

**Screening nach Naturstoffen aus acidophilen und  
alkalophilen Streptomyceten sowie Actinomyceten  
aus der Antarktis und der Tiefsee**

Dissertation

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard Karls Universität Tübingen

vorgelegt  
von

Anke Dieter

aus Mannheim

2002

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.02  
Dekan: Prof. Dr. H.-U. Schnitzler  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-P. Fiedler  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Poralla

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler am Lehrstuhl Mikrobiologie/Biotechnologie des Biologischen Institutes der Universität Tübingen angefertigt.

**Mein herzlichster Dank gilt:**

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler für die Überlassung des interessanten Themas, seine Unterstützung bei der Durchführung und für die Pflege einer bemerkenswert guten Arbeitsstimmung.

Herrn Prof. Dr. K. Poralla für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Dem Graduiertenkolleg Mikrobiologie für seine finanzielle Förderung.

Der Erich und Maria Teufel Stiftung für die finanzielle Unterstützung eines Auslandsaufenthaltes und eines Kongressbesuchs.

Herrn Prof. Dr. R. Kroppenstedt und Herrn Prof. Dr. E. Stackebrandt und ihren Arbeitsgruppen für eine praktische Einführung in moderne taxonomische Methoden.

Herrn Prof. Dr. M. Goodfellow für die Überlassung der in seiner Arbeitsgruppe isolierten alkalophilen und acidophilen Stämme zur Bearbeitung sowie für die große Gastfreundschaft, die mir in seinem Arbeitskreis entgegengebracht wurde.

Herrn Prof. Dr. A. T. Bull für die Bereitstellung der antarktischen und marinen Stämme.

Herrn Prof. Dr. W. Beil für die Durchführung der Tumortestierung von Substanzen.

Der Firma Oncotest für die Tumortestierung von Substanzen.

Herrn Prof. Dr. R. Brun für die Testierung gegen parasitologische Krankheitserreger.

Herrn Prof. Dr. G. Bringmann und seinen Mitarbeitern Herrn Dipl. Chem. Robert Pfeifer, Herrn Dipl. Chem. Gerhard Lang und vor allem Herrn Dipl. Chem. Andreas Hamm für die gute Zusammenarbeit bei der Strukturaufklärung.

Herrn Dipl. Chem. Dietmar Schmid und Frau Dr. Alexandra Höltzel aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. G. Jung für die Strukturaufklärung.

Herrn H. Schoppman für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Bilder.

Herrn Prof. Dr. K. Hantke für Tipps bei der Erstellung von Tests mit *E. coli* und Phagen.

Herrn Dietmar Neubauer für die Durchführung des Screenings.

Frau Kathrin Schirner für ihre Hilfe im Labor.

Herrn Georg Grewe für seine große Hilfe bei der Durchführung der Fermentationen und viel Wissenswertes über die asiatische Kultur und Kunstfilme.

Dem gesamten AK Fiedler für eine fantastische Arbeitsatmosphäre, das Aufpolieren meiner Allgemeinbildung und die weltbesten Tischgespräche!

Den Arbeitsgruppenmitgliedern AG Fiedler und AG Wohlleben für ein gutes Miteinander.

Frau Dr. Susanne Dilsen, Frau Dr. Christina Bruntner, Frau Michaela Forster und Frau Doro Wabbels für den heldenhaften Einsatz bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Dem Spanier Herrn Dr. Markus Kempf für viel Olé und Spätzle.

Meinen Eltern, die in allen Lebenslagen für mich da waren und meine gesamte Ausbildung finanziert haben.

Alle, die noch mit mir reden, obwohl ich sie vergessen habe.

## Abkürzungen

---

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AG	Arbeitsgruppe
ATCC	American Type Culture Collection
BM	Biomasse
BuOH	Butanol
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DAD	Diode Array Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
deion.	deionisiertes
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
Ferm.	Fermentation
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
I. D.	Innendurchmesser
IC <sub>50/70/90</sub>	50 / 70 / 90% Hemmung des Zellwachstums
L	Liter
LB	Lehrbereich
LC <sub>50</sub>	50% Verringerung der Zellzahl nach 24 Stunden im Vergleich zum Zeitpunkt 0
LM	Luftmycel
LS	Lehrstuhl
M	Molar
mAU	Milli Absorbance Units
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
ml	Milliliter
MS	Massenspektroskopie
N	Normal

## Abkürzungen

---

n.b.	nicht bestimmt
NL	Nährlösung
NMR	Kernspinresonanz
N-Quelle	Stickstoffquelle
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
PhoA	Phosphorsäure
PHPLC	Präparative HPLC
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
Rk	Riesenkolonie
RP	Reversed Phase
RP-HPLC	Reversed Phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Rt	Retentionszeit
SM	Sekundärmetabolit
Sp	Sporen
sp.	Spezies nicht bestimmt
Std	Stunden
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
TGI	100% Wachstumshemmung
Tü	Stammsammlung des LB Mikrobiologie der Universität Tübingen
Ük	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV-Vis	Ultraviolet-visible
vvm	Volumen Luft pro Flüssigkeitsvolumen und Minute

## Inhaltsverzeichnis

---



## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1	Einführung in die Naturstoff-Forschung	1
2	Ungewöhnliche Habitate zur Isolierung neuer Actinomyceten	2
2.1	Tiefsee	3
2.2	Antarktis	4
2.3	Alkalische Habitate	4
2.4	Saure Habitate	5
3	Techniken zur Suche nach neuen Naturstoffen	6
4	Aufgabenstellung	7
<b>II</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
1	Chemikalien	8
2	Nährmedien und Puffer	10
2.1	Nährlösungen für das Screening	10
2.2	Nährlösungen für die Testierung und die Stammhaltung	11
2.3	Puffer und Lösungen	13
2.4	Nährlösungen für Anzucht und Produktion	13
3	Mikroorganismen und Teststämme	16
3.1	Produktionsstämme	16
3.2	Teststämme zur Erfassung des antibiotischen Wirkspektrums	22
3.3	Zelllinien zur Bestimmung der antitumoralen Wirkung	22
3.4	Teststämme zur Testierung der herbiziden und algiziden Wirkung	23
3.5	Phage zur Testierung auf antivirale Eigenschaften	24
3.6	Organismen zur Erfassung der antiparasitologischen Spektren	24
4	Taxonomische Charakterisierung	24
4.1	Morphologische Charakterisierung	24
4.1.1	Lichtmikroskopie	24
4.1.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	25
4.2	Chemische Charakterisierung	25
4.2.1	Diaminopimelinsäure Bestimmung (DAP)	25
5	Kulturbedingungen	26
5.1	Stammhaltung und Konservierung	26
5.2	Schüttelkulturen	27
5.3	Fermentation in Bioreaktoren	27
6	Mess- und Regelvorgänge	28
6.1	Messdatenerfassung über das Prozessleitsystem	28
6.2	pH-Wert Regelung über das Prozessleitsystem	29
7	Fermentationsanalysen	29
7.1	Biomasse	29
7.2	pH-Wert	30
7.3	Kohlenhydratanalytik	30
7.4	Ammonium	30

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>8</b>	<b>Extraktion, Nachweis und Quantifizierung der Metabolite</b>	<b>31</b>
8.1	Extraktion	31
8.2	Reversed-Phase-HPLC	32
<b>9</b>	<b>Screening</b>	<b>33</b>
9.1	Biologisches Screening	33
9.2	HPLC-DAD-Screening	34
<b>10</b>	<b>Isolierung und Reinigung der Metabolite</b>	<b>34</b>
10.1	Trennung von Kulturfiltrat und Biomasse	34
10.2	Extraktionsverfahren	34
10.2.1	Extraktion der Biomasse	34
10.2.2	Extraktion des Kulturfiltrates	35
10.3	Chromatographische Verfahren	35
10.3.1	RP-Chromatographie an Adsorberharzen	35
10.3.2	Adsorptionschromatographie an LiChroprep Diol	36
10.3.3	Ausschlusschromatographie an Sephadex oder Fractogel	37
10.3.4	Präparative HPLC	38
<b>11</b>	<b>Physikalische und chemische Charakterisierung</b>	<b>39</b>
11.1	UV/Vis-Spektroskopie	39
11.2	Strukturaufklärung	39
<b>12</b>	<b>Biologische Charakterisierung</b>	<b>39</b>
12.1	Agardiffusionstests	39
12.1.1	Nachweis einer antibiotischen Aktivität	40
12.1.2	Nachweis von algizider Aktivität (Chlorella-Test)	41
12.1.3	Nachweis einer DNA-schädigenden Wirkung	41
12.1.4	Untersuchung zur Phagen hemmenden Wirkung	41
12.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	42
12.3	Test zum Nachweis der herbiziden Aktivität (Lemna-Test)	43
12.4	Hemmung von Tumorzellen in Zellkulturen	44
12.4.1	Hemmung von Tumorzellen	44
12.4.2	Zellzyklusanalyse	45
12.5	Test auf Hemmung unterschiedlicher parasitärer Krankheitserreger	45
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>1.</b>	<b>Das Screening</b>	<b>47</b>
1.1	Das chemische Screening	47
1.2	Biologisches Screening	49
1.3	Vergleich der Ergebnisse aus dem chemischen und biologischen Screening	50
1.4	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus dem chemischen Screening	51
<b>2</b>	<b>Bearbeitung einzelner Stämme</b>	<b>52</b>
2.1	<i>Streptomyces</i> sp. AK 409	52
2.1.1	Herkunft und Taxonomie	52
2.1.2	Screening	52
2.1.2.1	Chemisches Screening	52
2.1.2.2	Biologisches Screening	53
2.1.3	Nährlösungsvariation	54
2.1.4	Dirigierte Biosynthese	56
2.1.5	Kultivierung im Bioreaktor mit der Nährlösung SGG	57
2.1.6	Kultivierung im Bioreaktor mit NL 400*	59
2.1.7	pH-statische Kultivierung im Bioreaktor	60

