140
5	Ergebnisse <i>Synechocystis pevalekii</i>	141
5.1	Kultivierung.....	141
5.2	Polysaccharid-Analytik.....	146
5.2.1	Neutralzuckerzusammensetzung	146
5.2.2	Elementaranalyse	149
5.2.3	Acetatgehalt	150
5.2.4	Pyruvatgehalt	150
5.2.5	Sulfatgehalt	150
5.2.6	Uronsäuregehalt.....	151
5.3	Spektroskopische Methoden	152
5.3.1	IR-Spektroskopie.....	152

5.4	Partialhydrolytische Methoden	153
5.4.1	Oxalsäurehydrolyse	153
5.4.2	Alkalische Hydrolyse.....	156
5.5	Bindungstyp-Analyse	157
5.6	Protein-Analytik.....	163
5.7	Chromatographische Verfahren	166
5.7.1	Fraktionierung mittels IAC.....	166
5.7.2	GPC.....	171
5.8	Biologische Aktivität	173
5.8.1	Testung auf antimikrobielle Wirkung	173
5.8.2	Komplementaktivität	173
5.8.3	Testung der Zytotoxizität.....	174
6	Diskussion	175
6.1	Kultivierung	175
6.2	Polysaccharid-Analytik	183
6.3	Spektroskopische Methoden	192
6.4	Partialhydrolytische Methoden	195
6.5	Desulfatierung.....	199
6.6	Bindungstyp-Analyse	201
6.7	Protein-Analytik.....	206
6.8	Chromatographische Verfahren	212
6.9	Biologische Aktivität	217
6.10	Ausblick	221
7	Zusammenfassung / Abstract	223
8	Literaturverzeichnis	226
9	Danksagung.....	241
10	Ehrenwörtliche Erklärung zu § 8 Absatz 1 der Promotionsordnung	242
11	Anhang	243
11.1	Synthesis of 2-amino-2,6-dideoxy-D-galactose hydrochloride (D-Fucosamine).....	243
11.2	Übersicht über die Zusammensetzung von cyanobakteriellen EPS.....	246

II. Abkürzungsverzeichnis

Ara	Arabinose
ATR	Abgeschwächte Totalreflektion, attenuated total reflection, IR-Technik
C	Kohlenstoff
CAUP	Culture Collection of Algae, Charles Universität Prag, Tschechische Republik
CCALA	Culture Collection of Autotrophic Organisms, Academy of Sciences of the Czech Republic, Třeboň
COSY	Correlated Spectroscopy, NMR-Korrelationsspektroskopie
CP	Komplementrezeptor
CTMS	Chlortrimethylsilan
Da	Dalton, Einheit des Molekulargewichtes und des hydrodynamischen Volumens
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisationstransfer, NMR-Technik
DNS	Desoxyribonukleinsäure, Erbinformation
DP	Degree of polymerization, Polymerisationsgrad
DS	Degree of sulfation, Sulfatierungsgrad
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Eigenfärbung
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay, enzymgekoppelte Immunadsorptions-Analyse
EPS	Exopolysaccharide
Fa.	Firma
FID	Flammenionisationsdetektor in der Gaschromatographie
Fuc	Fukose
FucN	Fukosamin
FucNAc	N-Acetyl-Fukosamin
Gal	Galaktose
GC	Gaschromatographie
Glc	Glukose
GlcN	Glukosamin
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
GPC	Gelpermeationschromatographie
H	Wasserstoff
HCl	Hydrochlorid, Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography, Hochleistungs Dünnschichtchromatographie
hV	hydrodynamisches Volumen in der Gelpermeationschromatographie
IAC	Ionenaustauschchromatographie
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
KD	Kultivierungsdauer
LPS	Lipopolysaccharid
MAA	Mycosporin-ähnliche Aminosäuren
MAK	Membranangriffskomplex
Man	Mannose
MBL	Mannose-bindendes Lektin
KDO	2-Keto-3-Desoxy-Oktonat
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Molecular weight, Molekulargewicht, molare Masse
MWCO	Molecular weight cut off, Molekülgrößen-(Ausschluss)-Grenze
N	Stickstoff

NaCl	Natriumchlorid
NL-DS N-10	Standardkultivierungsmedium
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernspinresonanzspektroskopie
PMAAs	Partiell methylierte Alditole
PMAAs	Partiell methylierte Alditol-Acetate
RD	Reaktionsdauer
Rf	Retentionsfaktor
Rha	Rhamnose
RPS	Released polysaccharides, abgegebene Polysaccharide
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung (g), nach DIN 58970-2
S	Schwefel
s	Standardabweichung
<i>S. aquatilis</i>	<i>Synechocystis aquatilis</i> Sauvageau SAG 90.79
SAG	Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen
<i>S. pevalekii</i>	<i>Synechocystis pevalekii</i> Ercegovic SAG 91.79
TFA	Trifluoressigsäure
WHO	World Health Organization
ZD	Zelldichte
\bar{x}	Mittelwert
Xyl	Xylose
Z1	Zentrifuge Sigma 3K30, Fa. Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Z2	Zentrifuge Sigma 6-16K, Fa. Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Z3	Zentrifuge Megafuge 1.0, Fa. Heraeus Sepatech, Hannover

1 Einleitung

1.1 Systematik

Cyanobakterien stellen eine wichtige Gruppe an Organismen dar, da sie an der Entwicklung der heutigen sauerstoffhaltigen Atmosphäre und durch Endosymbiose an der Entstehung der Chloroplasten und damit der Pflanzenwelt entscheidend beteiligt waren [Knoll, 2008]. Lange wurden Cyanobakterien, die vermutlich seit 3500 Millionen Jahren existieren, zu den Pflanzen gezählt und als Blau-Grüne Algen oder Blaualgen bezeichnet [Knoll, 2008; Muralitharan & Thajuddin, 2010; Bresinsky et al., 2008]. Ihr prokaryotischer Zellaufbau wurde aber erst in den 1970er Jahren entdeckt [Oren, 2010]. Heute wird den Cyanobakterien, nach vielen Jahren der Diskussion, ein gram-negativer Zellaufbau zugeordnet (1.2) [Stewart et al., 2006]. Seit wenigen Jahren unterliegen die Cyanobakterien endgültig auch dem „Bacteriological Code of Nomenclature“, was eine lange umstrittene Zuordnung ist [Muralitharan & Thajuddin, 2010; Oren, 2004; Oren 2010]. Es sind etwa 150 Gattungen bekannt, die circa 2000 Arten umfassen [Pulz & Gross, 2004]. In Anbetracht der hohen Diversität der sekundären Stoffwechselprodukte ist die angewandte Taxonomie aber sehr stark vereinfacht [Leão et al., 2012]. Die Stämme wurden ursprünglich anhand ihrer Morphologie in fünf Unterklassen eingeteilt [Rippka et al., 1979]. Nach dieser Systematik zählt *Synechocystis* zur Sektion 1 (einzellig, binäre Teilung oder Knospung). Die heutige systematische Einordnung nach Bresinsky et al. findet sich in Abbildung 1.1-1 [Bresinsky et al., 2008]. Unterschiedliche Literaturangaben existieren derzeit noch in der Ebene der Ordnungen.

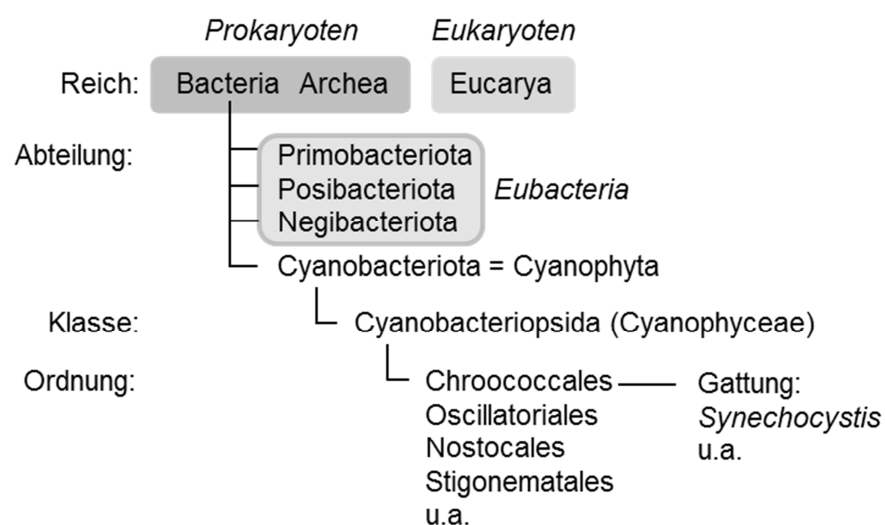


Abbildung 1.1-1: Systematische Einordnung der Gattung *Synechocystis* [Bresinsky et al., 2008].

1.2 Zytologie und Morphologie

Lange Zeit zählten die Cyanobakterien zu den Algen, daher die synonyme Bezeichnung Blau-Grünalgen oder Blaualgen [Bresinsky et al., 2008; Muralitharan & Thajuddin, 2010]. Im Gegensatz zu Algen haben Cyanobakterien allerdings einen prokaryotischen Zellaufbau. Das bedeutet, ihnen fehlen im Gegensatz zu eukaryotischen Algen Zellkern, Mitochondrien, Lysosomen, endoplasmatisches Retikulum, membranbegrenzte Chloroplasten und eine Zellsaftvakuole. Später wurde ihr Zellaufbau dem der gram-negativen Bakterien zugeordnet, da ihre äußere Abgrenzung aus einer Plasmamembran, einer Peptidoglykanschicht und einer äußeren Membran besteht [Hoiczky & Hansel, 2000]. Aber auch hierbei zeigen sich Unregelmäßigkeiten. Die Peptidoglykanschicht ist dicker und höher verzweigt als bei gram-negativen Bakterien. Anders als bei gram-positiven Bakterien enthält sie allerdings keine Teichonsäure. Die Zellwandpolysaccharide vegetativer Zellen, überwiegend 1,3-glykosidisch verknüpfte Glukose, Mannose und Galaktose, unterscheiden sich allerdings von den Polysacchariden der Zellwände von Akineten (Überdauerungszellen) und Heterocysten (stickstofffixierende Zellen) [Bertocchi et al., 1990; Bresinsky et al., 2008]. So findet sich Cellulose, der Hauptbaustein pflanzlicher Zellwände, nur in der Zellwand der Heterocysten [Bresinsky et al., 2008]. Die Lipopolysaccharide (LPS) unterscheiden sich von denen der gram-negativen Bakterien durch das Vorkommen von langen ungesättigten und Hydroxyfettsäureketten im Lipid A-Teil, das Fehlen von Phosphat und das teilweise Fehlen von Heptosen und 2-Keto-3-Desoxy-Oktonat (KDO) [Stewart et al., 2006]. Bereits 1979 beschrieben Šmarda et al. den Aufbau der Zellwand von *Synechocystis aquatilis* [Šmarda et al., 1979]. Die äußerste Abgrenzung wird dabei von einer schleimartigen Schicht gebildet, welche radiale schleimige Filamente enthält, die in tiefere Zellwandschichten reichen. Die äußerste Schicht bei mehreren Spezies wird als „S-Layer“ bezeichnet. Sie ist aus kugeligen Partikeln aus Glykoproteinen mit einem Durchmesser von 10 nm aufgebaut, die bei Aufsicht ein regelmäßiges hexagonales Gitter ergeben [Šmarda et al., 1979; Hoiczky & Hansel, 2000]. Extrazelluläre Polysaccharide werden generell in drei Gruppen anhand ihrer Lage eingeteilt [De Philippis & Vincenzini, 1998]. Die innerste Schicht ist die Schleimscheide. Sie bildet eine dünne, dichte Schicht, die Zellen oder kleinere Zellgruppen locker umgibt, und ist ohne Färbung im Lichtmikroskop sichtbar. Die zweite Schicht, die Kapsel, besteht aus einer dicken, schleimigen Schicht, welche eng mit der Zelloberfläche verbunden und nach außen scharf abgegrenzt ist. Sie schließt Partikel, beispielsweise Tusche, aus. Die dritte Schicht, die Schleim-Schicht, ist als diffuses Material ohne scharfe Abgrenzung oder Wiedergabe der Zellform um die Zellen angeordnet. Sowohl Kapselmaterial als auch Teile des Schleimes werden bei Suspensionskulturen ins Medium abgegeben und ergeben so die RPS (released polysaccharides, abgegebene Polysaccharide), welche in dieser und der überwiegenden Zahl anderer Arbeiten als EPS (Exopolysaccharide) bezeichnet werden. Filali Mouhim et al. sowie

De Philippis und Vincenzini betrachteten EPS überwiegend als Produkte des Primärstoffwechsels, seltener als Sekundärstoffwechselprodukte [Filali Mouhim et al., 1993; De Philippis & Vincenzini, 1998].

Der Zellaufbau der Cyanobakterien ist analog dem Zellaufbau anderer Prokaryoten organisiert [Bresinsky et al., 2008]. Die Thylakoide bei *Synechocystis* sp. PCC 6803 bilden aber ein von der Plasmamembran unabhängiges System unterschiedlich großer Kompartimente und unterscheiden sich so von anderen Prokaryoten [Liberton et al., 2006]. An den Thylakoiden ist das Assimilationspigment gebunden, welches hauptsächlich aus Chlorophyll a besteht [Bresinsky et al., 2008]. Zusätzlich sind verschiedene Carotinoide als akzessorische Pigmente vorhanden. Die Phycobiliproteine, ebenfalls Assimilationspigmente, sind in einzelnen Phycobilisomen den Thylakoiden aufgelagert. Die Endosymbiontenhypothese besagt, dass durch primäre Endosymbiose cyanobakterielle Zellen in Eukaryoten gelangten [Hoiczyk & Hansel, 2000; Keeling, 2004]. Nach Reduktion der Peptidoglykanschicht sowie anderer Zellbestandteile und Verkleinerung bzw. Einbau des Genoms in das Wirtsgenom entstanden die Plastiden (Chloroplasten). Von diesem Prozess zeugen auch die Cyanellen [Adams, 2000]. Diese sind wie Chloroplasten durch Endosymbiose entstanden, besitzen aber noch ein größeres Genom und eine Peptidoglykanschicht.

Zwischen den Thylakoiden wird Cyanophyceenstärke, dem Glykogen ähnlich, als ein Reservestoff gelagert [Bresinsky et al., 2008]. Ebenfalls eine Speicherfunktion und zusätzlich eine Beteiligung an der Energiegewinnung haben die Volutinkörner, Agglomerate aus Polyphosphatketten. Als weiterer Reservestoff wird Cyanophycin (Arginin-Asparagin-Polymere) in eigenen Körperchen gespeichert. Sie erfüllen neben der direkten Aminosäurespeicherung auch die Funktion eines schnellen Stickstofflieferanten. Unter Stickstoffmangel werden von einigen Stämmen zusätzlich Heterocysten gebildet. Dies sind morphologisch andersartige Zellen, die eine dicke Zellwand besitzen. In ihnen herrscht ein absolut anaerober Zustand, da ein wichtiges Enzym, die Nitrogenase, sehr sauerstoffempfindlich ist. Mit Hilfe dieses Enzyms kann N_2 aus der Umgebung in Ammonium umgewandelt werden und den Nachbarzellen über Kanäle als Stickstoffquelle zur Verfügung gestellt werden. Zusätzlich verfügen manche Arten über Gasvakuolen, die nur für die aktive Bewegung genutzt werden, um eine möglichst lichtintensive Lage an der Wasseroberfläche zu ermöglichen [Walsby, 1994]. Insgesamt verfügen die Cyanobakterien über optimale adaptive Mechanismen, um sich im Überlebenskampf zu behaupten. Dies hat den Vorteil, dass sie auch unter nicht optimalen Kultivierungsbedingungen wachsen [van den Hoek, 1978].

Die Vermehrung von Cyanobakterien geschieht ungeschlechtlich über Zellteilung. Dabei kommt es unter Durchschnürung des Centriplasmas teilweise zur Bildung von Endo- und Exosporen. Wachsen die Tochterzellen nicht auf die vollständige Größe heran, spricht man von Nanocyten. Die Ordnung der Chroococcales, zu der auch die Gattung *Synechocystis* gehört, besteht aus

Einzelzellen oder einfachen Coenobien [Bresinsky et al., 2008]. Cyanobakterien können einzellig, in Gruppen oder filamentös auftreten [Whitton & Potts, 2000]. Verzweigungen können dabei echt oder unecht sein. Echte Verzweigungen entstehen durch eine Zellteilung in mehr als einer Ebene, wo hingegen es sich bei unechten Verzweigungen um zwei eigenständige noch zusammenhängende Filamente handelt.

Synechocystis Spezies sind einzellig, photoautotroph, fakultativ Glukose-heterotroph, alkalitolerant (pH 6,5-8,0 bis sogar 4,5-10,5), halotolerant (0-10% Natriumchlorid) und lichttolerant [Grant & Tindall, 1986; Reed, 1986; Bano & Siddiqui, 2004; Martin et al., 2006; Nagle et al., 2010, Dudkowiak et al., 2011; Martinez et al., 2012]. *Synechocystis* sp. stellt eine dominierende Cyanobakterien-Gattung in Alkali-Salz-Seen (alkaline soda lakes oder natron lakes) dar, sodass diese Gattung auch alkaliphile Arten enthält [Grant & Tindall, 1986]. Cyanobakterien verfügen dabei über einen Natrium-Ionen gestützten Pumpenmechanismus zur Aufrechterhaltung des neutralen cytosolischen pHs [Pawlik-Skowronska et al., 1997; Pomati et al., 2004]. Durch den Vorgang der Kalzifizierung erreichen Cyanobakterien auch im alkalischen Milieu eine Generierung von Protonen. Protonen wiederum werden besonders zur leichteren Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff durch Umwandlung von Karbonat in CO₂ benötigt [McConnaughey & Whelan, 1997]. Ein alkalischer pH-Wert in Seen geht meist mit einer niedrigen Kalziumionenkonzentration, aber einer hohen Natriumchloridkonzentration einher [Grant & Tindall, 1986; Arp et al., 1999]. Cyanobakterien verfügen daher über Mechanismen zum Schutz vor ionischem und nicht-ionischem osmotischem Stress. *Synechocystis* sp. PCC 6803 beispielsweise reagiert dabei auf Salzstress mit einer Induktion der Bildung von Glukosylglycerol, wohingegen nichtionischer osmotischer Stress nur durch die Aufnahme von Sorbitol und andere niedermolekulare Substanzen ausgeglichen werden kann [Martin et al., 2006]. Diese Substanzen halten den Turgor der Zellen aufrecht, schützen Enzyme und scheinen partiell die fehlende Hydratisierung auszugleichen, die durch das reduzierte Wasserpotential durch Bindung von Wassermolekülen an Natriumionen verursacht wird [Reed, 1986]. Allgemein können halophile Organismen mit höheren intrazellulären Natriumkonzentrationen leben, da, unter anderem, eine Adaption der Enzyme besteht. Um aber auch diese höhere Natriumkonzentration zu stabilisieren, verfügen diese Organismen über Natrium-Efflux-Systeme. Verbunden damit akkumulieren einige Organismen bevorzugt Kaliumionen statt Natriumionen, da K⁺ eine geringere Toxizität aufweist. Aufgrund dieser vielfältigen Umgebungsvarianten der Cyanobakterien sind sie ubiquitär zu finden [Li et al., 2001]. So sind sie in Frischwasser und Meerwasser ebenso vorhanden wie auf Stein und in oberen Bereichen der Erdoberfläche. Cyanobakterien leben in allen Klimazonen von polaren bis tropischen Regionen sowie in Wüsten.

1.3 Cyanobakterielle Stoffwechselprodukte

Für Cyanobakterien sind mehr als 300 stickstoffhaltige Sekundärstoffwechselprodukte bekannt [Uzair et al. 2012]. Davon werden 128 zu der Stoffklasse der Alkaloide gezählt. Für die Ordnung Chroococcales, zu der auch die Gattung *Synechocystis* gehört, sind mindestens 36 Substanzen mit biologischer Aktivität bekannt, welche unter anderem bestimmte Enzyme inhibieren, als Zytotoxine und Tumorpromotoren, endotoxisch und hepatotoxisch wirken sowie die Zelldifferenzierung beeinflussen können [Burja et al., 2001].

Cyanobakterien sind, abgesehen von einem fakultativ-heterotrophen Wachstum, auf Sonnenlicht angewiesen, um Photosynthese betreiben zu können. Aber auch eine übermäßige Bestrahlung, speziell mit ultraviolettem Licht, hat negative Einflüsse auf Cyanobakterien [Leão et al., 2012]. Aus diesem Grunde können sie neben Mechanismen wie Expositionsvermeidung, zellulärer Reparatur oder antioxidativen Mechanismen auch UV-absorbierende Substanzen bilden und sekretieren (siehe auch 1.4.1). Dabei handelt es sich um Mycosporine und Mycosporin-ähnliche Aminosäuren (MAA), welche beide auf denselben Grundstrukturen basieren, sowie Scytonemin. Während Mycosporin und MAAs ihren Wirkort im Zellinneren haben und dort noch mehr Funktionen als den Sonnenschutz ausüben, wird Scytonemin in die extrazellulären Polysaccharide eingelagert. Über diese Substanzen hinaus bilden Cyanobakterien Stoffwechselprodukte, die eine Reihe von Abwehrfunktionen übernehmen. Dabei sind die Abwehr von Fraßfeinden und Konkurrenten sowie die Funktion der Allelopathie zu nennen. Diese Aufgaben werden, um nur ein Beispiel zu nennen, von Substanzen der Gruppe der Malyngolide übernommen. Einen Vorteil im Kampf um seltene Nährstoffe, besonders Eisen und Phosphat, erreichen Cyanobakterien durch Synthese und Sekretion von Liganden dieser Nährstoffe. Hierbei sind es besonders Substanzen der Gruppe der Siderophore. Außer Substanzen zur Abwehr oder Ernährung bilden Cyanobakterien auch Signalstoffe wie unter anderem N-Acetyl-Homoserinlaktone.

Die bekannteste Gruppe an Stoffwechselprodukten sind aber die Cyanotoxine. Diese spielen besonders während cyanobakterieller Blüten eine wichtige Rolle. Diese Blüten entstehen durch eine übermäßige Vermehrung bei hohen Temperaturen und einem niedrigen Nitrat-Phosphat-Verhältnis [Valério et al., 2010]. Es ist allerdings nicht ausschließlich der direkte Kontakt zwischen Säugetieren und einem Toxin, der schädigend wirken kann, sondern auch die Aufnahme über die Nahrungskette durch Akkumulation in Fischen, Schalentieren oder Muscheln ist möglich [Mulvenna et al., 2012]. Dabei sind besonders die Hepatotoxine dominierend, zu denen die Substanzgruppe der Microcystine, mit mehr als 80 Strukturen, und Nodularin gehören [Valério et al., 2010]. Diese Hepatotoxine sind zyklische Peptide. Microcystine erzeugen durch Leberzell-Apoptose eine akute Toxizität sowie durch Genomschäden eine chronische karzinogene Wirkung. Bedingt durch die Toxizität, speziell die

Leberschädigung, legte die World Health Organization (WHO) eine Leitlinie zu diesem Thema vor und empfahl eine maximale Microcystin-LR Konzentration von 1 µg/l im Trinkwasser [WHO, 1998]. Weitere Cyanotoxine, hierbei besonders das Cylindrospermopsin, attackieren neben der Leber auch die Nieren, das Herz und die Thymus-Drüse [Valério et al., 2010]. Cylindrospermopsin, ein Alkaloid, inhibiert hauptsächlich die Proteinbiosynthese, bindet aber auch kovalent an DNS und erzeugt so vermutlich auch mutagene Schäden. Ebenfalls zu den Alkaloiden zählen die Neurotoxine Anatoxin-a und Homoanatoxin-a. Diese erzeugen, wie viele cyanobakterielle Neurotoxine, eine besonders starke akute Toxizität durch die irreversible Bindung an muskuläre und neuronale nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren mit agonistischer Wirkung. Anatoxin-a(s) hingegen, ein Organophosphat, wirkt als irreversibler Acetylcholinesterase-Hemmstoff. Auf eine andere Art wirken die Substanzen aus der Gruppe der Saxitoxine neurotoxisch. Diese trizyklischen Alkaloide blockieren Natrium- und Kalziumkanäle von Herzmuskel- und Nervenzellen. Aufgrund ihrer extremen Toxizität wurden die Saxitoxine in den Anhang I des „Übereinkommens über das Verbot chemischer Waffen“ (aktuellste Fassung vom 31. Januar 1994) aufgenommen. Eine weitere toxische Substanzklasse, die Lipopeptide, wurden besonders bei der Art *Lyngbya majuscula* gefunden. Die Gattung *Lyngbya* zählt zu den giftigsten unter den Cyanobakterien [Singh et al., 2005]. Von besonderem Interesse sind die Stoffwechselprodukte Jamaicamide, Antillatoxin und Kalkitoxin (drei Hemmstoffe von Natriumkanälen) sowie Curacin A, welches den Aufbau von Mikrotubuli hemmt [Valério et al., 2010]. Auch cyanobakterielle Lipopolysaccharide (LPS), wenn auch von etwas anderem Aufbau als bei gram-negativen Bakterien (1.2), können als Toxine angesehen werden, wobei diese Einordnung noch umstritten ist [Stewart et al., 2006]. Generell scheinen sie von geringerer Toxizität als die anderer gram-negativer Bakterien zu sein.

Es gibt aber noch weitere Sekundärstoffwechselprodukte, die aufgrund völlig neuer Wirkmechanismen oder einer vielversprechenden pharmazeutischen Nutzung von besonderem Interesse sind [Singh et al., 2005; Montaser & Luesch, 2011]. Diese unterschiedlichen Substanzen zeichnen sich durch antivirale, antitumorale und antifungale Wirkungen aus. Der erfolgversprechendste Vertreter ist derzeit Soblitodin (Auristatin PE) mit Anwendung in der Onkologie [Cragg et al., 2012; Montaser & Luesch, 2011]. Es handelt sich hierbei um ein synthetisches Peptid nach dem Vorbild des cyanobakteriellen Peptids Dolastatin, welches an verschiedene monoklonale Antikörper gebunden wurde. Die verschiedenen Formen befinden sich in unterschiedlichen Stadien der Prüfung von der präklinischen Phase bis zur Phase II/III.

Aber auch die cyanobakteriellen Farbstoffe wie β -Carotin, Astaxanthin, C-Phycocyanin, zu den Phycobiliproteinen gehörend, und andere haben einen human-physiologischen Nutzen, da sie antioxidativ, antiinflammatorisch und zum Teil gegen Tumorzellen wirken [Stengel et al., 2011]. Häufig werden heute Carotinoide und Phycobiliproteine als Nahrungsmittelfarbstoff, Futterzusatz (z.B. zur Farbintensivierung von Eidotter) und in der Kosmetikindustrie eingesetzt

[Uzair et al., 2012]. Ihre eigentliche Aufgabe liegt aber in der Beteiligung an der Photosynthese (1.2). Einige Cyanobakterien sind zusätzlich reich an Vitaminen der B-Gruppe und Vitamin E, wodurch sie von Interesse für die großindustrielle Gewinnung dieser Wirkstoffe sind. So zeichnet sich *Arthrospira platensis* durch einen hohen Vitamin B₁₂-Gehalt aus, der höher ist als bei Pflanzen oder Tieren [Gantar & Svirčev, 2008]. Außerdem ist der Anteil an Vitamin E, Vitamin B₁ und Biotin höher als in Grünalgen, Spinat oder Leber. Viele Cyanobakterien enthalten einen hohen Anteil von Lipiden mit 20-50% [Brennan & Owende, 2010]. Davon besteht ein höherer Anteil aus einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren [Deshnium et al., 2000]. Besonders erwähnenswert ist darüber hinaus der hohe Gehalt an γ -Linolensäure, speziell in *Arthrospira platensis*, der Grundlage von Spirulina [Habib et al., 2008]. Hervorzuheben ist auch der hohe Proteinanteil in Spirulina mit 55-70%; in den Proteinen sind alle essentiellen Aminosäuren enthalten. Cyanobakterien, z. B. in Form von Spirulina, haben als Nahrungsquelle eine Jahrhunderte alte Tradition in Südamerika, Afrika und Asien, die auch heute noch Bestand hat [Gantar & Svirčev, 2008]. Aufgrund ihrer vielfältigen positiven Inhaltsstoffe (Lipide, Proteine, Farbstoffe und Vitamine) werden Cyanobakterien immer häufiger als Nahrungsergänzungsmittel oder „functional food“ angeboten, auch wenn der wissenschaftliche Nachweis eines positiven Einflusses auf die Gesundheit noch nicht erfolgreich erbracht wurde [Gantar & Svirčev, 2008]. Immer häufiger geraten Produkte in die Kritik, da unhaltbare Gesundheitsversprechen („health claims“) verwendet oder Cyanotoxine nachgewiesen werden. So wurden bisher Microcystin und Anatoxin-a in einigen Produkten nachgewiesen [Eisenbrand, 2008; Rellán et al., 2009; Liu & Scott, 2012]. Diese Belastungen der Produkte werden besonders durch eine Kontamination mit anderen Stämmen als dem Deklarierten verursacht [Rellán et al., 2009]. So wird die Biomasse von *Aphanizomenon flos-aqua* (für „AFA-Produkte“) aus Wildsammlungen aus einem US-amerikanischen See bei Algenblüte gewonnen und ist demnach besonders anfällig dafür. Nur eine gute Qualitätskontrolle kann hier den Endverbraucher vor gesundheitlichen Schäden schützen.

In einem völlig anderen Anwendungsbereich finden sich die Stoffwechselprodukte Isopren und Polyhydroxyalkanoate (PHA) bzw. Poly- β -Hydroxybutyrat (PHB) wieder. Diese können als Grundstoffe für Gummi und abbaubaren Kunststoff verwendet werden und bieten so eine alternative zu Erdölprodukten [Panda et al. 2006; Ducat et al., 2011].

Bedingt durch den steigenden Energieverbrauch der Weltbevölkerung und knapper werdenden Rohstoffen für die Energiegewinnung wird fieberhaft nach neuen Energiequellen gesucht. Die bisher genutzten Ausgangsstoffe für Bioethanol und Biodiesel (Getreide, Zuckerrohr, Sojabohnen, Palmöl und Ölsaaten) können den Bedarf allerdings nicht dauerhaft und vollständig decken [Jones & Mayfield, 2012]. Cyanobakterien könnten ebenfalls, häufig nach molekularbiologischer Genomveränderung, in der Produktion von Biodiesel, Bioethanol, Biogas und Biowasserstoff eingesetzt werden. Sie bieten eine gute Alternative, welche allerdings

neben der recht kurzen Forschungshistorie noch andere Nachteile, aber auch Vorteile aufweisen [Rosgaard et al., 2012; Ducat et al., 2011; Machado & Atsumi, 2012]. Ein eindeutiger Vorteil, auch im Hinblick auf steigende Bevölkerungszahlen, ist, dass Cyanobakterien nicht als Grundnahrungsmittel dienen und so die Energiegewinnung nicht in Konkurrenz zur Nahrungsgewinnung steht. Allerdings benötigt die Kultivierung noch große Mengen Wasser, eine begrenzte Ressource. Der Wasserbedarf kann allerdings durch neue Designs von Bioreaktoren gesenkt werden. Von Vorteil ist ebenfalls die Kultivierbarkeit unter für andere Organismen unwirtlichen Umständen durch thermo- und kryophile, halotolerante und alkaliphile Stämme. Dadurch ist eine einfachere axenische Kultivierung an Orten möglich, die nicht in Konkurrenz zum Ackerbau stehen. Bisher ist die Gewinnung von Energieträgern und kostbaren Stoffwechselprodukten noch deutlich kostenintensiver als die herkömmlichen Produktionen. Allerdings sprechen die photoautotrophe Kultivierung (ohne teure zucker- und kohlenstoffhaltige Medien) und die einfache Gewinnung einiger Produkte durch Sekretion in das Medium für eine zukunftsweisende Technologie. Bisher konnten bereits mehrere interessante Substanzen mittels Cyanobakterien gewonnen werden:

- Fettalkohol, Ethanol, Isobutanol und 1-Butanol für Biosprit,
- Mannitol, Hexosen und Cellulose als Grundstoffe und für die Fermentation zu Bioethanol,
- Fettsäuren für Biodiesel und als Alternative zur Petroleum-Industrie,
- Isopren, Milchsäure und Ethylen als Grundstoffe für die chemische Synthese u.a. von Kunststoffen und Gummi.

Bedingt durch die noch junge Forschung ist das Wissen über die biologischen Grundlagen, die molekularbiologische Modifizierbarkeit und die effiziente Nutzung von Cyanobakterien noch gering. Somit kann eine Kostenreduktion durch Erhöhung von Ausbeuten und Optimierung von Prozessen sowie eine Entwicklung weiterer Einsatzgebiete von primären und sekundären Stoffwechselprodukten gelingen.

1.4 Cyanobakterielle Exopolysaccharide

1.4.1 Funktion cyanobakterieller Exopolysaccharide

Die grundlegendsten Funktionen der EPS sind der Schutz der Zellen vor schädlichen Umwelteinflüssen als Überlebensvorteil. Zum einen ist es der Schutz der Quellschicht vor Austrocknung, der den Cyanobakterien die biologische Nische eines trockenen Standortes zugänglich macht [Pereira et al., 2009]. Dabei regulieren EPS die Wasseraufnahme sowie -abgabe und stabilisieren die Zellmembran. Zum anderen schützen EPS-Schichten vor Infektionen (Viren) und immunologischen Angriffen (Phagozytose, Antikörper-Reaktion, Lyse) [Pereira et al., 2009]. Für Bakterien im Allgemeinen wurden Kapsel-EPS eine Schutzfunktion gegenüber verdauenden Enzymen zugesprochen, wo hingegen Schleim-EPS besonders gut verdaut werden und als Nahrungsquelle für andere Organismen dienen können [Decho & Lopez, 1993]. Zusätzlich ermöglichen EPS die Anhaftung der Bakterien an wasserumspülte Oberflächen und ermöglichen so den Zugang zu einer weiteren biologischen Nische [Pereira et al., 2009; Ozturk & Aslim, 2009]. Dabei scheint die Quervernetzung der EPS über zweiwertige Ionen oder multivalente Lektine die nötige Stabilität, aber auch Hydrophobizität zu verleihen [Higgins & Novak, 1997; Li et al., 2001]. Aber auch die Anhaftung an Symbiosepartner über die EPS, speziell beeinflusst durch enthaltene Proteine, wurde beschrieben [De Philippis & Vincenzini, 1998]. Die EPS ermöglichen die Bildung von Biofilmen und mikrobiellen Matten [Klock et al., 2007]. Die Interaktion negativ geladener EPS mit Metallionen ermöglicht zum einen die Anreicherung von seltenen Nährstoffen und vermeidet zum anderen den direkten Kontakt zwischen einer Zelle und ihrer Umgebung mit toxischen Metallkonzentrationen [Pereira et al., 2009]. So kann es stammabhängig zu einer erhöhten EPS-Bildung in Situationen geringer Nährstoffkonzentration oder erhöhter Toxinkonzentration kommen [De Philippis et al., 1991; De Philippis et al., 1993; Ozturk et al., 2010]. Zusätzlich spielt die Bildung von Chelatkomplexen mit Eisen und Kalzium eine wichtige Rolle bei der Fixierung von Stickstoff [De Philippis & Vincenzini, 1998; Otero & Vincenzini, 2003]. Einen Schutz vor dem destruktiven Einfluss von Sauerstoff auf Nitrogenasen und damit auf die Fixierung atmosphärischen Stickstoffs haben EPS ebenfalls (siehe auch 1.2) [Pereira et al., 2009]. Des Weiteren schützen in EPS eingelagerte Stoffwechselprodukte vor übermäßiger UV-Exposition (siehe auch 1.3) und einer damit einhergehenden Reduktion von Wachstum, Photosyntheserate und Stickstofffixierung [Suresh Babu et al., 1998]. Nicht zuletzt können EPS auch als Überschussprodukt der Zellen gesehen werden, mit dem ein Zuviel an Kohlenstoff aus dem Zellinneren entfernt werden soll, wenn aufgrund von Stickstoffmangel assimiliertes Kohlenstoff nicht in Aminosäuren, sondern nur in Monosaccharide umgewandelt werden kann [De Philippis & Vincenzini, 1998]. Alle Funktionen werden in ihren unterschiedlichsten Ausprägungen durch die Balance aus

Hydrophilie (Hydroxylgruppen und Ladungsträger) und Lipophilie (Proteinanteile, Methylierungen, Acylierungen und Desoxyzucker) geprägt. Die Lipophilie der EPS verbessert die Quellfähigkeit, Schleimstabilität und Adhäsionskraft, aber auch andere Kräfte wie Londonsche Dispersionswechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen erzeugen die EPS-Stabilität [De Philippis & Vincenzini, 1998; Mayer et al., 1999]. Ein weiterer stabilisierender Effekt wird durch die Selbst-Orientierung der EPS in Doppelhelices bis zu flüssigkristallinen Gelen erreicht [Okajima et al., 2009]. Die einzelnen Doppelhelix-Stränge können dabei durch zweiwertige Ionen ein stabiles Netzwerk über ihre negativen Ladungen ausbilden [Williams, 2009].

EPS haben aber nicht nur einen Vorteil für den jeweiligen produzierenden Organismus, sondern spielen auch im Ökosystem eine entscheidende Rolle. So sind cyanobakterielle EPS entscheidende Bestandteile der biologischen Bodenkruste (biological soil crust), die besonders die Erdoberfläche arider und semiarider Gegenden prägt [Rossi et al., 2012]. Die EPS beeinflussen und stabilisieren dabei die Wasserspeicherung sowie die Struktur und bestimmen die optimale Funktion dieses Umfeldes mit. Mit diesem stabilisierenden Effekt haben sie Anteil am Erosionsschutz des Bodens [Hu et al., 2003]. Zusätzlich sind EPS und damit einhergehende Biofilme an der Kalzifizierung, der Ablagerung von CaCO_3 , und Bildung von Stromatholiten beteiligt [Arp et al., 1999]. Ein weiteres, u.a. durch EPS gebildetes Element sind die transparenten exopolymeren Partikel (TEP, transparent exopolymeric particles) [Berman-Frank et al., 2007]. Diese TEP haben eine geringere Dichte als ihre wässrige Umgebung und sind so an der Kohlenstoffrückführung und am vertikalen Nährstofffluss, auf- sowie abwärts, in aquatischen Lebensräumen beteiligt. Die TEP sind Bestandteil des partikulären organischen Kohlenstoff Pools (POC, particulate organic carbon) und entstehen durch das Absterben von Cyanobakterien und besonders ausgeprägt bei dem Untergang cyanobakterieller Blüten.

Funktionen in der industriellen Nutzung cyanobakterieller EPS sind in drei Bereichen zu sehen [Pereira et al., 2009]. Zunächst ist es die Beeinflussung von Fließeigenschaften und Viskositäten von Flüssigkeiten, die einen Einsatz als Dickungsmittel, Suspensionsstabilisatoren und Emulgatoren in der Nahrungsmittel-, Kosmetik-, Textil- und Farbenindustrie möglich macht. Dabei sind die hydrophoben Eigenschaften von EPS ausschlaggebend für emulgierende und rheologische Eigenschaften. Es handelt sich um ein pseudoplastisches Fließverhalten, welches die meisten EPS charakterisiert [De Philippis et al., 1991]. Die physiologische Eigenschaft des Schutzes vor Austrocknung macht zusätzlich einen Einsatz als Feuchthaltemittel möglich [Otero & Vincenzini, 2003]. Aber auch ein Einsatz in der pharmazeutischen Branche aufgrund biologischer Aktivitäten ist denkbar (siehe auch 1.3) [Pereira et al., 2009]. Zusätzlich könnten EPS als technologischer Hilfsstoff zur Verkapselung eingesetzt werden, denn De Philippis et al. berichteten von der Bildung von Gelspherulen nach dem Eintropfen von 1% EPS-Lösung in 0,05 molare FeCl_3 oder CuCl_2 Lösung [De Philippis et al., 1993]. Die Fähigkeit der Metall- und

Ionenbindung allerdings macht einen Einsatz in der Wasser- und Bodenaufbereitung am wahrscheinlichsten, da die anderen Märkte bereits mit gut bekannten und rechtlich zugelassenen Hilfsstoffen, wie Xanthan aus dem gram-negativen Bakterium *Xanthomonas campestris*, gesättigt sind [Sutherland, 2001; Pereira et al., 2009; De Philippis et al., 2011]. Zusätzlich sind cyanobakterielle Produkte derzeit noch teurer und eine Akzeptanz ist schwerer erreichbar.

1.4.2 Zusammensetzung cyanobakterieller Exopolysaccharide

Im Allgemeinen sind mit EPS die abgegebenen Polysaccharide aus Kapsel- und Schleim-Schichten gemeint, die so genannten RPS (siehe 1.2). Die Heteropolysaccharide der EPS von Cyanobakterien zeugen von einem komplexen Aufbau, wobei etwa 75% der EPS aus mehr als sechs Monosacchariden bestehen [Pereira et al., 2009]. Im Vergleich dazu bestehen EPS anderer Bakterien oder von Makroalgen oft aus weniger als vier Zuckerbausteinen. Cyanobakterien nutzen bis zu zwölf verschiedene Monosaccharide. Dabei ist in etwa 90% der Fälle Glukose enthalten [De Philippis & Vincenzini, 1998]. Häufig stellt Glukose den Hauptzucker, aber auch Arabinose, Galaktose und Fukose sind möglich. Seltener wurde von methylierten Zuckern und Aminozuckern berichtet. Bei den Aminozuckern sind N-Acetyl-Glukosamin und –Galaktosamin bekannt [De Philippis et al., 2001]. Die Zusammensetzung der EPS kann allerdings aufgrund von Alter einer Zellkultur oder veränderten Umgebungsbedingungen variieren [Pereira et al., 2009]. Die strukturelle Aufklärung der EPS gestaltet sich aufgrund der großen Zahl an Monosacchariden als schwierig. In wenigen Fällen wurden dennoch Strukturmodelle erstellt. Die Untereinheiten der Polysaccharide bestanden dabei aus 3 bis 15 Monomeren.

Die EPS von Cyanobakterien haben als Alleinstellungsmerkmal Uronsäuren und Sulfatgruppen verglichen mit anderen mikrobiellen EPS, welche häufig stark acyliert sind [Sutherland, 2001; Pereira et al., 2009]. Speziell die Sulfatierung der EPS ist eine Eigenschaft, die besonders von eukaryotischen Lebewesen und Archaeobakterien bekannt ist. Diese Fähigkeit zur Sulfatierung wird als Indiz für die evolutionäre Zwischenstellung der Cyanobakterien zwischen Prokaryoten und photosynthetischen Eukaryoten gesehen [Bertocchi et al., 1990]. Cyanobakterielle EPS zeichnen sich durch ihren amphiphilen Charakter aus. Zum einen treten häufig negative Ladungen und zum anderen die hydrophoben Eigenschaften durch Acetylgruppen und Desoxyzucker auf (Funktion siehe 1.4.1). Viele EPS beinhalten zusätzlich einen Proteinanteil als wichtigen Bestandteil zur Erhöhung der Lipophilie. Dabei enthalten EPS einer Kapsel oder einer EPS-Schleimscheide einen höheren Proteinanteil als Schleim-EPS [Plude et al., 1991; Decho & Lopez, 1993]. Mit diesen unterschiedlichen Eigenschaften und der Vielzahl an Hydroxylfunktionen der Zucker kann die Bindung an die Zelloberfläche erklärt werden. Die

Bindung kann dabei über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen sowie kovalente Bindungen über Phospholipidanker erfolgen [Klock et al., 2007].

Die Zusammensetzung von Zellwand-Polysacchariden ist nicht mit der von EPS übereinstimmend, wodurch sich die Frage nach selektiven Exkretionsmechanismen stellte [Bertocchi et al., 1990]. Durch den komplexen Aufbau der EPS ist eine Vielzahl von Glykosyltransferasen an der Bildung beteiligt [Pereira et al., 2009]. In der Übersichtsarbeit von Pereira et al. ist die bisher bekannte Synthese von EPS zusammengefasst (Abbildung 1.4-1).

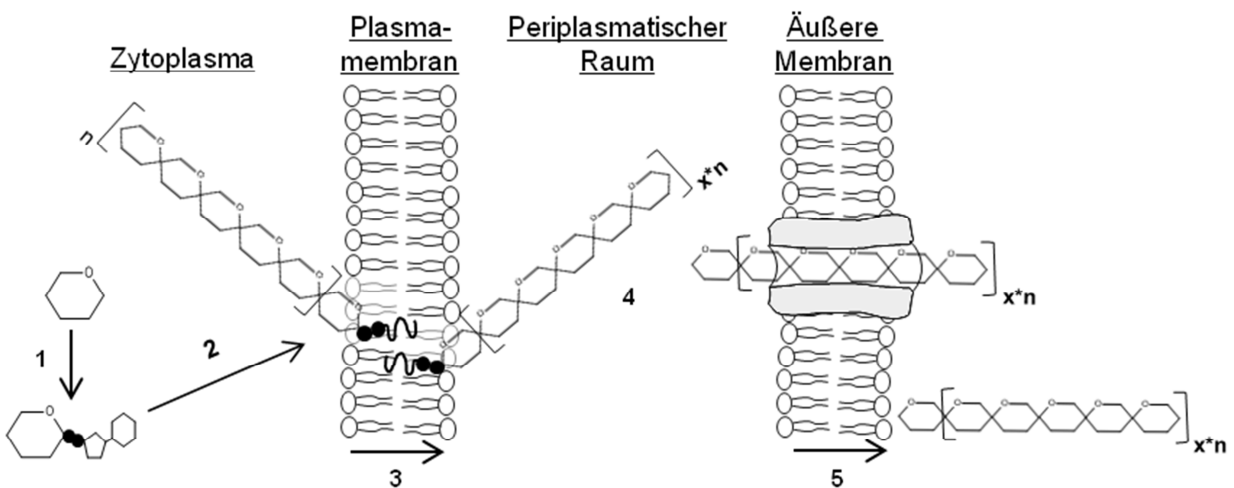


Abbildung 1.4-1: Syntheseweg von EPS nach [Pereira et al., 2009].

- 1: Zuckeraktivierende /-modifizierende Enzyme bilden Zuckernukleotide;
- 2: Glykosyltransferasen übertragen Monosaccharide auf einen Lipidanker;
- 3: Flipping der Oligosaccharide in den periplasmatischen Raum;
- 4: Polymerisation der Oligosaccharide;
- 5: Transport durch die äußere Membran.

1.4.3 Einfluss der Kultivierung auf Cyanobakterien und EPS-Bildung

Cyanobakterien benötigen wie alle Organismen Wasser, Luft und verschiedenste Nährstoffe sowie, im Falle von photosynthetisch aktiven Organismen, Licht. Dabei sind Licht und Luft allerdings nicht für jeden Cyanobakterien-Stamm essentiell. Einige Arten können auch ohne Licht unter Zusatz organischen Substrates wachsen, andere wachsen auch anaerob, sofern Sulfid als Elektronendonator vorhanden ist [De Philippis & Vincenzini, 1998].

Der Einfluss von Stickstoff

Zu den essentiellen Nährstoffen zählen neben anorganischen Massenelementen wie Kalium, Magnesium oder Kalzium auch Spurenelemente, Vitamine und Kohlenstoffquellen. Dabei kann es innerhalb der vielen Cyanobakterien-Stämme zu großen Unterschieden in der Empfindlichkeit kommen. Besonders erwähnenswert ist der Einfluss von Stickstoff. Dabei ist nicht nur die Stickstoffquelle ausschlaggebend, sondern auch das C:N-Verhältnis [Pereira et al., 2009]. Der Vorteil im Zusatz von Kaliumnitrat als Stickstoffkomponente im Kulturmedium gegenüber der Stickstofffixierung durch Cyanobakterien-Stämme liegt in der Konstanthaltung des pH-Wertes durch die Entstehung von Kaliumhydroxid: $\text{NO}_3^- + 2 \text{H}_2\text{O} + 8 \text{e}^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2 \text{OH}^-$ [Fischer, 1996; Ducat et al., 2011]. Bei der Fixierung von atmosphärischem Stickstoff kommt es zu einem Absinken des pH-Wertes in saure Bereiche und damit zu ungünstigeren Umgebungsbedingungen für Cyanobakterien. Ein Nachteil des konstanten alkalischen Milieus ist allerdings eine schlechtere Verwertbarkeit von Kohlenstoff aus CO_2 [Otero & Vincenzini, 2003]. Generell ist die Abhängigkeit der EPS-Bildung vom Nitratangebot - Konzentration und Art (N_2 , Nitrat- oder Ammoniumsalze) - sehr heterogen und kann von Stamm zu Stamm variieren [Pereira et al., 2009].

Der Einfluss von Phosphat und Sulfat

Ein ebenfalls großer Einfluss auf das Zellwachstum geht vom Phosphatanteil aus [Pereira et al., 2009]. Fischer und Su et al. zeigten, dass es bei stickstofffreien Nährlösungen der Dikaliumphosphatgehalt kaum einen Einfluss auf die EPS, wohl aber auf die Biomassekonzentration hat, während es bei stickstoffhaltigen Medien zu einer Verringerung der EPS-Bildung mit zunehmender Phosphatkonzentration kommt [Su et al., 2007]. Im Hinblick auf einen hohen Phosphatverbrauch unter hoher Photosyntheserate und Biomassebildung plädierten auch Kim et al. für einen hohen Phosphatanteil [Kim et al., 2010]. Generell scheint es ein Zusammenspiel zwischen Phosphat, Sulfat und Nitrat zu sein, welches die EPS-Bildung beeinflusst [Pereira et al., 2009]. Sulfat, allein betrachtet, scheint einen Einfluss auf die Zellmorphologie zu haben.

Salz und andere Komponenten

Ein Problem ist die Zugabe von Mediumkomponenten natürlichen Ursprungs. So enthält das Basal Medium „ES“ der SAG einen Extrakt aus Erde [SAG Medium Recipe Version 03.2007]. Andere Arbeiten verwendeten Meerwasser oder versuchten dieses durch aufwendige Salzkombinationen zu imitieren [Provasoli et al., 1957]. Bei allen Zusätzen natürlichen Ursprungs ohne Kontrolle der Zusammensetzung besteht die Gefahr von Schwankungen durch Jahreszeiten und Umwelteinflüsse. Dieses kann durch den Einsatz künstlichen Meerwassers verringert werden.

Häufig stammen die Cyanobakterien aus Alkali-Salz-Seen (alkaline soda lakes oder natron lakes). Dieser Lebensraum zeichnet sich durch hohe pH-Werte, hohe Natriumchlorid-Konzentrationen und niedrige Konzentrationen an Kalzium, Magnesium und Phosphat aus [Grant & Tindall, 1986]. Daher sind reine Mineral-Medien aus einer Kombination an Salzen, Spurenelementen und einigen Puffersubstanzen ausreichend. Häufig konnte ein Einfluss der Salzkonzentration (Natriumchlorid) auf die EPS-Bildung, teilweise auch auf deren Zusammensetzung beobachtet werden [Pereira et al., 2009]. Meist wird von einer gesteigerten EPS-Bildung für den äußeren Schutz ausgegangen. Die veränderte EPS-Menge und eine teilweise deutlich veränderte EPS-Zusammensetzung wurde auch an drei Isolaten der Gattung *Synechocystis* bewiesen [Ozturk & Aslim, 2009]. Es gibt aber noch weitere Faktoren, die die EPS-Bildung fördern können. So sind ein Zusatz an Kalziumchlorid und eine Erhöhung der Temperatur, bis etwa 35°C, zu nennen [Jindal et al., 2011]. Der Faktor Licht spielt eine uneinheitliche, artspezifische Rolle.

1.5 Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein fundamentaler Bestandteil des angeborenen menschlichen Immunsystems und der Homöostase [Tudoran & Kirschfink, 2012]. Dessen physiologische Aufgaben liegen in der Beseitigung von Immunkomplexen und der Bekämpfung pathogener Bakterien. Dabei werden Fremdorganismen vom Komplementsystem markiert (Opsonisierung) und anschließend von phagozytierenden Zellen aufgenommen sowie unschädlich gemacht. Das Komplementsystem verfügt aber auch über ein eigenes Instrument, den Membranangriffskomplex (MAK), um Pathogene zu lysieren. Das Komplementsystem setzt sich aus einem komplexen Zusammenspiel aus über 35 Proteinen zusammen. Die Aktivierung des Systems kann sich dabei über drei unterschiedliche Wege vollziehen, die allerdings alle in einem identischen Endprodukt, dem lytischen MAK, zusammenfinden. Die zwei grundlegenden Reaktionen jedes Kaskaden-Schrittes sind die Spaltung eines inaktiven Proteins unter der Freisetzung aktiver Spaltprodukte sowie die Bildung von Proteinkomplexen.

Der erste Aktivierungsweg, der klassische Weg, wird primär durch die Bindung von Immunglobulinen G und M (IgG und IgM) an Antigene aktiviert [Tudoran & Kirschfink, 2012]. Aber auch das C-reaktive Protein (ein Opsonin und Akut-Phase-Protein), gram-negative Bakterien, apoptotische Zellen und virale Glykoproteine sind Aktivatoren des klassischen Weges. Die Bindung eines IgM- oder IgG-Antikörpers an ein Epitop hat eine Konformationsänderung des Fc-Teils des Antikörpers zur Folge, woraufhin das Komplementprotein C1q binden kann [Ehrnthaller et al., 2011]. Es folgt die Bildung des Faktors C1, ein Pentamer aus C1q und je zwei Molekülen C1r und C1s [Tissot et al., 2003]. Aktives C1 spaltet die Faktoren C2 und C4 in ihre jeweilige a und b Untereinheit. C4b bildet mit C2a die C3-Konvertase, die auf der Oberfläche des Pathogens bzw. an den Antikörper gebunden vorliegt [Makrides, 1998; Vollmar & Dingermann, 2005]. Durch die Spaltung von C3 entstandenes C3b bindet an den Komplex, sodass C4bC2aC3b als C5-Konvertase aktiv wird.

Der alternative Komplementweg wird direkt von Mikroorganismen, ischämisch geschädigtem Gewebe und körperfremden Oberflächen aktiviert und basiert auf einer spontanen Hydrolyse des Faktors C3 [Tudoran & Kirschfink, 2012]. Entstandenes C3b bindet an die Oberfläche des Pathogens und wird dadurch stabilisiert [Makrides, 1998; Vollmar & Dingermann, 2005]. Dieses gibt dem Faktor B die Möglichkeit zu binden, woraufhin dieser vom Faktor D gespalten wird. Der Komplex C3bBb bleibt gebunden und wird durch Properdin stabilisiert. Dieser Komplex wirkt wiederum als C3-Konvertase, sodass es zu einer positiven Rückkopplung kommt [Ehrnthaller et al., 2011]. Durch die Bindung eines weiteren C3b Moleküls entsteht die C5-Konvertase des alternativen Weges (C3bBbC3b) und die gemeinsame Endstrecke setzt sich fort.

Der Lektin-Weg basiert, wie der Name andeutet, auf der Bindung von Mannose-bindendem Lektin (MBL) und Ficolinen an die Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen [Tudoran &

Kirschfink, 2012; Ehrnthaller et al., 2011]. Durch diese direkte Wirkung ist dieser Weg besonders schnell [Tudoran & Kirschfink, 2012]. Aber nicht nur Pathogene, sondern auch durch ischämische Schäden freigesetzte körpereigene Strukturen wie Glykosamine, mitochondriale Proteine und Phospholipide wirken als Aktivatoren und lösen so den Ischämie-Reperfusionsschaden aus. Das MBL wird nach Bindung an eine passende Struktur für die Serinproteasen MASP-1 und -2 zugänglich, wodurch ein dem C1-Pentamer ähnlicher Komplex entsteht [Ehrnthaller et al., 2011]. Daraufhin kann MASP-2 die Faktoren C2 und C4 spalten, wodurch, wie im klassischen Aktivierungsweg, die C3-Konvertase C4bC2a entsteht. Die C5-Konvertase wiederum entsteht ebenfalls durch die zusätzliche Bindung von C3b an die C3-Konvertase.

Die gemeinsame Endstrecke aller Aktivierungswege endet in der Bildung des MAK, welcher sich aus bis zu 22 Proteinen zusammensetzt [Tudoran & Kirschfink, 2012]. Dafür wird zunächst der Faktor C5 von den jeweiligen C5-Konvertasen gespalten [Ehrnthaller et al., 2011]. C5b verbleibt an der Zelloberfläche. Im Folgenden kommt es zur Anlagerung der Faktoren C6, C7 und C8. Die Anlagerung des C8-Moleküls ermöglicht seine partielle Einlagerung in die Zellmembran. Zuletzt lagern sich 10 bis 15 Moleküle des Faktors C9 an, sodass eine transmembranäre Pore mit einem Durchmesser von 10 Å entsteht. Eine ausreichend große Anzahl dieser Poren führt zu einer Zellyse durch unkontrollierten Konzentrationsausgleich von Wasser, Ionen und kleinen Molekülen und somit, letztendlich, zum Zelltod durch osmotischen Stress [Ehrnthaller et al., 2011; Tudoran & Kirschfink, 2012].

Neben der direkten Zellyse sind die weiteren Reaktionen der Spaltprodukte von entscheidender Bedeutung [Ehrnthaller et al., 2011]. So gehören C3a, C4a und C5a zu der Gruppe der Anaphylatoxine und zählen zu den stärksten Entzündungsmediatoren. Die Wirkungen werden durch Bindung an spezifische Rezeptoren (C3aR und C5aR) ausgelöst. Dabei beeinflussen sie eine Vielzahl unterschiedlichster Stoffwechselwege. C3b, C4b und C5b agieren als Oponine und vermitteln so eine Phagozytose von markierten Partikeln. C3b und C4b können an im Blut gelösten Antigen-Antikörper-Komplexen binden. Dadurch werden sie über den Komplementrezeptor 1 (CR1 = CD35) an Erythrozyten gebunden und in Milz und Leber eliminiert. Eine weitere Funktion übt das C3-Fragment C3d aus. Oberflächengebundenes C3d sorgt für die Bindung von Antigenen an B-Zellen über den Komplementrezeptor 2 (CR2), sodass die Bildung spezifischer Antikörper und die Differenzierung der B-Gedächtniszellen angeregt wird. Der menschliche Körper verfügt über zwei Gruppen von Schutzfaktoren, um nicht selbst Opfer seines Komplementsystems zu werden [Tudoran & Kirschfink, 2012]. Zum einen handelt es sich dabei um lösliche hemmende Proteine, zum anderen um membrangebundene Regulatoren. Zu den löslichen Komponenten zählt unter anderem der C1 Inhibitor, welcher den pentameren C1-Komplex auflöst sowie MASP-1 und -2 inaktiviert [Ehrnthaller et al., 2011]. Faktor I seinerseits greift die Spaltprodukte C3b und C4b an, wohingegen Faktor H die Bildung der C3-Konvertase des alternativen Weges durch eine Blockade

der Bindungsstelle des Faktors B verhindert. Membrangebundene Regulatoren sind unter anderem die Proteine CD35, CD46, CD55 und CD59, die die Spaltung von Komplementfaktoren und Konvertasen initiieren bzw. unterstützen.

Eine Fehlregulation des Komplementsystems aufgrund genetischer Defekte oder äußerer Einwirkungen wie bakterielle Infektionen oder schwere Gewebs-Traumata ruft schwere gesundheitliche Probleme hervor [Tudoran & Kirschfink, 2012]. Neben diesen primären Defekten können aber auch sekundäre Defekte, durch einen übermäßigen Verbrauch von Bestandteilen des Komplementsystems, schwere Folgen haben. Genetische Defizienzen in Komplementfaktoren, speziell im Lektin-Weg, äußern sich häufig durch eine hohe und rezidivierende Infektanfälligkeit. Fehlregulationen im klassischen Weg sind eine häufige Ursache von systemischem Lupus erythematoses, einer schweren Autoimmunerkrankung. Aber auch ein Mangel an Schutzfaktoren löst durch eine Überaktivität des Komplementsystems schwere Erkrankungen wie das hereditäre Angioödem und die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie aus. Es gibt noch mehrere weitere genetisch verursachte Erkrankungen, deren Inzidenz mit 4-5% (bezogen auf alle primären Immundefekte) recht gering ist. Deutlich häufiger ist die Beteiligung des Komplementsystems an schweren pathogenen Prozessen. Dabei sollen nur einige genannt werden wie Transplantatabstoßung, Glomerulonephritis, Sepsis und Multi-Organ-Versagen, aber auch rheumatoide Arthritis sowie neuroinflammatorische Störungen wie Multiple Sklerose und Morbus Alzheimer. Neben der Abstoßung organischer Transplantate verursacht das Komplementsystem auch Komplikationen bei Nutzung von Biomaterialien und Medizinprodukten (Katheter, Stents, Herzklappen) sowie Dialysesystemen und extrakorporalen Kreisläufen, da es die Oberflächen als körperfremd erkennt. Zwei der häufigsten Erkrankungen der modernen Welt sind Asthma bronchiale und allergische Reaktionen. Auch in diesen Fällen hat das Komplementsystem, in Form von Anaphylatoxinen, seinen Anteil an der Pathogenese. Therapeutische Maßnahmen existieren derzeit nur in begrenztem Rahmen. Probleme mit körperfremden Materialien werden mit der Gabe des Komplementinhibitors Heparin bekämpft. Zusätzlich gibt es noch ein zugelassenes C1-Inhibitor-Konzentrat sowie einen monoklonalen anti-C5 Antikörper (Eculizumab) zur Therapie des hereditären Angioödems, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie und Formen des hämolytisch urämischen Syndroms.

2 Zielsetzung

Aufgrund des stetig steigenden Energieverbrauchs der Weltbevölkerung und der begrenzten Energieresourcen wird nach neuen Quellen für die Energiegewinnung gesucht. Wie Jones und Mayfield in ihrer Übersichtsarbeit zusammenfassten, können die bisher kommerziell genutzten Ausgangsstoffe für Bioethanol und Biodiesel auf Dauer nicht den Energiebedarf decken, zumal die Nutzung in Konkurrenz zur Nahrungsquelle steht (1.3) [Jones & Mayfield, 2012]. Ein immer weiter in das Zentrum des Interesses rückendes Gebiet ist die Nutzung von Mikroalgen (Cyanobakterien) als Energielieferanten. Alle alternativen Energieträger – Biodiesel, Bioethanol, Biogas und Biowasserstoff – können aus diesen Organismen gewonnen werden (1.3). Da ein einzelner Prozess bisher nicht-tragbare Kosten bedeutet, stellten Jones und Mayfield ebenso wie die breite Fachöffentlichkeit die sogenannte Wertschöpfungskette in den Mittelpunkt zukünftiger Bemühungen. Diese beschreibt die mehrfache und restlose Nutzung und Verwertung derselben Kultivierung aufgrund der vielfältigen Inhaltsstoffklassen für unterschiedlichste Produkte. Neben der Erforschung der Prozessoptimierung ist die Suche nach weiteren hochpreisigen Produkten unter den Stoffwechselprodukten von Cyanobakterien unerlässlich. Ein Forschungsschwerpunkt liegt dabei auf der Suche nach pharmazeutisch nutzbaren Wirkstoffen. Aber auch die Exopolysaccharide (EPS) zeigen ausgesprochen vielseitige Einsatzmöglichkeiten (siehe 1.4.1) bei einfacher Gewinnung, was sie zu einer der attraktivsten Quellen von neuen Polymeren macht [De Philippis & Vincenzini, 1998; De Philippis & Vincenzini, 2003]. Obwohl dieses bekannt ist und Cyanobakterien als ubiquitäre Organismen allgegenwärtig einen wichtigen Pfeiler im Ökosystem darstellen, sind die EPS aufgrund ihrer Komplexität nach wie vor in nur geringem Maße erforscht [Sharma et al., 2011; Pereira et al., 2009]. Um aber ihre physikochemischen Eigenschaften in vollem Umfang nutzen zu können, ist eine exakte Strukturaufklärung unerlässlich [De Philippis & Vincenzini, 1998].

Synechocystis aquatilis gilt als Referenzstamm für die Gattung *Synechocystis* [Korelusova et al., 2009]. Aufgrund dieser Tatsache und seines einfachen Aufbaus als Einzeller wurde dieser Stamm schon häufig für wissenschaftliche Arbeiten verwendet. Mehrfach wurde dabei seine Fähigkeit der Schwermetallbindung untersucht. Die Arbeit von Venzke klärte zwar die Komponenten der EPS auf, dennoch war die genaue Struktur nach wie vor ungeklärt [Venzke, 2005]. Weitergehende Untersuchungen zur Strukturaufklärung waren die erste Aufgabe dieser Arbeit. Diese sollte allerdings nicht nur den genauen strukturellen Aufbau der Polysaccharide klären, sondern auch Hinweise auf Struktur-Wirkungs-Beziehungen geben, nachdem bei Venzke erste Anzeichen für hohe biologische Aktivitäten zu erkennen gewesen waren. Diese Erkenntnisse, besonders im Bereich der Komplementaktivität, sollten gesichert und weiter ausgebaut werden. Aus der Arbeit von Junge [Junge, 2008] war über die EPS von *Synechocystis pevalekii*, abgesehen von einer von *S. aquatilis* abweichenden

Neutralzuckerzusammensetzung, wenig über den strukturellen Aufbau bekannt. Aus diesem Grund wurde dieser, eher wenig beforschte Organismus, ebenfalls für die Untersuchungen ausgewählt.

Mit dieser Arbeit sollte demnach zum einen zum weiteren Verständnis der umfassenden strukturellen und physikochemischen Eigenschaften der cyanobakteriellen Exopolysaccharide beigetragen werden und zum anderen ein weiterer Schritt in Richtung der Wertschöpfung von Cyanobakterien gemacht werden.

3 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werde ich die von mir verwendeten Materialien und Methoden näher beschreiben, an passender und notwendiger Stelle einige Methoden kritisch betrachten sowie mögliche Grenzen der Nutzung bzw. Grenzen der Aussagekraft aufzeigen.

3.1 Allgemein verwendete Chemikalien und Materialien

Um Redundanzen in den Aufzählungen verwendeter Chemikalien und Materialien sowie technischer Geräte zu vermeiden, folgt hier eine Auflistung der häufig Verwendeten. Alle Chemikalien, Materialien und Geräte, die darüber hinaus für einzelne Experimenten eingesetzt wurden, werden an der jeweiligen Stelle im Text oder am Ende der jeweiligen Versuchsbeschreibung genannt.

Verwendete Chemikalien

Ethanol 99%	Ethanol 99%, Fa. Merck, Darmstadt
Molekularsieb	4 Å, Typ 514, Fa. Carl Roth, Karlsruhe

Verwendete Geräte und Materialien

Bioblock:	Thermolyne Scientific code 92607, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA mit V-Vials 5,0 ml & screw cap, Fa. Wheaton, Millville, USA
Dialyseschläuche	12-14 kDa, Fa. Medicell International Ltd., Liverpool, UK
Gefriertrocknungsanlagen	Christ Beta 1-8K, Fa. Christ, Osterode am Harz mit Vakuubrand RZ 5, Fa. Vakuubrand, Wertheim Christ Alpha 1-4 LSC, Fa. Christ, Osterode am Harz mit Vakuubrand RC 6, Fa. Vakuubrand, Wertheim
Glasgeräte	Schott Duran, Fa. Schott, Mainz Pyrex, Fa. Scilabware, Staffordshire, UK
Küvetten	67741 und 67742, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Magnetrührer	MR mini, Fa. Heidolph, Schwabach
pH-Meter	pH-Meter 761 Calimatic, Fa. Knick, Berlin mit pH electrode Blueline 16 pH Mikro, Fa. SI Analytics, Mainz
Photometer	Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer, Fa. Varian, Palo Alto, USA
Pipetten	Eppendorf Research, Fa. Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen	Spitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße	1,5 und 2 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht

Rotationsverdampfer	Laborota 4000 efficient mit HB digital, Fa. Heidolph, Schwabach CVC 3000, Fa. Vakuubrand, Wertheim Laborota 4000 efficient mit HB digital, Fa. Heidolph, Schwabach CVC 2000 II, Fa. Vakuubrand, Wertheim Rotavapor-R, Fa. Büchi, Essen HB4 basic, Fa. IKA Labortechnik, Staufen
Trockenschrank	T 6060, Fa. Heraeus, Hannover Tv29u, Fa. Memmert, Schwabach
Tubes	15 ml und 50 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P Digital, Fa. Bandelin electronic, Berlin
Vortexer	Genie 2, Fa. Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waagen	Sartorius laboratory, Fa. Sartorius, Göttingen Sartorius universal, Fa. Sartorius, Göttingen Sartorius Genius, Fa. Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Typ 1002 GFL, Fa. Gesellschaft für Labortechnik m.b.H., Burgwedel
Zentrifuge Z1	Sigma 3K30, Fa. Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Zentrifuge Z2	Sigma 6-16K, Fa. Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Zentrifuge Z3	Megafuge 1.0, Fa. Heraeus Sepatech, Hannover

3.2 Cyanobakterien-Stämme

Zur Untersuchung wurden zwei Stämme der Cyanobakterien aus der „Sammlung von Algenkulturen“ (SAG) der Universität Göttingen, Deutschland, verwendet. Dabei handelte es sich um

- *Synechocystis aquatilis* Sauvageau SAG 90.79 (M. Lefèvre M138/1, Chad, 1963, natron lake)
- *Synechocystis pevalekii* Ercegovic SAG 91.79 (R. Pourriot M 138/3, France, Ramboillet, pool with humic water).

Beide Kulturen wurden am Tag nach der Lieferung zum Anlegen von Erhaltungskulturen in das Standardmedium NL-DS N-10 (3.3.2) überimpft und bei konstanter Belichtung und Durchmischung kultiviert (3.3.3). Der größte Teil meiner Arbeit beschäftigte sich mit diesen beiden Stämmen. Daher stehen die Abkürzungen *S. aquatilis* und *S. pevalekii*, ohne Angabe der SAG Bezeichnung, für diese beiden Stämme.

Für Vergleichsversuche wurden aus zwei weiteren Algensammlungen *Synechocystis aquatilis* Stämme erworben und Kulturen davon angelegt. Der erste Stamm entstammte der „Culture Collection of Autotrophic Organisms“ (CCALA) der Academy of Sciences in Třeboň, Tschechische Republik.

Dieser ist näher charakterisiert als

- *Synechocystis aquatilis* Sauvageau CCALA 189 (Gromov 1965/428, Ägypten, nahe Asiut, Stauwasser, Phytoplankton, CALU 428 (1983)).

Der zweite Stamm entstammte der „Culture Collection of Algae“ (CAUP) der Charles Universität Prag, Tschechische Republik, und ist durch die Sammlung näher beschrieben als

- *Synechocystis aquatilis* Sauvageau CAUP A 801 (Holubcová 1959/1, Tschechische Republik, Karlovy Vary-King Wenceslas Spring).

Da diese beiden Stämme nur eine untergeordnete Rolle in meiner Arbeit spielten, lautet ihre Bezeichnung in Abgrenzung zu den beiden Hauptstämmen *S. aquatilis* CCALA und *S. aquatilis* CAUP.

3.3 Kultivierung

3.3.1 Allgemeine Kultivierungsbedingungen

Entscheidend für das Wachstum photoautotropher Organismen ist die Belichtung. Diese wurde mittels Weißlicht Neonröhren in einer Intensität von 140-170 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}^{-1}$ bzw. 470-520 Lux durchgeführt. Dieses entspricht etwa 9% des vollen Sonnenlichts [Grobelaar & Kurano, 2003]. Ein weiterer wichtiger Faktor für das Wachstum von Kulturen ist die Temperatur. Die Umgebungstemperatur betrug $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Kultivierungsgefäße mit der Lösung 1 des Mediums (3.3.2) sowie alle benötigten weiteren Einrichtungen wie Belüftungskerzen als geschlossenes System autoklaviert. Das An- oder Einbringen aller anderen benötigten autoklavierten Teile sowie der sterilen Lösung 2 des Mediums erfolgte weitestgehend aseptisch, um eine möglichst reine und axenische Kultur zu erreichen.

Verwendete Geräte und Materialien

Lichtmessgeräte	Li 185 B, Quantum/Radiometer/Photometer, Fa. Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, USA
	Standard-Luxmeter, G. A. 203, Fa. Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin
Dampfsterilisator	VST 40/60 S, Fa. Zirbus, Bad Grund

3.3.2 Nährmedium

Die Auswahl des Nährmediums für die Kultivierung ist wesentlich an der Entwicklung, der Biosynthese und dem Stoffwechsel der Organismen beteiligt. Entscheidend ist hierbei nicht nur die qualitative, sondern auch die quantitative Zusammensetzung. Als Medium wurde das Nährmedium „NL-DS N-10“ nach Pohl et al. in einer Variation verwendet (Tabelle 3.3-1) [Pohl et al., 1987; Junge, 2008]. Dieses reine Mineral-Medium zeichnet sich durch eine geringe Anzahl an Bestandteilen und einen geringen Kostenaufwand aus [Pohl et al., 1987].

Um Wechselwirkungen einzelner Bestandteile in Form von Komplexbildung zu verhindern, wurden zwei Lösungen (Lösung 1 und 2) getrennt voneinander autoklaviert und erst nach dem Erkalten der Lösungen unter aseptischen Bedingungen vereint.

Die Komponente Instant Ocean[®] (Aquatic Systems Inc., Atlanta, USA) garantierte eine konstante Zusammensetzung des Anteils an Meerwasser und förderte damit die Standardisierung. Sie wurde in einer Endkonzentration von 10% eingesetzt. Die Endkonzentrationen von Ionen im Medium mit Ursprung Instant Ocean[®] sind in Tabelle 3.3-2 aufgeführt.

Lösung 1		Lösung 2	
Substanz	Konzentration (mg/l)	Substanz	Konzentration (mg/l)
MnCl ₂ *4H ₂ O (Merck, Darmstadt)	0,40	FeCl ₃ *6H ₂ O (Merck, Darmstadt)	4,00
ZnSO ₄ *7H ₂ O (Merck, Darmstadt)	0,10	Na ₂ EDTA*2H ₂ O (Merck, Darmstadt)	5,50
CoSO ₄ *7H ₂ O (Rudolf Walter KG, Kiel)	0,10	K ₂ HPO ₄ (Merck, Darmstadt)	50,00
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O (Merck, Darmstadt)	0,10		
CuSO ₄ *5H ₂ O (Merck, Darmstadt)	0,01		
KNO ₃ (Merck, Darmstadt)	500,00		
Instant Ocean® (Aquatic Systems Inc., Atlanta)	3500,00		

Tabelle 3.3-1: Stoffliche Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums NL-DS N-10.

Substanz	Konzentration (mg/l)	Substanz	Konzentration (mg/l)
Chlorid	1,93	Bromid	5,60
Natrium	1,08	Strontium	0,88
Sulfat	0,27	Bor	0,56
Magnesium	0,13	Fluorid	0,10
Kalium	42,00	Lithium	0,03
Kalzium	40,00	Iodid	0,02
Bikarbonat	20,00	andere	<0,004

Tabelle 3.3-2: Ionenkonzentration in Instant Ocean®.

Verwendete Geräte und Materialien

Dampfsterilisator VST 40/60 S, Fa. Zirbus, Bad Grund

3.3.3 Kultivierung in Kleinkulturen

Die Kultivierung von Kleinkulturen diente der Erhaltung der Stämme sowie der Anzucht von Kulturen als Inokulum für Batch-Kulturen. Die Kultivierung erfolgte in 250 ml Medium in 500 ml Erlenmeyer-Kolben unter konstanter Belichtung und Temperatur (3.3.1). Bei Erhaltungskulturen wurde etwa alle sechs Monate ein geringes Volumen Zellsuspension in frisches Medium überführt. Die Durchmischung von Kleinkulturen gewährleisteten Schüttler. Der Schüttler für Vorkulturen war auf eine dauerhafte kreisförmige Durchmischung mit 70 U/min eingestellt.

Die Erhaltungskulturen wurden vier Mal täglich in einer linearen Bewegung durchmischelt. Arbeiten an den Kulturen erfolgten ausschließlich unter Laminar Airflow Bedingungen.

Verwendete Geräte und Materialien

Schüttler	GFL 3017, Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Werkbank	Antair ZKB 4, Fa. Mahl, Trendelburg

3.3.4 Kultivierung in Batch-Kulturen

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in 10 Liter Weithals-Standflaschen mit einer Mediummenge von 8 Litern unter konstanter Belichtung und Temperatur (3.3.1). Bei Batch-Kulturen erfolgte die Durchmischung hauptsächlich indirekt über die Belüftung durch Belüftungskerzen mit Druckluft. Zusätzlich wurden die Gefäße ein- bis zweimal täglich sanft geschwenkt, um eine optimale Durchmischung zu gewährleisten und die Anhaftung der Zellen an die Gefäßwandung sowie eine mögliche Sedimentbildung zu reduzieren. Die Belüftungskerzen hatten einen Abstand von etwa 3 cm zum Gefäßboden. Die Belüftung wurde auf eine Abluft von circa 1 ml/min eingestellt. Arbeiten an den Kulturen erfolgten unter möglichst aseptischen Bedingungen. Dazu zählten Handschuhe, Kittel und das Abflammen aller autoklavierten Hilfsmittel, die in direkten Kontakt mit der Zellkultur oder den 10-Liter-Gefäßen kamen, direkt vor der Verwendung. Die Beimpfung der Kulturen erfolgte aus jeweils 5-10 Tage alten Vorkulturen (Kleinkulturen; 3.3.3) mit jeweils dem gleichen Volumen an Vorkultur bei Mehrfachansätzen bzw. annähernd gleicher Zelldichte bei Vergleichsversuchen.

In mehreren Ansätzen wurden zudem Variationen vorgenommen. So führte der Strom der Druckluft direkt vor den Kultivierungsflaschen durch Wulff'sche Flaschen mit sterilem demineralisiertem Wasser, um ein Anfeuchten der Zuluft zu erreichen. Des Weiteren wurde unter der Kultivierung verdunstete Flüssigkeit durch steriles demineralisiertes Wasser oder das verwendete Nährmedium ersetzt und somit eine Fed-Batch-Kultivierung durchgeführt. Außerdem kam verändertes Medium, verringerte Lichtintensität oder ein halbiertes Ausgangsvolumen zum Einsatz. In einem Fall wurde mehrfach die Hälfte des Ansatzes (4 Liter) über eine Schlauchpumpe in 4 Liter frisches Medium überführt.

Verwendete Geräte und Materialien

Belüftungskerzen	P2 30cm, Fa. Eydam, Kiel
Abluftmesser	B-250-4, Porter Instr. Company, Hatfield, PA, USA
Kapsenbergkappen	Fa. Eydam, Kiel
Weithals-Standflasche	10 l, Schott Duran, Fa. Schott, Mainz
Zustellschrauben	Fa. Eydam, Kiel
Schlauchpumpe	PA 20, Fa. IKA Labortechnik, Staufen

3.3.5 Wachstumsdokumentation

Die Dokumentation des Wachstums der Zellen erfolgte, um schädliche oder positive Effekte der Kultivierungsparameter auf die Zellen beobachten zu können. Außerdem wurden dadurch Aussagen über die Optimierbarkeit des Wachstums ermöglicht.

3.3.5.1 Probennahme

In regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen wurden Proben von je circa 10 ml entnommen und das genaue Probenvolumen ermittelt. Der Probenzug erfolgte unter möglichst aseptischen Bedingungen (Handschuhe, Abflammen mittels Gasflamme), um eine Fremdkontamination der Kulturen zu vermeiden.

3.3.5.2 Chlorophyllabsorption

Die Messung der Chlorophyllabsorption diene als Maß für die Bestimmung der Zelldichte. Eine direkte Auszählung der Zellen, beispielsweise mittels einer Neubauer-Kammer, war nicht möglich, da die Zellen zu klein waren und so eine verlässliche Aussage nicht möglich war.

Die genommenen Proben wurden bei 440 nm gegen Nährlösung als Blindwert vermessen [Stadnichuk et al., 2009]. Bei dieser Wellenlänge zeigt Chlorophyll ein Absorptionsmaximum. Es wurde darauf geachtet, dass die Absorption maximal 0,40 betrug, da es oberhalb dieses Wertes zur Überlagerung mehrerer Zellen und damit zu einer Verfälschung des Wertes durch Verlassen des linearen Bereiches kommt [Junge, 2008].

Während der Kultivierung kam es durch Verdunstung zu einer Volumenreduktion und somit zu einer künstlichen Erhöhung der Zelldichte. Die Volumenreduktion musste durch Zugabe neuen Mediums ausgeglichen werden oder bei der Auswertung der Messung korrigiert werden. Dabei wurden nach Volk die Flüssigkeitsstände der Batch-Kulturen in Zentimeter dokumentiert und der räumliche Verlust in einen Volumenverlust umgerechnet [Volk, 2007]. Mit dem erhaltenen Faktor konnten die Messwerte durch Multiplikation korrigiert werden. Das Probenvolumen wurde dabei ausgehend von einer Innenfläche der Kulturflasche von 10,5 cm² in das Volumenmaß umgerechnet.

$$H_P = x \text{ cm}^3 / (\pi * (10,5 \text{ cm})^2)$$

H_0 : Flüssigkeitsstand Tag 0 (cm)

$$KF = (H_0 - H_V) / (H_0 - (\Sigma H_P))$$

H_V : Flüssigkeitsstand zur Probenahme (cm)

ΣH_P : Volumen aller genommenen Proben (cm)

3.3.5.3 EPS-Bildung

Mit einer photometrischen Methode sollte die Bildung von EPS im Verlauf einer Kultivierung beobachtet werden, um Aussagen über die Produktivität der Kulturen treffen zu können. Es gibt eine Reihe von quantitativen Zuckerbestimmungen, allerdings ist für EPS die Phenol-Schwefelsäure-Methode weiterhin die in der Literatur am häufigsten verwendete.

Bei dieser Reaktion nach DuBois et al. [DuBois et al., 1956] handelt sich um eine nasschemische Reaktion freier oder freisetzbarer reduzierender Zucker mit den Reagenzien Phenol (5% wässrige Lösung, Fa. Merck, Darmstadt) und konzentrierter Schwefelsäure (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA). Vorteile dieser Methode sind die Einfachheit und Schnelligkeit der Durchführung und die Stabilität der Reaktionsprodukte. Nach DuBois et al. können parallel Methylpentosen bei 415 nm, Pentosen und Uronsäure bei 480 nm und Hexosen bei 490 nm bestimmt werden. Der erste Schritt der Reaktion ist die Hydrolyse der Polysaccharidketten in Monosaccharide durch die Säure. Im sauren Milieu lagern sich die Monosaccharide zu Furfural (Pentosen) beziehungsweise 5-Hydroxymethylfurfural (Hexosen) um. Beide Furfurale können anschließend mittels aktiver Aromaten (hier Phenol) farbige Verbindungen bilden.

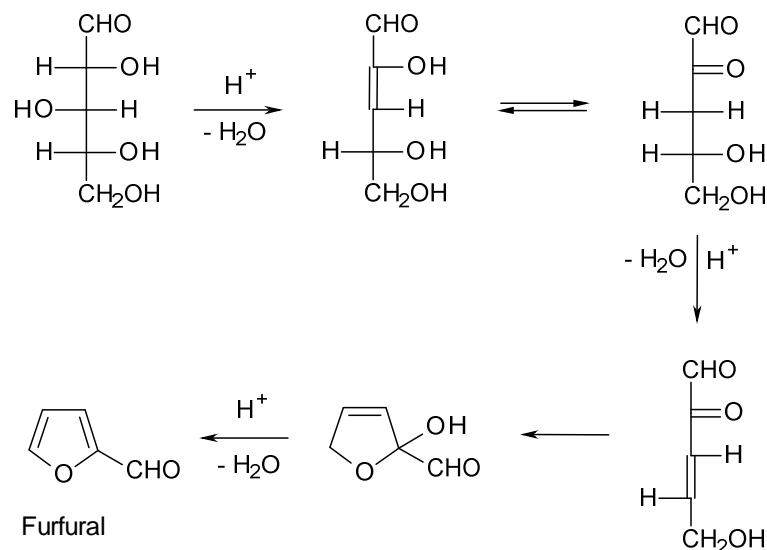


Abbildung 3.3-1: Reaktionsgleichung der Furfuralbildung am Beispiel der D-Xylose [Walter, 2004].

Für die Kalibrierung wurden zunächst L-Arabinose 98% als Pentose (Fa. Aldrich, St. Luis, USA) und/oder D-(+)-Glukose (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) als Hexose verwendet.

Für die Untersuchung musste das Kulturmedium zunächst von zellulären Bestandteilen durch Zentrifugation (Z1, 12.000 U/min, 20 min, 20°C) befreit werden. Der Überstand wurde vermessen und der Kohlenhydratgehalt anhand der erstellten Kalibriergeraden ermittelt. Dazu gab man zur Probe jeweils das gleiche Volumen Phenollösung und das 5-fache Volumen

konzentrierter Schwefelsäure. Der Zusatz der Säure muss dabei innerhalb von 20 Sekunden erfolgen [DuBois et al., 1956]. Anschließend wurde mittels Vortex-Gerät durchmischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur und 15 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

Für die leichtere Durchführbarkeit der Methode wurden alle beteiligten Reagenzien sowie das Probenvolumen ausgehend von der Originalvorschrift im gleichbleibenden Verhältnis verringert. Ein Vergleich der Kalibriergeraden zeigte keinen signifikanten Unterschied. Zuletzt betrug das Endvolumen 1,05 ml (entsprach 150 µl Probe). Die Anpassung des Tests auf 96-well-plates, wie von Masuko et al. [Masuko et al., 2005] beschrieben, war ebenso wie verschiedene Variationen der Durchführung, nicht erfolgreich.

3.3.5.3.1 Kritische Betrachtung der Methode

Es war aufgefallen, dass das Nährmedium eine starke Eigenfärbung durch die Umsetzung mit Phenol und Schwefelsäure erhielt. Diese Beobachtung stellte die Frage nach der Wahl des Blindwertes (demineralisiertes Wasser oder Nährmedium). Die Absorption des vollständigen Mediums lag bei circa 0,1 (gemessen gegen demineralisiertes Wasser als Blindwert). Es zeigte sich, dass die Bestandteile DS-B und KNO₃-Lösung mit Absorptionen von etwa 0,03 und 0,95 bei 480 und 490 nm für die Eigenfärbung verantwortlich waren. Bei der Reaktion der KNO₃-Lösung handelte es sich vermutlich um eine Nitrierung des aromatischen Ringes. Bei DS-B lag die Vermutung nah, dass es sich um eine Komplexbildung des Phenols mit Eisenionen handelt. Da es sich bei der Eigenfärbung eindeutig um einen systematischen Fehler handelte, in Folge dessen die Absorption höher erschien als sie durch die enthaltenen reagierenden Kohlenhydrate tatsächlich war, schien es sinnvoll, die Nährlösung als Blindwert heranzuziehen und als Lösungsmittel für die Kalibriergerade zu verwenden.

Ein weiteres Problem ergab sich durch die abnehmende Konzentration an Nitrat während der Kultivierung, da es den Cyanobakterien als Nährstoff diente. Die Abnahme an Eisen wurde nicht berücksichtigt, da der Einfluss auf die Eigenabsorption des Nährmediums gering war. Durch den Effekt der Konzentrationsabnahme verringerte sich die Eigenabsorption und damit einhergehend sank der Einfluss des Nährmediums auf die Kohlenhydratbestimmung. Um reale Werte zu erhalten, müsste also bei jedem Probenzug der Nitratgehalt bestimmt und anschließend anhand einer vorab erstellten Beziehung zwischen Absorption und Nitratgehalt die Eigenabsorption berechnet werden. Die Bestimmung der Nitratkonzentration stellte dabei ein Problem dar, da die Nachweise auf Nitrierungsreaktionen oder Bildung von Azofarbstoffen beruhen, die alle mit einer starken Säure und einem aktiven Aromaten einhergehen. Diese Komponenten reagieren analog der Nachweismethode nach DuBois et al. [Dubois et al., 1956] mit den enthaltenen Zuckern. Ein analoges Problem entstand bei der Suche nach alternativen Zuckernachweisen. Die meisten Farbreaktionen beruhen auf der Bildung von Furfural und dessen Nachweis mit aktiven Aromaten. Diese würden allerdings nitriert. Eine Möglichkeit der

Behebung des Fehlers läge in der Durchführung einer Größenausschlusschromatographie. Dabei würden zuerst alle kleinen Salzmoleküle und anschließend die Polysaccharide eluieren. Auch wenn dieses in einem Vorversuch gute Ergebnisse lieferte, schien diese Durchführung aufgrund des hohen zeitlichen Aufwandes einer Routinetestmethode nicht angemessen.