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.8	Isolierung und Reinigung der Metabolite 409-A, 409-B und 409-D	62
2.1.9	Strukturaufklärung der Komponenten	64
2.1.10	Biologische Wirkung	64
2.1.10.1	Antibiotisches Wirkspektrum von AK 409-A	64
2.1.10.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von AK 409-A	65
2.1.10.3	Test auf algizide Wirkung von AK 409-A	66
2.1.10.4	Test auf herbizide Wirkung von AK 409-A	66
2.1.10.5	Wirkung von AK 409-A gegen unterschiedliche Tumor Zelllinien	66
2.1.10.6	Wirkung von AK 409-A gegen Erreger von Tropenerkrankungen	68
2.2	<i>Streptomyces</i> sp. AK 623	70
2.2.1	Herkunft und Taxonomie	70
2.2.2	Screening	70
2.2.2.1	Chemisches Screening	70
2.2.2.2	Biologisches Screening	71
2.2.3	Nährlösungsvariation in Schüttelkolben	72
2.2.4	Kultivierung im Bioreaktor mit Medium OM	74
2.2.5	Kultivierung im Bioreaktor mit Medium SGG	77
2.1.6	pH-statische Kultivierung im Bioreaktor	79
2.2.7	Isolierung und Reinigung	81
2.2.7.1	Isolierung und Reinigung aus einer Kultur in OM	81
2.2.7.2	Isolierung und Reinigung aus einer Kultur in SGG	83
2.2.8	Strukturaufklärung	85
2.2.9	Biologische Wirkung der Metabolite aus AK 623	86
2.2.9.1	Antibiotisches Wirkspektrum	86
2.2.9.2	Test auf DNA-schädigende Wirkung	87
2.2.9.3	Test auf antivirale Wirkung	87
2.2.9.4	Test auf antitumorale Wirkung	88
2.3	<i>Streptomyces</i> sp. AK 671	90
2.3.1	Herkunft und Taxonomie	90
2.3.2	Screening	90
2.3.2.1	Chemisches Screening	91
2.3.2.2	Biologisches Screening	92
2.3.3	Medienvariation im Schüttelkolben	92
2.3.4	Kultivierung im Bioreaktor	95
2.3.5	pH-statische Kultivierung im Bioreaktor	98
2.3.6	Isolierung und Reinigung der Komponenten	99
2.3.7	Strukturaufklärung	101
2.3.8	Biologische Wirkung	102
2.3.8.1	Antibiotisches Wirkspektrum der Metabolite aus AK 671	102
2.3.8.2	DNA-schädigende Wirkung der Metabolite aus AK 671	102
2.3.8.3	Antivirale Eigenschaften der Metabolite aus AK 671	103
2.2.8.4	Test auf antitumorale Wirkung	103
2.4	<i>Streptomyces</i> sp. KC 1030	105
2.4.1	Herkunft und Taxonomie	105
2.4.2	Screening	105
2.4.2.1	Chemisches Screening	105
2.4.2.2	Biologisches Screening	106
2.4.3	Produktionsverhalten auf KM 4-Festagar	107
2.4.4	Schüttelkolbenversuche	107
2.4.4.1	Nährlösungsvariation	107
2.4.4.2	Einfluss des Puffers auf die Metabolitproduktion	109

## Inhaltsverzeichnis

---

2.4.4.3 Optimierung der Nährlösung für die Produktion von 1030-B	112
2.4.4.4 Optimierung der Vorkultur für die Produktion von 1030-B	113
2.4.5 Kultivierung im Bioreaktor	117
2.4.5.1 Kultivierung im Bioreaktor ohne pH-Wert-Regelung	117
2.4.5.2 Kultivierung im Bioreaktor mit pH-Wert-Regelung	119
2.4.5.3 Kultivierung im Bioreaktor mit unterschiedlichen Puffern	122
2.4.6 Isolierung und Reinigung der Komponenten	127
2.4.6.1 Isolierung und Reinigung der Komponenten 1030-A und 1030-B	127
2.4.6.2 Isolierung und Reinigung der Komponenten 1030-G und 1030-J	128
2.4.7 Strukturaufklärung	130
2.4.8 Biologische Wirkung	131
2.4.8.1 Antibiotisches Wirkspektrum der Metabolite aus KC 1030	131
2.4.8.2 DNA-schädigende Wirkung der Metabolite aus KC 1030	131
2.4.8.3 Antivirale Eigenschaften der Metabolite aus AK KC 1030	131
2.4.8.4 Test auf antitumorale Wirkung	132
<b>IV Diskussion</b>	<b>133</b>
1. Das Screening	133
2. Bearbeitung einzelner Stämme	135
2.1 <i>Streptomyces</i> sp. AK 409	135
2.1.1 Kultivierung im Bioreaktor	135
2.1.2 Strukturaufklärung der Komponenten und Überlegungen zur Biosynthese	136
2.1.3 Biologische Wirksamkeit von Pyrocoll	137
2.2 <i>Streptomyces</i> sp. AK 623	138
2.2.1 Kultivierung im Bioreaktor mit Medium OM	138
2.2.2 Isolierung und Reinigung	139
2.2.3 Metabolite aus AK 623	139
2.2.4 Biologische Wirkung der Metabolite aus AK 623	140
2.3. <i>Streptomyces</i> sp. AK 671	141
2.3.1 Kultivierung im Bioreaktor	141
2.3.2 Strukturaufklärung	142
2.3.3 Biologische Wirkung	143
2.4 <i>Streptomyces</i> sp. KC 1030	144
2.4.1 Produktionsverhalten in der Schüttelkultur	144
2.4.2 Optimierung der Produktion von 1030-B in Schüttelkultur	145
2.4.3 Kultivierung im Bioreaktor	146
2.4.4 Metabolite aus KC 1030	147
2.4.5 Biologische Wirkung	148
<b>V Zusammenfassung</b>	<b>149</b>
1. Screening	149
2. Bearbeitung ausgewählter Stämme	149
2.1 <i>Streptomyces</i> sp. AK 409	149
2.2 <i>Streptomyces</i> sp. AK 623	150
2.3 <i>Streptomyces</i> sp. AK 671	150
2.4 <i>Streptomyces</i> sp. KC 1030	151
<b>VI Literatur</b>	<b>152</b>

# I Einleitung

## 1 Einführung in die Naturstoff-Forschung

Krankheiten haben von jeher das Leben der Menschen bedroht und aus diesem Grund ist die Geschichte der Krankheitsbekämpfung so alt wie die Menschheit selbst. Die Therapie von Krankheiten wurde, neben Ritualen, vor allem über Heilpflanzen bestritten. Die Kenntnisse über die Wirkung unterschiedlicher Drogen war dabei oft sehr gut. So wurde beispielsweise die Chinawurzel erfolgreich gegen Malaria eingesetzt (FRANKLIN & SNOW, 1973). Jedoch erfolgte die Krankheitsbekämpfung ohne ein tieferes Wissen darüber, was die Krankheit erzeugt und wodurch eine heilende Wirkung eintritt. Das änderte sich erst Ende des 19. Jahrhunderts, als Robert Koch das Tuberkelbakterium entdeckte und zum ersten Mal der Erreger einer Erkrankung identifiziert wurde. Das Wissen, dass Krankheiten durch Kleinstlebewesen erzeugt werden können, brachte einen Wandel in die Medizin. Die heute übliche Medikation, die Chemotherapie, wurde Anfang des 20. Jahrhunderts durch Ehrlich und seine Versuche mit Farbstoffen begründet. In seiner Theorie stellte er fest, dass Krankheiten mit Chemikalien therapiert werden können (BÄUMLER, 1984) und man suchte nun nach Quellen für therapeutisch wirksame Substanzen. Nach der Isolierung des 1928 von Fleming entdeckten Penizillins durch Florey (BENTLEY, 1997) im Jahre 1940 begann die Ära der Antibiotika und Naturstoffforschung. Mit den Antibiotika setzte ein Wandel der therapeutischen Möglichkeiten ein. Zumindest in den Industrieländern konnten nun Infektionskrankheiten bekämpft werden, die bislang hauptsächliche Todesursache waren. Infolgedessen stieg die Lebenserwartung der Menschen an. In den folgenden Jahren erweiterte sich das Einsatzgebiet der „Wunderdrogen“ auf andere Krankheiten und nicht humanmedizinische Anwendungsbereiche wie die Landwirtschaft (DEMAIN, 1999).

Bei der Auffindung neuer Wirkstoffe sind die von Organismen gebildeten Naturstoffe von jeher von großem Interesse. Der besondere Vorteil der Naturstoffe liegt in ihrer großen chemischen Variabilität, die bisher von der kombinatorischen Chemie nicht erreicht werden konnte (HENKEL et al., 1999; GRABLEY et al., 2000). Die Synthese von Naturstoffen findet vor allem in höheren Pflanzen und in Mikroorganismen statt. Unter den Mikroorganismen sind neben den Pilzen hauptsächlich Vertreter der Gattung Actinomyces eine gute Quelle für neue Naturstoffe (GRABLEY et al., 2000). Bei 78% der 1995 bekannten Antibiotika handelte es sich um Komponenten aus Bakterien und 66% davon wurden aus Actinomyceten isoliert

(DEMAIN, 1999). Bis heute ist das Interesse an neuen Wirksubstanzen ungebrochen (DEMAIN, 1998). Zum einen sind bislang immer noch viele Krankheiten nicht oder nur schlecht therapierbar, wie beispielsweise HIV, Krebs oder Malaria. Dazu kommt das Auftreten antibiotikaresistenter Keime, die zuvor therapierbare Krankheiten erneut zu einem großen Problem werden lassen (ZÄHNER & FIEDLER, 1995; GILMORE & HOCH, 1999; BLONDEAU & VAUGHAN, 2000). Diese Entwicklung wird durch unsachgemäße Handhabung von Medikamenten und vor allem durch den massiven Einsatz potenter Wirkstoffe als Mastmittel in der Agrarwirtschaft noch gefördert (WITTE, 1998).