Die Absorptionsmaxima der Reaktionsprodukte hatten sich unter der Einwirkung der aus dem Nährmedium entstandenen Nitrophenole nicht verschoben, so dass die Wellenlängen von 490 nm und 480 nm beibehalten werden konnten. Die unterschiedlichen Absorptionsmaxima für Pentosen und Hexosen von 480 und 490 nm konnten zwar beobachtet werden, ließen aber, wie sich zeigte, keinen Rückschluss auf die wirkliche Zusammensetzung zu.

Die Nitratproblematik betreffend wurde der Fehler durch Nitratreduzierung über den Kultivierungszeitraum akzeptiert, da es sich lediglich um eine Beschreibung des Bildungsverlaufes, nicht aber um eine quantitative Bestimmung handelte. Von diesem Standpunkt aus wurde in vielen Fällen völlig auf die quantitative Auswertung der Reaktion verzichtet und nur die Höhe der Absorption bei 490 nm betrachtet. Dieses war ausreichend, um die Bildungsverläufe zu dokumentieren.

3.3.6 Abernten von Batch-Kulturen

Das Abernten der Kulturen wurde nach individuell festgelegten Zeiträumen, spätestens aber nach Feststellung einer optischen Veränderung der Kulturen vorgenommen. Dabei erfolgte noch einmal die Entnahme von 10 ml für die Wachstumsdokumentation (3.3.5). Im Anschluss wurden die Parallelansätze der Kulturen vereint, sofern die Entwicklung der Ansätze vergleichbar verlaufen war. Durch dieses Pooling erhöhte sich zum einen die Gesamtausbeute an EPS, zum anderen wurden geringfügige Unterschiede ausgeglichen. Die Abtrennung der Zellen von dem Kulturmedium erfolgte mittels Durchlaufzentrifugation. Das in der Durchlaufzentrifuge verbliebende Restvolumen wurde separat zentrifugiert (Z1, 12.000 U/min, 20 min, 20°C) und die getrennten Bestandteile mit den restlichen vereinigt. Nachdem die Durchlaufzentrifuge durch einen Defekt nicht mehr verfügbar war, musste die Ernte mit einer konventionellen Zentrifuge (Z2, 9000 U/min, 20 min, 20°C) vorgenommen werden, wobei auf dieselbe relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 14.942 geachtet wurde. Im Anschluss an den Zentrifugationsschritt wurde das Volumen auf 1/5 bis 1/10 des Ausgangsvolumens am Rotationsverdampfer eingeeengt und die gewonnene Biomasse lyophilisiert.

Bei der Volumenreduktion des zellfreien Mediums bildete sich bei *S. pevalekii* ein Präzipitat. Diese als „Sp-Ausfällung“ bezeichnete Substanz wurde abzentrifugiert und ebenfalls den weiteren Schritten der Aufarbeitung unterzogen.

Verwendete Geräte und Materialien

Durchlaufzentrifuge Contifuge 17 S, Fa. Heraeus Sepatech, Osterode
12.000 U/min, Raumtemperatur

3.3.7 Aufreinigung der Exopolysaccharide

Die Entfernung der Proteine aus dem Kulturmedium erfolgte mittels Hitzedenaturierung [Venzke, 2005]. Dazu wurden bis zu 100 ml des Mediums bei einer Kerntemperatur von 86°C für 15 Minuten erhitzt. Im Anschluss daran vollzog sich die vollständige Fällung der Proteine bei 4°C über Nacht. Die denaturierten und präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (Z1, 12.000 U/min, 20 min, 4°C; Z2, 9200 U/min, 20 min, 4°C) abgetrennt und für mögliche weitere Untersuchungen lyophilisiert.

Die Abtrennung der EPS von möglichen anderen noch enthaltenen niedermolekularen Bestandteilen wurde mittels Ethanol-Fällung erreicht [Venzke, 2005]. Dazu wurde 1 g Medium mit Ethanol 99% auf 3,956 g versetzt, um eine Endkonzentration von 80% zu erreichen. Der Anteil an Ethanol 99% wurde möglichst luftblasenfrei und ohne starke Verwirbelungen auf das Medium gegeben und die Phasen durch sanftes Schwenken vereint. Im Anschluss daran kam es zur vollständigen Fällung über Nacht bei 4°C und die EPS konnten mittels Zentrifugation (s.o.) vom Überstand abgetrennt werden. Die Polysaccharide wurden noch drei Mal mit gekühltem Ethanol 80% gewaschen und im Anschluss gefriergetrocknet. Der Zentrifugationsüberstand konnte zur Kontrolle möglicher weiterer Fällungen bei 4°C gelagert und zur Aufbewahrung einrotiert werden.

Zur Entfernung niedermolekularer Substanzen wie Bestandteile des Nährmediums, Zuckermomere und -oligomere oder kleine Zuckerpolymeren, die sich durch Kopräzipitation noch in den Polysacchariden befinden könnten, erfolgte eine Dialyse. Dazu wurde eine Lösung aus den lyophilisierten Roh-EPS oder direkt aus gefällten Roh-EPS in demineralisiertem Wasser hergestellt und in Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgrenze von 12 bis 14 kDa gefüllt. Diese wurden für fünf bis zehn Tage bei 4°C einer kontinuierlichen Dialyse gegen demineralisiertes Wasser unterzogen. Die dialysierte EPS-Lösung wurde gefriergetrocknet und die somit gewonnenen EPS als Rein-EPS bezeichnet.

Die Roh-EPS von *S. aquatilis* waren sehr schlecht löslich. Daher wurde Dinatrium-EDTA (Titriplex III, Fa. Merck, Darmstadt) zugefügt bis sich eine klare Lösung einstellte, die in die Dialyseschläuche überführt werden konnte. Es zeigte sich, dass häufig bereits etwa 5 mmol/l Dinatrium-EDTA ausreichend waren.

Verwendete Geräte und Materialien

Heizplatte	RET basic, Fa. IKA Labortechnik, Staufen
Fühler	IKATRON ETS D3, Fa. IKA Labortechnik, Staufen
	VT-4, Fa. VWR, Darmstadt

3.3.8 Bezeichnung der Kultivierungsansätze und EPS

Die Bezeichnung der einzelnen Kultivierungen und den daraus isolierten EPS soll an folgendem fiktiven Beispiel erklärt werden:

200901-Sa-K k

2009	Jahr der Kultivierung
01	laufende Nummer
Sa	<i>Synechocystis aquatilis</i> SAG
K	Kontroll-/Standardbedingungen wie unter 3.3.4 beschrieben
k	kurze Kultivierungsdauer

Weitere Bezeichnungen:

Ad	Volumenausgleich mit demineralisiertem Wasser
NL	Volumenausgleich mit NL-DS N-10
B	Zuluft angefeuchtet
d	dunkel, ½ Lichtintensität
l	lange Kultivierungsdauer
½	Ausgangsvolumen 4 Liter
halb	mehrfaches Überführen von 4 Litern Zellsuspension in 4 Liter frischen Mediums
KNO ₃	Nährmedium mit 1,5-fachem Kaliumnitrat-Gehalt
kno ₃	Nährmedium mit 0,5-fachem Kaliumnitrat-Gehalt
Sa CAUP	<i>Synechocystis aquatilis</i> CAUP
Sa CCALA	<i>Synechocystis aquatilis</i> CCALA

3.4 Polysaccharid-Analytik

3.4.1 Bestimmung der Zusammensetzung der Neutralzucker

3.4.1.1 Neutralzuckeranalyse mittels Acetylierungsanalyse

Die Neutralzuckeranalyse erfolgte mittels Acetylierung wie von Blakeney et al. beschrieben [Blakeney et al., 1983]. Für die Analytik der Monomerenzusammensetzung von Polysacchariden waren 3 Schritte für die Acetylierungsanalyse notwendig. Zu Beginn mussten die Polysaccharide hydrolysiert werden. Bereits an dieser Stelle wurde der interne Standard myo-Inositol (>99%, Fa. Merck, Darmstadt) zu der Reaktion gegeben. Die Hydrolyse erfolgte durch Hinzufügen von 1 ml 2 molarer Trifluoressigsäure (TFA, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) zu 1-10 mg Probe und der Inkubation bei 121°C für 60 Minuten [Fry, 1988]. Zur vollständigen Entfernung der flüchtigen TFA wurden die Proben drei Mal mit 5 ml demineralisiertem Wasser versetzt und jeweils am Rotationsverdampfer bis zur vollständigen Trockenheit eingeeengt. Dieser Schritt war wichtig, da Säurerückstände die nachfolgende Reduktion gestört hätten. Diese erfolgte durch Zugabe von 200 µl 1 molarem Ammoniak (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA) und 1 ml 2% Natriumborhydrid in trockenem DMSO (beides Fa. Roth, Karlsruhe). Nach 90 Minuten Reaktionszeit bei 40°C stoppte diese Reaktion durch Zugabe von 100 µl Eisessig (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA). Durch die Reduktion der Monomere zu Alditolen wurden ebenfalls potentiell enthaltene Säurefunktionen von Uronsäuren reduziert, sodass diese nicht erkennbar waren. Die anschließende Acetylierung mit 2 ml trockenem Acetanhydrid (Fa. Roth, Karlsruhe) erfolgte mit Hilfe von 200 µl des Katalysators 1-Methylimidazol (Fa. Merck, Darmstadt). Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml demineralisiertem Wasser nach 20 Minuten bei Raumtemperatur beendet. Eine Aussage über eine ursprüngliche Acetylierung von Hydroxyl- sowie Aminogruppen konnte nicht getroffen werden, da auch freie funktionelle Gruppen in der Reaktion acetyliert wurden. Die entstandenen Alditolacetate wurden nach Ansäuern mit 1 ml 0,1 molarer Schwefelsäure (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA) mit 1 ml Dichlormethan (Rotisol, Fa. Merck, Darmstadt) durch Ausschütteln extrahiert und per Gaschromatographie (GC) vermessen. Die Auswertung erfolgte qualitativ durch Vergleich der relativen Retentionszeiten (bezogen auf den internen Standard myo-Inositol) mit vermessen Referenzsubstanzen und quantitativ durch Integralbildung der Peakflächen.

Die Auftrennung mittels Gaschromatographie (GC) erfolge an einer polaren Siloxansäule mit 50% Cyanopropylmethyl- und 50% Phenylmethylgruppen. Als Trägergas diene Stickstoff oder Helium. Die Detektion vollzog sich an einem Flammenionisationsdetektor (FID) in einer Knallgasflamme.

Die acetylierten Standards wurden auch zur Bestimmung der Korrekturfaktoren verwendet. Dieser Faktor setzt die Signalintensitäten des Zuckers und des internen Standards am Flammenionisationsdetektor (FID) bei bekannten Einwaagen in Bezug. Dadurch wird das unterschiedliche Ansprechen des Detektors auf verschiedene Moleküle ausgeglichen. Dieser Faktor lag bei den verschiedenen Zuckern zwischen 1,19 und 1,55, bei Glukosamin bei 3,54. Die acetylierten Proben wurden für weitere Identifizierungsschritte mittels GC-MS vermessen. In der Massenspektrometrie (MS) werden eluierte Analyten des Gaschromatographen ionisiert, woraufhin diese in charakteristische Fragmente zerfallen. Die Signalspektren der Proben konnten mit Spektren von acetylierten Referenzsubstanzen verglichen werden. Zusätzlich wurde ein Spektrum einer synthetisierten Fukosamin-HCl-Referenz (3.4.1.2) zum Vergleich aufgenommen.

Verwendete Geräte und Materialien

Referenzsubstanzen	L-(+)-Arabinose (>99%, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) L-(-)-Fukose (>99%, Fa. NeoLab Migge GmbH, Heidelberg) L-(+)-Rhamnose Monohydrat (>99%, Fa. Merck, Darmstadt) D-Mannosamin Hydrochlorid (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) D-(+)-Xylose (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) D-(+)-Galaktose (97%, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) D-(+)-Glukose (>99,5%, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) D-(+)-Glukosamin-HCl (99,9%, Fa. Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego, USA)
--------------------	---

Verwendete Geräte und Materialien für GC-FID

GC-Anlage	HP 5890 Series II
Säule	Optima 225 0,25 µm, Länge 25 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Macherey-Nagel, Düren
Bedingungen	Inletttemperatur: 240°C Detektortemperatur: 250°C Ofentemperatur: max. 280°C, initial 230°C Oven Equib time: 0,1 min Flussrate: 0,7 ml/min

Verwendete Geräte und Materialien für GC-MS

GC-Anlage	HP 5890 Series II
Säule	Optima 225 0,25 µm, Länge 25 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Macherey-Nagel, Düren
Bedingungen	Inletttemperatur: 280°C Detektortemperatur: 250°C Ofentemperatur: 160°C, mit 2°C/min auf 200°C, mit 1°C/min auf 225°C, mit 70°C/min auf 260°C, 4,5 min ausheizen Oven Equib time: 0,1 min
EI-MS-Spektrometer	HP MS Engine 5898 A, Fa. Hewlett Packard, USA
Bedingungen	Ionisation: EI (70 eV), m/z scan: 40-540 Th, 1,3 Scans/sek

3.4.1.2 Synthese von Fucosamin Hydrochlorid

Die Synthese der Fucosamin-Hydrochlorid-Referenz beruhte auf der Veröffentlichung von Medgyes et al. [Medgyes et al., 1997]. Sie wurde von Dr. A. Fekete und Prof. Dr. A. Liptak im Chemischen Institut, Abteilung Organische Chemie, in Debrecen, Ungarn, durchgeführt. Die genaue Beschreibung der Methode sowie die experimentellen Bedingungen für die Durchführung der Synthese und die Identitätsnachweise finden sich im Anhang 11.1 „Synthesis of 2-amino-2,6-dideoxy-D-galaktose hydrochloride (D-Fucosamine)“.

3.4.2 Elementaranalyse

Genau eingewogene Proben werden bei hohen Temperaturen verbrannt. An einem heißen Wolfram- oder Kupferdraht werden die einzelnen Atome in ihre gasförmigen Oxide (CO_2 , H_2O , SO_2) sowie Stickstoffoxide in N_2 überführt. Die Gase werden säulenchromatographisch getrennt und an einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor detektiert.

Die Elementaranalyse der Atome Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel wurden am Institut für Anorganische Chemie der Universität Kiel durchgeführt. Die qualitative und quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe des Standards Sulfanilamid per Vergleich und rechnerischer Auswertung der Einwaagen und Peakflächen.

Verwendete Geräte und Materialien

CHNS Analysator Fa. HEKAtech, Wegberg

3.4.3 Bestimmung des Acetatgehaltes

Eine mögliche Acylierung der Alkoholfunktionen der Zucker wurde photometrisch über den Acetatgehalt bestimmt [McComb & McCready, 1957]. Acetylgruppen spalten in einem Schritt vom Analyten ab und bilden Hydroxamsäure. Dafür wurden 150 μl der Probelösung mit 60 μl einer 1+1-Mischung aus 9,4% Natriumhydroxid (Fa. C. Roth, Karlsruhe) und 3,75% Hydroxylammoniumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt) versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion stoppte durch die Zugabe von 150 μl 4,9% Perchlorsäure (Fa. Merck, Darmstadt). Zur Farbvertiefung wurde das Reaktionsprodukt mit 390 μl einer 1,93%igen sauren Eisen-3-Chlorid-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) komplexiert. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierreihe mit Glukosepentaacetat (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim).

3.4.3.1 Kritische Betrachtung der Methode

Führte man die Bestimmung des Acetatgehaltes mit unterschiedlichen Substanzen mit bekanntem Acetatgehalt durch, war zu erkennen, dass nur O-Acetyl-Verbindungen, aber keine N-Acetyl- oder freien Acetat-Gruppen nachgewiesen werden konnten. Dieses schränkte die Aussage über Acetatgruppen im untersuchten Polysaccharid ein.

Substanz	Soll-Konzentration (mmol/l)	Ermittelte Konzentration (mmol/l)	s
N-Acetyl-Glukosamin (Fa. Fluka, Steinheim)	1,820	-0,076	0,002
Natriumacetat (Fa. Fluka, Steinheim)	16,600	-0,347	0,005

Tabelle 3.4-1: Werte der Acetatbestimmung von Positivproben.
s: Standardabweichung.

3.4.4 Bestimmung des Pyruvatgehaltes

Der Gehalt an Pyruvatgruppen in EPS wurde nach Sloneker und Orentas bestimmt [Sloneker & Orentas, 1962]. Dabei kam es zunächst zur Freisetzung der Pyruvatgruppen unter saurer Hydrolyse in ca. 0,7 molarer Salzsäure (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA) (100°C, 3h). Im Anschluss wurden 2 ml Hydrolysat mit 1 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz (Fa. Merck, Darmstadt, 0,5% in 2 molarer Salzsäure) versetzt und das Reaktionsprodukt nach 5 Minuten durch Zugabe von 5 ml Ethylacetat (Lichrosolv, Fa. Merck, Darmstadt) aus der sauren, wässrigen Phase entfernt. Zuletzt wurde das Reaktionsprodukt durch dreimaliges Ausschütteln mit 5 ml 10%iger Dinatriumkarbonat-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) aus der organischen Phase isoliert, mit Dinatriumkarbonat-Lösung auf 25 ml aufgefüllt und die Farbintensität bei 375 nm vermessen. Für die Auswertung wurde eine Kalibriergerade mit Brenztraubensäure (98%, Fa. C. Roth, Karlsruhe) erstellt.

3.4.5 Bestimmung des Sulfatgehaltes

Die Bestimmung des Sulfatgehaltes erfolgte über zwei verschiedene Methoden. Die konduktometrische Sulfatbestimmung benötigt, abgesehen vom Konduktometer selbst, nur eine einfache Ausrüstung an Glasgeräten und Pipetten und kann daher in jedem Labor eingesetzt werden. Dabei nachteilig ist die höhere Probenmenge von mindestens 5 mg. Hingegen benötigt eine Berechnung des Sulfatgehaltes aus dem Schwefelgehalt aus der Elementaranalyse lediglich 2 mg, dafür aber ein teures hochtechnisiertes Gerät, welches nicht in jedem Labor verfügbar ist. Je nach Fragestellung wurden beide Methoden verwendet und der Vergleich der Ergebnisse für Rückschlüsse genutzt.

3.4.5.1 Konduktometrische Sulfatbestimmung

Neben Sulfatgruppen können in der konduktometrischen Sulfatbestimmung nach Casu und Gennaro auch Carboxylgruppen bestimmt werden [Casu & Gennaro, 1975]. Dabei zeigen stark saure Funktionen sehr steile Kurvenverläufe, während die Kurven schwacher Säuren sehr flach verlaufen.

Die Sulfatgruppen wurden in einem ersten Schritt durch Gabe über 10 g des Kationenaustauschers Amberlite IR-120 (Fa. Rohm/Haas, Philadelphia, USA) in ihre protonierte Form überführt. Das Amberlite Harz war zuvor mit 10 ml ca. 1,4 molarer Salzsäure (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA) bei 4°C für 30 Minuten konditioniert und anschließend bis zur konstanten Leitfähigkeit mit bidestilliertem Wasser gewaschen worden. Die entstandenen Säurefunktionen in den EPS wurden gegen 0,1 M Natronlauge (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) titriert und der Wendepunkt konduktometrisch, also durch Messung des elektrischen Widerstandes, bestimmt. Die Auswertung erfolgte über die von Casu und Gennaro veröffentlichte mathematische Formel.

Verwendete Geräte und Materialien

Konduktometer Seven Easy, Fa. Mettler Toledo Deutschland, Giessen

3.4.5.2 Berechnung des Sulfatgehaltes aus dem Schwefelgehalt

Alternativ wurde der Sulfatgehalt aus den Ergebnissen der Elementaranalyse (3.4.2) berechnet:

$$\text{Gehalt}_{(\text{SO}_3^-)}\% = (\text{Gehalt}_{(\text{S})}\% / 40,4\%) * 100\% \qquad \text{MW}_{(\text{SO}_3^-)} 80,6 \text{ g/mol} \approx 100\%$$
$$\qquad \qquad \qquad \text{MW}_{(\text{S})} 32,6 \text{ g/mol} \approx 40,4\%$$

3.4.6 Bestimmung des Uronsäuregehaltes

Die Bestimmung des Uronsäuregehaltes wurde nach der Methode von Blumenkrantz und Asboe-Hansen durchgeführt [Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973]. Dabei erfolgte zunächst die Hydrolyse der Polysaccharide in 4% Schwefelsäure (Fa. Merck, Darmstadt) bei 121°C für 60 Minuten. Anschließend mussten 200 µl des Hydrolysates mit 1,2 ml 0,29% Natriumtetraborat in Schwefelsäure (Fa. Merck, Darmstadt) versetzt und exakt 5 Minuten bei 100°C im Wasserbad belassen werden. Zur Farbreaktion kam es nach Zugabe von 20 µl 0,15% 3-Hydroxydiphenyl (85% (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) in 0,5% NaOH (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)). Die Absorption wurde nach 5 Minuten bei Raumtemperatur bei 520 nm gemessen. Als Blindwert wurde ein Parallelansatz vermessen, der 20 µl 0,5% NaOH statt des Farbreaquenzes enthielt. Die Auswertung erfolgte über eine zuvor erstellte Kalibriergerade, deren Grundlage eine Mischung aus Galakturon- und Glukuronsäure zu gleichen Anteilen war.

3.5 Spektroskopische Methoden

3.5.1 IR-Spektroskopie

Für allgemeine Hinweise auf die funktionellen Gruppen in EPS und zur ersten Überprüfung von Desulfatierungen wurden IR-Spektren aufgenommen. Dabei kamen die Techniken der abgeschwächten Totalreflektion, attenuated total reflection (ATR), und Fourier-Transformation zum Einsatz.

Die Zuordnung der Banden erfolgte mit Hilfe selbst vermessener Referenzsubstanzen (D-(+)-Glukosamin (99,9%, Fa. Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego); N-Acetyl-Glukosamin (98%, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim); Glucosepentaacetat (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)) sowie anhand von Literaturdaten [Wu et al, 2010; Bilan et al, 2004; Bilan et al., 2007; Bilan et al., 2008].

Verwendete Geräte und Materialien

IR-Spektrometer	Perkin Elmer, Universal ATR Sampling Accessory, Waltham, USA Perkin Elmer, Spectrum 100, FT-IR-Spektrometer mit Software "Spectrum", Waltham, USA
-----------------	--

3.5.2 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR)

Die Proben und Referenzsubstanzen für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen lagen in D₂O (99,9 atom%D, Aldrich) gelöst vor. Als interner Standard wurde Aceton 0,2% verwendet (H 2,225 ppm, C 31,45 ppm).

In der Neutralzuckeranalyse wurden die Signale einzelner Referenzmonomere mit Monomerenmischungen von TFA hydrolysierten Proben (3.4.1.1.) verglichen. Für die Untersuchung der EPS von *S. aquatilis* wurde der Überstand der Ethanol-fällung aus der Oxalsäurehydrolyse (3.6.1) in D₂O gelöst, mit Natriumhydroxid (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) neutralisiert und filtriert.

Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von Veröffentlichungen und einer Internetdatenbank [Collins & Ferrier, 1995; Okutani & Tanadvanitj, 1991; Vinogradov et al., 1989; www.hanhonggroup.com, 5138; D-(+)-Fukose].

Verwendete Geräte und Materialien

NMR-Gerät	Avance III 300, Fa. Bruker, Rheinstetten
Bedingungen	300 MHz, 300 K
Spritzenfilter	0,45 µm, Nalgen, Thermo Scientific, Rochester, USA

3.6 Partialhydrolytische Methoden

3.6.1 Oxalsäurehydrolyse

Bei der Oxalsäurehydrolyse handelt es sich um eine Spaltung schwacher glykosidischer Bindungen, bevorzugt an Furanosen und Pentosen, durch milde Säure nach Gleeson und Clarke [Gleeson & Clarke, 1979]. Ziel war es, Hinweise auf die Anordnung der einzelnen Zucker im Polysaccharid zu erhalten. So würden beispielsweise Seitenketten aus Arabinosen abgespalten, während ein Kern aus Glykan bestehen bliebe.

Durch die Zugabe einer 12,5 mmol/l Oxalsäure (Fa. Merck, Darmstadt) und Umsetzung bei 100°C über fünf Stunden kam es zu der oben genannten Spaltung. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (Z1, 6000 U/min, 5 min, 20°C). Durch Fällung mit Ethanol, Endkonzentration 80%, und anschließender Zentrifugation (Z1, 20.000 g, 10 min, 4°C) erfolgte eine Fraktionierung in höher- und niedermolekulare Bruchstücke. Die Ethanolphase wurde bis zur Trockene am Rotationsverdampfer einrotiert, in demineralisiertem Wasser aufgenommen und, ebenso wie die ausgefallenen höhermolekularen Bestandteile (ab einer Kettenlänge von etwa 10 Zuckern), gefriergetrocknet. Für die Auswertung der Ausbeuten musste die Masse an eingesetzter Oxalsäure von der Auswaage des getrockneten Fällungsüberstandes abgezogen werden. Als Variation der Methode wurden Hydrolysezeiten von 0,5, 1, 2, 3 und 4 Stunden sowie Säurekonzentrationen von 0,5, 2, 5 und 9 mmol/l untersucht.

3.6.2 Alkalische Hydrolyse

Bei der alkalischen Hydrolyse werden unter Einwirkung von Laugen und erhöhter Temperatur Proteine zerstört, sodass intakte Zuckerketten mit einer Aminosäure, die für die Bindung an das Protein verantwortlich war, zurück bleiben. Auf diese Weise konnte der reine Polysaccharidanteil analysiert werden.

Dieser Versuch basierte auf der Arbeit von Volk [Volk et al., 2007 a]. Die eingewogene Probenmenge, mit dem 6,6-fachen an 0,44 N Natriumhydroxid-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) versetzt, inkubierte bei 105°C für 18 Stunden. Anschließend wurde die Probe mit Salzsäure (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA) neutralisiert und gefriergetrocknet. Zur weiteren Aufarbeitung wurde die Probe erneut in demineralisiertem Wasser gelöst und zur Entfernung der Salze über eine Säule mit Sephadex G-25 Coarse (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden, Bettvolumen ca. 100 ml) gegeben. Die Entfernung des Wassers erfolgte zunächst am Rotationsverdampfer und weiter mittels Gefriertrocknung. Diese Probe wurde mit der GPC (3.10.2) untersucht.

3.7 Desulfatierung von EPS

Unter einer Desulfatierung versteht man die Abspaltung von Sulfatgruppen von einem Molekül, zum Beispiel einem Polysaccharid. Dadurch entsteht an der Spaltungsstelle eine Hydroxylgruppe.

Der Erfolg der Desulfatierung wurde anhand der Ausbeute und dem verbleibenden Sulfatgehalt ermittelt. Für den Sulfatgehalt erfolgte eine Einschätzung mittels IR-Spektroskopie (3.5.1) und im Falle einer bis dahin positiven Versuchsbewertung mittels Elementaranalyse mit anschließender Berechnung des Sulfatgehaltes (3.4.2; 3.4.5.2).

3.7.1 Solvolyse

Bei der Solvolyse handelt es sich um die am häufigsten verwendete Methode zur Desulfatierung von Polysacchariden. Dabei wird die Probe in Lösungsmittel, meist N,N-Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO), gelöst und mit Wasser oder Methanol versetzt. Durch anschließende Inkubation bei erhöhter Temperatur kommt es zur Abspaltung von Sulfatgruppen, die in einer Dialyse entfernt werden. Um die Löslichkeit der Probe zu erhöhen, wird sie häufig vor der Reaktion in ihr Pyridinium-Salz überführt. Dadurch wird in Konsequenz die Reaktivität erhöht [Usov et al., 1971].

Zur Bildung des Pyridinium-Salzes wurden die EPS über Nacht in demineralisiertem Wasser (1 mg/ml) unter Rühren gelöst und anschließend 3 g konditioniertes Amberlite IR-120 (Fa. Rohm/Haas, Philadelphia, USA) pro 10 mg EPS zugefügt. Das Amberlite Harz war zuvor konditioniert und gewaschen worden (3.4.5.1). Die Protonierung aller Sulfatgruppen geschah unter Schwenken der Probe mit dem Amberlite IR-120 für 15 Minuten. Anschließend wurde das Amberlite durch Filtration abgetrennt. Das Filtrat eluierte in ein Gefäß, welches 1 ml Pyridin (Fa. Merck, Darmstadt) pro 10 mg EPS enthielt. Der pH lag bei etwa 7. Die zuvor protonierten Sulfatgruppen gaben das Proton an das Pyridin ab und bildeten mit diesem ein Ionenpaar. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Probe bis zur Trockne am Rotationsverdampfer eingengt, in demineralisiertem Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Die eigentliche Desulfatierung erfolgte in einem zweiten Schritt. In einer ersten Variation wurde nach der Methode von Nagasawa et al. [Nagasawa et al., 1977] in DMSO (DMSO, Rotidry, Fa. Roth, Karlsruhe) mit 2% demineralisiertem Wasser beziehungsweise Methanol (Fa. Riedel-de Haen, Seelze) für 7 Stunden bei 100°C desulfatiert. Des Weiteren folgte in Anlehnung an Usov et al. [Usov et al., 1971] der Ersatz vom DMSO durch DMF (DMF, Fa. Merck, Darmstadt). Dazu wurde das Pyridinium-Salz in 1 ml demineralisiertem Wasser gelöst, anschließend mit 9 ml DMF versetzt und 24 Stunden bei 90°C desulfatiert. Als Variation erfolgte die Reaktion für nur 12 Stunden bzw. bei 70°C. An alle Desulfatierungsmethoden schloss sich eine Dialyse (MWCO 1 oder 12-14 kDa) und Gefriertrocknung an.

Verwendete Geräte und Materialien

Konduktometer Seven Easy, Fa. Mettler Toledo Deutschland, Giessen

3.7.2 Desulfatierung mit Chlortrimethylsilan

Bei dieser Methode nach Kolender und Matulewicz wird regionen-unspezifisch mit Chlortrimethylsilan (CTMS) in wasserfreiem Pyridin desulfatiert (Abbildung 3.7-1) [Kolender & Matulewicz, 2004].

In einem ersten Schritt wurden die Proben in ihr Pyridinium-Salz überführt (3.7.1) und anschließend in wasserfreiem Pyridin (Fa. Merck, Darmstadt) suspendiert, mit CTMS (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) versetzt und bei 100°C inkubiert. Sowohl die Dauer der Inkubation, als auch die Menge an CTMS ist für jedes Polysaccharid spezifisch und wird als molares Verhältnis CTMS zu Sulfatgruppen angegeben. Die Bedingungen 5,25 h und 100:1 CTMS (entsprach 320 µl/10 mg EPS) erzielten die besten Ergebnisse mit höchsten Ausbeuten und stärkster Desulfatierung. Im Anschluss an die Reaktion wurde durch tropfenweise Zugabe von demineralisiertem Wasser das gebundene Trimethylsilan abgespalten. Eine anschließende Dialyse (MWCO 12-14 kDa) entfernte dieses vollständig.

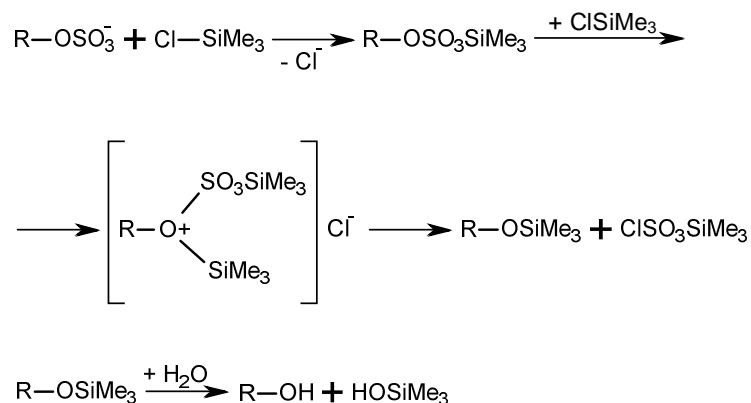


Abbildung 3.7-1: Mechanismus der Desulfatierung mit CTMS nach Kolender und Matulewicz [Kolender & Matulewicz, 2004].

3.8 Bindungstyp-Analyse

Die Analyse des Bindungstypes der Zucker innerhalb des Polysaccharides beruht auf der unterschiedlichen chemischen Veränderung von Bindungs- und Nicht-Bindungs-Alkoholgruppen der Zucker. In einem ersten Schritt werden die im Polysaccharid frei vorliegenden Alkoholgruppen methyliert, also eine Methylgruppe an den Sauerstoff gebunden. Starke Basen sind dabei Bedingung, um die Alkoholgruppen zu aktivieren. Nach der Hydrolyse des Polysaccharides und Reduktion der Zucker liegen auf diese Weise partiell methylierte Alditole (PMAAs) vor. Dabei werden Alkoholgruppen frei, die vorher die Zucker untereinander verbunden haben oder an der Zyklisierung der Zucker beteiligt waren. Diese Alkoholgruppen werden in einem letzten Schritt mit einer Acetylgruppe versehen. Diese Endprodukte sind die partiell methylierten Alditol-Acetate (PMAA) (Abbildung 3.8-1). Sichtbar werden so die für die glykosidische Bindung verantwortlichen Gruppen und Substituenten tragende Gruppen. Es ist aber nicht erkennbar, ob es sich um eine glykosidische Verknüpfung oder zum Beispiel eine sulfatierte Alkoholfunktion handelt. Des Weiteren können Aussagen über eine pyranosidische oder furanosidische Form der Monomere getroffen werden. Da die PMAAs flüchtig sind, können sie gaschromatographisch getrennt, die einzelnen MS-Spektren aufgenommen und die Peakflächen quantitativ ausgewertet werden. Die Korrekturfaktoren der Peakflächen wurden der Veröffentlichung von Sweet et al. entnommen oder mangels Literaturdaten und Referenzmaterials aus der experimentellen Bestimmung der Neutralzuckerbestimmung mit Acetylierungsanalyse übernommen (3.4.1.1) [Sweet et al., 1975].

Der Hauptunterschied in den nachfolgend beschriebenen Methoden bestand in den verwendeten unterschiedlichen Basen zur Aktivierung.

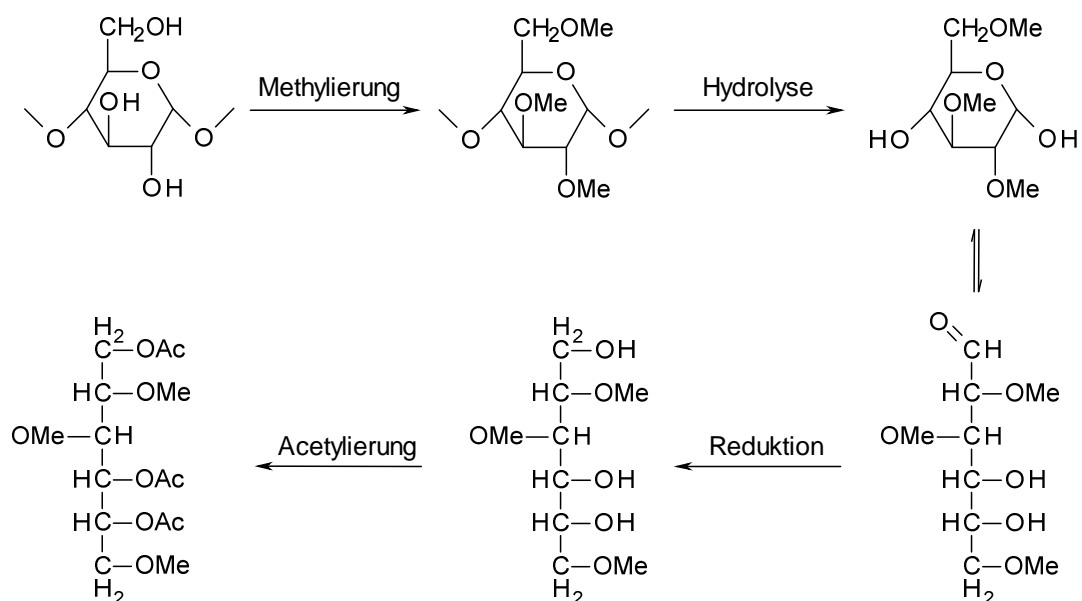


Abbildung 3.8-1: Schritte der Methylierungsanalyse am Beispiel einer α -1,4-D-Glukopyranose.

Verwendete Geräte und Materialien für GC-FID

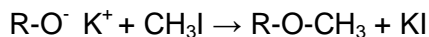
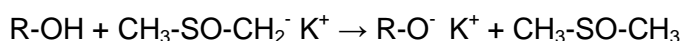
GC-Anlage:	HP 5890 Series II, Palo Alto, USA
Säule:	Optima OV-1701 0,25 µm, Länge 25 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Macherey-Nagel, Düren
Bedingungen:	Inletttemperatur: 250°C Detektortemperatur: 250°C Ofentemperatur: 2 Minuten 170°C, mit 1°C/min auf 210°C, 10 Minuten isotherm 210°C Oven Equib time: 0,1 min Flussrate: 0,7 ml/min

Verwendete Geräte und Materialien für GC-MS

GC-Anlage:	HP 5890 Series II, Palo Alto, USA
Säule:	Optima OV-1701 0,25 µm, Länge 25 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Macherey-Nagel, Düren
Bedingungen:	Inletttemperatur: 260°C Detektortemperatur: 250°C Ofentemperatur: Beginn 120°C, mit 8°C/min auf 170°C, mit 0,5°C/min auf 185°C, mit 20°C/min auf 260°C, 20 Minuten isotherm 260°C Flussrate: 1,0 ml/min
EI-MS-Spektrometer	HP MS Engine 5898 A, Fa. Hewlett Packard, USA
Bedingungen	Ionisation: EI (70 eV), m/z scan: 40-540 Th, 0,94 Scans/sek

3.8.1 Methylierung mit Dimethylsulphanyl-Carbanionen-Aktivierung

Die verwendete Methode für diese Bindungsstypanalyse beruht auf der von Harris et al. veröffentlichten Variation der Methode nach Hakomori [Harris et al., 1984; Hakomori, 1964]. Dabei erfolgt die Aktivierung der freien Alkoholgruppen zu Alkoxid-Ionen für die Methylierung mit Dimethylsulphanyl-Carbanionen (Dimsyl-Reagenz) [Hakomori, 1964]:



Bei Proben mit schlechter Löslichkeit durch geladene Substituenten empfiehlt es sich, die Löslichkeit durch die Bildung von Salzen zu erhöhen. Dabei wurden drei Varianten ausprobiert. Die erste war die Bildung eines Pyridinium-Salzes (3.7.1) wie bei Stevenson und Furneaux sowie Alban und Franz [Stevenson & Furneaux, 1990; Alban & Franz, 1994]. Die zweite Variante war die Bildung eines Salzes mit Triethylamin nach Stevenson & Furneaux. Eine weitere Möglichkeit war die Zugabe von 5 µl Glycerol als Lösungsvermittler zu 100-300 µl wässriger Probenlösung (1 mg/ml) vor der Lyophilisation [Kim et al., 2006].

Das Dimsyl-Reagenz wurde direkt vor der Reaktion mit Iodmethan aus der Umsetzung von reinem Kalium- oder Natriumhydrid mit trockenem DMSO unter Schutzgas hergestellt. Dazu mussten zunächst etwa 800 mg Kaliumhydrid (KH) in Paraffinöl (35%, Fa. Merck, Darmstadt)

unter Argonbegasung (Argon 4.6, Fa. AGA Gas, Hamburg) in mehreren Schritten mit insgesamt 20 ml n-Hexan (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA) gewaschen werden. Nach Entfernung der letzten Teilmenge n-Hexan wurde das Kaliumhydrid im Argon-Strom getrocknet und anschließend unter Eiskühlung und Argonbegasung tropfenweise mit 13 ml trockenem DMSO (Rotidry, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) pro Gramm KH versetzt, sodass sich das Dimsyl-Carbanion bildete. Zu den in 460 µl trockenem DMSO gelösten Proben (1-10 mg) kamen nun unter Rühren und Schutzgas in mehreren Schritten Dimsyl-Reagenz und eisgekühltes Iodmethan (Fa. Merck, Darmstadt).

	Reaktionszeit
40 µl Dimsyl-Reagenz	40 Minuten
10 µl Iodmethan	20 Minuten
120 µl Dimsyl-Reagenz	40 Minuten
30 µl Iodmethan	20 Minuten
400 µl Dimsyl-Reagenz	30 Minuten
300 µl Iodmethan	10 Minuten

Durch die Methylierung in drei Schritten wurde die vollständige Methylierung durch stetig verbesserte Löslichkeit gewährleistet und das spätere Endergebnis nicht durch Untermethylierung einiger schwer zugänglicher Zucker oder Zucker mit geringerer Reaktivität verfälscht [Harris et al., 1984]. Allerdings verringert jede eingefügte Methylgruppe die Methylierung der benachbarten Hydroxylgruppen [Ciucanu & Kerek, 1984]. In Anlehnung an Harris et al. wurde anschließend eine Aufreinigung mittels Phasentrennung zwischen 2 ml zugefügtem demineralisiertem Wasser und organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Als organisches Lösungsmittel wurde eine 2:1 Mischung aus Chloroform (Lichrosolv, Fa. Merck, Darmstadt) und Methanol (Fa. Riedel-de Haen, Seelze) verwendet. Dabei sollten sich die methylierten Polysaccharide in der organischen Phase befinden und Verunreinigungen sowie überschüssiges Iodmethan in die wässrige Phase übergehen und entfernt werden. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (Z3, 2500 U/min, 5 Minuten, Raumtemperatur) getrennt. In einem anschließenden Schritt reagierte restliches Wasser aus der organischen Phase mit 2,2 ml 2,2-Dimethoxypropan (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) und 20 µl Eisessig (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA) bei 90°C ab. Zu letzt wurde die organische Phase im Argonstrom getrocknet. Alternativ kann die methylierte und mit Wasser versetzte Probe aber auch mittels Dialyse aufgereinigt werden [Alban & Franz, 1994; Stevenson & Furneaux, 1990], was sich besonders bei sulfatierten Proben empfiehlt, da diese durch ihre Ladung trotz Methylierung noch zu hydrophil sind und während der Aufreinigung mit der wässrigen Phase entfernt werden. Hierfür wurde zunächst überschüssiges Iodmethan durch Einleiten von Stickstoffgas (5.0) entfernt und die Flüssigkeit in Dialyseschläuche (MWCO 12-14 kDa) überführt. Die Dialyse erfolgte für mindestens 22 Stunden in demineralisiertem Wasser,

welches mehrfach ausgetauscht wurde. Hydrolyse und Reduktion des methylierten Polysaccharides können in einem zweiten Schritt der Bindungstypanalyse zusammengefasst werden. Die Hydrolyse erfolgte dabei wie auch bei der Neutralzuckeranalyse (3.4.1) mit 1 ml 2 molarer Trifluoressigsäure (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) für eine Stunde bei 121°C. Die flüchtige Trifluoressigsäure wurde im Stickstoffstrom bei 40°C entfernt. Die Reduktion vollzog sich durch die Zugabe von 2 ml frischer Natriumborhydrid-Lösung (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) in 2 molarem Ammoniak (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA) bei 60°C in einer Stunde. Die Reaktion stoppte nach Zugabe von 500 µl Aceton (Fa. Merck, Darmstadt) und die Probe trocknete im Stickstoffstrom bei 40°C. Der letzte Schritt der Methylierung, die Acetylierung, setzte nach Zugabe von 3 ml trockenem Acetanhydrid (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) ein. Zuvor wurde die Probe in 200 µl Eisessig aufgenommen sowie 1 ml Ethylacetat (Lichrosolv, Fa. Merck, Darmstadt) und 100 µl Perchlorsäure als Katalysator zugegeben (Fa. Merck, Darmstadt). Die Reaktion endete nach einer Reaktionszeit von fünf Minuten durch Kühlung und die Zugabe von 10 ml demineralisiertem Wasser. Nach Zugabe von 200 µl 1-Methylimidazol (Fa. Merck, Darmstadt) wurden die PMAAs mit 2 ml Dichlormethan (Rotisol, Fa. Merck, Darmstadt) ausgeschüttelt. Das 1-Methylimidazol katalysierte die Umsetzung von überschüssigem Acetanhydrid zu Essigsäure, da es ansonsten zu einer Acetanhydrid-bedingten Auftrennung des Lösungsmittels unter der Chromatographie gekommen wäre [Harris et al., 1984]. Zur Aufkonzentrierung der Dichlormethanphase im Stickstoffstrom kam es in einem letzten Schritt, bevor die Auftrennung und Detektion der PMAAs mittels Gaschromatographie und FID- bzw. MS-Detektion erfolgte.

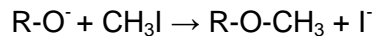
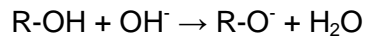
Für die Bildung eines Triethylaminsalzes wurde Probenmaterial in bidestilliertem Wasser gelöst, in einen Dialyseschlauch (MWCO 12-14 kDa) überführt und für 24 Stunden bei 4°C gegen 0,1 M Ethylamin-Lösung dialysiert. Es schloss sich eine Dialyse für 24 Stunden bei 4°C gegen demineralisiertes Wasser an. Bei beiden Schritten wurde die Flüssigkeit nach der ersten und zweiten Stunde sowie am nächsten Morgen erneuert. Das so gewonnene Salz wurde lyophilisiert. Die Bildung des Pyridinium-Salz ist unter 3.7.1 beschrieben. Die von Stevenson und Furneaux beobachtete Degradation und Instabilität des Pyridinium-Salzes konnten nicht beobachtet werden.

Verwendete Geräte und Materialien

Heizplatte	RET basic, Fa. IKA Labortechnik, Staufen
Fühler	IKATRON ETS D3, Fa. IKA Labortechnik, Staufen
	VT-4, Fa. VWR, Darmstadt

3.8.2 Methylierung mit Natriumhydroxid-Aktivierung

Eine weitere Möglichkeit der Methodik zur Bindungstypanalyse ist die Aktivierung der Alkoholfunktionen mit Natriumhydroxid (NaOH) als Base. Dabei dient ein hoher Anteil NaOH als Aktivator für die Alkoholfunktionen [Ciucanu & Kerek, 1984]:



Ein deutlicher Vorteil bei dieser Art der Aktivierung ist die Zeitersparnis, da das Herstellen des Dimethyl-Reagenzes entfällt. Zusätzlich muss bei allen Methylierungsmethoden auf absolute Wasserfreiheit der Geräte und Reagenzien geachtet werden. Das NaOH fängt, im Gegensatz zum Dimethyl-Reagenz, mögliches Restwasser ab [Ciucanu & Kerek, 1984].

3.8.2.1 Methylierung nach Ciucanu

Ciucanu und Kerek verwendeten für die Methylierung der Polysaccharide Pulver von Natriumhydroxid, welches die Alkoholgruppen aktiviert [Ciucanu & Kerek, 1984]. Dazu wurden 4-5 mg trockenes EPS in 460 µl trockenem DMSO (Rotidry, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) gelöst und nach Zugabe von 20 mg trockenem Natriumhydroxid-Pulver für fünf Minuten geschüttelt. Nach der Zugabe von 300 µl Iodmethan (Fa. Merck, Darmstadt) kam es für 6 Minuten unter Schütteln zur Methylierung der EPS. Zur Aufreinigung wurde, abweichend von Ciucanu und Kerek, eine Dialyse (MWCO 12-14 kDa) angeschlossen (3.8.1). Die weiteren Schritte der Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung erfolgten wie unter 3.8.1 beschrieben nach Harris et al. [Harris et al., 1984].

Verwendete Geräte und Materialien

Schüttler	Vibrax-VXR, Fa. IKA Labortechnik, Staufen, 100 U/min
-----------	--

3.8.2.2 Methylierung nach Kim

Ähnlich wie Ciucanu und Kerek beschrieben auch Kim et al. eine Methylierung mit NaOH, allerdings in Form einer feinen Suspension in DMSO [Ciucanu & Kerek, 1984; Kim et al., 2006]. Dabei wurde das verwendete NaOH direkt vor der Verwendung aus einer Lösung ausgefällt und zur Entfernung von Wasser mit trockenem DMSO aufgereinigt. Die Lösung bestand aus einer klaren Mischung aus 400 µl Methanol (Fa. Riedel-de Haen, Seelze) mit 100 µl 50% NaOH (Fa. Carl Roth, Karlsruhe). Nach der Zugabe von 2 ml DMSO (Rotidry, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) und Mischen fiel das NaOH aufgrund der reduzierten Löslichkeit in DMSO / Methanol aus. Dieses wurde bei 3500 bis 4000 U/min (Z3) für 1-2 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abdekantiert worden war, wurde nochmals 2 ml DMSO zugegeben, gründlich gemischt und erneut zentrifugiert. Die Suspension entstand durch Suspendieren des NaOH-Pellets in 2 ml

frischem DMSO. Im nächsten Schritt wurden zu einer Probe in 100 µl DMSO 500 µl der NaOH-Suspension gegeben und gemischt. Nach Zugabe von 100 µl Iodmethan (Fa. Merck, Darmstadt) kam es während einer Reaktionszeit von 10 Minuten unter gelegentlichem Mischen zur Methylierung. Die Aufreinigung erfolgte zunächst durch zehninütiges Einleiten von Stickstoffgas (5.0) zur Entfernung überschüssigen Iodmethans. Die weiteren Schritte der Aufreinigung waren die Zugabe von 2 ml demineralisiertem Wasser und 2 ml Dichlormethans (Rotisol, Fa. Merck, Darmstadt) sowie Phasentrennung durch Zentrifugation (Z3, 3500 U/min, 1 Minute). Die wässrige Phase wurde entfernt und zur weiteren Aufreinigung gab man erneut Wasser zur organischen Phase. Nach Phasentrennung unter Zentrifugation und der Entfernung der wässrigen Phase wurde die organische Phase im Stickstoffstrom entfernt. Eine Variante dieser Methode war die Aufreinigung mittels Dialyse (MWCO 12-14 kDa; 3.8.1). Die Behandlung zur Löslichkeitsverbesserung, die Methylierung, jeweils mit frischer NaOH-Suspension, und die Aufreinigung wiederholten sich für jede Probe. Dabei erfolgte die Methylierung beim zweiten Mal in zwei Stufen.

Reaktionszeit

100 µl NaOH-Suspension	
20 µl Iodmethan	10 Minuten
500 µl NaOH-Suspension	
100 µl Iodmethan	10 Minuten

Die weiteren Schritte der Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung wurden wie von Harris et al. unter 3.8.1 beschrieben durchgeführt [Harris et al., 1984].

Kim et al. beschrieben, wie unter 3.8.1 erwähnt, eine Erhöhung der Probenlöslichkeit durch die Zugabe von Glycerol [Kim et al., 2006]. Die Kombination aus Glycerol-Zugabe und Pyridinium-Salz (3.8.1) und die zwei unterschiedlichen Wege der Aufreinigung kamen in einem Versuchsansatz zusammen (Abbildung 3.8-2). Die Art der Aufreinigung einer Probe war konstant, wobei sich die Methode zur Löslichkeitsverbesserung verändern konnte oder ganz entfiel.

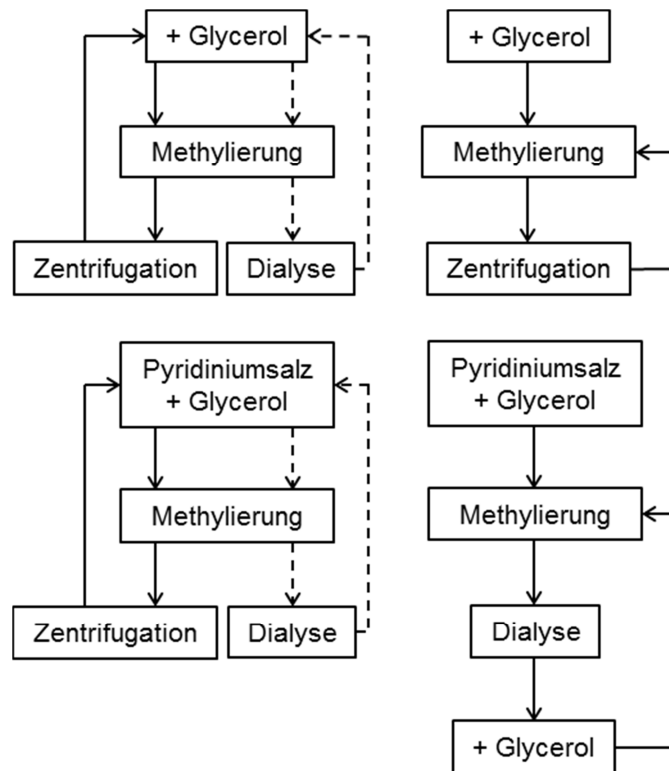


Abbildung 3.8-2: Versuchsansatz der Methylierungsanalyse nach Kim [Kim et al., 2006].

3.8.2.3 Methylierung mit NaOH-Brei

Eine weitere Methode mit NaOH in DMSO ist das als „NaOH-slurry“-Methode bekannte Verfahren. Dazu wurden 3-4 NaOH-Plättchen (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) pro Probe in einem Glasmörser fein gepulvert und anschließend zügig mit 500 µl trockenem DMSO (Rotidry, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) pro Probe zu einem dicklichen Brei, dem „slurry“, verrührt. Dieser Brei wurde abwechselnd mit Iodmethan (Fa. Merck, Darmstadt) zu den in 500 µl DMSO gelösten Proben gegeben. Dabei ist zu beachten, dass der NaOH-Brei aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaft vor jeder Zugabe frisch angerührt werden muss. Während der Reaktionszeiten wurden die Proben mit ca. 200 U/min geschüttelt. Das folgende Zugabeschema erwies sich als optimal:

	Reaktionszeit
500 µl NaOH-Suspension	20 Minuten
50 µl Iodmethan	20 Minuten
500 µl NaOH-Suspension	20 Minuten
200 µl Iodmethan	20 Minuten

Drei Arten der anschließenden Aufreinigung wurden getestet: Zum einen das von Stevenson und Furneaux [Stevenson & Furneaux, 1990] beschriebene Verfahren der Dialyse unter gleichzeitiger Bildung des Ethylamin-Salzes (3.8.1), nachdem die Proben mit mind. 2 ml

demineralisiertem Wasser versetzt und das überschüssige Iodmethan durch eingeleitetes Stickstoffgas ausgetrieben worden war. Als weitere Art wurden 3 ml Chloroform (Lichrosolv, Fa. Merck, Darmstadt) zu den Proben gegeben, die Phasentrennung durch Zentrifugation (Z3, 2500 U/min, 5 Minuten, Raumtemperatur) verbessert und die wässrige Phase entfernt. Die Chloroform-Phase wurde am Rotationsverdampfer getrocknet, die Probe in demineralisiertem Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die dritte Variante war die in 3.8.1 beschriebene Dialyse gegen demineralisiertes Wasser nach Zugabe von mind. 2 ml demineralisiertem Wasser und Austreiben des überschüssigen Iodmethans. Dabei wurde in der endgültigen Methodendurchführung die dialysierte Probe erneut direkt in das Pyridinium-Salz überführt (3.4.5.1), wenn eine mehrfache Methylierung durchgeführt werden sollte.

Die nächsten Schritte waren die Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung wie von Harris et al. [Harris et al., 1984] beschrieben (3.8.1) oder aber in der Variante der reduktiven Hydrolyse mit anschließender Acetylierung nach Stevenson und Furneaux [Stevenson & Furneaux, 1990]. Dafür kamen 50 µl Boran-4-Methylmorpholin-Komplex (MMB, 120 mg/ml, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) zu der Probe. Nach Zugabe von 200 µl 3 molarer Trifluoressigsäure (TFA, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) wurde die Probe bei 80°C für 5 Minuten gelöst und vorhydrolysiert. Nach Zugabe weiterer 50 µl MMB-Lösung und Verschluss der Gefäße mit Argon als Schutzgas hydrolysierten die Proben 60 Minuten bei 121°C. Nach dieser Zeit wurden die abgekühlten Proben zur vollständigen Reduktion mit weiteren 100 µl MMB-Lösung versetzt und im Stickstoffstrom bei 40 °C getrocknet sowie zur Aufreinigung zweimalig in 500 µl Methanol (Fa. Riedel-de Haen, Seelze) aufgenommen und getrocknet. Die Acetylierung der PMAs erfolgte durch Zugabe von 100 µl Acetanhydrid (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) und 100 µl 2 molarer TFA bei 50°C in 10 Minuten. Nach Zugabe von 1 ml Toluol (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) wurde die Probe unter größter Vorsicht, der flüchtigen PMAAs wegen, im Stickstoffstrom eingeeengt. Die Proben wurden in 2,5 ml Dichlormethan (Rotisolv, Fa. Merck, Darmstadt) aufgenommen und zunächst mit 2,5 ml 0,5 molarer Dinatriumkarbonat-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) sowie zwei weitere Male mit 2,5 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Aufkonzentrierung erfolgte zum Schluss im Stickstoffstrom.

Verwendete Geräte und Materialien

Schüttler	Vibrax-VXR, Fa. IKA Labortechnik, Staufen, 200 U/min
Heizplatte	RET basic, Fa. IKA Labortechnik, Staufen
Fühler	IKATRON ETS D3, Fa. IKA Labortechnik, Staufen
	VT-4, Fa. VWR, Darmstadt

3.9 Protein-Analytik

3.9.1 Proteinquantifizierung

3.9.1.1 Berechnung des Proteingehaltes aus dem Stickstoffgehalt

Anhand der Ergebnisse der Elementaranalyse (3.4.2) konnte der Gehalt an Proteinen in den EPS berechnet werden. Dabei war zu bedenken, dass auch Aminozucker einen Beitrag zum Stickstoffgehalt haben. Dieser musste zunächst berechnet und vom Gesamtstickstoffgehalt abgezogen werden.

$$MW_{(\text{GlcN})} 179 \text{ g/mol} \approx 100\%$$

$$MW_{(\text{FucN})} 161 \text{ g/mol} \approx 100\%$$

$$MW_{(\text{N})} 14 \text{ g/mol} \approx 8\%$$

$$MW_{(\text{N})} 14 \text{ g/mol} \approx 8,7\%$$

$$\text{Gehalt}_{(\text{N-Zucker})}\% = \text{Gehalt}_{(\text{Zucker})}\% * 0,08 \text{ bzw. } 0,087$$

$$\text{Gehalt}_{(\text{N-Protein})}\% = \text{Gehalt}_{(\text{N gesamt})}\% - \text{Gehalt}_{(\text{N-Zucker})}\%$$

Der so erhaltene Stickstoffgehalt ist dann auf den Proteinanteil zurückzuführen. Für diesen wurde das mittlere Molekulargewicht der Aminosäuren aus den Ergebnissen der HPLC-Analyse (3.9.2.1) berechnet. Dieses betrug 127 g/mol. Zusätzlich war der durchschnittliche Anteil an Stickstoffatomen pro Aminosäure mit 1,1 errechnet worden. Dieses ergab einen Faktor von 8,24, mit welchem der Proteingehalt berechnet werden konnte.

$$\text{Gehalt}_{(\text{Protein})}\% = \text{Gehalt}_{(\text{N-Protein})}\% * 8,24$$

Bei Proben mit unbekannter Aminosäurezusammensetzung wurde der Proteingehalt aus dem korrigierten Stickstoffgehalt durch Multiplikation mit dem Faktor 6,25 nach Kjeldahl [Kjeldahl, 1883] bestimmt.

3.9.1.2 Proteingehaltsbestimmung mit Coomassie Brilliantblau

Der Test geht zurück auf eine Veröffentlichung von Zor und Selinger zu einem Test nach Bradford [Zor & Selinger, 1996; Bradford, 1976]. Grundlage des Testes ist die Komplexbildung des Coomassie-Farbstoffes mit dem Protein und eine damit verbundene Wellenlängenverschiebung.

Für diesen Test wurde eine Probenlösung (1 mg/ml) in bidestilliertem Wasser sowie eine Verdünnungsreihe mit dem Standard BSA (Albumin Fraktion V, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) von 1 bis 200 µg/ml hergestellt. Für die Reaktion wurde ein Teil Probenlösung mit 20 Teilen Farbreagenz vermischt, welches aus Coomassie Brilliantblau G-250 (Fa. Carl Roth, Karlsruhe), Phosphorsäure 85% (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) und Wasser bestand. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten die Messungen des Anteils gebundenen Farbstoffs bei 595 nm und des Anteils freien Farbstoffs bei 465 nm. Ausgewertet wurde über die erstellte Kalibriergerade (Quotient A590nm/A465nm gegen die Konzentration).

3.9.1.3 Proteingehaltsbestimmung mit Folin-Ciocalteu-Reagenz

Diese Methode basiert auf der Veröffentlichung von Lowry et al. [Lowry et al, 1951]. Die Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe mit Folin-Ciocalteu-Reagenz ergänzt die ebenfalls ablaufende Reaktion mit Cu^{2+} . Bei dieser bildet Cu^{2+} im alkalischen Milieu mit den Peptidbindungen einen violetten Komplex, während Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert wird (Biuret-Reaktion). Dieses fungiert als Katalysator in der Reduktionsreaktion des Folin-Reagenzes (Folin-Ciocalteu-Reagenz, Phosphormolybdat(VI) und Phosphorwolframat) durch aromatische Aminosäuren. Durch diese Reaktion entsteht Molybdänblau [Waterborg, 2002].

Für die Reaktion wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA (Albumin Fraktion V, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) zur Kalibrierung in Konzentrationen von 1 bis 200 µg/ml erstellt. Ein Teil dieser Verdünnungen oder der Probenlösung (10-20 mg/ml) reagierte mit demselben Volumen des Lowry-Farbreagenzes in 15 Minuten bei Raumtemperatur. Das Lowry-Farbreagenz bestand aus Dinatriumkarbonat (Fa. Merck, Darmstadt) in 0,5 N Natriumhydroxidlösung (NaOH, Fa. Carl Roth, Karlsruhe), Kupfer(II)sulfat (Fa. Merck, Darmstadt) und Kaliumtartrat (Fa. Merck, Darmstadt). In einem weiteren Reaktionsschritt wurde die dreifache Volumenmenge Folin-Ciocalteu-Reagenz zugefügt und nach einer weiteren Inkubation von 45 Minuten die Absorption bei 650 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte über die Geradengleichung Absorption gegen BSA-Konzentration der Kalibriergeraden.

3.9.1.4 Proteingehaltsbestimmung mit Ninhydrin

Die Methode der Proteinbestimmung mit Ninhydrin basiert auf einer bekannten Reaktion des Ninhydrins mit primären Aminen. Dabei wird Ninhydrin zu Hydantoin reduziert und bildet Diketohydrindylidendiketohydrindamin [Starcher, 2001]. Allerdings hat erst Starcher diese Methode auf einen Mikrotiterplatten-Assay übertragen. Dabei wird das Ninhydrinreagenz aus 800 mg Ninhydrin (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) durch die Zugabe von 30 ml Ethylenglycol (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim), 5 ml Natriumacetat-Puffer (4 molar, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) und 1 ml Zinn(II)chlorid (100 mg/ml, Fa. Merck, Darmstadt) stabilisiert und lagerfähig gemacht.

Um die freien Aminosäuren mit ihren primären Aminen vorliegen zu haben, wurden die Proben zunächst mit 500 µl 6 n Salzsäure (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA) für 24 Stunden bei 100°C im Trockenschrank hydrolysiert. Bei wässrigen Proben, wie zum Beispiel Fraktionen aus der IAC (3.10.1), mussten 475 µl Probe mit 525 µl konzentrierter HCl vermischt werden, um eine Säureendkonzentration von 6 normal zu erreichen. Da ein Anteil von 10 µl 6 n Salzsäure direkt in der Reaktion nicht stört [Starcher, 2001], konnten die hydrolysierten Proben direkt auf 10 ml mit Wasser aufgefüllt und vermessen werden. Bei sehr geringen Probenmengen und Proben aus der IAC wurden die Proben nach der Hydrolyse neutralisiert und ohne weitere Verdünnungsschritte vermessen. Bei Proben mit größeren Probenmengen musste eine Verdünnungsreihe mit bis zu 1:100 erstellt werden. Für die Farbreaktion wurden dieselben Volumina Probe bzw. hydrolysierte BSA-Verdünnung für die Kalibrierung (Albumin Fraktion V, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) und Ninhydrinreagenz gemischt und inkubiert. Abweichend von der Originalvorschrift erfolgte die Inkubation für 20 Minuten in einem 100°C heißen Trockenschrank. Die Messung wurde bei 570 nm anstatt 575 nm, wie von Starcher beschrieben, vorgenommen. Für die Mittelwertbildung für die Auswertung dienten diejenigen Probenverdünnungen, die nach Einrechnung der Verdünnung ähnliche Absorptionswerte ergaben. Zu schwache und zu hohe Verdünnungen zeigten deutlich abweichende Absorptionswerte. Zusätzlich wurde eine Kalibriergerade mit D-(+)-Glukosamin (99,9%, Fa. Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego) angefertigt. Über diese konnte der theoretische Absorptionwert bestimmt werden, der durch den Gehalt an Aminozucker in der Probe verursacht wurde. Diese theoretische Absorption korrigierte die gemessene Absorption.

Verwendete Geräte und Materialien

MTP-Platten	96F without lid SH, Nunc, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	U96 PP-0,5 ml, Nunc, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MTP-Reader	Tecan Spectra III Thermo, Fa. Tecan, Männedorf, Schweiz
MTP-Inkubator	Amersham Shaker/Incubator, Amersham, GE Healthcare Europe, Freiburg

3.9.2 Proteinzusammensetzung

3.9.2.1 Aminosäure-HPLC

Für die Qualifizierung und Quantifizierung der Aminosäuren des Proteinanteils in EPS von *S. pevalekii* wurde eine Probe vorbereitet und im Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde, Universität Kiel, vermessen. Die angewandte Methode wurde dabei der Veröffentlichung von Göllner et al. entnommen [Goellner et al., 2010].

Etwa 20 mg Probenmaterial wurden in 2 ml 6 normaler Salzsäure für 22 Stunden bei 110°C im Bioblock hydrolysiert und entstandene verkohlte Zuckerbestandteile abzentrifugiert (Z1, 10.000 g, 20 min, 20°C) sowie in einem letzten Schritt abfiltriert (0,2 µm). Das erhaltene Filtrat wurde am Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt und nach erneuter Aufnahme in demineralisiertem Wasser gefriergetrocknet. Die Auftrennung und Identifizierung der Aminosäuren erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, High Performance Liquid Chromatographie (HPLC), auf einer FG0369 Säule. Als Fließmittel diente ein Lithiumacetatpuffer (Fa. Onken, Gründau) mit steigendem pH von 2,95 bis 10,3. Für die photometrische Detektion wurden die Aminosäuren in einer Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin (Fa. Onken, Gründau) umgesetzt und bei 570 nm beziehungsweise 440 nm für Hydroxyprolin und Prolin vermessen.

Verwendete Geräte und Materialien

Amino-Acid-Analyser	Biochrom 30, Fa. Biochrom, Berlin
Detektor	PCB, Fa. Biochrom, Berlin
Spritzenfilter	0,45 µm, Nalgen, Thermo Scientific, Rochester, USA

3.10 Chromatographische Verfahren

Die chromatographische Trennung von Substanzgemischen beruht auf Verteilungsgleichgewichten zwischen zwei Phasen. Grundvoraussetzung für eine Trennung ist ein unterschiedliches Verteilungsgleichgewicht der Substanzen, welches auf die molekularen Beschaffenheiten wie Größe, Polarität und Ladung zurückzuführen ist. Die daraus resultierende Adsorptionsneigung an der stationären Phase ist bei fast allen Verfahren, auch der Ionenaustauschchromatographie (IAC) ausschlaggebend. Bei der Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) allerdings ist es die Fähigkeit der Substanzen, in das stationäre Material einzudringen, welche die Auftrennung ergibt.

Bei allen chromatographischen Verfahren ist die Reinheit der mobilen Phase wichtig für die Qualität der Trennung und die Funktionsfähigkeit der Systeme. Daher wurden die Fließmittel für IAC und GPC vor Verwendung filtriert und mit Ultraschall entgast. Zusätzlich wurden die Proben zur Entfernung größerer Partikel filtriert.

Verwendete Geräte und Materialien

Filtrationseinheit	Filtrationsgerät, Fa. Sartorius , Göttingen mit Omnipore Membran Filters 0,1 µm JV, Fa. Merck Millipore, Billerica, USA
Ultraschallbad	Sonorex super, Fa. Bandelin electronic, Berlin
Spritzenfilter	0,45 µm, Nalgen, Thermo Scientific, Rochester, USA

3.10.1 Fraktionierung mit Ionenaustauschchromatographie

Bei der Fraktionierung der EPS mittels Ionenaustauschchromatographie (IAC) werden die EPS primär nach ihrer Ladung getrennt. Dabei wechselwirken negativ geladene Molekülgruppen der EPS mit positiven Trimethylammoniummethyl-Gruppen der quervernetzten Agarose von Sepharose Q (Fa. Pharmacia, Uppsala).

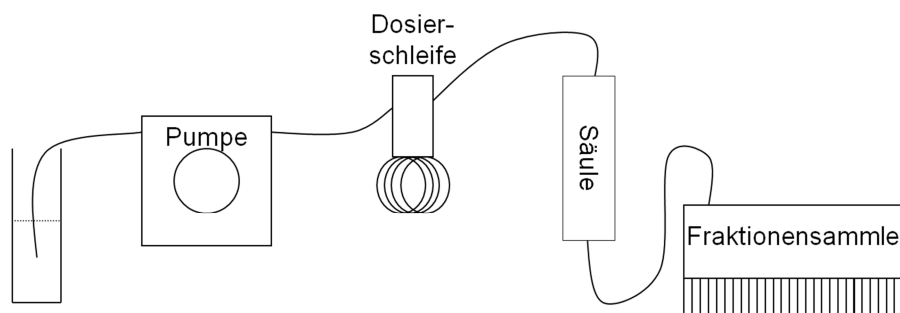


Abbildung 3.10-1: Schematische Darstellung des Aufbaus einer IAC.

Verwendet wurde eine Säule (High Load XK 16/10, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit einem Bettvolumen von 23 ml. Diese mit Sepharose Q gefüllte Säule wurde vor jedem neuen

Trennvorgang mit 100 ml 2 molarer Natriumchlorid-Lösung konditioniert (Natriumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt) und anschließend mit 100 ml bidestilliertem Wasser equilibriert. Nach der Aufgabe von 5 ml Probenlösung (1-2 mg/ml) mit Hilfe der Dosierschleife, kamen je 50 ml verschieden ionenstarker Lösungen zur stufenweisen Elution zum Einsatz. Mittels Fraktionensammler wurden Fraktionen von 10 ml gesammelt. In einigen Fällen entsprach allerdings eine Fraktion einem Elutionsschritt, da für die anschließenden Analyseschritte die Nachweisgrenzen bei Aufteilen der Gesamtmenge unterschritten waren. Die Flussgeschwindigkeit beim Probenauftrag und bei der Elution betrug 1 ml/min und beim anschließenden Waschen und Konditionieren 2,5 ml/min.

Als Elutionsmittel kamen überwiegend unterschiedlich konzentrierte Natriumchlorid-Lösungen zum Einsatz. Die zu untersuchende Probe wurde dabei in bidestilliertem Wasser über Nacht unter Rühren gelöst und filtriert. In einem Versuchsansatz wurde 5 molare Harnstoff-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) verwendet, um mögliche stabile Aggregate und Komplexe zu zerstören. Um bereits während der Probenvorbereitung den chaotrophen Effekt zu nutzen, wurde die Probe in der Harnstoff-Lösung gelöst. Die nun freien ungeladenen Strukturen sollten mit Wasser eluieren, während geladene Moleküle auf der Säulenoberfläche verbleiben sollten. Bei einer direkten Elution mit Harnstoff wäre zu befürchten gewesen, dass die ionischen Wechselwirkungen zwischen Probe und Säulenmaterial durch den strukturbrechenden Effekt gestört und somit aufgehoben worden wären.

Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte teilweise über die Bestimmung des Proteingehaltes (3.9.1.4) sowie grundsätzlich über den Kohlenhydratgehalt (3.3.5.3), wobei lediglich die Absorption des Reaktionsproduktes betrachtet wurde. Einzelne gesammelte Fraktionen wurden zu EPS-Fraktionen vereinigt, dialysiert (MWCO 12-14 kDa) und gefriergetrocknet.

Verwendete Geräte und Materialien

Dosierschleife	Valve V-7, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden
Pumpe	LKB Pump P1, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden
Fraktionensammler	Super Frac, Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
sonst	Luer lock Spritze, Kanüle, Filter 0,45 µm Befülltrichter für Säule, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

3.10.2 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Die GPC beruht auf dem Prinzip des Größenausschlusses. Das Material der Säule ermöglicht die Auftrennung von Molekülen nach Ihrer Größe. Dabei können kleine Moleküle besser in Kavitäten des Materials eindringen als große Moleküle und werden auf diese Weise länger in der Säule gehalten. Die Detektion austretender Moleküle wurde mit zwei Detektoren durchgeführt. Zum einen wurde der Brechungsindex des aus der Säule austretenden Fließmittels bestimmt (RI-Detektor) und mit dem Brechungsindex des reinen Fließmittels verglichen. Dabei werden kleine Moleküle besser erkannt als große. Diese wiederum werden im zweiten, in diesem Fall externen Detektor, einem MALLS-Detektor (Multi Angle Laser Light Scattering-Detektor), besser erkannt. Hierbei haben drei Detektoren, die in unterschiedlichen Winkeln zu einem eingestrahnten Laser-Strahl standen, den von den Probenmolekülen gestreuten Anteil des Lichtes gemessen. Die Auswertung erfolgte relativ über eine Kalibrierung mit Pullulanen mit bekanntem Molekulargewicht (5,9 bis 788 kDa; PL Polysaccharide Standards, Varian Inc. Germany) und deren Retentionszeit sowie anhand des von der Software errechneten absoluten Molekulargewichts (dafür verwendete dn/dc -Werte: Pullulane 0,147, andere Polysaccharide 0,15). Das Ergebnis der Kalibrierung mit Pullulanen wird von der Größe, der Gestalt (linear oder globulär) und der Ladung der Standards beeinflusst und ergibt das relative Molekulargewicht oder auch hydrodynamische Volumen. Die zwei Werte, absolutes Molekulargewicht und hydrodynamisches Volumen, konnte genutzt werden, um Aussagen über die mögliche Form und Beschaffenheit des untersuchten Moleküls zu treffen. Als Fließmittel wurde 0,1 molares Natriumnitrat (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) in bidestilliertem Wasser mit pH 8,0 nach Filtration und Entgasen verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,7 ml/min. Die Proben wurden mit Fließmittel versetzt (Konzentration 1 bis 5 mg/ml), anschließend bei 4°C über Nacht zum Quellen ruhen gelassen und direkt vor der Messung filtriert.

Verwendete Geräte und Materialien

GPC-Anlage	PL-GPC 50 Plus, Polymer Laboratories, Varian Inc. Germany PL Data Stream, Polymer Laboratories, Varian Inc. Germany
MALLS-Detektor	Mini Dawn, Wyatt Technologie Corporation, Dernbach
Säulen	PL-aquagel-OH Guard 8 μ m, 50 x 7,5 mm PL-aquagel-OH mixed, 300 x 7,5 mm PL-aquagel-OH 20 5 μ m, 300 x 7,5 mm PL-aquagel-OH 40 8 μ m, 300 x 7,5 mm Polymer Laboratories, Varian Inc. Germany
Software	Astra, Version 4.73.04, Fa. Wyatt Technologie Corporation, Dernbach

3.10.3 HPTLC

Bei der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie, High Performance Thinlayer Chromatography (HPTLC), handelt es sich um eine Weiterentwicklung der klassischen Dünnschichtchromatographie. Die Trennung basiert auf unterschiedlicher Verteilung der Substanzen zwischen der Plattenoberfläche und dem Fließmittel. Aufgrund einer feineren Korngröße und Korngrößenverteilung des Beschichtungsmaterials erhält man eine verbesserte Auflösung und Trennung bei kurzen Laufstrecken. Außerdem besitzt die Methode eine hohe Sensitivität.

Zur besseren Archivierung wurden die Platten fotografiert.

Verwendete Geräte und Materialien

Platten	HPTLC Silica Gel 60 F ₂₅₄ , 10x10 cm, Fa. Merck, Darmstadt
Auftraggerät	Linomat IV, Fa. Camag Deutschland, Berlin
Kammer	CAMAG horizontal developing chamber, Fa. Camag Deutschland, Berlin

3.10.3.1 Aminosäure-HPTLC

Hierbei galt es, die vermutete Anwesenheit von Proteinen und einen ersten Hinweis auf ihre Zusammensetzung zu erhalten. Dabei wurde die Methode von Classen und Blaschek zum Vorbild genommen [Classen & Blaschek, 2002].

Zur Freisetzung der Aminosäuren mussten die Proben wie für eine Acetylierungsanalyse hydrolysiert werden (3.4.1.1). Dieses Hydrolysat wurde ebenso wie die Referenzsubstanzen (ca. 1 mg/ml) in einer Mischung aus Methanol (Fa. Riedel-de Haen, Seelze) und Wasser (50:50 V/V) aufgenommen. Während der verschiedenen Versuche kam es zur Optimierung der aufgetragenen Volumina. Als optimal erwiesen sich dabei folgende Mengen:

Substanz	Aufgetragene Substanzmengen (µg)
D-(+)-Glukosamin-HCl (Fa. Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego)	7-10
Alanin (Fa. Merck, Darmstadt)	7-10
Serin (Fa. Merck, Darmstadt)	7-10
Glutaminsäure (Fa. Merck, Darmstadt)	7
Threonin (Fa. Merck, Darmstadt)	7
Asparaginsäure (Fa. Merck, Darmstadt)	5-7
Tyrosin (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)	20
Phenylalanin (Fa. Merck, Darmstadt)	20

Tabelle 3.10-1: Referenzsubstanzen der Aminosäure-HPTLC und aufgetragene Substanzmengen

Das verwendete Fließmittel setzte sich aus Acetonitril (Fa. Carl Roth, Karlsruhe), bidestilliertem Wasser und Eisessig (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA) (85/14/1; V/V/V) zusammen. Jede Platte wurde drei Mal entwickelt und nach jedem Lauf für 10 Minuten bei 80°C getrocknet. Die Detektion erfolgte durch Besprühen der Platten mit einem Ninhydrinreagenz (Merck, Darmstadt) (1% in Aceton (Fa. Merck, Darmstadt)) und Erhitzen für 10 Minuten bei 120°C.

3.10.3.2 Zucker-HPTLC

Die Produkte der Partialhydrolyse mit Oxalsäure (3.6.1) und der Hydrolyse mit TFA (3.4.1) von EPS von *S. aquatilis* bei unterschiedlichen Säurekonzentrationen und Hydrolysezeiten wurden mittels HPTLC auf ihre Molekülgrößen untersucht. Die verwendete Methode lehnte sich an die Beschreibung von Akiyama et al. [Akiyama et al., 1995]. Dabei setzte sich das Fließmittel aus 5 Teilen n-Butanol (Rotipuran, Fa. Carl Roth, Karlsruhe), 2 Teilen Methanol (Fa. Riedel-de Haen, Seelze) und 2 Teilen demineralisiertem Wasser zusammen. Die Platten tauchten zur Detektion für drei Sekunden in ein Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure-Reagenz ein und trockneten anschließend bei 150°C für 90 Sekunden. Das Reagenz bestand aus 1 ml konzentrierter Salzsäure (Fa. J. T. Baker, Avantor Performance Materials, USA), 2 ml Anilin (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim), 10 ml 85% Phosphorsäure (Fa. Carl Roth, Karlsruhe), 100 ml Ethylacetat (Lichrosolv, Fa. Merck, Darmstadt) und 2 g Diphenylamin (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim). Um eine Aussage über die Molekülgröße treffen zu können, wurden verschiedene Referenzsubstanzen verwendet (Tabelle 3.10-2). Als optimal hatten sich aufgetragene Substanzmengen von Referenzsubstanzen und Proben von 20-40 µg herausgestellt.

	Polymerisations- grad	Molekulargewicht (g/mol)
L-(+)-Arabinose (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)	1	150,1
L-(-)-Fukose (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)	1	164,0
Polysaccharid MW 180 (Polymer Laboratories, Varian Inc. Germany)	-	180,0
D-(+)-Glukosamin-HCl (Fa. Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego)	1	215,5
N-Acetyl-D-Glukosamin (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)	1	221,1
D-(+)-Cellobiose (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)	2	342,3
D-(+)-Saccharose (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)	2	342,3
D-(+)-Raffinose (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)	3	504,4
Stachyose (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)	4	666,6
Polysaccharid MW 667 (Polymer Laboratories, Varian Inc. Germany)	-	667,0
Stärke, löslich (Fa. Merck, Darmstadt)	>120	>20000*

Tabelle 3.10-2: Referenzsubstanzen der Zucker-HPTLC zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Hydrolyseprodukten. *[Nebesyn et al. 1989]

Die Oxalsäurehydrolyse (3.6.1) von etwa 2 mg EPS wurde mit Oxalsäurekonzentrationen (Fa. Merck, Darmstadt) von 0,5 / 2,0 / 5,0 / 9,0 und 12,5 mmol/l für fünf Stunden bei 100°C durchgeführt. Bei den Konzentrationen 2 und 5 mmol/l kam es zusätzlich zur Variation der Hydrolysezeiten mit 0,5, 2 und 4 Stunden. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (Z1, 6000 U/min, 5 min) und der Überstand einer Ethanol-Fällung (Endkonzentration 80%) bei 4°C unterzogen. Der Überstand der Fällung wurde nach Zentrifugation am Rotationsverdampfer getrocknet und in 1 ml demineralisiertem Wasser aufgenommen.

Für die TFA-Hydrolyse (3.4.1.1) von ca. 2 mg EPS wurden Konzentrationen der Trifluoressigsäure (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) von 0,1 / 0,5 / 1,0 / 1,5, und 2 molar verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 121°C konnte überschüssige Säure am Rotationsverdampfer entfernt werden, indem die Proben drei Mal mit 5 ml demineralisiertem Wasser gewaschen und einrotiert wurden. Das Hydrolysat wurde in 1 ml demineralisiertem Wasser aufgenommen.

3.11 Biologische Aktivität

3.11.1 Testung auf antimikrobielle Aktivität

Diese Testung wurde von Frau PD Dr. S. Mundt am Pharmazeutischen Institut, Abteilung Pharmazeutische Biologie, der Universität Greifswald durchgeführt. Für die Agarplattendiffusionstests wurden die EPS und Positivproben in sterilem destilliertem Wasser gelöst und auf 6 mm Filterplättchen aufgetropft, sodass sich eine Substanzmenge von 100 und 200 µg auf den Plättchen befand. Nach dem Trocknen wurden die Plättchen auf die Oberfläche von mit dem entsprechenden Mikroorganismus beimpften Nähragarplatten aufgelegt. Die Agarplatten wurden bei 4°C etwa 3 h zur Vordiffusion aufbewahrt. Anschließend wurden die Platten bei Testung mit Bakterien 24 h bei 37°C sowie bei Testung mit Hefe für 24 h bei 26°C inkubiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein mit 200 µl Wasser beladenes und getrocknetes Filterplättchen. Eine Übersicht über die Positivkontrollen und die verwendeten Testorganismen findet sich in Tabelle 3.11-1.

Positivkontrolle	Konzentration (µg/paper disc)	Testorganismus	Hemmhof (mm) (einschließlich Plättchen)
Nystatin	10	<i>Candida maltosa</i> SBUG 700	26 mm
Ampicillin	10	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	14 mm
Ampicillin	10	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	35 mm
Ampicillin	50	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	26 mm
Gentamicin	25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	26 mm

Tabelle 3.11-1: Durchgeführte Positivkontrollen der Agarplattendiffusionstests für die Testung auf antimikrobielle Aktivität.

3.11.2 Testung der Komplementaktivität

Zur Testung des Einflusses von Substanzen auf das humane Komplementsystem wurden bisher hämolytische Testsysteme verwendet, die die Aktivität des Membranangriffkomplexes (MAK) nachwiesen. Diese Testsysteme waren als instabil und schwer reproduzierbar bekannt. In dieser Arbeit wurde ein ELISA-Test zur klinischen Diagnostik verwendet und auf die in-vitro Substanz-Aktivitäts-Testung umgearbeitet. Dieser zeichnete sich durch eine einfache und schnelle Handhabung, Robustheit und Reproduzierbarkeit aus [Tudoran & Kirschfink, 2012]. Damit erfolgte eine Einreihung in die von Kirschfink und Mollnes vorhergesagte Ablösung hämolytischer Testsysteme [Kirschfink & Mollnes, 2003]. Das Testkit basiert auf

Mikrotiterplatten (MTP), die mit selektiven Aktivatoren der Komplementwege beschichtet sind. Dabei wird der klassische Weg mit humanem Immunglobulin M, der alternative Weg mit Lipopolysaccharid (LPS) und der Lektin-Weg mit Mannan aktiviert. Nach einer Aktivierungszeit von 60 Minuten bei 37°C wurden die Kavitäten mit einem speziellen Waschpuffer von allen ungebundenen Bestandteilen befreit. Durch Zugabe von einem gegen MAK gerichteten Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase konnte an die Platte gebundenes MAK innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur markiert werden. Nach dem Entfernen überschüssiger Antikörper mit Waschpuffer wurde das Substrat der alkalischen Phosphatase zugegeben und dieses in 30 Minuten bei Raumtemperatur in einen gelben Farbstoff umgesetzt. Die Messung der Absorption des Farbstoffes erfolgte bei 405 nm.

Zunächst mussten die Proben allerdings frei von Endotoxinen (speziell LPS) sein, um dadurch ausgelöste Aktivierungen auszuschließen. Da die Proben bakteriellen Ursprungs waren, war eine Kontamination möglich. Um die LPS-Freiheit zu gewährleisten, wurden die Proben zwei Mal über eine Aufreinigungssäule (Endotrap blue 5/1, Fa. Hyglos, Bernried) gegeben. Um die Salzkonzentration für die nachfolgenden Schritte gering zu halten, diente Wasser (steril, pyrogenfrei, hypoton, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) mit einem Zusatz von 0,1 mmol CaCl₂ (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) als Elutions- und Lösungsmittel. Die Proben waren in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst worden. Alle Glasgeräte und Verbrauchsmaterialien waren pyrogenfrei oder durch Hitzebehandlung (200°C, 4 Stunden) von Pyrogenen befreit worden. Nach der Behandlung wurden die Proben gefriergetrocknet und ausgewogen.

Für die Testung der Komplementaktivität wurden Probenverdünnungen mit dem im Testkit enthaltenen Puffer des jeweiligen Aktivierungsweges erstellt. Dieser Puffer stellte sicher, dass nur der gewünschte Weg reagierte, indem die anderen Wege inaktiviert wurden. Die Konzentrationen der Proben waren dabei doppelt so hoch wie die anschließend im Serum getesteten Konzentrationen. Anstatt des Patientenserums wurde das im Testkit enthaltene Positiv-Serum als Testserum verwendet. Dieses bestand aus gepooltem Humanserum und war von der Firma auf seine Aktivität hin untersucht worden. Dieses Vorgehen erhöhte die Aussagekraft des Testes, da im Normalfall selbst gewonnenes Serum von etwa fünf Personen ohne Überprüfung verwendet worden wäre. Dieses Testserum wurde wie von der Firma vorgegeben mit dem jeweiligen Puffer verdünnt, allerdings nur halb so stark (1:50,5 statt 1:100, 1:9 statt 1:18). Im nächsten Schritt wurden 50 µl der Probenverdünnungen in die Kavitäten der MTP gegeben sowie zügig im Anschluss 50 µl des Testserums. Die dadurch erreichte 1:2 Verdünnung der beiden Komponenten glich die zuvor erstellten doppelten Konzentrationen aus. Als Leerwert diente reiner Verdünnungspuffer, als Negativkontrolle im Testkit enthaltenes Komplement-inaktives humanes Serum. Die weiteren Schritte wurden wie im Testkit vorgeschrieben durchgeführt. Auch die Umrechnung der Messergebnisse in Aktivität in Prozent erfolgte nach Firmenvorgabe.

Für die Auswertung wurde die Aktivität gegen die Konzentration ($\mu\text{g/ml}$ in logarithmischer Darstellung) aufgetragen. Zur Sicherung der Ergebnisse erfolgten überwiegend erneute Messungen an einem oder zwei weiteren Tagen.

Verwendete Geräte und Materialien

Reaktionsgefäße	1,5 ml, pyrogenfrei, Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	100-1000 μl , 34 Multi universal, Fa. Carl Roth, Karlsruhe 1-200 μl , 29 Multi universal, Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Testkits	COMPL 300 / COMPL CP310 / COMPL AP330 / COMPL MP320, Fa. Euro Diagnostica AB, Malmö, Schweden
Inkubationsschrank	Brutschrank, Fa. Memmert, Schwabach
Plattenschüttler	Amersham Shaker/Incubator, Amersham, GE Healthcare Europe, Freiburg
Plattenreader	infinite F50, Fa. Tecan, Männedorf, Schweiz

3.11.3 Testung der Zytotoxizität

Diese Testung wurde von Frau PD Dr. S. Mundt am Pharmazeutischen Institut, Abteilung Pharmazeutische Biologie, der Universität Greifswald durchgeführt. Die Testung wurde an Zellen der Zelllinie 5637 (humane Harnblasenkarzinomzellen) durchgeführt und der Einfluss der EPS über den Neutralrot-Assay, 96 Well Platten (pro Platte 6 Parallelen), mit Doppelbestimmung untersucht. Als Positivkontrolle diente $0,5 \mu\text{M}$ Etoposid. Die Proben wurden in sterilem destilliertem Wasser gelöst. Die Auswertung erfolgte in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle.

4 Ergebnisse *Synechocystis aquatilis*

4.1 Kultivierung

Die Beobachtung des Wachstumsverhaltens von Kulturen diente dem Vergleich unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen und der Kontrolle der Vitalität der Kulturen (3.3). Alle fünf Kultivierungsansätze ohne Variationen in den Kultivierungsbedingungen (-Sa-K) zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf des Zellwachstums, welches als Chlorophyllabsorption bei 440 nm gemessen wurde (3.3.5.2; Diagramm 4.1-1). Die fünf Kultivierungen lagen dabei über einen Zeitraum von 3,5 Jahren verteilt. Die Verläufe von 200901-Sa-K und 200902-Sa-K wiesen eine höhere Zelldichte auf. Die Kurven waren jedoch parallel zu den anderen Kultivierungsverläufen verschoben. Aus den Wachstumskurven war eine Lag-Phase von etwa 3-8 Tagen erkennbar. Keine der Kultivierungen wurde bis weit in den stationären Wachstumsverlauf ausgedehnt, sondern spätestens zu Beginn dieser Phase geerntet.

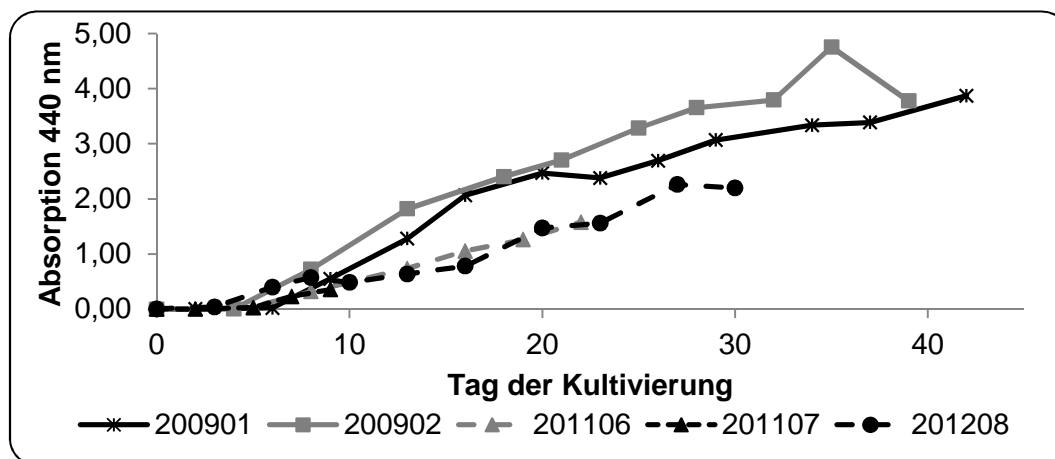


Diagramm 4.1-1: Verlauf der Zelldichten unter der Kultivierung von *S. aquatilis* ohne Variation der Kultivierungsbedingungen. Anzahl der parallelen Batch-Kulturen: 200901 n=4; 200902 n=2 (ab Tag 28 n=1); 201106 n=2; 201107 n=2; 201208 n=2 (ab Tag 10 n=1).

Der Vergleich verschiedener Variationen in den Kultivierungsbedingungen (Diagramm 4.1-2) zeigte leichte Unterschiede in den Kurvenverläufen. Die Wachstumskurven erreichten bei Volumenausgleich mit demineralisiertem Wasser (200902-Sa-Ad) und bei Zufuhr feuchter Luft (200902-Sa-B) im Gegensatz zu den anderen Kurven von 200902-Sa nach etwa 25 Tagen den stationären Bereich. Außerdem war zu erkennen, dass die Wachstumskurve bei Volumenausgleich mit Medium und gleichzeitig halber Lichtintensität (200903-Sa-NL d) deutlich flacher verlief als die Vergleichskurve mit Volumenausgleich durch Medium und voller Lichtintensität (200903-Sa-NL). Die Kurven bei Kontrollbedingungen (200902-Sa-K) und

Volumenausgleich mit Medium (200902- und 200903-Sa-NL) zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten der Kulturen.

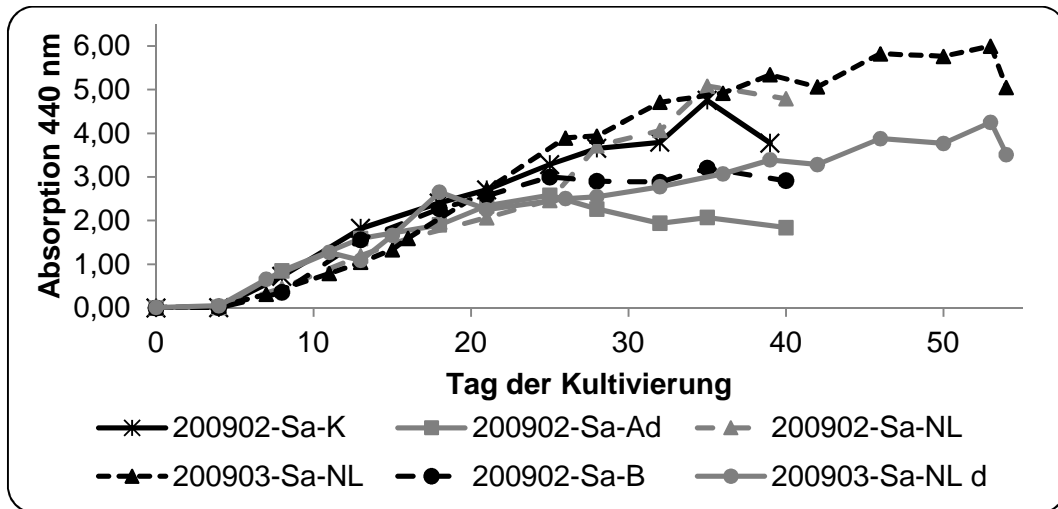


Diagramm 4.1-2: Verlauf der Zelldichten unter der Kultivierung von *S. aquatilis* mit Variationen in den Kultivierungsbedingungen. Anzahl der parallelen Batch-Kulturen: 200902 je n=2 (ab Tag 28 n=1); 200903-Sa-NL n=2 (ab Tag 13 n=1); 200903-Sa-NL d n=1.

Bei der ersten Kultivierung von *S. aquatilis*, 200901-Sa-K, färbte sich das Medium unter der Kultivierung braun. Zusammen mit der hohen Viskosität des Mediums am Ende der Kultivierung kam es zu einer deutlich erschwerten Isolierung. Das Endprodukt waren braun gefärbte EPS. Um dieses Phänomen zu untersuchen wurden bei den verschiedenen Variationen in den Kultivierungsansätzen die Eigenfärbung des Mediums nach Entfernen der Zellen bei 440 nm gemessen (Diagramm 4.1-3). Mit den Kultivierungen 200902-Sa-Ad, -NL und -B sollte ein Substrat- und Platzmangel als Ursache untersucht werden, da die Volumenreduktion durch Verdunstung ausgeglichen werden konnte. Ein Übermaß an Licht als Ursache für die Braunfärbung sollte durch eine reduzierte Lichtintensität (200903-Sa-NL, -NL d) getestet werden. Mit der Kultivierung 200903-Sa-half, bei der die Hälfte des Mediums mehrfach in frisches Medium überführt wurde, konnte der Einfluss von Substrat- und Platzmangel noch weiter betrachtet werden. Eine eindeutige Beobachtung konnte bei den Messungen (Diagramm 4.1-3) nicht gemacht werden. Allerdings war bei den Kulturen 200902-Sa-K, 200902-Sa-B, 200903-Sa-NL, 200903-Sa-NL d und 200903-Sa-half zu erkennen, dass ab einer Zelldichte von etwa 3 bis 4 die Eigenfärbung anstieg (dargestellt durch die grauen Markierungen). Alle anderen Kulturen erreichte nur eine Zelldichte von 2,2 (Absorption der Zellsuspension bei 440 nm), ohne zuvor einen Anstieg der Eigenfärbung zu zeigen. Auffällig war eine sprunghafte Zunahme der Eigenfärbung bei 201107-Sa-K ohne hohe Zelldichte.

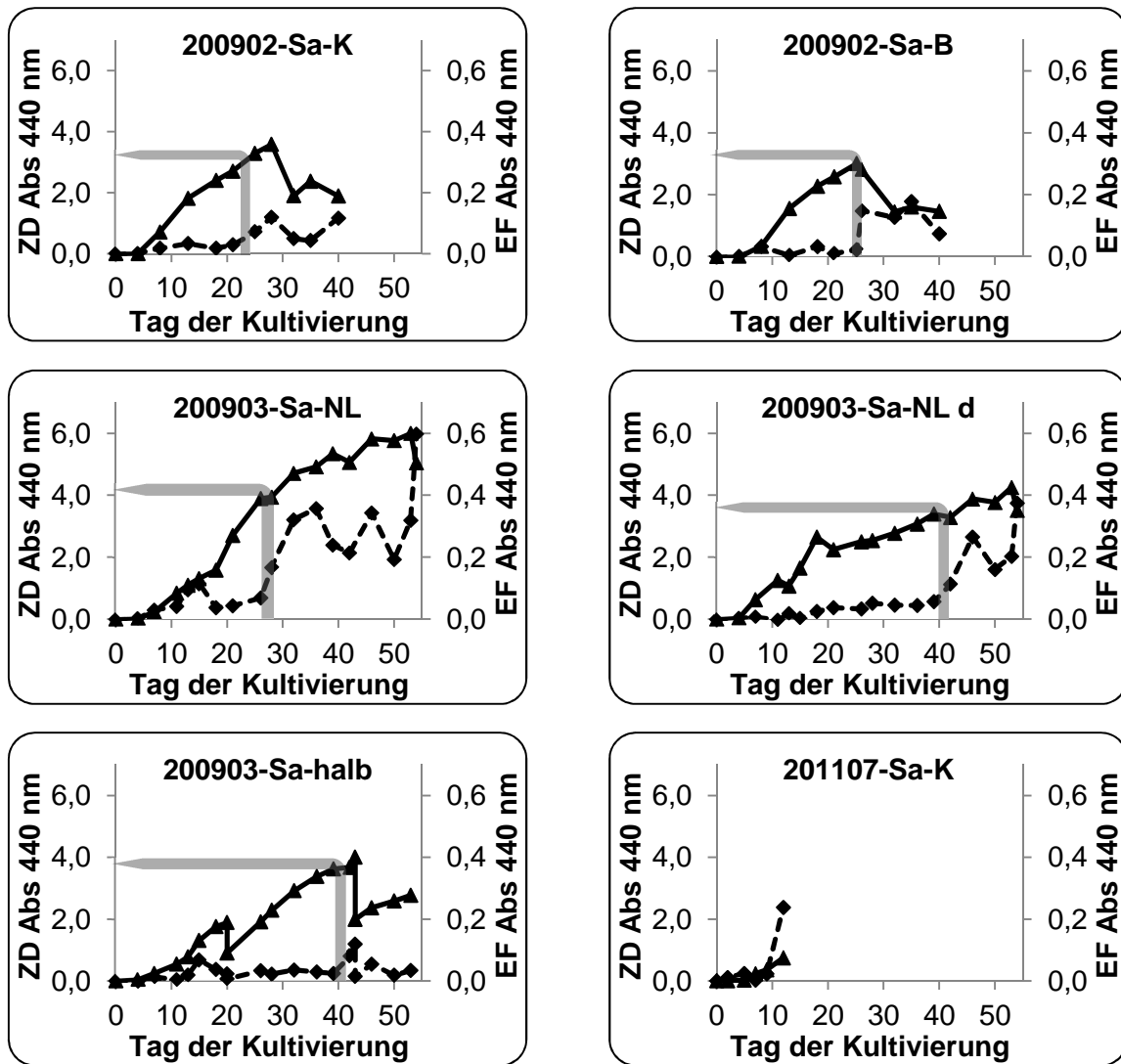


Diagramm 4.1-3: Gegenüberstellung der Zunahme der Zelldichte (ZD, ▲) und der Eigenfärbung (EF, -◆-) des zellfreien Medium von *S. aquatilis* über die Kultivierungsdauer. Graue Markierungen: Bezug des Beginns der Eigenfärbung zur Zelldichte. Anzahl paralleler Batch-Kulturen: 200902 n=2 (ab Tag 28 n=1); 200903-Sa-NL n=2 (ab Tag 13 n=1); 200903-Sa-NL d n=1; 200903-Sa-halb n=1; 201107 n=2.

Ebenso wie die Eigenfärbung konnten auch die Verläufe der EPS-Bildung denen der Zelldichte gegenübergestellt werden. Dazu wurde nach der Reaktion nach DuBois (3.3.5.3) die Absorption des Reaktionsproduktes bei 490 nm gemessen (Diagramm 4.1-4). Dabei wurde ein weitgehend paralleler Kurvenverlauf erkennbar (exemplarisch für 200901- und 200902-Sa-K dargestellt), der bei allen Kultivierungen vergleichbar und nicht durch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen beeinflusst worden war. Lediglich die Kulturen 200903-Sa-NL, -NL d und -halb zeigten für die EPS-Bildung bei einheitlicher Skalierung eine deutlich geringere Steigung der Kurve im Vergleich zu den anderen Kulturen.

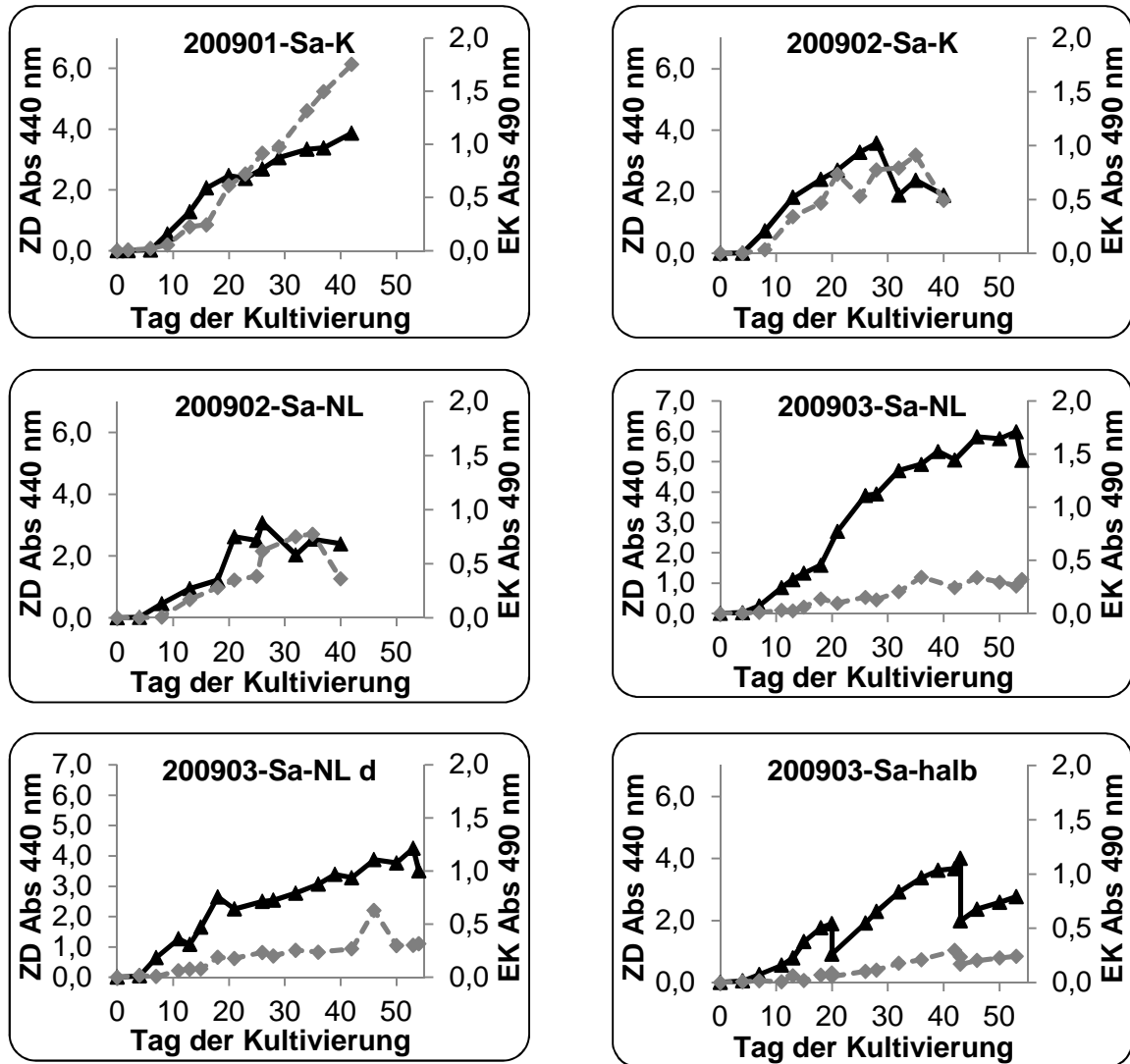


Diagramm 4.1-4: Gegenüberstellung der Zunahme der Zelldichte (ZD, ▲) und der EPS-Konzentration (EK, -◆-) des zellfreien Medium von *S. aquatilis* über die Kultivierungsdauer. Anzahl paralleler Batchkulturen: 200901 n=4; 200902 n=2 (ab Tag 28 n=1); 200903-Sa-NL n=2 (ab Tag 13 n=1); 200903-Sa-NL d n=1; 200903-Sa-halb d n=1.

Während einer Kultivierung wurde der pH-Wert im zellfreien Medium über den Verlauf der Kultivierung bestimmt (Diagramm 4.1-5). Eine leichte Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich war bei allen drei Kulturen zu erkennen.

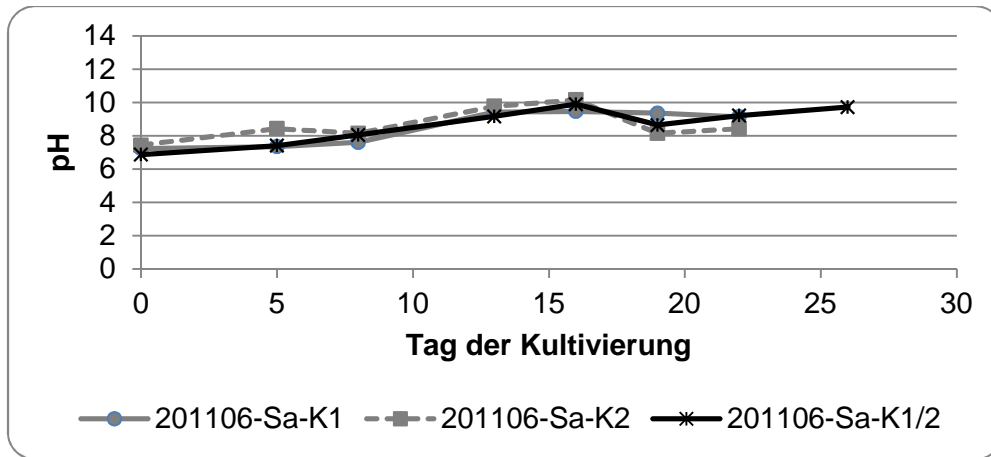


Diagramm 4.1-5: Verlauf des pH-Wertes im zellfreien Medium während der Kultivierung 201106 von *S. aquatilis*. Anzahl paralleler Batch-Kulturen: n=1.

Nicht nur die Kurvenverläufe von Zelldichte, Eigenfärbung und EPS-Konzentration waren von Interesse, sondern besonders die nach der Isolierung erhaltenen EPS-Massen, da diese als Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen zu sehen waren. Zum besseren Vergleich der Werte unterschiedlicher Kultivierungszeiträume untereinander, wurden die gewonnene Massen pro Mediumvolumen auf die Kultivierungsdauer bezogen (Tabelle 4.1-1).

Kultivierung	KD (d)	Biomasse (g)*	Biomasse (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	Protein (mg)*	Protein (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	EPS (mg)*	EPS (mg l ⁻¹ d ⁻¹)
200901-Sa-K	42	17,70	27,27	1108,67	1,71	133,14***	0,21***
200902-Sa-K1	39	3,39	15,80	1177,20	5,49	**	**
200902-Sa-K2	26	4,41	29,76	870,00	5,87	2511,24	17,25
201106-Sa-K1	22	4,20	12,97	558,37	3,46	360,66	2,23
201106-Sa-K2	22			451,67	2,78	257,44	1,59
201107-Sa-K1	12	1,48	16,57	175,52	1,96	136,05	1,52
201107-Sa-K2	12	1,17	13,22	259,19	2,93	85,80	0,97
201208-Sa-K k	8	1,11	17,41	414,82	6,73	111,77	1,81
201208-Sa-K l	30	3,82	4,25	1575,00	6,82	919,90	3,98
200902-Sa-Ad1	26	4,20	20,18	1,03	0,00	1768,33	8,50
200902-Sa-Ad2	40	3,39	10,60	144,18	0,45	**	**
200902-Sa-NL1	26	3,53	16,95	1130,53	5,44	1144,96	5,50
200902-Sa-NL2	40	5,84	18,26	63,31	0,20	**	**
200903-Sa-NL	54	5,41	12,54	872,90	2,02	**	**
200903-Sa-NL k	13	1,39	13,40	470,93	4,53	136,36	1,31
200902-Sa-B1	26	4,46	21,43	1006,45	4,84	1253,46	6,03
200902-Sa-B2	40	4,86	15,18	567,11	1,77	**	**

200903Sa-NL-halb a	23	5,52	30,03	572,41	3,11	**	**
200903Sa-NL-halb c	10	3,90	48,75	319,10	3,99	**	**
200903Sa-NL-halb d	10	3,84	48,06	590,97	7,39	**	**
201106-Sa-1/2	49	2,53	17,72	253,12	1,78	1353,95	9,50
200903-Sa-NL d	54	5,63	13,04	1719,30	3,98	**	**

Tabelle 4.1-1: Übersicht über gewonnene EPS, Protein- und Biomasse-mengen aus den einzelnen Kultivierungen verschiedener Versuchsansätze von *S. aquatilis*.

KD: Kultivierungsdauer. * Gewonnene Masse eines Kultivierungsansatzes.

** Da Eigenfärbung zu stark, erfolgte keine Isolierung. *** Aufgrund der Eigenfärbung nur anteilige Gewinnung der Rein-EPS für erste Analysen.

Neun Kulturen wurden nach der Ernte keiner endgültigen EPS-Isolierung unterzogen, da die Eigenfärbung zu intensiv war und die zu erwartenden EPS somit einen hohen Anteil dieser farbverursachenden Substanz beinhaltet hätten. Die Biomasse lag bei den Kontroll-Ansätzen (200901-, 200902-, 201106- und 201107-Sa-K) zwischen 4,25 und 29,76 mg l⁻¹ d⁻¹. Ebenso weit streuend waren die Werte für die EPS-Mengen mit 0,97 bis 17,25 mg l⁻¹ d⁻¹. Dabei folgten die gewonnenen EPS-Mengen allerdings den Ergebnissen der Zelldichte (Diagramm 4.1-1). Die Verläufe der Zelldichten von der Kultur 200902 lagen in höheren Absorptionsbereichen als 201106, 201107 und 201208, sodass auch die daraus resultierenden EPS-Mengen deutlich größer waren. Im Vergleich zu den Kontrollkultivierungen lagen die EPS-Mengen für die Kultivierungsansätze mit Volumenersatz durch Nährmedium (200902- und 200903-Sa-NL) bei 1,31 und 5,50 mg l⁻¹ d⁻¹ und die erhaltene Biomasse bei 12,54 bis 18,26 mg l⁻¹ d⁻¹. Ein Volumenersatz mit demineralisiertem Wasser (200902-Sa-Ad) ergab eine EPS-Bildung von 8,50 mg l⁻¹ d⁻¹ und eine Biomasse-Bildung von 10,6 bzw. 20,18 mg l⁻¹ d⁻¹. Ein indirekter Volumenersatz durch die Zufuhr angefeuchteter Luft (200902-Sa-B) ergab eine EPS-Bildung von 6,03 mg l⁻¹ d⁻¹ und Zellmassen von 15,18 und 21,43 mg l⁻¹ d⁻¹. Im direkten Vergleich der unterschiedlichen Kulturen von 200902 erbrachten demnach die Kontroll-Kultur und die Kultur mit Volumenausgleich durch demineralisiertes Wasser die höchsten EPS-Erträge, obwohl letzterer das schwächste Wachstum der Vergleichsansätze 200902 zeigte. Die Kultur, die unter halber Lichtintensität und Volumenersatz mit Medium kultiviert wurde (200903-Sa-NL d), enthielt Biomasse mit einer Menge von 13,04 mg l⁻¹ d⁻¹. Die Biomassen des Fed-Batch-Ansatzes (200903-Sa-halb) und der daraus durch Teilung und Weiterkultivierung entstandenen drei Ernten hatten eine Biomasse von 30,03, 48,06 und 48,75 mg l⁻¹ d⁻¹ produziert. Bei einem Anfangsvolumen von vier statt acht Litern (201106-Sa-1/2) lag die Zellmasse bei 17,72 mg l⁻¹ d⁻¹ und die EPS-Bildung bei 9,50 mg l⁻¹ d⁻¹. Mit 9,50 mg l⁻¹ d⁻¹ entspricht diese Kultur der Kontroll-Kultur 200902, obwohl sie eine deutlich höhere Zelldichte erreichte. Betrachtete man alle Werte, konnte keine einheitliche Endaussage getroffen werden. Für die bei der Isolierung

entstandenen Proteinfraktionen ergaben für die Kontrollansätze 1,71 bis 5,87 mg l⁻¹ d⁻¹. Die Proteinmengen für die anderen Kultivierungsansätze lagen bei 0,00 bis 7,39 mg l⁻¹ d⁻¹.

Neben der *S. aquatilis* Kultur der Göttinger Algensammlung (SAG) wurden auch *S. aquatilis* Kulturen der Sammlungen aus Prag (CAUP) und Třeboň (CCALA) untersucht (3.2). Da bei der ersten Kultivierung (201107) ein Pilzbefall der gelieferten CCALA-Kultur festgestellt worden war, erfolgte eine erneute Kultivierung nach Erhalt einer kontaminationsfreien Kultur. Die Verläufe der Zelldichten sind in Diagramm 4.1-6 dargestellt. Es zeigte sich eine Überlagerung der wiederholten Kultivierung von *S. aquatilis* und *S. aquatilis* CCALA. Die Steigungen der Wachstumsverläufe der drei Kulturen zeigten eindeutige Unterschiede.

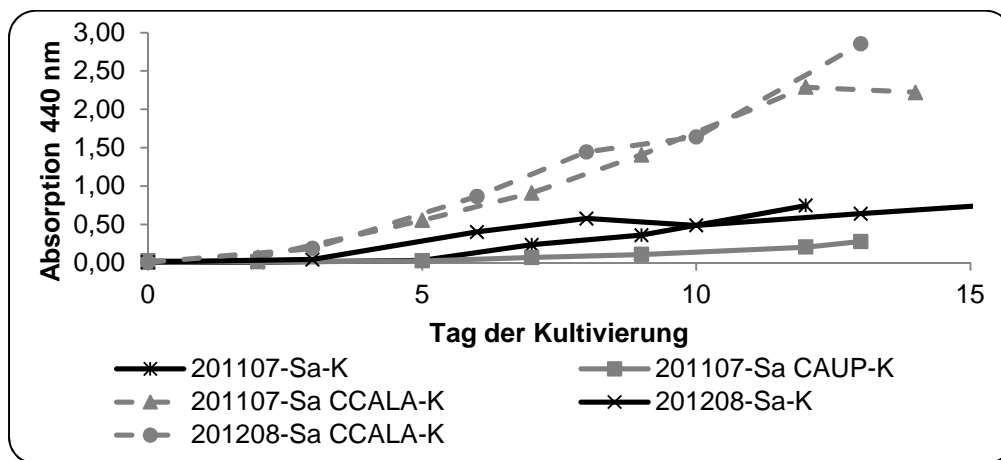


Diagramm 4.1-6: Verlauf der Zelldichte unter der Kultivierung von *S. aquatilis* unterschiedlicher Herkunft unter Kontrollbedingungen. Anzahl der parallelen Batch-Kulturen: 201107 n=2; 201208-Sa-K n=2 (ab Tag 10 n=1); 201208-Sa CCALA-K n=2.

Unterschiede waren auch optisch bei den Kulturen sowie mikroskopisch bei den Zellen zu erkennen (Abbildung 4.1-1). Während *S. aquatilis* eine fein verteilte Zellsuspension von Einzelzellen bildete, war es bei *S. aquatilis* CAUP eine Sedimentschicht mit klarem Überstand. Mikroskopisch waren die Zellen von deutlich unterschiedlicher Gestalt. Die Zellen von *S. aquatilis* CAUP waren zu Zellaggregaten von 2 bis 4 Zellen zusammengeschlossen, welche sich zu größeren Zellverbänden zusammenlagerten. *S. aquatilis* CCALA hatte ein vergleichbares mikroskopisches Bild wie *S. aquatilis*, bildete aber zusätzlich zur feinen Zellsuspension einen Belag an der Glaswand der Weithalsflasche. Die Größen der Zellen lagen bei *S. aquatilis* bei etwa 4 µm, bei *S. aquatilis* CAUP bei ca. 5 µm und bei *S. aquatilis* CCALA bei ca. 3,5 µm.

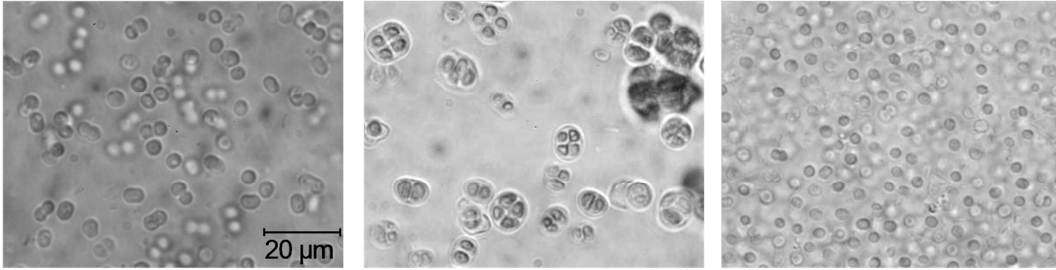


Abbildung 4.1-1: Mikroskopisches Bild der drei *S. aquatilis* Stämme. Rechts: *S. aquatilis* SAG; Mitte: *S. aquatilis* CAUP; Links: *S. aquatilis* CCALA.
Vergrößerung der drei Bilder: 800-fach.

Auch bei diesen Kultivierungen wurde die Eigenfärbung des Mediums über die Kultivierungsdauer bei 440 nm bestimmt. Die beiden *S. aquatilis* Kulturen der SAG-Sammlung zeigten den zuvor schon beschriebenen Verlauf: Unterhalb einer Zelldichte von etwa 3 kam es nicht zur Braunfärbung der Kulturen. Darüber hinaus konnte keine Eigenfärbung bei den Kulturen von *S. aquatilis* CAUP und CCALA beobachtet werden. Lediglich am letzten Kultivierungstag von 201107-Sa-K und –Sa CCALA-K wurde ein plötzlicher Anstieg der Eigenfärbung gemessen, welcher sich nicht in der optischen Bewertung wiederfand. Zumal sollte bei paralleler Entwicklung der Zelldichte auch die Eigenfärbung ähnlich verlaufen und bei 201208-Sa CCALA-K war kein Anstieg zu beobachten.

Neben der Verfolgung der Entwicklung der Zelldichte, war bei diesem vergleichenden Versuchsansatz verschiedener *S. aquatilis* Stämme auch die Bildung an EPS von Interesse. Die dazu bestimmte Absorption des Reaktionsproduktes der Phenol-Schwefelsäure-Reaktion (3.3.5.3) war der Zelldichte gegenüber gestellt worden (Diagramm 4.1-7). Dabei war im Gegensatz zu den parallelen Kurvenverläufen von *S. aquatilis* der Göttinger SAG Sammlung bei *S. aquatilis* CCALA kein eindeutiger Anstieg der EPS-Bildung mit deutlich zunehmender Zelldichte zu erkennen. Im Vergleich sah man bei 201208-Sa-K bei identischer Skalierung der Diagramm-Achsen deutlich die parallele Zunahme der zwei Messparameter. Die Ergebnisse für 201107-Sa CAUP-K zeigten nur eine geringe Zelldichtenzunahme. Daher wurde eine schwache, aber parallel verlaufende Zunahme der EPS-Konzentration angenommen.

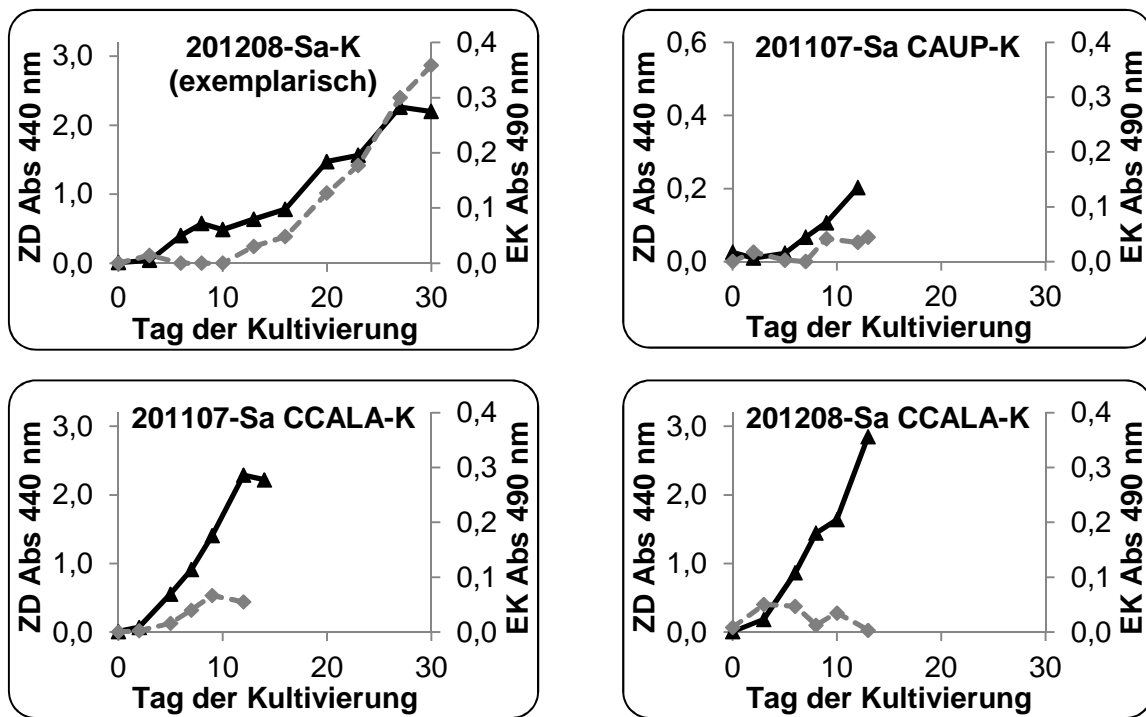


Diagramm 4.1-7: Gegenüberstellung der Zunahme der Zelldicht (ZD, ▲) und der EPS-Konzentration (EK, ◆) des zellfreien Mediums über die Kultivierungsdauer.
Anzahl paralleler Batchkulturen: 201107 n=2; 201208-Sa-K n=2 (ab Tag 10 n=1);
201208-Sa CCALA-K n=2.

Auch für die *S. aquatilis* Kulturen CAUP und CCALA wurden die Massen an Zellmaterial, Protein und EPS nach der Isolierung bestimmt und für eine bessere Vergleichbarkeit auf das Volumen an Nährmedium und die Kultivierungsdauer bezogen (Tabelle 4.1-2). Bei der Bildung von Biomasse war *S. aquatilis* CCALA den zwei anderen Stämmen mit 21,59 bis 28,16 mg l⁻¹ d⁻¹ überlegen (*S. aquatilis* CAUP 14,55 und 16,87 mg l⁻¹ d⁻¹; *S. aquatilis* 13,22 bis 17,41 mg l⁻¹ d⁻¹). Ebenso verhielt es sich bei der gebildeten Proteinmenge. Lag diese bei *S. aquatilis* CCALA bei 6,42 bis 10,60 mg l⁻¹ d⁻¹, so lag sie bei *S. aquatilis* CAUP bei 2,02 und 6,54 mg l⁻¹ d⁻¹ und bei *S. aquatilis* bei 1,96 bis 6,73 mg l⁻¹ d⁻¹. Ein anderes Bild zeigte sich bei der gebildeten EPS-Menge. Dabei hatte *S. aquatilis* mit 0,97 bis 1,81 mg l⁻¹ d⁻¹ mehr gebildet als *S. aquatilis* CAUP (0,38 und 0,45 mg l⁻¹ d⁻¹) und *S. aquatilis* CCALA (0,37 bis 0,42 mg l⁻¹ d⁻¹).

Kultivierung	KD (d)	Biomasse (g)	Biomasse (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	Protein (mg)	Protein (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	EPS (mg)	EPS (mg l ⁻¹ d ⁻¹)
201107-Sa-K1	12	1,48	16,57	175,52	1,96	136,05	1,52
201107-Sa-K2	12	1,17	13,22	259,19	2,93	85,80	0,97
201208-Sa-K k	8	1,11	17,41	414,82	6,73	111,77	1,81
201107-Sa CAUP-K1	13	1,60	16,87	618,35	6,54	36,36	0,38
201107-Sa CAUP-K2	13	1,45	14,55	201,37	2,02	44,39	0,45
201107-Sa CCALA-K1	14	2,78	26,96	663,30	6,42	40,52	0,39
201107-Sa CCALA-K2	14	2,24	21,59	1099,62	10,60	43,17	0,42
201208-Sa CCALA-K	13	5,64	28,16	1734,01	8,66	73,11	0,37

Tabelle 4.1-2: Übersicht über gewonnene EPS- und Biomassemengen aus den einzelnen Kultivierungen von *S. aquatilis* unterschiedlicher Herkunft bei paralleler Kultivierung. KD: Kultivierungsdauer.

Festgestellte Unregelmäßigkeiten in der Neutralzuckerzusammensetzung (4.2.1) führten zu einem Versuch, bei dem zwei Kontroll-Kulturen von *S. aquatilis* (201208) nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer geerntet wurden und die Zellen bei unterschiedlichen Zentrifugationsbedingungen entfernt worden waren. So erfolgte die Zellabtrennung an der Zentrifuge Sigma 6-16K (Z2) mit 4500 und 9000 U/min sowie in zwei Durchgängen mit je 9000 U/min. Bei der Aufarbeitung unter der Lösungsvermittlung mit Dinatrium-EDTA (3.3.7) entstand ein, auch unter der Dialyse, unlöslicher Niederschlag bei einem Teil des 201208-Sa-K k 9000 Versuches. Dieser Niederschlag wurde über einen Papierfilter (Rundfilter 595, Fa. Schleicher & Schueller, Dassel) abgetrennt. Eine Hälfte des Filtrates wurde direkt gefriergetrocknet (9000 filtriert), die zweite Hälfte wurde erneut dialysiert (9000 filtriert dialysiert).

Kultivierung	KD (d)	Vol (l)	Protein (g)	Protein (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	EPS (mg)	EPS (mg l ⁻¹ d ⁻¹)
201208-Sa-K k Z9000	8	3,0	124,57	5,19	36,90	1,54
201208-Sa-K l Z9000	30	5,7	1242,15	7,26	661,42	3,87
201208-Sa-K k Z9000 filtriert		1,35			36,52	1,69
201208-Sa-K k Z9000 filtr.dialysiert	8	1,35	186,24	8,62	18,45	0,85
201208-Sa-K k Z4500	8	1,0	56,43	7,05	11,01	1,38
201208-Sa-K l Z4500	30	1,0	177,32	5,91	151,15	5,04
201208-Sa-K k Z9000x2	8	1,0	47,58	5,95	8,89	1,11
201208-Sa-K l Z9000x2	30	1,0	155,49	5,18	107,33	3,58

Tabelle 4.1-3: Übersicht über gewonnene Mengen Protein und EPS aus den Versuchsansätzen von 201208-Sa-K. Biomassen siehe Tabelle 4.1-1.
KD: Kultivierungsdauer, Vol: Verwendetes Volumen.

Es war kein eindeutiger Unterschied in der entfernten Proteinmenge bei unterschiedlichen Erntemethoden und Kultivierungszeiten (Tabelle 4.1-3) zu erkennen. Die Werte lagen alle in einem Bereich von 5,18 bis 8,62 mg l⁻¹ d⁻¹. Bei den gewonnenen EPS-Mengen fanden sich Unterschiede zwischen den zwei Kultivierungszeiträumen. Nach 8 Tagen Wachstumszeit erhielt man 1,11 bis 1,54 mg l⁻¹ d⁻¹ bei unproblematischer weiterer Aufarbeitung, also ohne die Bildung eines unlöslichen Niederschlags. Auffällig war der Unterschied zwischen den drei bei 9000 U/min geernteten Versuchsansätzen von 201208-Sa-K k. Bei unproblematischer Aufarbeitung lag die gewonnene EPS-Menge bei 1,54 mg/l. Bei Entfernung des Niederschlages über einen Papierfilter erhielt man 1,69 mg l⁻¹ d⁻¹ und bei zusätzlicher erneuter Dialyse nur 0,85 mg l⁻¹ d⁻¹. Bei 201208-Sa-K l lagen die gewonnenen EPS-Mengen zwischen 3,58 und 5,04 mg l⁻¹ d⁻¹.

4.2 Polysaccharid-Analytik

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse der Polysaccharid-Analytik der EPS von *S. aquatilis* dienen der Aufklärung der Zusammensetzung des Zuckeranteils. Aussagen über den strukturellen Aufbau konnten aus den Ergebnissen dieses Teils nicht getroffen werden, sondern nur über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Monomere und der Substituenten.

4.2.1 Neutralzuckerzusammensetzung

Der erste Schritt der Polysaccharid-Analytik war die Aufklärung der Zusammensetzung der Neutralzucker (3.4.1). Diese bestand bei EPS von *S. aquatilis* überwiegend aus drei Zuckern (Abbildung 4.2-1; Tabelle 4.2-1). Dabei machte Fukose mit $37,0 \pm 4,5\%$ den größten Massenanteil aus. Der mengenmäßig am zweitstärksten vertretene Zucker war Arabinose mit $30,2 \pm 3,4\%$. Weitere in der Natur weitverbreitete Zucker waren Glukose ($10,6 \pm 7,7\%$) und Galaktose ($2,4 \pm 2,2\%$). Andere Zucker waren in Spuren enthalten: Mannose, Rhamnose und Xylose. Nicht identifizierte Signale in der GC machten einen Massenanteil von $0,4 \pm 0,4\%$ aus. Zusätzlich zu den bisher genannten Zuckern wurde in den GC-Spektren nach dem internen Standard (myo-Inositol) ein weiteres größeres Signal detektiert, welches zunächst nicht zugeordnet werden konnte.

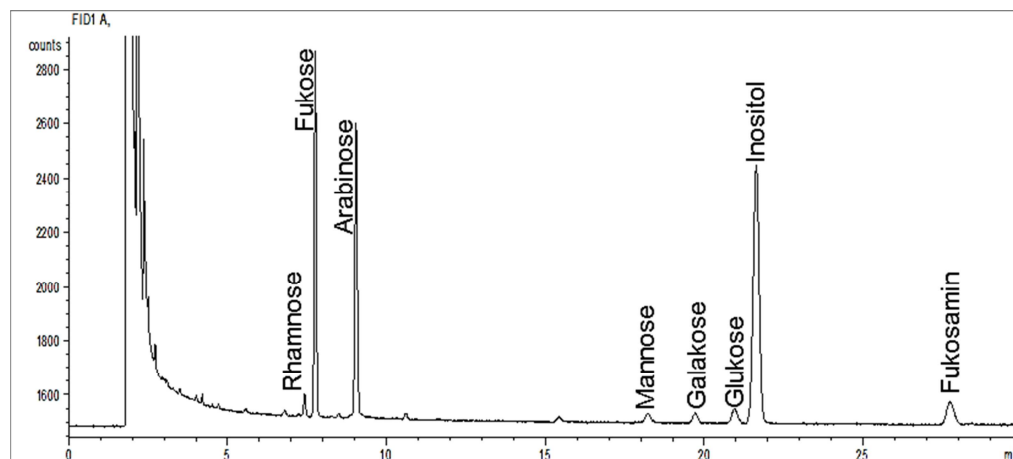


Abbildung 4.2-1: GC-Chromatogramm einer Acetylierungsanalyse von EPS von *S. aquatilis* (am Beispiel 201106-Sa-K1). Myo-Inositol als interner Standard.

Kultivierung	KD (d)	Fukose	Arabinose	Fukosamin	Glukose	Galaktose	Mannose	Rhamnose	Xylose	Unbekannte Zucker	Ausbeute
200901-Sa-K	42	39,3	31,1	26,2	1,8	0,0	0,6	0,7	0,0	0,3	26,5
200902-Sa-K2	26	44,6	36,1	17,3	0,7	0,0	0,0	0,6	0,0	0,4	27,2
201106-Sa-K1	22	36,7	30,7	15,2	12,0	5,4	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0
201106-Sa-K2	22	33,1	28,3	16,4	16,7	4,2	0,0	1,2	0,0	0,0	24,2
201107-Sa-K1	12	36,1	29,1	16,3	13,7	2,6	0,8	0,2	0,0	1,2	27,5
201107-Sa-K2	12	32,3	26,2	16,6	19,0	2,5	1,0	1,2	0,8	0,4	28,1
Mittelwert Kontrolle		37,0	30,2	18,0	10,6	2,4	0,4	0,6	0,1	0,4	25,6
s		4,5	3,4	4,1	7,7	2,2	0,4	0,5	0,3	0,4	3,1
201106-Sa- KL1/2	49	40,8	34,5	16,4	2,9	1,9	3,5	0,0	0,0	0,0	23,0
200902-Sa-Ad1	26	43,2	35,7	18,5	0,7	0,0	0,0	0,8	0,0	1,0	26,9
200902-Sa-NL1	26	42,2	35,1	19,1	0,8	0,5	0,0	0,7	0,0	1,7	25,2
200902-Sa-B1	26	44,6	35,2	18,3	0,6	0,0	0,0	0,7	0,0	0,6	24,9
200903-Sa-NL k	13	39,1	32,3	13,9	4,2	2,4	2,2	2,7	1,0	2,3	15,6

Tabelle 4.2-1: Neutralzuckerzusammensetzung der EPS von *S. aquatilis* unter Kontrollbedingungen und Kultivierungsvarianten. Anteil der Neutralzucker im Polysaccharid in %; Kultivierungsdauer (KD); Ausbeute der Acetylierungsanalyse (%).
s: Standardabweichung

Aufgrund der Lage des Signals im Chromatogramm hinter dem Inositol, war die erste Vermutung, dass es sich um einen Aminozucker handelte, wobei Hexosamine aber ausgeschlossen werden konnten. Um dieses mittels NMR- und MS-Spektroskopie zu klären, wurde zunächst versucht, den unbekanntem Zucker zu isolieren. Die Abtrennung glückte nicht. Allerdings lag die Annahme nahe, dass aufgrund der höheren Häufigkeit von Fukosamin (FucN) in natürlichen Zuckerstrukturen im Vergleich zu Rhamnosamin oder anderen, der unbekanntem Zucker ein FucN sein könnte.

Erst durch den Vergleich mit der Referenzsubstanz war eine Identifizierung möglich. Da FucN kommerziell nicht zu erwerben war, wurde die Referenz FucN-HCl von Dr. A. Fekete und Prof. Dr. A. Liptak im Chemischen Institut, Abteilung Organische Chemie, in Debrecen, Ungarn, synthetisiert und auf ihre Identität überprüft. Die Reinheit der Substanz zeigte sich auch nach der Acetylierungsanalyse im GC-Chromatogramm (Abbildung 4.2-2). Der Vergleich der Retentionszeiten in der GC-Auftrennung nach Acetylierung bestätigte den Verdacht, dass es sich bei dem unbekanntem Zucker in EPS von *S. aquatilis* um FucN handelte. Die relative Retentionszeit bezogen auf den internen Standard der Referenz war 1,282. Der unbekanntem Zucker im EPS hatte eine relative Retentionszeit von 1,283.

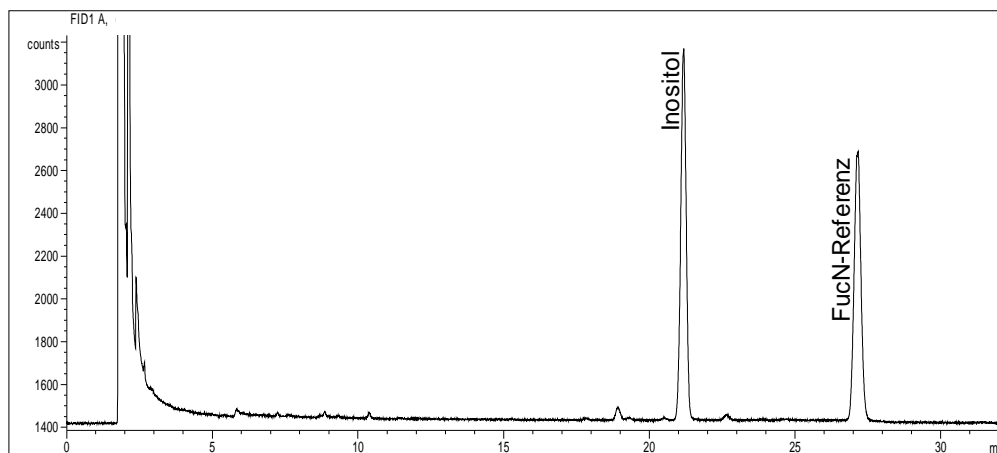


Abbildung 4.2-2: GC-Chromatogramm einer Acetylierungsanalyse der Referenzsubstanz Fukosamin-Hydrochlorid. Inositol als interner Standard.

Da die Retentionszeit keine endgültige Aussagekraft besaß und Verwechslungen mit anderen Zuckern sehr ähnlicher Retentionszeit denkbar wären, wurden die Proben aus der Acetylierungsanalyse und die acetylierte Referenz in der GC-MS vermessen. Die MS-Spektren des unbekanntem Zuckers und der Referenz stimmten überein (Abbildung 4.2-3). Zusätzlich zeigten die aufgenommenen Spektren große Übereinstimmungen mit dem von Okutani und Tanadvanitj veröffentlichtem Spektrum für Fukosamin [Okutani & Tanadvanitj, 1991]. Es handelt sich bei dem Zucker mit dem drittgrößten Anteil demnach eindeutig um Fukosamin. Auch alle anderen gefundenen Neutralzucker in den EPS von *S. aquatilis* wurden vermessen und mit den relativen Retentionszeiten sowie den MS-Spektren der Referenzsubstanzen verglichen.

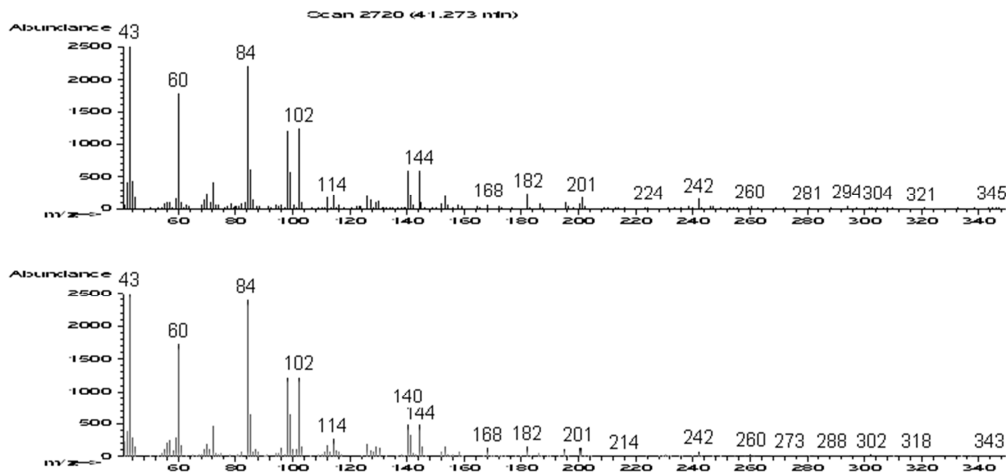


Abbildung 4.2-3: MS-Spektren nach Acetylierung (oben: unbekannter Zucker aus EPS von *S. aquatilis*; unten: Referenz FucN-HCl).

Für die Auswertung der Peakflächen des GC-Chromatogramms benötigt man Faktoren für die Umrechnung (3.4.1.1). Aufgrund der geringen Substanzmenge der FucN-HCl-Referenz war es nicht möglich einen Faktor zu bestimmen. Die Faktorbestimmung von Glukosamin ergab einen Faktor von 3,54. Dieses deutete darauf hin, dass auch der Faktor für FucN nicht wie bei den anderen bestimmten Zuckern zwischen 1,19 und 1,55 läge. Der Stickstoffgehalt in den EPS von *S. aquatilis* aus der Elementaranalyse (3.4.2) wurde allerdings bei einem angenommenen Faktor von 3,54 rechnerisch deutlich überschritten. Die Ergebnisse stimmten bei einem Faktor von 2,00 für FucN am besten überein. Die Berechnung über die Peakfläche des GC-Signals ergab $18,0 \pm 4,1\%$ und über den Stickstoffgehalt der Elementaranalyse $19,7 \pm 2,7\%$. Dabei wurde der Berechnung aus dem Stickstoffgehalt die freie Aminogruppe ohne Acetylierung zu Grunde gelegt, da der Vergleichswert aus der Neutralzuckerbestimmung ebenfalls Acetylgruppen unerkannt und unberücksichtigt ließ. Für die Berechnung wurde der Stickstoffgehalt (%) verwendet (Tabelle 4.2-5).

$$\text{Gehalt}_{(\text{Zucker})} \% = \text{Gehalt}_{(\text{N})} \% / 0,087 * 100\%$$

$$\text{MW}_{(\text{FucN})} 161 \text{ g/mol} \approx 100\%$$

$$\text{MW}_{(\text{N})} 14 \text{ g/mol} \approx 8,7\%$$

Die Zusammensetzung der Neutralzucker kann auch als Kriterium für die Übereinstimmung verschiedener EPS aus unterschiedlichen Kultivierungsansätzen herangezogen werden. Bei den durchgeführten Kultivierungsvariationen (200902-Sa-NL / -Ad / -B) war kein Unterschied zu der parallel durchgeführten Kultivierung unter Kontrollbedingungen oder zu dem Gesamtmittelwert der Kontrollkultivierungen erkennbar. Diese EPS aus verschiedenen Kultivierungen konnten also in diesem Punkt als identisch angesehen werden, was entscheidend für den Einsatz und die Aussagekraft weiterer Untersuchungen war.

Die Ausbeuten der Acetylierungsanalyse der EPS berechnet mittels der Menge des internen Standards lagen bei $25,6 \pm 3,1\%$ (Tabelle 4.2-1).

Neben der Vermessung der acetylierten Monosaccharide in der GC und GC-MS wurden die hydrolysierten underivatisierten EPS von *S. aquatilis* (200902-Sa-NL 1) in der NMR vermessen (3.5.2). Der Vergleich der Signale mit einem Referenzgemisch mit derselben Monomerenzusammensetzung in Art und Konzentration der Zucker Arabinose, Fukose und Glukose zeigte eine große Übereinstimmung (Tabelle 4.2-2, Abbildung 4.2-4). Dabei fiel auf, dass die Glukosekonzentration zu niedrig war, sodass sie keine messbaren Signale ergab. Die Signale der Fukosamin-HCl-Referenz fanden sich im Spektrum der EPS-Probe wieder.

Referenzen	C-1		C-2		C-3		C-4		C-5		C-6
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	
Fukose	93,4	97,5	69,3	72,9	70,5	74,2		72,7		72,1	16,7
Arabinose	98,0	93,8	73,1		73,7		69,8	69,7	67,6	63,7	
Fukosamin -HCl	94,2 90,4		55,5 52,2		72,5 70,8		72,0 71,5		67,7		16,7

EPS <i>S. aquatilis</i>	C-1		C-2		C-3		C-4		C-5		C-6
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	
Fukose	93,5	97,5	69,3	72,9	70,5	74,2		72,7		72,1	16,7
Arabinose	98,0	93,8	73,1		73,7		69,8	69,7	67,6	63,7	
Fukosamin -HCl	94,1 90,4		55,5 52,2		72,5 70,7		72,0 71,5		67,7		16,7

Tabelle 4.2-2: Chemische Verschiebungen (ppm) im ^{13}C -NMR-Spektrum von Referenzsubstanzen und hydrolysiertem EPS von *S. aquatilis*. α - und β -Konfiguration bei Fukosamin-HCl nicht zugeordnet.

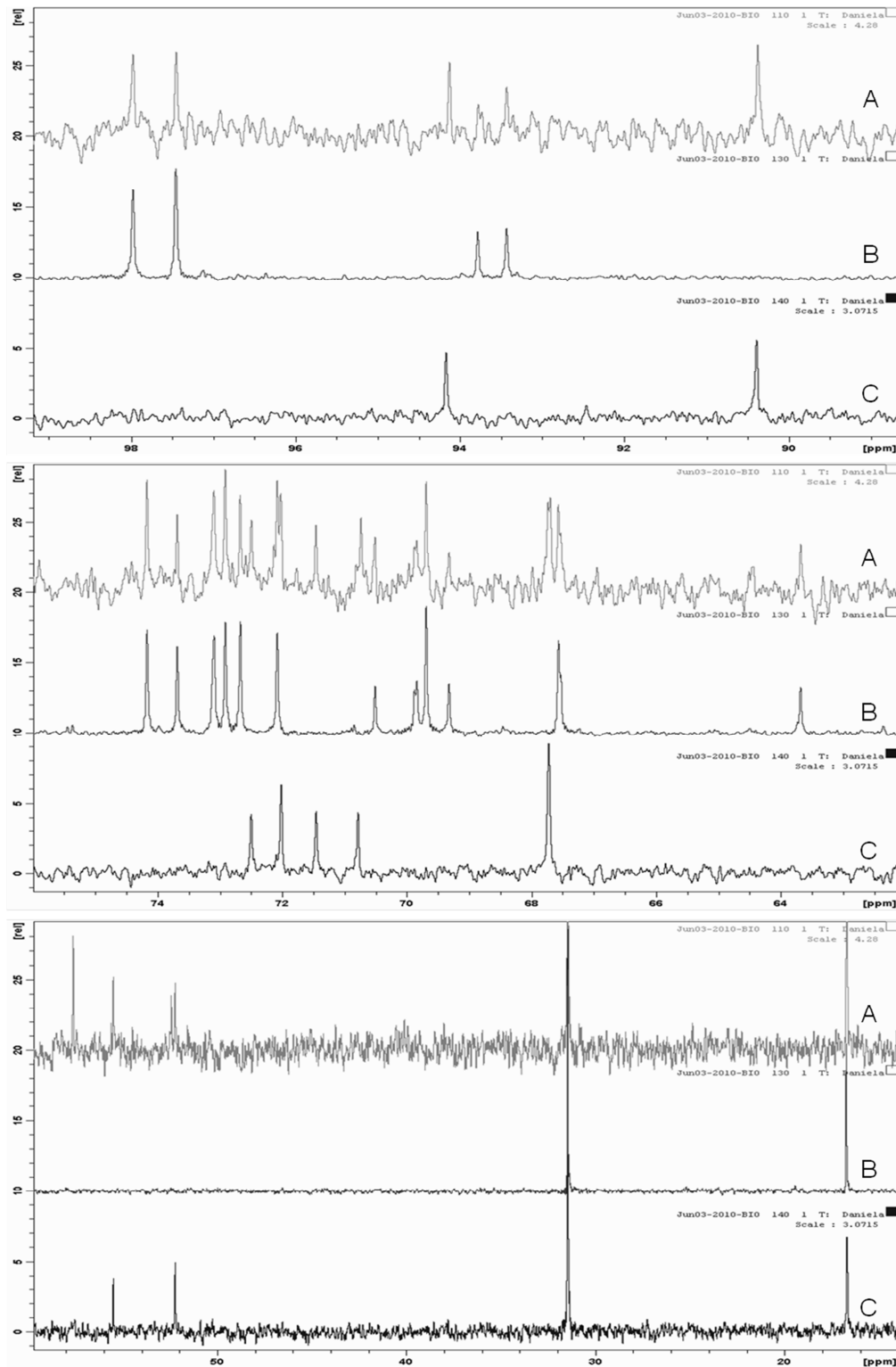


Abbildung 4.2-4: ^{13}C -NMR-Spektrum von Referenzsubstanzen und hydrolysiertem EPS von *S. aquatilis*. A: EPS; B: Fucose + Arabinose + Glukose; C: Fukosamin-HCl.

Kultivierung	KD (d)	Fukose	Arabinose	Fucosamin	Glukosamin	Glukose	Galaktose	Mannose	Rhamnose	Xylose	Unbekannte Zucker	Ausbeute
Mittelwert Sa SAG-K		37,0	30,2	18,0	0,0	10,6	2,4	0,4	0,6	0,1	0,4	25,6
201107-Sa CAUP-K1	13	11,0	6,3	0,0	0,0	20,1	10,0	16,8	4,6	25,2	6,0	15,8
201107-Sa CAUP-K2	13	3,5	7,9	0,0	0,0	34,1	6,8	10,8	6,5	21,2	9,3	18,2
201107-Sa CCALA-K1	14	7,4	1,9	0,0	6,9	18,2	2,6	10,0	29,3	12,3	11,4	25,9
201107-Sa CCALA-K2	14	11,0	1,4	0,0	6,4	25,9	0,8	10,2	21,3	10,7	12,4	30,5
201208-Sa CCALA-K	13	11,5	2,7	0,0	7,0	35,7	0,8	9,1	12,5	10,5	10,1	31,9

Tabelle 4.2-3: Neutralzuckerzusammensetzung der EPS von *S. aquatilis* unterschiedlicher Herkunft unter Kontrollbedingungen. Anteil der Neutralzucker im Polysaccharid in %; Kultivierungsdauer (KD); Ausbeute der Acetylierungsanalyse (%).

Die Ergebnisse der Acetylierungsanalyse der unterschiedlichen *S. aquatilis* Stämme sind in Tabelle 4.2-3 zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zusammensetzungen der Neutralzucker der drei Stämme nicht übereinstimmten. Während die EPS von *S. aquatilis* überwiegend aus Fukose, Arabinose und Fukosamin bestanden, waren diese Monosaccharide in den EPS von *S. aquatilis* CAUP und CCALA nur in geringeren Mengen oder gar nicht enthalten. Stattdessen enthielten diese EPS einen deutlich höheren Anteil an Glukose, Mannose und Xylose. *S. aquatilis* CAUP enthielt zudem größere Mengen Galaktose, *S. aquatilis* CCALA größere Mengen Rhamnose sowie Glukosamin und einen höheren Anteil unbekannter GC-Peaks. Auch im direkten Vergleich der Ergebnisse mit den parallel kultivierten *S. aquatilis* Kulturen waren diese Unterschiede ersichtlich.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Acetylierungsanalyse der EPS von *S. aquatilis* (Tabelle 4.2-3) fiel die, im Vergleich zu den anderen Neutralzuckern, höhere Standardabweichung des Glukoseanteils auf. Eine Veränderung schien zwischen den Kultivierungen 200902 und 201106 eingetreten und nicht abhängig von der Kultivierungsdauer gewesen zu sein (201106-Sa-K: 22 Tage und 12,0 bzw. 16,7% Glc; 201107-Sa-K: 12 Tage und 13,7 bzw. 19,0% Glc). Die Tatsache, dass die zunächst verwendete Durchlaufzentrifuge unter der Ernte von 201005 einen irreparablen Defekt aufwies, könnte eine Erklärung liefern, obwohl bei den anschließenden Ernten auf einer anderen Zentrifuge (Sigma 6-16K) auf die gleiche relative Zentrifugalbeschleunigung geachtet wurde. Um dieses zu überprüfen, wurde die Kultivierung 201208 unter Verwendung verschiedener Zentrifugationsbedingungen geerntet und die Zusammensetzung der Neutralzucker bestimmt (Tabelle 4.2-4). Die Betrachtung des Glukosegehaltes ergab keine Unterschiede bei der Zentrifugation mit 4500 oder 9000 U/min oder bei zweifacher Zentrifugation bei 9000 U/min (9000x2). Vor der Aufreinigung der EPS über Dialyse wurde wie beschrieben Dinatrium-EDTA (3.3.7) quantum satis zugefügt. Bei einem Teil des Versuches 201208-Sa-K k mit 9000 U/min verblieb ein unlöslicher Anteil, welcher zunächst als überschüssiges Dinatrium-EDTA interpretiert wurde. Dieser löste sich auch nicht im Laufe der Dialyse, sodass er über einen Papierfilter (Rundfilter 595, Fa. Schleicher & Schueller, Dassel) abgetrennt wurde (9000 filtriert). Ein Teil des Filtrats wurde erneut dialysiert (9000 filtriert dialysiert). Die Ergebnisse der Neutralzuckeranalytik zeigten, dass es keine Unterschiede in der Zusammensetzung der EPS unterschiedlicher Ernte gab. Ebenso war zu erkennen, dass bei allen Erntearten Glukose nur in geringen Mengen enthalten war. Der einzige auffällige Wert war der Xylosegehalt in den EPS von 201208-Sa-K k nach Zentrifugation bei 9000 U/min. Fehler in der Acetylierungsanalyse wurden allerdings nicht ausgeschlossen.

Kultivierung	Zentrifugation (d)	KD	Fukose	Arabinose	Fucosamin	Glukose	Galaktose	Mannose	Rhamnose	Xylose	Unbekannte Zucker	Ausbeute
Mittelwert 201107-Sa-k	9000	12	34,2	27,6	16,4	16,3	2,6	0,9	0,7	0,4	0,8	27,8
201208-Sa-K k	4500	8	38,4	32,2	18,4	2,6	1,1	2,1	0,8	4,4	0,0	23,0
201208-Sa-K I	30	30	40,8	34,7	21,5	1,3	0,8	0,0	0,7	0,0	0,0	23,2
201208-Sa-K k	9000	8	32,3	28,8	17,8	2,7	1,2	2,9	0,7	13,7	0,0	27,5
201208-Sa-K I	30	30	40,2	35,2	20,5	1,6	1,0	0,0	1,0	0,0	0,5	21,9
201208-Sa-K k	9000	8	38,5	34,7	15,3	2,6	3,3	1,8	1,2	2,6	0,0	18,8
201208-Sa-K I	x2	30	42,0	35,9	17,6	1,6	1,2	0,4	0,9	0,0	0,3	17,8
201208-Sa-K k	9000 filtriert	8	39,3	33,2	15,1	3,3	1,1	2,0	2,4	3,5	0,0	11,03
201208-Sa-K k	9000 filtriert dialys.	8	39,8	34,6	16,6	2,5	1,1	1,5	1,1	2,4	0,4	16,99

Tabelle 4.2-4: Neutralzuckerzusammensetzung in EPS von *S. aquatilis* nach unterschiedlicher Entfernung der Zellen (Zentrifugation in U/min). Anteil der Neutralzucker im Polysaccharid in %; Kultivierungsdauer (KD); Ausbeute der Acetylierungsanalyse (%).

4.2.2 Elementaranalyse

Die Ergebnisse der Elementaranalyse der EPS von *S. aquatilis* sind in Tabelle 4.2-5 dargestellt.

Kultivierung	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
200902-Sa-K2	25,93	5,19	1,46	7,39
200902-Sa-Ad1	26,95	5,00	1,65	7,92
200902-Sa-NL1	26,78	5,04	1,90	7,60
200902-Sa-B1	26,45	4,92	2,01	7,36
201106-Sa-K1	26,45	5,20	1,54	6,84
Mittelwert	26,51	5,07	1,71	7,42
s	0,39	0,12	0,24	0,39

Tabelle 4.2-5: Ergebnisse der Elementaranalysen der EPS von *S. aquatilis* unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen. C: Kohlenstoff; H: Wasserstoff; N: Stickstoff; S: Schwefel.

Aus der mittleren Neutralzuckerzusammensetzung aller Kontrollkultivierungen, dem Sulfat-Gehalt aus den Ergebnissen der Elementaranalyse und dem prozentualen Gehalt an Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel der einzelnen Monosaccharide sowie der SO_3^- -Gruppe (4.2.5) konnte der theoretische Gehalt der Elemente berechnet werden. Diese Berechnung ergab:

C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
40,34	5,51	1,15	6,35

Die Werte stimmten, abgesehen vom Kohlenstoffgehalt, mit den Ergebnissen der Tabelle 4.2-5 annähernd überein.

4.2.3 Acetatgehalt

Die EPS von *S. aquatilis* enthielten keine acylierten Hydroxylfunktionen (3.4.3; Tabelle 4.2-6). Wie in 3.4.3.1 beschrieben, gab die verwendete Methode keine Auskunft über die Acetylierung von Aminogruppen.

Kultivierung	Gehalt O-Acetat (mmol/l)	s
200901-Sa-K	-0,024	0,035

Tabelle 4.2-6: Ergebnis der Acetatbestimmung in EPS von *S. aquatilis*.

4.2.4 Pyruvatgehalt

Die Ergebnisse der Bestimmung des Pyruvatgehaltes der EPS (3.4.4) von *S. aquatilis* sind in Tabelle 4.2-7 dargestellt und ergaben einen Mittelwert von $2,26 \pm 0,49\%$.

Kultivierung	Gehalt Pyruvat (% m/m)	s
200902-Sa-K2	2,46	
200903-Sa-NL k	1,71	0,33
200902-Sa-NL1	2,54	0,16
200902-Sa-B1	2,50	0,46
Mittelwert	2,26	0,49

Tabelle 4.2-7: Ergebnisse der Bestimmung des Pyruvatgehaltes in EPS von *S. aquatilis* verschiedener Kultivierungsansätze.

4.2.5 Sulfatgehalt

Der Sulfatgehalt der EPS von *S. aquatilis* wurde auf zwei Arten bestimmt (3.4.5). Die konduktometrische Bestimmung ergab einen mittleren Sulfatgehalt der EPS aus Kontrollkultivierungen von $21,22 \pm 2,53\%$. Der Anteil an Sulfat in EPS aus Kultivierungsvarianten wich nicht von diesem Wert ab, so dass der Gesamtmittelwert für EPS von *S. aquatilis* bei $21,87 \pm 2,06\%$ lag (Tabelle 4.2-8).

Kultivierung	Sulfat (% m/m)	Kultivierung	Sulfat (% m/m)
200901-Sa-K	17,30	200902-Sa-Ad1	22,40
200902-Sa-K2	21,80	200902-Sa-NL1	21,60
201106-Sa-K1	20,70	200903-Sa-NL k	24,00
201106-Sa-K2	22,10	200902-Sa-B1	20,70
201107-Sa-K1	24,20	201106-Sa-K 1/2	23,90
Mittelwert Sa-K	21,22	Gesamtmittelwert	21,87
s	2,53	s	2,06

Tabelle 4.2-8: Sulfatgehalt in EPS von *S. aquatilis* nach konduktometrischer Bestimmung.

Der kalkulierte Sulfatgehalt aus den Ergebnissen der Elementaranalyse (Tabelle 4.2-5) lag bei $18,37 \pm 0,97\%$ und unterschied sich damit nicht von dem konduktometrisch bestimmten Wert.

Kultivierung	Sulfat (% m/m)
200902-Sa-K2	18,29
200902-Sa-Ad1	19,60
200902-Sa-NL1	18,80
200902-Sa-B1	18,21
201106-Sa-K1	16,93
Mittelwert	18,37
s	0,97

Tabelle 4.2-9: Sulfatgehalt der EPS von *S. aquatilis* aus der Berechnung des Schwefelgehaltes aus der Elementaranalyse.

Der berechnete Sulfatierungsgrad (DS) der Monomere variierte je nach Art der Berechnung. Die Berechnung nach Alban [Alban, 1993] aus den Ergebnissen der konduktometrischen Titration ergab einen mittleren DS von $0,53 \pm 0,1$. Für die Berechnung wurde das mittlere Molekulargewicht (MW) der Monomere aus dem Neutralzuckerzusammensetzung aller Kontrollkultivierungen berechnet (MW = 150,1 g/mol) und das Molekulargewicht der Sulfatanionen (MW = 80 g/mol) verwendet. Die Berechnung aus der Molekülgröße und der anteiligen Größe aller Bestandteile (Zucker und Sulfat) ergab einen DS von 0,34.

Die zwei weiteren *S. aquatilis* Stämme (201107-Sa CAUP-K1 und -K2, 201208-Sa CCALA-K) wiesen in der Elementaranalyse keinen Schwefel und somit kein Sulfat auf.

Die Ergebnisse der Sulfatbestimmung nach 8 und 30 Tagen Kultivierung sowie nach unterschiedlichen Erntebedingungen (Tabelle 4.2-10) zeigten einen verringerten Sulfatgehalt bei achttägiger Kultivierung und besonders nach Entfernen eines unlöslichen Niederschlages durch Filtration. Die übrigen EPS mit einer Kultivierungsdauer von acht Tagen ergaben einen Mittelwert von $12,49 \pm 1,48\%$. Nach 30 Tagen Kultivierung lag der Mittelwert bei $16,96 \pm 1,15\%$.

Kultivierung	Sulfat (% m/m)	
201208-Sa-K k KD: 8 Tage	Z4500	13,27
	Z9000	13,86
	Z9000x2	12,37
	Z9000 filtr.	3,62
	Z9000 filtr.dial.	10,47
201208-Sa-K I KD: 30 Tage	Z4500	15,85
	Z9000	16,89
	Z9000x2	18,14

Tabelle 4.2-10: Sulfatgehalt der EPS von *S. aquatilis* aus der Berechnung des Schwefelgehaltes aus der Elementaranalyse. EPS nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer (KD) und Ernte.

4.2.6 Uronsäuregehalt

Der Test auf Uronsäuren (3.4.6) in EPS von *S. aquatilis* ergab einen Gehalt von $0,88 \pm 0,39\%$ im Mittel (Tabelle 4.2-11). Ein Unterschied zwischen der Kontrollkultivierung 200902-Sa-K 2 und der Kultivierungsvariation 200902-Sa-B1 war nicht zu erkennen. Der Wert für 201107-Sa-K 2 war im Vergleich etwas niedriger. Im Gegensatz zu *S. aquatilis* SAG lag der Uronsäuregehalt bei *S. aquatilis* CAUP zwischen 1,85 und 3,31% und bei *S. aquatilis* CCALA bei 6,80%.

Kultivierung	Gehalt Uronsäuren (% m/m)	s
200902-Sa-K2	1,04	0,18
200902-Sa-B1	1,17	0,53
201107-Sa-K2	0,43	0,10
Mittelwert Sa SAG	0,88	
s	0,39	
201107-Sa CAUP-K1	1,85	0,04
201107-Sa CAUP-K1	3,31	0,06
201208-Sa CCALA-K	6,80	0,13

Tabelle 4.2-11: Ergebnisse der Uronsäurebestimmung der EPS von *S. aquatilis* verschiedener Kultivierungsansätze und unterschiedlicher Herkunft.

4.3 Spektroskopische Methoden

4.3.1 IR-Spektroskopie

Das IR-Spektrum der EPS von *S. aquatilis* (Abbildung 4.3-1) wurde mit Hilfe der Angaben von Wu et al. ausgewertet [Wu et al., 2010]. Das Signal 3385 cm^{-1} entsprach dabei der Streckschwingung der O-H Bindung, das Signal 1037 cm^{-1} der Streckschwingung der C-O Bindung. Das Signal bei 1620 cm^{-1} konnte der asymmetrischen Streckschwingung der C=O Bindung des N-Acetyl-Fukosamins zugordnet werden. Für die Aufklärung dieser Bande wurden ebenfalls Vergleichsspektren von acetyliertem und unacetyliertem Glukosamin aufgenommen. Die freie Aminogruppe lag mit einem schmalen Signal bei 1538 cm^{-1} , während die N-Acetyl-Gruppe ein deutlich stärkeres Signal bei 1624 cm^{-1} ergab. Damit war die Acetylierung der Aminogruppe im Fukosamin belegt. Sulfatgruppen erzeugten mit der Streckschwingung der S=O Bindung die Bande bei 1214 cm^{-1} und mit der Deformationsschwingung der C-O-S Bindung die Bande bei 856 cm^{-1} . Außerdem trat eine Bande bei 835 cm^{-1} auf. Zusätzlich konnte die Bande bei 1408 cm^{-1} aliphatischen Bindungen zugeordnet werden [Okajima-Kaneko et al., 2007]. Die Anwesenheit von O-Acetylgruppen mit einem Signal bei 1737 cm^{-1} [Wu et al., 2010] oder 1732 cm^{-1} [Bilan et al., 2004] wurde ausgeschlossen.

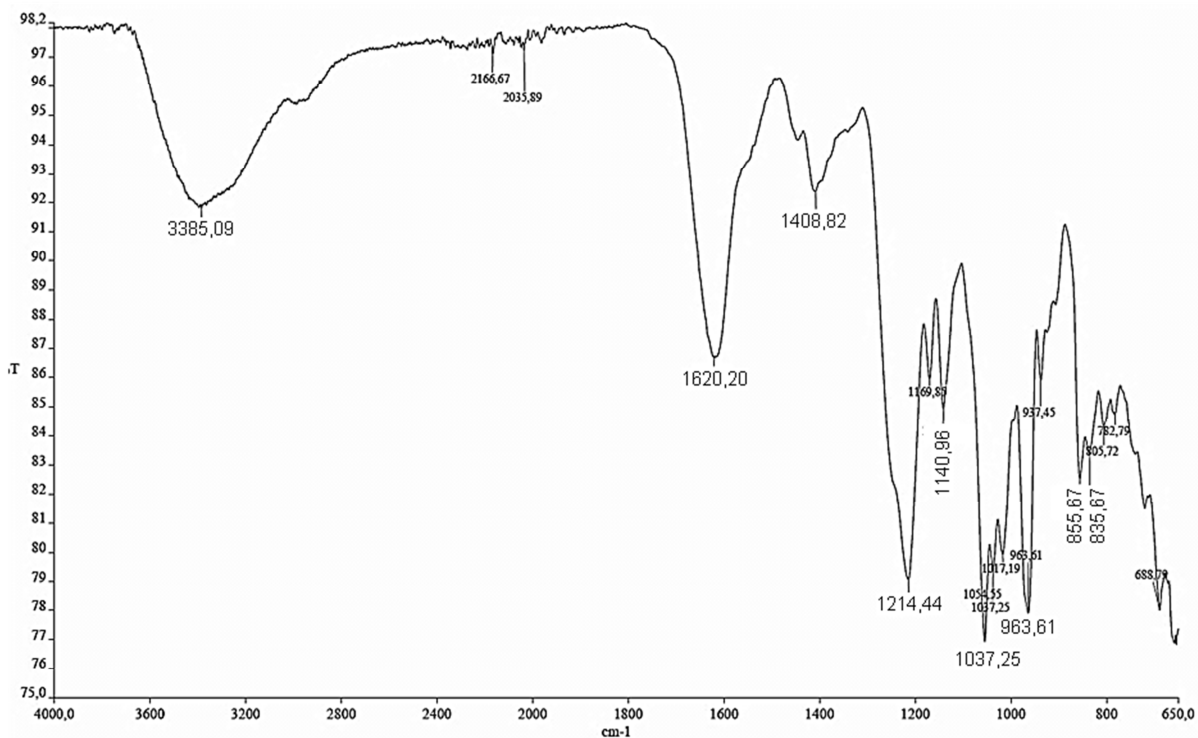


Abbildung 4.3-1: IR-Spektrum der EPS von *S. aquatilis* (200902-Sa-K2).
y-Achse: Transmission in %.

4.3.2 NMR-Spektroskopie

Die EPS von *S. aquatilis* waren nicht ausreichend löslich, um sie im NMR-Spektrometer zu vermessen (3.5.2). Daher wurde der Überstand der Ethanolfällung der fünfstündigen Oxalsäurehydrolyse dafür verwendet (3.6.1; 4.4.1). Die verwendete Probenkonzentration betrug 24,3 mg/ml. Aufgenommen wurden ein ^{13}C - und ein ^1H -Spektrum (Abbildung 4.3-2; Abbildung 4.3-3) sowie ein DEPT-Spektrum (Distortionless Enhancement by Polarisationstransfer). Zusätzlich wurde für die Zuordnung der Kohlenstoff- und der Protonen-Signale mit einem H,C-COSY-Spektrum (Correlated Spectroscopy) gearbeitet. Die ^{13}C -Signale des internen Standards Aceton lagen bei 31,45 und 2,225 ppm.

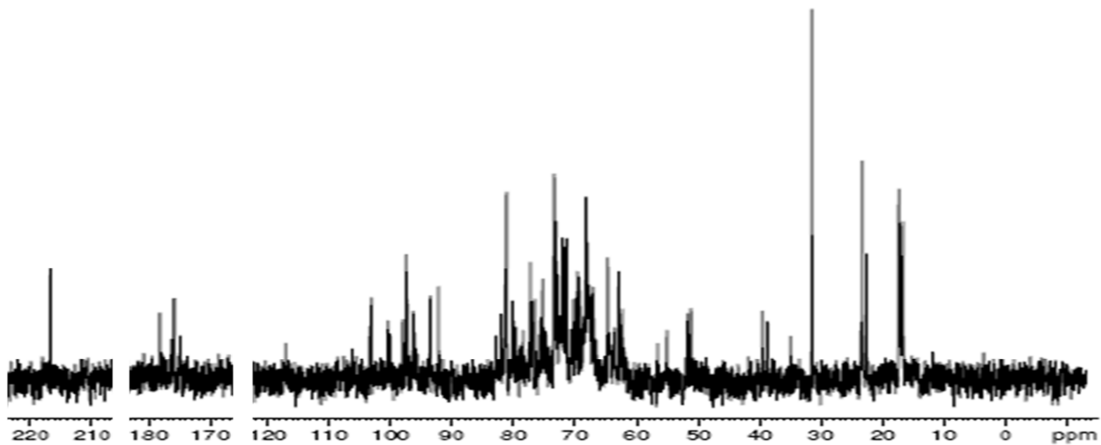


Abbildung 4.3-2: ^{13}C -NMR-Spektrum der EPS von *S. aquatilis* nach Oxalsäurehydrolyse.

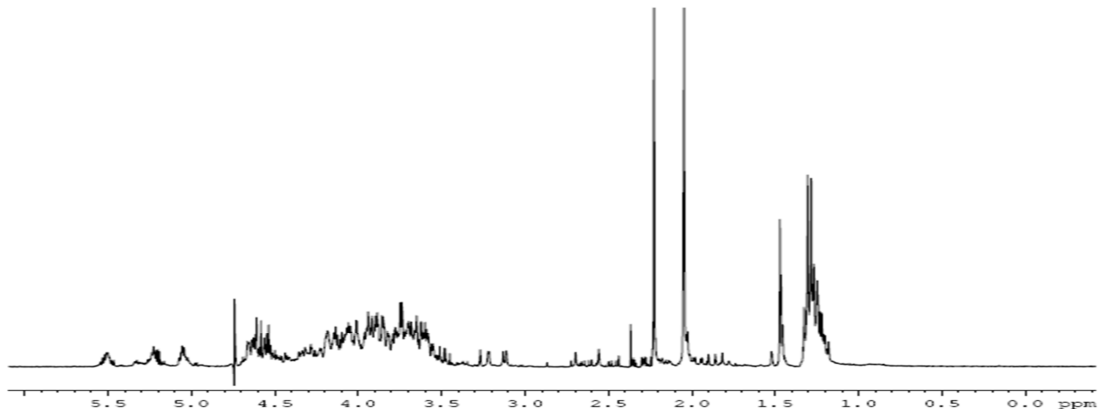


Abbildung 4.3-3: ^1H -NMR-Spektrum der EPS von *S. aquatilis* nach Oxalsäurehydrolyse.

In Bereich von 15-25 ppm im ^{13}C -Spektrum befanden sich die Signale der Methylgruppen. Zwischen 16,63 und 17,27 ppm fanden sich drei Signale für Methylgruppen von C6-Desoxy-Zuckern. Dabei konnte das Signal bei 16,63 ppm der CH_3 -Gruppe des Fukosamins zugeordnet werden, welches auch bei Vinogradov et al. mit 16,4 ppm zu finden war [Vinogradov et al., 1989] und in dieser Arbeit in der Monomerenform bei 16,66 ppm gefunden wurde (4.2.1). Die zwei weiteren Signale bei 17,10 und 17,27 ppm wurden demnach mit der Kenntnis der

Neutralzuckerzusammensetzung (Tabelle 4.4-2) der Fukose zugeordnet und lagen damit ebenfalls in dem von Bilan et al. beschriebenen typischen Bereich für α -Fukopyranosen von 16,8-17,4 ppm [Bilan et al., 2007]. Eine Fukofuranose hätte ein Signal bei etwa 18 ppm bzw. 19,5-19,9 ppm gezeigt [Bilan et al, 2004; Bilan et al, 2008]. Die Signale der Monomeren lagen bei 16,71 ppm (4.2.1). Die Signale bei 23,18 und 23,42 ppm entstammten der Acetamidogruppe des Fukosamins (Vinogradov et al.: 23,5 ppm). Mit diesem Fund konnte die Acetylierung der Aminogruppe des Fukosamins belegt werden. Ein weiteres Signal (22,50 ppm) in diesem Bereich des ^{13}C -Spektrums konnte nicht genauer zugeordnet werden. Dabei könnte es sich um freies Acetat oder, nach den Veröffentlichungen von Bilan et al., um eine O-Acetylgruppe handeln.