Naturstoffforscher und vor allem Kritiker dieser Disziplin untersuchen derzeit, ob die natürlichen Ressourcen an Naturstoffproduzenten und damit die chemische Diversität der von ihnen gebildeten Strukturen mittlerweile nicht erschöpft sind (HARVEY, 1999; BÉRDY 1995). Studien über biologische Diversität zeigen jedoch deutlich das Gegenteil. Nach neuesten Schätzungen machen Mikroorganismen über 50% der Biomasse aus und die Zahl der auf der Erde vorkommenden Prokaryonten wird auf  $4 - 6 \times 10^{30}$  geschätzt (WHITEMAN et al., 1998). Von diesen Organismen sind jedoch nur etwa 1% mit den heute existierenden Methoden kultivierbar (AMANN et al., 1995). Um wiederholte Isolierung bereits bekannter Organismen zu vermeiden, wendet man sich von stark bearbeiteten Organismengruppen, wie beispielsweise den Streptomyceten, ab. Über neue Isolierungsstrategien versucht man bisher nur schwach bearbeitete Gattungen zu erhalten, die möglicherweise biosynthetische Fähigkeiten aufweisen (LAZZARNI et al., 2000). Neue Naturstoffe sollten sich allerdings auch aus Stämmen isolieren lassen, die zu den erfolgreich bearbeiteten Taxa, wie den Streptomyceten, gehören. Diese sind durch ihre genetische Struktur ganz besonders zu ungewöhnlichen Biosyntheseleistungen fähig. Das Genom ist ungewöhnlich groß und die Organismen sind durch genetische Anpassungen in der Lage ihre sekundären Stoffwechsellleistungen schnell zu verändern, ohne dass die Vitalität des Stammes beeinträchtigt wird (VOLFF & ALTENBUCHNER, 1998). Um nun neue Naturstoffe aus Stämmen einer stark bearbeiteten Gattung zu isolieren, ist es daher von besonderer Relevanz auf die Diversität und das ungewöhnliche Habitat der Proben zu achten, aus denen man Organismen isolieren möchte (BULL et al., 1992).

## **2 Ungewöhnliche Habitate zur Isolierung neuer Actinomyceten**

Da es eigentlich keinen Ort auf der Erde gibt, an dem Mikroorganismen nicht zu finden sind (BACHOFEN et al., 1998), kann man auf eine große Fülle von ungewöhnlichen Standorten

zurückgreifen. Interessante und bislang noch wenig beachtete Isolierungs-Habitate sind die Tiefsee, die Antarktis und Gegenden, die sich durch besonders saure oder basische Böden hervortun.

## 2.1 Tiefsee

Betrachtet man die Erdoberfläche, so sind über 70% davon mit dem Wasser von Meeren und Ozeanen bedeckt. Von den mit Wasser bedeckten Bereichen reichen etwa 60% mindestens 2000 Meter tief. Diese Bereiche bezeichnet man als Tiefsee und sie wurden in früheren Jahren fälschlicherweise als biologisch tote Zone betrachtet (ZOBELL, 1938). Die ersten Untersuchungen von bakteriellen Populationen dieser schwer zugänglichen Zone begannen während der Fahrten der „Travailleur“ und „Talisman“ zwischen 1882 und 1883 (GAGE & TYLER, 1991). Heute werden Probenahmen und Untersuchungen in der Tiefsee von unbemannten Tauchbooten durchgeführt, welche Proben nach oben transportieren (BRUUN, 1957). Die Grundlagen der Tiefseemikrobiologie wurden in den 50ern von MORITA & ZOBELL (1955) geschaffen. Sie wiesen eine geringe bakterielle Aktivität nach, was wegen der unwirtlichen Verhältnisse nicht weiter verwunderte. Außerdem zeigten sie das erste Mal die Existenz von barophilen Bakterien, welche nur unter großem Druck wachsen können (MORITA, 1980). Trotzdem ist Wissen über die in den Tiefen verborgene mikrobiologische Vielfalt gering, da das Interesse bislang weniger der mikrobiologischen Vielfalt, als mehr einzelnen, spezialisierten Organismengruppen galt (TAKAMI et al., 1997). Mikrobiologische Forschungsschwerpunkte waren vor allem der Einfluss von Druck auf barophile Tiefsee-Organismen oder bei niedrigen Temperaturen wachsende psychophile Mikroorganismen (YAYANOS, 1995; CANGANELLA, 1996; DELONG et al., 1997; YAYANOS, 2000). Diese Organismen sind darüber hinaus auch für eine industrielle Anwendung interessant. So produzieren barophile und psychophile Mikroorganismen Enzyme, die unter großem Druck oder bei niedrigen Temperaturen arbeiten (HORIKOSHI, 1998). In jüngerer Zeit wurden auch mikrobielle Populationen der Tiefsee taxonomisch charakterisiert (TAKAMI et al., 1997; BULL et al., 2000). Erste Ergebnisse zeigen, dass Actinomyceten oft weniger als 1% der Population darstellen, und es ist nicht eindeutig zu klären, ob diese Organismen in der Tiefsee leben oder ob sie eingeschwemmt wurden (COLQUHOUN et al., 1998-1; COLQUHOUN et al., 1998-2). Obwohl man aus marinen Organismen schon zahlreiche Naturstoffe isoliert hat (FAULKNER,

2002), gibt es bislang keine Naturstoffe, die aus Bakterien stammen, die eindeutig als Tiefseeorganismen identifiziert wurden.

## 2.2 Antarktis

Das mikrobiologische Interesse an der Antarktis begann in den 70er Jahren in der ehemaligen UdSSR (TSYGANOV et al., 1970). Das Interesse der westlich orientierten Länder an antarktischen Mikroorganismen erwachte erst in den 90er Jahren. Entsprechend gibt es wenige Informationen über die biologische Diversität dieser Region. Ein Forschungsschwerpunkt bildet Lake Vostok, der einen abgeschlossenen Lebensraum darstellt und deshalb mit Hoffnung auf völlig unbekannte Gattungen intensiv untersucht wird (KARL et al., 1999). Ansonsten ist das Interesse an Organismen aus der Antarktis sehr speziell an bestimmte Anwendungen gebunden. So bestand und besteht großes Interesse an psychrophilen Organismen als Produzenten von Enzymen oder zur Biodegradation von Erdölen bei niedrigen Temperaturen (DELILLE et al., 2000, MAGESIN et al., 1999). In den letzten Jahren ist das Interesse an möglichen Naturstoff-Produzenten aus dieser Region gestiegen und es wurden einige aus der Antarktis isolierte Actinomyceten beschrieben (LAWSON et al., 2000; SUZUKI et al., 1997; SCHUMANN et al., 1997). Zur Zeit läuft in Australien die erste taxonomische Studie über Actinomyceten aus der Antarktis seit TSYGANOV et al. (1970). Dieser soll eine Untersuchung der biosynthetischen Fähigkeiten dieser Organismen folgen (NICHOLS et al., 1999). Bislang wurden nur wenige Naturstoffe aus antarktischen Mikroorganismen isoliert. Beispiele sind das aus einem Actinomyceten isolierte Sandramycin (HU et al., 2000; WANG et al., 1999), die Komponenten 1010-G1, -G2, -F1 und -F2 aus einem Streptomyceten (IVANOVA et al., 2001) und Metabolit C3368 aus einem Pilz (CHENG et al., 1992-1, CHENG et al., 1992-2)

## 2.3 Alkalische Habitate

Als Alkalophile bezeichnet man solche Organismen, welche optimal bei einem pH-Wert über 8,0 wachsen (GRANT et al., 1990). Taxonomische Studien zeigten, dass es sich bei den alkalophilen Mikroorganismen um eine heterogene Gruppe handelt, die sich aus Archaeobakterien und Eubakterien zusammensetzt. Sie leben vorwiegend aerob oder fakultativ



anaerob. Unter den Eubakterien findet man vor allem Endosporenbildner, wie die Gattung *Bacillus* (MIKAMI et al., 1986; KRULWICH & GUFFANTI, 1989). Alkalophile können aus „normalen“ Habitaten isoliert werden, wie beispielsweise Gartenerde, was wahrscheinlich auf die Fähigkeit von Alkalophilen zurückzuführen ist, ihre Umgebung ihren Bedürfnissen anzupassen (KUMAR & TAGKAGI, 1999). Diese Böden werden jedoch vorwiegend von alkalophilen *Bacillus*-Arten besiedelt, in alkalischen Habitaten ist die Artenvielfalt deutlich größer (GRANT et al., 1990). Die erste Beschreibung eines alkalophilen Stammes erfolgte im Jahre 1928 (DOWNIE & CRUICKHANK, 1928) und bis heute sind Alkalophile vor allem wegen ihrer alkalostabilen Exoenzyme und ihrer Fähigkeit zur Biodegradation basischer Abfälle von besonderer Relevanz (GRANT et al., 1990, HORIKOSHI, 1999; KUMAR & TAGKAGI, 1999). Unter den Alkalophilen finden sich auch Actinomyceten (MIKAMI et al., 1982), und es konnte in einer taxonomischen Studie gezeigt werden, dass die alkalophilen Streptomyceten eine eigene Untergruppe bilden (JIANG et al., 1993). Obwohl viele Enzyme aus alkalophilen Organismen isoliert werden konnten, wurden bislang nur wenige Naturstoffe aus dieser Gruppe beschrieben (SATO et al., 1983). Beispiele sind das YUA001 (BAHN et al., 1998) das Aminoglycosid 2B-B (FANG et al., 1993) und das Peptidantibiotikum 1907 (SATO et al., 1980).