Die Methylgruppe der N-Acetylgruppe fand sich im ^1H -Spektrum bei einer Verschiebung von 2,05 ppm mit einem ausgesprochen intensiven Signal und einem Integral von 3 wieder. Außerdem ließ sich dieser Gruppe noch ein schwaches Signal bei 1,52 ppm zuordnen. Die Methylgruppe des Fukosamins fand sich bei 1,23 ppm mit einem Integral von 3 wieder. Die zwei Signale der Methylgruppe der Fukose lagen um 1,30 ppm mit einem Integral von 6. Das unbekannte Signal (1,47 ppm) hatte ein Integral von 1,6 und entstammte demnach keiner Methylgruppe.

Die C2-Atome des Fukosamins fanden sich mit vier Signalen bei 51,10, 51,62, 54,98 und 56,45 ppm (Vinogradov et al.: 49,7-56,9 ppm; Monomere (4.2.1): 52,21 und 55,49 ppm). Eindeutige Signale im ^1H -Spektrum für das FucNAc lagen bei 3,85, 4,11 und 4,19 ppm.

Aus dem Vergleich des ^{13}C -Spektrums mit dem DEPT-Spektrum konnten CH_2 -Gruppen identifiziert werden. Mehrere lagen zwischen 61 und 65 ppm, wobei es sich bei einigen Signalen um nicht vollständig aufgetrennte Mehrfachsignale handelte: 62,16 ppm (^1H : 3,22 und 3,80 ppm), 62,77 ppm (^1H : 3,74 und 3,98 ppm), 63,45 ppm (^1H : 3,62 und 3,74 ppm) und 64,51 ppm (^1H : 3,68 und 3,87 ppm). Bei diesen könnte es sich um die CH_2OH -Gruppe von Hexosen bzw. furanosidischer Pentosen, die Vinogradov et al. bei 61,7-62 ppm beschrieben, oder die CH_2 -Gruppe pyranosidischer Pentosen gehandelt haben. Auch Karácsonyi et al. beschrieben die Verschiebung des C5 von Arabinopyranosen mit 63,8 ppm [Karácsonyi et al., 1984]. Zusätzlich konnte das Vorhandensein furanosidischer Arabinose ausgeschlossen werden, da diese Signale des C1 bei 106,9-108,7 ppm hätte zeigen müssen [Thude & Classen, 2005]. Weiter ins Hochfeld verschoben fanden sich noch einige weitere CH_2 -Signale bei 38,59 ppm (^1H : 2,62 ppm), 38,71 ppm (^1H : 1,97 und 2,48) und 39,50 ppm (^1H : 1,89 und 2,24 ppm).

Der Bereich der C2 bis C5-Atome lag zwischen 66,41 und 82,81 ppm und konnte nicht weiter differenziert werden (^1H : 3,45-4,69 ppm).

Der Bereich anomerer Kohlenstoffe erstreckte sich von 91,95 bis 102,38 ppm. Bei drei weiteren Signalen im allgemein als Anomeren-Bereich bezeichneten Verschiebungsbereich handelte es sich um quartäre Kohlenstoffatome, wie das DEPT- und das H,C-COSY-Spektrum zeigten. Diese quartären Atome lagen bei 103,01 ppm, 103,23 ppm und 116,96 ppm. Es konnten im H,C-COSY-Spektrum 13 anomere Kohlenstoffe gezählt werden, deren genaue Zuordnung zu einzelnen Neutralzuckern allerdings nicht möglich war (Abbildung 4.3-4; Tabelle 4.3-1).

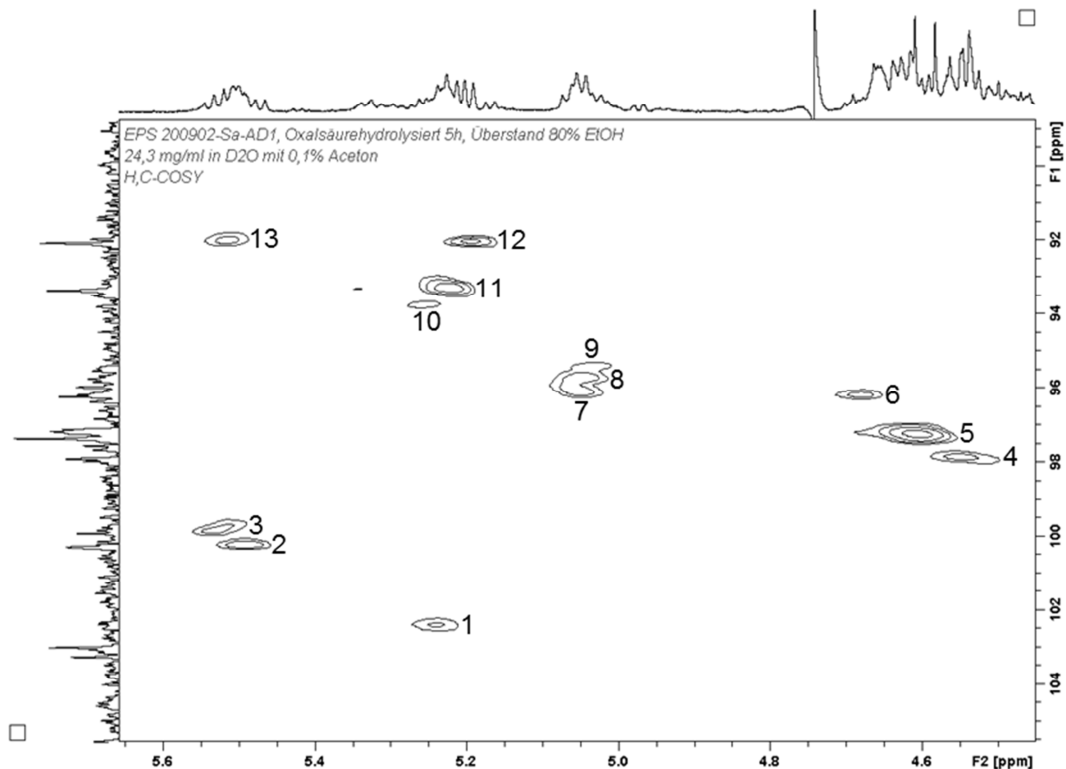


Abbildung 4.3-4: Bereich anomerer Kohlenstoffe im H,C-COSY-Spektrum der EPS von *S. aquatilis* nach Oxalsäurehydrolyse.

¹³ C	¹ H	Monomere (4.2.1)	¹³ C	¹ H	Monomere (4.2.1)
		90,38 FucN	96,14	5,05	
91,95	5,52		96,20	4,68	
92,05	5,19		97,13	4,61	
93,34	5,22	93,45 α-Fuc			97,45 β-Fuc
		93,79 β-Ara	97,87	4,55	
93,79	5,26				97,98 α-Ara
		94,13 FucN	99,90	5,53	
95,43	5,04		100,26	5,50	
95,72	5,05		102,38	5,24	

Tabelle 4.3-1: chemische Verschiebungen (ppm) im Anomerenbereich der EPS von *S. aquatilis* nach Oxalsäurehydrolyse.

Ein Signal bei 97,33 ppm zeigte keine Protonenkopplung im H,C-COSY-Spektrum, war nach dem DEPT-Spektrum allerdings auch eindeutig weder ein quartärer Kohlenstoff noch eine CH₂-Gruppe. Die Anomeren-Signale konnten teilweise α -Monomeren von Fukose und FucNAc zugeordnet werden, für welche Vinogradov et al. in Übereinstimmung eine chemische Verschiebung bei 98-102 ppm beschrieben hatte. Dieses wurde auch durch Bilan et al. bestätigt, welche eine α -anomeren Region im ¹H-Spektrum bei 5,0-5,6 ppm berichteten [Bilan et al., 2004]. Des Weiteren konnte von α -Fukopyranosen ausgegangen werden, da diese, laut Bilan et al., eine Verschiebung bei 94-105 ppm zeigten [Bilan et al., 2007]. Auch Arabinofuranosen konnten, wie bereits beschrieben, anhand der Anomeren-Signale ausgeschlossen werden, wo hingegen auch die große Anzahl CH₂-Signale für Arabinopyranosen sprach. Dabei war die Bestimmung der Konfiguration der Arabinopyranosen nicht eindeutig möglich. Die β -Konfiguration war in mehreren Veröffentlichungen in einem Bereich von 94,8 bis 101,2 ppm angesiedelt, aber auch für die α -Konfiguration war eine Verschiebung von 102,7 ppm angegeben worden [Ciancia et al., 2007; Göllner et al., 2011; Glushka et al., 2003]. Die drei ins Hochfeld verschobenen ¹H Signale (4,55-4,68 ppm) der anomeren Zucker gehörten vermutlich zum FucNAc, wie auch die C2-Signale des FucNAc im Vergleich zu Nicht-Aminozuckern ins Hochfeld verschoben waren.

Zwei Signale bei 174,81, 175,82, 176,25 und 178,10 ppm konnten als quartäre Gruppen dem Carbonylkohlenstoff von Acetylgruppen zugeordnet werden. Nach Vinogradov et al. lagen diese Signale aus N-Acetyl-Gruppen bei 174,8 bis 175,5 ppm. Nach Bilan et al. lagen O-Acetylgruppen bei etwa 175 ppm.

4.4 Partialhydrolytische Methoden

4.4.1 Oxalsäurehydrolyse

Die Fraktionen der Partialhydrolyse der EPS von *S. aquatilis* mit Oxalsäure (3.6.1) wurden hinsichtlich der Ausbeuten, Zusammensetzung und Molekülgrößen untersucht. Die Ausbeuten zeigten eine große Streuung (Tabelle 4.4-1). In jedem Fall war die Fraktion des Ethanolüberstandes mit ihren niedermolekularen Bestandteilen deutlich am größten (72,71 ± 12,71% für 5 Stunden Hydrolyse), gefolgt von dem gefällten hochmolekularem Anteil (26,71 bis 3,74%) und den ungelösten Bestandteilen (1,71 bis 25,83%). Anhand der Ausbeuten der Fraktionen war kein Unterschied zwischen den Hydrolysezeiten erkennbar. Die Gesamtausbeuten, bezogen auf die eingesetzten EPS Mengen, lagen zwischen 50,47 und 87,25%.

RD (h)	Kultivierung	% bez. auf Ausbeute			% bez. auf Einwaage	
		Ungelöste Bestandt.	Rückstand Fällung	Überstand Fällung	Summe Ausbeute	
1	200902-Sa-NL1	1,71	7,46	90,83	72,23	
2	200902-Sa-NL1	6,49	8,20	85,31	80,41	
3	200902-Sa-NL1	n.b.	3,74	96,26	87,25	
4 (n=2)	200902-Sa-NL1	8,46	15,03	76,50	77,83	
		25,83	26,71	47,46	50,47	
5 (n=5)	200902-Sa-NL1	\bar{x}	13,66	13,63	72,71	69,14
	200903-Sa-NL k					
	200902-Sa-Ad1	s	10,82	9,67	12,71	27,00
	200902-Sa-K2					
201106-Sa-K1						

Tabelle 4.4-1: Ausbeuten der Oxalsäurehydrolyse mit EPS von *S. aquatilis* mit anschließender Fraktionierung bei unterschiedlicher Hydrolyse-(Reaktions)-Dauer (RD).

Der Überstand der Ethanol-fällung nach fünfstündiger Hydrolyse der EPS von 200902-Sa-Ad1 wurde in der Elementaranalyse untersucht (3.4.2, 3.9.1.1; 3.4.5.2). Es wurde ein Proteingehalt von -3,34% (Stickstoffgehalt 0,98%) berechnet. Die Berechnung des Sulfatgehaltes ergab 11,95% (Schwefelgehalt 4,83%). Der Sulfatverlust lag demnach, im Vergleich zu dem intakten EPS von 200902-Sa-Ad1 (19,6%), bei 39,04%.

Kultivierung	RD (h)	Fukose	Arabinose	Fukosamin	Glukose	Galaktose	Mannose	Rhamnose	Xylose	Unbekannte Zucker	
Überstand Fällung											
200903-Sa-NLk	1	48,4	38,0	11,0	0,7	0,4	0,2	0,7	0,1	0,5	
	2	42,4	33,6	22,2	0,4	0,0	0,0	0,6	0,0	0,7	
	3	43,4	32,9	17,6	2,0	0,9	1,0	0,7	1,0	0,5	
	4		42,4	32,6	22,9	0,4	0,1	0,0	0,8	0,0	0,7
			28,0	29,7	13,1	1,4	23,8	0,9	1,2	0,3	1,5
200902-Sa-Ad1	5	42,6	33,1	15,8	1,4	1,5	1,2	1,0	1,9	1,0	
		37,5	34,1	17,4	0,9	1,1	1,2	0,0	0,8	6,1	
Rückstand Fällung											
200903-Sa-NLk	1	41,8	33,2	6,0	9,7	5,0	0,0	4,2	0,0	0	
	3	24,9	11,0	0,0	28,2	6,6	13,6	3,9	11,6	0	
	4		13,1	40,8	0,0	12,9	7,7	4,8	0,0	9,0	11,7
			33,6	29,6	12,3	7,1	3,5	3,3	3,3	0,5	6,7
	5	6,6	18,0	20,2	14,5	10,1	6,4	0,0	0,0	24,1	
Ungelöste Bestandteile											
200903-Sa-NLk	4	36,2	23,4	5,5	12,0	4,4	4,5	8,4	1,0	4,5	

Tabelle 4.4-2: Neutralzuckeranalyse der Fraktionen aus der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *S. aquatilis* nach unterschiedlichen Hydrolysezeiten. RD: Hydrolyse-(Reaktions)-Dauer; Anteil der Neutralzucker in %.

Die Acetylierungsanalyse (Tabelle 4.4-2) des niedermolekularen Anteils aus dem Überstand der Ethanolfällung spiegelte die Neutralzuckerzusammensetzung der Gesamt-EPS (Tabelle 4.2-1) wieder. Außerdem waren keine Unterschiede in der Zuckerzusammensetzung zwischen den variierten Hydrolysezeiten erkennbar. Die zweite Acetylierungsanalyse nach einer Hydrolysedauer von 4 Stunden zeigte einen hohen Galaktoseanteil an, aufgrund dessen die restlichen Zuckeranteile verringert waren. Die Ergebnisse der Neutralzuckerbestimmung für die Rückstände der Ethanolfällung ergaben ein heterogenes Bild ohne erkennbare Zusammenhänge. Der ungelöste Anteil nach vier Stunden Hydrolyse entsprach in seiner Zuckerzusammensetzung ebenfalls der Zusammensetzung der Gesamt-EPS. Die Acetylierungsanalyse des Überstandes der Ethanolfällung ohne hydrolytische Spaltung von Mehrfachzuckern zeigte nur sehr schwache Signale im Gaschromatogramm mit 56,3% Arabinose und 43,7% eines unbekanntes Signales.

Die Bestimmungen der Molekülgrößen mittels GPC (3.10.2) der Überstände aus den Ethanolfällungen nach unterschiedlichen Hydrolysezeiten ließ Gruppen gleicher Bruchstückgrößen erkennen (Tabelle 4.4-3). Da die Einzelmessungen des Molekulargewichts große Standardabweichungen aufwiesen, beschränkten sich die Betrachtungen auf das hydrodynamische Volumen. Das größte Molekül nach einer Stunde Hydrolyse mit einem hydrodynamischen Volumen von 230 kDa war nach zwei Stunden nicht mehr erkennbar. Dafür eines mit 6.395 Da und nach drei Stunden eines mit 5.175 Da. Nach allen Hydrolysezeiten waren Moleküle mit den hydrodynamischen Volumen von etwa 3.094, 1.960 und 1.046 Da erkennbar. Zusätzlich zu Molekülgrößen bestimmte die Auswertungssoftware Massenanteile der Peaks anhand der Signalfächen und der eingesetzten Probenmengen. Auffällig dabei waren die kontinuierlichen Massenzunahmen über die Dauer der Hydrolyse bei den zwei kleinsten Molekülen. Das EPS-Fragment mit dem hydrodynamischen Volumen von etwa 3 kDa wurde zunächst anteilig in den ersten drei Stunden vermehrt gebildet (15,2%, 24,3% und 26,1%), um dann zunehmend weniger vorhanden zu sein (20,7% und 17,5%). Das Molekül mit dem hydrodynamischen Volumen von ca. 2 kDa nahm über die ersten zwei bis drei Stunden der Hydrolyse an Massenanteil zu. Über drei Stunden hinaus blieb der Wert konstant bei 58,6 bis 59,9%. Der Massenanteil des kleinsten Moleküls mit einem hydrodynamischen Volumen von ca. 1 kDa nahm mit zunehmender Bildungsrate von 4,1 bis 24,0% zu. Der ethanolgefällte Anteil ergab nach fünfstündiger Hydrolyse hydrodynamische Volumina von 802 kDa sowie 1.846 und 328 Da. Der unlösliche Anteil wies nach fünf Stunden Reaktionszeit Moleküle mit hydrodynamischen Volumina von 1.554, 849 und 11 kDa sowie 3.099, 2.012 und 1.009 Da auf.

RD (h)	Molekulargewicht (Da)			Hydrodynamisches Volumen (Da)			Kalkulierte Masse (%)		
	\bar{x}	s	MW	\bar{x}	s	MW	\bar{x}	s	
1	12.859	12.673	12.859	229.882	434.259	229.882	45,2	7,9	
2									
3									
4									
5									
1	4.751	2.268	4.751	6.395	611	6.395	15,1	15,8	
2									
3									
4									
5									
1	18.530	4.794	18.530	5.175	161	5.175	7,2	16,6	
2									
3									
4									
5									
1	12.137	9.304	13.334 ± 4.153	3.092	130	3.094 ± 113	15,2	2,0	
2	10.461	4.720		3.238	222		24,3	12,0	
3	10.853	1.303		3.108	48		26,1	0,7	
4	12.629	5.441		3.108	3		20,7	20,2	
5	20.590	21.247		2.922	406		17,5	14,3	
1	8.996	2.312	5.119 ± 2.579	1.934	52	1.960 ± 32	34,6	5,3	
2	6.213	2.143		2.015	142		53,9	2,6	
3	3.196	3.239		1.942	17		58,9	12,0	
4	4.602	3.079		1.962	30		59,9		
5	2.586	3.666		1.945	16		58,6		
1	2.920		4.318 ± 1.328	1.023		1.046 ± 25	4,1		
2	3.536	3.464		1.085	106		6,7	5,8	
3	3.687	3.336		1.025	14		7,8	15,8	
4	5.469	5.007		1.045	24		16,9	11,0	
5	5.980	7.520		1.051	10		24,0	6,4	

Tabelle 4.4-3: Ergebnisse der GPC-Messungen des Überstandes der Ethanolfällung nach Oxalsäurehydrolyse unterschiedlicher Hydrolyse-(Reaktions-)Dauer (RD). MW: Gesamtmittelwert einer Gruppe.

4.5 Desulfatierung

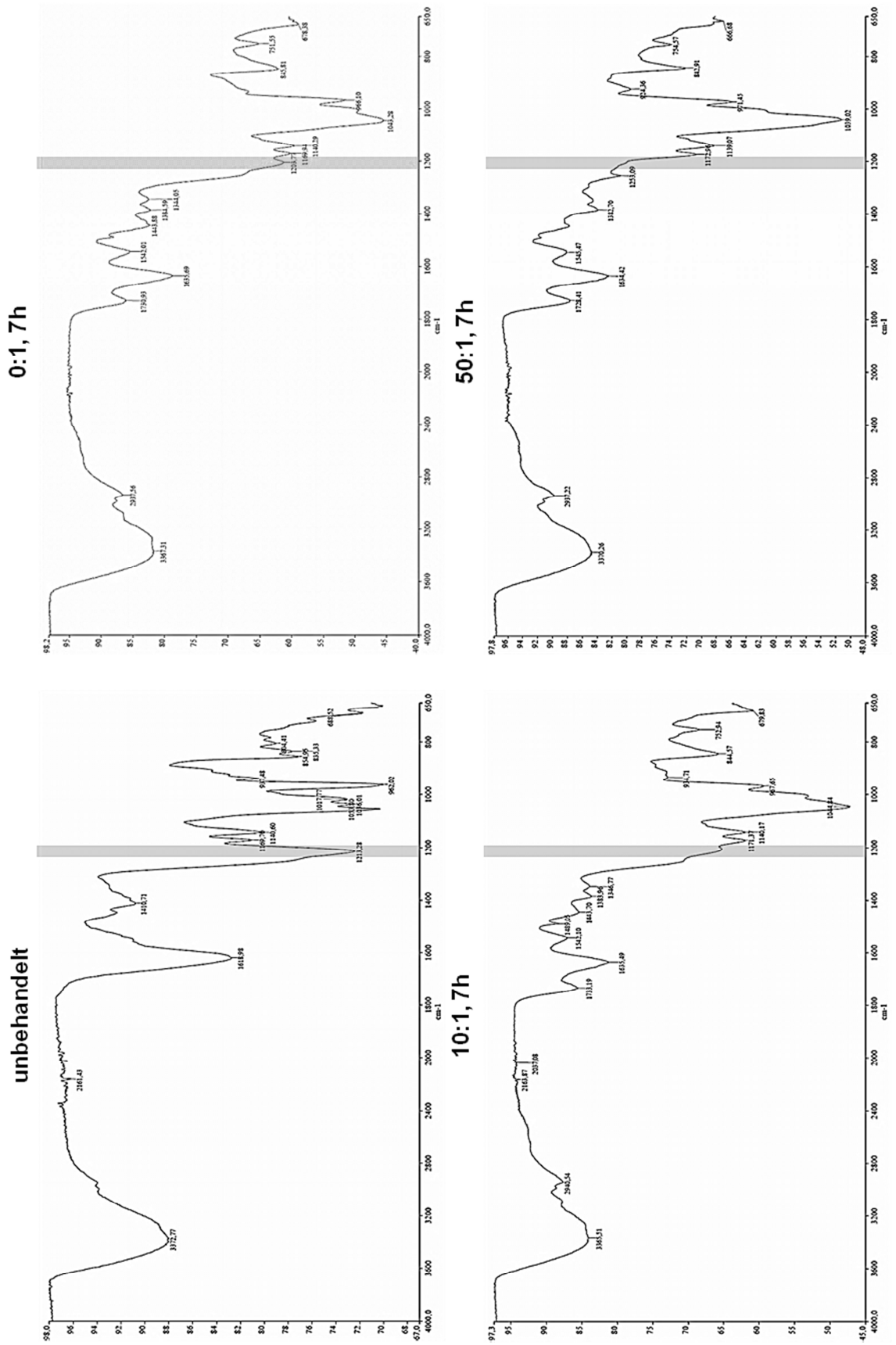
Wie unter 3.7 beschrieben, wurden mehrere Methoden für die Desulfatierung der EPS von *S. aquatilis* durchgeführt, da sich die Abspaltung der Sulfatgruppen vom Polysaccharid der EPS von *S. aquatilis* als problematisch herausstellte. Eine Übersicht über die durchgeführten Methoden und deren jeweilige Ergebnisse ist in Tabelle 4.5-1 dargestellt.

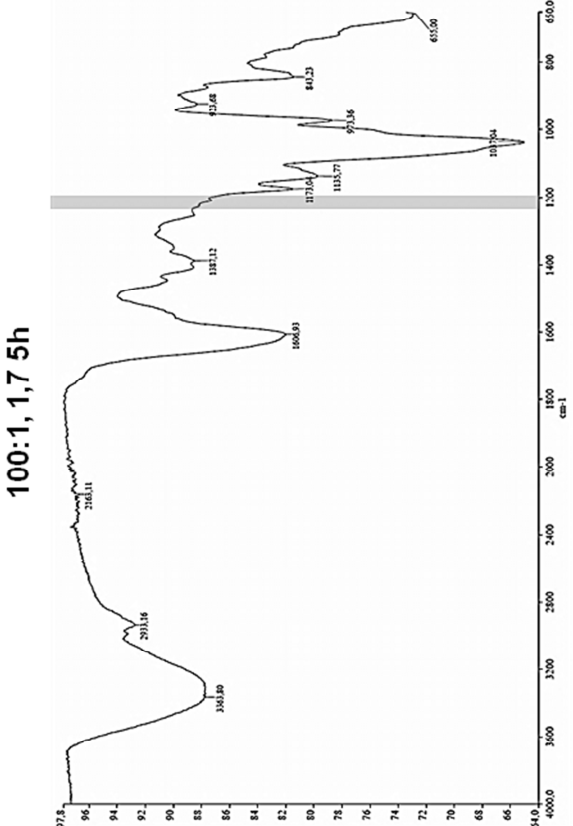
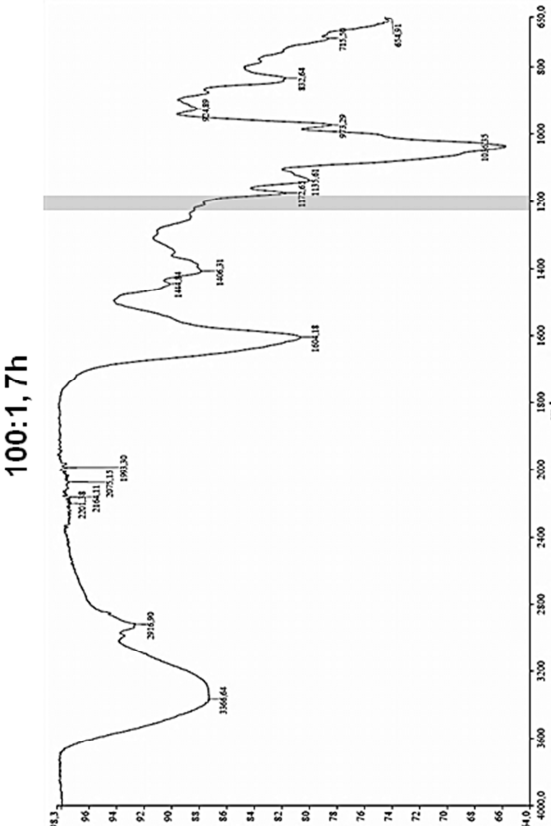
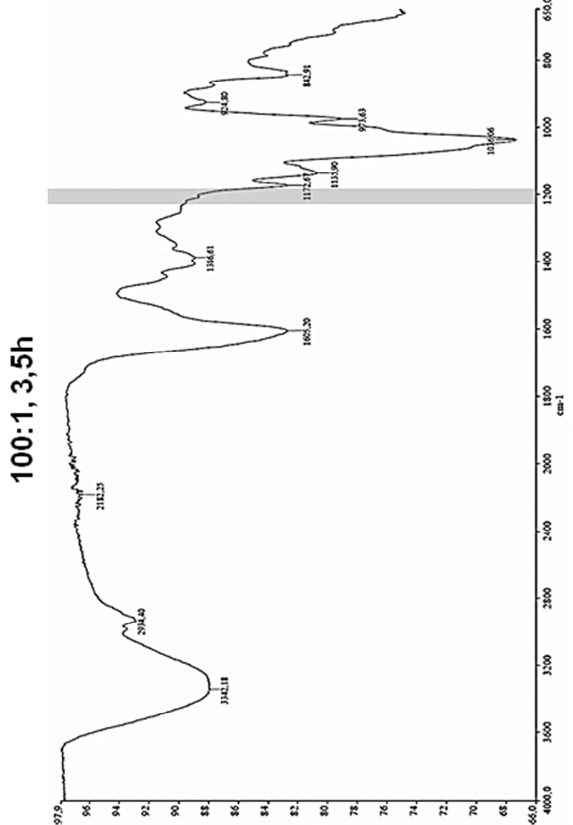
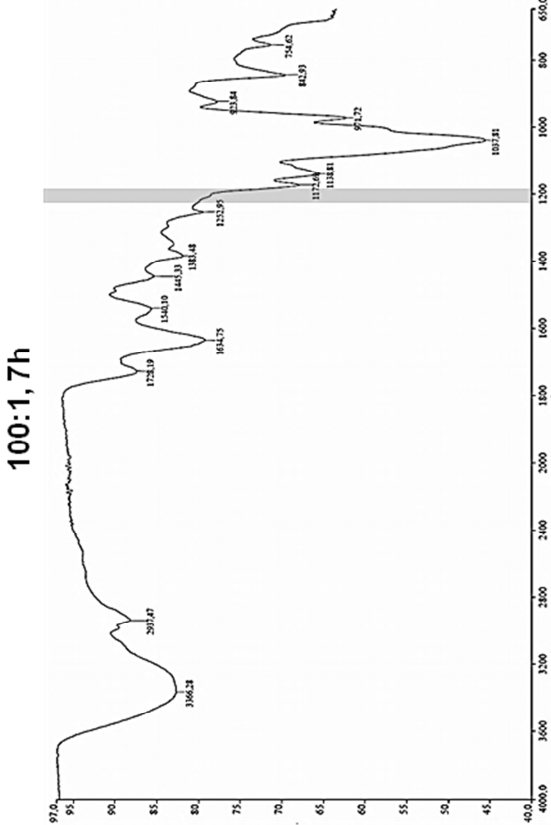
Die Desulfatierung der EPS mit Methanol in DMSO (Solvolyse) für 7 Stunden und anschließender Dialyse mit einem MWCO von 12-14 kDa wies mit $6,6 \pm 3,2\%$ eine unzureichende Ausbeute auf. Auch die Dialyse bei einem geringeren MWCO von 1 kDa erzielte dasselbe Ergebnis (4,4%). Eine halbierte Reaktionsdauer von 4,5 Stunden verringerte den Molekülabbau nicht (4,0%). Ebenso verhielt es sich bei der Solvolyse mit Wasser in DMSO. Auch hierbei lag die Ausbeute nach 7 Stunden und einer Dialyse mit MWCO von 12-14 kDa bei 6,1% sowie bei 4,7% bei einem MWCO von 1 kDa. Aufgrund der geringen Ausbeute wurde auf eine Bestimmung des Restsulfatgehaltes verzichtet. Der Austausch von DMSO gegen DMF ergab insgesamt höhere Ausbeuten. Bei 10 ml je Pyrex-Gefäß erreichte die Desulfatierung eine Ausbeute von $33,9 \pm 18,1\%$ (MWCO 12-14 kDa) und 53,5% (MWCO 1 kDa). Auch hier war die Ausbeute demzufolge nicht durch eine veränderte Dialyse zu verbessern. Da das Volumen von 10 ml an seiner Oberfläche in den Pyrex-Gefäßen nur zur Hälfte vom Bioblock umschlossen wurde, waren bei diesem Versuchsansatz allerdings die genauen vorherrschenden Temperaturen ungewiss. Daher wurde das Volumen auf 5 ml je Pyrex-Gefäß reduziert, was erwartungsgemäß die Ausbeuten bei gleichen Reaktionsbedingungen, aber erhöhter Wärmeeinwirkung, verringerte (25,7% bei MWCO 12-14 kDa). Eine halbierte Reaktionszeit (Ausbeute 22,4%) erreichte keine Ausbeutenerhöhung. Eine verringerte Temperatur von 70°C statt 90°C erhöhte zwar die Ausbeute (37,4%), reduzierte allerdings die Sulfatreduktion von 43,2% auf 27,4%. Die Sulfatreduktion bei halbiertem Reaktionsdauer lag bei 40,8%. Deutlich erfolgreicher war die Desulfatierung mit CTMS. Bereits die Reaktion lediglich in Pyridin ohne CTMS (0:1) führte zu einer Sulfatreduktion von 28,9% bei einer Ausbeute von 52,7%. Eine steigende Zugabe von CTMS führte bei annähernd konstanter Ausbeute (36,5 bis 58,7%) zunächst zu einer deutlichen Steigerung der Sulfatabspaltung (100:1 83,6% und 200:1 78,6%). Darüber hinaus schien eine erhöhte CTMS-Konzentration nicht sinnvoll, da die Sulfatabspaltung abnahm (300:1 61,5%; 400:1 47,4%). Der Verlauf der Sulfatreduktion wurde ebenfalls in den IR-Spektren beobachtet (Abbildung 4.5-1). Die Streckschwingung der S=O Bindung bei 1213 cm^{-1} war bereits ohne CTMS deutlich verkleinert. Bei einer CTMS-Konzentration von 10:1 war sie noch zu erkennen, ab einer Konzentration von 50:1 war sie nicht mehr sichtbar. Erst ab einer Konzentration von 300:1 erschien sie wieder. Die Betrachtung der unterschiedlichen Reaktionszeiten ergab, dass bereits ab 1,75 Stunden keine Veränderungen der Sulfatbande mehr im IR-Spektrum sichtbar waren.

Methode	RD (h)	Konz.	Dialyse MWCO (kDa)	getestete Kultivierung(en)	n	Ausbeute (%)	n	Sulfat-gehalt (%)	Sulfat-reduktion (%)
DMSO / MeOH	7		12-14	200903-Sa-NL k, 200902-Sa-K2	3	6,6 ± 3,2			
	7		1	200902-Sa-K2	1	4,4			
	4,5		12-14	200902-Sa-K2	1	4,0			
DMSO / H ₂ O	7		12-14	200902-Sa-K2	1	6,1			
	7		1	200902-Sa-K2	1	4,7			
DMF / H ₂ O 10ml/Pyrex	24		12-14	200902-Sa-K2	3	33,9 ± 18,1			
	24		1	200902-Sa-K2	1	53,5			
DMF / H ₂ O 5ml/Pyrex	24		12-14	200902-Sa-K2, 200902-Sa-B1	3	25,7	1	10,3	43,2
	12		12-14	200902-Sa-B1	1	22,4	1	10,8	40,8
DMF / H ₂ O 70°C, 5ml/Pyrex	24		12-14	200902-Sa-B1	1	37,4	1	13,2	27,4
	7	0:1	12-14	200902-Sa-K2	1	52,7	1	15,5	28,9
CTMS, 100°C	7	10:1	12-14	200902-Sa-K2	1	47,1			
	7	50:1	12-14	200902-Sa-K2	1	56,4			
	7	100:1	12-14	200902-Sa-K2, 200903-Sa-NL k	2	51,5 ± 5,5	1	3,6	83,6
	7*	100:1	12-14	200903-Sa-NL k	1	48,0			
	1,75	100:1	12-14	200902-Sa-K2	1	44,1	1	2,7	87,4
	1,75*	100:1	12-14	200902-Sa-K2	1	36,2			
	3,5	100:1	12-14	200902-Sa-K2	1	53,3			
	3,5*	100:1	12-14	200902-Sa-K2	1	34,9			
	5,25	100:1	12-14	200902-Sa-K2, 200903-Sa-NL k, 2011-06-Sa-K1	4	50,6 ± 4,5	4	1,9 ± 0,4	89,5 ± 2,0
	5,25*	100:1	12-14	200903-Sa-NL k		n.b.			
	7	200:1	12-14	200902-Sa-K2	1	52,6		4,7	78,6
	7	300:1	12-14	200902-Sa-K2	1	58,7		8,4	61,5
	7	380:1	12-14	200902-Sa-K2	1	57,1			
	7	400:1	12-14	200902-Sa-K2	1	36,5		11,5	47,4
	7	500:1	12-14	200902-Sa-K2	1	50,7			

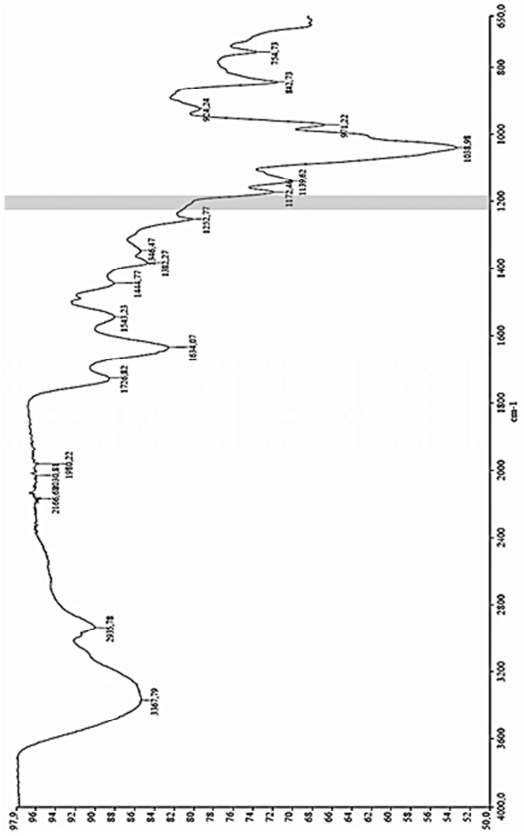
Tabelle 4.5-1: Übersicht der verschiedenen durchgeführten Desulfatierungsmethoden bei EPS von *S. aquatilis*. RD: Reaktionsdauer; Konz: Konzentration; *Abspaltung der Silangruppe unter Eiskühlung.

Die CTMS-Konzentration von 100:1 wurde für weitere Optimierungen ausgewählt, da sie mit 83,6% die höchste Sulfatreduktion bei annehmbarer Ausbeute erzielte. Erstaunlich war, dass die kürzeste Reaktionsdauer von 1,75 Stunden die geringste Ausbeute (44,1%), allerdings eine mit den Produkten längerer Reaktionszeiten vergleichbare Sulfatreduktion (87,4%), ergab. Die Ausbeuten der anderen Produkte lagen mit 53,3% für 3,5 Stunden, 57,0% bei 5,25 Stunden und $51,5 \pm 5,5\%$ bei 7 Stunden alle in einem vergleichbaren Bereich. Der Wert der Sulfatreduktion schien nach 7 Stunden gegenüber dem Wert nach 5,25 Stunden (86,8%) leicht verringert zu sein (83,6%). Die Abspaltung der Silangruppen durch Zugabe von Wasser unter Eiskühlung schien im direkten Vergleich zu einer geringeren Ausbeute zu führen (Werte in Tabelle 4.5-1). Die letztendlich als wiederholte Methode durchgeführte Variation mit einer CTMS-Konzentration von 100:1 und einer Reaktionsdauer von 5,25 Stunden ist mit einer Ausbeute von $50,6 \pm 4,5\%$ und einer Sulfatreduktion von $89,5 \pm 2,0\%$ der Solvolyse deutlich überlegen.

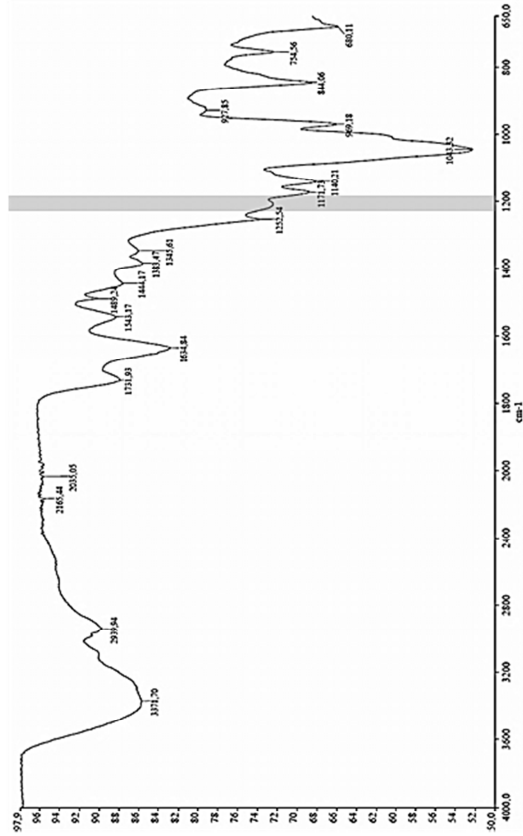




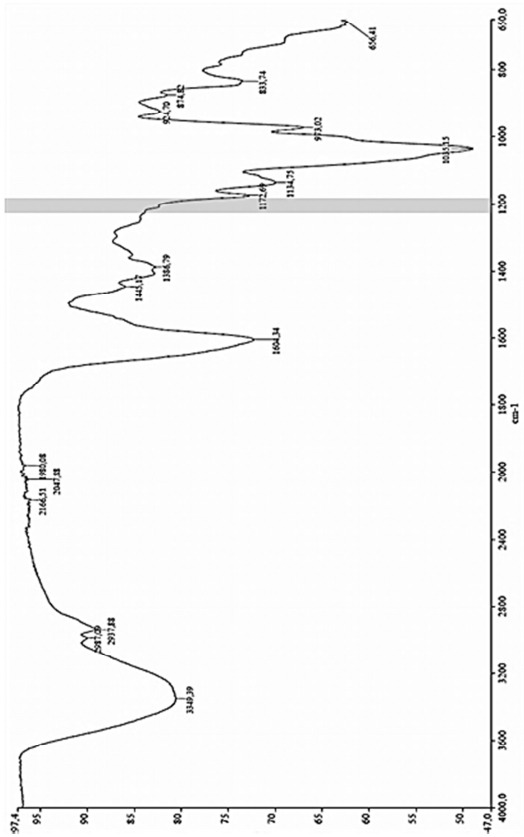
200:1, 7h



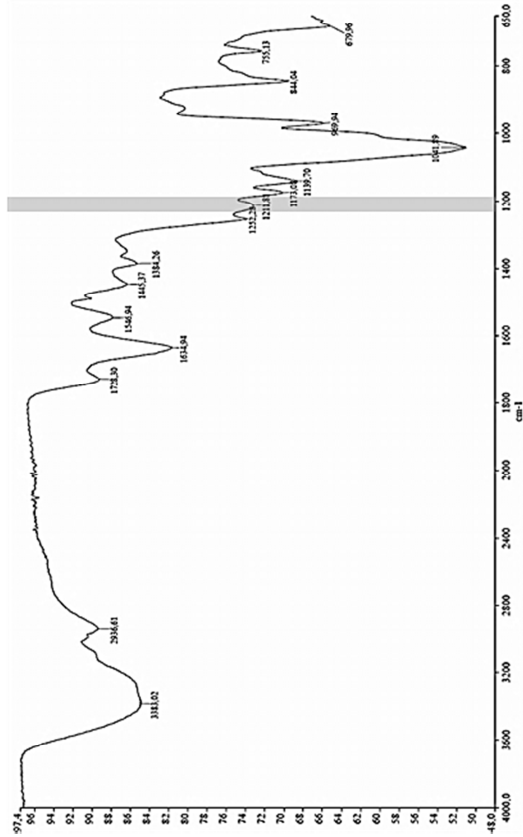
380:1, 7h



100:1, 5,25h



300:1, 7h



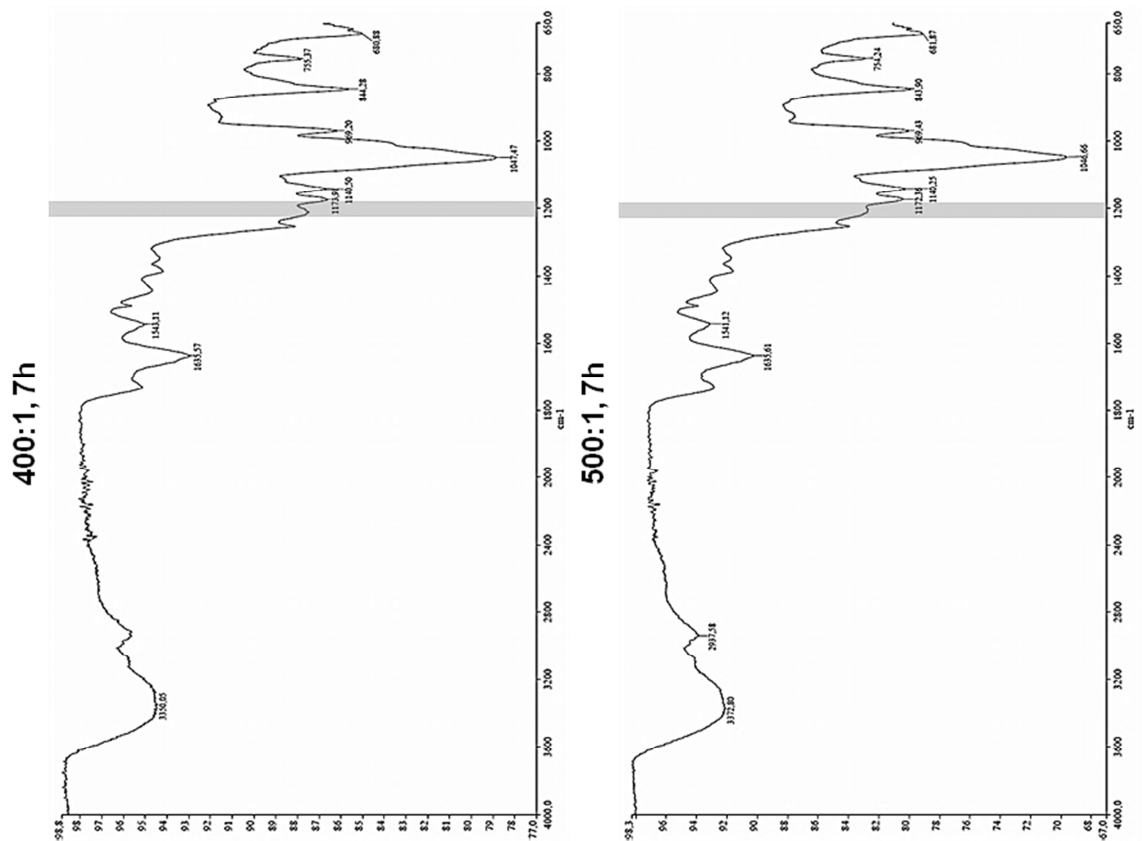


Abbildung 4.5-1: IR-Spektren der Desulfatierungen von EPS von *S. aquatilis* mit CTMS unterschiedlicher Konzentration (x:1) und Reaktionszeiten. y-Achse: Transmission in %. Graue Markierung: Lage der Sulfatbande.

Die aus der Desulfatierung gewonnenen EPS wurden mittels GPC (3.10.2) auf ihre Größe untersucht (Tabelle 4.5-2). Die Auswertung erfolgte lediglich über das hydrodynamische Volumen, da die Unsicherheiten und die Standardabweichungen der MALLS-Signale aufgrund zu geringer Probenkonzentrationen zu groß waren. Bei den Messungen sind bei jeder Probe mehrere Signale erkennbar gewesen. Trotz höherem MWCO unter der Dialyse, waren bei allen in DMSO solvolytisch behandelten Proben deutlich Moleküle mit einem hydrodynamischen Volumen (hV) von etwa 2 kDa erkennbar. Mit derselben Intensität waren Moleküle mit einem hV von 500 bis 600 kDa bestimmt worden. Die Solvolyse in DMF führte zur Bildung von Molekülen mit einem hV von 26 bis 47 kDa. Die Desulfatierung mit CTMS ergab Moleküle von einem hV von 24 bis 30 kDa und deutlich größere mit 780 bis 1.000 kDa. Bei allen drei Desulfatierungsmethoden waren keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Versuchsvarianten erkennbar.

Methode	RD (h)	MWCO (kDa)	getestete Kultivierung(en)	Hydrodynamisches Volumen (Da)	
				\bar{x}	s
DMSO / MeOH	7	12-14	200902-Sa-K2	1.734	1.011
				460.568	10.971
DMSO / MeOH	7	1	200902-Sa-K2	2.290	57
				496.809	61.278
DMSO / H ₂ O	7	12-14	200902-Sa-K2	2.136	0
				592.069	252.004
DMSO / H ₂ O	7	1	200902-Sa-K2	2.178	27
				642.058	150.472
DMF / H ₂ O, 90°C 5ml/Pyrex	12	12-14	200902-Sa-B1	2.464	546
				25.746	7.268
DMF / H ₂ O, 90°C 5ml/Pyrex	12	12-14	200902-Sa-B1	726.184	55.080
				2.125	74
DMF / H ₂ O, 70°C, 5ml/Pyrex	24	12-14	200902-Sa-B1	47.524	9.853
				844.886	143.694
CTMS, 100°C 100:1	1,75	12-14	200902-Sa-K2	4.079	31
				30.378	581
CTMS, 100°C, 100:1	3,5	12-14	200902-Sa-K2	819.677	10.421
				4.138	52
CTMS, 100°C, 100:1	5,25	12-14	200902-Sa-K2	29.099	376
				780.907	11.016
CTMS, 100°C, 100:1	5,25	12-14	200903-Sa-NL k	4.136	
				24.338	
CTMS, 100°C, 100:1	5,25	12-14	200902-Sa-K2	818.405	
				7.356	
CTMS, 100°C, 100:1	5,25	12-14	200902-Sa-K2	25.086	
				1.070.922	

Tabelle 4.5-2: Übersicht über das hydrodynamische Volumen der EPS nach Desulfatierung. Graue Schrift: Signale mit geringem Flächenanteil.

Die gewonnenen EPS nach Desulfatierung wurden auf ihre Neutralzuckerzusammensetzung (3.4.1.1) hin untersucht, um zu gewährleisten, dass die grundlegende Struktur des Moleküls unverändert geblieben war. Die in Tabelle 4.5-3 aufgeführten Ergebnisse ließen keine grundlegenden Veränderungen der Neutralzucker durch die Desulfatierungen erkennen. Lediglich der Galaktosegehalt nach Desulfatierung in DMF / H₂O bei 90°C für 24 Stunden mit

5 ml je Pyrex-Gefäß zeigte eine Erhöhung. Eine Verunreinigung oder sonstige Messfehler wurden nicht ausgeschlossen. Ansonsten konnte ein erhöhter Anteil an unbekanntem Signalen bei DMF / H₂O-Desulfatierungen beobachtet werden.

Neutralzucker	DMF / H ₂ O,	DMF / H ₂ O,	DMF / H ₂ O,	CTMS,	Sa-K	
	90°C. 24h, 10 ml/Pyrex	90°C. 24h, 5 ml/Pyrex	70°C. 24h, 5 ml/Pyrex	100°C, 100:1, 5,25h	\bar{x}	s
Fukose	36,4	35,2	36,3	40,4	37,0	4,5
Arabinose	28,7	34,7	34,5	38,0	30,2	3,4
Fukosamin	19,7	17,4	18,2	18,5	18,0	4,1
Rhamnose	0,0	0,5	0,6	0,0	0,6	0,5
Xylose	1,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3
Mannose	1,7	0,7	0,9	0,0	0,4	0,4
Galaktose	1,1	5,8	0,9	0,0	2,4	2,2
Glukose	2,1	0,7	0,0	1,6	10,6	7,7
unbekannte	9,1	5,1	8,6	1,5	0,4	0,4

Tabelle 4.5-3: Neutralzuckerzusammensetzung der EPS von *S. aquatilis* nach Desulfatierungen. Neutralzuckergehalt in %; Sa-K: Mittelwert aller Acetylierungsergebnisse von Kontroll-Kulturen (Tabelle 4.2-1).

4.6 Bindungstyp-Analyse

4.6.1 Methylierungsanalyse

Um verwertbare Ergebnisse der Methylierungsanalyse für die EPS von *S. aquatilis* zu erhalten, mussten viele verschiedene Methoden und Varianten durchgeführt werden (Tabelle 4.6-1 mit Abbildung 4.6-2). Zunächst wurden verschiedene Methoden der Methylierungsanalyse mit NaOH-Brei und anschließender reduktiver Hydrolyse durchgeführt (3.8.2.3). Dabei erfolgte die Durchführung nahe an der Veröffentlichung [Stevenson & Furneaux, 1990], wobei die EPS in ihre Triethylamin-Salzform überführt und die Aufreinigung nach dem Methylierungsschritte durch Dialyse ausgeführt wurde. Diese Durchführung zeigte im GC-FID Chromatogramm erst bei extremer Aufkonzentrierung schwache Signale, welche keine auswertbaren MS-Spektren ergaben. Ebenso verhielt es sich bei der Methylierung in zwei Stufen und unterschiedlicher Aufreinigung. In einem nächsten Versuch wurde die häufig verwendete Methylierung mit Dimsyl-Reagenz angewandt (3.8.1). Diese Methode brachte zunächst auch mit verschiedenen Salzformen der EPS keinen Erfolg. Im GC-Chromatogramm waren einige größere Peaks als bei vorigen Methode erkennbar, allerdings waren die MS-Spektren aufgrund zu schwacher Signale nicht aussagekräftig. Häufig handelte es sich aber auch um Analyse-Artefakte. In diesem Methylierungsdurchgang zeigte sich, dass das Pyridinium-Salz der EPS besser in wasserfreiem DMSO löslich war als das Triethylamin-Salz oder die unbehandelten EPS. Da die Dimsyl-Reagenz-Methode etwas erfolgreicher war als die NaOH-Brei-Methode, wurde sie in einem folgenden Schritt variiert. Durch eine erhöhte Menge Dimsyl-Reagenz in der ersten Methylierungsstufe, sollte der hemmende Effekt der Sulfatgruppen der EPS (4.2.5) ausgeglichen werden. Es erhöhte sich zwar die Signalintensität der Peaks in der GC, allerdings handelte es sich dabei um peracetylierte Monomere. Da die sinnvollen Variationsmöglichkeiten der Dimsyl-Reagenz-Methylierung zunächst erschöpft schienen, wurde eine Methode mit NaOH-Pulver versucht (3.8.2.1). Diese führte wie die Methode zuvor zu einer Peracetylierung der Monomere, nicht aber zu einer partiellen Methylierung. In Anlehnung an die Veröffentlichung von Kim et al. wurde erneut die Dimsyl-Reagenz-Methode angewandt, allerdings mit einem Zusatz von Glycerol in den Proben [Kim et al., 2006]. Damit sollte der noch immer, trotz Pyridinium-Salz, schlechten Löslichkeit der Proben entgegengewirkt werden. Hierbei ergab sich ebenfalls wieder das Bild peracetylierter Monomere. Allerdings zeigten die ethanollöslichen EPS-Fragmente nach zweistündiger Oxalsäurehydrolyse (4.4.1) mit ihrer geringeren Molekülgröße ein erstes teilweise auswertbares Ergebnis. Ohne die Kenntnis der Bindungstypen des intakten Polymers waren die Ergebnisse nach partieller Hydrolyse nur von geringer Aussagekraft. Zusätzlich stimmte das Monomerenverhältnis der Ergebnisse nach Auswertung nicht mit den Ergebnissen der Neutralzuckeranalyse (4.2.1) überein. Der Anteil an

Hexosen war deutlich höher als der Gehalt an Pentosen und Desoxyzuckern. Grundsätzlich war bekannt, dass die Methylierung mit Dimsyl-Reagenz gute Ergebnisse brachte, wie auch bei EPS von *S. pevalekii* (5.5) oder mitgeführten Standard-Polysacchariden. Die Zugabe von myo-Inositol nach der Methylierung zeigte, dass das Problem im Schritt der Methylierung und nicht der Reduktion, Hydrolyse oder Acetylierung liegen musste. Dieses führte zur erneuten Durchführung der NaOH-Brei-Methode mit reduktiver Hydrolyse, wobei auch hier wieder der Zusatz von Glycerol getestet wurde. Es erschienen erneut nur sehr schwache Signale. Eine mitgeführte Probe von Stärke und der Zusatz von myo-Inositol vor der Hydrolyse ließ die Annahme zu, dass es sich nun primär um einen Mangel im Schritt der Reduktion / Acetylierung handelte. So wurden die beiden bekannten Methoden kombiniert. Die Methylierung der Pyridinium-Salze der EPS erfolgte mittels NaOH-Brei, die Aufreinigung über Dialyse gegen demineralisiertes Wasser und die anschließenden Schritte nach der Dimsyl-Methode. Auf diese Weise wurden starke Peaks von PMAAs erzeugt. Je häufiger die Methylierung an einer Probe durchgeführt wurde, desto schwächer wurden die Signale der peracetylierten Zucker. Um Substanzverluste auszugleichen, wurde bei einer dreifachen Methylierung zunächst mit drei Methylierungsansätzen je Probe begonnen und diese zur Dialyse vereint. Anschließend erfolgte eine erneute Aufteilung auf zwei Teilmengen für die zweite Methylierung. Nach erneuter vereinter Dialyse vollzog sich die dritte Methylierung nur noch an einer Teilmenge.

Kultivierung	EPS-Form	Methodik	Beispiel- chromato- gramm	Ergebnis
200902-Sa-B1	Triethylamin-Salz	NaOH-Brei & reduktive Hydrolyse;	A	
	Triethylamin-Salz	Aufreinigung: Dialyse		
200903-Sa-NL k	Solvolyse (DMSO)	NaOH-Brei & reduktive Hydrolyse;	B	
		Aufreinigung:		
		Phasenverteilung;		
200902-Sa-B1	Triethylamin-Salz	2-stufige Methylierung (1.: 50 min; 2.: 20 min)		schlechte Signale oder Artefaktsignale
200902-Sa-B1	Triethylamin-Salz	NaOH-Brei & reduktive Hydrolyse;	C	
	Triethylamin-Salz	Aufreinigung: Dialyse;		
	Triethylamin-Salz	2-stufige Methylierung (1.: 20 min; 2.: 50 min)		
200902-Sa-K2	Solvolyse (DMF)	NaOH-Brei & reduktive Hydrolyse;		
		Aufreinigung:		
		Phasenverteilung		

	unbehandelt			
200902-Sa-K2	Triethylamin-Salz		D	
	Pyridinium-Salz	Dimsyl, Aufreinigung: Phasenverteilung		schwache Zuckersignale, einige erkennbar nicht eindeutig
	Desulfatiert mit Solvolyse			
200902-Sa-NL1	Oxalsäure- hydrolyse 2h, Überstand			
200902-Sa-B1	Pyridinium-Salz	Dimsyl, 1. Dimsylzugabe doppelte Menge Aufreinigung: Dialyse	E	nur wenige Peaks eindeutige Zuckersignale, starke <u>Untermethylierung</u>
200902-Sa-K2	IAC, F3			
200902-Sa-B1	Pyridinium-Salz		F	
200902-Sa-K2	IAC, F3	Methylierung nach Ciucanu & Kerek		hohe Signale, aber nur peracetyliert; starke Untermethylierung
	Pyridinium-Salz + Glycerol			
200903-Sa-NL k	CTMS-Desulfatiert + Pyridinium-Salz & Glycerol	Dimsyl, Aufreinigung: Dialyse		
	Oxalsäurehydrolyse 5h, Überstand + Pyridinium-Salz & Glycerol		G	Signale teilweise auswertbar
	1. Glycerol 2. /	Methylierung nach Kim; Aufreinigung Zentrifugation		
	1. Glycerol 2. Glycerol	Methylierung nach Kim; Aufreinigung Zentrifugation		
	1. Glycerol 2. Glycerol	Methylierung nach Kim; Aufreinigung Dialyse		
200902-Sa-K2	1. Pyridinium-Salz & Glycerol 2. Glycerol	Methylierung nach Kim; Aufreinigung Dialyse		hohe Signale, aber nur peracetyliert; starke Untermethylierung
	1. Pyridinium-Salz & Glycerol 2. Pyridinium-Salz & Glycerol	Methylierung nach Kim; Aufreinigung Phasenverteilung		
	1. Pyridinium-Salz & Glycerol 2. Pyridinium-Salz & Glycerol	Methylierung nach Kim; Aufreinigung Dialyse	H	

200902-Sa-K2	Pyridinium-Salz	NaOH-Brei & reduktive Hydrolyse; Aufreinigung: Dialyse; 2-stufige Methylierung (1.: 20 min; 2.: 50 min)	I	kleine Signale
	Pyridinium-Salz & Glycerol			
	CTMS-Desulfatiert, 200:1, 7h			
200902-Sa-B1	Solvolyse (DMF) 90°C 24h	2 Md mit NaOH-Brei 2-stufige Methylierung (1.: 20 min; 2.: 50 min) weitere Schritte nach Harris; Aufreinigung: Dialyse mit MWCO 1 kDa gegen demineralisiertes Wasser		
	Solvolyse (DMF) 90°C 12h			
	Solvolyse (DMF) 70°C 24h			
200902-Sa-K2	Solvolyse (DMF) 90°C, 24h 10ml/Pyrex			
200902-Sa-K2	Pyridinium-Salz	3 Md	J	Auswertbare Signale
	CTMS-Desulfatiert 100:1, 5.25h	3 Md	K	
	Pyridinium-Salz	2 Md		
	Pyridinium-Salz	1 Md		
	CTMS-Desulfatiert 100:1, 5.25h	2 Md		
	CTMS-Desulfatiert 100:1, 5.25h	1 Md		
201106-Sa-K1	unbehandelt	3 Md		
200902-Sa-Ad1	Oxalsäurehydrolyse 5h, Überstand	2 Md	L	
201106-Sa-K1	IAC F3	2 Md		untermethyliert

Tabelle 4.6-1: Übersicht über durchgeführte Methylierungsmethoden und -variationen bei EPS von *S. aquatilis* in zeitlicher Reihenfolge ihrer Durchführung.
Md: Anzahl Methylierungsdurchgänge.

In einer Desulfatierung mit Dimsyl-Reagenz und Aufreinigung über Phasenverteilung sowie in der letztendlich als optimal ermittelten Methode bei einfacher Methylierungsdurchführung, zeigte sich, dass Fukosamin ausschließlich terminal gebunden vorlag (Abbildung 4.6-1). Amine neigen zur Bildung quartärer Stickstoffe, somit positiv geladener Moleküle. Generell werden N-acetylierte Amine unter der Methylierung zunächst zu N-Methylacetamido-Verbindungen umgesetzt [Finne & Rauvala, 1977]. Methylierte und acetylierte Aminoverbindungen zeigen sich unter Hydrolyse als instabil. Nach der Methylierungsanalyse sind N-Methyl-Acetamido-, N-Acetyl-, N-Acetyl-Acetamido- und N-Methyl-Acetyl-Acetamido-Verbindungen denkbar. Probleme bei der Detektion entstehen durch Salze tertiärer Amine, da sie nicht verdampfen, und durch quartäre Amine, da sich diese thermisch zersetzen [McLafferty & Turecek, 1995]. Dies erklärte, warum bei annähernd vollständiger Methylierung keine Peaks des Fukosamins

gefunden wurden. Aus diesem Grund wurde der aus der Neutralzuckeranalyse bekannte Anteil des Fukosamins am Polysaccharid von *S. aquatilis* über eine theoretische Berechnung mit in die Ergebnisse einbezogen, zumal die experimentell gefundene Neutralzuckerverteilung mit der Acetylierungsanalyse übereinstimmte. Es fiel auf, dass alle Zucker, abgesehen von wenigen Spuren, in der pyranosidischen Form vorlagen. Die ausgewerteten Methylierungen des Polysaccharids von *S. aquatilis* zeigten beinahe vollständige Methylierung mit nur geringeren Anteilen peracetylierter Zucker (Tabelle 4.6-1; Tabelle 4.6-2). Die häufigsten Verknüpfungen im Pyridinium-Salz waren eine 1,3,4-Arabinose und eine 1,3-Fukose (je 27,4%). Des Weiteren enthalten war 1,3,4-Fukose (10,2%). Der berechnete Anteil 1-Fukosamin lag bei 17,30%. Weitere Bindungstypen waren nur in sehr geringen Mengen vertreten: 1,4-Hexose (2,5%) und 1,3-Arabinose (1,2%). Spuren von 1-Arabinose lagen in pyranosidischer und furanosidischer Form vor (0,6 und 0,6%). Durch die Desulfatierung des Moleküls verschwand die 1,3,4-Fukose vollständig. Dafür wurde eine 1,2,3-Fukose gefunden (5,3%). Der Anteil weiterer Bindungstypen blieb annähernd unverändert: 1,3,4-Arabinose (29,6%), 1,3-Fukose (29,5%). Zusätzlich zu den Spuren terminaler Arabinosen erschien eine äußerst geringe Menge terminaler Fukose (0,5%). Durch die Behandlung der EPS mit Oxalsäure kam es verglichen mit dem Pyridinium-Salz zu einem deutlichen Verlust von 1,3,4-Arabinose (6,8%) und einem Anstieg an 1,3- und 1,4-Arabinose (7,0% und 3,3%). Die Anteile 1,3-Fukose und 1,3,4-Fukose waren leicht gesunken (24,2% und 5,9%). Zusätzlich wurde ein größerer Anteil 1,4-Hexose (16,0%) sichtbar. Wie in Tabelle 4.6-2 zu sehen, lag der größte Einfluss bei dem Pyridinium-Salz bei einer mehrfachen Methylierung der Proben in dem Gehalt an 1,3-Fukose (27,4% zu 15,2%) und peracetylierter Hexose (3,9% zu 14,0%). Ein leichter Einfluss wurde auf den Gehalt von 1,3,4-Fukose ausgeübt (10,2% zu 13,1%). Wie oben beschrieben, fand sich auch bei vorangehenden Methylierungsversuchen mit schwächeren Peaks in der GC-MS ein zu hoher Anteil an Hexosen. Deutlichere Unterschiede in den Ergebnissen waren bei den desulfatierten EPS erkennbar. Hierbei waren eine starke Reduktion aller PMAAs und ein Anstieg der peracetylierten Zucker offensichtlich.

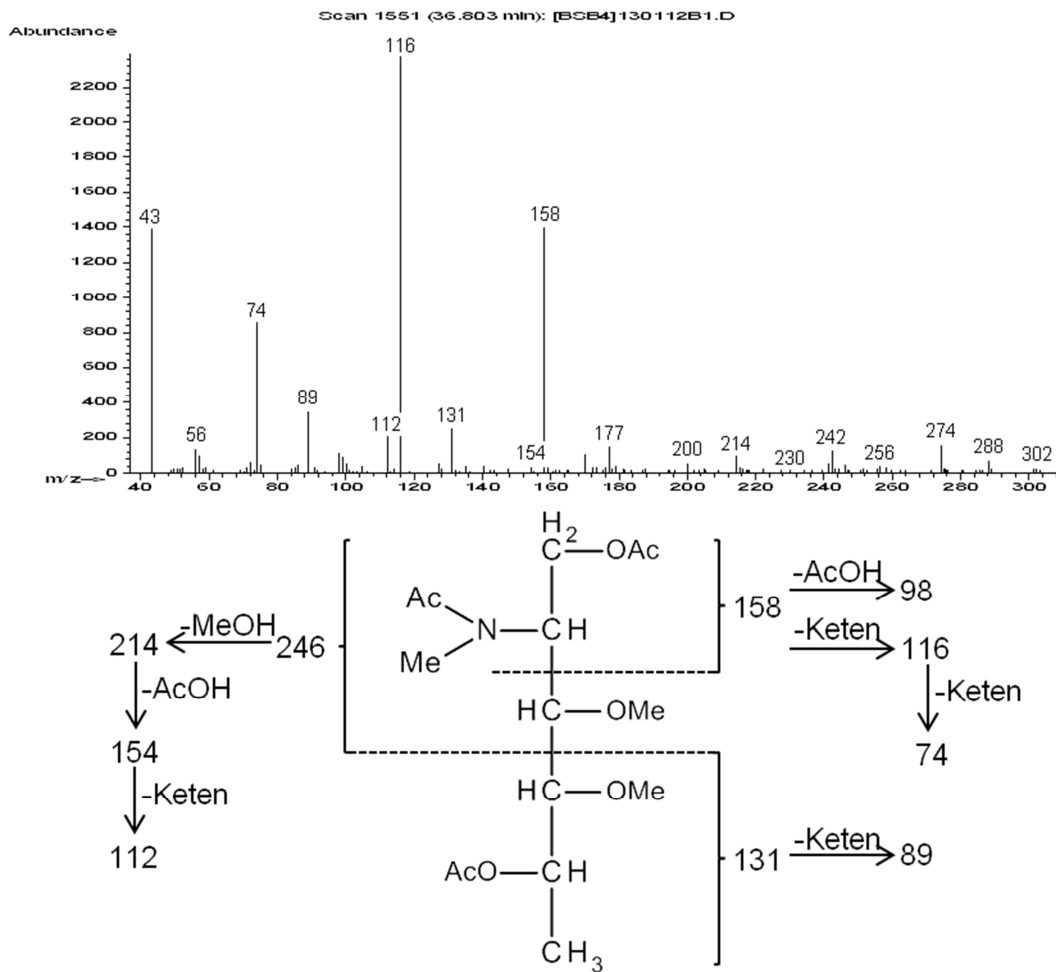


Abbildung 4.6-1: MS-Spektrum und Fragmentierungsmuster des terminalen Fukosamins aus EPS von *S. aquatilis*.

Die Methylierung unterschiedlicher Desulfatierungsprodukte zeigte eine Abhängigkeit der Bindungstypen von der Stärke der Degradation durch die Desulfatierung (4.5; Tabelle 4.6-3). Diese wurde ausgedrückt als Ausbeute in %, denn je geringer die Ausbeute, desto stärker die Zersetzung unter der Reaktion. Mit abnehmender Ausbeute kam es gleichzeitig zu einer Abnahme der 1,3,4-Arabinose und einer Zunahme der 1,3-Arabinose. Der Anteil 1,3-Fukose und 1-Fukosamin wurde leicht verringert. Bei den Desulfatierungen mit CTMS zeigten sich keine 1,3,4-Fukose im Gegensatz zu den Solvolyse-Reaktionen in DMF. Dabei lag der Anteil dieses Bindungstypes zwischen 14,9 und 17,8%, im Pyridinium-Salz lag er bei gleicher Methylierungsmethode bei 11,2%. Bei den zwei CTMS-desulfatierten Proben wurde eine Bildung von 1,2,3-Fukose beobachtet. Der oben beschriebene Zusammenhang zwischen Sulfatreduktion und Verschwinden der 1,3,4-Fukose ließ sich nicht eindeutig bestätigen, da die CTMS-Desulfatierung mit einer Konzentration von 300:1 zwar noch 8,4% Sulfat aufwies, allerdings keine 1,3,4-Fukose mehr.

Bindungstyp	Pyridin. Salz	CTMS- desulf.	OxH, 5h, Überstand	Pyridinium- Salz		CTMS- desulfatiert	
	3-fach	3-fach		2-fach	1-fach	2-fach	1-fach
1-Ara(<i>f</i>)	0,6	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1-Ara(<i>p</i>)	0,6	0,4	1,9	0,4	0,3	0,0	0,2
1,3-Ara(<i>f</i>)	0,0	0,0	0,7				
1,3-Ara(<i>p</i>)	1,2	1,8	7,0 ↑	1,0	0,9	0,8	0,2
1,4-Ara(<i>p</i>)	0,0	1,2	3,3 ↑	0,0	0,0	0,2	0,0
1,3,4-Ara(<i>p</i>)	27,4	29,6	6,8 ↑	19,0	22,3	10,0 ↓	2,0 ↓
PerAc Ara	2,8	3,7	8,4	4,1	4,4	15,5 ↑	23,9 ↑
1-Fuc(<i>p</i>)	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
1,3-Fuc(<i>p</i>)	27,4	29,5	24,2	21,0 ↓	15,2 ↓	11,5 ↓	2,3 ↓
1,3,4-Fuc(<i>p</i>)	10,2	0,0 ↓	5,9	11,2 ↑	13,1 ↑	1,0	0,0
1,2,3-Fuc(<i>p</i>)	0,0	5,3	0,0	0,3	0,0	2,4	0,0
PerAc Fuc	0,0	0,0	1,4	0,3	0,0	19,5 ↑	33,1 ↑
1,3,4-Xyl(<i>p</i>)	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
PerAc Xyl	6,1	7,5	7,1	0,0	9,9	2,7	4,6
1-FucN(<i>p</i>)	17,3	18,5	12,5	28,4	19,8	9,4 ↓	0,9 ↓
PerAc FucN	0,0	0,0	4,1	0,0	0,0	17,6 ↑	23,6 ↑
1,4-Hex(<i>p</i>)	2,5	1,4	16,0	5,5	0,0	1,7	0,0
PerAc Hex	3,9	0,0	0,0	8,4 ↑	14,0 ↑	7,7 ↑	9,1 ↑

Tabelle 4.6-2: Übersicht über die Ergebnisse der Methylierungsanalyse von *S. aquatilis*. Pyridinium-Salz und CTMS-desulfatierter Probe bei mehrfachen Methylierungsdurchgängen; zweifache Methylierung der oxalsäurehydrolysierten Probe (OxH). Anteil (%) mit (theoretisch berechnetem) 1-FucN-Anteil. PerAc: peracetyliert. Schwarze Pfeile: Veränderungen im Vergleich zum Pyridinium-Salz. graue Pfeile: Veränderungen im Vergleich zur jeweiligen dreifachen Methylierung.

Bindungstyp	CTMS 5,25h, 100:1	CTMS 7h, 300:1	DMF 70°C, 24h	DMF 90°C, 12h	DMF 90°C, 24h
1-Ara(<i>f</i>)	0,6	0,1	0,0	0,0	0,0
1-Ara(<i>p</i>)	0,4	0,7	0,0	0,0	0,0
1,4-Ara(<i>p</i>)	1,2	1,9	0,0	1,3	1,7
1,3-Ara(<i>p</i>)	1,8	4,4 ↑	3,6 ↑	14,0 ↑	17,8 ↑
1,3,4-Ara(<i>p</i>)	29,6	24,6 ↓	12,6 ↓	9,1 ↓	5,9 ↓
PerAc Ara	3,7	0,0	23,1	10,6	8,6
1-Fuc(<i>p</i>)	0,5	0,8	0,0	0,0	0,0
1,3-Fuc(<i>p</i>)	29,5	35,7	16,8	24,4	25,3
1,3,4-Fuc(<i>p</i>)	0,0	0,0	17,4	16,3	17,5
1,2,3-Fuc(<i>p</i>)	5,3	4,2	0,0	0,0	0,0
PerAc Fuc	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0
1,3,4-Xyl(<i>p</i>)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PerAc Xyl	7,5	0,0	0,0	4,6	3,2
1-FucN(<i>p</i>)	18,5	27,5	18,2	19,7	17,4
PerAc FucN	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,4-Hex(<i>p</i>)	1,4	0,0	0,0	0,0	1,1
PerAc Hex	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5
Sulfatgehalt %	1,8	8,4	13,2	10,3	10,8
Ausbeute %	50,6 ± 4,5	58,7	37,4 ↓	22,4 ↓	25,7 ↓

Tabelle 4.6-3: Übersicht über die Methylierungsergebnisse von EPS von *S. aquatilis* nach unterschiedlichen Methoden zur Desulfatierung. Anteil (%) mit (theoretisch berechnetem) 1-FucN-Anteil. PerAc: peracetyliert. Pfeile: Veränderungen im Vergleich zur Desulfatierung CMTS 5,25h, 100:1.

Zusammenfassend war festzustellen, dass eine Desulfatierung die Bindungen über 1,3,4-Fukose verschwinden ließ und eine partielle Hydrolyse mit Oxalsäure den Gehalt an 1,3,4-Arabinose stark verringerte, während 1,4-Arabinose neu und 1,3-Arabinose vermehrt entstand. Eine Solvolyse in DMF mit Degradation der EPS reduziert den 1,3,4-Arabinose Anteil und erhöht den 1,3-Arabinose Anteil.

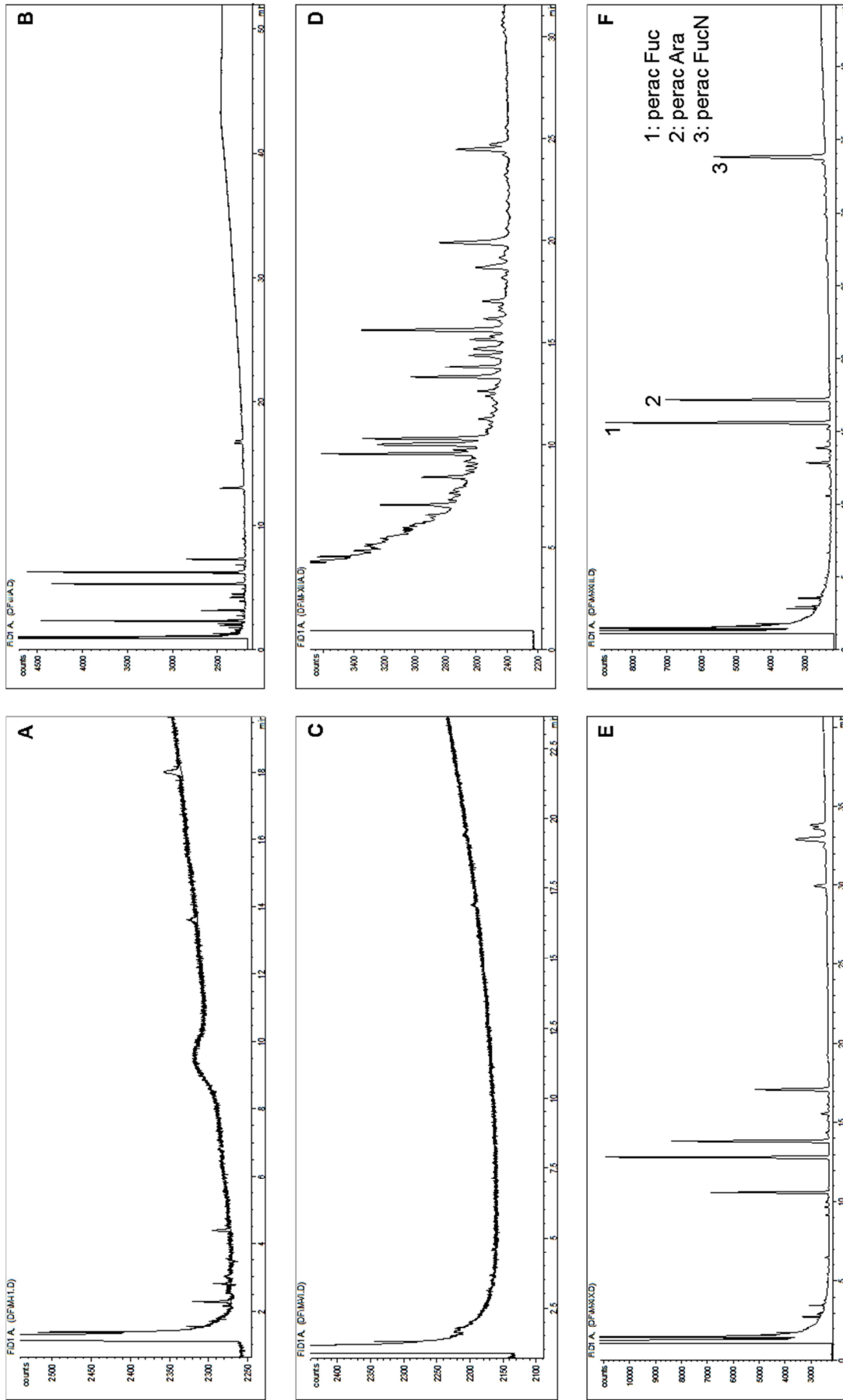




Abbildung 4.6-2: Beispiele für GC-FID Chromatogramme von Methylierungsanalysen von EPS von *S. aquatilis*.

4.6.2 NMR

Die Ergebnisse der NMR-Messungen für die oxalsäurehydrolysierten EPS (4.3.2) ließen keine endgültigen Rückschlüsse auf die Bindungstypen der Zucker zu, Hinweise konnten aber gefunden werden.

Die von Vinogradov et al. beschriebene Verschiebung für eine 1,3- α -FucNAc mit 98,7 ppm (C1) und 49,7 (C2) konnten nicht im Spektrum der EPS von *S. aquatilis* wiedergefunden werden [Vinogradov et al., 1989]. Die Angaben von Bilan et al. zu 1,3- α -Fukosen konnten teilweise wiedergefunden werden [Bilan et al., 2007]. Für das anomere Kohlenstoffatom gaben Bilan et al. Verschiebungen von 93,9, 95,4, 95,7, 97,0 und 97,1 ppm an. In *S. aquatilis* konnten Signale mit 93,3, 95,7 und 97,1 ppm gefunden werden. Die darüber hinaus gut erkennbare Spektrumsregion der Methylgruppen (C6) sollte nach Bilan Signale bei 16,7, 16,8 und 17,4 ppm zeigen. Das EPS-Spektrum hatte Signale bei 16,6 und 17,3 ppm. Eine Übereinstimmung im Auftreten von 1,3- α -Fukosen, auch im Hinblick auf den unterschiedlichen internen Standard und unterschiedliche Neutralzuckerzusammensetzung zwischen dem Fukoidan bei Bilan et al. und dem EPS von *S. aquatilis*, ließ sich vermuten. Nach Bilan et al. trafen die verglichenen Strukturelemente allerdings auch auf 1,2- α -Fukosen zu (C1: 97,0 ppm; C6: 16,8 ppm). Auch das Auftreten einer 1,2,3- α -Fukose wäre möglich gewesen, wenn auch etwas unwahrscheinlicher. Das anomere Kohlenstoffatom läge dabei bei 95,9 ppm [Bilan et al., 2008]. Die EPS zeigten ein Signal bei 95,7 ppm. Auch die C6-Signale zeigten eine Übereinstimmung mit 16,7 ppm (Literatur) und 16,6 ppm (EPS). Das Anomerensignal für 1,4- α -Fukosen unterschied sich nach Bilan et al. allerdings mit 102,3 ppm deutlich von den anderen Bindungstypen. Im EPS von *S. aquatilis* fand sich kein Signal dieser Verschiebung. In einer weiteren Veröffentlichung [Bilan et al., 2004] wurde die Substitution mit Sulfatgruppen an Fukosepolymeren untersucht. Die dort angegebenen chemischen Verschiebungen für C1 von 2,4-Disulfat-1,3- α -Fukosen und 2-Sulfat-1,4- α -Fukosen wurden mit 100,2 und 99,1 ppm angegeben. Das Spektrum der EPS zeigte ein Signal bei 100,3 ppm, allerdings keines im Bereich 99 ppm. Ein Vorkommen einer 1,3- α -Fukose mit Sulfatsubstitution an Position 2 und / oder 4 wäre demnach möglich. Die Zuordnung möglicher Signale durch Arabinosen war schwierig, da die meisten Literaturdaten von Arabinofuranosen stammen. Zwar fanden sich einige Literaturdaten für Verschiebungen in glykosidischen Bindungen, allerdings konnte keine genaue Übereinstimmung festgestellt werden.

4.7 Protein-Analytik

Die Bestimmung des Proteinanteils in den EPS von *S. aquatilis* erfolgte auf dreierlei Weise (3.9.1). Die Ergebnisse in Tabelle 4.7-1 zeigen die ermittelten Proteingehalte. Diese lagen bei der Bestimmung aus den Ergebnissen der Elementaranalyse bei $0,96 \pm 1,13\%$. Die Bestimmung mit dem Folin-Ciocalteau-Reagenz ergab einen Proteingehalt von 0,59% und mit Coomassie Brilliantblau von $0,44 \pm 0,12\%$. Die Bestimmung mit Ninhydrin-Reagenz zeigte $7,48 \pm 0,35\%$ an, wobei der farbgebende Anteil an Aminozucker nicht korrigiert wurde.

Kultivierung	Elementar-analyse	Folin-Ciocalteau-Reagenz	Coomassie Brilliantblau	Ninhydrin ohne FucN-Korrektur
200902-Sa-K2	-0,29		$0,31 \pm 0,09$	$7,15 \pm 1,59$
201106-Sa-K1	0,77		$0,31 \pm 0,10$	$7,44 \pm 0,82$
200902-Sa-Ad1	0,22		$0,46 \pm 0,10$	$7,32 \pm 0,72$
200902-Sa-NL1	1,48		$0,56 \pm 0,10$	$8,08 \pm 1,21$
200903-Sa-NL k			$0,42 \pm 0,09$	
200902-Sa-B1	2,61	$0,59 \pm 0,40$	$0,58 \pm 0,11$	$8,41 \pm 0,86$
Mittelwert	0,96	0,59	0,44	7,48
s	1,13		0,12	0,35

Tabelle 4.7-1: Gehalt an Protein (% m/m) in EPS von *S. aquatilis* bestimmt mit drei Methoden (3.9.1).

Der Proteingehalt in EPS von *S. aquatilis* nach Ernte mit unterschiedlichen Bedingungen zeigte einige Heterogenitäten der Ergebnisse nach Berechnung aus dem Stickstoffgehalt (3.9.1.1). Während die EPS nach 30 Tagen Kultivierung proteinfrei waren (0,03 bis -2,64%), enthielten die EPS nach 8 Kultivierungstagen und unterschiedlicher Zentrifugation (Z4500, Z9000 und Z9000x2) 1,13 bis 5,09% Protein. Die EPS Z9000 filtr. und Z9000 filtr.dial. enthielten einen Proteinanteil von 21,71 und 13,16%. Der Proteingehalt der EPS bestimmt über die Ergebnisse der Elementaranalyse der zwei weiteren *S. aquatilis* Stämme belief sich auf 32,9 und 25,7% für *S. aquatilis* CAUP (201107-Sa CAUP-K1 und -K2) und 21,2% für *S. aquatilis* CCALA (201208-Sa CCALA-K).

4.8 Chromatographische Verfahren

4.8.1 Fraktionierung mittels IAC

In der IAC wurden die EPS primär anhand ihrer Ladung aufgetrennt (3.10.1). Diagramm 4.8-1 zeigt ein für alle untersuchten EPS exemplarisches Elutionsprofil. Dafür wurden die einzelnen gesammelten Fraktionen in der DuBois-Reaktion (3.3.5.3) getestet und die höchste gemessene Absorption des Reaktionsproduktes gleich 1 gesetzt. Auch mehrere Fraktionierungsdurchgänge von EPS aus einer Kultivierung zeigten übereinstimmende Elutionsprofil teilweise mit leichten Unterschieden in den Intensitäten der einzelnen Fraktionen.

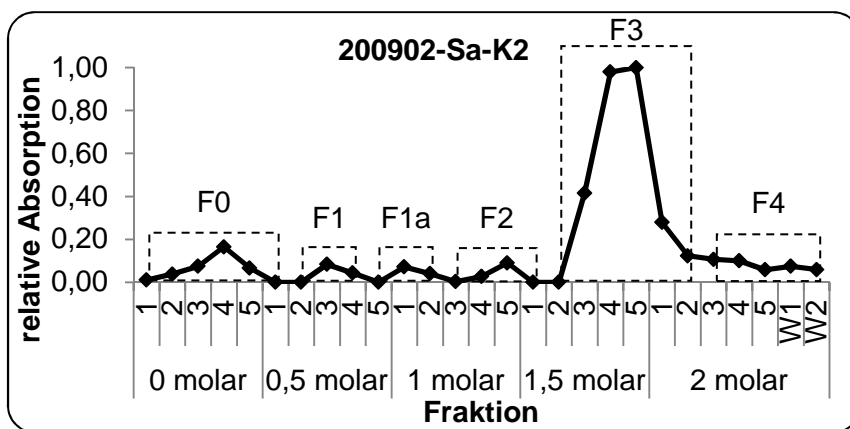


Diagramm 4.8-1: Verläufe der IAC von EPS von *S. aquatilis*. y-Achse: Absorption des Produktes der DuBois-Reaktion, jeweilige höchste Absorption = 1; x-Achse: aufgefangene Fraktionen und Natriumchlorid-Molarität des Elutionsmittels; F: zu einzelnen EPS-Fraktion zusammengefasste gesammelte Fraktionen.

Tabelle 4.8-1 zeigt die gewonnen Ausbeuten der EPS-Fractionen nach Dialyse sowie die Gesamtausbeute bezogen auf die eingewogene EPS-Menge. Die Standardabweichung des Mittelwertes war groß, aber die in den Elutionsverläufen erkannte Hauptfraktion F3, stellte immer den größten Massenanteil mit etwa 50%. Die Fraktion 0 stellte in jedem Durchgang den geringsten Massenanteil. Die Gesamtausbeute zeigte ebenso eine große Streuung und in einem Fall einen Wert über 100%.

Eine Abhängigkeit der Unterschiede zwischen den Elutionsverläufen und den Ausbeuten konnte nicht in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen gebracht werden.

Kultivierung	F0	F1	F1a	F2	F3	F4	Ausbeute*
200902-Sa-K2	5,87	11,92	12,62	14,67	34,19	20,73	143,00
201106-Sa-K1	3,06	12,61	-	4,67	79,67	n.b.	31,01
200902-Sa-Ad1	6,84	15,16	8,32	9,51	50,52	9,66	57,87
200902-Sa-NL1	-	11,33	-	22,38	66,30	0,00	99,00
200903-Sa-NL k	0,00	28,57	-	12,09	42,86	16,48	53,00
Mittelwert	3,94	15,92	10,47	12,66	54,71	11,72	76,78
s	3,08	7,22	3,04	6,57	18,28	9,04	44,43

Tabelle 4.8-1: Verteilung der Ausbeuten (%) der IAC von *S. aquatilis*. *Ausbeute bezogen auf die Einwaage (%).

In Tabelle 4.8-2 sind die detektierten Proteinmengen in den EPS-Fractionen aufgeführt. In keinem Fall konnte im Mittelwert mehr als 1% bei der Quantifizierung mit Coomassie Brilliantblau gefunden werden (3.9.1.2). Die aus den Ergebnissen der Elementaranalyse berechneten Proteinmengen (3.9.1.1) ergaben Werte von 5,03% für die Fraktion F1 sowie negative Werte für die Fraktion 3.

	Kultivierung	Coomassie Brilliantblau	Elementaranalyse	
		Protein (% m/m)	Stickstoff- (%)	Protein (% m/m)
F1	200903-Sa-NL k	0,48 ± 0,10		
	201106-Sa-K1		1,72	5,03
F2	200903-Sa-NL k	0,90 ± 0,18		
	200902-Sa-NL1		0,82	-2,32
F3	200903-Sa-NL k	0,06 ± 0,09		
	201106-Sa-K1		1,02	-3,17
F4	200903-Sa-NL k	0,23 ± 0,08		

Tabelle 4.8-2: Proteingehalt der EPS-Fractionen der IAC von *S. aquatilis*.

Die Bestimmung des Sulfatgehaltes über die Ergebnisse der Elementaranalyse (3.4.5.2) zeigte einen Gehalt von 4,62% Sulfat aus 1,87% Schwefel bei Fraktion 1 an. Die zwei Werte des Sulfatgehaltes für die Fraktion 3 stimmten mit 15,10 und 6,78% nicht überein, so wie auch die Schwefelanteile variierten (6,10 und 2,74%).

Das Molekulargewicht und das hydrodynamische Volumen der EPS-Fractionen wurde mittels GPC bestimmt (3.10.2; Tabelle 4.8-3). Alle Fractionen wiesen ein Molekulargewicht von 300 bis 500 kDa auf. Das Molekulargewicht der Hauptfraction F3 lag bei 361 ± 33 kDa. Das hydrodynamische Volumen der Fractionen war bei allen Fractionen größer als das Molekulargewicht. Es betrug zwischen 865 und 1.073 kDa. Das hydrodynamische Volumen der Hauptfraction war 865 ± 65 kDa. Bei einem mittleren Molekulargewicht eines Monomers von 150 g/mol (berechnet aus der Neutralzuckerzusammensetzung der Kontroll-Kultivierungen) ergab sich ein Polymerisationsgrad von 2184 bis 2629 für die Hauptfraction F3.

	Molekulargewicht (Da)		hydrodynamisches Volumen (Da)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
F1	301.600	33.716	882.777	15.704
F1a	380.567	51.707	1.017.342	79.489
F2	414.750	117.168	1.073.469	20.861
F3	361.000	33.375	865.409	65.042
F4	512.867	180.292	886.057	107.727

Tabelle 4.8-3: Ergebnisse der GPC (in Da) der EPS-Fractionen der IAC von *S. aquatilis* (200902-Sa-Ad1).

Die Neutralzuckerzusammensetzung der EPS-Fractionen wurde mittels Acetylierungsanalyse bestimmt (3.4.1.1; Tabelle 4.8-3). Die Fractionen F0, F3 und F4 wiesen eine der Gesamt-EPS entsprechende Neutralzuckerzusammensetzung auf. Dabei machten die Zucker Fukose und Arabinose den größten Anteil am Polysaccharid mit 32,8 bis 43,0% und 31,3 bis 37,5% aus. Die Hauptfraction F3 wies $43,0 \pm 5,6\%$ Fukose sowie $37,5 \pm 1,7\%$ Arabinose auf. Der Aminozucker Fukosamin war mit 13,4 bis 14,8% in den drei Fractionen enthalten. Die Fraction F3 im Speziellen enthielt $13,7 \pm 1,6\%$. Die Fractionen F1, F1a und F2 hatten eine vom Gesamt-EPS und untereinander abweichende Neutralzuckerzusammensetzung erkennen lassen. Der Hauptzucker der Fraction F1 war Glukose mit 20,5%, gefolgt von Arabinose (13,6%), Mannose (13,5%), Xylose (11,3%). Fukosamin war mit 10,5% vertreten. Auffällig war der hohe Anteil (16,4%) unbekannter Signale. Die Zusammensetzung an Monosacchariden der Fraction 1a unterschied sich maßgeblich von Fraction 1 durch das vollständige Fehlen des Fukosamins. Die verbleibenden Zucker waren von vergleichbarer Zusammensetzung. Auch bei Fraction 1a gab es einen höheren unbekanntem Anteil (22,3%). Bei Fraction 2 ließ sich eine Verschiebung der Neutralzuckeranteil von der Xylose (6,8%) und Arabinose (5,2%) hin zur Glukose (55,6%) erkennen. Auch in Fraction 2 fehlte Fukosamin. Es fiel auf, dass die Ausbeuten der Acetylierungen alle sehr gering waren und bei den Fractionen F1, F1a, F2 und F4 die Ausbeuten sogar unter 15% lagen.

Kultivierung	Fukose	Arabinose	Fukosamin	Glukose	Galaktose	Mannose	Rhamnose	Xylose	Unbekannte Zucker	Ausbeute
F0 200902-Sa-K2	32,8	31,3	13,4	7,5	3,2	5,1	0,0	0,0	6,7	22,2
F1 200902-Sa-K2	4,8	13,6	10,5	20,5	6,1	13,5	3,3	11,3	16,4	10,0
F1a 200902-Sa-K2	5,7	11,0	0,0	33,2	0,0	20,4	0,0	7,4	22,3	4,9
F2 200902-Sa-K2	0,0	5,2	0,0	55,6	0,0	13,0	0,0	6,8	19,4	0,5
200902-Sa-NL1	43,0	37,5	13,7	1,3	0,6	0,8	0,0	1,7	2,8	24,8
200902-Sa-NL1	37,4	35,7	15,4	2,6	1,2	1,5	0,0	3,4	0,0	15,0
F3 201106-Sa-K1	34,9	33,2	17,6	3,6	0,7	0,7	0,0	0,0	9,2	25,8
Mittelwert	43,0	37,5	13,7	1,3	0,6	0,8	0,0	1,7	4,0	
s	5,6	1,7	1,6	1,3	0,6	0,8	0,0	1,7	4,7	
F4 200902-Sa-K2	39,5	37,0	14,8	8,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,6

Tabelle 4.8-4: Neutralzuckerzusammensetzung der EPS-Fractionen der IAC von *S. aquatilis*. Anteil der Neutralzucker im Polysaccharid in %; Ausbeute der Acetylierungsanalyse (%).

4.8.2 GPC

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der EPS von *S. aquatilis* wurde mittels GPC durchgeführt (3.10.2; Tabelle 4.8-5). Die Auswertung der Messungen ergab ein Molekulargewicht von etwa 1,8 Mio. Da (1.806 ± 374 kDa) sowie ein hydrodynamisches Volumen von etwa 2,3 Mio. Da (2.258 ± 98 kDa). Es waren keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen erkennbar.

Kultivierung	Molekulargewicht (Da)		hydrodynamisches Volumen (Da)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
200901-Sa-K	1.364.700	494.192	8.343.886	5.526.840
200902-Sa-K2	2.211.000	369.110	2.106.099	332.100
200902-Sa-B1	1.670.000	323.927	5.322.925	1.690.319
200903-Sa-NL k	1.444.000	169.279	1.615.106	203.378
201106-Sa-K1	1.796.500	71.418	2.082.649	68.706
201106-Sa-K2	1.773.000	114.551	1.952.424	115.460
201106-Sa-K 1/2	2.381.000	32.527	2.273.860	89.675
201107-Sa-K1	*		5.383.098**	1.094.587
201107-Sa-K2	*		3.520.534	201.438
Mittelwert	1.805.743	374.191	2.258.445	98.032

Tabelle 4.8-5: Ergebnisse der GPC-Messungen (in Da) mit den EPS von *S. aquatilis*. *keine Auswertung, da MALLS defekt; **Lange Lagerung des gelösten EPS bei -20°C und -4° C. Graue Schrift: Aufgrund starker Abweichungen nicht bei Mittelwertbildung berücksichtigt.

Die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der GPC-Analysen mit den einzelnen IAC-Fraktion von *S. aquatilis* (4.8.1) veranlasste die Vermessung von verschiedenen Salzen der EPS um eine mögliche Aggregatbildung der Polysaccharide zu untersuchen. Untersucht wurde ein Pyridinium-Salz (3.7.1). Außerdem wurde versucht ein Natrium-Salz der EPS zu bilden. Zum einen durch Lösen der EPS unter Verwendung von Dinatrium-EDTA (3.3.7) und anschließender Dialyse gegen Natriumchlorid-Lösungen sowie durch Überführen in die protonierte Molekülform mit Amberlite IR-120 (3.7.1), Deprotonierung mit Natriumhydroxid und Dialyse gegen Natriumchlorid-Lösung. Die Bildung des Natrium-Salzes brachte bei beiden Varianten keine neuen Erkenntnisse über das Molekulargewicht oder das hydrodynamische Volumen (Tabelle 4.8-6). Allerdings zeigte das Pyridinium-Salz der EPS ein dem unbehandelten EPS gegenüber reduziertes Molekulargewicht von etwa 850.000 statt 1,8 Mio. Da (847 ± 20 kDa) und reduziertes hydrodynamisches Volumen mit 1,3 statt 2,3 Mio. Da (1.329 ± 65 kDa).

Salzform	Kultivierung	Molekulargewicht (Da)		hydrodynamisches Volumen (Da)	
		\bar{x}	s	\bar{x}	s
unbehandelt	Mittelwert	1.805.743	374.191	2.258.445	98.032
Pyridinium-Salz	200902-Sa-K2	846.700	19.516	1.329.328	65.155
Na-Salz via Na-EDTA	200903-Sa-NL k	2.098.667	75.593	1.997.397	74.742
Na-Salz via Amberlite	200903-Sa-NL k	2.480.000	1.139.879	1.864.306	527.659

Tabelle 4.8-6: Ergebnisse der GPC-Messungen (in Da) mit den EPS von *S. aquatilis* unterschiedlicher Salzformen des Moleküls und Mittelwert der unbehandelten Proben (Tabelle 4.8-5).

Die GPC-Messungen der zwei weiteren *S. aquatilis* Stämme CAUP und CCALA ergaben zwei von *S. aquatilis* SAG verschiedene Ergebnisse (Tabelle 4.8-7). Die EPS von *S. aquatilis* CAUP zeigten zwei Signale mit einem hydrodynamischen Volumen von 568 und 5 kDa und lagen damit circa um das Vierfache unter dem hydrodynamischen Volumen von *S. aquatilis* der Göttinger Algensammlung (2.258 ± 98 kDa). Um etwa das Vierfache über dem hydrodynamischen Volumen von *S. aquatilis* lag das hydrodynamische Volumen von *S. aquatilis* CCALA. Diese EPS ergaben fünf Peaks mit 8.994, 699, 21, 4 und 3 kDa. Die absoluten Molekulargewichte der EPS von *S. aquatilis* CAUP und CCALA konnten aufgrund eines Defektes im MALLS-Detektor nicht ermittelt werden.

201107-Sa CAUP-				201107-Sa CCALA-			
K1	K2		Mittelwert	K1		K2	Mittelwert
\bar{x}	\bar{x}	s		\bar{x}	s	\bar{x}	
563.558	573.240	11.051	568.399	8.804.411	337.031	9.182.617	8.993.514
5.051	5.457	244	5.254	622.923	67.403	774.212	698.568
				19.967	1.874	21.191	20.579
				4.150	44	4.190	4.170
				2.642	17	2.645	2.643

Tabelle 4.8-7: Hydrodynamische Volumina (in Da) aus den GPC-Messungen mit den EPS von *S. aquatilis* CAUP und *S. aquatilis* CCALA.

4.8.3 HPTLC

Die Untersuchung der Hydrolyseprodukte der Oxalsäurehydrolyse und der TFA-Hydrolyse erfolgte mittels HPTLC (3.10.3.2). Die Abbildungen wurden der Arbeit der von mir betreuten Wahlpflichtstudentinnen des Wintersemesters 2011/2012 entnommen. Die aufgetragenen Referenzsubstanzen zeigten (Abbildung 4.8-1), dass eine Auftrennung bis zu Tetrasacchariden (exemplarisch Stachyose) problemlos möglich war. Außerdem konnte für Zucker ohne Aminogruppe eine lineare Abhängigkeit im Diagramm von den Rf-Werten zu den entsprechenden Molekulargewichten beobachtet werden (Diagramm 4.8-2). Aminozucker mit freier Aminogruppe zeigten einen deutlich verringerten Rf-Wert, wo hingegen die acetylierte Form höhere Rf-Werte aufwies, als es die Molekülgröße hätte vermuten lassen. Die verwendete N-Acetyl-Glukosamin-Referenz trennte sich zudem in zwei Banden auf.

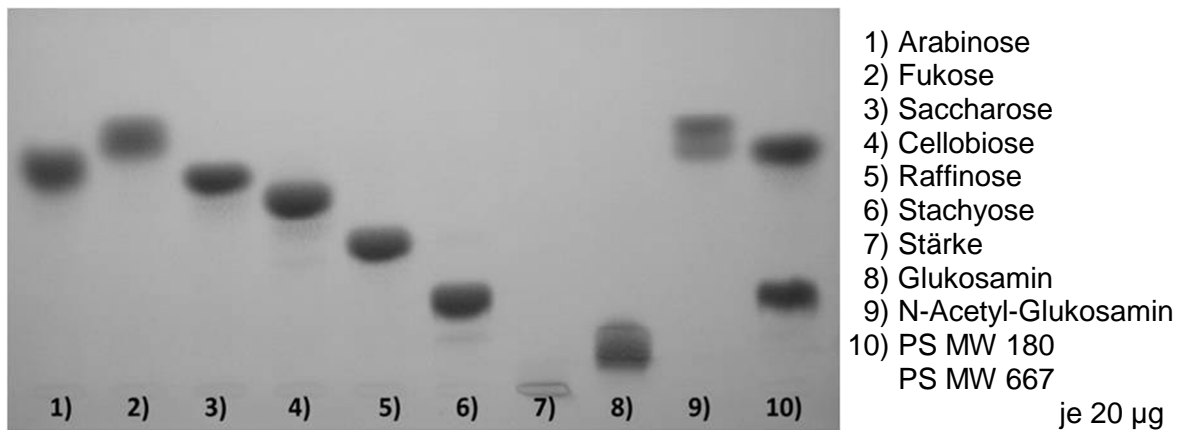


Abbildung 4.8-1: Referenzsubstanzen in der Zucker-HPTLC.

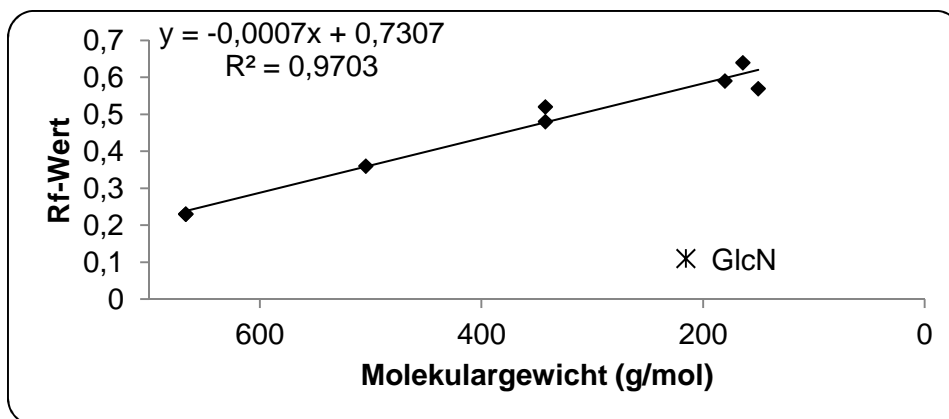


Diagramm 4.8-2: Molekulargewicht der Referenzsubstanzen gegen Rf-Werte aus Abbildung 4.8-1.

Die Untersuchung der Hydrolyseprodukte nach Behandlung mit TFA sollte der Überprüfung der Vollständigkeit der Hydrolyse dienen. Die dazu eingesetzten unterschiedlichen TFA-Konzentrationen zeigten alle eine weitgehend vollständige Hydrolyse (Abbildung 4.8-2). Für die Auswertung wurde aus den ebenfalls aufgetragenen Standards eine platten-individuelle Kalibriergerade erstellt ($y = -0,0007x + 0,696$; $R^2 = 0,9945$). Keine der aufgetragenen Bahnen

zeigte noch deutliche Rückstände an der Auftragsstelle, wie sie bei der Stärkereferenz zu erkennen waren. Oligo- und Polysaccharide schienen nicht mehr in den Hydrolyseprodukten enthalten gewesen zu sein. Die entstandenen Hauptprodukte zeigten Übereinstimmungen der Rf Werte mit den bereits aus der Neutralzuckeranalyse bekannten Zuckern Arabinose (Referenz Rf: 0,57; 150 g/mol) und Fukose (Referenz-Rf: 0,64; 164 g/mol). Die Banden der Hydrolyseprodukte hatten Rf-Werte und errechnete Molekulargewichte von 0,56 / 189 g/mol und 0,65 / 67 g/mol. Bei diesen Werten war zu erkennen, dass die Berechnung des Molekulargewichtes nur als Anhaltspunkt für die Größe, nicht aber als Absolutwert angesehen werden konnte, da die Fukose trotz höherem Molekulargewicht bedingt durch die höhere Lipophilie durch die Methylgruppe am C6 den größeren Rf-Wert aufzeigte. Weitere schwache Banden der TFA-Hydrolyseprodukte waren durch Rf-Werte von 0,40, 0,31, 0,21 und 0,15 charakterisiert. Dabei handelte es sich bei einem mittleren Molekulargewicht der Neutralzuckerzusammensetzung von 150 g/mol um Fragmente mit Polymerisationsgraden (DP) von etwa 2,8, 3,7, 4,7 und 5,2. Die Bandenlagen waren dabei zwischen Disaccharid (Cellobiose) und Trisaccharid (Raffinose), kurz unterhalb des Trisaccharids, auf Höhe des Tetrasaccharids (Stachyose) und unterhalb des Tetrasaccharids gelegen.

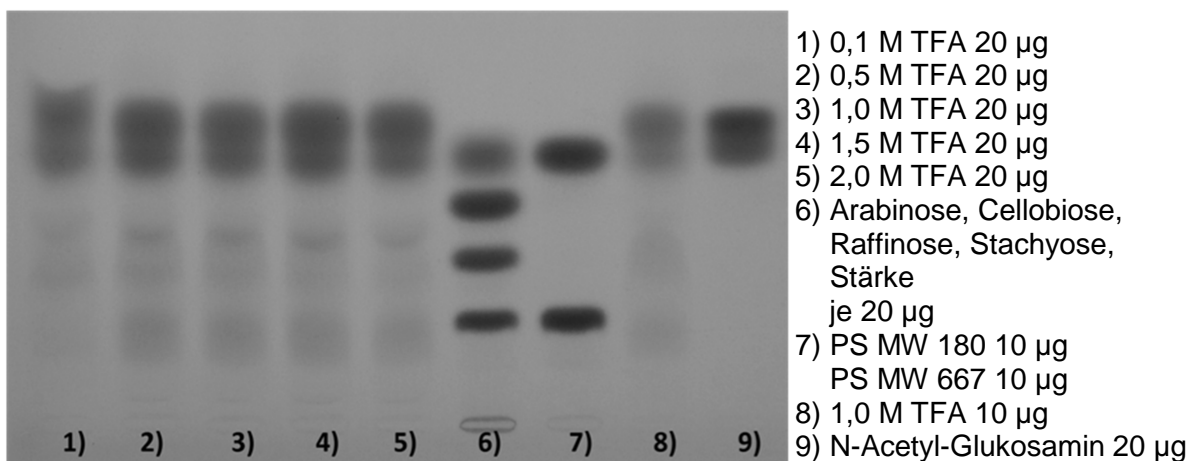


Abbildung 4.8-2: Hydrolyseprodukte der TFA-Hydrolyse aufgetrennt mittels HPTLC.

Bei der Untersuchung der Hydrolyseprodukte aus der Oxalsäurehydrolyse sollte der Fortschritt der Hydrolyse und mögliche Fragmentgrößen betrachtet werden (Abbildung 4.8-3). Die Standardsubstanzen wurden zur Ermittlung einer Kalibriergeraden herangezogen ($y = -0,0007x + 0,6474$; $R^2 = 0,9721$). Die erste Betrachtung galt den Hydrolyseprodukten nach 5 Stunden Hydrolyse mit unterschiedlichen Konzentrationen an Oxalsäure (Abbildung 4.8-3). Bei 0,5 mM Oxalsäure (Bahn 2) zeigte sich zunächst eine teilweise Bildung eines hochmolekularen Fragmentes, welches einen Rf-Wert von 0,04 und einen kalkulierten DP von 5,8 hatte. Bereits die Hydrolyse mit 2 mM Oxalsäure (Bahn 6) zeigte kein hochmolekulares Polymer mehr, sondern eine Hauptbande mit einem Rf-Wert von 0,07 und einem DP von 5,5 sowie zwei schwache Banden bei Rf 0,27 / DP 3,5 und Rf 0,33 / DP 3,0. Diese Hauptbande war bei

Hydrolyse mit 5 mM Oxalsäure (Bahn 10) nicht mehr sichtbar und auch die zwei schwächeren Banden wurden undeutlicher. Dafür entstanden Hydrolyseprodukte mit Rf 0,52 / DP 1,3 und Rf 0,58 / DP 0,7. Letztere konnte der Arabinose (Rf 0,57) zugeordnet werden. Diese Banden waren zunächst nicht klar definiert. Die Hydrolyseprodukte mit 9 mM und 12,5 mM Oxalsäure (Bahn 10 und 11) zeigten klarer definierte, identische Banden bei Rf 0,33, Rf 0,5 und Rf 0,57. Letztere entsprachen den beiden Referenzbanden für Arabinose und Fukose.

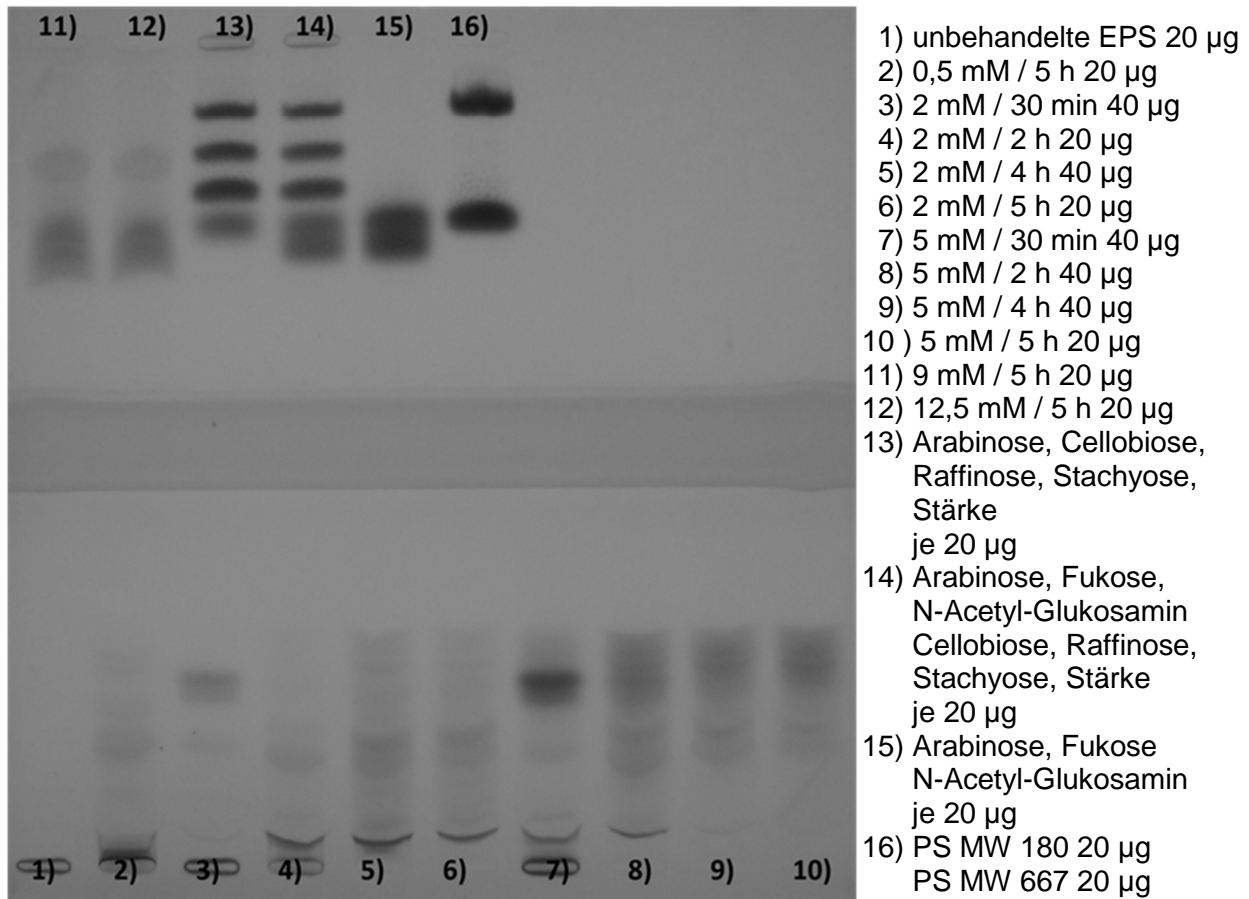


Abbildung 4.8-3: Hydrolyseprodukte der Oxalsäure-Hydrolyse aufgetrennt mittels HPTLC. Angabe: mM Oxalsäure / Hydrolysedauer. Probenauftrag an zwei Plattenseite, Laufrichtung jeweils Richtung Plattenmitte.

4.9 Biologische Aktivität

4.9.1 Testung auf antimikrobielle Wirkung

Die EPS von *S. aquatilis* (201106-Sa-K1) erzeugten mit einer eingesetzten Substanzmenge von sowohl 100 µg als auch 200 µg keinen Hemmhof bei den untersuchten Mikroorganismen (3.11.1).

4.9.2 Komplementaktivität

Der Einfluss der EPS von *S. aquatilis* auf die Komplementaktivität wurde mit einem ELISA-Testsystem untersucht (3.11.2). Die zuvor durchgeführte Aufreinigung der Proben zur Entfernung von Endotoxinen erzielte Ausbeuten von 63,4% für die EPS, 26,3% für CTMS-desulfatierte EPS und 80,8% für oxalsäurehydrolysierte EPS. Alle Proben entstammten den EPS der Kultivierung 201106-Sa-K1. Die Desulfatierung war zuvor mit CTMS in einer Konzentration von 100:1 und einer Reaktionsdauer von 5,25 Stunden durchgeführt worden (3.7.2.) Bei den hydrolysierten Proben handelte es sich um den ethanollöslichen Anteil nach fünfstündiger Oxalsäurehydrolyse und Entsalzung (3.6.1; Entsalzung wie bei der alkalischen Hydrolyse 3.6.2). Die Messungen der Proben von *S. aquatilis* im Testsystem des klassischen Weges des Komplementsystems ergaben eine 100%ige Hemmung der Komplementaktivität durch ein vollständiges Ausbleiben der Bildung des Membranangriffskomplexes (MAK). Um die Bildung des MAKs durch die Komplementreaktion und somit die Komplementaktivität auf die Hälfte (50%) zu reduzieren (IC_{50}), war eine Konzentration an unbehandelten EPS von 0,292 µg/ml ausreichend (Diagramm 4.9-1; Tabelle 4.9-1). Hingegen zeigte weder die desulfatierte noch die partiell hydrolysierte Probe einen Einfluss auf die gebildete MAK-Konzentration im gemessenen Konzentrationsbereich, sodass die Komplementaktivität über 90% lag. Um eine verunreinigungsbedingte Verfälschung der Ergebnisse mit Rückständen an Oxalsäure auszuschließen, wurde die Komplementaktivität in Anwesenheit der maximal möglichen Oxalsäurekonzentration bestimmt. Diese Aktivität im klassischen Aktivierungsweg wurde vollständig gehemmt und lag bei -0,9%. Auch bei Messung nach verkürzter Inkubationszeit zeigte sich keine Änderung des hemmenden Einflusses der EPS von *S. aquatilis* auf den klassischen Komplementweg (Diagramm 4.9-1).

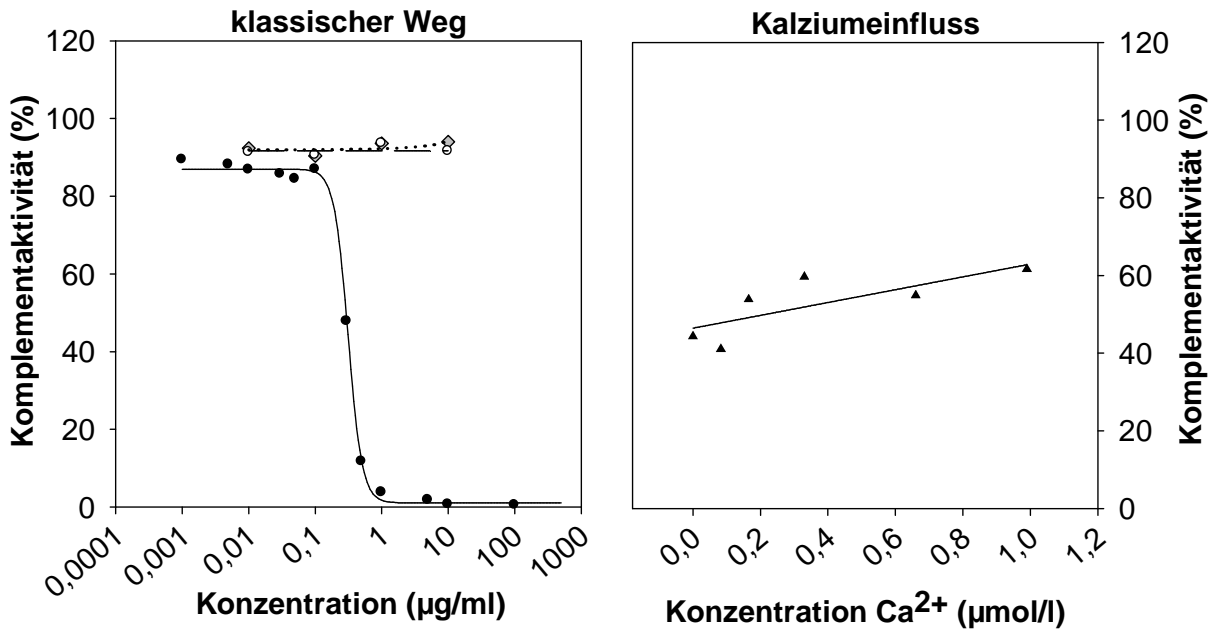


Diagramm 4.9-1: rechts: Aktivität des Komplementsystems des klassischen Weges in Abhängigkeit von der Konzentration der EPS von *S. aquatilis* im Serum.
 ●- unbehandelte EPS; -○- oxalsäurehydrolysierte EPS; ◆- desulfatierte EPS.
 links: Einfluss von Kalziumionen auf die Aktivität des Komplementsystems bei einer EPS-Konzentration von 0,3 µg/ml.

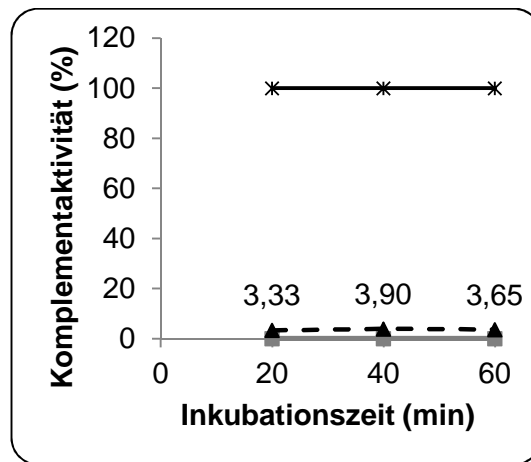


Diagramm 4.9-2: Aktivität des Komplementsystems des klassischen Weges in Abhängigkeit von der Aktivierungszeit der EPS von *S. aquatilis*. ✖- Positivkontrolle, -■- Negativkontrolle, -▲- unbeeideter EPS von 201106-Sa-K1 (Konzentration: 1 µg/ml).

Um einen Einfluss kalziumkomplexierender Eigenschaften der EPS auszuschließen, wurde Kalzium unterschiedlicher Konzentration der EPS-Lösung (0,3 µg/ml) zugefügt. Die theoretisch komplexierte Kalziummenge bei einem molaren Bindungsverhältnis von 1 mol Ca²⁺ zu 2 mol SO₃⁻ nach Uchisawa et al. hätte 0,33 µmol/l betragen [Uchisawa et al., 2001]. Bei Zugabe dieser und darüber hinausgehender Kalziumkonzentrationen konnte nur eine schwache konzentrationsabhängige Aktivitätssteigerung festgestellt werden (Diagramm 4.9-1;

Tabelle 4.9-1). Ein Zusatz äquimolarer Mengen an Dinatrium-EDTA zu reinem Puffer ohne EPS führte zu einer unveränderten Komplementaktivität um 98,7%.

Im alternativen Weg zeigten die EPS von *S. aquatilis* eine schwächere Reduktion der Komplementaktivität mit einem IC_{50} -Wert von 279,84 $\mu\text{g/ml}$ (Diagramm 4.9-3; Tabelle 4.9-1). Auch im alternativen Weg zeigten die desulfatierten und oxalsäurehydrolysierten EPS keinen eindeutigen Einfluss im untersuchten Konzentrationsbereich (Aktivitäten >81%). Die getestete mögliche maximale Oxalsäureverunreinigung ergab 112,5% Komplementaktivität.

Die Komplementaktivität im Lektin-Weg war unter Einfluss der EPS von atypischem Kurvenverlauf (Diagramm 4.9-3; Tabelle 4.9-1). Dieser war flach über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich annähernd linear verlaufend. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) betrug 13,80 $\mu\text{g/ml}$ nach Datenerhebung an vier Tagen mit zwei Verdünnungsreihen. Wie auch bei den zwei anderen Komplementwegen war kein eindeutiger Einfluss der EPS nach Desulfatierung oder Partialhydrolyse beobachtet worden. So lag die Komplementaktivität bei beiden Proben immer über 80%. Oxalsäure in höchstmöglicher Konzentration der Verunreinigung ergab eine Komplementaktivität von 0,14%.

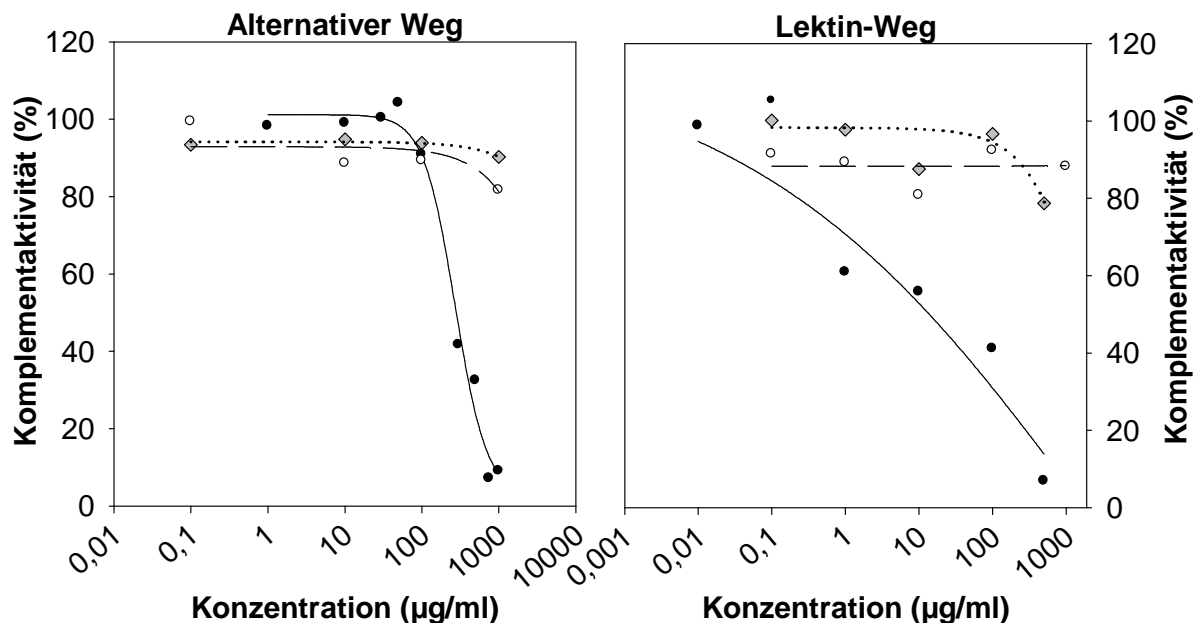


Diagramm 4.9-3: Aktivität des Komplementsystems des alternativen Weges (links) und des Lektin-Weges (rechts) in Abhängigkeit von der Konzentration der EPS von *S. aquatilis* im Serum. ● unbehandelte EPS; -○- oxalsäurehydrolysierte EPS; ◆ desulfatierte EPS.

Klassischer Weg			Alternativer Weg			Lektin-Weg				
Konz. (µg/ml)	1. M	2. M	Konz. (µg/ml)	1. M	2. M	Konz. (µg/ml)	1. M	2. M	3. M	4. M
500		-0,2	1000	9,0		500	3,9		9,6	7,4
100	0,4		750		7,1	100	26,8		45,6	50,9
10	0,6		500		32,4	10	55,8			
5		1,7	300	41,6		1	54,2		63,2	65,1
1	3,7		100	90,8		0,1	111,6	98,8		
0,5		11,6	50		104,1	0,01	93,4			104,0
0,3	47,7		30	100,3						
0,1	86,8		10	98,9						
0,05		84,4	1	98,1						
0,03	85,6									
0,01	86,8									
0,005		88,0								
0,001	89,3									

Tabelle 4.9-1: Einzelergebnisse der Komplementaktivitäts-Messungen von unbehandelten EPS von *S. aquatilis*. Konz.: Konzentration; M: Messung.

4.9.3 Testung der Zytotoxizität

Die EPS von *S. aquatilis* (201106-Sa-K1) zeigten keinen zytotoxischen Effekt (Diagramm 4.9-4; 3.11.3).

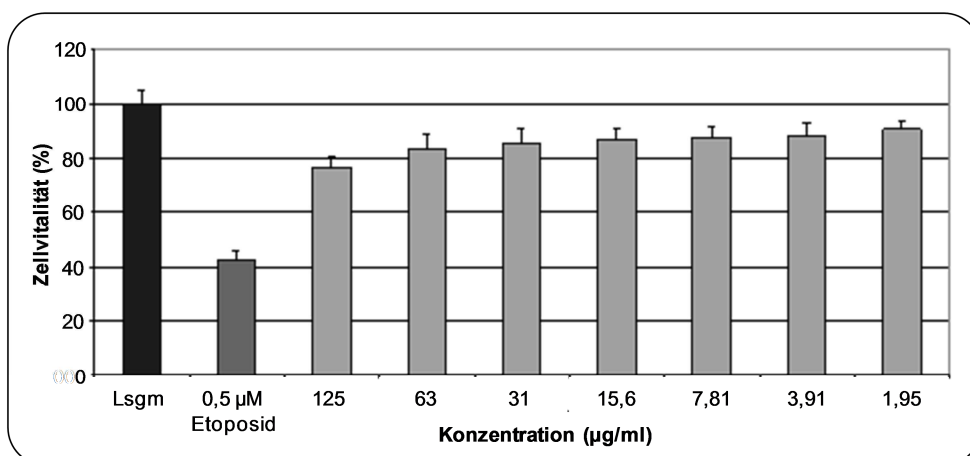


Diagramm 4.9-4: Einfluss von EPS von *S. aquatilis* auf die Zellaktivität in Abhängigkeit von der EPS-Konzentration.

5 Ergebnisse *Synechocystis pevalekii*

5.1 Kultivierung

Das Wachstumsverhalten von Kulturen wird beobachtet, um Vergleiche zwischen unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen ziehen und die Vitalität der Kulturen beurteilen zu können (3.3). Die Kultivierung von *S. pevalekii* ließ dabei Probleme erkennen. Die ersten zwei Kultivierungsansätze zeigten beinahe kein Zellwachstum und somit auch kaum EPS-Bildung. Betrachtete man die Kultivierungen unter Kontrollbedingungen (3.3), so fiel auf, dass die ersten Verläufe von 200901 und 200903 kein nennenswertes Wachstum zeigten (Diagramm 5.1-1). Erst spätere Kultivierungen zeigten ein deutliches Wachstum mit vergleichbaren Verläufen der Zelldichten (3.3.5.2).

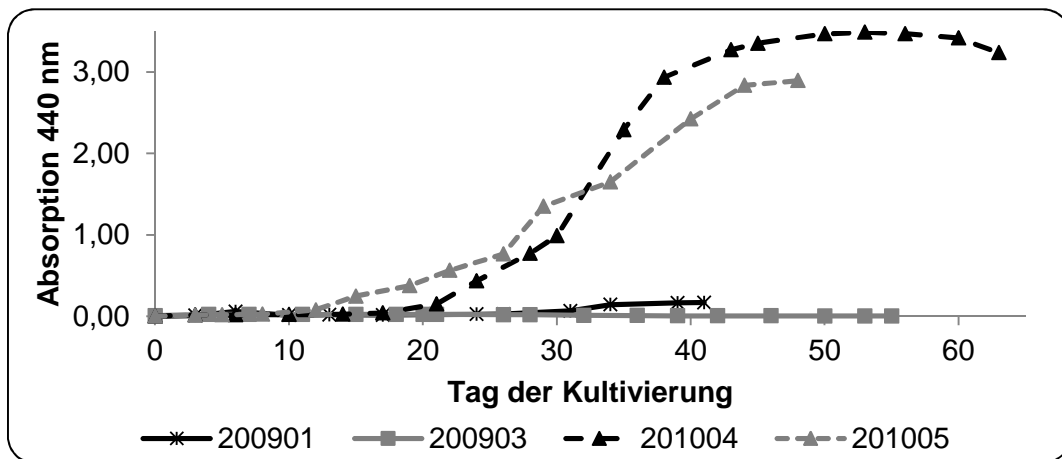


Diagramm 5.1-1: Verlauf der Zelldichten unter der Kultivierung von *S. pevalekii* ohne Variation der Kultivierungsbedingungen. Anzahl der parallelen Batch-Kulturen: 200901 n=4; 200903 n=1; 201004 n=2 (ab Tag 35 n=1); 201005 n=6 (ab Tag 27 n=4).

Das schlechte Wachstum der Kulturen zu Beginn der Arbeit veranlasste die Testung unterschiedlicher Kultivierungsvariationen um mögliche Ursachen erkennbar zu machen (Diagramm 5.1-2). Einige im Diagramm nicht dargestellte Variationen zeigten wie 200903-Sp-K kein Wachstum. Dazu zählten die Kultivierung bei halber Lichtintensität (200903-Sp-K d) und der Ersatz verdunsteten Mediums mit Nährmedium (200903-Sp-NL). Als einzige Variation von 200903 zeigte die Kombination aus halber Lichtintensität und Volumenersatz mit Medium (200903-Sp-NL d) nach etwa 40 Tagen eine Zunahme der Zelldichte. Bei später durchgeführten analytischen Versuchen stellte sich allerdings heraus, dass es sich um eine Kreuzkontamination mit *S. aquatilis* handelte. Die Variationen des Kaliumnitratgehaltes des Mediums (-KNO₃ 1,5-facher und -kno₃ 05-facher Gehalt) in 201004 zeigten kein verbessertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle. Der einzig bewusst veränderte Parameter bei 201004 und damit ein

möglicher Grund für das verbesserte Wachstum gegenüber den zwei vorherigen Kultivierungsversuchen (200901 und 200903) war die Erhöhung des Volumens und der Zelldichte des Inokulums. Daher wurde keine Variation in den Parametern der Kultivierungsbedingungen als sinnvoll erachtet, sondern die Beimpfung erfolgte lediglich mit einer höheren Zelldichte.

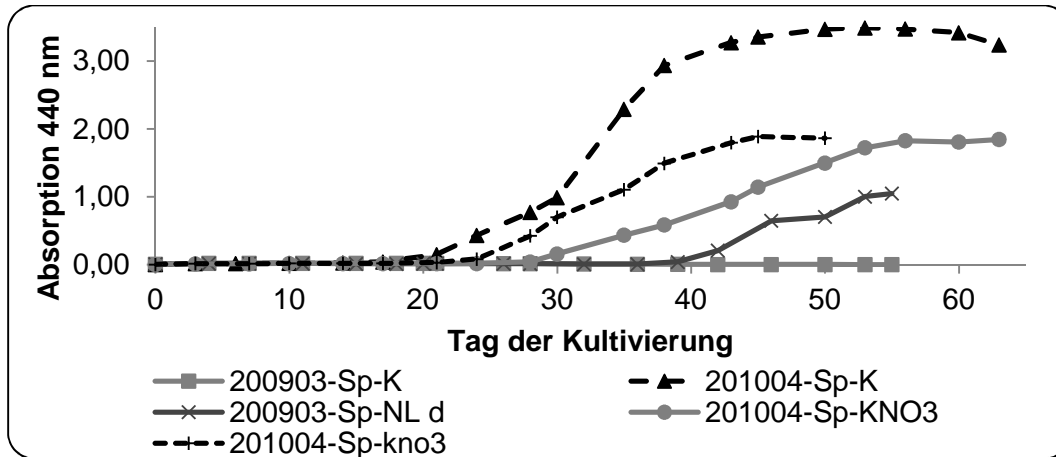


Diagramm 5.1-2: Verlauf der Zelldichten unter der Kultivierung von *S. pevalekii* bei teilweise veränderten Kultivierungsbedingungen. Anzahl der parallelen Batch-Kulturen: 200901 n=4; 200903 n=1; 201004 n=2 (201004-Sp-K ab Tag 35 n=1); 201005 n=6 (ab Tag 27 n=4).

Die Verläufe der Kultivierungen zeigten den klassischen Verlauf. Nach einer etwa 20-tägigen Lag-Phase begann die exponentielle Phase des Wachstums, welche nach etwa 40 bis 50 Tagen in die stationäre Phase überging. Die Ernte erfolgte zu Beginn der stationären Phase und bei 201004-Sp-K erst am scheinbaren Ende dieser Phase.

Eine Eigenfärbung des Medium war bei keiner Kultivierung von 201004 (exemplarische Darstellung von 201004-Sp-K und -KNO3; Diagramm 5.1-3) und davor zu erkennen, sodass die Messung der Eigenfärbung bei 440 nm bei der später folgenden Kultivierung 201005 entfiel.

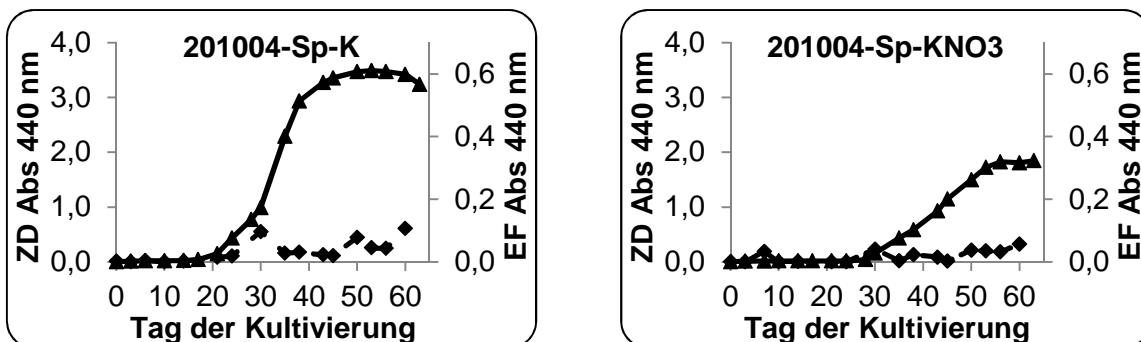


Diagramm 5.1-3: Gegenüberstellung der Zunahme der Zelldichte (ZD, \blacktriangle) und der Eigenfärbung (EF, \blacklozenge) des zellfreien Mediums von *S. pevalekii* über die Kultivierungsdauer. Anzahl der parallelen Batch-Kulturen: 201004 n=2 (201004-Sp-K ab Tag 35 n=1).

Neben der Zelldichte und der Eigenfärbung war die Bildung der EPS von großer Bedeutung, so dass auch diese im Verlauf der Kultivierung anhand der Absorption des Reaktionsproduktes der DuBois-Reaktion betrachtet wurde (3.3.5.3). Eine eindeutige Aussage über Abhängigkeiten der beiden Parameter Zelldichte und EPS-Konzentration ließ sich nicht treffen. Die Kurven von 201004-Sp-KNO₃ deuteten einen parallelen Verlauf an. Auch eine eindeutige Aussage im Vergleich der verschiedenen Medien war nicht möglich. Im Vergleich der beiden Kontrollkultivierungen zeigte 201005 eine deutlich schwächere EPS-Bildung als 201004.

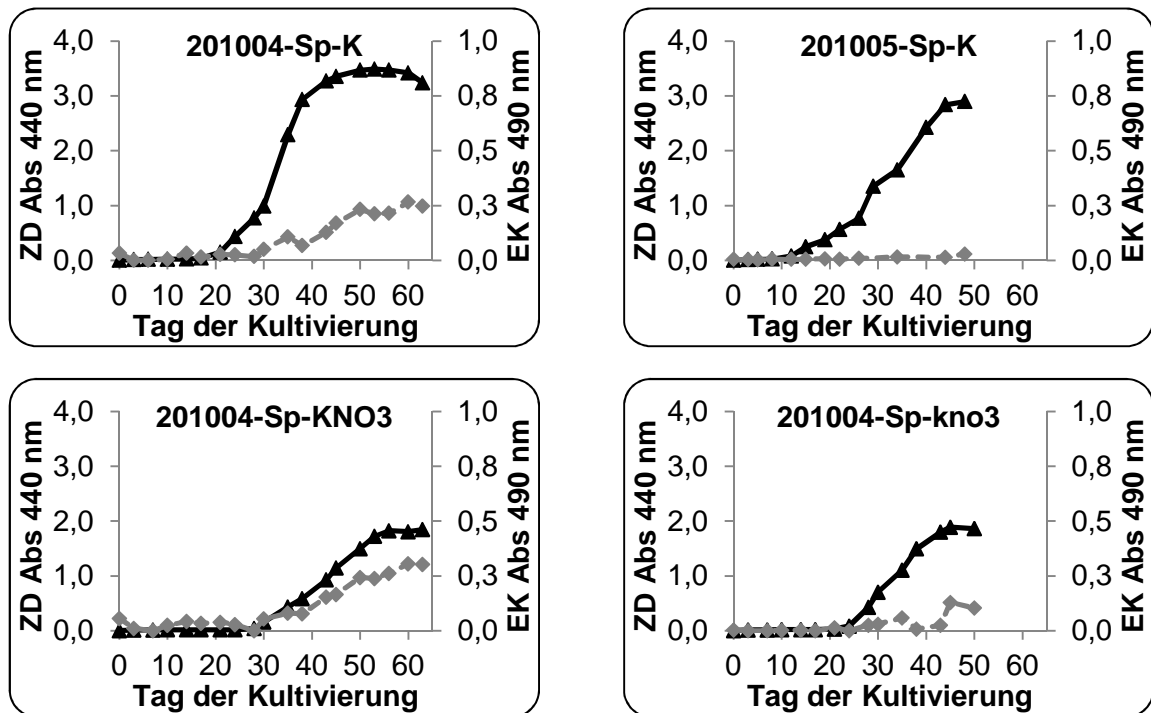


Diagramm 5.1-4: Gegenüberstellung der Zunahme der Zelldichte (ZD, ▲) und der EPS-Konzentration (EK, -◆-) des zellfreien Mediums von *S. pevalekii* über die Kultivierungsdauer. Anzahl der parallelen Batch-Kulturen: 201004 n=2 (201004-Sp-K ab Tag 35 n=1); 201005: n=6 (ab Tag 27 n=4).

Die endgültigen Mengen an Biomasse, Protein und EPS nach den Isolierungsschritten wurden für eine bessere Vergleichbarkeit als Masse bezogen auf das Mediumvolumen pro Kultivierungstag angegeben (Tabelle 5.1-1). Aufgrund des schlechten Wachstums der ersten Kultivierungen (200901 und 200903) schien es nicht sinnvoll, diese in die Auswertung mit einzubeziehen. Betrachtete man die Werte für die produzierte Biomasse bei den Kulturen mit gutem Wachstum bei Kontrollbedingungen, so lagen die Werte zwischen 4,13 und 12,10 mg l⁻¹ d⁻¹. Im Bereich dieser großen Streuung befanden sich auch die Werte der anderen zwei untersuchten Medien (KNO₃ und kno3): 4,40 bis 7,80 mg l⁻¹ d⁻¹. Wie bei den Kultivierungsverläufen der Zelldichte schon beschrieben, erklärte sich der höhere Wert (4,22 mg l⁻¹ d⁻¹) bei 200903-Sp-NL d durch eine Kreuzkontamination mit *S. aquatilis*. Die Protein-Massen, die bei der Isolierung entstanden waren, lagen bei Kontrollkultivierungen zwischen 0,70 und 2,69 mg l⁻¹ d⁻¹. Bei Medium mit anderer Kaliumnitratkonzentration lagen die

Werte für den Proteinanteil tendenziell etwas niedriger bei 0,38 bis 1,39 mg l⁻¹ d⁻¹. Bei dem Ansatz mit Volumenausgleich mit Medium ergab die gebildete Proteinmenge trotz schlechtem Wachstums (Biomasse 0,11 mg l⁻¹ d⁻¹) 1,19 mg l⁻¹ d⁻¹. Die Ergebnisse der EPS-Mengen zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Damit ließen sich die großen Schwankungen mit Werten zwischen 0,05 und 0,5 mg l⁻¹ d⁻¹ erklären. In der Vergleichskultivierung 201004 zeigten die Kulturen mit verändertem Medium analog zur Entwicklung der Zelldichte mit 0,21 bis 0,28 mg l⁻¹ d⁻¹ eine niedrigere EPS-Bildung als die Kontrollkultivierung mit 0,50 mg l⁻¹ d⁻¹.

Kultivierung	KD (d)	Biomasse (g)*	Biomasse (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	Protein (mg)*	Protein (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	EPS (mg)*	EPS (mg l ⁻¹ d ⁻¹)
200901-Sp-K	42	0,79	1,49	1030,07	1,94	74,05	0,14
200903-Sp-K	55	0,02	0,05	183,21	0,54	5,98	0,02
201004-Sp-K1	30	0,88	4,13	369,09	1,73	10,22	0,05
201004-Sp-K2	63	3,23	9,95	766,80	2,36	163,81	0,50
201005-Sp-K k	26	2,07	5,46	265,7	0,70	1197,74**	1,12**
201005-Sp-K I	48	15,47	12,10	3432,99	2,69	135,00	0,11
201004-Sp-KNO3 1	63	1,70	4,40	165,98	0,38	79,52	0,21
201004-Sp-KNO3 2	63	2,66	7,80	393,65	1,02	96,97	0,28
201004-Sp-kno3	50	4,58	7,71	472,80	1,39	134,22	0,23
200903-Sp-NL	55	0,05	0,11	709,60	1,19	9,42	0,02
200903-Sp-K d	55	0,02	0,05	72,22	0,21	5,64	0,02
200903-Sp-NL d	55	1,86	4,22	119,49	0,27	136,57	0,31

Tabelle 5.1-1: Übersicht über gewonnene EPS-, Protein- und Biomassemengen aus den einzelnen Kultivierungen verschiedener Versuchsansätze von *S. pevalekii*.

Farblich hervorgehoben: Kulturen mit gutem Wachstum; KD: Kultivierungsdauer

* Gewonnene Masse eines Kultivierungsansatzes.

**Zugabe von SDS und/oder Dinatrium-EDTA.

Die gebildete Sp-Ausfällung (3.3.6) wurde auch im Hinblick auf ihre Mengen untersucht (Tabelle 5.1-2). Dabei war die Auswertung mit gesonderter Betrachtung von „Protein“ und „EPS“-Anteil schwierig, da die abgetrennte Substanz kaum löslich war und bei der Denaturierung der Proteine und der anschließenden Zentrifugation ebenfalls teilweise abgetrennt worden sein könnte. Außerdem waren die Mengen teilweise zu gering, um sie nach der Entfernung aus dem Medium einer weiteren Aufarbeitung zu unterziehen (200903-Sp-K und -K d, 201004-Sp-K1). Im Ansatz 201004 und 201005 wurde versucht durch Zugabe von Dinatrium-EDTA, wie bei *S. aquatilis* (3.3.7), und Natriumlaurylsulfat (SDS) die Löslichkeit zu erhöhen. Dieses war nicht erfolgreich, sondern führt zu einer Verfälschung der Ergebnisse, da eine Entfernung des SDSs durch Dialyse nicht vollständig möglich, wie optisch erkennbar war. Ebenso verhielt es sich mit den EPS von 201005-Sp-K k. Auch bei diesen wurde durch SDS-Zugabe versucht, die

Löslichkeit vor der Dialyse zu verbessern. Leider war auch dieses nicht zufriedenstellend, so dass diese Kultivierung nur begrenzt für weitere Untersuchungen verwendet wurde.

Kultivierung	KD (d)	Protein (mg)	Protein ($\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	EPS (mg)	EPS ($\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$)
200901-Sp-K	42	426,43	0,80	27,28	0,05
201004-Sp-K2	63	15,57	0,05	257,00	0,78
201005-Sp-K k	26	252,45	0,67	393,99*	1,04*
201005-Sp-K I	48	475,49	0,37	1435,44*	1,12*
201004-Sp-KNO3 1	63	59,98	0,16	61,4	0,67
201004-Sp-KNO3 2	63	68,57	0,20	17,94*	0,05*
201004-Sp-kno3	50	534,95	0,90	39,63	0,03
200903-Sp-NL	55	0,33	0,001	152,72	0,35
200903-Sp-NL d	55	135,64	0,31	56,90	0,13

Tabelle 5.1-2: Ausbeuten an EPS- und Proteinanteil von *S. pevalekii* Ausfällung. Farblich hervorgehoben: Kulturen mit gutem Wachstum; KD: Kultivierungsdauer. *Zugabe von SDS und/oder Dinatrium-EDTA.

Bedingt durch die Zugabe von SDS, welches nicht über die Dialyse entfernt werden konnte, wurden die gewonnenen Massen bei der Sp-Ausfällung nur als Anhaltspunkt gesehen. Die von Kontrollkulturen gebildeten EPS-Mengen schienen einen Bereich von 0,78 bis 1,12 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$ zu erreichen und damit in etwa der Menge an EPS zu entsprechen. Die aus der Ausfällung entfernte Proteinmenge lag zwischen 0,05 und 0,67 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$ und damit etwas unter der aus dem Medium entfernten Proteinmengen.

Abbildung 5.1-1 zeigt das mikroskopische Bild von *S. pevalekii*. Zu erkennen waren dabei größere (ca. 5 μm) und kleinere, hellere Zellen (ca. 3 μm). Die Zellen von *S. pevalekii* lagen als Einzelzellen vor.

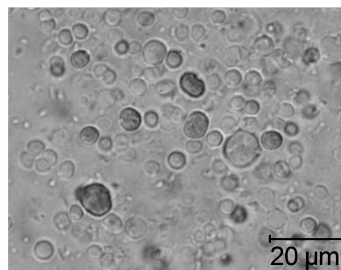


Abbildung 5.1-1: Mikroskopisches Bild von *S. pevalekii*. 800-fache Vergrößerung.

5.2 Polysaccharid-Analytik

Dieses Kapitel beschreibt die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Polysaccharidanteils der EPS von *S. pevalekii*. Die Ergebnisse lassen allerdings noch keine Aussagen über die strukturelle Anordnung der gefundenen Bestandteile im Polysaccharid zu.

5.2.1 Neutralzuckerzusammensetzung

Die Zusammensetzung der Neutralzucker in den EPS von *S. pevalekii* aus verschiedenen Kultivierungen, ermittelt mit der Acetylierungsanalyse (3.4.1.1), ist in Tabelle 5.2-1 aufgeführt. Dabei konnten nicht alle EPS aus den unter 5.1 beschriebenen Kultivierungen untersucht werden, da die gewonnenen EPS-Mengen teilweise unter 6 mg lagen. Hauptsächlich bestanden die EPS von *S. pevalekii* aus den Hexosen Mannose, Glukose und Galaktose sowie der Desoxyhexose Fukose. Weitere Monosaccharide waren Xylose, Rhamnose, Glukosamin und Arabinose. Diese Zucker wurden über ihre Retentionszeit und über Vergleiche mit MS-Spektren bekannter Referenzsubstanzen identifiziert. Zusätzlich entfielen bis zu 20% auf unbekannte Zucker. Diese unbekannt Signale im GC-Chromatogramm, teilweise bis zu 16 Stück, wurden aufgrund ihres einzelnen geringen Massenanteils nicht weiter identifiziert. Von einigen war der allgemeine Aufbau im MS-Spektrum aufgeklärt worden. Bei diesen handelte es sich um eine Hexose, eine Pentose und eine 2-Amino-3-Deoxy-Hexose. Anhand des abgebildeten Chromatogramms (Abbildung 5.2-1) erkannte man, mit welchem zeitlichen Abstand Glukosamin den Detektor erreichte.

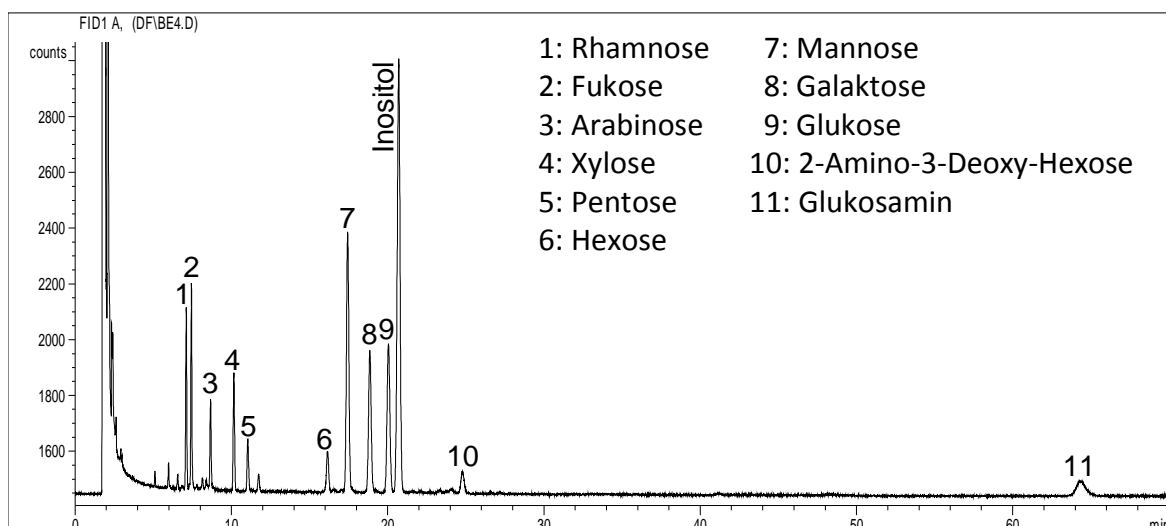


Abbildung 5.2-1: GC-Chromatogramm einer Acetylierungsanalyse von EPS von *S. pevalekii* (am Beispiel 201004-Sp-K 2). Inositol als interner Standard.

Kultivierung	KD (d)	Mannose	Glukose	Galaktose	Fukose	Xylose	Rhamnose	Glukosamin	Arabinose	Unbekannte Zucker	Ausbeute
200901-Sp-K	42	21,6	19,7	9,6	10,5	8,6	6,8	9,0	2,9	11,2	22,4
201004-Sp-K1	30	23,3	22,5	8,0	10,8	17,0	3,2	3,8	2,9	8,6	19,4
201004-Sp-K2	63	22,2	15,4	12,7	8,3	6,3	8,4	12,2	3,5	10,9	24,9
201005-Sp-K k	26	19,6	23,0	14,9	8,1	4,1	9,8	11,6	3,0	5,9	5,00
201005-Sp-K I	48	19,5	18,7	11,9	8,1	3,3	8,8	17,2	3,6	8,9	7,0
Mittelwert Kontrolle		21,3	19,9	11,4	9,2	7,9	7,4	10,8	3,2	9,1	15,7
s		1,6	3,1	2,7	1,4	5,5	2,6	4,9	0,3	2,1	9,1
201004-Sp-KNO3 1	63	24,8	13,5	10,8	9,4	5,9	7,0	7,0	2,7	18,8	31,7
201004-Sp-KNO3 2	63	25,5	16,8	11,3	8,2	5,2	6,8	10,1	2,9	13,1	28,5
201004-Sp-kno3	50	21,0	21,2	12,1	7,1	6,0	6,7	12,7	2,7	10,5	19,2

Tabelle 5.2-1: Neutralzuckerzusammensetzung der EPS von *S. pevalekii* unter Kontrollbedingungen und Kultivierungsvarianten. Anteil der Neutralzucker im Polysaccharid in %; Kultivierungsdauer (KD); Ausbeute der Acetylierungsanalyse (%).
s: Standardabweichung.

Die in Tabelle 5.2-1 aufgeführten Zusammensetzungen der EPS aus unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen ließen keine eindeutigen Unterschiede erkennen. Die Acetylierungsanalyse von 200903-Sp-NL d ergab eine völlig andere Zusammensetzung als die anderen untersuchten EPS: Fukose 38,1%, Arabinose 34,3%, Glukose 7,6%, Fukosamin 14,9%, Mannose 2,0%, Galaktose 1,4% und unbekannte Zucker 0,5%. Diese abweichende Zusammensetzung war mit der von EPS von *S. aquatilis* vergleichbar (Tabelle 4.2-1).

Die Ausbeuten der Acetylierungsanalysen der Kontrollkultivierungen berechnet anhand des internen Standard waren mit $15,7 \pm 9,1\%$ niedrig.

Die Neutralzuckerzusammensetzung der Ausfällung unter der Volumenreduktion des Mediums von *S. pevalekii* nach verschiedenen Kultivierungen ergab kein einheitliches Bild. Um auszuschließen, dass es sich bei der aus der Ausfällung isolierten Proteinfraction nicht um die Ausfällung an sich handelte, da diese sehr schlecht löslich war, wurde auch hier eine Acetylierungsanalyse durchgeführt. Auch diese Fraktionen ergaben keine einheitlichen Ergebnisse der Neutralzuckerzusammensetzung.

5.2.2 Elementaranalyse

Die Ergebnisse der Elementaranalyse (3.4.2) der EPS von *S. pevalekii* sind in der Tabelle 5.2-2 dargestellt.

Kultivierung	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
200901-Sp-K	26,16	4,88	5,56	0,30
201004-Sp-KNO ₃ 2	42,72	6,72	6,98	0,10
201004-Sp-kno ₃	34,52	6,23	7,14	0,00
201005-Sp-K I	39,41	6,59	6,24	1,35
Mittelwert	35,70	6,11	6,48	0,44
s	7,20	0,84	0,73	0,62
201004-Sp-K2	19,51	2,33	1,89	0,00
201005-Sp-K k	46,71	8,12	2,75	6,77

Tabelle 5.2-2: Ergebnisse der Elementaranalysen der EPS von *S. pevalekii* unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen. C: Kohlenstoff; H: Wasserstoff; N: Stickstoff; S: Schwefel.

Die Berechnung der Verteilung der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel auf der Grundlage der bekannten Neutralzuckerzusammensetzung und dem prozentualen Gehalt der Elemente in den einzelnen Monosacchariden ergab:

C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
45,79	6,31	0,82	0,00

Diese Werte stimmten für C, H und S mit den experimentellen Ergebnissen der Elementaranalyse überein. Allerdings wichen die kalkulierten Werte für den Stickstoffgehalt deutlich vom experimentell ermittelten Mittelwert ab. Die Sp-Ausfällung von 200901-Sp-K ergab in der Elementaranalyse Ergebnisse von C 24,14%, H 4,56%, N 3,37% und S 0,16%.

5.2.3 Acetatgehalt

Der nach der Methode 3.4.3 ermittelte Gehalt an Acetatgruppen lag bei EPS von *S. pevalekii* bei $0,041 \pm 0,054\%$ (Tabelle 5.2-3). Die EPS konnten demnach als frei von acylierten Hydroxylfunktionen bezeichnet werden. Eine Aussage über eine Acetylierung anderer funktioneller Gruppen ließ dieses Ergebnis nicht zu (3.4.3.1).

Kultivierung	Gehalt O-Acetat (mmol/l)	s
200901-Sp-K	0,041	0,054

Tabelle 5.2-3: Ergebnis der Acetatbestimmung in EPS von *S. pevalekii*.

5.2.4 Pyruvatgehalt

Der nach der Methode 3.4.4 bestimmte Pyruvatgehalt in EPS von *S. pevalekii* lag bei $0,26 \pm 0,41\%$ (Tabelle 5.2-4).

Kultivierung	Gehalt Pyruvat (% m/m)	s
201004-Sp-K1	-0,16	
201004-Sp-KNO3 1	0,32	0,46
201004-Sp-kno3	0,28	0,41
Mittelwert	0,26	0,41

Tabelle 5.2-4: Ergebnisse der Bestimmung des Pyruvatgehaltes in EPS von *S. pevalekii* verschiedener Kultivierungsansätze.

5.2.5 Sulfatgehalt

Die zwei unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung des Sulfatgehaltes sind in 3.4.5 beschrieben. In Tabelle 5.2-5 wurde der Verbrauch an NaOH-Lösung in der Titration mit konduktometrischer Endpunktsbestimmung der EPS von *S. pevalekii* ausgedrückt als Gehalt an Sulfat und alternativ als Gehalt an Säuregruppen dargestellt. Der Sulfatgehalt läge bei $11,2 \pm 6,6\%$, ein Karbonsäuregehalt bei $6,2 \pm 3,6\%$.

Die Elementaranalyse zeigte, wie in Tabelle 5.2-6 zu sehen, nur einen sehr geringen bis gar keinen Sulfatgehalt an. Somit handelte es sich bei den Ergebnissen der Konduktometrie um einen Gehalt an Säurefunktionen oder anderer geladene funktioneller Gruppen.

Kultivierung	Sulfat (% m/m)	Säure (% m/m)
200901-Sp-K	22,3	12,2
201004-Sp-K2	7,9	4,3
201004-Sp-KNO3 1	6,3	3,5
201004-Sp-KNO3 2	7,4	4,1
201004-Sp-kno3	12,3	6,7
Mittelwert	11,2	6,2
s	6,6	3,6

Tabelle 5.2-5: Ergebnisse der konduktometrischen Titration der EPS von *S. pevalekii* ausgedrückt als Sulfatgehalt und Säuregehalt.

Kultivierung	Sulfat (% m/m)
200901-Sp-K	0,75
201004-Sp-kno3	0,00
201004-Sp-KNO3 2	0,26
201005-Sp-K I	3,34
Mittelwert	1,09
s	1,53
201005-Sp-K k	16,75

Tabelle 5.2-6: Sulfatgehalt in EPS von *S. pevalekii* aus der Berechnung des Schwefelgehaltes aus der Elementaranalyse.

Die konduktometrische Sulfatbestimmung für Sp-Ausfällung ergab einen Sulfatgehalt von 17,1% oder als Karbonsäure ausgedrückt 9,4%. Die Berechnung des Sulfatgehaltes aus der Ergebnissen der Elementaranalyse (5.2.2) ergab 0,39%.

5.2.6 Uronsäuregehalt

Die Bestimmung der Uronsäurekonzentration in EPS von *S. pevalekii* nach der Methode beschrieben in 3.4.6 ergab Werte von 0,71 und 0,21% (Tabelle 5.2-7).

Kultivierung	Gehalt Uronsäuren (% m/m)	s
200901-Sp-K	0,71	0,04
201005-Sp-K I	0,21	0,08
Mittelwert	0,46	0,35

Tabelle 5.2-7: Ergebnisse der Uronsäurebestimmung in EPS von *S. pevalekii*.

5.3 Spektroskopische Methoden

5.3.1 IR-Spektroskopie

Das IR Spektrum der EPS von *S. pevalekii* (200901-Sp-K) findet sich in Abbildung 5.3-1. Das Signal bei 3270 cm^{-1} entsprach der Streckschwingung der O-H Bindung und das Signal 1053 cm^{-1} konnte der Streckschwingung der C-O Bindung zugeordnet werden. Das Signal bei 1625 cm^{-1} gehörte zu einer asymmetrischen Streckschwingung einer C=O Bindung einer N-Acetyl-Gruppe oder einer anderen N-Ester-Gruppe. Die entsprechende Bande bei der Referenzsubstanz N-Acetyl-Glukosamin war ebenfalls bei 1624 cm^{-1} zu finden. Zusätzlich war eine schwächere Bande einer freien Aminogruppe wie bei der Glukosaminreferenz bei etwa 1538 cm^{-1} zu erkennen. Die Bande bei 1403 cm^{-1} ließ sich Valenzschwingungen einer Karbonsäurefunktion oder einer aliphatischen Bindung [Okajima-Kaneko et al., 2007] zuordnen. Banden von Sulfatgruppen bei etwa 1214 cm^{-1} und 856 cm^{-1} waren nicht Bestandteil des Spektrums von *S. pevalekii*. Ebenso konnten keine O-Acetylgruppen (etwa 1737 cm^{-1} ; [Wu et al., 2010]) gefunden werden.

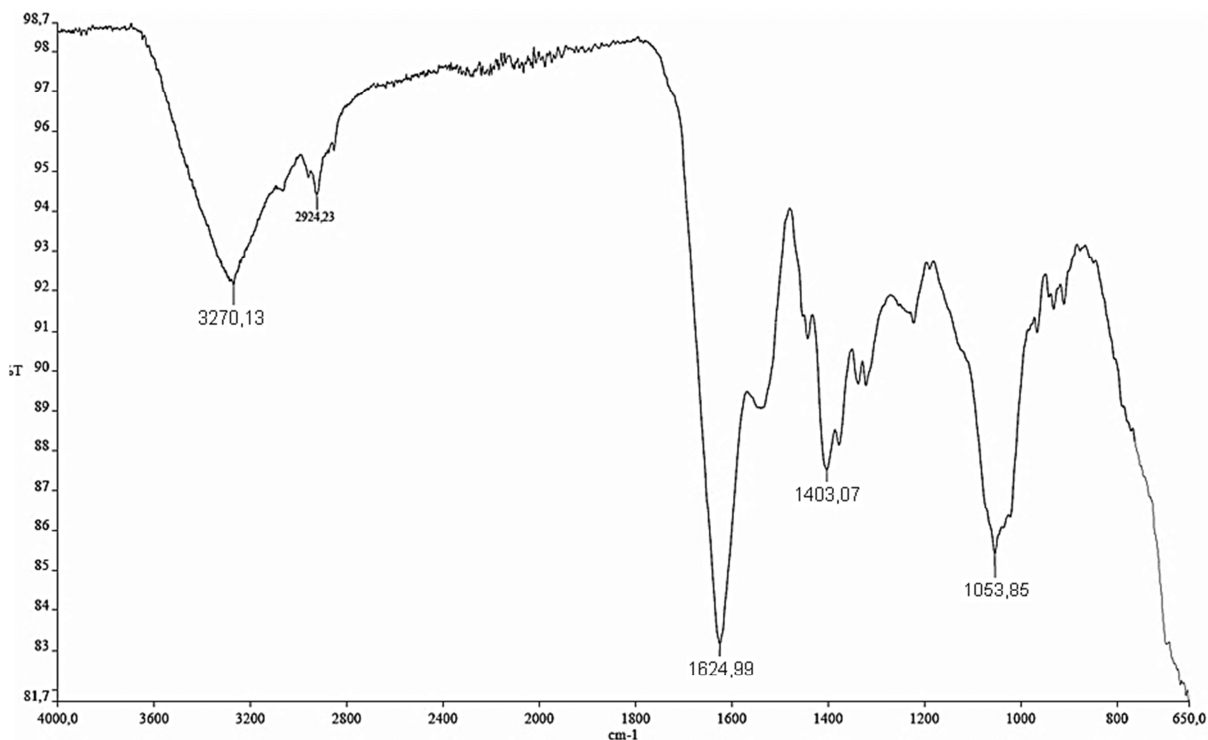


Abbildung 5.3-1: IR-Spektrum von EPS von *S. pevalekii* (200901-Sp-K).
y-Achse: Transmission in %.

5.4 Partialhydrolytische Methoden

5.4.1 Oxalsäurehydrolyse

Die Oxalsäurehydrolyse von EPS von *S. pevalekii* wurde drei Mal durchgeführt (3.6.1; Tabelle 5.4-1). Dabei verteilten sich die Ausbeuten der Fraktionen bei zwei Durchführungen annähernd gleichmäßig auf die drei gewonnenen Fraktionen. Bei der dritten Durchführung mit den EPS von 201004-Sp-K2 bot sich eine andere Verteilung der Ausbeuten. Eine Korrektur der Überstandsfraktion um die eingesetzte Oxalsäuremenge (3,38 mg) war hierbei zudem nicht möglich, da die Auswaage nur 0,88 mg betrug.

Unterschiede waren in der Zusammensetzung der Neutralzucker erkennbar (Tabelle 5.4-2). Die Monosaccharid-Zusammensetzung der ungelösten Bestandteile entsprach der Zusammensetzung des Gesamt-EPS (Tabelle 5.2-1), allerdings mit einem geringeren Anteil Pentosen und Desoxyzuckern sowie einem erhöhten Anteil Mannose und Glukosamin. Die Monomerenzusammensetzung fand sich auch bei dem Überstand der Ethanol-fällung wieder, allerdings mit einem höheren Anteil an Mannose und Galaktose sowie reduzierten Glukose- und Rhamnose-Anteilen. Zur Überprüfung des Vorliegens von Monosacchariden im Fällungsüberstand wurde die Acetylierungsanalyse ohne vorangehende Hydrolyse durchgeführt. Dabei fanden sich alle Zucker, außer Glukosamin wieder. Auffällig war der hohe Anteil an Xylose mit 18,6%. Der mit Ethanol gefällte Anteil wies eine abweichende Neutralzuckerzusammensetzung auf. Der Hauptzucker war Rhamnose (40%), gefolgt von Mannose (19,4%) und Xylose (16,3%). Außerdem war Glukose (10,1%) und Galaktose (6,7%) enthalten. Fukose, Arabinose und Glukosamin fehlten.

Kultivierung	% bez. auf Ausbeute			% bez. auf Einwaage
	Ungelöste Bestandt.	Rückstand Fällung	Überstand Fällung	Summe Ausbeute
201004-Sp-K2	33,25	28,72	38,04	41,7
201004-Sp-KNO3 1	34,40	24,35	41,26	61,2
Mittelwert	33,82	26,53	39,65	51,5
201004-Sp-K2*	76,6	16,7	6,7	78,6

Tabelle 5.4-1: Ausbeuten der Oxalsäurehydrolyse mit EPS von *S. pevalekii* mit anschließender Fraktionierung nach 5 Stunden Hydrolyse.

*Ohne Korrektur um die eingesetzte Oxalsäuremenge.

TFA-Hydrolyse	Mannose	Glukose	Galaktose	Fukose	Xylose	Rhamnose	Glukos-amin	Arabinose	Unbekannte Zucker
Überstand Fällung									
Mit	31,4	12,0	16,6	9,7	7,0	3,7	8,7	4,5	6,4
Ohne	29,7	17,1	8,2	11,8	18,6	7,2	0,0	6,0	1,4
Rückstand Fällung									
Mit	19,4	10,1	6,7	0,0	16,3	40,0	0,0	0,0	7,4
Ungelöste Bestandteile									
Mit	31,4	18,1	13,1	1,3	2,8	4,1	20,7	1,6	7,0

Tabelle 5.4-2: Neutralzuckeranalyse der Fraktionen aus der Oxalsäurehydrolyse der EPS von 201004-Sp-KNO3 1 nach 5 Stunden Hydrolysezeit. Anteil der Neutralzucker in %. Acetylierung des Überstandes ohne TFA-Hydrolyse zur Überprüfung auf Monomere.

Die Untersuchung der Oxalsäurehydrolyse-Fractionen der EPS von *S. pevalekii* mittels GPC (3.10.2) ergab jeweils ein hochmolekulares Hauptsignal. Aufgrund sehr großer Schwankungen in den Ergebnissen der Molekulargewichtsbestimmung schien es sinnvoll, lediglich die hydrodynamischen Volumina zu betrachten. Diese lagen bei den ungelösten Bestandteilen bei 802 ± 40 kDa, bei dem Fällungsrückstand bei 1.171 ± 353 kDa und bei dem Fällungsüberstand bei 845 ± 22 kDa. Auffällig war, dass trotz Unlöslichkeit auf der einen und Löslichkeit in 80% Ethanol auf der anderen Seite das hydrodynamische Volumen von beiden Fraktionen ähnlich groß war. Die unbehandelten EPS hatten ein hV von etwa 1,4 Mio. Da. Zusätzlich zum Hauptsignal waren bei den unlöslichen Bestandteilen und dem Überstand kleinere Signale mit einem hV von 1,3 und 2,1 bzw. 2,3 kDa erkennbar. Der Fällungsrückstand enthielt neben dem Hauptsignal noch Anteile von einem hV von 19 und 1,7 kDa.

Fraktion	Molekulargewicht (Da)		Hydrodynamisches Volumen (Da)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Überstand Fällung	857.467	260.566	845.349	22.026
	n.b.	n.b.	2.100	69
	419	210	1.299	33
	11.616	12.452	363	9
Rückstand Fällung	1.514.725	923.147	1.170.794	352.528
	107.727	68.160	19.374	1.169
	31.136	28.025	1.658	571
Ungelöste Bestandteile	10.157.867	15.925.611	801.564	39.595
	13.805	1.817	2.332	142
	3.977	2.865	1.312	32

Tabelle 5.4-3: Ergebnisse der GPC-Messungen (in Da) der Fraktionen nach Oxalsäurehydrolyse von EPS von *S. pevalekii* (201004-Sp-K2). Graue Schrift: Werte aufgrund großer Schwankungen nicht in die Auswertung einbezogen.

Die Bestimmung des Proteinanteils in den drei Fraktionen der Oxalsäurehydrolyse zeigte den höchsten Proteingehalt im ungelösten Anteil ($17,10 \pm 2,45\%$), gefolgt vom Rückstand nach Ethanol-fällung ($9,39 \pm 1,21\%$) und dem Überstand ($5,98 \pm 0,27\%$) (Tabelle 5.4-4).

Fraktion	Ninhydrin-Methode ohne GlcN- Korrektur
Überstand Fällung	5,98 ± 0,27
Rückstand Fällung	9,39 ± 1,21
Ungelöste Bestandteile	17,10 ± 2,45

Tabelle 5.4-4: Übersicht über Proteingehalte (% m/m) in den Fraktionen nach Oxalsäurehydrolyse der EPS von *S. pevalekii* (201004-Sp-K2).

5.4.2 Alkalische Hydrolyse

Die alkalische Hydrolyse wurde zur Freisetzung der Polysaccharidketten aus den EPS von *S. pevalekii* durchgeführt (3.6.2). Nach der Hydrolyse verblieb ein großer Anteil ungelöster Bestandteile, die optisch als wolkig oder wateartig beschrieben werden konnten, welcher auch nach der Neutralisation nicht vollständig gelöst vorlag.

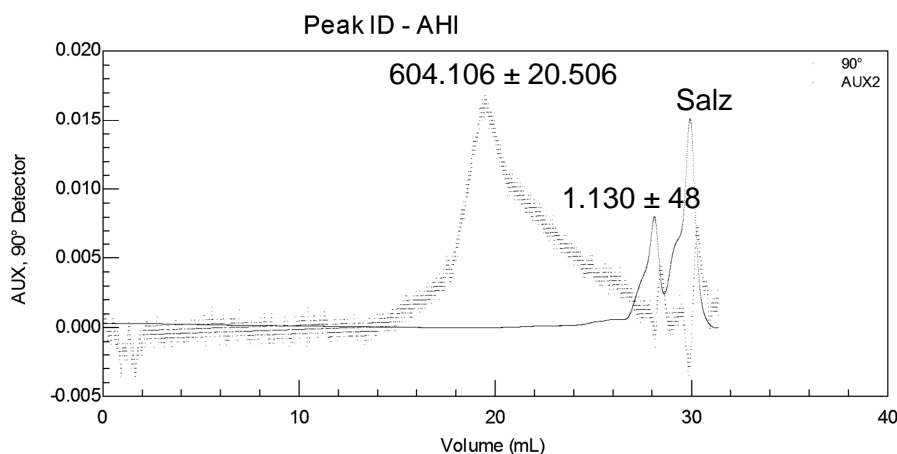


Abbildung 5.4-1: Ergebnis der alkalischen Hydrolyse (in Da) der EPS von *S. pevalekii*. Chromatogramm der GPC der unfraktionierten Probe.

Die Entsalzung der Probe war nicht vollständig, sodass ein Salzrest in der Probe zurückgeblieben war. Die Probe wurde vor und nach der Fraktionierung mittels GPC untersucht. Die unfraktionierte Probe ergab Moleküle mit einem hydrodynamischen Volumen (hV) von 604 ± 21 kDa und 1.130 ± 48 Da (Abbildung 5.4-1). Die ethanolgefällten Probenbestandteile wiesen nur einen Peak im GPC-Chromatogramm mit einem hV von 563 kDa auf. Im Überstand der Ethanolgefällung fanden sich Moleküle mit einem hV von 652 ± 76 kDa und 1.123 ± 37 Da. Als Mittelwerte für die zwei Polysaccharide der EPS von *S. pevalekii* ließen sich demnach 606 ± 44 kDa und 1.127 ± 5 Da errechnen.

5.5 Bindungstyp-Analyse

Die Methylierungsanalyse der EPS von *S. pevalekii* wurde mit zwei verschiedenen Methoden und Variationen davon durchgeführt (Tabelle 5.5-1 mit Abbildung 5.5-2). Zunächst wurde NaOH-Brei zur Aktivierung der Hydroxylgruppen an den Zuckern (3.8.2.3) eingesetzt. Dabei hatte eine anschließende reduktive Hydrolyse keinen Erfolg. Hierbei waren nur kleine Peaks oder Peaks von Artefakten in der GC-MS Messung auffindbar (siehe auch 4.6.1). Die Methode mit Dimsyl-Reagenz, wie sie unter 3.8.1 beschrieben, war hingegen erfolgreich. Dabei kamen die unbehandelten EPS und das Pyridinium-Salz der EPS mit einem Zusatz von Glycerol zur Verbesserung der Löslichkeit zum Einsatz. Eine Kombination von NaOH-Brei Methylierung mit anschließender Aufreinigung über Dialyse gegen demineralisiertes Wasser und eine Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung, wie in der Dimsyl-Reagenz-Methode beschrieben, ergab ebenfalls ein auswertbares Ergebnis.