## 2.4 Saure Habitate

Acidophile Organismen wachsen am besten bei einem Umgebungs-pH-Wert, der unter 6,0 liegt (SECKBACH, 2000). Wie die Alkalophilen bilden sie keine homogene Gruppe, sondern setzen sich aus Vertretern der Archea und Eubakterien zusammen (HALLBERG & JOHNSON, 2001). Die Zusammensetzung einer Population hängt stark von der im Habitat herrschenden Temperatur ab. So findet man in Habitaten mit Temperaturen über 60°C fast ausschließlich Archea, bei Temperaturen von 40-60°C Archea und Gram-positive Eubakterien und bei Temperaturen unter 40°C werden die Habitate von Gram-negativen Organismen dominiert (JOHNSON, 1998). Der erste acidophile Organismus wurde 1928 von JENSEN beschrieben. Einsatzgebiete für acidophile Organismen sind die Gewinnung von acidostabilen Enzymen (BOK et al., 1984) und die Biodegradation von sauren Abfällen, wie beispielsweise der Abraum aus Minen (JORDAN et al., 1996) oder Abfälle der Metallindustrie (HALLBERG et al., 1999). In der Literatur finden sich nur wenige Beschreibungen von acidophilen Actinomyceten (FLOWERS & WILLIAMS, 1977, WILLIAMS & FLOWERS, 1978, BOK et al.,

1984), und im Gegensatz zu den alkalophilen Actinomyceten bilden die Vertreter der Streptomyceten keine isolierte Gruppe (PARK et al., 1991). Naturstoffe aus acidophilen Organismen sind bislang nicht bekannt.

### **3 Techniken zur Suche nach neuen Naturstoffen**

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten Naturstoffe nachzuweisen, die von einem Organismus gebildet werden. Man kann diese Methoden in zwei Strategien zuordnen, dem chemischen und wirkungsorientierten Screening.

Beim wirkungsorientierten oder auch biologischen Screening sucht man gezielt nach Substanzen mit einer definierten Wirkung. Das klassische Beispiel hierfür ist der antibiotische Hemmtest, ein Verfahren über das zu Beginn der Naturstoffforschung Antibiotika wie das Penicillin detektiert wurden (RIOS et al., 1988). Jedoch ist ein wirkungsorientierter Test nicht auf den Nachweis antibiotischer Eigenschaften beschränkt. Es sind längst Testsysteme für den Nachweis anderer Eigenschaften entwickelt worden, die beispielsweise enzymatisch arbeiten (YARBROUGH et al., 1993). Anwendung findet diese Art der Naturstoffsuche in dem seit den 90er Jahren in der Industrie eingesetzten High-Throughput-Screening (HTS), bei dem mehr als 100.000 Proben pro Tag auf ihre Wirkung getestet werden können (VOLLERT et al., 2000). Sowohl Durchführung als auch Auswertung der gerade 5-10 µl großen Ansätze erfolgt hier maschinell und computergesteuert. Der Trend zur Automatisierung des Versuchs und zur Miniaturisierung der Probenmengen setzt sich auch weiterhin fort. Eine der neuesten Entwicklungen auf diesem Gebiet ist die sogenannte BioChip-Technologie, bei der biomolekulare Sonden wie DNA, Antikörper oder Peptide als Zielmolekül auf einem Festkörper gebunden werden und so auf einer Oberfläche von 10 mm<sup>2</sup> 1000 Einzelnachweise durchgeführt werden können (WÖLFL, 2000).

Zur Untersuchung von Substanzdiversitäten werden chemische, wirkungsunabhängige Screening-Methoden eingesetzt. Dabei wird zur Analyse meist eine chromatographische Trennung mit einer Detektionsmethode kombiniert. Es gibt aber auch Techniken, wie die MALDI-TOF-Massenspektrometrie (ERHARD et al., 1998), die ohne chromatographische Trennung auskommen. Gängige chromatographische Trennmethode sind Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), Gaschromatographie (GC) und Dünnschichtchromatographie (DC). Oft verwendete Detektoren sind beispielsweise Diodenarray (DAD) (FIEDLER, 1984), Massenspektrometer (MS) (IHN et al., 1997),

Kernresonanzspektroskope (NMR) (ALBERT, 1999, WOLFENDER et al., 2000) und, im Fall einer Auftrennung über Dünnschichtchromatographie, unterschiedliche Färbereagenzien (PASCUAL et al., 2002). Ein Vorteil des chemischen Screenings liegt darin, dass man über Informationen, wie beispielsweise das UV/Vis-Spektrum, eine Datenbank aufbauen und so bekannte Naturstoffe schon im Substanzgemisch identifizieren kann (FIEDLER, 1993)

#### 4 Aufgabenstellung

84 Actinomyceten aus unterschiedlichen Habitaten (Tiefsee, Antarktis, saure und basische Habitate) sollten auf ihre Fähigkeit zur Produktion von Naturstoffen hin untersucht werden. Der Nachweis der Naturstoffe sollte über ein biologisches und ein chemisches Screening erfolgen. Die Ergebnisse aus den zwei Screeningtechniken sollten miteinander in Relation gesetzt werden. Dabei standen die folgenden Fragen im Vordergrund:

- Sind die einzelnen Gruppen als Naturstoffproduzenten begabt?
- Werden unbekannte oder nur bekannte Naturstoffe produziert?
- Finden sich in einer Organismengruppe auffallend viele oder wenige Produzenten neuer Naturstoffe?
- Decken sich die Ergebnisse aus dem biologischen und chemischen Screening?
- Ist die Produktion der Naturstoffe reproduzierbar?

Im Anschluss sollte die Bearbeitung einzelner Stämme im Vordergrund stehen, die durch die Produktion von bislang nicht identifizierten Sekundärmetaboliten aufgefallen waren. Folgende Punkte sollten hier untersucht werden:

- Besteht eine Abhängigkeit der Produktion von verschiedenen Nährlösungen?
- Lässt sich ein Scale-up in den Produktionsmaßstab durchführen?
- Können Isolierungsstrategien für die produzierten Komponenten entwickelt werden?
- Welche Charakteristika weisen die isolierten Substanzen auf?

## II Material und Methoden

### 1 Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden analysereine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

<u>Material</u>	<u>Firma</u>
Bacto Agar.....	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto Nutrient Broth.....	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto Trypton.....	Difco Laboratories, Augsburg
Brain Heart Infusion (BHI).....	Oxoid, Wesel
CaCO <sub>3</sub> .....	Carl Roth, Karlsruhe
Casaminoacids.....	Difco Laboratories, Augsburg
Celit (Hyflo Super-Cel).....	Häffner, Asperg
Cornsteep Powder.....	Hartge Ingredients, Hamburg
Cottonseed Pharmamedia.....	Hartge Ingredients, Hamburg
Dichlormethan.....	Riedel de Haën, Seelze
Ethidiumbromid-Lösung.....	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg
Ferrioxamin B.....	Novartis, Basel
Fetrlon (13%).....	BASF, Ludwigshafen
Fischmehl.....	Sigma, München
Fleischextrakt, Fermtech.....	Merck, Darmstadt
Fragol UCOLUB N115 .....	Fragol Industrieschmierstoffe, Mühlheim Ruhr
Gelatine.....	Merck, Darmstadt
Glucose.....	Cerestar Deutschland, Krefeld
Glycerin (99,5%).....	Henkel, Düsseldorf
Gramicidin S.....	Sigma, München
Hafermehl (Holo Hafergold).....	Neuform International, Zarrentin
Hefeextrakt.....	Oxoid, Wesel
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (chem. rein).....	Riedel-de Haen, Seelze
Komplexagar.....	Caroux, Hamburg

---

Lecithin aus Sojabohnen.....	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Magermilchpulver (Minoform).....	Nestlé, Lindau
Maltose.....	Fluca, Buchs (Schweiz)
Malzextrakt.....	Oxoid, Wesel
Mannit.....	Merck, Darmstadt
Methylthiazoltetrazolium.....	Sigma, München
NadodSO <sub>4</sub> (SDS).....	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid .....	Carl Roth, Karlsruhe
Nutrient Broth.....	Difco Laboratories, Augsburg
Pepton (aus Casein), Fermtech.....	Merck, Darmstadt
Phenol-Mix (neutral).....	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium .....	Difco Laboratories, Augsburg
Proteosepepton.....	Difco Laboratories, Augsburg
Sea Salts.....	Sigma, München
Sojamehl (vollfett).....	Henselwerke, Magstadt
Sojapepton (neutralisiert).....	Oxoid, Wesel
Spanagar.....	Carroux GmbH Co., Hamburg
Stärke, löslich .....	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose.....	Merck, Darmstadt
TES.....	Fisher Scientific, Ulm
Tyrocidin.....	Serva Feinchemikalien, Heidelberg
Tris base.....	Carl Roth, Karlsruhe

## 2 Nährmedien und Puffer

Die Bestandteile wurden nach dem Einwiegen gelöst und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Falls nicht explizit erwähnt beziehen sich die Rezepturen auf jeweils einen Liter Medium. Komplexe Nährlösungen wurden mit Leitungswasser, definierte Medien mit deionisiertem Wasser zubereitet. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte vor dem Autoklavieren mit HCl und NaOH. Medienbestandteile, die mit <sup>(1)</sup> gekennzeichnet sind, wurden getrennt autoklaviert und bei mit <sup>(2)</sup> gekennzeichneten Medien wurde der pH-Wert nach einer Stunde Rühren nachtitriert. Zur Herstellung fester Medien wurde den Rezepturen vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zugesetzt (für Weichagar 0,75%). Für komplexe Nährmedien wurde dabei Spanagar und für definierte Medien Bacto-Agar verwendet.

### 2.1 Nährlösungen für das Screening

Für das Screening der Alkalophilen und Acidophilen wurden die pH-Werte von SGG und NL 19 wie in Tabelle 01 beschrieben eingestellt.