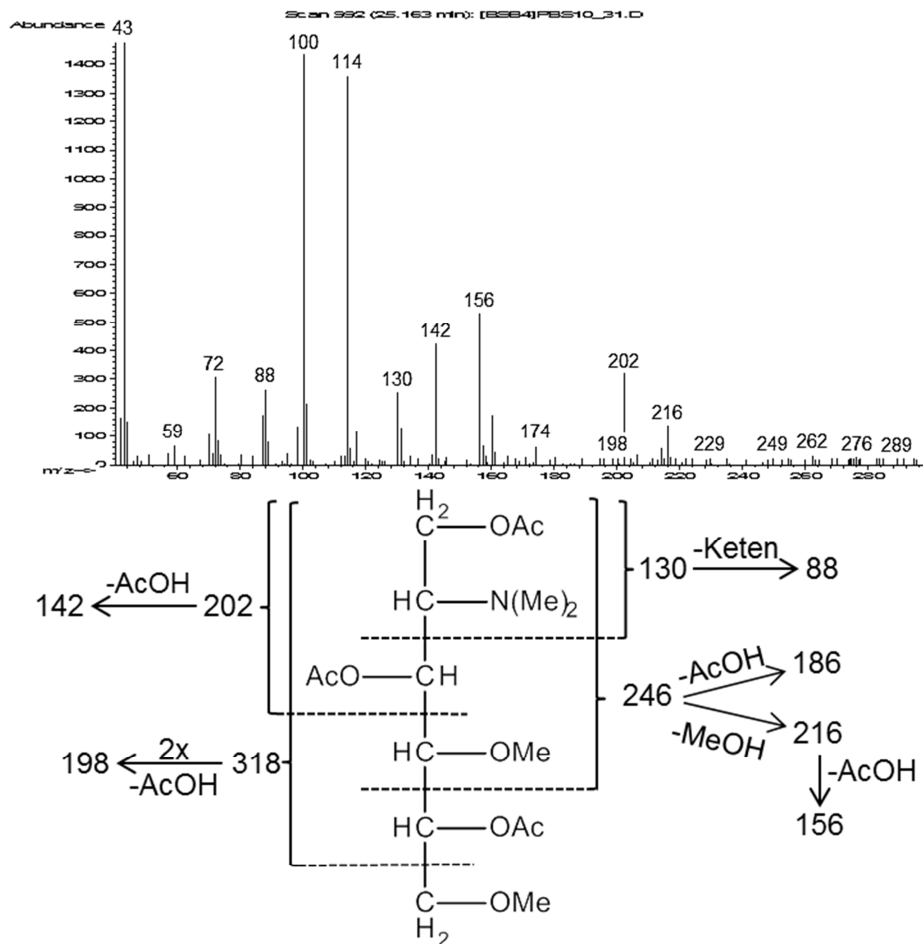


Abbildung 5.5-1: MS-Spektrum und Fragmentierungsmuster des 1,3-Glukosamins aus EPS von *S. pevalekii*.

Kultivierung	EPS-Form		Methodik	Beispiel chromto- gramm	Ergebnis
200903-Sp-K-d	unbehandelt		NaOH-Brei & reduktive Hydrolyse; Aufreinigung: Phasenverteilung; 2-stufige Methylierung (1.: 50 min; 2.: 20 min)	A	schlechte oder nicht-Zucker Signale
201004-Sp-NL +2	unbehandelt		Dimsyl, Aufreinigung: Phasenverteilung	B	
201004-Sp-NL +2	IAC F2		Dimsyl,	C	
201004-Sp-NL +1	Oxalsäurehydrolyse 5h, EtOH-gefällter Anteil		1. Dimsylzugabe doppelte Menge Aufreinigung: Dialyse	D	
201004-Sp-K2	Pyridinium-Salz & Glycerol		Dimsyl, Aufreinigung: Dialyse	E	
201005-Sp-K I	unbehandelt	2 Md	Md von Probenäquivalenten mit NaOH-Brei 2-stufige Methylierung (1.: 20 min; 2.: 50 min) weitere Schritte nach Harris;	F	Zuordnung möglich
201005-Sp-K I	IAC F2	1 Md	Aufreinigung: Dialyse mit MWCO 1000 Da gegen demineralisiertes Wasser		

Tabelle 5.5-1: Übersicht über durchgeführte Methylierungsmethoden und -variationen bei EPS von *S. pevalekii* in zeitlicher Reihenfolge ihrer Durchführung.
Md: Anzahl Methylierungsdurchgänge.

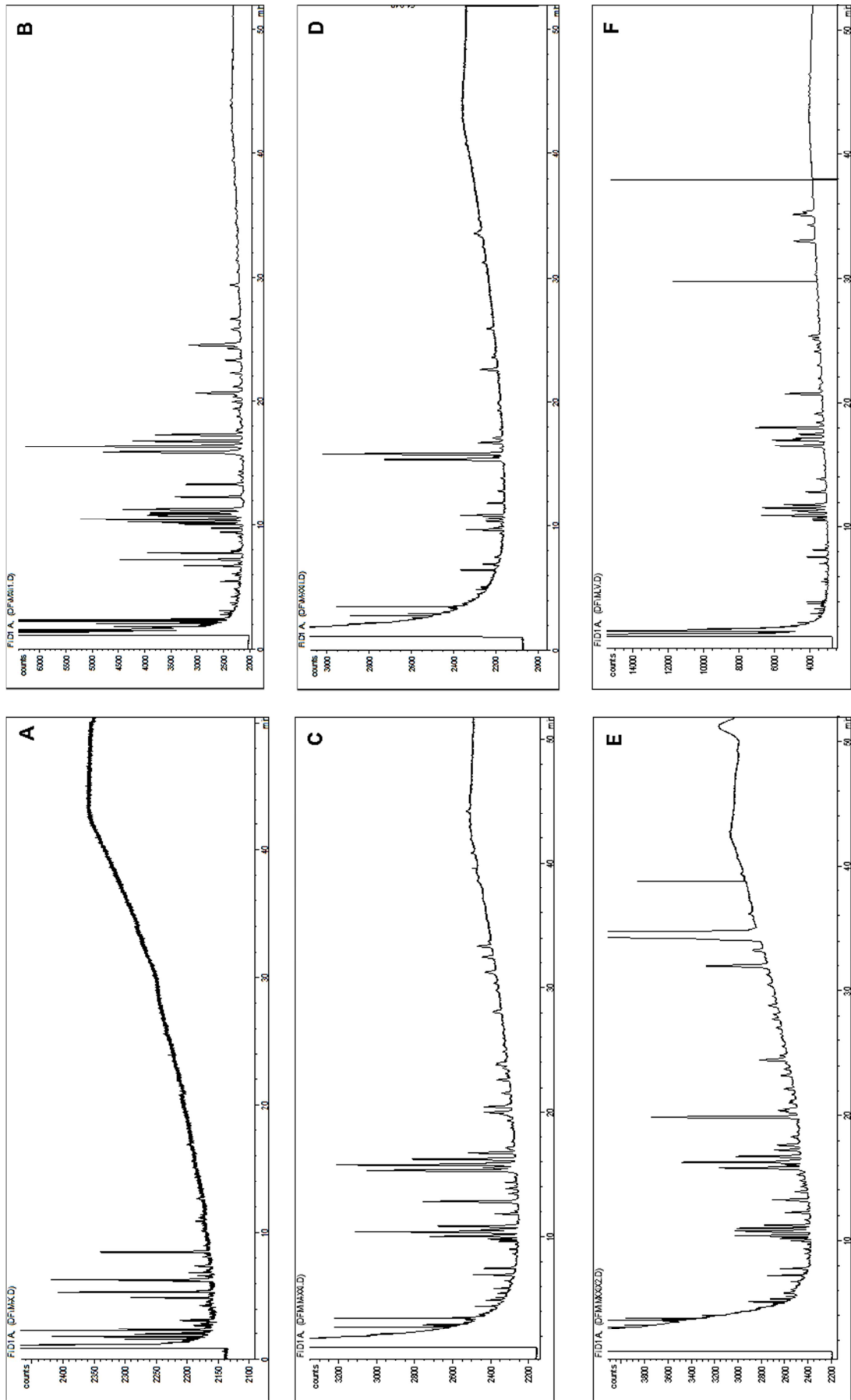


Abbildung 5.5-2: Beispiele für GC-FID Chromatogramme von Methylierungsanalysen von EPS von *S. pevalekii*.

Die Methylierungsanalyse unbehandelter EPS von *S. pevalekii* wurde drei Mal durchgeführt (Tabelle 5.5-2). Dabei ergaben die Methylierungen mit Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung nach Harris et al. [Harris et al., 1984] sowohl bei Methylierung mit Dimethyl-Reagenz als auch mit NaOH-Brei vergleichbare Ergebnisse. Es ergaben sich auch durch die rechnerische Miteinbeziehung des Aminozuckers Glukosamin größere Abweichungen in den einzelnen Bindungstypen durch einen Unterschied von 7,1% im GlcN-Gehalt (5.2.1). Der Aminozucker Glukosamin konnte nur in zwei Methylierungsanalysen gefunden werden, siehe dazu auch 4.6.1. Dabei wies er einen linearen sowie einen verzweigten Bindungstyp auf (Abbildung 5.5-1). Da nicht deutlich war, zu welchem Bindungstyp das fehlende Glukosamin zugeordnet werden sollte, wurde es als x-GlcN bezeichnet. Die Bindungstypanalyse mit Dimethyl-Reagenz des Pyridinium-Salzes der EPS mit Glycerol wurde ebenfalls ausgewertet, allerdings für die Mittelwertbildung nicht berücksichtigt, da sie einen hohen Anteil peracetylierter Glukose (75,4%) aufwies. Wie die Ergebnisse zeigten, war das Polysaccharid von *S. pevalekii* überwiegend linear aufgebaut und bestand beinahe ausschließlich aus pyranosidischen Monosacchariden. Aufgrund der Vielzahl von Bindungstypen waren die einzelnen Anteile sehr gering. Den größten Anteil hatte 1,3-Glukose mit 9,1%, gefolgt von 1,2-Mannose (8,5%) und 1,3-Fukose (7,3%). Des Weiteren waren 1,4-Mannose bzw. -Glukose (6,8%) und terminale Glukose (5,5%) enthalten. Mit Anteilen von weniger als fünf Prozent waren 1,3-Galaktose, 1,4-Fukose, 1,4-Galaktose, 1,2-Xylose, 1,4-Rhamose, 1,2,6-Glukose und 1,3-Arabinose vertreten. Weitere terminale Monosaccharide waren mit zwei bis drei Prozent zu finden: Galaktose, Arabinose und Fukose. Alle weiteren Bindungstypen waren mit 2% und weniger vertreten.

Für die Auswertung der Methylierungsergebnisse von Fraktion F2 der IAC von *S. pevalekii* wurde nur die Methylierung mit Dimethyl-Reagenz betrachtet, da die NaOH-Brei-Methylierung einen höheren Anteil peracetylierter Zucker aufwies. Die Ergebnisse stimmten dabei überwiegend mit den Ergebnissen der Gesamt-EPS überein (Tabelle 5.5-2). Auffällig waren ein erhöhter Anteil 1,4-Fukose (10,2%) und ein höherer Anteil 1,3,4-Fukose (6,5%). Die Zusammensetzung der Bindungstypen bei EPS nach Oxalsäurehydrolyse für fünf Stunden und dem ethanolgefällten Anteil wies größere Unterschiede zum unbehandelten EPS auf (Tabelle 5.5-2). Die beiden Hauptbindungstypen waren mit einem deutlich größeren Anteil enthalten (1,3-Glukose 31,8% und 1,2-Mannose 23,2%). Dafür fehlten nach der partiellen Hydrolyse 1,3-Fukose, 1,4-Mannose / Glukose, 1,3- und 1,4-Galaktose, 1,2,6-Glukose und 1,3-Arabinose. Alle anderen Veränderungen besaßen aufgrund größerer Streuungen der Ergebnisse der Methylierungsanalysen keine Aussagekraft.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass die EPS von *S. pevalekii* aus überwiegend linearen Polysacchariden mit einer Vielzahl von Bindungstypen bestanden.

Bindungstyp	Unbehandelte EPS				IAC F2		Oxalsäure- hydrolyse, 5h, ethanolgefällter Anteil
	PS + Glyc.	Dimsyl	NaOH	\bar{x}	NaOH	Dimsyl	
1,3-Glc	1,1	11,6	6,5	9,1	1,8	13,6	31,8 ↑
1,2-Man	0,9	9,9	7,0	8,5	3,7	11,6	23,2 ↑
1,3-Fuc	0,6	8,0	6,5	7,3	1,9	5,7	0,0 ↓
1,4-Man / Glc	0,0	4,8	8,8	6,8	0,0	3,2	0,0 ↓
1-Glc	0,4	6,5	4,6	5,5	1,8	5,2	6,4
1,3-Gal	0,2	6,7	3,1	4,9	1,3	7,3	0,0 ↓
1,4-Fuc	0,5	3,6	3,3	3,5	2,9	10,2 ↑	2,8
1,4-Gal	0,6	2,6	3,6	3,1	1,2	2,0	0,0 ↓
1,2-Xyl	0,5	0,1	6,1	3,1	1,7	1,5	2,2
1,4-Rha	0,2	4,9	1,3	3,1	0,3	0,0	1,1
1,2,6-Glc	0,1	4,9	0,9	2,9	0,0	0,0	0,0 ↓
1,3-Ara	0,3	3,7	2,0	2,8	0,0	0,0	0,0 ↓
1-Gal	0,2	2,9	2,0	2,5	0,8	1,2	2,5
1-Ara	0,1	3,0	1,6	2,3	1,5	1,4	1,5
1-Fuc	0,0	3,1	1,1	2,1	0,8	1,3	0,8
1,3,4-Fuc	0,3	2,7	0,9	1,8	0,5	6,5 ↑	1,1
1,3,4-Gal	0,0	3,2	0,4	1,8	0,0	10,6	0,0
1,2-Rha	0,1	2,2	1,3	1,8	0,7	0,0	4,9
1,2,6-Gal	0,0	0,8	1,3	1,1	0,0	0,0	1,9
1-Rha	0,0	1,5	0,4	1,0	0,0	2,2	3,2
1,4,6-Man	0,1	1,2	0,6	0,9	0,0	0,9	4,3
1,3,4-Glc	0,0	0,6	0,6	0,6	0,0	1,5	0,0
1,3,4-Man	0,2	0,6	0,5	0,5	0,0	0,2	0,0
1,2,4-Man	0,0	0,7	0,0	0,4	0,0	1,1	0,0
1,2,3-Man	0,0	0,0	0,5	0,3	0,0	0,0	0,0
1-Xyl	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,3,4-Xyl	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4x-Man	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,2,3-Rha	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
1,4-Man	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,4	4,8

Ergebnisse *Synechocystis pevalekii*

1,2,4,6-Man	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0
1-Ara(f)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
x-GlcN	12,2	1,9	17,2	9,6	8,9	0,0	0,0
1,3-GlcN	0,0	4,3	0,0	2,2	0,0	3,9	0,0
1,3,x-GlcN	0,0	3,8	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0
PerAc Fuc	0,3	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0
PerAc Ara	0,4	0,0	1,8	0,9	8,1	1,3	0,0
PerAc Xyl	2,7	0,0	0,0	0,0	25,0	1,5	0,0
PerAc Man	1,4	0,0	6,6	3,3	17,4	2,2	1,6
PerAc Gal	0,2	0,0	2,1	1,1	2,8	1,7	0,0
PerAc Glc	75,5	0,0	7,0	3,5	14,7	0,0	6,0

Tabelle 5.5-2: Übersicht über die Ergebnisse der Methylierungsanalyse der EPS von *S. pevalekii*. Anteil (%) mit (theoretisch berechnetem) GlcN-Gehalt. Alle aufgeführten Monosaccharide in pyranosidischer Form. PerAc: peracetyliert. Graue Schrift: stark abweichende Ergebnisse. Pfeile: Unterschiede gegenüber dem Mittelwert unbehandelter EPS.

5.6 Protein-Analytik

Die Quantifizierung der Proteinmengen in EPS von *S. pevalekii* erfolgte auf dreierlei Methoden (3.9.1; Tabelle 5.6-1). Die Berechnung anhand der Ergebnisse der Stickstoffbestimmung basierten auf den Ergebnissen der Elementaranalyse (Tabelle 5.2-2). Die Quantifizierung mit Ninhydrin nach Hydrolyse erfolgte sowohl ohne als auch mit rechnerischer Korrektur der gemessenen Absorption um die theoretische Färbung durch das Glukosamin.

Kultivierung	Elementar- analyse	Folin- Ciocalteau- Reagenz		Coomassie Brilliantblau		Ninhydrin mit GlcN- Korrektur		Ninhydrin ohne GlcN- Korrektur	
		\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
200901-Sp-K	39,68			0,59	0,09				
201004-Sp-K1						19,40	9,53	20,79	9,53
201004-Sp-KNO3 1		5,02	0,86	4,85	0,32	34,50	3,41	37,17	3,41
201004-Sp-KNO3 2	50,86	4,14	2,23	4,13	0,35	39,66	6,82	47,81	6,82
201004-Sp-kno3	50,45	3,88	1,26	1,86	0,24	26,80	2,43	31,54	2,43
201005-Sp-K I	40,13	4,24	0,58			67,20	3,23	74,13	3,23
Mittelwert	45,28	4,32		2,86		30,09		34,33	
s	6,21	0,49		1,97		8,87		11,27	
201004-Sp-K2	7,53			6,93	0,45			8,92	0,47
201005-Sp-K k	14,99	1,97	0,58			11,50	0,85	16,19	0,85

Tabelle 5.6-1: Übersicht über Proteingehalte (% m/m) in EPS von *S. pevalekii*. Graue Schrift: Aufgrund starker Abweichungen nicht bei Mittelwertbildung berücksichtigt.

Der ermittelte Proteingehalt schwankte in großem Maße in Abhängigkeit der verwendeten Methode. Die Berechnung über den Stickstoffgehalt ergab einen Proteingehalt von $45,28 \pm 6,21\%$. Ebenfalls hohe Werte wurden durch die Quantifizierung mit Ninhydrin ermittelt. Dabei schien eine Korrektur der gemessenen Absorption um die Absorption des Glukosamins erst ab einem Aminosuckeranteil von etwa 50% wirklich sinnvoll, da zuvor eine Überkorrektur stattfand (Diagramm 5.6-1). Demnach lag der mit der Ninhydrin-Methode bestimmte Proteingehalt bei $34,33 \pm 11,27\%$. Einen um das zehnfach geringeren Proteingehalt verglichen mit der Berechnung aus der Elementaranalyse ergaben die Quantifizierungen mit Folin-Ciocalteu-Reagenz und Coomassie Brilliantblau mit $4,32 \pm 0,49\%$ und $2,86 \pm 1,97\%$. Die EPS von 201004-Sp-K2 und 201005-Sp-K k wurden aufgrund der stark abweichenden Ergebnisse nicht in die Mittelwertberechnungen einbezogen.

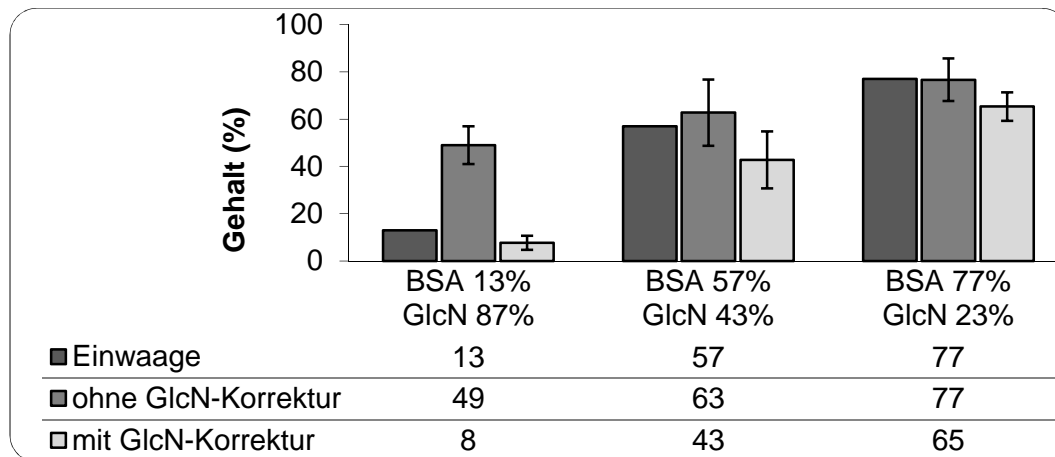


Diagramm 5.6-1: Wiederfindung von BSA-Standard in der Ninhydrin-Quantifizierung bei unterschiedlichen Konzentrationen an Glukosamin mit und ohne Korrektur der Absorption um die theoretische Glukosamin-Absorption.

Die Gehaltsbestimmungen des Proteinanteils in der Ausfällung, die unter der Volumenreduktion des Mediums der *S. pevalekii* Kulturen entstand, und der daraus gewonnenen Proteinfraktion ließen aufgrund inhomogener Ergebnisse keine übergreifende Aussage zu. Die Ergebnisse der Sp-Ausfällung der jeweiligen Kultivierungen lagen zwischen proteinfrei (200903-Sp-K d mit $1,24 \pm 1,06\%$) und reinem Protein (201005-Sp-K I mit $99,1 \pm 4,24\%$). Die Ergebnisse der Proteinfraktion schwankten zwischen $3,73 \pm 0,66\%$ und $56,53 \pm 4,41\%$.

Der erste Vortest der Aminosäurezusammensetzung erfolgte mittels HPTLC (3.10.3.1). Dabei zeigten die hydrolysierten EPS-Proben drei Banden, die den Referenzbanden Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure oder Glukosamin entsprachen. Letztere Bande schien beide Substanzen zu erhalten, da die Asparaginsäure-Bande einen geringfügig höheren Rf-Wert und eine violette Färbung aufwies und die Glukosamin-Bande eine orangene Färbung. Beide Farben waren in der Bande erkennbar: Violett im oberen, Orange im unteren Bandenbereich. Eine vierte Bande mit kleinstem Rf-Wert konnte nicht zugeordnet werden.

Das Ergebnis der Aminosäure-Quantifizierung und -Qualifizierung nach Untersuchung der freigesetzten Aminosäuren mittels HPLC aus den EPS von *S. pevalekii* zeigte hohe Anteile saurer Aminosäuren an (3.9.2.1; Tabelle 5.6-2). Dabei betrug der Asparaginsäuregehalt 12,89% und der Glutaminsäuregehalt 8,96%. Weitere Aufmerksamkeit verdienen die Aminosäuren Threonin (8,31%) und Serin (6,91%), welche für O-glykosidische Bindung zwischen Proteinen und Zuckern verantwortlich sind. Weitere nicht-proteinogene Aminosäuren, die detektiert wurden, waren γ -Aminobuttersäure (0,42%) und Ornithin (0,35%).

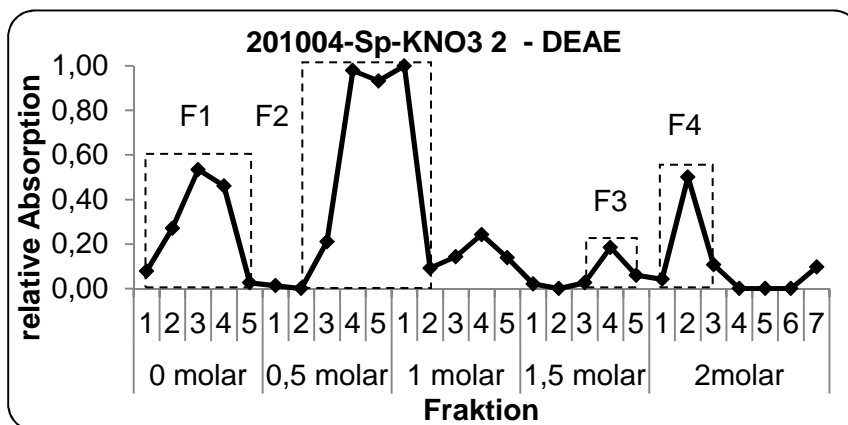
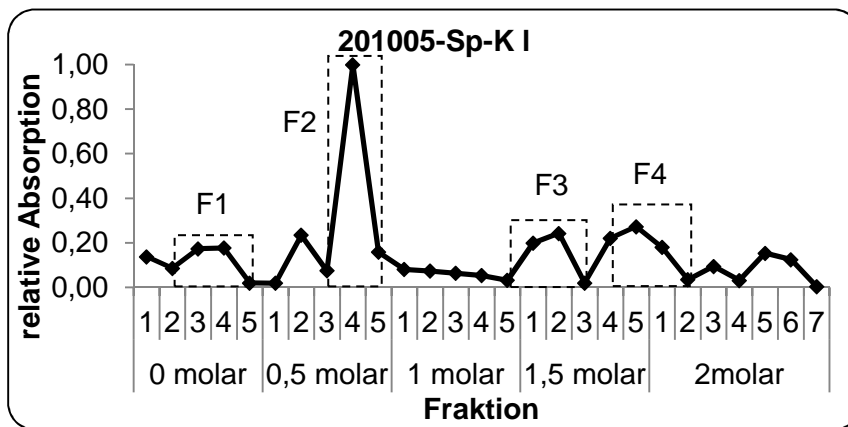
Aminosäure	Anteil (% m/m)
Asparaginsäure	12,89
Glutaminsäure	8,96
Glycin	8,48
Threonin	8,31
Leucin	8,07
Valin	7,57
Phenylalanin	7,48
Alanin	7,40
Serin	6,91
Prolin	6,17
Isoleucin	5,33
Tyrosin	5,22
Lysin	3,96
Arginin	1,73
Methionin	0,41
Histidin	0,17
Tryptophan	0,16

Tabelle 5.6-2: Zusammensetzung der Aminosäuren im Proteinanteil der EPS von *S. pevalekii*.

5.7 Chromatographische Verfahren

5.7.1 Fraktionierung mittels IAC

Die Fraktionierung der EPS von *S. pevalekii* in der IAC aufgrund von Ladung ergab drei bis vier Fraktionen (3.10.1; Diagramm 5.7-1). Dabei eluierte die Hauptfraktion bei 0,5 molarer Natriumchlorid-Konzentration (exemplarisch für alle untersuchten EPS anhand der EPS von 201005-Sp-K I dargestellt). Auch die Auftrennung an DEAE Sepharose, einem schwächeren Kationenaustauscher, ergab vier Fraktionen, wobei der Peak der Hauptfraktion verbreitert eluierte. Mit der Elution mit 0,05 molarer Natriumchlorid-Lösung („Größenausschluss“) wurde nachgewiesen, dass es sich bei der Hauptfraktion um eine ionenbedingte Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial handelt und nicht um eine Retention durch die Molekülgröße. Die feinmolare Elution mit einer größeren Anzahl an Elutionsstufen zeigte die Auftrennung der Hauptfraktion F2 in zwei Fraktionen (Fa und Fb) an. Zusätzlich eluierte bei 0,6 molarer NaCl die Fraktion Fc. Es war nicht ausgeschlossen, dass es sich auch hierbei um einen Teil der Fraktion F2 handelte, der ansonsten in der kurzen Phase des Überganges und der Durchmischung von 0,5 und 1 molarer NaCl eluierte.



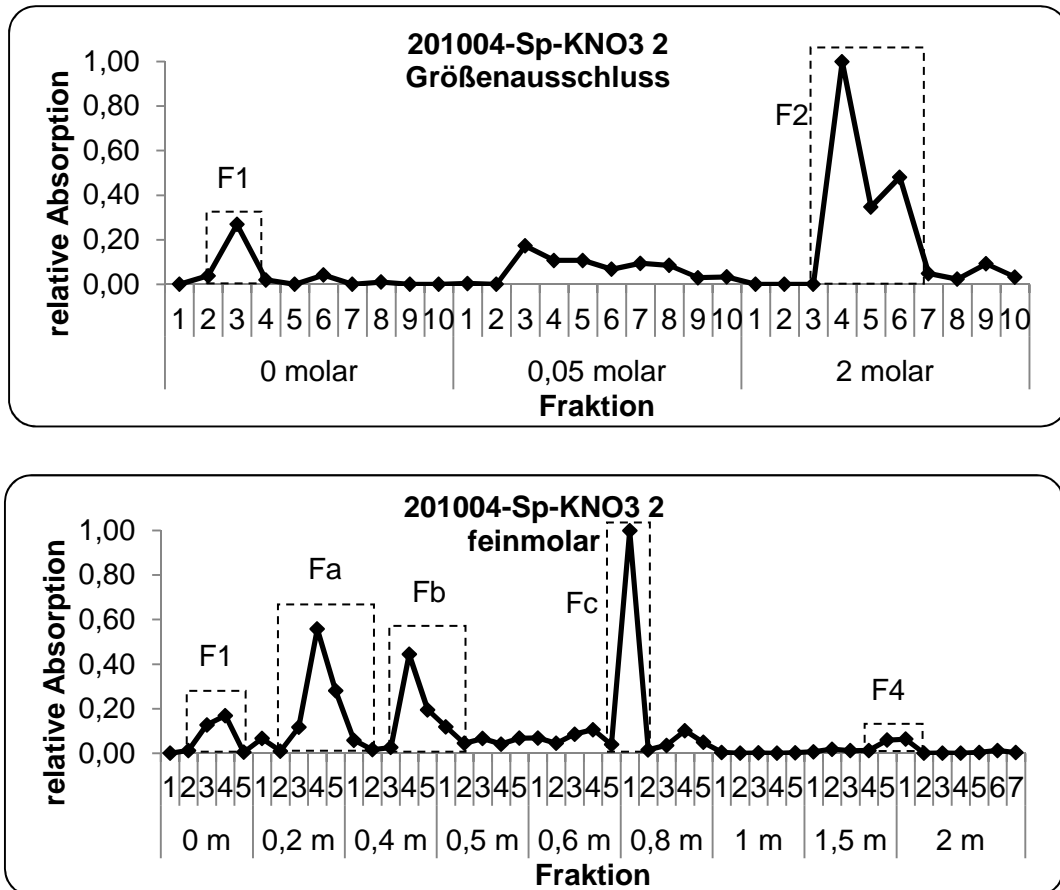


Diagramm 5.7-1: Verläufe der IAC von EPS von *S. pevalekii*. y-Achse: Absorption des Produktes der DuBois-Reaktion, jeweilige höchste Absorption = 1; x-Achse: aufgefangene Fraktionen und Natriumchlorid-Molarität des Elutionsmittels; F: zu einzelnen EPS-Fraktion zusammengefasste gesammelte Fraktionen.

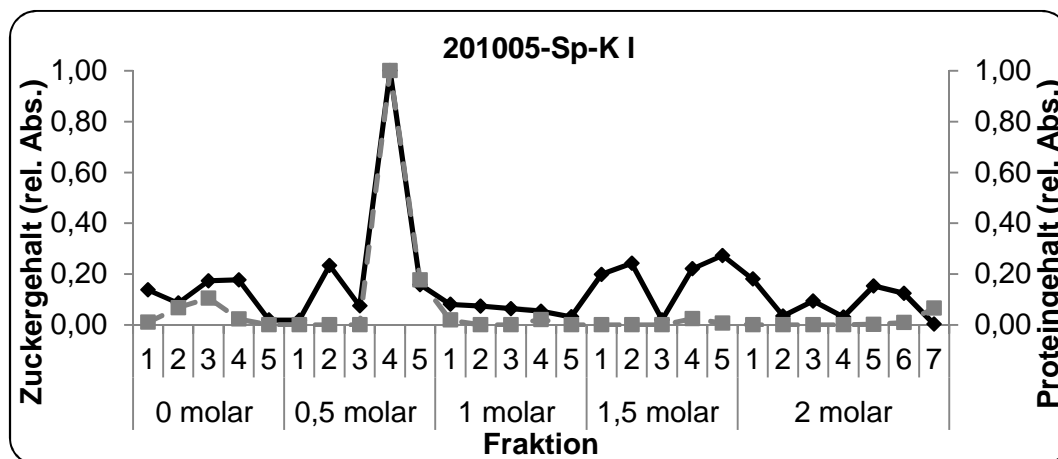
Die Auswertung der Ausbeuten der IAC ergab kein einheitliches Bild (Tabelle 5.7-1). Neben den Ausbeuten der einzelnen Fraktionen zeigten auch die Werte der Gesamtausbeuten eine große Streuung. Die Hauptfraktion F2 bildete die größte Fraktion. Ausnahme war eine Auftrennung von 201004-Sp-KNO₃ 2, mit deutlich größerer Fraktion F1 mit 80,6%, und der Untersuchung von 200901-Sp-K, mit größerer Fraktion F4. Je höher die Molarität des Elutionsmittels, desto größer war allerdings die Wahrscheinlichkeit von Restsalz in den Fraktionen. Die Größe der Hauptfraktion F2 lag bei unauffälligen Versuchen zwischen 47,1 und 55,6%.

Kultivierung	F1	Fa	Fb	Fc	F2	F3	F4	Ausbeute*
200901-Sp-K	7,3				20,4	14,0	58,3	71,6
201005-Sp-K k					51,8	48,2		11,2
201005-Sp-K I	22,2				55,6	22,2		11,8
	27,6				47,1	10,3	14,9	62,0
201004-Sp-KNO3 2	80,6				19,4			87,0
DEAE	14,5				85,5			9,7
feinmolar	18,8	24,5	30,6	10,0	65,1 ¹		16,2	32,0

Tabelle 5.7-1: Verteilung der Ausbeuten (%) der IAC von *S. pevalekii*.
 *Ausbeute bezogen auf die Einwaage (%); ¹ Summe der Fraktionen Fa-c.

Die Untersuchung des Verlaufes der Proteinelution in der IAC zeigte eine überwiegend parallele Elution von Zucker- und Proteinanteil (exemplarisch für alle untersuchten EPS für die EPS von 201005-Sp-K I im Diagramm 5.7-2 dargestellt). Besonders die Zucker-Hauptfraktion der Fraktionierung an Sepharose Q zeigte eine hohe Übereinstimmung mit dem Verlauf des Proteingehaltes. Die molaritätsabhängige Fraktionensammlung (Diagramm 5.7-3) zeigte, dass in allen Fraktionen ein Polysaccharid- und ein Protein-Anteil enthalten war. Durch die feinmolare Elution, als auch durch die Elution mit 5 molarer Harnstofflösung war es nicht möglich, den Proteinanteil abzutrennen. Der Mittelwert der gefundenen Werte der Molaritäts-Fraktionen spiegelte die Zusammensetzung der Gesamt-EPS wieder (5.2.1).

Die Ergebnisse der Acetylierungsanalyse der Hauptfraktion (Tabelle 5.7-2) entsprach annähernd den Ergebnissen der Gesamt-EPS (Tabelle 5.2-1). Die Fraktion F1 fiel durch das Fehlen von Glukosamin und Xylose auf. Die Fraktionen F3 und F4 wiesen ebenfalls kein Glukosamin auf sowie sehr geringe Anteile Galaktose. Dem gegenüber standen hohe Anteile Fukose und Arabinose. Außerdem enthielt die Fraktion F4 keine Rhamnose-Anteile.



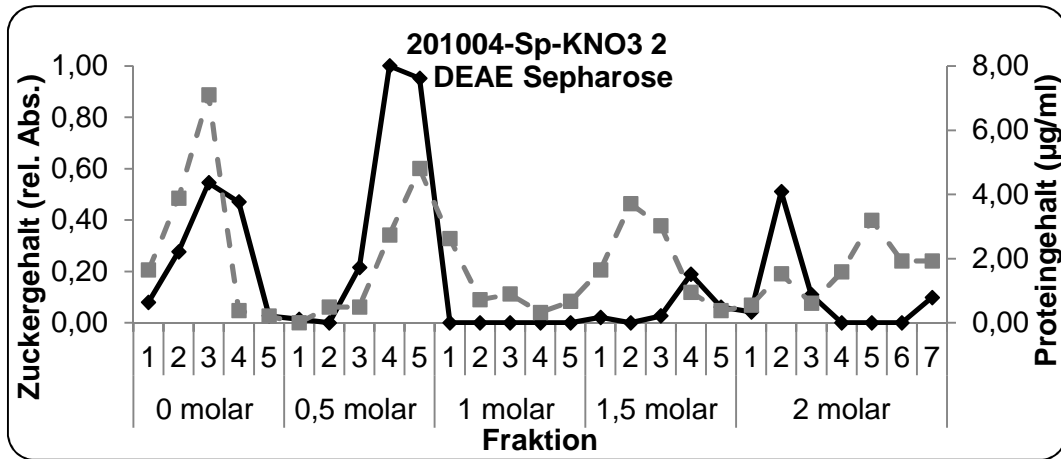


Diagramm 5.7-2: Verläufe der IAC von EPS von *S. pevalekii*. ◆ Zuckergehalt der Fraktionen, primäre y-Achse (Absorption des Produktes der DuBois-Reaktion, höchste Absorption = 1); -■- Proteingehalt der Fraktionen, sekundäre y-Achse (Gehalt in µg/ml ohne Aminosucker-Korrektur oder relative Absorption mit höchster Absorption = 1); x-Achse: aufgefangene Fraktionen und Natriumchlorid-Molarität des Elutionsmittels.

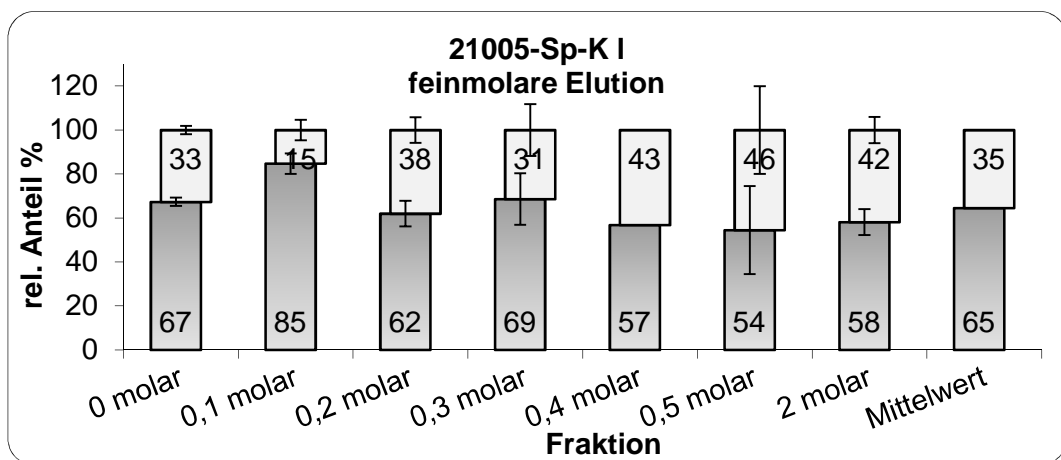
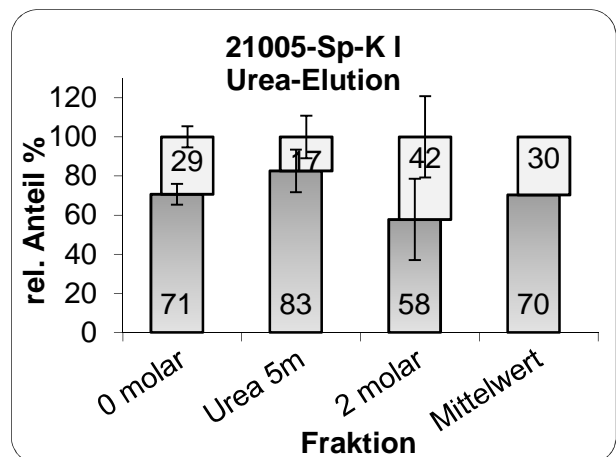
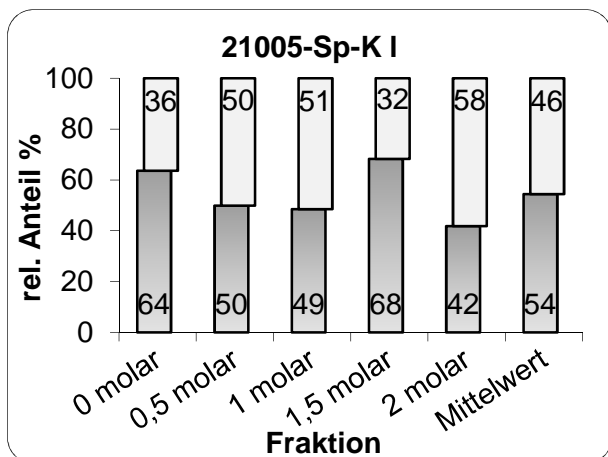


Diagramm 5.7-3: Zusammensetzung von IAC-Fraktion bei molaritätsabhängiger Fraktionensammlung. ■ Zuckergehalt der Fraktionen (%); □ Proteingehalt der Fraktionen (%; ohne Aminosuckerkorrektur); x-Achse: aufgefangene Fraktionen und Molarität des Elutionsmittels.

	Mannose	Glukose	Galaktose	Fukose	Xylose	Rhamnose	Glukos-amin	Arabinose	Unbekannte Zucker	Ausbeute
F1	38,6	14,7	7,7	1,5	0,0	7,9	0,0	4,9	24,7	9,6
F2	22,2	19,7	13,8	14,4	5,5	4,7	8,9	4,9	5,7	54,3
F3	10,4	28,2	0,0	23,2	6,8	7,9	0,0	23,6	0,0	46,9
F4	10,7	31,1	2,8	20,2	3,5	0,0	0,0	31,7	0,0	38,7

Tabelle 5.7-2: Neutralzuckerzusammensetzung der EPS-Fraktionen der IAC von *S. pevalekii* (201004-Sp-KNO3 2). Anteil der Neutralzucker im Polysaccharid in %; Ausbeute der Acetylierungsanalyse (%).

Die Bestimmung der Molekulargewichte und der hydrodynamischen Volumina (hV) der Fraktionen (Tabelle 5.7-3) ergaben für die Hauptfraktion F2 574 ± 60 kDa und 893 ± 20 kDa und lagen damit unter dem Wert der Gesamt-EPS (Tabelle 5.7-4). Die Messergebnisse für die Fraktion F3 waren für das Molekulargewicht um etwa 100 kDa geringer, die hV-Ergebnisse stimmten überein. Während die Ergebnisse für F4 ein mit F2 übereinstimmendes Molekulargewicht ergaben, war das hV um etwa 100 kDa größer. Die Fraktion F1 zeigte in beiden Messgrößen deutlich größere Werte. Das Molekulargewicht lag bei etwa 1,6 Mio. Da, während das hV bei 2,6 Mio. Da lag. Besonders der erste Wert zeigte allerdings eine hohe Standardabweichung.

	Molekulargewicht (Da)		hydrodynamisches Volumen (Da)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
F1	1.660.667	516.115	2.597.935	159.396
F2	573.633	60.052	892.631	20.286
F3	357.650	62.720	721.370	333.951
F4	636.400		1.006.126	245.405

Tabelle 5.7-3: Ergebnisse der GPC-Messungen (in Da) der EPS-Fraktionen der IAC von *S. pevalekii* (201004-Sp-KNO3 2).

Der Verlauf der IAC der Ausfällung der EPS von *S. pevalekii* ähnelte den EPS von *S. pevalekii*. Es erschien dabei eine Hauptfraktion bei Elution mit 0,5 molarer Natriumchlorid-Lösung sowie kleine Fraktionen bei 0 molarer, 1 molarer und 2 molarer Natriumchlorid-Lösung. Auf die Hauptfraktion F2 entfiel eine Ausbeute von 82,1% und auf F3 17,9%. Die restlichen Fraktionen konnten aufgrund zu geringer Massen nicht bestimmt werden. Die Gesamtausbeute bezogen auf die Einwaage betrug 17,3%.

5.7.2 GPC

Die Bestimmung der Molekülgröße der EPS von *S. pevalekii* erfolgte über GPC-Messung (3.10.2; Tabelle 5.7-4). Dabei zeigten alle Chromatogramme einen Peak mit einem Molekulargewicht von 2.326 ± 523 kDa. Die dazu bestimmten hydrodynamischen Volumina (hV) wiesen große Schwankungen zwischen 1,9 Mio. und 15,4 Mio. Da auf. Manche Chromatogramme wiesen einen zweiten Peak mit einem Molekulargewicht von 1.369 ± 500 kDa auf. Das hV dieses Peaks lag bei 842 ± 56 kDa.

Peak 1	Molekulargewicht (Da)		hydrodynamisches Volumen (Da)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
200901-Sp-K	2.032.750	607.597	15.412.773	2.486.769
200903-Sp-K	2.190.000		1.913.534	81.764
201004-Sp-K	2.574.000	325.018	2.934.835	381.295
201005-Sp-K k	8.556.000*		7.664.522	205.534
201005-Sp-K I	2.891.000		7.625.683	667.240
Mittelwert	2.326.000	522.615		

Peak 2	Molekulargewicht (Da)		hydrodynamisches Volumen (Da)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s
200901-Sp-K	1.198.125	539.176	854.780	317.827
200903-Sp-K	-		-	
201004-Sp-K	1.931.333	487.166	842.156	56.438
201005-Sp-K k	-		586.876	32.768
201005-Sp-K I	976.100		-	
Mittelwert	1.368.519	499.893	842.156	56.438

Tabelle 5.7-4: Ergebnisse der GPC-Messungen (in Da) mit den EPS von *S. pevalekii*. * Lange Lagerung des gelösten EPS bei 4°C und -20° C.

5.8 Biologische Aktivität

5.8.1 Testung auf antimikrobielle Wirkung

Die EPS von *S. pevalekii* (201004-Sp-K2) erzeugten mit einer eingesetzten Substanzmenge von sowohl 100 µg als auch 200 µg keinen Hemmhof bei den untersuchten Mikroorganismen (3.11.1).

5.8.2 Komplementaktivität

Der Einfluss der EPS von *S. pevalekii* (201005-Sp-K I) auf die Komplementaktivität wurde mit einem ELISA-Testsystem zur Quantifizierung des Membranangriffskomplexes (MAK) gemessen (3.11.2; Diagramm 5.8-1; Tabelle 5.8-1). Die zuvor durchgeführte Endotoxin-Entfernung hatte eine Ausbeute von 33,0%. Die Bestimmung der MAK-Konzentration und der damit einhergehenden Komplementaktivität in Anwesenheit der EPS ergab im klassischen Weg einen hemmenden Effekt mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 427,70 µg/ml. Im Lektin-Weg zeigten die EPS mit einem IC_{50} -Wert von 431,35 µg/ml einen vergleichbaren Einfluss. Im alternativen Weg des Komplementsystems zeigten die EPS von *S. pevalekii* keinen eindeutigen Einfluss auf die Aktivität.

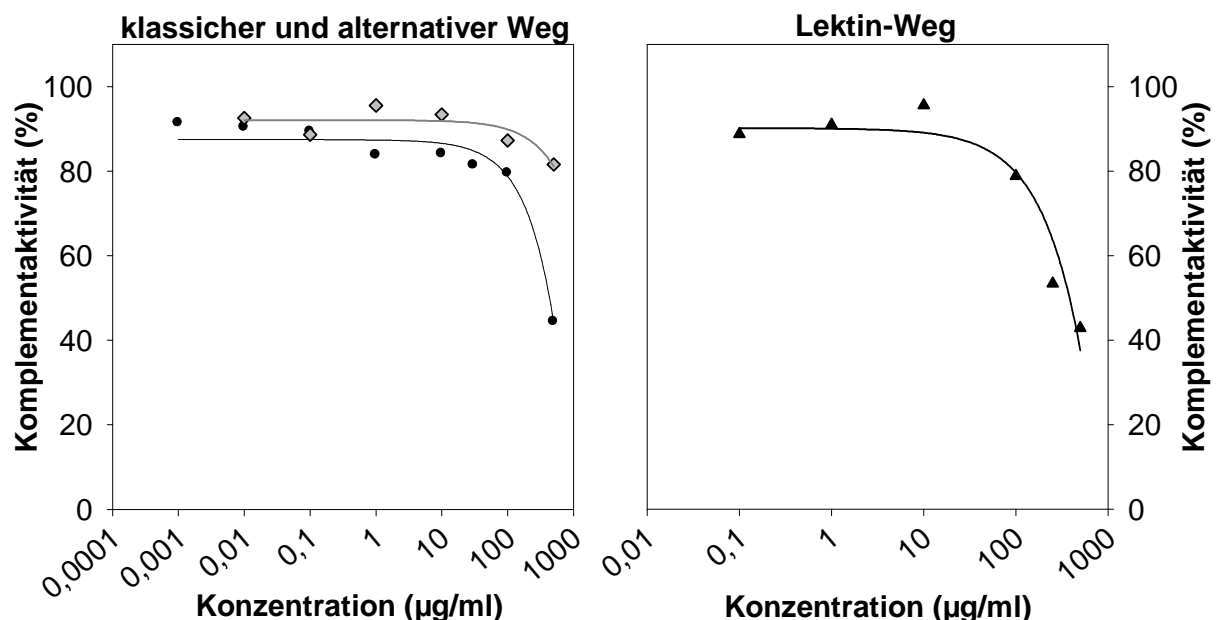


Diagramm 5.8-1: Aktivität des Komplementsystems in Abhängigkeit von der Konzentration der EPS von *S. pevalekii* im Serum.
rechts: ●-klassischer Weg; ◆-alternativer Weg;
links: ▲-Lektin-Weg.

Klassischer Weg			Alternativer Weg			Lektin-Weg			
Konz. (µg/ml)	1. M	2. M	Konz. (µg/ml)	1. M	2. M	Konz. (µg/ml)	1. M	2. M	3. M
500	53,5	35,3	500	84,9	78,3	500	36,0	49,7	56,2
100	84,7	74,3	100	87,4	87,1	250	53,4		69,0
30,19	81,4		10	93,4		100	80,1	77,5	95,0
10	84,1		1	90,5	100,6	10	95,6		
1	79,3	88,3	0,1	88,7		1	90,1	91,7	100,5
0,1	89,3		0,01	92,6		0,1	88,7		
0,01	90,4								
0,001	91,4								

Tabelle 5.8-1: Einzelergebnisse der Komplementaktivitäts-Messungen von unbehandelten EPS von *S. pevalekii*. Konz.: Konzentration; M: Messung.

5.8.3 Testung der Zytotoxizität

Die EPS von *S. pevalekii* (201004-Sp-K2) zeigten keinen zytotoxischen Effekt (Diagramm 5.8-2; 3.11.3).

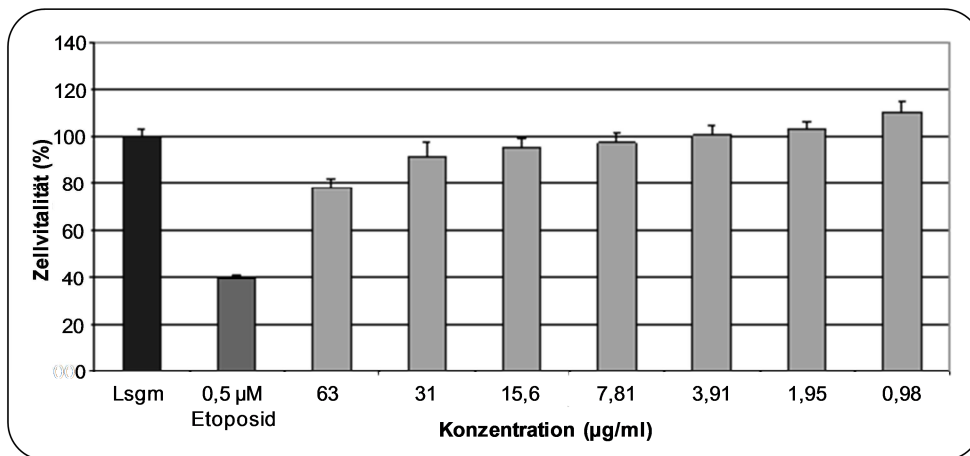


Diagramm 5.8-2: Einfluss von EPS von *S. pevalekii* auf die Zellaktivität in Abhängigkeit von der EPS-Konzentration.

6 Diskussion

Die Diskussion dieser Arbeit soll die Ergebnisse zu Kultivierung, Struktur der EPS und Einfluss auf das humane Komplementsystem der zwei Stämme *Synechocystis aquatilis* und *Synechocystis pevalekii* interpretieren. Dieses soll nicht nur im Hinblick auf den einzelnen Stamm, sondern auch vergleichend zwischen den zwei untersuchten Stämmen und unter Hinzuziehung von Literaturquellen geschehen. Es gibt viele Arbeiten anderer Forschungsgruppen zu EPS und cyanobakteriellen EPS im Speziellen, jedoch ist die Auswahl bei den zwei untersuchten Stämmen und besonders bei *S. pevalekii* gering. Bei *S. aquatilis* ist hier insbesondere die Arbeit von Venzke zu nennen, die als Grundlage für diese Arbeit herangezogen wurde [Venzke, 2005]. Als Anhaltspunkt und Basis für die Arbeit mit *S. pevalekii* kann die Arbeit von Junge genannt werden [Junge, 2008]. In der nun entstandenen Arbeit zeigt sich, dass sich ein zweiter intensiver Blick auf ein Thema lohnen kann und zuvor nicht beachtete Aspekte einen neuen Schwerpunkt setzen.

6.1 Kultivierung

Die Kultivierung von Cyanobakterien unterliegt einer Vielzahl von Einflüssen, die Wachstum und Ausbeuten der gewünschten Substanzen beeinflussen (1.4.3). Wie in diesem Kapitel erläutert, konnte teilweise nur ein leichter Einfluss der untersuchten Parameter auf die Stämme *S. aquatilis* und *S. pevalekii* beobachtet werden.

Wachstum unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

Die einzelnen Verläufe der Zelldichtenzunahme von *S. aquatilis* unter Kontrollbedingungen zeigen identische Kurvenverläufe (Diagramm 4.1-1). Die Kultivierungen 200901 und 200902 erreichten höhere Absorptionswerte als die Kultivierungen 201106, 201107 und 201208. Trotz dieser Parallelverschiebung war der Stamm *S. aquatilis* über den Zeitraum von etwa 3,5 Jahren bei permanenter Fortkultivierung stabil. Die Kultivierungsverläufe von *S. pevalekii* (Diagramm 5.1-1), soweit dieses an zwei Wachstumskurven beurteilt werden kann, deuten ebenfalls auf diese Konstanz hin. Der direkte Vergleich der beiden Stämme im Hinblick auf die maximal erreichten Zelldichten zeigt eindeutige Unterschiede. Während *S. aquatilis* Zelldichten von bis zu 3,9 (Absorption bei 440 nm) ergab, ohne in die stationäre Phase überzugehen, endete die exponentielle Wachstumsphase bei *S. pevalekii* bereits bei etwa 2,9. Die Wachstumskurven lassen ebenfalls Unterschiede in der Dauer der Lag-Phase erkennen. Während diese bei *S. aquatilis* bereits bei allen Kultivierungen nach 3-8 Tagen endet, benötigen die Zellen von *S. pevalekii* 10 bis 20 Tage. Die dargestellten Charakteristika der Kultivierungsverläufe (Lag-

Phasen-Dauer und maximale Absorption) finden sich mit großer Übereinstimmung auch in den Arbeiten von Venzke und Junge wieder.

Betrachtungen der Kurvenläufe für die Zelldichten bei *S. aquatilis* unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen (Diagramm 4.1-2) lassen nur wenige Unterschiede erkennen. Bei allen Kultivierungen war die Lag-Phase nach 3-8 Tagen beendet. Es bedurfte demnach keiner verlängerten Anpassungsphase bei veränderten Kultivierungsbedingungen. Allerdings gingen die Kulturen bei Ersatz des verdunsteten Mediums mit demineralisiertem Wasser und Zufuhr angefeuchteter Luft deutlich früher in die stationäre Phase über. Da es sich bei beiden Ansätzen um Einfachbestimmungen handelte, war eine endgültige Aussage schwierig. Der Einfluss eines naheliegenden Faktors, die Lichtintensität, zeigte sich ebenfalls. Bei der Kultivierung unter halber Lichtintensität war die Steigung der Wachstumskurve geringer, was für eine geringere Zellteilungsrate durch eine verringerte Photosyntheserate spricht. Die Kultivierung ohne Volumenersatz sowie mit Volumenausgleich mit Medium ergaben vergleichbare Wachstumskurven. Da die Kultivierung mit Volumenersatz einen gesteigerten Arbeits- und Kostenaufwand bedeutet (Bereitstellen und Autoklavieren des Mediums), kann die Kontrollkultivierung als effektiver und somit als Methode der Wahl bezeichnet werden.

Die Untersuchung und Optimierung der Kultivierungsbedingungen von Cyanobakterien sind seit Jahrzehnten Gegenstand vieler Arbeiten. Häufiges Ziel war die maximale Produktion von Biomasse. Besonders die zur Zeit der Arbeit geführte Diskussion über cyanobakterielle Biomasse als Grundlage für die Energiegewinnung ließ dieses Arbeitsfeld wieder in den Fokus der Wissenschaft rücken (siehe auch 1.3). Der Vergleich von Kultivierungsbedingungen war allerdings nicht die primäre Aufgabe dieser Arbeit, sondern die detaillierte Strukturaufklärung und weitergehende Untersuchungen der Komplementaktivität. Trotzdem kam es, bedingt durch Probleme bei der Kultivierung und EPS-Isolierung (*S. aquatilis* Braunfärbung des Mediums und *S. pevalekii* Kulturen mit minimalem Wachstums), zu Untersuchungen verschiedener Parameter. Beide Komplikationen waren nach den Arbeiten von Venzke und Junge nicht zu erwarten gewesen [Venzke, 2005; Junge, 2008]. Die Rahmenbedingungen für die Kultivierungen waren identisch im Hinblick auf Material und Umgebung. Es finden sich allerdings Unterschiede in den Konzentrationen der Bestandteile des Nährmediums gegenüber der Arbeit von Venzke, da die Konzentration aus der Arbeit von Junge übernommen worden waren. Dabei liegen die Konzentrationen der einzelnen Komponenten um das Achtfache, bei Kaliumnitrat sogar um das Zehnfache höher. Ein häufig in anderen Arbeiten verwendetes Medium, das BG-11 Medium [Stanier et al., 1971], wies nochmals bis zu Achtfach höhere Konzentrationen an Nitrat auf. Toxische Effekte von Schwermetallen werden durch ihre Bindung an physiologische Strukturen wie Schwefelwasserstoff-Funktionen von Enzymen, die Verdrängung und Interaktion mit wichtigen Bestandteilen wie Zink, Eisen und Magnesium oder die Bildung freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies ausgelöst [Nies, 1999]. Generell

reagiert *S. aquatilis* sensitiver auf Silber, Kupfer und Quecksilber als auf Kadmium, Blei und Zink [Dudkowiak et al., 2011]. Toxische Konzentrationen von Schwermetallen wurden von Nies als minimale Hemmkonzentrationen erarbeitet. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen an Zink und Kupfer lagen jedoch deutlich unter diesen Hemmkonzentrationen. Auch Chrom und Zinn lösen bei *S. aquatilis* eine Wachstumshemmung aus [Pawlik & Skowronski, 1994; Pawlik-Skowronska et al., 1997; Ozturk et al., 2009; Ozturk et al., 2010]. Diese Elemente sind aber in dem verwendeten Medium nur in Spuren über den Zusatz von Instant Ocean[®] enthalten. Die Komplikationen bei den Kultivierungen von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* lassen sich demnach nicht auf das verwendete Medium zurückführen.

Dennoch wurde der Nitratgehalt des Mediums als möglicher Einflussfaktor bei *S. pevalekii* untersucht. Dabei wurde die unter 3.3 beschriebene Standardmethode zur Kontrollmethode. In diesem Versuch zeigten die Kulturen in kaliumnitratärmerem Medium (250 mg/l) zwar einen schnelleren Anstieg der Zelldichte als in kaliumnitratreichem Medium (750 mg/l), beide Kulturen gingen aber, verglichen mit dem Kontrollmedium mit 500 mg/l, bei einer geringeren Zelldichte in die stationäre Phase über (Diagramm 5.1-3). Die am Ende gewonnenen Biomassemen gen spiegeln dieses Ergebnis ebenfalls wieder: 250 mg/l 7,71 mg l⁻¹ d⁻¹ nach 50 Tagen, 500 mg/l 9,95 mg l⁻¹ d⁻¹ nach 63 Tagen und 750 mg/l 4,40 / 7,80 mg l⁻¹ d⁻¹ nach 63 Tagen. Auffällig ist eine nochmals verlängerte Lag-Phase, was zeigt, dass den Kulturen die Anpassung an den Batch-Maßstab schwer fiel. Dieser Versuch gibt demnach zusammenfassend den Hinweis, dass mit einer veränderten Kaliumnitratkonzentration keine gesteigerte Zellteilung bei dem Stamm *S. pevalekii* erreicht wird und der Kaliumnitratgehalt als Ursache für die Kultivierungsprobleme ausgeschlossen werden kann.

Die Beobachtung, dass die Kultivierung 201005 von *S. pevalekii* trotz geringerer maximaler Absorption höhere Biomassemen gen im Vergleich zu 201004 ergab, kann nur mit einer unterschiedlichen Anzahl der Parallelansätze begründet werden. Die Wachstumskurve bei halbiertes Lichtintensität und Volumenausgleich mit Medium scheint zunächst dem parallel kultivierten Ansätzen überlegen. Ein Blick auf die Neutralzuckerzusammensetzung zeigt ohne Zweifel, dass es sich um eine Kreuzkontamination mit *S. aquatilis* handelt und die Lichtintensität nicht die entscheidende Ursache für das schlechte Wachstum unter Kontrollbedingungen ist. Als erkennbare Faktoren für das mangelnde Wachstum bleiben nur die Zelldichte und das Volumen des Inokulums zurück, da bei Beimpfung der Batch-Kulturen mit einer größeren Zellzahl das Wachstum nach der Lag-Phase zufriedenstellend war. Cyanobakterien passen sich dem umgebenden Lebensraum an und ermöglichen durch ihre Stoffwechselprodukte eine Besiedelung dieses Lebensraums (auch zu erkennen in der pH-Veränderung im Diagramm 4.1-5). Die hierbei beobachtete Alkalisierung des Mediums durch *S. aquatilis* wurde bereits 1992 beobachtet und spiegelt die Alkaliphilie der meisten Cyanobakterien wieder [Pawlik-Skowronska et al., 1997; Pomati et al., 2004]. Die lange Lag-Phase bei *S. pevalekii* indiziert

demnach die wahrscheinlichste Ursache für das schlechte Wachstum. Es handelt sich um eine Anpassungsträgheit, die bei Nichtüberwindung zu einem vollständigen Absterben der überimpften Zellen führt.

Ziel der veränderten Kultivierungsbedingung bei *S. aquatilis* war die Reduktion der Eigenfärbung der Kulturen, wie sie ab einer kritischen Zelldichte von 3-4 (Absorption bei 440 nm) auftrat. Alle untersuchten Parameter der Kultivierung können als Ursache für die Eigenfärbung ausgeschlossen werden (Diagramm 4.1-3). Bei verringerter Konkurrenzsituation der Zellen um Platz (Zufuhr angefeuchteter Luft) und Nährstoffe (Zugabe von Nährlösung) kam es ebenso zu einer Braunfärbung wie bei Überführung der Hälfte der Zellsuspension in frisches Medium. Bei Letzterem konnte sie lediglich um etwa 10 Tage verzögert werden. Bei Zugabe von demineralisiertem Wasser zur Konkurrenzreduktion ist keine Aussage möglich, da die Zelldichte unter 3 blieb. Der deutliche Anstieg der Eigenfärbung in den Kulturen 201107 kann als Messfehler beurteilt werden, da optisch keine sprunghafte Farbveränderung zu erkennen gewesen und die kritische Zelldichte von >3 noch nicht erreicht war. Auch eine zu hohe Lichtintensität lässt sich als Ursache für die Eigenfärbung ausschließen, da diese bei halber Lichtintensität ebenfalls bei einer Zelldichte von etwa 3,5 auftrat, zumal mit zunehmender Zelldichte die Beschattung der Zellen zu- und damit die Lichtintensität abnimmt. Zusätzlich liegt die eingesetzte hauptsächliche Lichtintensität mit $140-170 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$ unter dem beschriebenen Optimum von $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$ [Pereira et al., 2009]. Die reaktive Sekretion von Scytonemin, eine UV-absorbierende Substanz mit gelb-brauner Farbe [Leão et al., 2012], ist allerdings nicht gänzlich auszuschließen, da Weißlichtneonröhren ihr emittiertes Lichtspektrum über die Jahre verändern können. Eine ungünstige Verschiebung ist aber als Faktor unwahrscheinlich, da es auch hier durch die zunehmende Beschattung der Zellen durch erhöhte Zelldichte zu einer natürlichen verringerten UV-Exposition kommt. Ein Hinweis auf Farbveränderungen durch Stickstoffmangel, ausgelöst durch einen Abbau von Phycobiliproteinen, wie für *S. aquatilis* f. *salina* beschrieben, scheidet als Ursache aus, da auch bei Zugabe von frischem Medium keine Verschiebung der Eigenfärbung zu beobachten war [Nascimento & Azevedo, 1998]. Möglich ist das zunehmende Freiwerden von Zellinhalt durch Absterben von Zellen (siehe dazu auch 1.3). Letzteres kann nicht beurteilt werden, da bei der Messung bei 440 nm die Absorption des Chlorophylls unabhängig von der Vitalität der Zellen gemessen wird. Gegen Pigmente spricht aber die Tatsache, dass sich der braune Anteil nicht von den EPS abtrennen ließ. Es wurden unterschiedliche Fällungs- und Aufreinigungsmethoden durchgeführt: kalter Aceton, verschiedene Endkonzentrationen gekühlten und ungekühlten Ethanols, Zusatz von Natriumchlorid (2-5 molar), Ausschütteln mit Dichlormethan und Ethylacetat, Säulenaufreinigung mit Polyamid 6 (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) und Amberlite FPX-66 (Rohm & Haas, Frankfurt). Die starke Bindung zwischen EPS und brauner Substanz lässt vermuten, dass es sich um eine polyphenolische Substanz handelt, da für diese starke

Bindungen zu Polysacchariden bekannt sind [Renard et al., 2012]. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei der Eigenfärbung um eine Reaktion auf Konkurrenz unbekannter Ursache handelt, die allerdings nicht zum sofortigen Eintritt in die stationäre Phase und damit zu Einschränkungen im Wachstum führt. Um also eine mögliche Verunreinigung der isolierten EPS zu verringern und zu verhindern, wurden die Kulturen von *S. aquatilis* bereits vor Erreichen der kritischen Zelldichte von >3 geerntet.

Ausbeute an Biomasse

Die erreichte Biomasseproduktivität unter Kontrollbedingungen liegt bei *S. aquatilis* zwischen 13 und 30 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$ (8-39-tägige Kultivierung), bei *S. pevalekii* deutlich niedriger mit nur 4 bis 12 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$ (30-63-tägige Kultivierung). Bei *S. pevalekii* findet sich bei parallelen Kultivierungsansätzen eine Korrelation zwischen Biomassemenge und Kultivierungsdauer, wohingegen bei *S. aquatilis* keine Beobachtungen diesbezüglich möglich sind. Für *S. aquatilis* gab Venzke deutlich größere Mengen mit 60 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$ an (60-tägige Kultivierung) sowie Junge vergleichbare Ausbeuten mit 30 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$ (50-tägige Kultivierung) an. *S. pevalekii*-Kulturen bildeten bei Junge etwas mehr Biomasse von 18 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$. Diese Literaturwerte beruhen allerdings auf jeweils nur einem Kultivierungszyklus und zeigten demnach keine Wertestreuung. Sowohl bei *S. aquatilis*, als auch bei *S. pevalekii* lässt sich eine Abhängigkeit der Biomassemenge von der maximalen Zelldichte der Kulturen erkennen. Im direkten Vergleich zeigten die Stämme *Synechocystis minuscula* bei Junge mit 58 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$ sowie *Chroococcus minutus* und *Nostoc insulare* mit 139 und 107 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$ eine deutlich stärkere Biomassebildung. Ein Vergleich mit weiteren Literaturdaten war nur unter Vorbehalt möglich, da die Kultivierungsbedingungen einen großen Einfluss auf die gebildete Biomasse haben. So wurde für die kommerzielle Nutzung von Biomasse für *Arthrospira platensis* in der „open pond“-Kultivierung Produktivitäten von bis zu 320 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$ erreicht [Brennan & Owende, 2010]. In geschlossenen Bioreaktoren konnten sogar deutlich höhere Biomasseproduktivitäten von bis zu 2,7 $\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$ erreicht werden. Noch höhere Produktivität verspricht eine mixotrophe Kultivierung, da diese, besonders bei Tageslicht-Kultivierung die stagnierende Biomassebildung bei Dunkelheit ausgleicht [Kamjunke et al., 2008]. Da der Zusatz von Kohlenstoffquellen zum Medium eine Kostenerhöhung verursacht (vergl. 1.3), wird somit eine Kosten-Nutzen-Bewertung von höheren Produktionskosten zu längerer Kultivierungsdauer notwendig.

Ausbeute an Protein

Die isolierten Proteinmengen bewegten sich bei *S. aquatilis* im Bereich von 1,71 bis 6,82 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$ für Kontrollbedingungen. Veränderte Kultivierungsbedingungen bei *S. aquatilis* ergaben 0,00 bis 7,39 $\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$, wobei der deutlich geringste Anteil bei Volumenersatz mit demineralisiertem Wasser gefunden wurde. Häufig liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei

dem Proteinanteil, welcher teilweise höher als der Anteil an Rein-EPS war, um einen größeren Anteil Roh-EPS handelt. Durch die hohe Viskosität des Mediums war das Proteinsediment häufig damit versetzt. Da es bei diesem Arbeitsschritt aber um die Gewinnung reiner EPS und nicht um die Proteinfraction ging, wurde dieses akzeptiert. Bei *S. aquatilis* sind demnach keine eindeutigen Hinweise auf einen Zusammenhang mit den Kultivierungsbedingungen oder der Kultivierungsdauer ersichtlich. Bei *S. pevalekii* fand sich ein geringerer Anteil an Proteinen als bei *S. aquatilis* mit 0,38 bis 2,36 mg l⁻¹ d⁻¹ sowie eine Abhängigkeit von der Zelldichtenzunahme. Die geringste Proteinmenge entstand bei Kultivierung in Medium mit erhöhtem Kaliumnitratgehalt (750 mg/l), gefolgt von geringem Gehalt (250 mg/l). Aus dem Standardmedium (500 mg/l) wurde der höchste Proteinanteil isoliert. Dieses entspricht den Steigungen der Wachstumskurven, sodass ein direkter Bezug zwischen der Zellteilungsrate und der gebildeten Proteinmenge zu erkennen ist.

Ausbeute EPS

Die Bildungskurven der EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* folgen von Beginn an den Kurven für die Zunahme der Zelldichten: je stärker das Wachstum, desto höher die EPS-Bildung [Parikh & Madamwar, 2006]. Derartige Beobachtungen veranlassten Filali Mouhim et al. und De Philippis und Vincenzini von EPS als Produkte des Primärstoffwechsels zu sprechen [Filali Mouhim et al., 1993; De Philippis & Vincenzini, 1998]. Bei *S. aquatilis* haben die Kultivierungsbedingungen keinen Einfluss auf die Parallelität der Kurvenverläufe, allerdings wird das Ausmaß der EPS-Bildung beeinflusst. So haben die Kurven der EPS-Bildung für Kontrollkultivierungen eine größere Steigung als die Kurven der Kultivierungen mit Volumenausgleich. Dieses zeigt sich auch bei den endgültigen Ausbeuten an EPS. Während die Kontrollkultivierung 200902 eine EPS-Menge von 17,25 mg l⁻¹ d⁻¹ hervorbrachte, waren es bei den Ausgleichkulturen mit Medium und demineralisiertem Wasser sowie bei Zufuhr angefeuchteter Luft deutlich weniger. Die Schwankungen bei der EPS-Bildung bei beiden *Synechocystis*-Stämmen können teilweise auf das Verhältnis von Lag-Phase zu Kultivierungsdauer zurückgeführt werden. Bei einer Kultivierungsdauer von 30 Tagen bei 201004-Sp-K1 verblieben nach 20 Tagen der Lag-Phase nur noch 10 Tage für die Bildung, während bei einer Kultivierungsdauer von 63 Tage bei 201004-Sp-K2 noch 50 Tage unter exponentiellem Zellwachstum verblieben. Die dadurch entstandene Verzerrung der Ergebnisse für Kontrollkultivierungen macht sich in einer EPS-Bildungsrate von 0,05 bis 0,5 mg l⁻¹ d⁻¹ für *S. pevalekii* bemerkbar. Für *S. aquatilis* ist die Rate mit 0,97 bis 17,25 mg l⁻¹ d⁻¹ deutlich höher. Eine konkrete Produktionsrate lässt sich aber bei beiden Stämmen nicht nennen, im direkten Vergleich von 200902-Sa erbrachte die Kontrollkultivierung allerdings die größten EPS- und Biomasse-mengen. Generell finden sich in der Literatur unterschiedliche Einheiten zur Angabe der EPS-Mengen und –Produktivitäten, was die Vergleichbarkeit einschränkt. Die Werte für die

EPS-Ausbeuten von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* sind aber im Vergleich zu Arbeiten mit anderen Cyanobakterien-Stämmen teilweise sehr gering [De Philippis & Vincenzini, 1998]. Maximale Mengen wurden für *Cyanospira capsulata* mit $144 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht, die geringste Menge erbrachte *Nostoc* sp. 2S9B mit $1,4 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Ein *Arthrospira platensis*-Stamm lag beispielsweise mit $46,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in diesem Bereich [Trabelsi et al., 2009]. Für sechs verschiedene *Synechocystis* sp. Stämme finden sich ausschließlich Literaturwerte in einem recht schmalen Rahmen von $16,0$ bis $33,3 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ [Ozturk et al., 2009; Ozturk & Aslim, 2009; Panoff et al., 1988]. Während *S. aquatilis* in der Produktionsleistung im unteren Viertel erreichter EPS-Mengen anzusiedeln ist und damit auch tendenziell an die Literaturwerte anderer *Synechocystis*-Kulturen heranreicht, hat *S. pevalekii* den geringsten bisher beschriebenen Wert. Wie in 1.4.3 genannt, unterliegt die EPS-Bildung einer Reihe von Einflussfaktoren, sodass Vergleiche von Werten aus nicht-standardisierten und vergleichbaren Kultivierungen nur Hinweise liefern können.

Bei der Volumenreduktion des zellfreien Medium von *S. pevalekii* kam es zur Bildung einer Ausfällung. Diese Substanz wurde abgetrennt und analog den EPS aufgearbeitet (Sp-Ausfällung). Bereits Junge hatte diese Ausfällung beschrieben. Die gebildete Menge lag dabei zwischen $0,03$ und $0,78 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Eine deutliche Abhängigkeit vom Auftreten dieser Substanz und den Kultivierungsbedingungen wird nicht beobachtet. Beim Proteinanteil lagen die Massen zwischen $0,05$ und $0,9 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, wobei sich keine Abhängigkeit von der Ausfällungsmasse feststellen lässt. Bildet man die Summe aus den Mengen des EPS- und Proteinanteils ergeben sich einheitlichere Mengen von $0,83$ bis $0,93 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Dieses stützt die Vermutung, dass es sich bei dem Proteinanteil ebenfalls um den EPS-Anteil handelt, welche durch die sehr schlechte Löslichkeit im Rahmen der Aufreinigung und Kühlung über Nacht bei 4°C erneut ausgefallen war.

Die verschiedenen Erntebedingungen bei 201208-Sa-K zeigen für die 30-tägige Kultivierung einen geringen Einfluss auf die EPS-Ausbeute. Während die Zentrifugation nach Standardprotokoll bei 9000 U/min (RZB = 14942 g) und die zweifache Zentrifugation ähnliche EPS-Massen mit $3,87$ und $3,58 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ergab, stand eine deutlich größere Menge von $5,04 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nach Zentrifugation mit 4500 U/min (RZB = 3736 g) gegenüber. Bei der achtägigen Kultivierung konnte die reduzierte Ausbeute allerdings nicht beobachtet werden. Die untersuchten Zentrifugationsbeschleunigungen scheinen keinen größeren Einfluss auf die EPS-Ausbeute zu haben. Dagegen fanden Klock et al. bei geringeren untersuchten Beschleunigungen (4000 und 8220) eine leicht erhöhte Ausbeute bei erhöhter Zentrifugationsbeschleunigung [Klock et al., 2007]. Bei einem Ansatz mit Zentrifugation bei 9000 U/min kam es, wie beschrieben, zur Bildung eines unter der Dialyse unlöslichen Niederschlages. Das reine Abtrennen über Filtration erbrachte eine deutlich höhere Ausbeute ($1,69 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) verglichen mit der filtrierten und erneut dialysierten Lösung ($0,85 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

Dieses konnte mit einer gesättigten Lösung eines EDTA-Komplexes erklärt werden, welcher durch die zweite Dialyse abgetrennt werden konnte.

Nicht nur im makroskopischen, sondern auch im mikroskopischen Bild (Abbildung 4.1-1) der *S. aquatilis*-Kulturen aus drei unterschiedlichen Algensammlungen (SAG, CAUP und CCALA; 3.2) zeigen sich besonders deutliche Unterschiede zwischen *S. aquatilis* und *S. aquatilis* CCALA gegenüber *S. aquatilis* CAUP. Auch die Wachstumskurven sind deutlich voneinander zu unterscheiden. Die Kultur von *S. aquatilis* CAUP wuchs deutlich schwächer bei einer deutlich geringeren EPS-Bildung als die anderen zwei Stämme (Diagramm 4.1-6), wobei die Kulturen der Sammlungen CAUP und CCALA keine Eigenfärbung erkennen ließen. Die im Diagramm 4.1-7 gezeigte EPS-Bildung verläuft bei *S. aquatilis* CCALA nur die ersten Tage der Kultivierung parallel zur Zelldichte und stagniert anschließend. Da bei *S. aquatilis* CAUP nur eine schwache Zunahme der Biomasse zu verzeichnen war, kann hier nur über den parallelen Verlauf der EPS-Bildung spekuliert werden. Anders als nach dem Kurvenverlauf vermutet, ergaben *S. aquatilis* und *S. aquatilis* CAUP vergleichbare Biomassemengen (Tabelle 4.1-2). Die abweichenden Ergebnisse für *S. aquatilis* CAUP sind auf die starke Sedimentation der Zellen zurückzuführen, wodurch sie sich der photometrischen Bestimmung der Zelldichte trotz guter Durchmischung entzogen. *S. aquatilis* CCALA bildete die größten Mengen an Biomasse und Proteinen. Die EPS-Mengen spiegelten das Bild der photometrischen Bestimmung wieder. *S. aquatilis* bildete 0,97 bis 1,81 mg l⁻¹ d⁻¹, wo hingegen die anderen Stämme nur bis zu 0,45 mg l⁻¹ d⁻¹ bildeten. Eine Verringerung der EPS-Menge kann teilweise durch die Adhäsion an der Glaswand bei *S. aquatilis* CCALA und der damit einhergehenden Oberflächenverkleinerung verursacht worden sein, wie es auch Richert et al. beschrieben haben [Richert et al., 2005]. Das unterschiedliche Verhalten der Stämme kann mehrere Ursachen gehabt haben. Eine noch nicht abgeschlossene Anpassung an die Umgebung kommt durch Beimpfung der Batch-Kulturen mit gleichmäßig hoher Zelldichte der Vorkulturen nicht in Frage. Davon ausgehend, dass es sich um genetische Varianten des Stammes *S. aquatilis* handelt, kommen zwei Ursachen für die Unterschiede in Frage. Zum einen nicht optimale Umgebungsbedingungen der Stämme, zum anderen eine grundsätzlich veränderte Teilungsrate und EPS-Bildung. Die dort beobachteten Unterschiede lassen den Schluss zu, dass es sich mindestens bei *S. aquatilis* CAUP nicht um die gleiche Spezies wie bei *S. aquatilis* und *S. aquatilis* CCALA handelt.

6.2 Polysaccharid-Analytik

Die Polysaccharid-Analytik fasst die Untersuchungen zur Zusammensetzung des Kohlenhydrat-Anteils der EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* zusammen. Bei den Untersuchungen handelt es sich primär um qualitative und quantitative Verfahren wie gaschromatographische Messungen derivatisierter Monosaccharide und nasschemische Nachweisreaktion von möglichen Substituenten.

Neutralzuckerzusammensetzung

Die Ergebnisse der Neutralzuckeranalytik für die EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* zeigen die großen Unterschiede auf, die aus der Literatur bekannt sind [Venzke, 2005; Junge, 2008]. Während die EPS von *S. aquatilis* hauptsächlich aus Fukose, Arabinose und Fukosamin bestehen, enthalten die EPS von *S. pevalekii* acht verschiedene Monomere, wobei sich keines als eindeutiges Hauptmonomer herausstellte (Diagramm 6.2-1). Bei den nicht weiter identifizierten Signalen handelt es sich, wie unter 5.2.1 beschrieben, um eine Hexose, eine Pentose und eine 2-Amino-3-Deoxy-Hexose sowie teilweise um Methyl-Zucker, wie aus den Retentionszeiten der acetylierten Monosaccharide vermutet werden kann. Auch wenn Methylzucker nur selten in EPS vorkommen, wurden in EPS von *Synechocystis* sp. 6803 3-O-Methyl-Deoxyhexose und 4-O-Methyl-Hexose gefunden sowie 3-O-Methyl-Pentose in EPS von *Synechocystis* sp. 6714 [Panoff et al., 1988]. Die Signale der MS-Spektren ließen allerdings keine endgültige Identifizierung zu. Sowohl in den EPS von *S. aquatilis* als auch *S. pevalekii* kommen Aminozucker vor. Im Falle von *S. pevalekii* handelt es sich um Glukosamin, bei *S. aquatilis* um Fukosamin. Dieser Aminozucker war bis zur Fertigstellung dieser Arbeit noch nie im Zusammenhang mit Cyanobakterien erwähnt worden. Bisher war Fukosamin in den EPS von wenigen gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* Typ 5 und 8 sowie von einigen gram-negativen Spezies wie *Thauera* sp. Mz1t gefunden worden [Fournier et al., 1987; Allen, 2002]. Deutlich häufiger fand sich Fukosamin als Bestandteil der Lipopolysaccharide einiger gram-negativer Bakterien, wie beispielsweise bei mehreren *Legionella*-Spezies und im O-Polysaccharid von *Escherichia coli* O26 [Sonesson et al., 1994; Sonesson et al., 1994 a; Sengupta & Basu, 1997]. Für extrazelluläre Polysaccharide waren bisher Glukosamin, Galaktosamin und Mannosamin für kovalent an die Zellwand gebundene Polysaccharide von *Synechocystis* sp. PCC 6714 beschrieben worden, sowie häufiger GlcN und GalN für EPS [Jürgens & Weckesser, 1986; De Philippis et al., 2001]. Auch in den Arbeiten von Venzke und Junge war das Signal des Fukosamins im GC-Chromatogramm ersichtlich, wurde allerdings nicht näher charakterisiert. Für *S. sp* 6803 und 6714 wurden ebenfalls 8-11,7% Aminozucker beschrieben [Panoff et al., 1988]. Dabei handelte es sich aber um Glukosamin und Galaktosamin. Darüber hinaus beschriebene Neutralzucker aus den EPS von *S. aquatilis* stimmten, abgesehen vom Fukosamin, mit den von Venzke gefundenen Werten

überein. Die Neutralzuckerzusammensetzung bei Junge für die EPS von *S. pevalekii* wich geringfügig von der gefundenen Verteilung ab. In dieser Arbeit findet sich ein höherer Galaktosegehalt und daraus resultierende geringerer Glukose-, Xylose-, Fukose- und Rhamnosegehalte. Der Anteil des Glukosamins wurde bei Junge nicht quantifiziert. Trotz dieser Differenzen kann aber nicht von einem Unterschied gesprochen werden, sondern lediglich von einer natürlichen Varianz. Diese zeigt sich auch in den Standardabweichungen der Ergebnisse der Neutralzucker der Diagramm 6.2-1 und wird auf die mehrfache Kultivierung zurückgeführt. Die EPS von *S. pevalekii* fügen sich mit ihrer heterogenen Zuckerzusammensetzung in die Gruppe cyanobakterieller EPS ein (Übersicht über Zusammensetzungen cyanobakterieller EPS in Tabelle 11.2-1). Besonders charakteristisch ist dabei die Anzahl von sieben Zuckern ohne Aminosucker sowie eine Hexose als Hauptzucker für *S. pevalekii*. Dieses Merkmal war auch bei den *Synechocystis*-Arten PCC 6803 und 6714 von Panoff et al. beobachtet worden [Panoff et al., 1988]. Eine gänzlich abweichende Monomerenzusammensetzung der EPS war für die Stämme BASO444, BASO511 und BASO507 berichtet worden [Ozturk & Aslim, 2009]. Diese EPS bestanden aus maximal 3 Monosacchariden. Dabei handelte es sich annähernd um drei Homopolymere jeweils aus Glukose, Xylose oder Rhamnose. Trotz dieser äußerst konträren bereits beschriebenen EPS-Zusammensetzungen von *Synechocystis*-Stämmen sticht auch die Monomerenzusammensetzung von *S. aquatilis* deutlich hervor. Erstmals sind Arabinose und Fukose Hauptzucker und der für gram-negative bekannte Aminosucker Fukosamin ist in beachtlichen Mengen enthalten. Nur zwei cyanobakterielle EPS zeigen Ähnlichkeiten. Die EPS von *Palmella mucosa* Kütz haben ein ähnliches Neutralzuckerspektrum, wobei auch bei diesem Glukose der deutlich dominierende Zucker ist [Tischer & Moore, 1964]. Bei *Phormidium tenue* beträgt der Arabinoseanteil 43,9%, wobei aber erneut Glukose mit 32,5% der zweithäufigste Zucker ist [Hu et al., 2003]. Im Punkte der Neutralzuckerzusammensetzung bildet *S. aquatilis* einzigartige EPS, die aufgrund des hohen Gehaltes an Desoxyzucker, als verhältnismäßig hydrophob bezeichnet werden können. Diese Eigenschaft ist, wie unter 1.4.1 beschrieben, eine Schlüsseleigenschaft für die Funktionalität der EPS.

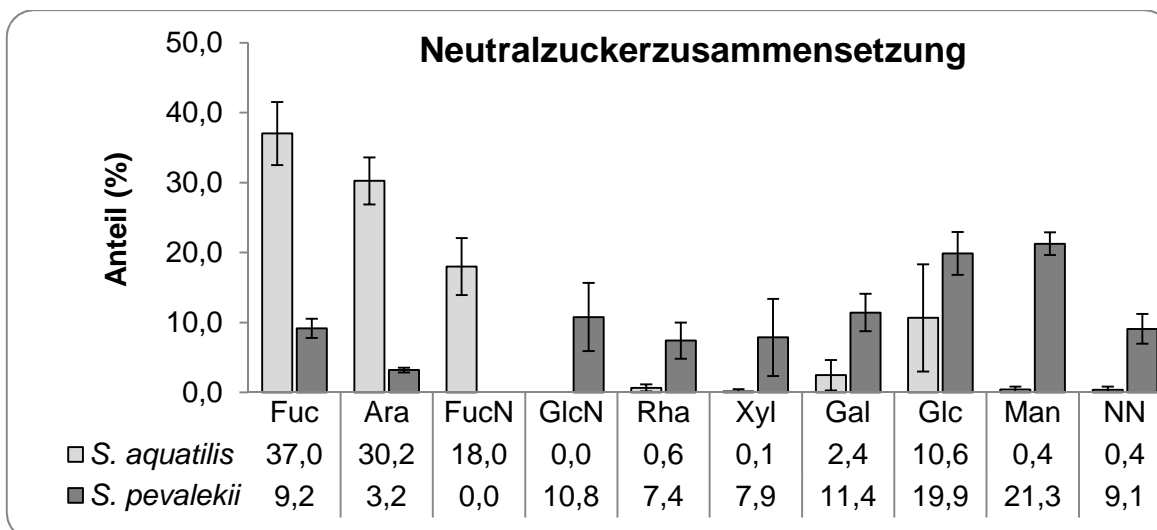


Diagramm 6.2-1: Gegenüberstellung der Mittelwerte der Neutralzuckerzusammensetzung der EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii*. Anteil der Neutralzucker in %.

Bei beiden EPS von *Synechocystis* zeigt sich kein Einfluss der untersuchten Kultivierungsbedingungen auf die Neutralzuckerzusammensetzung. Dabei waren Parameter wie Kaliumnitratgehalt, Belichtung, Volumenausgleich, Kultivierungsdauer und Erntebedingungen untersucht worden. Auch Venzke wies die konstante Neutralzuckerzusammensetzung über einen Kultivierungszeitraum von 100 Tagen nach [Venzke, 2005]. Die bei Panoff et al. beobachtete veränderte Neutralzuckerzusammensetzung zweier *Synechocystis*-Arten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer war allerdings auch nur durch eine moderate Verschiebung der Anteile charakterisiert [Panoff et al., 1988]. Deutlicher waren die Ergebnisse der Untersuchungen von Ozturk und Aslim an *Synechocystis*-Spezies und dem Einfluss von Salzstress durch Natriumchlorid [Ozturk & Aslim, 2009]. Während zwei Stämme nur leichte Veränderungen zeigten, kam es bei *S. sp.* BASO507 zu einer Verschiebung des Hauptzuckers von Xylose zu Rhamnose mit je über 90%. Derartige Beobachtungen wurden bei den EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* nicht gemacht. Die Ernte der Kultur 201004-Sp-K2 erfolgte nicht in der Wachstumsphase, sondern in der stationären Phase der Kulturentwicklung. Auch dabei wurde kein eindeutiger Einfluss auf die Neutralzuckerzusammensetzung beobachtet. Bei den EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* handelt es sich demnach, im Rahmen der Untersuchungen, um robuste Stoffwechselprodukte, deren große Unterschiede innerhalb derselben Gattung bestätigt werden können.

Die Ausbeuten der Acetylierungsanalysen der EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* sind mit 15,7 und 25,6% gering. Ursächlich dafür ist nicht, wie die Zucker-HPTLC von TFA-Hydrolysaten zeigte (4.8.3), eine unvollständige Hydrolyse. Die HPTLC ergab außerdem, dass sich bereits bei 20-fach geringeren TFA-Konzentrationen eine beinahe vollständige Hydrolyse vollzog. Die Annahme die geringen Ausbeuten der Acetylierungsanalysen seien durch höhere Anteile von

Nicht-Zuckerbestandteilen verursacht worden, stellt sich als richtig heraus, wie weiter unten näher erläutert wird.

Es findet sich aus dem Zusammenwirken von Kultivierung und Neutralzuckeranalyse kein eindeutiger Grund für den gestiegenen Glukosegehalt in den EPS von *S. aquatilis*. Der vermutete Einfluss der ausgetauschten Zentrifuge für die Zellabtrennung kann, wie weiter unten beschrieben, ausgeschlossen werden. Auch die Kultivierungsdauer hat keinen Einfluss. Während die EPS aus der Kultivierung 201208-Sa-K nach 8 Tagen einen Glukosegehalt von 2,7% hatte, waren es nach 30 Tagen lediglich 1,6%. Die beobachtete Braunfärbung einiger Kulturen (siehe dazu auch 6.1) steht ebenfalls nicht im Zusammenhang mit einem gestiegenen Glukoseanteil, da die EPS der Kultivierung 200901-Sa-K die stärkste Eigenfärbung und mit 42 Tagen die längste Kultivierungsdauer, aber nur einen Glukoseanteil von 1,8% aufwies. Als einziger Bezugspunkt für den gestiegenen Glukosegehalt der Kulturen 201106, 201107 und 201208 bleibt die Tatsache, dass sie eine geringere Steigung der Wachstumskurven aufzeigten. Somit könnte es sich um eine gesteigerte Bildung von Speicherpolysacchariden (komplexes Glykogen aus α -1,4- und α -1,6-Glukose [Bertocchi et al., 1990]) oder Zellwandpolysaccharide (je nach Stamm glukose- und mannose-reiche Strukturen [Bertocchi et al., 1990]) durch schlechteres Wachstum gekommen sein, welche unter der Kultivierung oder der Ernte in das Medium übergegangen sind. Für Glykogen als Verunreinigung spricht auch, dass bei unvollständigen Methylierungsanalysen häufig ein deutlich zu hoher Anteil an terminaler sowie 1,4-verknüpfter Glukose gefunden wurde. Dem stehen die IAC-Ergebnisse gegenüber, wonach der Glukoseanteil hauptsächlich in einem geladenen Molekül zu finden war (6.8). Die Ursache des schwankenden Glukosegehaltes kann demnach nicht ursächlich erklärt werden. Es scheint sich aber um ein weiteres Polysaccharid einer Nebenfraktion der EPS zu handeln, welches aufgrund bisher unbekannter Ursache in unterschiedlichem Maße von *S. aquatilis* gebildet wird.

Die Diskussion der Kultivierungs-Ergebnisse ergab, dass die Zentrifugationsbeschleunigung keinen eindeutigen Einfluss auf die EPS-Ausbeute bei *S. aquatilis* hat (6.1). Auch in der Neutralzuckeranalyse zeigte sich keine Veränderung. Sowohl die Zuckerzusammensetzung, als auch die Ausbeuten der Analyse sind vergleichbar (Tabelle 4.2-4). Die Zentrifugation zur Separation der Zellen hat demnach, im untersuchten Bereich, keinen Einfluss auf die EPS-Zusammensetzung und der Wechsel der Zentrifuge kann als Grund für den erhöhten Glukosegehalt der EPS ausgeschlossen werden. Hingegen wird die Vermutung, bei der unlöslichen Substanz in einem der Versuchsansätze zur Erntetechnik handele es sich um Dinatrium-EDTA oder seine Komplexe, erneut bestätigt. Dies zeigt sich in der Ausbeute der Analyse, die ohne anschließende zweite Dialyse um 6,96% niedriger war sowie im deutlich verringerten Sulfatgehalt bei 201008-Sa-K k 9000 filtr.. Zusätzlich war der Proteingehalt, bedingt durch den Stickstoffanteil im EDTA, sehr hoch (4.2.5; 4.7). Mit diesem Ergebnis zeigt

sich aber ebenfalls, dass die Neutralzuckeranalyse nicht durch den Einsatz von Dinatrium-EDTA und mögliche Rückstände beeinflusst wird.

Die Untersuchungen der Neutralzuckerzusammensetzung der Sp-Ausfällung und dem daraus gewonnenen Proteinanteil ergaben heterogene Einzelergebnisse. Die in der Sp-Ausfällung gefundenen Neutralzucker entsprechen denen der EPS von *S. pevalekii*. Durch die großen Schwankungen in der Quantifizierung lässt sich eine exakte Übereinstimmung nur vermuten, eine klare Andersartigkeit des Zuckeranteils allerdings ebenso ausschließen. Sowohl der Xylose-, als auch der Glukoseanteil sind leicht erhöht, die Anteile an Rhamnose und Glukosamin leicht verringert. Die großen Schwankungen der Ausbeuten der Acetylierungsanalyse werden auf Verunreinigungen mit SDS zurückgeführt. Die in der Diskussion der Kultivierungsergebnisse aufgestellte These, bei der isolierten Proteinfraction handele es sich ebenfalls um den EPS-Anteil der Ausfällung, kann mit der Neutralzuckerzusammensetzung nicht eindeutig bestätigt werden, da die Ergebnisse große Schwankungen aufweisen. Die Zusammensetzung entspricht, bei Nichtbeachtung von 201004-Sp-kno3, allerdings annähernd der Ausfällung.

Es lässt sich bereits aus der Kultivierung und der makro- und mikroskopischen Betrachtung der drei Stämme von *S. aquatilis* vermuten, dass es sich bei *S. aquatilis* CAUP um einen anderen Stamm als bei *S. aquatilis* und *S. aquatilis* CCALA handelt (6.1). Die Analyse der Neutralzucker ergibt, dass alle drei Stämme unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Da alle Stämme ein gutes Wachstum in der Vorkultur zeigten und unter identischen Bedingungen kultiviert wurden, lassen sich Umgebungseinflüsse als Ursache für die unterschiedlichen Neutralzuckerzusammensetzungen ausschließen. Zusammen mit den Ergebnissen für den Sulfatgehalt (SAG $18,37 \pm 0,97\%$; CAUP und CCALA 0,00%) und den Gehalt an Uronsäuren (SAG $0,88 \pm 0,39\%$; CAUP 1,85 und 3,31%; CCALA 6,80%) kann anhand der EPS gezeigt werden, dass es sich bei den drei *S. aquatilis* Stämmen nicht um genetisch identische Arten handelt.

Elementaranalyse

Die Ergebnisse der Elementaranalyse der EPS von *S. aquatilis* (4.2.2) zeigen einen auffällig hohen Schwefelgehalt an, welcher sich auch in den Ergebnissen der konduktometrischen Sulfatbestimmung widerspiegelt. Da in der Literatur bereits sulfatierte cyanobakterielle EPS bekannt sind, wird der Schwefelgehalt ausschließlich einer Sulfatsubstitution der Zucker zugeordnet [Pereira et al., 2009]. Diffiziler ist die Interpretation des Stickstoffgehaltes. Ohne die bekannte Anwesenheit des Fukosamins würde sich ein reiner Proteingehalt von 10,69% ergeben. Die in 4.2.1 erläuterte Problematik des Korrektur-Faktors in der Quantifizierung des FucN über Acetylierungsanalyse und gaschromatographischer Messung ließ sich nur durch die Annahme proteinfreier EPS lösen. Der somit zurückgeführte Faktor des Aminosuckers wurde auf 2,00 festgelegt. Dieser Wert erwies sich im Vergleich zu anderen experimentell ermittelten Faktoren für Neutralzucker und Aminosucker als plausibel. Die nasschemische Proteinquantifizierung widerlegt die vorgenommenen Interpretationen nicht (6.7). Der Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit der berechneten Verteilung der Elemente stimmt für Schwefel, Stickstoff und Wasserstoff überein. Einzig der Kohlenstoffanteil ist geringer als berechnet. Eine Verunreinigung mit Restsalzen kann ausgeschlossen werden, da dabei auch die anderen Elemente mit geringeren Anteilen zu finden wären. Gegen einen hohen Restwassergehalt spricht die Übereinstimmung im Wasserstoffgehalt. Die genaue Ursache für den niedrigen Kohlenstoffgehalt kann demnach nicht gefunden werden.

Die Bestimmung der Elemente für die EPS von *S. pevalekii* (5.2.2) ergibt Übereinstimmungen zur Berechnung für Wasserstoff und nur eine geringe Abweichung für Kohlenstoff. Dem entgegen steht der geringe Schwefelgehalt, welcher zunächst aus der konduktometrischen Messung der EPS-Ladung nicht erwartet wurde. Der gemessene Stickstoffanteil der EPS übertrifft deutlich die Erwartungen aus dem Aminosuckergehalt. Durch weitere Analysen kann der Stickstoffanteil einem hohen Proteingehalt zugeordnet werden. Die Abweichung von zwei untersuchten EPS aus unterschiedlichen Kultivierungen kann in keinen Zusammenhang mit Kultivierungsbedingungen gebracht werden. Da es sich um Einzelmessungen handelt, sind Messfehler nicht ausgeschlossen. Die Elementarverteilung der Sp-Ausfällung lässt Ähnlichkeiten, allerdings keine Übereinstimmung, mit den EPS von *S. pevalekii* erkennen. Der etwas verringerte Stickstoffanteil spricht für einen geringeren Proteingehalt, sowie den bereits besprochenen geringeren Glukosamingehalt.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse zeigen, vor dem Hintergrund weiterer Versuchsergebnisse, bereits die zwei weiteren herausragenden Unterschiede zwischen den EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* neben der Neutralzuckerzusammensetzung: zum einen die starke Sulfatierung der EPS von *S. aquatilis* und zum anderen den hohen Proteingehalt in den EPS von *S. pevalekii*.

Substituenten des Polysaccharidanteils und ihre Bestätigung im IR-Spektrum

Die EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* zeigen beide keine Acylierung sowohl in der nasschemischen Quantifizierung mit $-0,024 \pm 0,035$ mmol/l und $0,041 \pm 0,054$ mmol/l bzw. $-0,047\%$ und $0,104\%$ (4.2.3; 5.2.3) als auch im IR-Spektrum (4.3.1; 5.3.1). Zwar wurde jeweils nur eine Kultivierung untersucht, die in den anderen Versuchen beobachtete Konstanz der Zusammensetzung lässt allerdings auch im Falle der Acylierung der EPS keine große Varianz zwischen unterschiedlichen Kultivierung vermuten. Venzke berichtete für *S. aquatilis* zwar einen geringen Wert von $0,68\%$, welcher dennoch deutlich höher ist als die in dieser Arbeit ermittelten unacylierten EPS [Venzke, 2005]. Für andere Cyanobakterien-Stämme wurden Acetat-Anteile von $0,3$ bis $12,9\%$ berichtet, sodass die untersuchten *Synechocystis* EPS keine Besonderheit darstellen [De Philippis & Vincenzini, 1998].

Wie im O-Acetatgehalt, so unterscheiden sich die EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* auch im Pyruvatgehalt nur schwach mit $2,26 \pm 0,49\%$ und $0,26 \pm 0,41\%$ (4.2.4; 5.2.4). Diese Werte lagen in einem Bereich, der auch für andere cyanobakterielle EPS (Tabelle 11.2-1) und *S. aquatilis* beschrieben worden war [De Philippis & Vincenzini, 1998; Venzke, 2005]. Der Pyruvatgehalt war nicht von den Kultivierungsbedingungen abhängig, sofern dieses bei der geringen Anzahl ermittelter Messwerte beurteilt werden kann.

Die mögliche Sulfatierung der EPS von Cyanobakterien ist einzigartig im Reich der Bakterien, allerdings auch für Archaea und Eukaryoten bekannt [Pereira, 2009]. Wie im Ergebnisteil bei der Sulfatbestimmung für die EPS von *S. aquatilis* beschrieben (4.2.5), ergibt sich ein Sulfatgehalt von $21,22 \pm 2,53\%$ aus der konduktometrischen Titration für die Kontroll-Kultivierungen. Die Tatsache, dass der Gesamtmittelwert der EPS aller Kultivierungen $21,87 \pm 2,06\%$ ist, zeigt die konstante Sulfatierung der EPS ohne Einfluss der untersuchten Kultivierungsbedingungen. Der Wert, berechnet aus den Ergebnissen der Elementaranalyse, ergibt mit $18,37 \pm 0,97\%$ einen übereinstimmenden Sulfatgehalt. Wie bereits diskutiert, zeigt dieser Vergleich, dass das Ergebnis der konduktometrischen Sulfatbestimmung für die EPS von *S. aquatilis* korrekte Werte ergibt. Zusätzlich sind auch im IR-Spektrum starke Banden der Sulfatgruppe sichtbar. Als wahrer Wert wird allerdings, aufgrund seiner höheren Genauigkeit, das Ergebnis der Elementaranalyse verwendet. Daraus lässt sich, je nach Methode der Berechnung, ein Sulfatierungsgrad von $0,34$ bis $0,53$ ableiten. Demnach trägt jeder zweite bis dritte Zucker eine Sulfatgruppe. Es zeigt sich zwar keine Abhängigkeit von den Kultivierungs- und den Erntebedingungen, aber es ist eine leichte Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer erkennbar. Betrug die Kultivierungsdauer unter Kontrollbedingungen 8 Tage, so lag der Sulfatgehalt bei $13,86\%$, nach 22 Tagen waren es $16,93\%$, nach 26 Tagen $18,29\%$ und nach 30 Tagen $16,89\%$. Es kann demnach eine stärkere Sulfatierung durch längere Kultivierung erreicht werden. Ein Zusammenhang zwischen Sulfatgehalt und Anpassungs- bzw. exponentieller Wachstumsphase kann daher vermutet werden, da sich die Sulfatierung

besonders zwischen einer achttägigen und einer 22-tägigen Kultivierung veränderte. Weitergehend kann man einen Funktionsschwerpunkt der Sulfatierung der EPS stärker im Erhaltungszustand (Schutz, Nährstoffanreicherung bei Verknappung) als in der Vermehrung der Zellen (maximale Photosyntheserate und höchster Nährstoffbedarf) vermuten. Der ermittelte Wert stimmt zusätzlich mit dem von Venzke gefundenen Wert überein [Venzke, 2005]. Für andere cyanobakterielle EPS war zuvor ein Sulfatgehalt von bis zu 19,3% beschrieben worden (Übersicht Tabelle 11.2-1), sodass die EPS von *S. aquatilis* mit im obersten Bereich liegen und als hochsulfatiert bezeichnet werden können.

Im Gegensatz zu den gut übereinstimmenden Werten bei der Untersuchung des Sulfatgehaltes der EPS von *S. aquatilis* ist bei den EPS von *S. pevalekii* eine deutliche Diskrepanz festzustellen (5.2.5). Die Betrachtung der konduktometrischen Bestimmung allein hätte auf einen Sulfatgehalt von $11,2 \pm 6,6\%$ schließen lassen. Der Kurvenverlauf der Titration wies eine Steigung auf, die, auch im Vergleich mit den Ergebnissen von *S. aquatilis*, Sulfatgruppen zugeordnet werden konnte. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der Elementaranalyse mit einem Sulfatgehalt von $1,09 \pm 1,53\%$. Mit diesem Ergebnis der Elementaranalyse widerlegt sich die angenommene Sulfatierung der EPS und das Ergebnis der konduktometrischen Titration muss als Reaktion von Karbonsäuren gedeutet werden. Auch für die Sp-Ausfällung wird eine solche Diskrepanz bei den Bestimmungen festgestellt. Dies verdeutlicht, dass die Nutzung der konduktometrischen Sulfatbestimmung allein nicht ausreicht, um abschließende Aussagen treffen zu können. Eine zusätzliche Analyse über Bariumsulfat-Fällung [Craigie et al., 1984] oder die Bestimmung des Schwefelanteils über Elementaranalyse ist unerlässlich. Diese Ergebnisse zeigen des Weiteren, dass die EPS von *S. pevalekii* einen großen Anteil saurer Funktionen mit $6,2 \pm 3,6\%$, berechnet als Karbonsäure, beinhalten. Dabei handelt es sich allerdings nicht um Uronsäuren, wie ihre Quantifizierung gezeigt hat ($<1\%$; 5.2.6). Der Proteinanteil der EPS konnte in weiteren Versuchen als Träger der Säurefunktionen identifiziert werden (6.7). Mit der Sulfatbestimmung eröffnet sich der nächste deutliche Unterschied zwischen den hochsulfatierten EPS von *S. aquatilis* und den sulfatgruppenfreien Polysacchariden von *S. pevalekii*.

Ebenso wie die EPS von *S. pevalekii* können die EPS von *S. aquatilis* als uronsäurearm bezeichnet werden. Bei *S. aquatilis* wurde lediglich ein Uronsäuregehalt von $0,88 \pm 0,39\%$ nachgewiesen, welcher keinem Einfluss durch veränderte Kultivierungsbedingungen unterlag (4.2.6). Venzke hatte in Ihrer Arbeit aufgrund einer anderen Methode keine Uronsäuren nachweisen können [Venzke, 2005]. Die mögliche schwache Säurebande in der IR-Spektroskopie (4.3.1) zeugt von der Richtigkeit der Quantifizierung. Der niedrigere Wert für 201107-Sa-K2 war möglicherweise durch das Weglassen des vorgeschalteten Hydrolyseschrittes vor der eigentlichen Farbreaktion verursacht worden und ist somit auf eine geringfügige Veränderung der Methodik zurückzuführen. Auch die Werte für die Stämme

S. aquatilis CAUP und CCALA wurden nach der leicht veränderten Vorschrift bestimmt. Sollte diese Veränderung zu einer leichten Reduktion des Endergebnisses geführt haben, lägen die wahren Werte für *S. aquatilis* CAUP und CCALA noch stärker über dem Wert von *S. aquatilis* SAG (s.o.). Somit würde sich eine noch größere Differenz zwischen den EPS der *S. aquatilis* Stämme ergeben, was die Vermutung genetischer Varianz noch stärker stützt. Die EPS von *S. pevalekii* weisen einen Uronsäuregehalt von $0,46 \pm 0,35\%$ auf (5.2.6). Generell zeichnen EPS von Cyanobakterien ein heterogenes Bild des Uronsäuregehaltes (Übersicht Tabelle 11.2-1). Die Inzidenz für Galakturon- und Glukuronsäure ist aber ausgesprochen hoch, wobei mehrfach Werte von 60 bis 80% berichtet worden waren. Aber auch EPS ohne Uronsäuren sind bekannt. Ebenso waren für Stämme der Gattung *Synechocystis* deutlich unterschiedliche Werte berichtet worden. Der Uronsäuregehalt für *Synechocystis* kann in drei Gruppen eingeteilt werden: mehr als 70% Uronsäuren, bis zu 20% und bis zu 3% [Ozturk et al., 2009; Ozturk & Aslim, 2009; Panoff et al., 1988]. Zu der letzten Gruppe zählen entsprechend auch *S. aquatilis* und *S. pevalekii*.

Zusammenfassend kann man bei den EPS von *S. aquatilis* von hochsulfatierten Arabinofukanen mit einem höheren Anteil Fukosamin sprechen. Hingegen bildet *S. pevalekii* unsubstituierte komplexe Polysaccharide. Beide EPS-Zusammensetzungen sind weitestgehend unabhängig von den Kultivierungsbedingungen. Mit der Polysaccharid-Analytik konnte auch die genetische Andersartigkeit der *S. aquatilis*-Stämme der Sammlungen CAUP und CCALA nachgewiesen werden.

6.3 Spektroskopische Methoden

Die spektroskopischen Methoden ermöglichen bestätigende und erweiternde Aussagen zu den qualitativen und quantitativen Analysemethoden. So lässt sich die Anwesenheit von Substituenten und Strukturelementen bestätigen oder ausschließen. Zusätzlich können Aussagen über eine strukturelle Anordnung getroffen werden. In diesem Kapitel sind die zusätzlich gewonnenen Informationen dargestellt, wo hingegen bestätigende Merkmale an anderen Stellen genannt werden.

IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren der EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* zeigen deutlich die charakteristischen Signale von Zuckerstrukturen (4.3.1; 5.3.1). Dabei handelt es sich um die Streckschwingung der C-O- und O-H-Bindungen. In beiden Fällen sind zusätzlich zu den genannten Signalen deutliche Acetamido-Bindungen sichtbar. Die einzige stickstofftragende Komponente in den EPS von *S. aquatilis* ist der Aminosucker Fukosamin. Auch in den EPS von *S. pevalekii* ist nur eine schwache Bande freien Amins erkennbar. Somit handelt es sich bei den EPS von *S. aquatilis* um den genuin acetylierten Aminosucker N-Acetyl-Fukosamin und bei *S. pevalekii* um N-Acetyl-Glukosamin. Die EPS von *S. pevalekii* weisen allerdings eine stärkere Acetamido-Bande auf, als es der Glukosamin-Gehalt erwarten lässt. Diese weiteren N-Ester-Bindungen bei 1625 cm^{-1} , als auch das Signal bei ca. 1540 cm^{-1} kann den Peptidbindungen des Proteinanteils zugeordnet werden (5.6; 6.7) [Huang et al., 2010]. Des Weiteren ist eine deutliche Karbonsäurefunktion im IR-Spektrum von *S. pevalekii* sichtbar. Dadurch bestätigen sich die Schlussfolgerungen, bei der konduktometrischen Titration handele es sich nicht um Sulfatgruppen, sondern um Säurefunktionen (6.7). Im Spektrum der EPS von *S. aquatilis* sind zusätzlich zwei deutliche Signale von Sulfatgruppen sichtbar. Das Auftreten und die Intensität der Banden bestätigt die starke Sulfatierung der Polysaccharide. Bilan et al. gaben für äquatoriale Sulfatgruppen an C2 und C3 von Fukopyranose eine Bande bei 828 cm^{-1} sowie für axiale Sulfatgruppen bei 848 cm^{-1} an [Bilan et al., 2004]. Die Banden bei 836 cm^{-1} und 856 cm^{-1} könnten diesen entsprechen und weisen so auf mehrere Bindungsstellen des Sulfates hin.

NMR-Spektroskopie

Die Auswertung des NMR-Spektrums der partialhydrolysierten EPS von *S. aquatilis* (4.3.2) ergeben das ausschließliche Vorkommen pyranosidischer Zucker. Die pyranosidische Form der Arabinose manifestiert sich im Fehlen entsprechender anomerer ^{13}C -Verschiebungen sowie in der großen Zahl der CH_2 -Signale. Die pyranosidische Form der Fukose und des N-Acetyl-Fukosamins lässt sich an der Verschiebung der Methylgruppe erkennen. Außerdem bestätigt sich zusätzlich zur IR-Spektroskopie erneut die N-Acetylierung des Fukosamins. Dabei ergaben

sich für das FucNAc ein Methylsignal des C6-Atoms, sowie zwei Signale der Methylgruppe der Acetylgruppe. Dieses weist darauf hin, dass sich das C6-Atom in einer einheitlichen chemischen Umgebung befand und das FucNAc nur in einem Bindungstyp vorhanden ist. Die geringe Verschiebung des C6-Atoms im Polymer im Vergleich zum Monomer zeigt ebenfalls eine Bindung über entfernte Kohlenstoffe wie C1 oder C3 an. Die Aufspaltung des Signals der Methylgruppe der N-Acetylierung deutet auf zwei verschiedene Bindungspartner für die glykosidische Bindung des C1 oder C3 hin. Der Methylgruppe der Fukose sind zwei Signale zugeordnet, was wiederum auf zwei Bindungstypen hindeutet.

Die Verschiebung einiger CH₂-Gruppen von Arabinopyranosen ins Tieffeld, verglichen mit der Angabe von Vinogradov et al., zeigt vermutlich die Bindung von Sulfatgruppen an [Vinogradov et al., 1989; Bilan et al., 2004]. Die starke Hochfeldverschiebung einiger CH₂-Gruppen hingegen kann durch einen Einfluss räumlich nahgelegener N-Acetamido-Gruppen verursacht worden sein. In der Monomerenanalyse zeigt das C2-Atom des Fukosamins gegenüber der Fukose eine solche Verschiebung (4.2.1). Bei den gefundenen quartären Signalen (102,98 ppm, 103,23 ppm, 116,96 ppm) kann es sich, bei einem reinen Polysaccharid, nur um die Carbonylkohlenstoffe der N-Acetamido-Gruppe handeln. Allerdings beschrieben Vinogradov et al. diese Signale mit Verschiebungen bei 174,8-175,5 ppm, also deutlich weiter im Tieffeld. Die zwei quartären Signale bei 102,98 und 103,23 ppm sind im Monomerenmisch der Referenz-Substanzen ebenfalls sichtbar, nicht aber bei TFA-hydrolysierten EPS von *S. aquatilis* (nicht gezeigt in 4.2.1). Demnach scheinen diese quartären Kohlenstoffatome weniger Bestandteile der EPS, als vielmehr unspezifische Verunreinigungen zu sein.

Bei den gefundenen anomeren Kohlenstoffen finden sich Fukose und N-Acetyl-Fukosamin in der α -Konfiguration. Für die Arabinose ist eine β -Konfiguration festzustellen, da die von Hu et al. beschriebenen Verschiebungen für α -L-1,3- und -1,3,4-Arabinosen um 107 ppm eindeutig nicht zu finden sind [Hu et al., 2003]. Generell hat die α -Form der Arabinopyranose größere Werte für die chemische Verschiebung als die β -Form (α : ungebunden 97,6 ppm & glykosidisch gebunden 102,7 ppm; β : 93,4 ppm & 94,8-100,6 ppm) [Matulova et al., 2005]. Eine Sulfatsubstitution würde eine zusätzliche Tieffeldverschiebung bewirken. Demnach muss es sich bei der Arabinopyranose der EPS von *S. aquatilis* um eine β -Konfiguration handeln.

Die Anzahl von 13 anomeren Kohlenstoffatomen zeugt von einer großen, sich wiederholenden Untereinheit und nicht von einem Blockpolymer. In einem reinen Blockpolymer sind weniger Signale zu erwarten, da die NMR-Verschiebung beinahe ausschließlich durch den Bindungstyp und die Sulfatierung beeinflusst wird, was bei drei Monosacchariden und nur wenigen Bindungstypen (6.6) weniger Anomerensignale ergibt. Mit einem Polymerisationsgrad von 13 entspricht die Bruchstückgröße auch den Ergebnissen der GPC-Untersuchungen nach Partialhydrolyse (4.4.1). Es kann dabei kein Anomerensignal des NMR-Spektrums einem Zuckermonomer zugeordnet werden, obwohl es sich bei der Probe um den ethanollöslichen

Anteil der Partialhydrolyse handelte. Demnach stammen die Signale von polymerisierten Zuckern und die Monomerenmenge lag unter der Nachweisgrenze von etwa 5% [Miller & Blunt, 1998]. Diese Nachweisgrenze zeigt sich auch in der NMR-Analyse der TFA-hydrolysierten EPS von *S. aquatilis*, da neben den drei Hauptzuckern der geringere Anteil an Glukose nicht detektierbar war (4.2.1).

Damit ist zusammenfassend für die spektroskopischen Untersuchungen ein hochsulfatiertes Heteropolymer aus β -Arabinopyranose, α -Fukopyranose und N-acetyliertem α -Fukopyranosamin mit einer Untereinheit von 13 Zuckern für die EPS von *S. aquatilis* bewiesen. FucNAc liegt in einem Bindungstyp, am wahrscheinlichsten terminal, an zwei verschiedene Bindungspartner gebunden vor. Die Fukose weist zwei Bindungstypen auf. Die Bindung der Sulfatgruppen erfolgt vermutlich an zwei Positionen.

6.4 Partialhydrolytische Methoden

Ziel der partialhydrolytischen Methoden ist die Generierung von weiteren Informationen zum strukturellen Aufbau der EPS-Moleküle. Während die Oxalsäurehydrolyse eine säurehydrolytische Spaltung von glykosidischen Bindungen ist, handelt es sich bei der alkalischen Hydrolyse um einen Abbau von Proteinen und Peptiden unter dem Erhalt der glykosidischen Bindungen.

Oxalsäurehydrolyse

Wie unter 3.6.1 beschrieben, werden in der milden Säurehydrolyse mit Oxalsäure labile glykosidische Bindungen, speziell solche zu Furanosen und Pentosen, gespalten. Sind diese im Molekül als Seitenketten oder terminale Monosaccharide vorhanden, werden sie aufgrund geringerer Molekülmasse nach der Reaktion ethanollöslich sein, während das große Restmolekül in 80%igem Ethanol ausfällt. Demnach wird in der Neutralzuckerbestimmung eine Reduktion des Furanosen- oder Pentosenanteils erkennbar. Im Falle einer ungeordneten Anordnung der Furanose und Pentosen im Molekül ergibt sich ein unstrukturierter Abbau der gesamten Struktur.

Letzteres wurde bei EPS von *S. aquatilis* beobachtet (4.4.1). Dabei bildet der ethanollösliche Anteil des partialhydrolysierten Moleküls den weitaus größten Anteil. Bereits an diesem Punkt kann geschlussfolgert werden, dass die Arabinosen im Molekül verteilt vorliegen und nicht in Blöcken gruppiert sind. Unter Beachtung der Methylierungs- und NMR-spektroskopischen Ergebnisse handelt es sich um Arabinopyranosen, an denen es vermutlich zum Kettenbruch kommt. Hu et al. beobachteten hingegen bei dem arabinosereichen EPS von *Phormidium tenue* keine Spaltung bei vierfacher Oxalsäurekonzentration bei zweistündiger Reaktion und begründeten dieses mit der pyranosidischen Form [Hu et al., 2003]. Diese Aussage steht konträr zu den wiederholten Ergebnissen dieser Arbeit und lässt sich nicht in Übereinstimmung bringen. Die Acetylierungsanalyse zeigte, dass die ethanollöslichen Bruchstücke des Moleküls, die größte Fraktion, die gleiche Neutralzuckerzusammensetzung, sowohl qualitativ als auch quantitativ, aufweisen wie das Ausgangsmaterial. Der hohe Galaktosegehalt in der zweiten Messung nach vier Stunden Hydrolysezeit kann nur mit einer Verunreinigung verwendeter Glasgeräte erklärt werden. Die Variation der Reaktionsdauer ergab, dass sowohl die mengenmäßige Verteilung auf die Fraktionen als auch die Neutralzuckerverteilung bereits nach einer Stunde keiner weiteren Veränderung mehr unterliegen. Die Zusammensetzung der ethanollöslichen Fraktion und die Abwesenheit von Monomeren lassen auf einen Polysaccharid-Aufbau in Untereinheiten schließen. Wie die Auswertungen der GPC-Ergebnisse zeigen, handelt es sich bei diesen Untereinheiten um Oligomere mit 7, 13 und 21 Zuckern (hydrodynamische Volumina 1.046, 1.960 und 3.094 Da; berechnet mit mittlerem

Molekulargewicht 150 g/mol). Nach einer Stunde Hydrolysezeit war noch ein größeres Molekülteil intakt, welches zunehmend über 2 bis 3 Stunden abgebaut worden war. Auch der Molekülteil mit einem Polymerisationsgrad (DP) von etwa 21 erfuhr nach einer Zunahme bis drei Stunden Hydrolyse einen weiteren Abbau. Der Anteil des kleinsten Oligosaccharids mit einem DP von etwa 7 nahm konstant über die untersuchte Reaktionszeit zu und scheint die stabilste Form und kleinste Untereinheit zu sein. Die anteilig größte Zuckerkette mit einem DP von 13 wies nach 3 Stunden eine konstante Menge auf und ist demnach ebenfalls stabil. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Partialhydrolyse der EPS von *S. aquatilis* nach drei Stunden überwiegend abgeschlossen ist und stabile Untereinheiten des Polysaccharids ergeben. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den NMR-spektroskopischen Untersuchungen und der Degradation der EPS von *S. aquatilis* durch Solvolyse. Das NMR-Spektrum der EPS nach fünfstündiger Oxalsäurehydrolyse zeigt 13 anomere Kohlenstoffe. Der DP der Bruchstücke nach Solvolyse betrug ebenfalls 13. Außerdem sprechen die NMR-Ergebnisse (4.3.2) gegen ein Blockpolymer (6.3). Bei einem Arabinosegehalt von 30,2% in den EPS muss eine Untereinheit von 13 Zuckern allerdings mehrere Arabinosen beinhalten. Denkbar ist in diesem Punkt ein stabilisierender Effekt durch benachbartes N-Acetyl-Fukosamin oder durch die Sulfatierung der Arabinosen. Der Sulfatgehalt der ethanollöslichen Fraktion betrug 11,95%. Dabei handelt es sich primär um gebundenes Sulfat, da die Methylierung nur einen leicht reduzierten 1,3,4-Bindungstyp anzeigt (6.6).

Die Ergebnisse der GPC-Untersuchungen von ethanolgefällter und unlöslicher Fraktion spiegeln die Verteilung der Ausbeuten wieder. Während die unlösliche Fraktion die größten Moleküle aufweist, waren diese bei der ethanolgefällten Fraktion kleiner und entsprachen dem Ausgangsmaterial. Bei beiden Untersuchungen mussten die Molekülgrößen um 800 kDa allerdings mit Einschränkungen betrachtet werden, da dieser Bereich bei zu gering konzentrierten Proben auch durch einen Gerätefehler bedingt gewesen sein könnte. Bei allen Messungen aller Fraktionen hatte die Sulfatierung einen möglichen erhöhenden Einfluss auf die Löslichkeit und das hydrodynamische Volumen, sodass im Vergleich zu ungeladenen Molekülen durchaus auch größere Moleküle gelöst vorgelegen haben könnten. Der unlösliche Anteil der Hydrolyse weicht in seiner Neutralzuckeranalyse geringfügig von der Originalzusammensetzung mit einem verringerten Fukosamingehalt und erhöhtem Glukosegehalt ab. Zusätzlich sind die Zucker, die im EPS nur in Spuren zu finden sind, in stärkerem Ausmaße vertreten. Der ethanolfällbare Anteil weist eine variierende Zusammensetzung auf. Mit diesen Ergebnissen können die Ergebnis Venzkes bestätigt und deutlich erweitert werden [Venzke, 2005], wobei aufgrund des Fehlens des Fukosamins die Zuckerverteilung verschoben ist.

Die Ergebnisse der Zucker-HPTLC (4.8.3) der EPS von *S. aquatilis* nach Behandlung mit unterschiedlich konzentrierter Oxalsäure sowie nach unterschiedlichen Reaktionszeiten

stimmen nicht mit den Ergebnissen der Oxalsäure- und NMR-Analyse überein. So fanden sich in der GPC-Analyse des Hydrolysates keine Monomere. Ebenso wurden keine Anomeren-Signale von Monomeren in der NMR (6.3) detektiert, wobei die Nachweisgrenze von ^{13}C -NMR bei etwa 5% liegt [Miller & Blunt, 1998]. Die HPTLC aber zeigte einen überwiegenden Abbau der EPS von *S. aquatilis* zu Monomeren bei 12,5 mmolarer Oxalsäure nach fünf Stunden Reaktionszeit. Ausgehend von einer korrekten Versuchsdurchführung, scheint die Detektionsmethode für die quantitative Aussage ungeeignet. Bereits die HPTLC-Platte mit Referenzsubstanzen (Abbildung 4.8-1) zeigt bei identischer Auftragsmenge eine schwächere Bandenfärbung für Polysaccharide. Aus den Ergebnissen der Untersuchung lässt sich allerdings schließen, dass bereits eine Oxalsäurekonzentration von 5 mmolar und eine Reaktionszeit von vier Stunden für eine überwiegend abgeschlossene Reaktion ausreichen.

Im Falle der EPS von *S. pevalekii* kam es nach partialhydrolytischer Spaltung mit Oxalsäure zu einer gleichmäßigen Aufteilung der Ausbeute auf alle drei Fraktionen (5.4.1). Eine Ausnahme stellte die wiederholte Partialhydrolyse mit EPS aus der Kultivierung 201004-Sp-K2 dar. Unregelmäßigkeiten (zu geringe Temperatur oder Oxalsäurekonzentration) die das abweichende Ergebnis erklären könnten, wurden bei der Versuchsdurchführung nicht beobachtet. Bei den zwei übereinstimmenden Ergebnissen entfiel etwa ein Drittel auf ungelöste Bestandteile. Diese Probenanteile waren in leichter Säure trotz erhöhter Temperatur und langer Reaktionszeit von 5 Stunden nicht löslich. Es ist auch der unlösliche Anteil, der den höchsten Proteingehalt aufweist. Dieser trägt einen hohen Anteil saurer Funktionen, deren lösungsvermittelnder ionischer Charakter in saurer Umgebung verloren geht. Damit bleibt ein eher hydrophobes, säureunlösliches Molekül zurück. Auf den ethanollöslichen und unlöslichen Anteil entfielen ebenfalls je etwa ein Drittel der Ausbeute. Die Ergebnisse der GPC-Untersuchungen entsprechen nicht den Erwartungen. In beiden Fraktionen fanden sich ausgesprochen große Moleküle, deren Größe dem des Ausgangsmaterials entsprechen. Aufgrund fehlender geladener Polysaccharidsubstituenten nicht zu erklären ist das eindeutige Auftreten dieser Molekülgrößen im Überstand der Ethanolfällung. Im unlöslichen Anteil war es zu einer Abspaltung von Fruktose, Xylose und Rhamnose gekommen, in Folge dessen sich der Hexosen-Gehalt erhöhte. Die abgespaltenen Monosaccharide scheinen demnach über Arabinose und / oder Xylose an dieses überwiegend Hexosen-haltige Polysaccharid geknüpft zu sein. Auch Glukosamin ist primär ein Bestandteil der unlöslichen Fraktion. Die abgespaltenen Zucker Xylose und Rhamnose finden sich, neben Hexosen, besonders in dem zweiten abgespaltenen und ethanolfällbaren Polysaccharid wieder. Fruktose fehlt in diesem Anteil vollständig, was eine periphere, terminale Stellung im Molekül und eine Abspaltung vermuten lässt. Die Signalintensität der Spektren des ethanollöslichen Anteils zeigt, dass es sich in dieser Fraktion um ein Gemisch aus Monomeren und polymerisierten Zuckern handelte. Die Zusammensetzung des Überstandes der Ethanolfällung entspricht im Wesentlichen dem

Ausgangsmaterial und deutet durch den hohen Monosaccharidanteil auf eine unspezifische abbauende Nebenreaktion hin. Die monomeren Zucker werden dabei von Xylose und Glukose dominiert. Zusammenfassend befinden sich in den EPS von *S. pevalekii* keine blockweise angeordneten oder ausschließlich terminalen Pentosen. Die EPS bestehen aus einem proteingekoppelten Polysaccharid, welches überwiegend aus Mannose, Glukose und Galaktose besteht. Glukosamin befindet sich ebenfalls bevorzugt in dem proteingekoppelten Polysaccharid. An dieses Zuckerpolymer geknüpft, und in der Partialhydrolyse abgespalten, befindet sich ein ethanolunlösliches Polysaccharid aus Rhamnose, Hexosen und Xylose. Dabei wird Xylose am stärksten zu Monomeren degradiert, während Glukosamin eine feste Bindung zu anderen Zuckern eingeht.

Alkalische Hydrolyse

Nach der Degradation des Proteinanteils der EPS von *S. pevalekii* mittels alkalischer Hydrolyse (5.4.2) ergaben sich zwei Moleküle unterschiedlicher Größe. Das größere Molekül mit einem hydrodynamischen Volumen (hV) von etwa 600 kDa war bei der Fraktionierung per Ethanolfällung (Endkonzentration 80%) eindeutig als Niederschlag erkennbar. Es kann auch dieses Molekül gewesen sein, welches nach der Hydrolyse ungelöst vorgelegen hat. Bei einem Proteinanteil von 45,28% (5.6) und einem hydrodynamischen Volumen des Gesamtmoleküls von etwa 900 kDa (Hauptfraktion der IAC; 5.7.1) ist keine exakte Übereinstimmung, aber eine bestätigende Tendenz festzustellen. Die Abweichung ist hauptsächlich auf die Betrachtung des hV und nicht des Molekulargewichtes, dessen Messung aufgrund eines Gerätedefektes nicht durchgeführt werden konnte, zurückzuführen. Das hV unterliegt größeren Einflüssen durch Molekülgestalt und -ladung. Es kann allerdings eindeutig festgestellt werden, dass der Polysaccharidanteil der EPS von *S. pevalekii* aus einem großen und kleinen Molekülteilen besteht.

6.5 Desulfatierung

Um eine genaue Strukturanalyse von Polysacchariden durchführen zu können, ist es erforderlich, gebundene Sulfatgruppen abzuspalten. Nur so kann in der Bindungstypanalyse durch Vergleich mit dem genuinen Molekül die Position der Sulfatgruppen erkennbar gemacht werden. Um eine möglichst genaue Aussage treffen zu können, sollten sich durch die Desulfatierung nach Möglichkeit keine weiteren strukturellen Veränderungen an dem Polysaccharid ergeben.

Die in der Literatur am häufigsten verwendete Methode zur Desulfatierung von Polysacchariden ist die Solvolyse, die Hydrolyse mit Wasser oder Methanol in organischen Lösungsmitteln. Diese Methode führte bei den EPS von *S. aquatilis* zu einer starken Degradation des Polymers. Dieser Abbau war besonders stark in DMSO mit Wasser oder Methanol. Auch der Austausch des Lösungsmittels gegen DMF erzeugte keine ausreichende Sulfatreduktion, weshalb eine mehrfache Reaktionsdurchführung nötig wäre. Hierfür jedoch war die Ausbeute zu gering. Somit bestätigt sich die These von Nagasawa et al. nicht, wonach eine Desulfatierung in DMSO statt in DMF besser wäre [Nagasawa et al., 1977]. Für die Desulfatierung des Arabinofukans von *S. aquatilis* sind beide Methoden nicht geeignet. Ursächlich für die starke Spaltung des Moleküls ist vermutlich der hohe Arabinoseanteil, da für Fukoidane mit ihren strukturellen Ähnlichkeiten zu den EPS eine vollständige Desulfatierung mit DMSO / 10% MeOH (5 h, 80°C) mit annehmbarer Ausbeute von 57,3% beschrieben worden war [Bilan et al, 2007]. Die glykosidische Bindung der Arabinofukane kann bereits mit schwachen Säuren gespalten werden, wie bei der Oxalsäurehydrolyse beobachtet wurde (6.4). Die mit den Sulfatgruppen in den EPS vorhandenen sauren Funktionen, welche in der Form eines Pyridinium-Salzes vorlagen, haben dabei vermutlich für die Spaltung unter erhöhter Temperatur in Anwesenheit von Restfeuchte ausgereicht. Die durchgeführte Bestimmung des hydrodynamischen Volumens (hV) der Reaktionsprodukte spiegelt die Ausbeuten wieder. Während der Solvolyse in DMSO entstanden große Moleküle, deren hV im Bereich des originalen Moleküls lagen, und kleine Moleküle, deren hV etwa 2 kDa betrug. Betrachtet man die Ergebnisse der Oxalsäurehydrolyse (4.4.1) für EPS von *S. aquatilis*, ist genau dieses hV bei der stabilen Untereinheit des Polysaccharides zu finden. Dieser Zusammenhang zeigt, dass es sich bei der Degradation unter der Solvolyse tatsächlich um eine milde Säurehydrolyse analog zur Oxalsäurehydrolyse, handelt. Die Solvolyse in DMF führte zwar zu größeren Molekülresten von etwa 26 und 48 kDa (hV), diese waren aber wie beschrieben noch immer stark sulfatiert.

Aufgrund dieser Labilität der glykosidischen Bindungen, auch zu sehen in den Untersuchungen der Zucker-HPTLC, wurde von der ursprünglichsten aller Desulfatierungsmethoden, der Reaktion mit methanolischer Salzsäure, abgesehen [Kantor & Schubert, 1957]. Alle durchgeführten Methoden wurden für sulfatierte Polysaccharide aus Hexosen erarbeitet.

Dennoch sprachen bereits Kolender und Matulewicz von einem Misserfolg bei Desulfatierung in DMSO mit Wasser oder Methanol, obwohl sie ebenfalls mit Glukanen arbeiteten [Kolender & Matulewicz, 2004]. Daraufhin entwickelten sie eine selektive Desulfatierung mit CTMS. Man kann zusätzlich dem Lösungsmittel der Reaktion, dem Pyridin, eine schützende Funktion vor Säure durch eine Regulation möglicher überschüssiger Protonen zusprechen [Miller & Blunt, 1998]. Die von Kolender und Matulewicz beschriebene Moleküldegradation bei zu geringen und zu hohen CTMS-Konzentrationen konnte für EPS von *S. aquatilis* nicht beobachtet werden. Hingegen zeigte die Sulfatabspaltung bis zu einer CTMS-Konzentration von 100:1 eine Zunahme, sowie bei höheren Konzentrationen eine erneute Abnahme. Es ist erstaunlich, dass eine Kühlung während der exothermen Wasserzugabe und Abspaltung der Trimethylsilan-Gruppen vom Polysaccharid die Ausbeute verringerte. Eine Kühlung hätte eine geringere Degradation des Polymers erwarten lassen. Die desulfatierten Polysaccharide hatten ein M_n von 800.000 bis 1 Million Da. Dies entspricht der Größe der EPS vor der Desulfatierung. Die aufgenommenen IR-Spektren desulfatierter Proben zeigen bereits eine deutliche Verkleinerung der Sulfatbande bei 1214 cm^{-1} bei einer Reaktion ohne CTMS, ausschließlich in wasserfreiem Pyridin. Dieses kann mit dem zuvor beschriebenen sauren Eigenschaften der EPS und einer möglichen Restfeuchte der Proben erklärt werden. Bei einer Konzentration von 100:1 scheint im IR-Spektrum die Sulfatabspaltung bei allen untersuchten Zeiten vergleichbar zu sein. Die Absolutmessungen zeigen, dass es sich dabei um Sulfatmengen von 1,9 bis 3,6% handelt. Erst ab einem Sulfatgehalt von 8% ist die Sulfatbande wieder sichtbar (300:1, 7 Stunden). Dieses Ergebnis zeigt, dass die IR-Spektroskopie für eine schnelle Einschätzung des Desulfatierungserfolges nutzbar ist. Mit einem größeren Aufwand wäre auch eine Quantifizierung, wie von Lijour et al. beschrieben, möglich gewesen [Lijour et al., 1994]. Die auf den ersten Blick vermutete Reduktion der N-Acetyl-Bande bei $1620\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ ist lediglich durch eine veränderte Skalierung der y-Achse bedingt. Des Weiteren trat eine leichte Deacetylierung des Fukosamins ein, welche anhand einer C-NH₂-Bande bei etwa 1524 cm^{-1} sichtbar wird. Dabei scheint es sich um ein unspezifisches Nebenprodukt zu handeln, wie die zwei Spektren nach Reaktion mit CTMS 100:1 für 7 Stunden zeigen. Die bei dieser Reaktion ebenfalls entstandene Bande bei 1730 cm^{-1} gehört zu einer C=O Bindung des Acetats nach Abspaltung von der Aminogruppe.

Nach allen Desulfatierungsmethoden entsprach die Neutralzuckerzusammensetzung des Produktes der des Ausgangsmaterials, was erneut bestätigt, dass es sich um ein regelmäßig aufgebautes Molekül ohne blockweise Anordnung handelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Desulfatierungsmethode mit CTMS für labile Moleküle geeignet ist und dass das entstandene sulfatarme Produkt in sonstigen Charakteristika mit dem Ausgangsprodukt übereinstimmte.

6.6 Bindungstyp-Analyse

Die Bindungstyp-Analyse gibt Auskunft über die glykosidischen Bindungen im Polysaccharid. Durch die Kombination mit vorangehenden strukturellen Veränderungen des Polymers (Desulfatierung und Partialhydrolyse) können Aussagen über die Anordnung der Komponenten getroffen werden und diese, im besten Fall, in einem Vorschlag eines Strukturmodelles dargestellt werden.

Wie Pereira schon zusammenfasste, gestaltet sich die Bindungstypanalyse von EPS aufgrund der hohen Neutralzuckeranzahl als schwierig [Pereira et al., 2009]. Dieses ist auch der Grund, weshalb bisher von einer Reihe von Cyanobakterien die EPS-Zusammensetzungen, aber von nur wenigen die Strukturmodelle bekannt sind. Als überwiegende Verknüpfungstypen wurden 1,3- und 1,4-glykosidische Bindungen gefunden, in einem Fall, bei *Mastigocladus laminosus* auch 1,2-Bindungen [Gloaguen et al., 1995]. Dieses Cyanobakterium bildet zusätzlich 1,3- und 1,4-verknüpfte Fukose. Für *Cyanospira capsulata* wurde unter anderem 1,3-Fukose und terminale Arabinose beschrieben [Garozzo et al., 1998]. Venzke vermutete in ihrer Arbeit über EPS von *S. aquatilis* terminale, 1,4- und hochverzweigte pyranosidische Fukose sowie 1,5- und 1,3,5-Arabinofuranose, wobei die Zuordnung nur näherungsweise über die Retentionszeiten der GC-Untersuchung erfolgen konnte [Venzke, 2005]. Sie berichtete auch von schlechter Löslichkeit und Methylierbarkeit der Proben. Die Methylierung der genuinen EPS erfolgte bei Venzke als Pyridinium-Salz mit Dimsyl-Reagenz und Aufreinigung mittels Dialyse. Das dabei entstandene GC-Chromatogramm zeigte zwei große Signale hochverzweigter Zucker. Wie auch mehrere Methylierungsversuche dieser Arbeit (vgl. Abbildung 4.6-2 F) handelte es sich dabei vermutlich um durch Untermethylierung entstandene peracetylierte Monomere.

Diese schlechte Methylierbarkeit war, neben der Löslichkeit, welche durch Salzbildung erhöht werden könnte, das Hauptproblem bei der Bindungstypanalyse der EPS von *S. aquatilis* (4.6.1). Die von Stevenson und Furneaux vorgeschlagene Salzform eines Triethylamin-Salzes weist dabei zwei Nachteile auf: Eine aufwendigere Bildung und, deutlich wichtiger, eine schlechtere Löslichkeit in DMSO verglichen mit dem Pyridinium-Salz [Stevenson & Furneaux, 1990]. Viele der von Harris et al. genannten Probleme bei der Methylierungsanalyse konnten ausgeschlossen werden [Harris et al., 1984]. Eine inkomplette Hydrolyse in 2 molarer TFA wurde mit einer Zucker-HPTLC-Methode an genuinen EPS überprüft und widerlegt (4.8.3; 6.2). Verluste über die Gasphase durch übermäßige Begasung können ebenfalls ausgeschlossen werden, da teilweise parallel andere Proben erfolgreich bearbeitet wurden, ohne auswertbare Ergebnisse für die EPS von *S. aquatilis* zu ergeben. Probleme in den Schritten der Reduktion und Hydrolyse traten bei Dimsyl-Reagenz-Methylierungen ebenfalls nicht auf, da peracetylierte Monosaccharide entsprechend der Acetylierungsanalyse erhalten wurden. Es stellte sich heraus, dass eine Aktivierung mit Dimsyl-Reagenz im Rahmen der durchgeführten

Versuchsvariationen keine ausreichende Methylierung der genuinen EPS und ihrer Salzformen ermöglicht. Ursächlich dafür zeichnen die Molekülgröße und die Sulfatierung. Die Schwierigkeiten der Methylierung von sulfatierten Polysacchariden wurde unter anderem auch von Stevenson und Furneaux sowie Alban und Franz beschrieben [Stevenson & Furneaux, 1990; Alban & Franz, 1994]. Erst eine partialhydrolysierte Probe (nach Oxalsäurehydrolyse 3.6.1 oder Solvolyse 3.7.1) wies methylierte Hydroxylgruppen auf. Gegensätzlich verhielt es sich bei der reduktiven Hydrolyse nach Stevenson und Furneaux. Hier konnte, wie im Ergebnisteil beschrieben der Hydrolyseschritt als fehlerhaft identifiziert werden. Da dieser weder bei den EPS von *S. aquatilis* noch von *S. pevalekii* auswertbare Ergebnisse geliefert hat, handelte es sich deutlich um einen methodischen Mangel und nicht um ein Problem des Aufbaus der EPS. Ursächlich dafür kann der Verzicht auf eine vollständige Trocknung der Proben nach der Reduktion, aus Sorge um eine zu hohe Flüchtigkeit der PMAs gewesen sein, da, nach Stevenson und Furneaux, diese Aufkonzentrierung die Vollständigkeit der Reaktion entscheidend beeinflusst. Außerdem wurde nachgewiesen, dass, wie auch schon bei Alban und Franz beschrieben, die einzige Erfolg bringende Aufreinigungsmethode die Dialyse ist [Alban & Franz 1994]. Die Problematik der Nachweisbarkeit von Aminozuckern ist im Ergebnisteil näher erläutert (4.6.1). Um diese analysieren zu können, muss auch eine Untermethylierung zugelassen werden. Es wäre demnach hinderlich gewesen, untermethylierte Proben nicht zu beachten und von einer Auswertung auszuschließen. Ausschlaggebend für die ausreichende Methylierung der EPS von *S. aquatilis* sind eine Aktivierung der Hydroxylgruppen mit NaOH-Brei und eine mehrfache Durchführung des Methylierungsschrittes. Teilweise war, bei sonstiger Untermethylierung, ein übermäßiger Anteil an terminaler und 1,4-verknüpfter Hexosen beobachtet worden. In weiteren Teilen der Diskussion (6.1; 6.2; 6.8) wird die Möglichkeit einer Verunreinigung der EPS von *S. aquatilis* mit Speicherpolysacchariden besprochen.

Die EPS von *S. aquatilis* bestehen, wie die Methylierungsanalyse zeigt, aus 1,3- und 1,3,4-verknüpfter pyranosidischer Fukose, 1,3,4-verknüpfter pyranosidischer Arabinose und terminalem, pyranosidischem N-Acetyl-Fukosamin. Die 1,3-Fukose findet sich dabei auch deutlich im NMR-Spektrum wieder (4.6.2). Eine 1,4-Fukose kann auch im NMR-Spektrum ausgeschlossen werden. Die Desulfatierung resultiert in einem vollständigen Verschwinden von 1,3,4-Fukose. Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass es sich hier um eine mögliche Bindungsstelle der Sulfatgruppen handelt. Da es nicht zu einer Bildung von 1,4-Fukose kam, ist die Sulfatgruppe über die Position 4 gebunden. Die festgestellte 1,2,3-Fukose nach CTMS-Desulfatierung, allerdings nicht nach anderen Methoden mit partieller Sulfatabspaltung (Solvolyse oder Oxalsäurehydrolyse), lässt auf die Bildung eines Nebenproduktes schließen. Dabei sind silylierte Hydroxylfunktionen des C2-Kohlenstoffs am wahrscheinlichsten. Eine Bindung des terminalen N-Acetyl-Fukosamins an das C3 der Fukose ist ebenfalls auszuschließen. Die Änderungsmuster der oxalsäurehydrolysierten Probe zeigen sich auch bei

Proben nach der solvolytischen Desulfatierung, was bestätigt, dass die Degradation unter der Solvolyse durch eine Hydrolyse derselben Bindungen wie bei der Oxalsäurehydrolyse entsteht (4.6.1; 6.6). Der Verlust der 1,3,4-Arabinose und der Anstieg der 1,3-Arabinose bedeuten, dass die Moleküllänge über eine 1,4-Verknüpfung entsteht. Beide Methoden (Oxalsäurehydrolyse und Solvolyse) ergeben eine deutliche Reduktion der Kettenlänge und eine Zunahme des 1,3-Bindungstypes. Die molare Berechnung ergibt, dass auch Sulfatgruppen an den Arabinosen gebunden sein müssen, da die Menge an 1,3,4-Fukose nicht ausreicht (Tabelle 6.6-1). Auch die Methylierungsergebnisse stützen diese Vermutung: Bei der Methylierung des Desulfatierungsproduktes nach CTMS-Desulfatierung mit einer CTMS-Konzentration von 300:1 findet sich keine 1,3,4-Fukose mehr, allerdings lag der Sulfatgehalt noch bei 8,4%. Demnach ist die Bindung der Sulfatgruppen an Position 4 der Fukose in der CTMS-Desulfatierung labiler als die Bindung an Position 3 der Arabinose. Dennoch verändert sich bei vollständiger Desulfatierung der Anteil an 1,3,4-Arabinose nicht. Dabei handelt es sich möglicherweise um Ungenauigkeiten der Messung oder der Auswertung. Die zurückbleibenden freien Verzweigungspunkte der Arabinosen können mit den terminalen N-Acetyl-Fukosamin-Molekülen belegt werden. Demnach ergibt sich bei *S. aquatilis* ein lineares EPS-Molekül aus 1,3-Fukose und 1,4-Arabinose mit Sulfat an Position 4 der Fukose und 3 der Arabinose, sowie N-Acetyl-Fukosamin am C3-Kohlenstoff der Arabinose. Ein größeres hydrodynamisches Volumen verglichen mit dem absoluten Molekulargewicht der IAC-Hauptfraktion stützt die Vermutung, dass die EPS aus linearen Molekülen mit Seitenketten aus nur einem Monosaccharid bestehen. Des Weiteren ist auch die schlechte Löslichkeit der EPS ein gutes Indiz für die Linearität. So fassten Bilan et al. zusammen, dass viele lineare Polysaccharide eine schlechte Löslichkeit aufweisen [Bilan et al., 2007].

Der Rückblick in die Diskussion der NMR-Ergebnisse von *S. aquatilis* ergibt, dass Fukose und Arabinose in einer α - bzw. β -Konfiguration vorliegen und von pyranosidischer Form sind. Außerdem wird in der Diskussion der NMR-Analyse vermutet, dass die Fukose in zwei Bindungstypen und das N-Acetyl-Fukosamin in einem Bindungstypus vorliegen. Dieses kann mit der Methylierungsanalyse bestätigt werden. Ebenso deuten die NMR-Ergebnisse auf eine terminale oder C3-Bindung des FucNAc hin, was ebenfalls zutrifft. Nicht richtig ist die Aussage der NMR-Analyse, FucNAc wäre terminal an 2 verschiedene Zuckermoleküle oder Positionen gebunden, da nur die Position 3 der 1,3,4-Arabinose möglich ist. Eine starke Verschiebung des NMR-Signales durch räumlich benachbarte andere Zucker oder einen Sulfatrest ist denkbar. Dabei unterläge das Signal bei 23,18 ppm einer Tieffeldverschiebung durch Sulfat. Dieses wiederum lässt den Schluss zu, dass FucNAc-Arabinosen teilweise neben sulfatierten Zuckern liegen. Die von Qi et al. veröffentlichte chemische Verschiebung des C1 von β -1,4-Arabinopyranose-3-Sulfat mit 98,3 ppm trifft nicht auf die NMR-Ergebnisse von *S. aquatilis* zu [Qi et al., 2012], vermutlich bedingt durch den Einfluss von Sulfat- und Aminogruppen sowie

eine deutliche Reduktion dieses Bindungstypes durch die vorangegangene Partialhydrolyse. Die Ergebnisse der Oxalsäurehydrolyse, Solvolyse und NMR-Analyse lassen alle auf eine Untereinheit im Polysaccharid von 13 Zuckermomeren schließen. Aus den gesammelten Informationen über die EPS von *S. aquatilis* wurde ein Strukturvorschlag erarbeitet (Abbildung 6.6-1). Bei diesem bleibt als einzige Ungewissheit die genaue Reihenfolge der Zucker in der Kette zurück. Die NMR-Daten lassen vermuten, dass N-Acetyl-Fukosamin sowohl in der Nähe einer Sulfatgruppe als auch neben einem unsubstituierten Neutralzucker liegen muss, es aber sonst eine möglichst hohe Durchmischung der Zucker gibt, um 13 anomere Kohlenstoffe zu erreichen. Des Weiteren ist bisher nicht gänzlich ausgeschlossen, dass die EPS einige Seitenketten tragen.

Bindungstyp	mol
β -1,3-Ara(<i>p</i>)	0,2
β -1,3,4-Ara(<i>p</i>)	5,0
α -1,3-Fuc(<i>p</i>)	4,3
α -1,3,4-Fuc(<i>p</i>)	1,6
α -1-FucNAc(<i>p</i>)	1,8
Sulfat	4,4

Tabelle 6.6-1: Molare Verteilung der Bindungstypen in EPS von *S. aquatilis*, berechnet aus der Neutralzuckerverteilung.

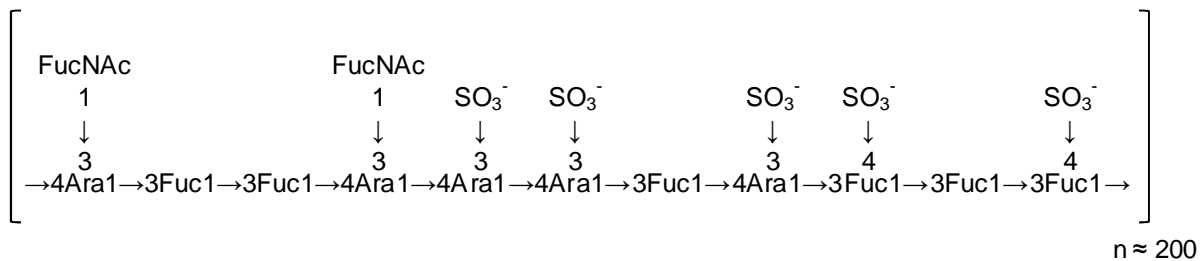


Abbildung 6.6-1: Mögliches Strukturmodell der EPS von *S. aquatilis*.

Die EPS von *S. pevalekii* boten eine Vielzahl von Bindungstypen bedingt durch die hohe Anzahl an Neutralzuckern. Dabei gestaltete sich die erfolgreiche Versuchsdurchführung einfacher als bei den EPS von *S. aquatilis*. An den EPS von *S. pevalekii* kann gezeigt werden, dass die Methylierung mit Dimsyl-Reagenz und NaOH-Aktivierung übereinstimmende Ergebnisse erzielt. Der Polysaccharidanteil der EPS von *S. pevalekii* weist einen überwiegend linearen Aufbau mit nur wenigen Verzweigungspunkten in Form von 1,2,6-Glukose, 1,3,4-Fukose und 1,3,4-Galaktose auf. Dabei liegt das Verhältnis von Verzweigungen zu terminalen Gruppen bei 0,9 für die Methylierung mit Dimsyl-Reagenz und bei 0,6 mit NaOH-Aktivierung, wodurch die Richtigkeit der Ergebnisse bestätigt wird. Trotz der Verzweigungspunkte ist dieses große Molekül mit einem Anteil an linearen Bindungstypen von 50-60% eindeutig langgestreckt, was

6.7 Protein-Analytik

Die Protein-Analytik ist das Äquivalent zur Polysaccharid-Analytik und ermöglicht Aussagen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Proteinanteils der EPS.

Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung des Proteingehaltes über den Stickstoffanteil der Probe ist zwar robuster, erfasst aber auch Stickstoff, der nicht aus Aminosäuren stammt. Da die EPS von *S. pevalekii* mit Glukosamin einen weiteren Stickstoffdonor beinhalten, mussten die gemessenen Stickstoffwerte rechnerisch korrigiert werden, um korrekte Endergebnisse zu erzielen (3.9.1.1). Nach diesem Vorgehen liegt der Proteingehalt in EPS von *S. pevalekii* bei $45,28 \pm 6,21\%$ (5.6). EPS aus zwei Kultivierungen sind dabei als abweichende Werte zu sehen: 201004-Sp-K2 und 201005-Sp-K k. Deren abweichendes Ergebnis basiert auf geringeren Stickstoffanteilen. Aber auch der Schwefelanteil bei 201005-Sp-K k weicht von Messungen anderer EPS ab (5.2.2). Bei beiden EPS bestätigt sich der geringere Proteingehalt im Ninhydrintest. Der festgestellte Proteingehalt in den EPS von *S. pevalekii* kann als hoch eingeschätzt werden (siehe auch Übersicht Tabelle 11.2-1). In mehreren cyanobakteriellen EPS waren zuvor Proteinanteile unterschiedlicher Menge gefunden worden. Wie auch die Untersuchungen von Hu et al. zeigten, scheinen proteinhaltige EPS zu dominieren [Hu et al., 2003]. Der höchste bisher gemessene Proteingehalt findet sich bei *Nostoc* sp. PCC 6310 (69,5%). Hohe Werte finden sich auch bei zwei zuvor untersuchten *Synechocystis* Arten, *Synechocystis* sp. PCC 6714 (altersabhängig 10-60%) und PCC 6803 (40%) [Pereira et al., 2009; Panoff et al., 1988]. Bei einer von Kawaguchi und Decho untersuchten *Synechocystis*-Art waren es allerdings nur 0,4% [Kawaguchi & Decho, 2000]. Die EPS von *S. aquatilis* weisen mit weniger als 1% bei drei durchgeführten Messmethoden einen niedrigen Proteingehalt auf (4.7). Der höhere Proteingehalt aus der Ninhydrin-Quantifizierung ist auf die Nachweisgrenze von ca. 5-10% bei gleichzeitig hohem Gehalt an Fukosamin und Messung ohne Aminosäurekorrektur zurückzuführen. Die Ergebnisse der Proteingehaltsberechnung aus den Ergebnissen der Elementaranalyse müssen bei *S. aquatilis* kritisch betrachtet werden, da der Faktor für die Gehaltsbestimmung von Fukosamin auf dem Stickstoffgehalt der Elementaranalyse basiert (4.2.1), wobei von proteinfreien EPS ausgegangen wurde. Somit findet sich hier ein Zirkelbezug in der Berechnung. Es ergab sich aber während der gesamten Arbeit kein Hinweis, dass die EPS von *S. aquatilis* Proteine enthalten könnten. Zusätzlich berichtete auch Venzke von einem Proteingehalt von nur 0,38% nach Aminosäurequantifizierung [Venzke, 2005]. Davon ausgehend, dass Cyanobakterien von der Gattung *Synechocystis* proteinhaltige oder proteinfreie EPS bilden, kann sowohl der hohe Proteinanteil von *S. pevalekii* als auch der niedrige Gehalt bei *S. aquatilis* als unauffällig betrachtet werden. Allerdings bemerkten De Philippis und Vincenzini, dass nicht in jedem Fall auszuschließen sei, dass es sich bei den

Proteinen um Verunreinigungen durch Zellyse handeln könnte [De Philippis & Vincenzini, 1998]. Sie wiesen aber auch darauf hin, dass ein geringer Anteil an Protein (1-3%) grundsätzlich in EPS vorhanden und nicht entfernbar sei. Generell denkbar ist auch eine Kopräzipitation eines Polypeptides bei *S. pevalekii* unter der Fällungsreaktion. Da allerdings für die EPS-Gewinnung von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* dasselbe Protokoll verwendet worden war, kann eine reine methodenbedingte Proteinverunreinigung ausgeschlossen werden.

Bei den EPS von *S. aquatilis* war ein leichter Unterschied im Proteinanteil in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, analog zum Sulfatgehalt (6.2), erkennbar, welcher aber auch auf eine unzureichende Entfernung von Dinatrium-EDTA während der Dialyse zurückgeführt werden könnte. Nach acht Tagen Wachstumszeit betrug der Wert 1,13 bis 5,09%, wobei er nach 22 Tagen bei weniger als 1% lag. Die zwei sehr hohen Werte der Kultivierung 201208-Sa-K k verweisen auf Substanzreste von Dinatrium-EDTA hin (siehe auch 6.1; 6.2).

Während der Proteingehalt in EPS von *S. aquatilis* unter einem Prozent lag, belief sich die Quantifizierung für *S. aquatilis* CAUP auf 32,9% und 25,7% bei zwei Kultivierungsansätzen sowie für *S. aquatilis* CCALA auf 21,2%. Diese Andersartigkeit der EPS von *S. aquatilis* CAUP und CCALA zeigt sich auch in anderen untersuchten Komponenten und steht für die genetischen Unterschiede der Arten.

Im Gegensatz zu *S. aquatilis* ergaben die Proteinquantifizierungen bei *S. pevalekii* über den Stickstoffgehalt, die Bestimmung mit Folin-Ciocalteu-Reagenz und die Bestimmung mit Coomassie Brilliantblau, keine übereinstimmenden Werte. Auch González López et al. beschrieben eine Abweichung der Ergebnisse für den Proteingehalt der Biomassen von *S. aquatilis* bei Bestimmung mit Folin-Ciocalteu-Reagenz verglichen bei Berechnung aus der Stickstoffmenge [González López et al., 2010]. Davon ausgehend, dass die Berechnung aus dem Stickstoffgehalt ein korrektes Ergebnis liefert, stellt sich die Frage nach der Ursache für die mangelnde Funktion der nasschemischen Versuche. Beide Reaktionen sind pH-abhängig [Kruger, 2002; Waterborg, 2002]. Besonders die Reaktion mit Folin-Ciocalteu-Reagenz kann in der Teilreaktion der Reduktion nur bei einem pH von 10 bis 10,5 durchgeführt werden [Waterborg, 2002]. Verunreinigungen sowie saure Gruppen im EPS- oder Proteinanteil stören demnach die Reaktion maßgeblich. Zusätzlich ist ein störender Effekt von Zuckern auf die Messung bekannt. Auch sind beide Reaktionen abhängig von der Aminosäurezusammensetzung. Bei der Reaktion mit Folin-Ciocalteu-Reagenz sind Tyrosin und Tryptophan an der Reaktion beteiligt, bei Coomassie Brilliantblau bindet der Farbstoff primär an Arginin und Lysin [Kruger, 2002; Waterborg, 2002]. Bei unterschiedlichen Konzentrationen dieser Aminosäure in den Proteinen der Probe und der Kalibriersubstanz kann immer nur von Näherungswerten ausgegangen werden. Die Komplexbildung mit Farbstoffen wie Coomassie Brilliantblau ist außerdem von der Beschaffenheit des untersuchten Proteins abhängig [Kruger, 2002]. Dabei ist die Reaktion erst ab einer Peptidgröße von 3 kDa durchführbar. Des Weiteren

handelt es sich bei dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau um geladene Moleküle, die in drei unterschiedlichen Ladungszuständen vorliegen können, wodurch ionische Ladungen in der Probe einen großen fördernden oder hinderlichen Einfluss auf die Protein-Farbstoff-Wechselwirkungen haben.

Die genaueste Methode ist, nach Waterborg, eine Quantifizierung der einzelnen Aminosäuren [Waterborg, 2002]. Da dieses aber nicht als Routinemethode geeignet ist, wurde auf die Quantifizierung der Aminogruppen nach Hydrolyse des Proteins mit Ninhydrin-Reagenz zurückgegriffen [Starcher, 2001]. Dabei war die Farbreaktion nicht von der Löslichkeit des Proteins abhängig und die Beschaffenheit des Proteins nicht ausschlaggebend für die Reaktion. Es muss allerdings beachtet werden, dass auch Aminosucker eine Färbung ergeben. Eine Korrektur des Ergebnisses um diese Nebenreaktion stellte sich erst ab einem Aminosuckeranteil von über 50% als notwendig heraus und hätte bei den EPS von *S. pevalekii* zu einer Überkorrektur geführt (5.6). Mit dieser Methode, der Quantifizierung über die Reaktion mit Ninhydrin nach Starcher, konnten mit einer nasschemischen Reaktion Ergebnisse erzielt werden, die dem wahren Wert der Berechnung aus dem Stickstoffgehalt ($45,28 \pm 6,21\%$) nah kamen ($34,33 \pm 11,27\%$). Wie auch bei der Sulfatbestimmung (6.2) hätte die Durchführung einer der zwei anderen nasschemischen Methode allein zu einem falschen Ergebnis und einer falschen Interpretation geführt. Auch hier ist es demnach empfehlenswert, nicht nur die in der Wissenschaft als Standardmethoden geführten Bestimmungen mit Folin-Ciocalteu und Coomassie Brilliantblau allein zu nutzen, sondern auch immer eine zweite Methode, wie die Elementaranalyse oder die Ninhydrinquantifizierung, anzuwenden.

Wie unter 6.1 vermutet, bestanden die Sp-Ausfällung und die daraus gewonnene Proteinfraction aus identischer Substanz. Neben der Überprüfung der Neutralzuckerzusammensetzung, ergab auch die Proteinquantifizierung ein heterogenes Ergebnis, welches keine endgültigen Aussagen zulässt.

Proteinzusammensetzung

Die zunächst durchgeführte HPTLC-Methode zur Aminosäurezusammensetzung bestätigte nicht nur das Vorkommen eines Proteinanteils, sondern gab erste Hinweise auf einen hohen Anteil saurer Aminosäuren (Asparagin- und Glutaminsäure) sowie auf die Aminosäure Alanin (5.6). Die anschließend durchgeführte Aminosäurequantifizierung bestätigt diese Hinweise. Der Proteinanteil der EPS von *S. pevalekii* besteht aus 21,85% sauren Aminosäuren, wobei Asparaginsäure einen etwas größeren Anteil ausmacht. Die weitere Aminosäurezusammensetzung zeigt keine Auffälligkeiten. Alanin ist, wie auch andere Aminosäuren mit ~7% vertreten, was auf eine mögliche Ergebnis-Verfälschung in der HPTLC-Methode durch die Detektion hindeutet. Die zwei Aminosäuren Serin und Threonin, welche an der Ausbildung O-glykosidischer Bindungen beteiligt wären, sind mit 6,91 und 8,31%

vorhanden. Es wurde zunächst vermutet, dass es unter der Hydrolyse für die Aminosäureanalytik zu einer Umwandlung von Asparagin, verantwortlich für die Ausbildung N-glykosidischer Bindungen, und Glutamin in Asparagin- und Glutaminsäure gekommen sein könnte und auf diese Weise der hohe Anteil saurer Aminosäuren nur ein Artefakt gewesen wäre. Die erneute Betrachtung des IR-Spektrums (Abbildung 5.3-1) der unveränderten EPS zeigt bestätigend eine Karbonsäurebande. Zusätzlich ergibt die Berechnung der konduktometrischen Sulfatbestimmung (5.2.5) einen Karbonsäuregehalt von $6,2 \pm 3,6\%$. 21,85% Asparagin- und Glutaminsäure im Proteinanteil bedeuteten umgerechnet 9,83% im gesamten EPS bzw. ausgedrückt als reine Karbonsäure 3,13%. Diese Werte liegen also im Bereich des konduktometrisch bestimmten Wertes. Dieses Ergebnis erklärt demnach auch die Retention der EPS in der IAC (5.7.1), obwohl keine Ladungsträger wie Sulfat oder Uronsäuren in größeren Mengen nachgewiesen werden konnten. Aus dem Wissen um den hohen Säuregehalt der EPS erklärte sich auch die schlechte Quantifizierbarkeit mittels der herkömmlichen nasschemischen Testsysteme (s.o.). Eine derartig charakteristische Zusammensetzung an Aminosäuren war auch von Flaibani et al. beschrieben worden [Flaibani et al., 1989]. Demnach besteht der Proteinanteil des Proteoglykans von *Nostoc calcicola* aus 20 bis 30% sauren Aminosäuren. Auch die Aminosäurezusammensetzung eines Proteoglykans aus der Schleimscheide von *Chlorogloeopsis* PCC 6912 zeigte einen hohen Anteil an Asparagin- und Glutaminsäure neben einem hohen Anteil Glycin, wohingegen bei *Microcystis aeruginosa* K-3A in den EPS neben Asparaginsäure Alanin die zweithäufigste Aminosäure ist [Schrader et al., 1982; Nakagawa et al., 1987]. Auch bei *Cyanospira capsulata* fanden sich hohe Anteil Asparagin- und Glutaminsäure (11,7 und 9,6%), aber auch Glycin und Alanin (je 12,0%) waren ebenso stark vertreten [Marra et al., 1990]. Bisher wurde angenommen, dass durch den Proteinanteil die Lipophilie der EPS und die Schleimstabilität, Quellung und Adhäsion verbessert werden (siehe auch 1.4.1) [De Philippis & Vincenzini, 1998]. Betrachtet man nun die hohe negative Ladung des Proteinanteils in *S. pevalekii*, stellt sich hier die Frage nach der Funktion und Funktionsfähigkeit. Dennoch argumentierten Flaibani et al. mit dem verbleibenden hohen Anteil hydrophober Aminosäuren mit 35-40%, welcher auch bei *S. pevalekii* 43,02% beträgt, um die Lipophilieerhöhung durch den Proteinanteil zu rechtfertigen. Eine aktuelle Veröffentlichung von Kovács et al. verdeutlichte, dass besonders der wasserabweisende Schutz und die räumliche Anordnung des Biofilms bei *Bacillus subtilis* von einem Protein mit amphiphilen Eigenschaften ausgehen [Kovács et al., 2012]. Betrachtet man diese Ergebnisse, liegt der Schluss nahe, dass ein hoher Anteil saurer Aminosäuren in dem mengenmäßig stark variierenden Proteinanteil cyanobakterieller EPS häufig ist. Grant und Tindall sowie Reed fassten zusammen, dass ein hoher Anteil saurer Aminosäuren bei Bakterien aus alkalischem Lebensraum und halophilen Organismen zu finden ist [Grant & Tindall, 1986; Reed, 1986]. Dabei konnte ein Anstieg des Anteils saurer Aminosäuren bei zunehmend

alkalischem pH-Wert beobachtet werden. Ionen des Mediums neutralisieren die Ladungen und schützen so vor elektrostatischer Abstoßung der einzelnen Moleküle und dem Zusammenbruch der äußeren Zellbereiche. Auf dieser Basis verwundert die Aminosäurezusammensetzung der Proteine cyanobakterieller EPS und im speziellen von *S. pevalekii* nicht, da Cyanobakterien überwiegend alkali- und halotolerante oder sogar alkaliphile Organismen sind (1.2). Betrachtet man die Zusammensetzung der Aminosäuren von Algen, so haben auch bei diesen die meisten einen hohen Anteil Asparagin- und Glutaminsäure [Fleurence, 1999]. Die Braunalge *Fucus* sp. enthält 22-44% saure Aminosäuren, Grünalgen der Gattung *Ulva* enthalten 26-32%. Im Vergleich sind es bei Rotalgen (*Palmaria palmata* und *Porphyra* sp.) nur bis zu 19%. Ein weiteres wichtiges pflanzliches Polysaccharid, Pektin, weist ebenfalls einen Proteinanteil mit anteilig viel Asparagin- und Glutaminsäure auf, sodass es sich bei den gefundenen sauren Proteinen nicht um eine Besonderheit aquatischer Organismen handelt [Anderson et al., 1987]. Eine hohe biologische Wertigkeit für die menschliche Ernährung besitzt Hühner-Vollei, mit seinem Hauptprotein Ovalbumin [Löffler & Petrides, 2003]. Dieses enthält nur 16% saure Aminosäuren [Fleurence, 1999]. Bei *S. pevalekii* fallen des Weiteren die hohen Anteile der essentiellen Aminosäuren Threonin, Valin, Leucin und Phenylalanin auf. Zwar fehlen die essentiellen Aminosäuren Methionin und Tryptophan vollständig; abgesehen davon sind, mit Ausnahme von Lysin, alle anderen essentiellen Aminosäuren in größerem Maße vertreten als im Ovalbumin. Dieses spricht für ein ernährungsphysiologisch wertvolles Protein.

Aufgrund des sehr geringen Proteinanteils in den EPS von *S. aquatilis* wurde hier auf eine erneute quantitative Bestimmung der Aminosäuren verzichtet. Dies war aber von Venzke durchgeführt worden [Venzke, 2005]. Die dabei bestimmten Konzentrationen waren sehr gering, doch auch hierbei hatten die sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure mit 10,5 und 21,1% den größten Anteil. Des Weiteren waren Prolin (15,8%), Serin (13,2%) und Glycin (7,9%) in größerem Umfang enthalten. Hierbei kann nicht, wie bei *S. pevalekii*, nachvollzogen werden, ob es sich im genuinen Protein um Asparagin bzw. Glutamin oder ihre Karbonsäuren handelte.

Folgt man den Gedanken, Kapsel- und Schleimscheiden-EPS enthielten mehr Protein als EPS von Schleim, müsste es sich bei den EPS von *S. pevalekii* um Bestandteile von Kapselschichten handeln, welche ebenfalls ins Medium übergehen können [Decho & Lopez, 1993; De Philippis & Vincenzini, 1998]. Gibt man den beschriebenen Faktoren der Alkali- und Halotoleranz durch saure Proteinstrukturen mehr Gewicht, spricht es für einen direkten Kontakt zur Zelloberfläche und somit für eine Kapsel. Auch die geringe gebildete EPS-Menge trotz guten Wachstums ist zu nennen. Dieses kann aber auch durch eine generell niedrige oder durch die Wachstumsbedingungen reduzierte Bildungsrate erklärt werden. Des Weiteren wurde allerdings für cyanobakterielle Kapseln eine scharfe Abgrenzung bei Färbung mit Tusche zur Umgebung angegeben (1.2), welche ebenfalls im mikroskopischen Bild von *S. pevalekii* und *S. aquatilis* beobachtet werden konnte (Abbildung 6.7-1). Abschließend kann diese Frage mit

den Ergebnissen dieser Arbeit aber nicht geklärt werden. Es ist lediglich klar, dass *S. pevalekii* eine Schleimkapsel besitzt.

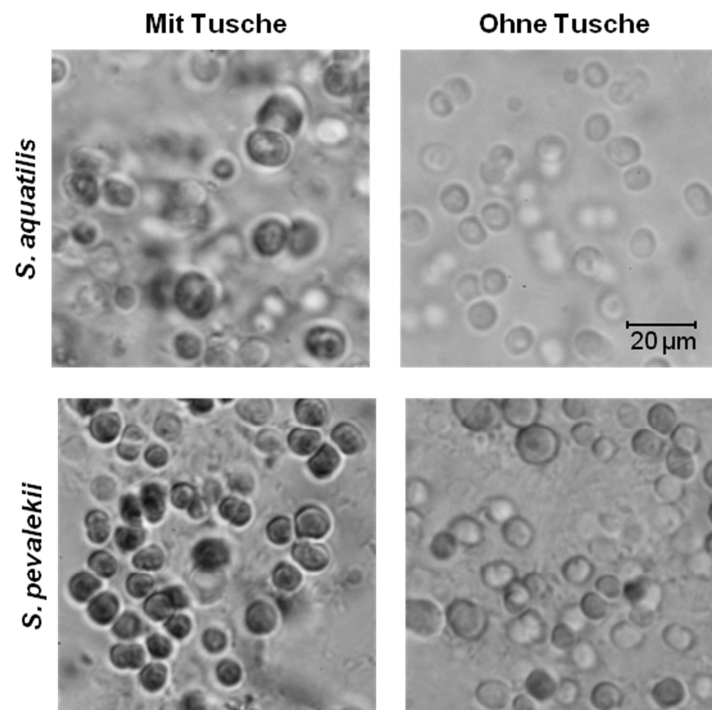


Abbildung 6.7-1: Mikroskopische Bilder der Zellen von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* mit und ohne Tuschefärbung.

6.8 Chromatographische Verfahren

Die chromatographischen Verfahren dienen der Auftrennung eines Gemisches von Polysacchariden in den EPS. Dabei können sich die trennenden Prinzipien und die Detektionsmethoden unterscheiden, sodass unterschiedliche Gesichtspunkte struktureller Aspekte der Polysaccharide betrachtet werden können.

Ionenaustauschchromatographie

Schon Li et al. fassten zusammen, dass cyanobakterielle EPS keine homogenen Produkte, sondern aus verschiedenen Polysacchariden zusammengesetzt sind [Li et al., 2001]. So überrascht es nicht, dass die Ionenaustauschchromatographie (IAC) bei den EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* jeweils eine Hauptfraktion mit mehreren kleineren Nebenfraktionen ergab (4.8.1; 5.7.1). Bei *S. aquatilis* handelt es sich um eine stärker geladene Fraktion mit Elution bei 1,5 molarer Natriumchloridlösung. Dabei sind die Sulfatgruppen die ausschließlichen Ladungsträger (6.2). Bei EPS von *S. pevalekii* handelt es sich um eine schwächer geladene Hauptfraktion, deren Ladungen dem Proteinanteil zugeordnet werden können (6.7). Das Elutionsprofil der EPS von *S. aquatilis* entspricht dem von Venzke beschriebenen [Venzke, 2005]. Unterschiede sind in dem Auftreten der Fraktionen F0 und F1a zu erkennen. Bei F0 handelt es sich um eine Überladung der Säule, da der Anteil gering ist und die Neutralzuckerzusammensetzung der Hauptfraktion entspricht. Bei F1a handelt es sich um eine in nur zwei Fällen auftretende Fraktion, deren Neutralzuckerzusammensetzung und Sulfatierungsgrad nicht mit der Hauptfraktion übereinstimmt. Ein hoher Glukosegehalt fand sich in Fraktion F2. Die Interaktion mit dem Säulenmaterial zeigt, dass diese Moleküle entweder ebenfalls sulfatiert sind oder Uronsäuren enthalten. Demnach kann es sich nicht um Speicherpolysaccharide handeln, da diese ungeladene Glykogen-Strukturen aufweisen [Bertocchi et al., 1990]. Im Vergleich mit den Ergebnissen Venzkes fällt auf, dass die Neutralzuckerzusammensetzung der Fraktion F2 der Hauptfraktion F3 entspricht und kaum Glukose enthält. Die weiteren Ergebnisse können als übereinstimmend angesehen werden. Bei der Fraktion F4 handelt es sich, der Neutralzuckerzusammensetzung nach, um ein Tailing der Hauptfraktion. Zusammenfassend bestehen die EPS von *S. aquatilis* also aus einem Hauptpolysaccharid (F0, F3 und F4; ca. 70%) und drei weiteren Polysacchariden (F1 ~16%, F1a ~0-10% und F2 ~13%). Fukosamin ist dabei in den Fraktionen des Hauptpolysaccharides und auch in Fraktion F1 enthalten. Diese beschriebene Fraktionenverteilung kann bei allen Messungen beobachtet werden und spricht so für eine konstante EPS-Zusammensetzung unabhängig von den untersuchten Kultivierungsbedingungen. Auch Panoff et al. beschrieben für zwei Arten der Gattung *Synechocystis* eine Zusammensetzung der EPS aus mehreren gleichzeitig gebildeten Polysacchariden und vermuteten eine Verschiebung der anteiligen Zusammensetzung dieser in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium [Panoff et al., 1988]. Keine

der Fraktionen der EPS von *S. aquatilis* weist einen alleinigen Proteingehalt auf. Die Untersuchung des Sulfatanteils der Fraktionen lässt keinen eindeutigen Schluss zu, da die zwei Messergebnisse für Hauptfraktion F3 stark voneinander abwichen. Die Tatsache der starken Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial spricht aber für einen Messfehler bei dem niedrigeren Ergebnis. Dieser kann durch einen zu hohen Rückstand an Natriumchlorid verursacht worden sein, wie auch die niedrigen Ausbeuten bei den Acetylierungsuntersuchungen zeigen.