#### NL 19:

Mannit	20 g
Sojamehl, vollfett	20 g
pH 7,5	

#### NL 500:

Stärke, löslich	10 g
Glucose	10 g
Glyzerin	10 g
Fish Meal	15 g
Sea Salts	10 g
pH 8,0 <sup>(2)</sup>	

#### SGG:

Stärke, löslich	10 g
Glucose	10 g
Glyzerin	10 g
Cornsteep Powder	2,5 g
Pepton	5 g
Hefeextrakt	2 g
NaCl	1 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g
pH 7,2	

Tab. 01: pH-Werte für die Erstellung der Medien im Screening

Medium	pH-Wert vor dem Autoklavieren	pH-Wert nach dem Autoklavieren
<b>NL 19</b>	4,0	4,1
	5,0	5,2
	6,0	6,4
	10,0	8,5
	12,0	10,0
<b>SGG</b>	4,0	4,3
	5,0	5,8
	6,0	6,6
	12,0	8,5
	12,6	10,0

## 2.2 Nährlösungen für die Testierung und die Stammhaltung

### Komplexe Nährlösungen:

#### **KM1:**

Bacto Nutrient Broth      8 g  
 NaCl                              5 g  
 deion. Wasser  
 pH 7,2

#### **KM5:**

Hefeextrakt                      4 g  
 Malzextrakt                      10 g  
 Glucose                            4 g  
 pH 5,5

#### **KM2:**

Malzextrakt                      20 g  
 pH 7,0

#### **KM8:**

Bacto-Trypton                  10 g  
 NaCl                                5 g  
 Maltose<sup>(1)</sup>                        2 g  
 Stammlösung 1                  10 ml

#### **KM4:**

Hefeextrakt                      4 g  
 Malzextrakt                      10 g  
 Glucose                            4 g  
 pH 7,3

#### **Stammlösung 1:**

1M MgSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O

**KM 9:**

Bacto Trypton	8 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

**Definierte Nährlösungen:****MM1:**

Glucose <sup>(1)</sup>	5 g
tri-Na-Citrat • 2 H <sub>2</sub> O	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
pH 7,0	

**MM2:**

Glucose <sup>(1)</sup>	8 g
Ammoniumtartrat	4 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	1 g
CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g
MnSO <sub>4</sub> • 1 H <sub>2</sub> O	0,01 g
Ferrioxamin B	0,02 g

**Spurenelementelösung A:**

pro 100ml deion. Wasser

MnCl <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	41,5 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	12 mg

**MM6 (Lemna-Medium):**

KNO <sub>3</sub>	400 mg
CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	540 mg
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	614 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg
Spurenelementelösung A	1 ml
Fetrilon	2,81 mg
pH 4,8	

**MM7 (Chlorella-Medium):**

KNO <sub>3</sub>	400 mg
CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	540 mg
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	614 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg
Spurenelementelösung A	1 ml
Fetrilon	2,81 mg
pH 6,2	

ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	5 mg
CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O	2,5 mg
CoCl <sub>2</sub>	2,5 mg



### 2.3 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

#### $\lambda$ -dil Puffer:

Tris base	1,21 g
MgSO <sub>4</sub> X 7H <sub>2</sub> O	1,20 g
Gelatine	0,10 g
pH 7,4	

#### Glyzerinlösung:

Glyzerin	200 ml
Saccharose	100 g

### 2.4 Nährlösungen für Anzucht und Produktion

#### Komplexe Nährlösungen:

Ist der Name eines Medium mit einem Stern (\*) markiert, so wurde das Medium ohne den Zusatz von CaCO<sub>3</sub> angesetzt ist er mit einem Plus (+) markiert, so wurden zusätzlich 3 g/l CaCO<sub>3</sub> zugesetzt.

#### OM:

Hafermehl	20 g
Spurenelementlösung	5 ml
pH 7,3	

CoCl<sub>2</sub> • 6 H<sub>2</sub>O 4 mg

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O 10 mg

#### SGG:

Stärke, löslich 10 g

Glucose 10 g

Glyzerin 10 g

Cornsteep Powder 2,5 g

Pepton 5 g

Hefeextrakt 2 g

NaCl 1 g

CaCO<sub>3</sub> 3 g

pH 7,3

#### Spurenelementelösung OM:

CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	3 g
Eisen-III-Citrat	1 g
MnSO <sub>4</sub> • 1 H <sub>2</sub> O	200 mg
ZnCl <sub>2</sub>	100 mg
CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O	25 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> • 10 H <sub>2</sub> O	4 mg

**NL 111:**

Malzextrakt	20 g
Fleischmehl	20 g
CaCO <sub>3</sub>	10 g
pH 7,2	

**NL 14:**

Glucose	3 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
CaCO <sub>3</sub>	10 g
pH 7,2	

**NL 19:**

Mannit	20 g
Sojamehl, vollfett	20 g
pH 7,5	

**NL 200:**

Mannit	20 g
Cornsteep Powder	20 g
pH 7,5	

**NL 300:**

Mannit	20 g
Cotton Seed	20 g
pH 7,5	

**NL 333:**

Glucose	5 g
Stärke, löslich	10 g
Malzextrakt	10 g
Hefeextrakt	3 g
Pepton aus Casein	3 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
pH 7,2	

**NL 400:**

Glucose	10 g
Stärke	20 g
Pepton	3 g
Fleischextrakt	3 g
Hefeextrakt	5 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g
pH 7,0	

**NL 410:**

Glucose	10 g
Glyzerin	10 g
Hafermehl	5 g
Sojamehl	10 g
Hefeextrakt	5 g
Casaminoacids	5 g
CaCO <sub>3</sub>	1 g
pH 7,0	

**NL 500:**

Stärke, löslich	10 g
Glucose	10 g
Glyzerin	10 g
Fish Meal	15 g
Sea Salts	10 g
pH 8,0 <sup>(2)</sup>	

**MO1:**

Stärke, löslich	10 g
Glucose	10 g
Glyzerin	15 g
Cornsteep Powder	2,5 g
Pepton	5 g
Hefeextrakt	2 g
NaCl	1 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g

**MO2:**

Stärke, löslich	10 g
Glucose	10 g
Glyzerin	20 g
Cornsteep Powder	2,5 g
Pepton	5 g
Hefeextrakt	2 g
NaCl	1 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g

**MO3:**

Stärke, löslich	10 g
Glucose	10 g
Glyzerin	15 g
Cornsteep Powder	2,5 g
Pepton	5 g
Hefeextrakt	2 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g

**MO4:**

Stärke, löslich	10 g
Glucose	10 g
Glyzerin	15 g
Cornsteep Powder	2,5 g
Pepton	5 g
Hefeextrakt	2 g
NaCl	1 g
CaCO <sub>3</sub>	4 g

### 3 Mikroorganismen und Teststämme

#### 3.1 Produktionsstämme

Die marinen und antarktischen Actinomyceten (KC) stammen aus der Stammsammlung der Reserche School of Biosciences der Universität of Kent (UK) und wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. T. Bull isoliert. Die Isolierung der alkalophilen und acidophilen Organismen erfolgte im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Goodfellow und sie sind in der Stammsammlung des Department Agricultural and Environmental Science der University of Newcastle (UK) aufbewahrt. Es handelt sich hierbei ausschließlich um Streptomyceten. Die genaue Beschreibung der Stämme findet sich in den folgenden Tabellen 02 - 05.

Tab. 02: Beschreibung der antarktisch-terrestrischen Produktionsstämme

<b>Name</b>	<b>Fundort:</b>	<b>Morphologie</b>
<b>KC 1027</b>	Terra Nova Bay Edmundson Point, Antarktis	gelb bis bläulich, weißes LM
<b>KC 1030</b>	Terra Nova Bay Edmundson Point, Antarktis	gelb bis bläulich, weißes LM
<b>KC 1031</b>	Terra Nova Bay Edmundson Point, Antarktis	gelb, weißes LM, gelbe Sporen
<b>KC 1032</b>	Terra Nova Bay Edmundson Point, Antarktis	gelb, weißes LM, grün-gelbe Sporen
<b>KC 1050</b>	Terra Nova Bay Edmundson Point, Antarktis	gelb, weißes LM, gelbe Sporen
<b>KC 1063</b>	Terra Nova Bay Edmundson Point, Antarktis	gelb, weißes LM, gelbe Sporen, Gutationströpfchen
<b>KC 1090</b>	Terra Nova Bay Edmundson Point, Antarktis	gelb, weißes LM, grün-gelbe Sporen
<b>KC 1130</b>	Terra Nova Bay Edmundson Point, Antarktis	gelb, weißes LM, grün-gelbe Sporen

LM = Luftmyzel

Tab. 03: Beschreibung der acidophilen Produktionsstämme

<b>Name</b>	<b>Fundort:</b>	<b>Morphologie</b>
<b>JL 83</b>	Pinienwald Hamsterley Forest, County Durham, England	gelb, aufgefaltet, weißes LM
<b>JL 164</b>	Pinienwald Hamsterley Forest, County Durham, England	grau mit weißen Sprenkeln, Gutationströpfchen
<b>JL 236</b>	Pinienwald Hamsterley Forest, County Durham, England	braun-gelb, weiße LM
<b>JL 256</b>	Pinienwald Hamsterley Forest, County Durham, England	bläulich-weiße Sporen
<b>JL 264</b>	Pinienwald Hamsterley Forest, County Durham, England	pelzig, weißes LM, graue Sporen
<b>JL 272</b>	Pinienwald Hamsterley Forest, County Durham, England	gelb, kein LM
<b>JL 300</b>	Pinienwald Hamsterley Forest, County Durham, England	gelb, weißes LM
<b>JL 336</b>	Kohlenminenabfall East Cramlington Colliery, England	gelb, weißes LM, braun- graue Sporen
<b>JL 365</b>	Kohlenminenabfall East Cramlington Colliery, England	gelb, weißes LM, Gutationströpfchen
<b>JL 367</b>	Kohlenminenabfall East Cramlington Colliery, England	gelb-schleimig, aufgefaltet
<b>JL 415</b>	Kohlenminenabfall, East Cramlington Colliery, England	gelb-schleimig, aufgefaltet
<b>JL 445</b>	Kohlenminenabfall Woodhorn Colliery, England	gelb, kein LM
<b>JL 470</b>	Kohlenminenabfall Woodhorn Colliery, England	gelb, weißes LM
<b>CN 671</b>	?	gelb-schleimig, teilweise weißes LM
<b>CN 732</b>	?	weißes LM, graue Sporen