Umfangreicher waren die IAC-Untersuchungen der EPS von *S. pevalekii* bedingt durch den ladungstragenden Proteinanteil. Ziel war es, neben der Polysaccharidzusammensetzung, herauszufinden, ob es sich um ein kovalent gebundenes Protein oder um Kopräzipitate handelt, wie sie von De Philippis & Vincenzini vermutet und von Bertocchi et al. beobachtet worden waren [De Philippis & Vincenzini, 1998; Bertocchi et al., 1990]. Zunächst kann festgestellt werden, dass die EPS aus einer Hauptfraktion, der Fraktion F2 (meist etwa 50%), bestehen, deren Neutralzuckerzusammensetzung mit derjenigen der Gesamt-EPS übereinstimmt. Diese Hauptfraktion kann durch feinere Abstufungen in der Molarität des Elutionsmittels in drei Fraktionen aufgetrennt werden. Die weiteren Fraktionen (F1, F3 und F4) haben abweichende Neutralzuckerzusammensetzungen und werden so als weitere Polysaccharide der EPS identifiziert. Bei den anderen Polysacchariden fällt besonders das Fehlen einzelner Zucker auf. Glukosamin ist nur in der Hauptfraktion vorhanden. Ein identisches Elutionsprofil zeigt die Sp-Ausfällung. Wie auch die EPS von *S. aquatilis* zeigten die EPS von *S. pevalekii* keine Veränderungen des Elutionsmusters in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen. Zunächst war unsicher, ob es sich bei dem Ladungsträger tatsächlich um das Protein handelte. Es konnte aber gezeigt werden, dass es sich nicht um Artefakte durch Molekülgrößenretention handelte, sondern um eine ionische Wechselwirkung, indem ein zweites Säulenmaterial mit schwächeren Ladungsträgern (DEAE-Sepharose) verwendet und ein Auswaschversuch durchgeführt worden war. Die Untersuchung der Fraktionen auf ihren Proteinanteil aber ergab, dass dieser parallel zur Hauptfraktion eluiert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass keine Fraktion, bei molaritätsabhängiger Fraktionensammlung, ausschließlich aus Protein oder Kohlenhydraten besteht. Des Weiteren war es nicht möglich, eine Abtrennung des Proteinanteils durch die Elution mit Harnstoff zu erreichen. Zusammenfassend indizieren mehrere Ergebnisse eine kovalente Bindung des Proteinanteils an die Polysaccharide. Erstens schließt sich eine methodenbedingte Kopräzipitation aus, da auch die EPS von *S. aquatilis* annähernd proteinfrei sind. Zweitens gelingt es weder durch Hitzedenaturierung, noch mit Natriumchloridlösungen unterschiedlicher Molarität oder Harnstofflösung in der IAC den Proteinanteil abzutrennen, zumal der Polysaccharidanteil selbst keine geladenen Gruppen enthält. Auch Flaibani et al. kamen in ihrer Arbeit zu dem Schluss, dass es sich bei den untersuchten Schleim-Fractionen aus *Nostoc calcicola* um nichttrennbare Kohlenhydrat-Peptid-Mischungen handelte und wählten zunächst den Begriff des „Proteoglykan Komplexes“ [Flaibani et al., 1989]. Sie beobachteten, in

Analogie zu dieser Arbeit, eine Koelution von Polysaccharid und Polypeptid in der IAC mit DEAE Sepharose und eine Kopräzipitation. Der ungeladene Zustand des Polysaccharidanteils sprach ebenfalls gegen ionische Wechselwirkungen. Berichtet wurde bisher von stabilen Protein-Polysaccharid-Komplexen über elektrostatische Wechselwirkungen [Williams, 2009]. Die Frage nach der chemischen Bindung zwischen Protein und Polysaccharid kann nicht abschließend geklärt werden. Die von Jürgensen und Weckesser gefundene Phosphodiester-Bindung zwischen Peptiden der Peptidoglykanschicht und einem Polysaccharid bei *Synechocystis* PCC 6714 konnte ausgeschlossen werden [Jürgensen & Weckesser, 1986], da im IR-Spektrum keine Phosphatbande erkennbar ist. Aufgrund des höheren Anteils an Serin und Threonin im Proteinanteil und dem starken Zusammenhalt ist eine O-glykosidische Bindung am wahrscheinlichsten.

Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung der IAC-Fraktionen werden im Teil der GPC-Untersuchungen diskutiert.

Da das Elutionsmuster der EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* stabil war und die Zusammensetzung der Gesamt-EPS kaum durch die kleineren Fraktionen beeinflusst wurden, wurde auch für die biologischen Testungen das Gesamt-EPS verwendet.

Gelpermeationschromatographie

Die Größenbestimmung über GPC ergab für die EPS von *S. aquatilis* ein absolutes Molekulargewicht von 1.806 ± 374 kDa sowie ein hydrodynamisches Volumen (hV) von 2.258 ± 98 kDa. Das Ergebnis des hVs lag außerhalb des kalibrierten Bereiches, wird aber auch durch die Ergebnisse der GPC-Analysen der IAC-Fraktionen widerlegt. Demnach hat die Hauptfraktion ein absolutes Molekulargewicht von nur 361 ± 33 kDa und ein hV von 865 ± 108 kDa. Dies zeigt, dass die EPS Komplexe bilden, bei denen sich eventuell 5 Moleküle zusammenlagern. Aufgrund des größeren Wertes des hVs sind die Polysaccharide eher von linearem Aufbau. Die bei der Isolierung der EPS von *S. aquatilis* auftretende Problematik schlechter Löslichkeit nach der Fällung in 80%igem Ethanol, konnte durch die Zugabe von Dinatrium-EDTA behoben werden. Scheinbar kommt es zur Komplexbildung von EPS mit zweiwertigen Ionen des Mediums (Mg^{2+} , Ca^{2+}). Auch Hu et al. beobachteten diese Löslichkeitsverbesserung und erklärten dieses, ebenso wie De Philippis et al., mit einer Komplexbildung mit Magnesium- oder Kalzium-Ionen [De Philippis et al., 1991; Hu et al., 2003]. Zusätzlich bestätigten De Philippis et al., die Rolle der Komplexierung in der Nährstoffanreicherung, da ein Magnesiummangel die EPS-Bildung anregt. Auch eine gesteigerte Stabilität der EPS-Matrix von Biofilmen und mikrobielle Matten durch Wechselwirkungen und Quervernetzungen über bivalenten Ionen wurde beschrieben [Higgins et al., 1997; Klock et al., 2007]. Hervorzuheben ist die definierte Zusammensetzung und die Stabilität der Molekülverbände der EPS von *S. aquatilis*, die sich an den für diese Anwendung

angemessene Standardabweichungen zeigen. Es wurde versucht auf verschiedene Arten durch Salzbildung diese komplexen Strukturen zu stören, aber nur als Pyridinium-Salz konnte diese auf Agglomerate von zwei Molekülen, möglicher Weise in Form einer Helix, reduziert werden. Die genaue Organisation ist für die untersuchten *Synechocystis*-EPS nicht geklärt. Es bestehen zwei mögliche Modelle. Das erste Modell beruht auf dem egg-box-Prinzip des Pektins, bei dem zwei Moleküle über Kalziumionen zu einer Einheit verbunden werden [Williams, 2009]. Bei dem zweiten Modell handelt es sich um Doppelhelices aus zwei Zuckerketten basierend auf Wasserstoffbrückenbindungen, die durch Kalzium ein stabiles Netzwerk bilden [Okajima et al., 2009; Williams, 2009]. Letzteres scheint am besten auf die EPS von *S. aquatilis* zuzutreffen.

Die weiteren IAC-Fraktionen der EPS von *S. aquatilis* zeigen Molekülgrößen in einem Bereich von 301 bis 512 kDa. Bei Venzke wurden nur die Gesamt-EPS auf ihre Molekülgröße hin untersucht [Venzke, 2005]. Die Ergebnisse lagen bei einem absoluten Molekulargewicht von 3,5 Mio. Da und einem hV um 1 Mio. Da. Diese entspricht nicht den in dieser Arbeit gefundenen Werten, sondern spiegelt vermutlich größere Agglomerate wieder.

Die Moleküle der EPS von *S. aquatilis* CAUP sind mit 568 kDa (hV) kleiner als die von *S. aquatilis*. Die Untersuchungen der EPS von *S. aquatilis* CCALA ergaben mehrere Polysaccharide mit 9.183, 774 und 21 kDa (je hV). Bei dem Größten handelt es sich, bedingt durch den hohen Uronsäuregehalt, vermutlich ebenfalls um Agglomerate. Der mittlere Wert liegt im Bereich des hV von *S. aquatilis*, der kleinste Wert darunter. Diese Ergebnisse bestätigen erneut, dass es sich bei den verschiedenen *S. aquatilis* Stämmen um genetisch verschiedene Organismen handelt.

Die EPS von *S. pevalekii* ergaben in der GPC-Analyse, anders als bei *S. aquatilis*, zwei Signale. Das absolute Molekulargewicht des ersten Signal konnte mit 2.326 ± 523 kDa ermittelt werden. Das hV dieses Signales schwankte zwischen 2 Mio. und 15 Mio. Da. Das hV des zweiten Signals beträgt 842 ± 56 kDa. Dessen absolutes Molekulargewicht liegt um 1,3 Mio. Da. Diese diffusen Ergebnisse können, wie bei *S. aquatilis*, auf eine Agglomeratbildung zurückgeführt werden, da die IAC-Hauptfraktion ein absolutes Molekulargewicht von 574 ± 63 kDa und ein hV von 893 ± 20 kDa aufweist. Dabei bilden die EPS von *S. pevalekii* Molekülverbände mit etwa 4 Molekülen, welche aber unterschiedliche tertiäre Strukturen annahmen, da sich nur so das schwankende hydrodynamische Volumen erklärt. Vergleicht man dieses mit den Ergebnissen von *S. aquatilis* fällt auf, dass dieses Cyanobakterium deutlich definiertere Molekülaggregate aus etwas kleineren Molekülen bildete. Auch bei *S. pevalekii* zeigen die Ergebnisse, dass die Moleküle eher von linearer langgestreckter Form sind. Vergleicht man die beiden Werte für das absolute Molekulargewicht – ca. 360 kDa für *S. aquatilis* und 574 kDa für *S. pevalekii* – mit Literaturdaten anderer cyanobakterieller EPS, so liegen diese im bekannten Bereich von 81 bis 2.000 kDa [Pereira et al., 2009]. Da aber die meisten untersuchten EPS über 1.000 kDa lagen, sind die EPS der in dieser Arbeit

untersuchten Stämmen eher als kleiner anzusehen. Wie eben beschrieben, zeigt sich aber auch die Neigung zur Bildung definierter Agglomerate, sodass die Literaturwerte, wie auch die Werte von Venzke, kritisch betrachtet werden sollten.

6.9 Biologische Aktivität

Im Bereich der biologischen Aktivität wurden die Einflüsse der EPS auf das humane Komplementsystem untersucht. Dabei sollte die bekannte Inhibition der EPS von *S. aquatilis* bestätigt und weitergehend untersucht werden. Im Zuge dessen wurde ein neues Testsystem basierend auf einem klinischen Test verwendet. Das für eine mögliche Anwendung entscheidende Kriterium der Toxizität der EPS wurde ebenfalls untersucht.

Die EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* zeigten keine antimikrobiellen Effekte bei Testung an dem gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*, den gram-negativen Spezies *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie dem Hefepilz *Candida maltosa* (4.9.1; 5.8.1). Potente Wirkstoffe zeigen bei 50 µg bereits eine Wirkung. Für die Testungen wurden deutlich höhere Konzentrationen von 100 und 200 µg verwendet, sodass eine Aktivität deutlich ausgeschlossen werden kann. Die Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die EPS keine toxischen Substanzen enthielten (vergl. 1.3), was sich auch darin manifestierte, dass die EPS keinen zytotoxischen Effekt auf humane Harnblasenkarzinomzellen ausübten (4.9.3; 5.8.3). Dieses Ergebnis ist besonders im Hinblick auf eine Anwendbarkeit der EPS als komplementbeeinflussende Substanzen wichtig.

Cyanobakterien als gram-negative Bakterien sind Träger von Lipopolysacchariden (LPS), welche das Komplementsystem deutlich beeinflussen [Sarma & Ward, 2011]. Um eine Verfälschung der Testergebnisse zu verhindern, wurde zunächst versucht, mögliche Endotoxin-Kontaminationen aus den Proben zu entfernen (3.11.2). Die dabei angewendete Säulenaufreinigung bietet allerdings keinen absoluten Schutz, da das Säulenmaterial mit Heptosen, KDO und dem Lipid-A Anteil der LPS interagiert [persönliche Korrespondenz mit der Firma Hyglos GmbH]. Es ist nicht bekannt, inwieweit die LPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* Heptosen und KDO enthalten, zumal diese nicht ubiquitär in cyanobakteriellen LPS vorhanden sind. Zusätzlich können cyanobakterielle LPS eine veränderte Lipid A-Struktur aufweisen (1.2) [Stewart et al., 2006]. Auch ein Test auf LPS-Kontamination zur Kontrolle der eingesetzten Probensubstanz mit dem LAL-Test (Limulus Amöbozyten Lysat) gäbe keine eindeutige Antwort, da, aufgrund veränderter Lipid-A Strukturen, dieser Test nicht mit gleicher Sensitivität wie bei LPS von gram-negativen Bakterien reagiert. Ebenfalls ist ein Nachweis von KDO aufgrund eines möglichen Fehlens dieser Komponente in den LPS nicht aussagekräftig. Allerdings wird diese Unsicherheit der erfolgreichen Probenaufreinigung von zwei Aspekten nivelliert. Zum einen weisen cyanobakterielle LPS eine deutlich schwächere biologische Aktivität auf als LPS gram-negativer Bakterien. Zum anderen wirken LPS als Komplementaktivatoren, speziell im alternativen Weg [Stewart et al., 2006; Sarma & Ward, 2011]. Die beobachtete Reaktion der EPS von *S. aquatilis* ist allerdings eine schwache Hemmung des alternativen Weges (4.9.2).

Letztendlich wurde versucht, eine mögliche Kontamination soweit möglich zu reduzieren, und die Ergebnisse sprechen für endotoxinarmes eingesetztes Probenmaterial.

Die Testung des Einflusses auf das Komplementsystem erfolgte nicht über den üblicherweise verwendeten CH50-Test, welcher in der Lyse von Erythrozyten seinen Endpunkt setzt, sondern über die Quantifizierung des Membranangriffskomplexes (MAK) in einem ELISA-Testsystem (3.11.2). Die Etablierung dieses neuartigen Testsystems erfolgte aufgrund allgemein bekannter Schwierigkeiten der Reproduzierbarkeit und Robustheit des CH50-Tests sowie im Hinblick auf eine effektivere, stabilere und einfachere Testmethode [Harboe et al., 2011; Tudoran & Kirschfink, 2012]. Bereits Venzke konnte, noch mit dem CH50-Testsystem, an EPS von *S. aquatilis* eine potente Inhibition des klassischen Komplementweges beobachten [Venzke, 2005]. Auch im neuen ELISA-Testsystem bestätigt sich diese Beobachtung (4.9.2). Die mittlere inhibitorische Konzentration (der IC_{50} -Wert) liegt dabei bei 0,29 $\mu\text{g/ml}$ und somit um den Faktor 10 höher als bei Venzke. Diese Differenz der Ergebnisse kann hauptsächlich mit dem neuen Testsystem begründet werden, welches nicht die Wirksamkeit des MAK misst, sondern die MAK-Menge spezifisch quantifiziert. Eine Hemmung der Komplementaktivität kann auch durch eine Aktivierung und anschließenden Zerfall sowie Verbrauch aktivierter Faktoren vorgetäuscht werden [Alban et al., 2002]. Dieses konnte in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da eine Verkürzung der Inkubationszeit im ELISA-Test eine konstant niedrige Aktivität zeigte. Daher kann ein reverser Effekt durch eine Komplementsystemaktivierung einhergehend mit dem Zerfall von Faktoren ausgeschlossen werden. Auch Venzke konnte dieses bereits ausschließen. Der IC_{50} -Wert der EPS von *S. aquatilis* mit 0,29 $\mu\text{l/ml}$ zeugt von einer sehr hohen Potenz. Der Vergleich mit anderen Komplementinhibitoren zeigt sich dieses deutlich: *Nostoc commune* (EPS, saure Fraktion) ca. 80 $\mu\text{g/ml}$, unfraktioniertes Heparin 20 $\mu\text{g/ml}$, Fukoidan (Fraktion 2) 3 $\mu\text{g/ml}$ [Brüll et al., 2000; Alban et al., 2002; Clément et al., 2010].

Venzke vermutete, die starke Inhibition würde von der Sulfatierung der EPS ausgehen. Um dieses weiter zu untersuchen, wurde ein EPS mit einem Restsulfatgehalt von nur 1,84% in das Testsystem gegeben. Es konnte eine vollständige Aufhebung der Hemmung beobachtet werden. Damit wird die funktionelle Rolle der Sulfatgruppen bei der Komplementhemmung des klassischen Weges bestätigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch der Polymerisationsgrad der Polysaccharide die Wirkung bedingt. Eine Verringerung des Polymerisationsgrades auf eine einzelne Untereinheit der EPS von etwa 13 Zuckern resultierte ebenfalls in einem vollständigen Wirkungsverlust. Demnach sind sowohl der Sulfatierungs- als auch der Polymerisationsgrad die wirkungsbestimmenden Strukturmerkmale. Dieses wurde auch von Groth et al. beobachtet [Groth et al., 2008]. Dabei konnten sie diesen Zusammenhang allerdings noch einer stärkeren Gewichtung unterziehen. Demnach ist der Einfluss der Molekülgröße bedeutender als der des Sulfatierungsgrades.

Es wurde auch überprüft, ob die Wirkung auf dem Entzug von Kalziumionen aus der Reaktion beruht. Wie bereits beschrieben, können die EPS von *S. aquatilis* Ca^{2+} -Ionen komplexieren (6.8). Der klassische und Lektin-abhängige Komplementweg ist im ersten Schritt der Kaskade, der Bildung des C1-Komplexes, kalziumabhängig und somit durch Kalziummangel hemmbar [Tissot et al., 2003; Tudoran & Kirschfink, 2012]. Ausgehend von einer Komplex-Stöchiometrie von 1:2 (Ca^{2+} :- SO_3^-) nach Uchisawa et al. und einem Sulfatgehalt von 20% ergab sich eine komplexierbare Kalziummenge von 0,033 $\mu\text{mol/l}$ [Uchisawa et al., 2001]. Der Zusatz dieser und darüber hinausgehender Mengen zu der Reaktion zeigten nur eine äußerst schwache Anhebung der Aktivität und somit keine Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit des Komplementsystems. Der Zusatz einer gleichen Menge von Dinatrium-EDTA (Komplex-Stöchiometrie 1: 1), einem Komplementinhibitor aufgrund Kalziumbindungsfähigkeit [Schultz & Zarco, 1970], zeigte keinen hemmenden Effekt, sodass die Kalziumkonzentration von 150 $\mu\text{mol/l}$ im Puffer einen deutlichen Kalziumüberschuss darstellt. Damit ist bewiesen, dass die Inhibition des klassischen Weges durch die EPS von *S. aquatilis* durch einen hemmenden Einfluss auf einen der beteiligten Faktoren entsteht. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es sich um einen selektiven Angriff der EPS auf den klassischen Weg handelt. Im alternativen Weg zeigten die EPS von *S. aquatilis* nur eine schwache Hemmung mit einem IC_{50} -Wert von 279,84 $\mu\text{g/ml}$. Das neue Testsystem des ELISAs ermöglichte erstmals eine Untersuchung des Einflusses der EPS auf den dritten Weg, den Lektin-Weg, des Komplementsystems. Hierbei war deutlich eine konzentrationsabhängige Hemmung erkennbar. Um Fehler der Verdünnungen auszuschließen, wurden die Werte anhand zweier Verdünnungsreihen ermittelt, ohne, dass ein Unterschied erkennbar war. Der so ermittelte Kurvenverlauf ergibt einen IC_{50} -Wert von 13,80 $\mu\text{g/ml}$. Der flache, lineare Kurvenverlauf indiziert eine irreversible Inhibition des Lektin-Weges des Komplementsystems. Es kann ein Einfluss auf eine der Komponenten der gemeinsamen Endstrecke aller drei Wege aufgrund der Nichtbeeinflussung des alternativen Weges des Komplementsystems ausgeschlossen werden. Die ebenfalls beobachtete Beeinflussung des Lektin-Weges könnte auf einen Einfluss auf die Faktoren C2 und C4 hindeuten, da diese sowohl am klassischen als auch am Lektin-Weg beteiligt sind. Eine Bindung an C4, und damit eine reduzierte Bildung der C3 Konvertase, ist auch für Heparin und Fukoidan beschrieben worden [Sahu & Pangburn, 1993; Tissot et al., 2003]. Die deutlich stärkere Inhibition im klassischen Weg legt eine Wechselwirkung mit dem Faktor C1 und seinen Komponenten nahe. Die Literaturdaten bestärken diese Theorie. Es ist bekannt, dass Fukoidan, ein sulfatiertes Fukan mit struktureller Ähnlichkeit zu den EPS von *S. aquatilis* (6.6), elektrostatische Wechselwirkungen mit den Lysin-Komponenten der Kollagenregion des Faktors C1q eingeht, sodass die Anlagerung des $\text{C1r}_2\text{-C1s}_2$ Tetramers gehemmt wird [Tissot et al., 2003]. Ebenso binden auch andere anionische Polysaccharide wie Heparin, Dermatansulfat und Carrageenan an C1q [Almeda et al., 1983; Baker et al., 1986]. Die Beobachtung, dass die

EPS von *S. aquatilis* durch die Desulfatierung die inhibitorische Wirkung vollständig verlieren, bekräftigt eine mögliche elektrostatische Wechselwirkung mit C1q. Auch EPS von *Nostoc commune* weisen eine Komplementaktivität auf [Brüll et al., 2000]. Dabei verstärkt sich die Wirkung durch enthaltene Uronsäuren. Diesen Berichten stehen die Ergebnisse von Groth et al. entgegen, die biologische Aktivitäten von sulfatierten Polysacchariden auf spezifische Wirkungen zurückführen und unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen ausschließen konnten [Groth et al., 2008].

Die EPS von *S. pevalekii* zeigten in allen drei Testsystemen nur eine schwache Hemmung mit IC_{50} -Werten um 430 $\mu\text{g/ml}$ und müssen daher als uninteressant für weitere Untersuchungen gewertet werden, obwohl auch sie durch den Proteinanteil eine negative Ladung tragen. Dadurch zeigen die Ergebnisse, dass die beobachtete Hemmung des klassischen Weges spezifische Effekte der EPS von *S. aquatilis* sind und weder Artefakte des Testsystems sind noch negative Ladungen für die Hemmung ausreichen.

Zusammenfassend muss der potente, inhibitorische Einfluss der EPS von *S. aquatilis* auf den klassischen Weg des humanen Komplementsystems hervorgehoben werden, dessen Wirkstärke sich auch bei Testung mit einem neuen, einfachen und reproduzierbaren Testsystem bestätigt.

6.10 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte viele detaillierte Informationen zur Struktur und Komplementwirkung der EPS von *S. aquatilis* und *S. pevalekii* sammeln. Dennoch bleiben einigen Fragen offen.

Im Themengebiet der Kultivierung konnte die Problematik der Braunfärbung des Kultivierungsmediums bei der Kultivierung von *S. aquatilis* nicht abschließend geklärt werden. Unklar waren die tatsächliche Ursache der Färbung ab einer bestimmten kritischen Zelldichte sowie die strukturelle Einordnung der braunen Substanz. Hier könnte versucht werden, mittels Extraktion und anschließender Strukturaufklärung Näheres zu erfahren. Der Auslöser für die Färbung könnte anschließend aufgrund der Struktur und nach weiteren Kultivierungsversuchen ergründet werden.

Die Neutralzuckeranalyse der EPS von *S. pevalekii* ergab einen nennenswerten Anteil unbekannter Zuckerstrukturen. Diese könnten durch weitergehende MS-Untersuchungen aufgeklärt und anschließend quantifiziert werden. Bei den EPS von *S. aquatilis* ist noch keine endgültige Ursache für den schwankenden Glukoseanteil bekannt. Zwar ist aufgeklärt, dass es sich um ein weiteres Polysaccharid in der EPS-Fraktion handelt, die Gründe für die inkonstante Bildung sind allerdings noch nicht geklärt.

Die Erstellung eines möglichen Strukturmodelles für die EPS von *S. aquatilis* konnte auf der Basis dieser Arbeit erfolgen. Die genaue Reihenfolge der Zuckerreste im Polysaccharid sowie das tatsächliche Fehlen von längeren Seitenketten müssen aufgeklärt werden. Dabei kommen zwei Techniken für weitere Untersuchungen in Frage: Zum einen eine detailliertere NMR-Analytik und zum anderen eine enzymatische Spaltung der EPS mit anschließender Analyse der Spaltprodukte.

Ebenfalls offen bleibt die Frage nach der genetischen Verwandtschaft und Identität der drei untersuchten *S. aquatilis* Sauvageau-Stämme aus unterschiedlichen Algensammlungen. Hilfreich wären genetische Untersuchungen (Restriktion und Sequenzierung).

Bei den EPS von *S. pevalekii* verbleiben noch mehr offene Fragen. Der erste Themenkomplex umfasst den Polysaccharidanteil mit seiner genauen Struktur und die Art der Verknüpfung mit dem Proteinanteil. Dieser Proteinanteil bildet den zweiten Themenkomplex mit der Frage nach der Aminosäuresequenz. Zunächst muss hierfür allerdings geklärt werden, ob es sich um ein einzelnes Protein oder mehrere kürzere Aminosäureketten handelt. Für diese offenen Fragen wäre die bereits beschriebene Nutzung von speziellen Enzymen mit nachfolgender Analyse der Spaltprodukte das aussichtsreichste Werkzeug.

Zuletzt verbleiben Fragen nach der genauen Wechselwirkung der EPS von *S. aquatilis* mit dem klassischen und dem Lektin-Weg des humanen Komplementsystems. In diesem Zusammenhang sind nicht nur Studien zu den beeinflussten Komplementfaktoren, sondern auch weitere Struktur-Wirkungs-Untersuchungen angedacht.

7 Zusammenfassung / Abstract

Unter den cyanobakteriellen Exopolysacchariden (EPS) stellen diejenigen von *Synechocystis aquatilis* Sauvageau SAG 90.79 eine Besonderheit dar. Zum ersten Mal wurde der Aminozucker α -N-Acetyl-Fukosamin(*p*) in cyanobakteriellem Material gefunden. Dieser befindet sich mit 18% in auch sonst bemerkenswerten EPS mit den Hauptkomponenten α -Fukose(*p*) (37%), β -Arabinose(*p*) (30%) und Glukose (um 11%). Zusätzlich sind diese EPS hochsulfatiert (18%). Basierend auf einer Vielzahl von weiteren Ergebnissen konnte ein Strukturmodell für die EPS von *S. aquatilis* erarbeitet werden (Abbildung 6.6-1).

Der Kohlenhydratanteil der EPS von *Synechocystis pevalekii* SAG 91.79 hingegen entspricht dem generellen charakteristischen Aufbau cyanobakterieller EPS mit 7 Monosacchariden, von denen Glukose den Hauptzucker stellt, und zusätzlich dem Aminozucker N-Acetyl-Glukosamin. Zwar ist dieses lineare Polysaccharide nicht sulfatiert, dafür aber vermutlich kovalent an einen großen Proteinanteil (45%) gebunden, der reich an Asparagin- und Glutaminsäure (22%) ist.

Bedingt durch die negativen Ladungen beider EPS konnten sie in der Ionenaustauschchromatographie untersucht werden. Es zeigte sich, dass die EPS jeweils überwiegend aus einem Hauptpolysaccharid bestehen. Dieses Hauptpolysaccharid von *S. aquatilis* ist ca. 360 kDa groß und bildet in der unfraktionierten Form stabile Dimere und größere definierte Agglomerate über Ca^{2+} -Brücken, während der Polysaccharid-Protein-Komplex von *S. pevalekii* um 570 kDa groß ist und ungeordnet agglomeriert.

Bei den Kultivierungen beider Stämme ließ sich eine Abhängigkeit der EPS-Mengen von den gemessenen Zelldichten erkennen. Alle beobachteten Charakteristika der EPS sowie die gebildeten EPS-Mengen wurden in keinem größeren Maße von unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen beeinflusst.

Hingegen konnte gezeigt werden, dass die EPS zweier weiterer *Synechocystis aquatilis* Sauvageau-Kulturen anderer Algen-Sammlungen, namentlich CAUP A 801 und CCALA 189, eine grundlegend andere Zusammensetzung aufweisen als die EPS von *S. aquatilis* Sauvageau SAG 90.79.

Methoden der Desulfatierung und Methylierung bei den EPS von *S. aquatilis* sowie die Proteinbestimmung der EPS von *S. pevalekii* bedurften aufgrund der besonderen Eigenschaften der EPS einer umfassenden Entwicklung. Ebenso wurde eine neue, einfache und robuste Methode entwickelt, basierend auf einem ELISA-Testsystem der klinischen Diagnostik, um Einflüsse der EPS auf das humane Komplementsystem zu testen. Die EPS von *S. pevalekii* zeigten keinerlei stärkere Beeinflussung der Komplementaktivität. Mit dem neuen Testsystem konnte für die EPS von *S. aquatilis* zum ersten Mal eine Inhibition des Lektin-Weges beobachtet werden ($\text{IC}_{50} = 14 \mu\text{g/ml}$). Außerdem bestätigte sich die potente Inhibition

des klassischen Komplementweges ($IC_{50} = 0,3 \mu\text{g/ml}$). Als wirksamkeitsbestimmende Voraussetzungen für die Hemmung des klassischen Weges konnten ausreichende Molekülgröße und Sulfatierung nachgewiesen werden. Bei der beobachteten Hemmung handelt es sich um eine selektive Inhibition eines oder mehrerer Komplementfaktoren.

Abstract

The exopolysaccharides (EPS) from *Synechocystis aquatilis* Sauvageau SAG 90.79 are exceptional for cyanobacterial EPS. For the first time the amino sugar α -N-acetyl-fucosamine(*p*) was found in cyanobacterial material. It is present in the remarkable EPS from *S. aquatilis* with 18% besides α -fucose(*p*) (37%), β -arabinose(*p*) (30%) und glucose (about 11%). Additionally, these EPS are highly sulfated (18%). Via further results a structural model of EPS from *S. aquatilis* could be established (Abbildung 6.6-1).

The sugar moiety of EPS from *Synechocystis pevalekii* SAG 91.79 is characteristic as described for other cyanobacterial EPS consisting of 7 monosaccharides with glucose as main component and the amino sugar N-acetyl-glucosamine. This linear polysaccharide is not sulfated, but is probably covalently linked to a large quantity of protein (45%), containing high amounts of aspartic- and glutamic acid (22%).

Due to the negative charge both EPS could be fractionated by ion exchange chromatography. It could be shown that both EPS are composed of main polysaccharides respectively. The polysaccharide of *S. aquatilis* has a size of about 360 kDa and builds up stable dimers as well as well-defined agglomerates via Ca^{2+} -bridges. In contrast, the polysaccharide-protein-complex from *S. pevalekii* has a size of about 570 kDa and can agglomerate uncontrolled.

During cultivation of the two strains the dependence of the amount of EPS on maximal cell density was observed. All observed characteristics and the obtained amount of EPS are not considerably influenced by the conditions of cultivation.

However, it was shown that two further *Synechocystis aquatilis* Sauvageau-cultures from different culture collections, namely CAUP A 801 und CCALA 189, are of fundamental different composition of EPS compared to *S. aquatilis* Sauvageau SAG 90.79.

For desulfation and methylation analysis of EPS from *S. aquatilis* as well as for the quantification of the protein moiety in EPS from *S. pevalekii* specific methods had to be developed due to their special structures. Also a new, simple and robust method for testing the influence of EPS on the human complement system was developed based on an ELISA-testsystem from clinical routine diagnostics. The EPS from *S. pevalekii* had no influence on any of the complement pathways. With the new testsystem for EPS from *S. aquatilis* an inhibition of

the lectin pathway was observed for the first time ($IC_{50} = 14 \mu\text{g/ml}$), and the potent inhibition of the classical pathway could be confirmed ($IC_{50} 0,3 = \mu\text{g/ml}$). Sufficient molecular size and degree of sulfation are important structural elements for complement inhibitory activity. Inhibition is the result of the selective inhibition of one or more complement factors.

8 Literaturverzeichnis

Adams D. G. (2000)

Symbiotic interactions.

In: Whitton B.A., Potts M. (ed) *The ecology of cyanobacteria*.

Kluwer Academic Publishers, Dordrecht [u.a.], pp 523–561.

Akiyama K., Kawazu K., Kobayashi A. (1995)

A novel method for chemo-enzymatic synthesis of elicitor-active chitosan oligomers and partially N-deacetylated chitin oligomers using N-acylated chitotrioses as substrates in a lysozyme-catalyzed transglycosylation reaction system.

Carbohydrate Research 279:151–160.

Alban S. (1993)

Synthese und physiologische Testung neuartiger Heparinoide.

Dissertation, Regensburg.

Alban S., Classen B., Brunner G., Blaschek W. (2002)

Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin.

Planta Medica 68:1118–1124.

Alban S., Franz G. (1994)

Gas-liquid chromatography-mass spectrometry analysis of anticoagulant active curdlan sulfates.

Seminars in Thrombosis and Hemostasis 20:152–158.

Allen M. S. (2002)

Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Thauera* strain MZ1T and its role in flocculation.

Dissertation, Knoxville.

Almeda S., Rosenberg R. D., Bing D. H. (1983)

The binding properties of human complement component C1q. Interaction with mucopolysaccharides.

The Journal of Biological Chemistry 258:785–791.

Anderson D. M. W., Mc Dougall F. J., Mc Nab C. G. A. (1987)

Differences between the amino acid compositions of apple and various citrus pectins.

Food Hydrocolloids (Food Hydrocolloids) 1:243–246.

Arp G., Reimer A., Reitner J. (1999)

Calcification in cyanobacterial biofilms of alkaline salt lakes.

European Journal of Phycology 34:393–403.

Baker K. C., Nicklin S., Miller K. (1986)

The role of carrageenan in complement activation.

Food and Chemical Toxicology 24:891–895.

Bano A., Siddiqui P. J. A. (2004)

Characterization of five marine cyanobacterial species with respect to their pH and salinity requirements.

Pakistan Journal of Botany 36:133–143.

Berman-Frank I., Rosenberg G., Levitan O., Haramaty L., Mari X. (2007)

Coupling between autocatalytic cell death and transparent exopolymeric particle production in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*.

Environmental Microbiology 9:1415–1422.

Bertocchi C., Navarini L., Cesàro A. (1990)

Review paper: Polysaccharides from cyanobacteria.

Carbohydrate Polymers 12:127–153.

- Bilan M. I.**, Grachev A. A., Ustuzhanina N. E., Shashkov A. S., Nifantiev N. E., Usov A. I. (2004)
A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L.
Carbohydrate Research 339:511–517.
- Bilan M. I.**, Zakharova A. N., Grachev A. A., Shashkov A. S., Nifantiev N. E., Usov A. I. (2007)
Polysaccharides of algae: 60. fucoidan from the pacific brown alga *Analipus japonicus* (Harv.) Winne (Ectocarpales, Scytosiphonaceae).
Russian Journal of Bioorganic Chemistry 33:38–46.
- Bilan M. I.**, Vinogradova E. V., Tsvetkova E. A., Grachev A. A., Shashkov A. S., Nifantiev N. E., Usov A. I. (2008)
A sulfated glucuronofucan containing both fucofuranose and Fukopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis*.
Carbohydrate Research 343:2605–2612.
- Binder W. (1999)**
Isolierung, Reinigung und Analytik von Lipopolysacchariden (LPS) aus Cyanobakterien der Gattung *Spirulina*.
Dissertation, Kiel.
- Blakeney A. B.**, Harris P. J., Henry R. J., Stone A. B. (1983)
A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis.
Carbohydrate Research 113:291–299.
- Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. (1973)**
New method for quantitative determination of uronic acids.
Analytical Biochemistry 54:484–489.
- Bradford M. M. (1976)**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Analytical Biochemistry 72:248–254.
- Brennan L., Owende P. (2010)**
Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.
Renewable and Sustainable Energy Reviews 14:557–577.
- Bresinsky A.**, Körner C., Kadereit J. W., Neuhaus G., Sonnewald U. (2008)
Strasburger. Lehrbuch der Botanik, 36th edn.
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Heidelberg.
- Brüll L. P.**, Huang Z., Thomas-Oates J. E., Smestad Paulsen B. (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 36:871–881.
- Burja A. M.**, Benaigs B., Abou-Mansour E., Burgess J. G., Wright P. C. (2001)
Marine cyanobacteria - a prolific source of natural products.
Tetrahedron 57:9347–9377.
- Casu B., Gennaro U. (1975)**
A conductimetric method for the determination of sulphate and carboxyl groups in heparin and other mucopolysaccharides.
Carbohydrate Research 39:168–176.
- Ciancia M.**, Quintana I., Vizcargüénaga M. I., Kasulin L., de Dios A., Estevez J. M., Cerezo A. S. (2007)
Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis.
International Journal of Biological Macromolecules 41:641–649.

Ciucanu I., Kerek F. (1984)

A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates.
Carbohydrate Research 131:209–217.

Classen B., Blaschek W. (2002)

An arabinogalactan-protein from cell culture of *Malva sylvestris*.
Planta Medica 68:232–236.

Clément M.-J., Tissot B., Chevotot L., Adjadj E., Du Y., Curmi P. A., Daniel R. (2010)

NMR characterization and molecular modeling of fucoidan showing the importance of oligosaccharide branching in its anticomplementary activity.
Glycobiology 20:883–894.

Collins P. M., Ferrier R. J. (1995)

Monosachharides - Their chemistry and their roles in natural products.
John Wiley & Sons Ltd, West Sussex.

Cragg G. M., Grothaus P. G., Newman D. J. (2012)

Natural products in drug discovery: Recent advances.
In: Cechinel-Filho V. (ed) *Plant Bioactives and Drug discovery: Principles, practice, and perspectives*.
John Wiley & Sons Ltd

Craigie J. S., Wen Z. C., van der Meer J. P. (1984)

Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp.
Botanica Marina 27:55–61.

Dechow A. W., Lopez G. R. (1993)

Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on trophic relationships.
Limnology and Oceanography 38(8):1633-1645.

de Philippis R., Sili C., Tassinato G., Vincenzini M., Materassi R. (1991)

Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulata*.
Bioresource Technology 38:101–104.

de Philippis R., Margheri M. C., Pelosi E., Ventura S. (1993)

Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat.
Journal of Applied Phycology 5:387–394.

de Philippis R., Sili C., Paperi, R., Vincenzini M. (2001)

Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review.
Journal of Applied Phycology 13:293-299.

de Philippis R., Colica G., Micheletti E. (2011)

Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process.
Applied Microbiology and Biotechnology 92:697–708.

de Philippis R., Vincenzini M. (1998)

Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible application.
FEMS Microbiology Reviews 22:151–175.

Deshnium P., Paithoonrangsarid K., Suphatrakul A., Meesapyodsuk D., Tanticharoen M., Cheevadhanarak S. (2000)

Temperature-independent and -dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438).
FEMS Microbiology Letters 184:207–213.

- DuBois M.**, Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956)
Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
Analytical Chemistry 28:350–356.
- Ducat D. C.**, Way J. C., Silver P. A. (2011)
Engineering cyanobacteria to generate high-value products.
Trends in Biotechnology 29:95–103.
- Dudkowiak A.**, Olejarz B., Lukasiwicz J., Banaszek J., Sikora J., Wiktorowicz K. (2011)
Heavy metals effect on cyanobacteria *Synechocystis aquatilis* study using absorption, fluorescence, flow cytometry, and photothermal measurements.
International Journal of Thermophysics 32:762–773.
- Ehrnthaller C.**, Ignatius A., Gebhard F., Huber-Lang M. (2011)
New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system.
Molecular Medicine 17:317–329.
- Eisenbrand G.** (2008)
Microcystins in algae products used as food supplements: opinion of the senate commission on food safety (SKLM) of the German research foundation (DFG) - (shortened version).
Molecular Nutrition & Food Research 52:735–736.
- Filali Mouhim R.**, Cornet J.-F., Fontanet T., Fournet B., Dubertret G. (1993)
Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*.
Biotechnology Letters 15:567–572.
- Finne J., Rauvala H.** (1977)
Determination (by methylation analysis) of the substitution pattern of 2-amino-2-deoxyhexitols obtained from O-glycosylic carbohydrate units of glycoproteins.
Carbohydrate Research 58:57–64.
- Fischer D.** (1996)
Untersuchungen über den Einfluss von Züchtungsfaktoren auf die Bildung, Zusammensetzung und das rheologische Verhalten der Exopolysaccharide ausgewählter Cyanobakterien (Blualgen).
Dissertation, Kiel.
- Flaibani A.**, Olsen Y., Painter T. J. (1989)
Polysaccharides in desert reclamation: compositions of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae.
Carbohydrate Research 190:235–248.
- Fleurence J.** (1999)
Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses.
Trends in Food Science & Technology (Trends in Food Science & Technology) 10:25–28.
- Fournier J. M.**, Hannon K., Moreau M., Karakawa W. W., Vann W. F. (1987)
Isolation of type 5 capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus*.
Annales de l'Institut Pasteur. Microbiology 138:561–567.
- Fry S. C.** (1988)
The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis.
Longman Scientific & Technical, Harlow, Essex.
- Gantar M., Svirčev Z.** (2008)
Microalgae and cyanobacteria: Food for thought.
Journal of Phycology 44:260–268.

- Garozzo D.**, Impallomeni G., Spina E., Sturiale L. (1998)
The structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulata*.
Carbohydrate Research 307:113–124.
- Gleeson P. A., Clarke A. E. (1979)**
Structural studies on the major component of *Gladiolus* style mucilage, an arabinogalactan-protein.
The Biochemical Journal 181:607–621.
- Gloaguen V.**, Morvan H., Hoffmann L. (1995)
Released and capsular polysaccharides of Oscillatoriaceae (Cyanophyceae, Cyanobacteria).
Archiv fuer Hydrobiologie, Supplementband 109:53–69.
- Glushka J. N.**, Terrell M., York W. S., O'Neill M. A., Gucwa A., Darvill A. G., Albersheim P., Prestegard J. H. (2003)
Primary structure of the 2-O-methyl-alpha-L-fucose-containing side chain of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan II.
Carbohydrate Research 338:341–352.
- Göllner E. M.**, Blaschek W., Classen B. (2010)
Structural investigations on arabinogalactan-protein from wheat, isolated with Yariv reagent.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 58:3621–3626.
- Göllner E. M.**, Utermoehlen J., Kramer R., Classen B. (2011)
Structure of arabinogalactan from *Larix laricina* and its reactivity with antibodies directed against type-II-arabinogalactans.
Carbohydrate Polymers 86:1739–1744.
- González López C. V.**, del Carmen Cerón García M., Acién Fernández F. G., S. A. Bustos, Chisti Y., Sevilla J. M. F. (2010)
Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass.
Bioresource Technology 101:7587–7591.
- Grant W. D., Tindall B. J. (1986)**
The alkaline saline environment.
In: Herbert R. A., Codd G. A. (ed) *Microbes in extreme environments*.
Academic Press, Orlando, Florida, pp 25–54.
- Grobbelaar J. U., Kurano N. (2003)**
Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation.
Journal of Applied Phycology 15:212–226.
- Groth I.**, Grunewald N., Alban S (2008)
Pharmacological profiles of animal- and nonanimal-derived sulfated polysaccharides - comparison of unfractionated heparin, the semisynthetic glucan sulfate PS3, and the sulfated polysaccharide fraction isolated from *Delesseria sanguinea*.
Glycobiology 19(4):408–417.
- Habib M. A. B.**, Huntington T. C., Hasan M. R. (2008)
A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish.
FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1034.
- Hakomo S. I. (1964)**
A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide.
Journal of Biochemistry 55:205–208.

- Harboe M.,** Thorgersen E. B., Mollnes T. E. (2011)
Advances in assay of complement function and activation.
Advanced Drug Delivery Reviews 63:976–987.
- Harris P. J.,** Henry R. J., Blakeney A. B., Stone B. A. (1984)
An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides.
Carbohydrate Research 127:59–73.
- Higgins M. J., Novak J. T. (1997)**
Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation.
Journal of Environmental Engineering May 1997:479–485.
- Hoiczuk E., Hansel A. (2000)**
Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope.
Journal of Bacteriology 182:1191–1199.
- Hu C.,** Liua Y., Smestad Paulsen B., Petersenc D., Klaveness D. (2003)
Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain.
Carbohydrate Polymers 54:33–42.
- Huang P.,** Kong Y., Li Z., Gao F., Cui D. (2010)
Copper selenide nanosnakes: Bovine serum albumin-assisted room temperature controllable synthesis and characterization.
Nanoscale Research Letters 5:949–956.
- Jindal N.,** Singh D. P., Khattar J. I. S. (2011)
Kinetics and physico-chemical characterization of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Oscillatoria formosa*.
World Journal of Microbiology and Biotechnology 27:2139–2146.
- Jones C. S., Mayfield S. P. (2012)**
Algae biofuels: Versatility for the future of bioenergy.
Current Opinion in Biotechnology 23:346–351.
- Junge A. (2008)**
Isolierung und Charakterisierung extrazellulärer Polysaccharide aus Cyanobakterienkulturen.
Diplomarbeit, Greifswald.
- Jürgens U. J., Weckesser J. (1986)**
Polysaccharide covalently linked to the peptidoglycan of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6714.
Journal of Bacteriology 168:568–573.
- Kamjunke N.,** Köhler B., Wannicke N., Tittel J. (2008)
Algae as competitors for glucose with heterotrophic bacteria.
Journal of Phycology 44:616–623.
- Kantor T. G., Schubert M. (1957)**
A Method for the desulfation of chondroitin sulfate.
Journal of the American Chemistry Society 79.
- Karácsonyi S.,** Kovácik V., Alfoldi J. K. M. (1984)
Chemical and ¹³C-N.M.R studies of an arabinogalactan from *Larix sibirica* L..
Carbohydrate Research 134:265–274.
- Kawaguchi T., Decho A. W. (2000)**
Biochemical characterization of cyanobacterial extracellular polymers (EPS) from modern marine dtromatolites (Bahamas).
Preparative Biochemistry and Biotechnology 30(4):321-330.

Keeling P. J. (2004)

Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts.
American Journal of Botany 91:1481–1493.

Kim J. S., Reuhs B. L., Michon F., Kaiser R. E., Arumugham R. G. (2006)

Addition of glycerol for improved methylation linkage analysis of polysaccharides.
Carbohydrate Research 341:1061–1064.

Kim H. W., Vannela R., Zhou C., Harto C., Rittmann B. E. (2010)

Photoautotrophic nutrient utilization and limitation during semi-continuous growth of *Synechocystis* sp. PCC6803.
Biotechnology and Bioengineering 106:553–563.

Kirschfink M., Mollnes T. E. (2003)

Modern complement analysis.
Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 10:982–989.

Kjeldahl J. (1883)

Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern.
Zeitschrift für Analytische Chemie:366–382.

Klock J.-H., Wieland A., Seifert R., Michaelis W. (2007)

Extracellular polymeric substances (EPS) from cyanobacterial mats: Characterisation and isolation method optimisation.
Marine Biology 152:1077–1085.

Knoll A. H. (2008)

Cyanobacteria and earth history.
In: Herrero A., Flores E. (ed) *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Ecolution*.
Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp 1–19.

Kolender A. A., Matulewicz M. C. (2004)

Desulfation of sulfated galactans with chlorotrimethylsilane. Characterization of beta-carrageenan by ¹H NMR spectroscopy.
Chinese Journal of Oceanology and Limnology 339:1619–1629.

Korelusová J., Kaštovský J., Komárek J. (2009)

Heterogeneity of the cyanobacterial genus *Synechocystis* and description of a new genus, *Geminocystis*.
Journal of Phycology 45:928-937.

Kovács Á. T., van Gestel J., Kuipers O. P. (2012)

The protective layer of biofilm: a repellent function for a new class of amphiphilic proteins.
Molecular Microbiology 85:8–11.

Kruger N. J. (2002)

The Bradford method for protein quantitation.
In: Walker J.M. (ed) *The Protein Protocols Handbook*.
Human Press Inc., Totowa (New Jersey), pp 15–21.

Leão P. N., Engene N., Antunes A., Gerwick W. H., Vasconcelos V. (2012)

The chemical ecology of cyanobacteria.
Natural Product Reports 29:372–391.

Li P., Harding S. E., Liu Z. (2001)

Cyanobacterial exopolysaccharides: Their nature and potential biotechnological applications.
Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 18:375-404.

Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. (2008)

Fucoidan: Structure and bioactivity.
Molecules 13:1671–1695.

- Liberton M.**, Howard Berg R., Heuser J., Roth R., Pakrasi H. B. (2006)
Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803.
Protoplasma 227:129–138.
- Lijour Y.**, Gentric E., Deslandes E., Guezennec J. (1994)
Estimation of the sulfate content of hydrothermal vent bacterial polysaccharides by Fourier transform infrared spectroscopy.
Analytical Biochemistry 220:244–248.
- Liu H., Scott P. M. (2012)**
Determination of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in algal food supplements.
Food Additives and Contaminants 28:786–790.
- Löffler G., Petrides P. E. (2003)**
Biochemie und Pathobiochemie, 7th edn.
Springer, Berlin [u.a.].
- Lowry O. H.**, Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
The Journal of Biological Chemistry 193:265–275.
- Machado I. M. P., Atsumi S. (2012)**
Cyanobacterial biofuel production.
Journal of Biotechnology 162(1):50-56.
- Makrides S. C. (1998)**
Therapeutic inhibition of the complement system.
Pharmacological Reviews 50:59–87.
- Marra M.**, Palmeri A., Ballio A., Segre A., Slodki M. E. (1990)
Structural characterization of the exocellular polysaccharide from *Cyanospira capsulata*.
Carbohydrate Research 197:338–44.
- Martin K.**, Stirnberg M., Eisenhut M. (2006)
Osmotic stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803: Low tolerance towards nonionic osmotic stress results from a lacking activation of glucosylglycerol accumulation.
Microbiology 152:2023–2030.
- Martínez L.**, Morán A., García A. I. (2012)
Effect of light on *Synechocystis* sp. and modelling of its growth rate as a response to average irradiance.
Journal of Applied Phycology 24:125–134.
- Masuko T.**, Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S., Lee Y. C. (2005)
Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format.
Analytical Biochemistry 339:69–72.
- Matulova M.**, Nouaille R., Capek P., Péan M., Forano E., Delort A.-M. (2005)
Degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: A liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study.
Applied and environmental microbiology 71:1247–1253.
- Mayer C.**, Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J., Flemming H. C. (1999)
The role of intermolecular interactions: Studies on model systems for bacterial biofilms.
International Journal of Biological Macromolecules 26:3–16.
- McComb E. A., Mc Cready R. M. (1957)**
Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers - Hydroxamic acid reaction.
Analytical Chemistry 29:819–821.

- McConnaughey T. A., Whelan J. F. (1997)**
Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake.
Earth-Science Reviews 42:95–117.
- McLafferty F. W., Turecek F. (1995)**
Interpretation von Massenspektren.
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Medgyes A., Farkas E., Lipták A., Pozsgay V. (1997)**
Synthesis of the monosaccharide units of the O-specific polysaccharide of *Shigella sonnei*.
Tetrahedron 53:4159–4178.
- Mikkat S., Effmert U., Hagemann M. (1997)**
Uptake and use of the osmoprotective trehalose, glucosylglycerol, and sucrose by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803.
Archiv für Mikrobiologie 167:112–118.
- Miller I. J., Blunt J. W. (1998)**
Desulfation of algal galactans.
Carbohydrate Research 309:39–43.
- Montaser R., Luesch H. (2011)**
Marine natural products: a new wave of drugs?
Future Medicinal Chemistry 3(12):1475-1489.
- Mulvenna V., Dale K., Priestly B., Mueller U., Humpage A., Shaw G., Allinson G., Falconer I. (2012)**
Health risk assessment for cyanobacterial toxins in seafood.
International Journal of Environmental Research and Public Health 9:807–820.
- Muralitharan G., Thajuddin N. (2010)**
M13-based genotyping of marine cyanobacterial strains from the Indian subcontinent and maintained in the NFMC germplasm collection.
Journal of Applied Phycology 22:709–716.
- Nagasawa K., Inoue Y., Kamata T. (1977)**
Solvolytic desulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water or methanol.
Carbohydrate Research 58:47–55.
- Nagle V. L., Mhalsekar N. M., Jagtap T. G. (2010)**
Isolation, optimization and characterization of selected Cyanophycean members.
Indian Journal of Marine Sciences 39:212–218.
- Nakagawa M., Takamura Y., Yagi O. (1987)**
Isolation and characterization of the slime from a cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* K-3A.
Agricultural and Biological Chemistry 51:329–337.
- Nascimento S. M., de Feliciano Oliveira e Azevedo S. M. (1999)**
Changes in cellular components in a cyanobacterium (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*) subjected to different N/P ratios - An ecophysiological study.
Environmental Toxicology 14(1):37-34
- Nebesny E., Skalski J., Sroczyński A. (1989)**
Molekulare Struktur und physikalischchemische Eigenschaften von löslichen Stärken und Dextrinen.
Starch - Stärke 41:289–293.
- Nies D. H. (1999)**
Microbial heavy-metal resistance.
Applied Microbiology and Biotechnology 51:730–750.

- Okajima M. K.**, Kaneko D., Mitsumata T., Kaneko T., Watanabe K. (2009)
Cyanobacteria that produce megamolecules with efficient self-orientations.
Macromolecules 42:3057–3062.
- Okajima-Kaneko M.**, Ono M., Kabata K., Kaneko T. (2007)
Extraction of novel sulfated polysaccharides from *Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada, and its spectroscopic characterization.
Pure and Applied Chemistry 79:2039–2046.
- Okutani K.**, Tandavanitj, S. (1991)
Isolation and characterization of a fucosamin-containing polysaccharide from a marine strain of *Pseudomonas*.
Nippon Suisan Gakkaishi 57(11):2151-2156.
- Oren A. (2004)**
A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code.
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54:1895–1902.
- Oren A. (2010)**
Cyanobacterial systematics and nomenclature as featured in the International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy / International Journal of Systematic Bacteriology / International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61:10–15.
- Otero A., Vincenzini M. (2003)**
Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity.
Journal of Biotechnology 102:143–152.
- Ozturk S., Aslim B. (2009)**
Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress.
Environmental Science and Pollution Research International 17:595–602.
- Ozturk S., Aslim B., Suludere Z. (2009)**
Evaluation of chromium(VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition.
Bioresource Technology 100:5588–5593.
- Ozturk S., Aslim B., Suludere Z. (2010)**
Cadmium(II) sequestration characteristics by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition.
Bioresource Technology 101:9742–9748.
- Panda B., Jain P., Sharma L., Mallick N. (2006)**
Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803.
Bioresource Technology 97:1296–1301.
- Panoff J. M.**, Priem B., Morvan H., Joset F. (1988)
Sulphated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803 and 6714
Archiv für Microbiologie 150:558-563.
- Parikh A., Madamwar D. (2006)**
Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria.
Bioresource Technology 97:1822–1827.
- Pawlik B., Skowronski T. (1994)**
Transport and toxicity of cadmium: its regulation in the cyanobacterium *Synechocystis aquatilis*.
Environmental and Experimental Botany 34:225–233.

- Pawlik-Skowonska B.**, Kaczoroska R., Skowronski T. (1997)
The impact of inorganic tin on the planktonic cyanobacterium *Synechocystis aquatilis*:
The effect of pH and humic acid.
Environmental Pollution 97:65–69.
- Pereira S.**, Zille A., Micheletti E., Moradas-Ferreira P., de Philippis R., Tamagnini P. (2009)
Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors
and putative genes involved in their biosynthesis and assembly.
FEMS Microbiology Reviews 33:917–941.
- Plude J. L.**, Parker D. L., Schommer O. J., Timmerman R. J., Hagstrom S. A., Joers J. M.,
Hnasko R. (1991)
Chemical characterization of polysaccharide from the slime layer of the cyanobacterium
Microcystis flos-aquae C3-40.
Applied and environmental microbiology 57:1696–1700.
- Pohl P.**, Kohlhase M., Krautwurst S., Baasch K.-H. (1987)
An inexpensive inorganic medium for the mass cultivation of freshwater microalgae.
Phytochemistry 26:1657–1659.
- Pomati F.**, Rossetti C., Manarolla G., Burns B. P., Neilan B. A. (2004)
Interactions between intracellular Na⁺ levels and saxitoxin production in
Cylindrospermopsis raciborskii T3.
Microbiology 150:455–461.
- Provasoli L.**, Mc Laughlin J. J., Droop M. R. (1957)
The development of artificial media for marine algae.
Archiv für Mikrobiologie 25:392–428.
- Pulz O., Gross W. (2004)**
Valuable products from biotechnology of microalgae.
Applied Microbiology and Biotechnology 65:635–648.
- Qi X.**, Mao W., Gao Y., Chen Y., Chen Y., Zhao C., Li N., Wang C., Yan M., Lin C., Shan J.
(2012)
Chemical characteristic of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide from
Enteromorpha clathrata.
Carbohydrate Polymers 90:1804–1810.
- Reed R. H. (1986)**
Halotolerant and halophilic microbes.
In: Herbert R.A., Codd G. A. (ed) *Microbes in Extreme Environments*.
Academic Press, Orlando, Florida, pp 55–81.
- Rellán S.**, Osswald J., Saker M., Gago-Martinez A., Vasconcelos V. (2009)
First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements
containing cyanobacteria.
Food and Chemical Toxicology 47:2189–2195.
- Renard C. M. G. C.**, Watrelot A. A., Le Bourvellec C. (2012)
Interaction between polyphenols and polysaccharides: mechanisms and consequences.
In: *Plant and Seaweed Polysaccharide Workshop*
- Richert L.**, Golubic S., Le Guédès R., Ratiskol J., Payri C., Guezennec J. (2005)
Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from polynesian
microbial mats.
Current Microbiology 51:379–384.
- Rippka R.**, Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y. (1979)
Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria.
Journal of General Microbiology 111:1–61.

- Rosgaard L.**, Porcellinis A. J. de, Jacobsen J. H., Frigaard N.-U., Sakuragi Y. (2012)
Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants.
Journal of Biotechnology
- Rossi F.**, Potrafka R. M., Pichel F. G., de Philippis R. (2012)
The role of the exopolysaccharides in enhancing hydraulic conductivity of biological soil crusts.
Soil Biology and Biochemistry 46:33–40.
- Sahu A., Pangburn M. K. (1997)**
Identification of multiple sites of interaction between heparin and the complement system.
Molecular Immunology 30:679–684.
- Sarma J. V., Ward P. A. (2011)**
The complement system.
Cell and Tissue Research 343:227–235.
- Schrader M.**, Drews G., Golecki J. R., Weckesser J. (1982)
Isolation and characterization of the sheath from the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912.
Journal of General Microbiology 128:267–272.
- Schultz D. R., Zarco R. M. (1970)**
Inhibition of the eighth component of complement (C8) by ethylenediaminetetra-acetat (EDTA).
The Journal of Immunology 104(2):279-288.
- Sengupta P., Basu S. (1997)**
Chemical studies on the lipopolysaccharides from enteropathogenic *E. coli* O128 and enterohemorrhagic *E. coli* O26.
Biochemical Archives 13:61–67.
- Sharma N. K.**, Tiwari S. P., Tripathi K., Rai A. K. (2011)
Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): Facts and challenges.
Journal of Applied Phycology 23:1059–1081.
- Silipo A.**, Molinaro A., Molteni M., Rossetti C., Parrilli M., Lanzetta R. (2010)
Full structural characterization of an extracellular polysaccharide produced by the freshwater cyanobacterium *Oscillatoria planktithrix* FP1.
European Journal of Organic Chemistry:5594–5600.
- Singh S., Das S. (2011)**
Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide.
World Journal of Microbiology and Biotechnology 27:1971–1980.
- Singh S.**, Kate B. N., Banerjee U. C. (2005)
Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview.
Critical Reviews in Biotechnology 25:73–95.
- Sloneker J. H., Orentas D. G. (1962)**
Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide.
Nature 194:478–479.
- Šmarda J.**, Čáslavská J., Komárek J. (1979)
Cell wall structure of *Synechocystis aquatilis* (Cyanophyceae).
Archiv für Hydrobiologie, Supplementband 23; 56:154–165.
- Sonesson A.**, Jantzen E., Tangen T., Zähringer U. (1994)
Chemical characterization of lipopolysaccharides from *Legionella feeleii*, *Legionella hackeliae* and *Legionella jordanis*.
Microbiology 140 (Pt 10):2663–2671.

- Sonesson A.**, Jantzen E., Bryn K., Tangen T., Eng J., Zähringer U. (1994)
Composition of 2,3-dihydroxy fatty acid-containing lipopolysaccharides from *Legionella israelensis*, *Legionella maceachernii* and *Legionella micdadei*.
Microbiology 140 (Pt 6):1261–1271.
- Stadnichuk I. N.**, Lukashev E. P., Elanskaya I. V. (2009)
Fluorescence changes accompanying short-term light adaptations in photosystem I and photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and phycobiliprotein-impaired mutants: State 1/State 2 transitions and carotenoid-induced quenching of phycobilisomes.
Photosynthesis Research 99:227–241.
- Stanier R. Y.**, Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. (1971)
Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales).
Bacteriological Reviews 35:171–205.
- Starcher B.** (2001)
A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples.
Analytical Biochemistry 292:125–129.
- Stengel D. B.**, Connan S., Popper Z. A. (2011)
Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application.
Biotechnology Advances 29:483–501.
- Stevenson T. T., Furneaux R. H.** (1991)
Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae.
Carbohydrate Research 210:277–298.
- Stewart I.**, Schluter P. J., Shaw G. R. (2006)
Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review.
Environmental Health: A Global Access Science Source 5:7.
- Su C.**, Chi Z., Lu W. (2007)
Optimization of medium and cultivation conditions for enhanced exopolysaccharide yield by marine *Cyanothece* sp. 113.
Chinese Journal of Oceanology and Limnology 25:411–417.
- Suresh Babu G.**, Joshi P. C., Viswanathan P. N. (1998)
UVB-induced reduction in biomass and overall productivity of cyanobacteria.
Biochemical and Biophysical Research Communications 244:138–142.
- Sutherland I. W.** (2001)
Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria.
International Dairy Journal 11:663–674.
- Sweet, D. P.**, Shapiro, R. H., Albersheim, P. (1975)
Quantitative analysis by various G.L.C. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates.
Carbohydrate Research 40:217–225.
- Thude S., Classen B.** (2005)
High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: An arabinogalactan-protein and an arabinan.
Phytochemistry 66:1026–1032.
- Tischer R. G., Moore B. G.** (1964)
Extracellular polysaccharide produced by *Pamella mucosa* Kutz.
Archiv für Mikrobiologie 49:158–166.
- Tissot B.**, Montdargent B., Chevolut L., Varenne A., Descroix S., Gareil P., Daniel R. (2003)
Interaction of fucoidan with the proteins of the complement classical pathway.
Biochimica et Biophysica Acta 1651:5–16.

- Trabelsi L., M'sakni N. H., Ouada H. B., Bacha H., Roudesli S. (2009)**
Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*.
Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14: 27-31.
- Tudoran R., Kirschfink M. (2012)**
Moderne Komplementanalytik Indikationen - Methodik – Perspektiven.
Laboratoriumsmedizin 36
- Uchisawa H., Okuzaki B., Ichita J., Matsue H. (2001)**
Binding between calcium ions and chondroitin sulfate chains of salmon nasal cartilage glycosaminoglycan.
International Congress Series 1223:205–220.
- Usov A. I., Adamyants K. S., Miroshnikova L. I., Shaposhnikova A. A., Kochetkov N. K. (1971)**
Solvolytic desulphation of sulphated carbohydrates.
Carbohydrate Research 18:336–338.
- Uzair B., Tabassum S., Rasheed M., Rehman S. F. (2012)**
Exploring marine cyanobacteria for lead compounds of pharmaceutical importance.
The Scientific World Journal 2012:1-10.
- Valério E., Chaves S., Tenreiro R. (2010)**
Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review.
Toxins 2:2359–2410.
- van den Hoek C. (1978)**
Algen. Einführung in die Phykologie, 1st edn.
Georg Thieme verlag, Stuttgart.
- Venzke K. (2005)**
Exopolysaccharide aus Cyanobakterien, Untersuchungen zum strukturellen Aufbau und zur biologischen Aktivität.
Dissertation, Kiel.
- Vinogradov E. V., Kaca W., Knirel Y. A., Rozalski A., Kochetkov N. K. (1989)**
Structural studies on the fucosamine-containing O-specific polysaccharide of *Proteus vulgaris* O19.
European Journal of Biochemistry 180:95–99.
- Volk R. B. (2007)**
Cyanobakterielle Exometabolite – Biotechnologische Gewinnung, Identifizierung, biologische Testung.
Dissertation, Kiel.
- Volk R. B., Blaschek W., Classen B. (2007 a)**
Characterization of an arabinogalactan protein from the pressed juice of *Echinacea purpurea*: investigations into the type of linkage between the protein and polysaccharide moieties.
Journal of Natural Medicines 61:397–401.
- Vollmar A., Dingermann T. (2005)**
Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Walsby A. E. (1994)**
Gas vesicles.
Microbiological Reviews 58:94–144.
- Walter W. (2004)**
Lehrbuch der organischen Chemie, 24st edn.
S. Hirzel, Stuttgart.

Waterborg, J. H. (2002)

The lowry method for protein quantification.
In: Walker J.M. (ed) *The Protein Protocols Handbook*.
Human Press Inc., Totowa (New Jersey), pp 7-20.

Whitton B. A., Potts M. (2000)

Introduction to the cyanobacteria.
In: Whitton B. A., Potts M. (ed) *The Ecology of cyanobacteria*.
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht [u.a.], pp 1–11.

Williams P. A. (2009)

Molecular interactions of plant and algal polysaccharides.
Structural Chemistry 20:299–308.

WHO (1998)

Guidelines for drinking-water quality / Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water / Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality

Wu M., Xu S., Zhao J., Kang H., Ding H. (2010)

Physicochemical characteristics and anticoagulant activities of low molecular weight fractions by free-radical depolymerization of a fucosylated chondroitin sulphate from sea cucumber *Thelenata ananas*.
Food Chemistry 122:716–723.

Yoshimura H., Kotake T., Aohara T., Tsumuraya Y., Ikeuchi M., Ohmori M. (2012)

The role of extracellular polysaccharides produced by the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. strain HK-01 in NaCl tolerance.
Journal of Applied Phycology 24:237–243.

Zor T., Selinger Z. (1996)

Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies.
Analytical Biochemistry 236:302–308.

9 Danksagung

Mein größter Dank geht an Professor Dr. Wolfgang Blaschek, meinen Doktorvater, dafür dass er mir dieses Thema überlassen hat. Dank ihm habe ich nicht nur meine fachliche Kompetenz auf diesem Gebiet erweitern können, sondern habe die Eigenschaften an einer schwierigen und geduldfordernden Aufgabe dranzubleiben und mich in ihr zu „verbeißen“ weiterentwickelt. Dabei stand er mir immer mit Rat und Tat aus seinem unerschöpflichen Erfahrungsschatz, Ermutigungen und Ruhe zu Seite und ermöglichte mir dabei ein selbstständiges Arbeiten.

Auch Prof. Dr. Birgit Classen möchte ich für die kollegiale und produktive Zusammenarbeit danken. Ihr kritischer Blick stärkte und erweiterte so manche Ideen, Ergebnisse und Sichtweisen. Mein Dank geht auch an PD Dr. Rainer Volk, der mit seiner langjährigen Erfahrung im Umgang mit Cyanobakterien immer ein guter Ansprechpartner bei Fragen und Problemen war.

Ich möchte mich bei Dr. Ulrich Girreser aus der Pharmazeutischen Chemie der Universität Kiel für den unermüdlichen Einsatz an der MS und NMR bedanken. Genannt werden müssen auch Dr. A. Fekete und Prof. Dr. A. Liptak (Chemisches Institut, Abteilung Organische Chemie, Debrecen, Ungarn) für die Synthese des Fukosamins und PD Dr. S. Mundt (Institut für Pharmazie, Universität Greifswald) für die Testung auf antimikrobielle und zytotoxische Wirkung. Außerdem danke ich Stephanie thor Straten (Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde, Universität Kiel) für die HPLC-Messung und alle, die mir im Labor zur Seite standen.

Die gesamte Zeit bei den „Bios“ in der Pharmazeutischen Biologie der Universität Kiel war durchweg von einer positiven und fröhlichen, aber auch kollegialen und hilfsbereiten Stimmung voller Tatendrang geprägt. Besonders hervorheben möchte ich Heidi Blaschek, die gute Seele des Instituts, und Dr. Esther Marie Göllner, die auch im größten Stress ein offenes Ohr für die Fragen und Probleme der Kollegen hat. Wichtig waren auch meine Mitstreiterinnen Stefanie Duchow mit den Arbeitsbesprechungen von Schreibtisch zu Schreibtisch und Esther Maria Friedrich, die beste Ko-Pipettiererin. Einen großen Dank auch an Helle für ihr großes Herz und an Kirsten für die vielen Stunden in der Spülküche. Ich müsste noch viele weitere „Bios“ nennen, doch um niemanden zu vergessen: Ein herzliches Dankeschön an alle!

Ohne meine Familie wäre ich nun nicht hier. Mein größter Dank geht an meine Eltern, die meinen gesamten Weg ermöglicht und in Liebe begleitet haben. Ohne meinen Mann Thomas, seine Liebe, Geduld und Motivation, wären die letzten Jahre deutlich schwerer gewesen. Dafür ein liebevolles Dankeschön. Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner ganzen, seit einigen Jahren noch größeren Familie bedanken.

10 Ehrenwörtliche Erklärung zu § 8 Absatz 1 der Promotionsordnung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Pharmazie eingereichte Arbeit zum Zwecke der Promotion am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Abteilung Pharmazeutische Biologie, unter Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Blaschek allein durchgeführt habe, bei der Abfassung der Arbeit keine sonstigen Hilfsmittel als die in der Arbeit genannten benutzt habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Außerdem erkläre ich, dass ich diese Arbeit bisher weder der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der CAU, noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Promotion, zur Veröffentlichung oder im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt habe.

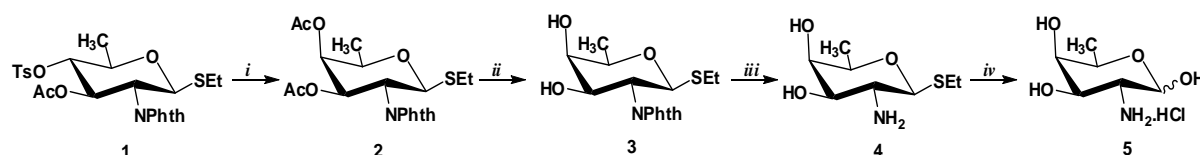
Kiel,

Daniela Flamm

11 Anhang

11.1 Synthesis of 2-amino-2,6-dideoxy-D-galactose hydrochloride (D-Fucosamine)

The synthetic route started from the known ethyl 3-O-acetyl-2,6-dideoxy-2-phthalimido-1-thio-4-O-(4-toluenesulfonyl)- β -D-glucopyranoside (**1**)¹. In the first step the tosyl ester **1** was treated with sodium acetate in dimethylformamide. After complete conversion of the tosylate the mixture was acetylated to give the *galacto*-derivative **2**. Deacetylation of **2**, followed by dephthaloylation of diol **3** afforded amine **4**. Finally, the amine derivative **4** was hydrolyzed with 2 M hydrochloric acid to yield the 2-amino-2,6-dideoxy-D-galactose hydrochloride (**5**).



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) (a) sodium acetate, trace H₂O, DMF, 120°C, 48h; (b) Ac₂O, Py, rt, 24h, 53% for two steps; (ii) acetyl chloride, CH₂Cl₂, CH₃OH, 50 °C, 24h, 74%; (iii) ethylenediamine, EtOH, 70°C, 24h, 73%; (iv) 2 M hydrochloric acid, 110°C, 82%.

2. Experimental

Optical rotations were measured at room temperature with a Perkin-Elmer 241 automatic polarimeter. TLC was performed on Kieselgel 60 F254 (Merck) with detection by charring with 50% aqueous sulfuric acid. Column chromatography was performed on Silica gel 60 (Merck 63-200 mesh). The ¹H (360 MHz and 400 MHz) and ¹³C NMR (90.54 MHz and 128 MHz) spectra were recorded with Bruker AM-360 and Bruker DRX-400 spectrometers. Internal references: TMS (0.000 ppm for ¹H), CDCl₃ (77.00 ppm for ¹³C for organic solutions). Elemental analyses were performed at the analytical laboratories in Debrecen.

2.1. Ethyl 3,4-di-O-acetyl-2,6-dideoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-galactopyranoside (**2**).

To a solution of ethyl 3-O-acetyl-2,6-dideoxy-2-phthalimido-1-thio-4-O-(4-toluenesulfonyl)- β -D-glucopyranoside (**1**)¹ (610 mg, 1.14 mmol) in dimethylformamide (10 mL) sodium acetate (425 mg, 5.16 mmol) and trace H₂O were added. The mixture was stirred at 120 °C. When t.l.c.

showed complete conversion of the starting material the reaction mixture was concentrated. The residue was diluted with CH_2Cl_2 , extracted with water, dried and concentrated. The residue was dissolved in pyridine (10 mL) and Ac_2O (5 mL). After stirring for one day at room temperature the mixture was concentrated. The residue was diluted with CH_2Cl_2 , extracted with aq 1 M HCl and saturated NaHCO_3 solution, dried and concentrated. The crude product was purified by silica column chromatography (CH_2Cl_2 – acetone 97 : 3) to yield **2** (255 mg, 53%) as a colourless syrup. $[\alpha]_{\text{D}} +21.7$ (c 0.13 in CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.91-7.72 (m, 4H, aromatic), 5.85 (dd, $J_{2,3}=11$ Hz, $J_{3,4}=3$ Hz, 1H, H-3), 5.45 (d, $J_{1,2}=11$ Hz, 1H, H-1), 5.37 (d, $J_{3,4}=3$ Hz, 1H, H-4), 4.60 (t, $J_{1,2}=11$ Hz, $J_{2,3}=11$ Hz, 1H, H-2), 4.07-3.98 (m, 1H, H-5), 2.80-2.61 (m, 2H, SCH_2CH_3), 2.23 and 1.85 (2s, 6H, 2 COCH_3), 1.28 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-6), 1.22 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, SCH_2CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 170.58 and 169.68 (2 COCH_3), 167.87 and 167.40 (2 CO), 134.23, 134.13, 131.49, 131.19, 123.56, 123.42 (aromatic), 80.95 (C-1), 73.10, 70.01 and 69.05 (C-3, C-4, C-5), 50.03 (C-2), 24.23 (SCH_2CH_3), 20.66 and 20.46 (2 COCH_3), 16.53 (C-6), 14.71 (SCH_2CH_3). Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_7\text{S}$: C, 57.00; H, 5.50. Found: C, 57.09; H, 5.45.

2.2. Ethyl 2,6-dideoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-galactopyranoside (3).

To a solution of compound **2** (210 mg, 0.5 mmol) in CH_2Cl_2 - CH_3OH (10 ml, 1:1) was added acetyl chloride (357 μl , 5 mmol) at 0°C . The reaction mixture was left to attain room temperature and stirred overnight, then concentrated. The residue was purified by silica column chromatography (CH_2Cl_2 – acetone 95 : 5) to yield **3** (125 mg, 74 %) as a colourless syrup. $[\alpha]_{\text{D}} +42.1$ (c 0.16 in CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.98-7.79 (m, 4H, aromatic), 5.41 (d, $J_{1,2}=10$ Hz, 1H, H-1), 4.58-4.49 (m, 1H, H-5), 4.45 (t, $J_{1,2}=10$ Hz, $J_{2,3}=10$ Hz, 1H, H-2), 4.02-3.92 (m, 2H, H-4, H-3), 3.43 and 3.21 (bs, 2H, 2 OH), 2.89-2.69 (m, 2H, SCH_2CH_3), 1.50 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, H-6), 1.31 (t, $J=7.5$ Hz, 3H, SCH_2CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 168.45 (2 CO), 134.04, 131.74, 131.58, 123.62, 123.16 (aromatic), 81.02 (C-1), 74.82, 71.85 and 69.62 (C-3, C-4, C-5), 53.23 (C-2), 24.16 (SCH_2CH_3), 16.76 (C-6), 14.80 (SCH_2CH_3). Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{S}$: C, 56.96; H, 5.68. Found: C, 56.87; H, 5.73.

2.3. Ethyl 2-amino-2,6-dideoxy-1-thio- β -D-galactopyranoside (4).

To a solution of compound **6** (85 mg, 0.25 mmol) in ethanol (10 mL) ethylene diamine (84 μL , 1.25 mmol) was added. After stirring for one day at reflux temperature the mixture was concentrated. The residue was purified by silica column chromatography (CH_2Cl_2 – methanol 9: 1) to yield **4** (38 mg, 73 %) as a colourless syrup. $[\alpha]_{\text{D}} -42.7$ (c 0.57 in CH_3OH);

^1H NMR (CD_3OD): δ 4.39 (d, $J_{1,2}=10$ Hz, 1H, H-1), 3.80-3.73 (m, 1H, H-5), 3.72 (d, $J_{3,4}=3$ Hz, 1H, H-4), 3.51 (dd, $J_{2,3}=10$ Hz, $J_{3,4}=3$ Hz, 1H, H-3), 3.03 (t, $J_{1,2}=10$ Hz, $J_{2,3}=10$ Hz, 1H, H-2), 2.94-2.78 (m, 2H, SCH_2CH_3), 1.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, SCH_2CH_3), 1.39 (d, $J=6.5$ Hz, 3H, H-6);

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 87.75 (C-1), 76.26, 76.07 and 72.40 (C-3, C-4, C-5), 53.24 (C-2), 25.22 (SCH_2CH_3), 17.28 (C-6), 15.71 (SCH_2CH_3).

2.4. 2-Amino-2,6-dideoxy-D-galactose hydrochloride ($5\alpha, 5\beta$).

The compound **6** (32 mg, 0.15 mmol) was dissolved in 2 M hydrochloric acid (1 mL) and stirred for one day at 110°C . The mixture was purified by Sephadex LH20 chromatography to give **5** (20 mg, 82 %) as a mixture of α/β anomers. $[\alpha]_{\text{D}} +44.6$ (c 0.28 in H_2O);

5 α : ^1H NMR (D_2O): δ 5.43 (d, $J_{1,2}=4$ Hz, 1H, H-1), 4.32-4.24 (m, 1H, H-5), 4.09 (dd, $J_{2,3}=11$ Hz, $J_{3,4}=3$ Hz, 1H, H-3), 3.85 (d, $J_{3,4}=3$ Hz, 1H, H-4), 3.45 (dd, $J_{1,2}=4$ Hz, $J_{2,3}=11$ Hz, 1H, H-2), 1.25 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-6); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 90.11 (C-1), 71.76 (C-4), 67.43 (C-3, C-5), 51.94 (C-2), 16.47 (C-6).

5 β : ^1H NMR (D_2O): δ 4.87 (d, $J_{1,2}=8.5$ Hz, 1H, H-1), 3.90 (dd, $J_{2,3}=11$ Hz, $J_{3,4}=3$ Hz, 1H, H-3), 3.88-3.83 (m, 1H, H-5), 3.81 (d, $J_{3,4}=3$ Hz, 1H, H-4), 3.14 (dd, $J_{1,2}=8.5$ Hz, $J_{2,3}=11$ Hz, 1H, H-2), 1.29 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-6); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 93.85 (C-1), 72.21 (C-5), 71.19 (C-4), 70.44 (C-3), 55.20 (C-2), 16.47 (C-6).

Reference:

[1] Medgyes, A.; Farkas, E.; Lipták, A.; Pozsgay, V.; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4159-4178.

11.2 Übersicht über die Zusammensetzung von cyanobakteriellen EPS

Stamm	Glukose	Galaktose	Mannose	Arabinose	Xylose	Ribose	Rhamnose	Fukose	Anzahl	Uronsäuren	Amino zucker	Sulfat	Pyruvat	Deoxy zucker	Protein-anteil	Literatur- stelle
<i>Anabaena</i> (8 Arten)									2-6	0-51,5		0-X		0-33,9	--12,0	2
<i>Anabaena cylindrica</i>									5	0				0		2
<i>Anabaena cylindrica</i> 10C									5	1,7		X		10,1		2
<i>Anabaena cylindrica</i> CCAP1403/2	X	X		X	X		X		5	28,0				6,0		1; 2
<i>Anabaena flos-aquae</i> A37 (2 Untersuchungen)									3	0,9-58,4				0		2
<i>Anabaena flos-aquae</i> A37- neutrale Fraktion	X				X	X			3	0						1
<i>Anabaena flos-aquae</i> A37- saure Fraktion	X				X				2	10,0						1
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	X	X		X				X	4	5,3						Yoshimura et al., 2012
<i>Aphanocapsa halophytica</i> MN11	X	X	X		X		X	X	6	0		11,9		52,4	10,3	1; 2
<i>Chlorogloeopsis</i> sp. PCC 6912									4	X				10,2		2
<i>Chroococcus minutus</i> B 41.79	X	X	X	X	X		X	X	Insg. 12	4,2				17,1	3,2	1; 2
<i>Cyanospira capsulata</i> ATCC 43193	X		X	X				X	4	36,5		0	15,4		2	1

Stamm	Glukose	Galaktose	Mannose	Arabinose	Xylose	Ribose	Rhamnose	Fukose	Anzahl	Uronsäuren	Amino zucker	Sulfat	Pyruvat	Deoxy zucker	Protein-anteil	Literatur- stelle
<i>Cyanospira capsulata</i>	X		X	X				X	4	25-34					2	Marra et al., 1990
<i>Cyanothece</i> (18 strains)									1-7	0-80,1	0-X		0- 3,9	3,4- 80,2	0-18 ^a	1
<i>Fischerella</i> (2 Arten)									4; 5	-; 12,8	X; -			21,4; 17,6		2
<i>Gloeocapsa gelatinosa</i>									8	31,4				14,2	28,2	2
<i>Gloeotheca</i> sp. PCC 6909	X	X	X		X		X		5	5,0		13,8		3,0	6,2	1; 2
<i>Gloeotheca</i> sp. PCC 6909 Innere Kapsel	X	X	X		X		X		5	2,9		18,6			4,2	Tease et al., 1991
Äußere Kapsel	X	X	X		X		X		5	4,2		8,2			4,4	
Lösliche EPS	X	X	X		X		X		5	5,0		13,8			6,2	
<i>Lyngbya confervoides</i> S9g	X	X	X	X	X		X	X	7	38,6				0		1; 2
<i>Mastigocladus lamniosus</i>	X	X	X	X	X		X	X	7	X				X		1; 2
<i>Microcoleus</i> (2 Arten)	X	X	X			X		X		0; 8				Tr; 9,9	6,0; 50,3	1; 2
<i>Microcystis aeruginosa</i> K 3A	X	X	X	X	X		X	X	7	28,1						1
<i>Microcystis flos-aquae</i> C3- 40	X	X	X		X		X		5	83,0				5,5	<1	1; 2
<i>Nostoc</i> (43 Untersuchungen an 36 Arten)									2-7	0-69,4	0-X		0- 6,2	0- 15,5	1- 69,5	2
<i>Nostoc calcicolat</i> RDU-3	X	X			X	X	X		5			X				Singh & Das, 2011

Stamm	Glukose	Galaktose	Mannose	Arabinose	Xylose	Ribose	Rhamnose	Fukose	Anzahl	Uronsäuren	Amino zucker	Sulfat	Pyruvat	Deoxy zucker	Protein-anteil	Literatur- stelle
<i>Nostoc</i> sp. HK-01	X	X	X	X	X			X	6	7,8						Yoshimura et al., 2012
<i>Oscillatoria</i> (6 Arten)									<8	0-24,2	HexN	0-19,3		0-15,9	0-50,3	1; 2
<i>Palmella mucosa</i>	X			X				X	3	X						Tischer & Moore, 1964
<i>Phormidium</i> (20 Arten)									3-7	0-41,5	Ggl. HexN	0-15,2		0-24,5	- -21,9	1; 2
<i>Plectonema</i> (2 Arten)									6	7; 11		0;16		11,1; 20,4	11; 19	2
<i>Scytonema</i> (4 Arten)									3-9	-- 16,6		-- X		0-12,5	-- 50	2
<i>Spirulina maxima</i>									6	X				X		2
<i>Arthrospira platensis</i> Compère 1968/3786	X	X	X	X	X		X	X	>7	14,4					55	Trabelsi et al., 2009
<i>Spirulina platensis</i>		X			X		X			20,0				X		1; 2
<i>Spirulina platensis</i> PCC 8005	X	X	X		X		X	X	6	40,0		5,0		X		Filali Mouhim et al., 1993
<i>Synechocystis</i> sp.	X	X		X	X		X	X	6	4,6					0,4	Kawaguchi & Decho, 2000
<i>Synechocystis aquatilis</i> SAG 90.79	X	X		X				X	4	0,9	FucN	18,4	2,3	0	0	
<i>Synechocystis aquatilis</i> CAUP A 801	X	X	X	X	X		X	X	7	2,6		0,0			29,3	

Stamm	Glukose	Galaktose	Mannose	Arabinose	Xylose	Ribose	Rhamnose	Fukose	Anzahl	Uronsäuren	Amino zucker	Sulfat	Pyruvat	Deoxy zucker	Protein-anteil	Literatur- stelle
<i>Synechocystis aquatilis</i> CCALA 189	X	X	X	X	X		X	X	7	6,8		0,0			21,2	
<i>Synechocystis</i> sp. BASO444	X								1	3						Ozturk & Aslim, 2009
<i>Synechocystis</i> sp. BASO511	X			X	X				3	0,07						Ozturk & Aslim, 2009
<i>Synechocystis</i> sp. BASO507	X			X	X				3	0,02						Ozturk & Aslim, 2009
<i>Synechocystis</i> sp. BASO670	X						X		2	75						Ozturk et al., 2009
<i>Synechocystis</i> sp. BASO672	X								1	89						Ozturk et al., 2009
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	X	X	X	X	X		X	X	7	14-20	GlcN; GalN / 5-16	1,2	0	31,4	10-60	Panoff et al., 1988
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	X	X	X		X		x	X	6	6-16,4	GlcN; GalN / 8; 11	0,6-1		6,7	40	Panoff et al., 1988
<i>Synechocystis pevalekii</i> SAG 91.79	X	X	X	X	X		X	X	7	0	GlcN 10	1,1	0		45	
<i>Tolpothrix tenuis</i> PCC 7101										5				14,3		2

Tabelle 11.2-1: Übersicht über die Zusammensetzung einer Auswahl cyanobakterieller EPS in der Literatur. n: Anzahl der Monosacchide ohne Uronsäuren, Desoxyzucker und Aminozucker. X fettdruck: Hauptmonosaccharid sofern bekannt; X: vorhanden.^a bei einem Stamm untersucht. Übersichtsarbeiten: 1 [De Philippis & Vincenzini, 1998] für Monosaccharide; 2 [Pereira et al., 2009].