LM = Luftmyzel

Tab. 04a: Beschreibung der alkalophilen Produktionsstämme (Teil 1)

<b>Name</b>	<b>Fundort:</b>	<b>Morphologie</b>
<b>AK 33</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	weißes LM, graue Sporen, gelbliche Gutationströpfchen
<b>AK 61</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	orange-gelb, beiges LM/Sporen
<b>AK 75</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	gelb, weißes LM
<b>AK 78</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	gelb, braunweißes LM
<b>AK 112</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	braungelb, weißes LM, gelbe Sporen
<b>AK 149</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	graugrün, weißes LM
<b>AK 187</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	weißes LM, grünliche Sporen
<b>AK 197</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	gelb, weißes LM, gelbe Sporen
<b>AK 209</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	gelb, weißes LM, gelbe Sporen
<b>AK 274</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	weißes LM, gelbe Sporen
<b>AK 276</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	weißes LM, grau-gelbe Sporen, Gutationströpfchen
<b>AK 277</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	weißes LM, orange-gelbe Sporen
<b>AK 289</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	weißes LM, grün-gelbe Sporen
<b>AK 340</b>	Sanddüne Warkworth, County Northumberland, England	grün-gelb, weißes LM, grau- gelbe Sporen
<b>AK 363</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	weißes- LM, grau-gelbe Sporen, Gutationströpfchen

LM = Luftmyzel

Tab. 04b: Beschreibung der alkalophilen Produktionsstämme (Teil 2)

<b>Name</b>	<b>Fundort:</b>	<b>Morphologie</b>
<b>AK 382</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	weißes-pelziges LM/Sporen, Gutationströpfchen
<b>AK 384</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	rot, weißes LM
<b>AK 409</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	braun-gelb, weißes LM, braun-gelbe Sporen, Gutationströpfchen
<b>AK 420</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	weißes LM, grau-gelbe Sporen, Gutationströpfchen
<b>AK 473</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	gelb, weißes LM, grün-gelbe Sporen, Gutationströpfchen
<b>AK 503</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	gelb, weißes LM, grün-gelbe Sporen, Gutationströpfchen
<b>AK 532</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	gelb, weißes LM, grün-gelbe Sporen
<b>AK 540</b>	Stahlwerkabfallhaufen Consett, County Durham, England	gelb, weißes LM, grau-grüne Sporen, Gutationströpfchen
<b>AK 623</b>	Pinienwald Hamsterley Forest, County Durham, England	gelb, weißes LM, graue Sporen
<b>AK 645</b>	Pinienwald Hamsterley Forest, County Durham, England	gelb, weißes LM, graue Sporen
<b>AK 671</b>	Pinienwald Hamsterley Forest, County Durham, England	gelb, weißes LM, gelbe Sporen, Gutationströpfchen
<b>AK 686</b>	Wüstensand Matamata, Tunesien	graugelb, kein LM
<b>AK 698</b>	Wüstensand Matamata, Tunesien	grauses LM
<b>AK 713</b>	Wüstensand Daham, Saudi Arabien	gelb, weißes LM, grün-graue Sporen

LM = Luftmyzel

Tab. 05a: Beschreibung der marinen Produktionsstämme (Teil 1)

<b>Name</b>	<b>Fundort:</b>	<b>Morphologie</b>
<b>KC 291</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weißes LM, grün-gelbe Sporen
<b>KC 377-1</b>	4739 m Tiefe Izu-Bonin Trench	gelb, weißes LM, gelbe Sporen
<b>KC 377-2</b>	4739 m Tiefe Izu-Bonin Trench	gelb, weißes LM, gelbe Sporen
<b>KC 409</b>	6000 m Tiefe Ryukyu Trench	gelb, weißes LM, gelbe Sporen
<b>KC 447</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weißes LM, grün-gelbe Sporen
<b>KC 453</b>	6000 m Tiefe Ryukyu Trench	gelb, weißes LM, braun-gelbe Sporen
<b>KC 458</b>	6000 m Tiefe Ryukyu Trench	gelb, weißes LM, gelbe Sporen
<b>KC 503</b>	6370 m Tiefe Japan Trench	rosa, rosa-weißes LM, gelbliche Sporen
<b>KC 520</b>	6370 m Tiefe Japan Trench	rosa, rosa-weißes LM
<b>KC 530</b>	6370 m Tiefe Japan Trench	rosa, rosa-weißes LM
<b>KC 554</b>	6370 m Tiefe Japan Trench	gelb, weißes LM, gelbliche Sporen
<b>KC 558</b>	6370 m Tiefe Japan Trench	gelb, weißes LM, weiße Sporen
<b>KC 574</b>	6370 m Tiefe Japan Trench	gelb, weißes LM, gelbliche Sporen
<b>KC 576</b>	4485 m Tiefe Japan Trench	gelb, weißes LM
<b>KC 582</b>	6370 m Tiefe Japan Trench	grün-gelb, rosa LM/Sporen
<b>KC 591</b>	1171 m Tiefe Japan Trench	gelb bis bläulich, weißes LM, graue Sporen
<b>KC 641</b>	2679 m Tiefe Izu-Bonin Trench	weiß-rosa LM

LM = Luftmyzel



Tab. 05b: Beschreibung der marinen Produktionsstämme (Teil 2)

<b>Name</b>	<b>Fundort:</b>	<b>Morphologie</b>
<b>KC 643</b>	2679 m Tiefe Izu-Bonin Trench	rosa, weißes LM, gelbliche Sporen
<b>KC 644</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weißes LM, dunkelgraue Sporen
<b>KC 647</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weißes LM, dunkelgraue Sporen
<b>KC 659</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weißes LM
<b>KC 674</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weißes LM, dunkelgraue Sporen
<b>KC 680-1</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weiß-gelb-grünes LM, graue Sporen
<b>KC 680-2</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weiß-gelb-grünes LM, graue Sporen
<b>KC 691</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weißes LM, gelbe Sporen
<b>KC 695</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	dunkelrot, kein LM
<b>KC 697</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	orange, kein LM, schwarze Sporen
<b>KC 775</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, gelbes LM/Sporen
<b>KC 780</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weißes LM, grüngelbe Sporen
<b>KC 782</b>	1487 m Tiefe Suruga Bay	gelb, weißes LM, dunkelgraue Sporen, Gutuströpfchen
<b>KC 783</b>	1487 m Tiefe, Suruga Bay	gelb, weißes LM, hellgraue Sporen
<b>KC 784</b>	1487 m Tiefe, Suruga Bay	dunkelorange, weißes LM
<b>KC 786</b>	1487 m Tiefe, Suruga Bay	dunkelrot, kein LM, schwarze Sporen
<b>KC 793</b>	1487 m Tiefe, Suruga Bay	hellorange, kein LM

LM = Luftmyzel

### 3.2 Teststämme zur Erfassung des antibiotischen Wirkspektrums

Tab. 06: Beschreibung der Testorganismen für die antibiologischen Tests und deren Kulturbedingungen

Testorganismus:	Kultivierungsbedingungen		
	Medium	Inkubation	
<b>Gram-positive Prokaryoten</b>			
<i>Arthrobacter aureus</i> DSMZ 20116	KM1	27°C	Ük
<i>Arthrobacter oxydans</i> DSMZ 6612	KM1	27°C	Ük
<i>Arthrobacter pascens</i> DSMZ 20545	KM1	27°C	Ük
<i>Bacillus brevis</i> DSMZ 30	KM1/ MM2	37°C	Ük
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	KM1/ MM1	37°C	Sp
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 381	KM1	27°C	Ük
<i>Mycobacterium phlei</i> DSMZ 750	KM1	27°C	Ük
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSMZ 750	KM1	27°C	Ük
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	KM1	37°C	Ük
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü 57	KM4	37°C	Sp
<b>Gram-negative Prokaryoten</b>			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> DSMZ 30205	KM1/ MM1	27°C	Ük
<i>Escherichia coli</i> K 12	KM1/ MM1	37°C	Ük
<i>Escherichia coli</i> K 12 ROW	KM1/ MM1	37°C	Ük
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSMZ 500 90	KM1/ MM1	27°C	Ük
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35501	KM1	37°C	Ük
<b>Pilze</b>			
<i>Aspergillus viridi nutans</i> CBS 12756	KM5	27°C	Ük
<i>Botrytis cinerea</i> Tü 157	KM2	24°C	Rk
<i>Candida albicans</i> CBS 12754	KM5	27°C	Ük
<i>Mucor hiemalis</i> Tü 179/180	KM5	24°C	Ük
<i>Paecilomyces variotii</i> Tü 137	KM5	37°C	Ük
<i>Penicillium notatum</i> Tü 136	KM5	27°C	Ük
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	KM5	27°C	Ük

ÜK = Übernachtkultur

RK = Riesenkultur

SP = Sporensuspension

### 3.3 Zelllinien zur Bestimmung der antitumoralen Wirkung

Die Testierung auf zytotoxische Aktivität wurde von Herrn Prof. Dr. W. Beil am Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover, im Arbeitskreis von Prof. Dr. W. E. G. Müller am Institut Physiologische Chemie der Universität Mainz und bei der Firma Oncotest in Freiburg durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien sind in Tab. 07 beschrieben.

Tab. 07: Zelllinie für die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität

<b>Teststamm:</b>	<b>Herkunft:</b>	<b>Typ:</b>
HM02	Medizinischen Hochschule Hannover	Magen-Karzinom
HEP G2	Medizinischen Hochschule Hannover	Leber-Karzinom
MCF 7	Medizinischen Hochschule Hannover	Mamma-Karzinom
L5178y	Institut Physiologische Chemie der Universität Mainz	Lymph-Karzinom
HeLa S3	Institut Physiologische Chemie der Universität Mainz	Epithel-Karzinom
HT29	Oncotest in Freiburg	Magen-Karzinom
H460	Onkotest in Freiburg	Lungen-Karzinom
629L	Oncotest in Freiburg	Lungen-Karzinom
66NL	Oncotest in Freiburg	Lungen-Karzinom
1072L	Oncotest in Freiburg	Lungen-Karzinom
529L	Oncotest in Freiburg	Lungen-Karzinom
MCF7	Oncotest in Freiburg	Mamma-Karzinom
401NL	Oncotest in Freiburg	Mamma-Karzinom
276L	Oncotest in Freiburg	Melanom
462NL	Oncotest in Freiburg	Melanom
514L	Oncotest in Freiburg	Melanom
393NL	Oncotest in Freiburg	Nieren-Karzinom
631L	Oncotest in Freiburg	Nieren-Karzinom
944L	Oncotest in Freiburg	Nieren-Karzinom

### 3.4 Teststämme zur Testierung der herbiziden und algiziden Wirkung

Der Nachweis algizider Aktivität wurde mit der coccalen Grünalge *Chlorella fusca*, der Nachweis herbizider Aktivität mit der kleinen Wasserlinse *Lemna minor* geführt (Tab.08).

Tab. 08: Teststämme für die Testierung auf algizide (*Chlorella fusca*) und herbizide Wirksamkeit (*Lemna minor*) und ihre Kulturbedingungen

<b>Teststamm:</b>	<b>Herkunft:</b>	<b>Medium:</b>	<b>Temperatur:</b>
<i>Chlorella fusca</i>	TU Braunschweig, Institut für Mikrobiologie	MM7	24°C
<i>Lemna minor</i>	BASF Versuchsstation Limburger Hof	MM6	24°C

### 3.5 Phage zur Testierung auf antivirale Eigenschaften

Zur Testierung wurde der *E. coli*-lytische Phage T5 verwendet.

### 3.6 Organismen zur Erfassung der antiparasitologischen Spektren

Die Testierung wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Brun am Schweizerischen Tropeninstitut in Basel (Schweiz) durchgeführt.

Tab. 09: Organismen für die Bestimmung der antiparasitologischen Aktivität

<b>Teststamm:</b>	<b>Herkunft:</b>	<b>Krankheit:</b>
<i>Plasmodium falciparum</i>	Schweizerisches Tropeninstitut in Basel	Malaria
<i>Trypanosoma brucei rhodensiense</i>	Schweizerisches Tropeninstitut in Basel	Schlafkrankheit
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Schweizerisches Tropeninstitut in Basel	Chagaskrankheit

## 4 Taxonomische Charakterisierung

### 4.1 Morphologische Charakterisierung

#### 4.1.1 Lichtmikroskopie

Die Morphologie der Organismen wurde mit einem Universal-Mikroskop der Firma Zeiss (Oberkochen) und einem Stereo-Zoom-Mikroskop 6045TR der Firma Olympus (Hamburg) untersucht.

#### 4.1.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden von Herrn H. Schoppmann am Lehrstuhl für Spezielle Zoologie der Universität Tübingen angefertigt.

##### Reagenzien:

Cacodylat-Puffer (pH 7,5):	100 mM Cacodylsäure Natriumsalz-Trihydrat
Glutaraldehyd-Lösung:	2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
Ethanol:	30%, 50%, 70%, 90%, 100%

##### Fixierung:

Mit Hilfe eines Korkbohrers wurden aus einer gut bewachsenen Agarplatte Stücke ausgestochen. Bei Raumtemperatur wurden diese 1 Stunde lang in Glutaraldehyd-Lösung gelegt und im Anschluss für jeweils 10 Minuten mit Cacodylatpuffer und H<sub>2</sub>O gewaschen. Die so fixierten Präparate wurden über eine aufsteigenden Reihe wässrigen Ethanols für jeweils 10 Minuten dehydriert. Es folgte eine „kritische Punkttrocknung“ in einer CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und das Bedampfen mit einer Gold/Palladiumlegierung. Das fertige Objekt wurde auf Silbergrits aufgeklebt. Die Aufnahmen wurden an einem Rasterelektronenmikroskop mit sekundärem Elektronenmodus bei 20 kV angefertigt.

## 4.2 Chemische Charakterisierung

### 4.2.1 Diaminopimelinsäure Bestimmung (DAP)

Die Unterschiede in der Struktur des Peptidoglycans sind bei Gram-positiven Organismen von taxonomischer Relevanz.

10 mg Zellmaterial von einer Platte oder einer lyophilisierten Kultur wurden in 200 µl 6 M HCl suspendiert und 18 Stunden bei 100°C hydrolisiert. Nach dem Abkühlen wurde das Hydrolysat über eine Mini-Nutsche mit Glasfaserfilterpapier (Durchmesser 2 cm) abgenutscht und zwei Mal mit je 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, in 0,5 ml H<sub>2</sub>O gelöst und im Exsikkator über NaOH-Plätzchen über Nacht getrocknet. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Der

Rückstand wurde in 300 µl H<sub>2</sub>O gelöst und in ein Eppendorf-Cup überführt. 5 µl werden auf eine DC-Cellulose-Alufolie (Merck 5552) aufgetragen. Als Referenz wurden 5 µl einer Lösung von 300 µl/ml 2,6-Diaminopimelinsäure (Fluka 33240) aufgetragen. Die Trennung erfolgte mit einem Gemisch aus MeOH–H<sub>2</sub>O–6N HCl–Pyridin (80+26+4+10), Trennstrecke 15 cm (ca. 4,5 Std. Trennzeit). Im Anschluss an die Chromatographie wurden die Folien im Abzug unter Luftzug getrocknet, mit Ninhydrin besprüht und für 5 min bei 100°C erhitzt.

## 5 Kulturbedingungen

### 5.1 Stammhaltung und Konservierung

#### Herstellung einer Glycerinkultur

Aus einer gut gewachsenen Flüssigkultur wurde 1 ml entnommen und mit 1 ml steriler Glycerinlösung gemischt und anschließend bei –20°C eingefroren.

#### Schrägagarröhrchen:

Die Produktionsstämme wurden auf Schrägagarröhrchen mit der Nährlösung KM 4 ausgestrichen, bei 27°C bis zu 9 Tagen inkubiert und anschließend bei +4°C gelagert.

Bei den Organismen zur biologischen Testierung wurden lediglich Kultivierungstemperatur und Medium angepasst (Tab. 6).

Teststamm *Chlorella fusca* wurde auf Schrägagarröhrchen 2-4 Tage mit Helldunkel-Wechsel bei 20°C inkubiert und anschließend lichtdicht verschlossen bei Raumtemperatur gelagert.

#### Nährlösung

*Lemna minor* wurde alle sieben Tage in einen neuen Kolben mit MM6 überführt und bei 20°C mit Helldunkel-Wechsel inkubiert

Sporensuspension:

Ein Schrägagarkolben mit 150 ml KM-Medium wurde mit 1 ml Flüssigkultur beimpft und bis zur vollständigen Sporulation, abhängig vom Organismus, bei 27°C bzw. 37°C inkubiert. Durch Abschwemmen der Sporenketten mit Saline entstand eine Suspension, welche in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit Glasperlen überführt und bei 120 Upm für 30 min geschüttelt wurde. Die so vereinzelt Sporen wurden über Glaswolle abfiltriert und mit Saline ein Titer von  $10^9$  Sporen pro ml eingestellt und Aliquots zu je 1 ml bei -20°C tiefgefroren.

**5.2 Schüttelkulturen**

Die Schüttelkulturen wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich und 100 ml Nährlösung bei 27°C auf einer Schüttelmaschine (Typ RC 106; Infors, Basel, Schweiz) mit einer Drehzahl von 120 Upm kultiviert. Angeimpft wurden die Schüttelkolben jeweils mit 5% einer 48 Stunden alten Vorkultur.

**5.3 Fermentation in Bioreaktoren**

Tab. 10: Technische Beschreibung der Bioreaktoren

<b>Reaktor</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Reaktorvolumen/ Arbeitsvolumen</b>	<b>Rührsystem</b>
Giovanola b 20	Giovanola Freres Monthey, Schweiz	25 l / 20 l	Propellerschleife
Biostat E	B. Braun Biotech International, Melsungen	15 l / 10 l	3 x 6-Blatt-Scheibenrührer
Biostat S	B. Braun Biotech International, Melsungen	12 l / 10 l	3 x 6-Blatt-Scheibenrührer oder Blattrührer-Umwurf-Kombi
Biostat S	B. Braun Biotech International, Melsungen	10 l / 8 l	3 x 6-Blatt-Scheibenrührer
Minis	Eigenbau	500 ml	Kreuzförmiges Magnetührstäbchen

### Vorkulturen:

Die Stammführung für die Fermentationen mit einem Arbeitsvolumen von mehr als 8 l erfolgte mit zwei Vorkulturschritten: zunächst wurde Vorkultur I mit einer Glycerinkultur beimpft und für 48 Stunden wie in II.5.2 beschrieben inkubiert. Das Inokulum von Vorkultur II bestand aus 5 ml der 48 Stunden alten Vorkultur I. Diese wurde erneut unter den gleichen Bedingungen für 48 Stunden kultiviert.

Für die Fermentationen mit einem Arbeitsvolumen von 0,5 l wurde die Vorkultur mit einer Glycerinkultur beimpft und für 72 Stunden inkubiert (II.5.2).

Wenn nicht anders erwähnt, war das für die Vorkulturen gewählte Medium das selbe, mit dem die Fermentation durchgeführt wurde.

### Fermenterkulturen:

Dem Medium der Bioreaktoren wurde vor der Sterilisation 0,05% Antischaummittel (Fragol UCOLUB N115) zugegeben. Weitere Zugaben von sterilem Antischaummittel erfolgten je nach Bedarf im Laufe der Fermentation. Die Sterilisation von Medien und Reaktoren erfolgte *in situ* für 30 Minuten bei 121°C (Biostat S im Autoklaven). Nach dem Sterilisieren und Abkühlen des Mediums auf die Inkubationstemperatur (27°C) wurde der Reaktor mit 5% (v/v) der gut gewachsenen Vorkultur (48 oder 72 Stunden) inokuliert und, falls nicht anders erwähnt, mit 0,5 vvm belüftet. Die Angaben sind auf das Arbeitsvolumen im jeweiligen Bioreaktor bezogen.

## **6 Mess- und Regelvorgänge**

### **6.1 Messdatenerfassung über das Prozessleitsystem**

Über das Prozessleitsystem MFCS Win (B. Braun Biotech International) konnte die Messdaten von pO<sub>2</sub>, pH, Temperatur und Drehzahl online erfasst, gespeichert und ausgewertet werden.

### Sauerstoffpartialdruck:

Die Erfassung des relativen Sauerstoffpartialdrucks (pO<sub>2</sub>) erfolgte kontinuierlich über eine sterilisierbare amperometrische Sauerstoffelektrode vom Typ 02 (Mettler Toledo



Prozessanalytik, Steinbach/Taunus). Die Kalibrierung auf 100% Sättigung wurde unter Prozessbedingungen zu Beginn der Fermentation durchgeführt.

#### pH-Wert:

Der pH-Wert im Verlauf einer Fermentation konnte über eine sterilisierbare Elektrode vom Typ 456 (Mettler Toledo Prozessanalytik) gemessen werden.

### **6.2 pH-Wert Regelung über das Prozessleitsystem**

Der pH-Wert wurde wie in II.6.1 beschrieben erfasst und bei einer Abweichung vom eingestellten Soll-Wert um mehr als 0,2 über konfigurierte Regler eine Pumpe angesteuert welche H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder NaOH zutitriert. Die Normalität der verwendeten Säure und Lauge lag je nach Bedarf und Reaktorgröße zwischen 0.5 und 5.

## **7 Fermentationsanalysen**

### **7.1 Biomasse**

#### Volumetrische Bestimmung des Biomasseanteils:

5 ml Kultur wurden für 5 Minuten bei 3500 x g (Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor 2704, Heraeus Sepatech) in skalierten Probegefäßen zentrifugiert und das relative Volumen des Pellets % (v/v) bestimmt.

#### Bestimmung des Biomasseanteils über das Trockengewicht:

1 ml Kulturbrühe in einem ausgewogenen Eppendorfcup wurde durch Zentrifugation bei 13000 x g für 5 Minuten (Biofuge 13, Heraeus Sepatech, Osterode) in Myzel und Kulturüberstand getrennt. Der Kulturüberstand wurde abgenommen und das Pellet für 24 Stunden bei 100°C getrocknet und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur der Gewichtszuwachs des Eppendorfcup bestimmt.

## 7.2 pH-Wert

Der pH-Wert wurde über eine pH-Elektrode (Blue-Line 16 pH, Schott Glaswerke, Mainz) mit angeschlossenem pH-V-Meter (Knick, Berlin) bestimmt.

## 7.3 Kohlenhydratanalytik

Die im Kulturfiltrat enthaltene Konzentration von Glucose und Glycerin wurde über das Verfahren von PLAGA et al. (1989) bestimmt. Dabei wird eine Normalphasen-HPLC mit einem Refraktometer gekoppelt. Über das Erstellen einer Eichkurve und das Integrieren der Peakflächen konnte die enthaltene Menge bestimmt werden.

### Geräteausstattung:

Chromatograph:	HP 1050 (Agilent Technologies, Waldbronn)
Detektor:	HP 1037 A Refraktometer, 40°C
Integrator:	HP 3390 A
Säule:	CapcellSG 80 NH <sub>2</sub> (5 µm), 250 mm x 4,6 mm I.D. Vorsäule 20 mm x 4,6 I.D. (Grom, Herrenberg)

### Trennparameter:

Mobile Phase:	Isokratische Elution mit ACN/H <sub>2</sub> O (75+25)
Fluss:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl

## 7.4 Ammonium

Über eine Methode von MARING & STEINMANN (1973) erfolgte die Bestimmung der Ammoniumkonzentration. Dabei werden 2 ml Kulturfiltrat mit 120 µl 10 N NaOH versetzt und gerührt. Durch die Alkalisierung wird das Ammonium in Ammoniak umgewandelt, welches im Verlauf der Reaktion mit einer ionenselektiven Elektrode (Modell 9512 ammonia, Orion Research, Boston, USA) und einem angeschlossenen Digital-pH-Meter (Expandable

ionAnalyzer EA 920, Orion Research) quantifiziert wird. Mit Hilfe einer Eichkurve aus der Potentialdifferenz ist es möglich, die Konzentration nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes zu bestimmen.

## **8 Extraktion, Nachweis und Quantifizierung der Metabolite**

### **8.1 Extraktion**

Vor dem Extrahieren wurden die Proben mit NaOH und HCl auf einen für die Extraktion optimalen pH-Wert eingestellt. Dieser war im Normalfall pH 5, nur bei Stamm KC 1030 wurde für alle Versuche nach dem Screening pH 7 eingestellt.

#### Gesamtkulturextrakt:

Je 5 ml Kulturbrühe wurden mit 5 ml Ethylacetat 45 Minuten extrahiert, wobei eine Phasendurchmischung mit Hilfe eines Überkopfschüttlers (REAX 2, Heidolph, Kehlheim) erzielt wurde. Um die Phasen anschließend vollständig zu trennen, wurde im Anschluss 5 Minuten bei 3500 x g zentrifugiert, die organische Phase mit einem Zentrifugalverdampfer (RC 1010, Jouan, Unterhaching) zur Trockene eingengt und für die HPLC-Analysen in 0,5 ml Methanol resuspendiert.

#### Extrakte von Kulturüberstand und Myzel:

Die Auftrennung von 5 ml Kulturbrühe in Myzel und Kulturüberstand erfolgte über Zentrifugation (5 Minuten bei 3500 x g). Nach dem Einstellen des gewünschten pH-Wertes wurde der Kulturüberstand mit 5 ml Ethylacetat 45 Minuten extrahiert, wobei die Phasendurchmischung mit Hilfe eines Überkopfschüttlers (REAX 2, Heidolph) erzielt wurde. Nach der vollständigen Phasentrennung durch erneute Zentrifugation (5 Minuten bei 3500 x g) wurde die organische Phase mit einem Vakuumrotationsverdampfer (RC 1010, Jouan) zur Trockene eingengt und für die HPLC-Analysen in 0,5 ml Methanol resuspendiert.

Die Biomasse wurde mit 5 ml Methanol für 45 Minuten extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren (3000 x g, 5 Minuten) wurde der Überstand zur Trockene eingengt, in 0,5 ml Methanol resuspendiert und mittels HPLC analysiert.

## 8.2 Reversed-Phase-HPLC

Der Nachweis der Metabolite erfolgte über Reversed-Phase-HPLC. Sämtliche Proben wurden vor dem Auftrag auf die HPLC 5 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert.

### Geräteausstattung:

Chromatograph: HP 1090 M mit integriertem Diodenarray-Detektions-  
system (Agilent Technologies)  
Integrator: HP 3392 A  
Steuer- und Auswerteeinheit: Kayak XM 600 ChemStation, A.08.03

### Trennparameter:

Säule: Nucleosil 100 C<sub>18</sub>, 5 µm, 125mm x 4,6 mm I.D.  
Vorsäule: 20 mm x 4,6 mm I.D. (Maisch)  
Detektion: 210 nm, 230 nm, 260 nm 280 nm, 310 nm, 360 nm, 435 nm.  
Injektionsvolumen: 10 µl  
Mobile Phase: A: 0,1% PhoA; B: ACN

<u>Gradient:</u>	Zeit [Minuten]:	A [%]	B [%]
	0	100	0
	15	0	100
	16	0	100

Flussrate: 2 ml/min

### Quantifizierung:

Eine Quantifizierung der Metabolite in den Proben ist über das Integral der Peakflächen im Chromatogramm bei 230 nm möglich. Mit den gereinigten Substanzen wurde eine Eichgerade erstellt, über deren Steigung die Berechnungen vorgenommen wurden.

## 9 Screening

### Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht aller Stämme erfolgte in den unter II.5.2 beschriebenen Schüttelkulturen, die verwendeten Medien waren an die jeweilige Gruppe angepasst. Für die marinen und antarktischen Stämme wurden die Medien SGG (pH 7,0), NL 19 (pH 7,0) und NL 500 verwendet. Die Kultivierung der alkalophilen Organismen erfolgte in SGG und NL 19 mit den pH-Werten 7,0, und 10,0, zum Teil auch noch mit pH 8,5. Die acidophilen Stämme wurden in Medium SGG mit den pH Werten 4,3, 5,8, und 6,6 und in NL 19 mit den pH-Werten 4,1, 5,2, und 6,4 kultiviert.

### Probenahme

Probenahmen erfolgten bei den marinen, antarktischen und alkalophilen Stämmen nach 72 und 120 Stunden. Dabei entnahm man einem Kolben 10 ml Kultur, bestimmte mittels Zentrifugation die Biomasse (siehe II.7.1) und entnahm 1 ml Kulturüberstand für Analysen. Die restliche Kultur wurde auf pH 5 eingestellt und mit 50 ml Ethylacetat für 30 Minuten im Überkopfschüttler extrahiert. Die organische Phase wurde abgenommen, zur Trockene eingengt und in 5 ml Methanol resuspendiert.

Zur Analyse der so gewonnenen Proben wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Screening-Methoden verwendet.

### **9.1 Biologisches Screening**

Für eine biologische Testierung wurden die Extrakte in Methanol gegen mindestens zwei Gram-positive Bakterien, einen Gram-negativen Stamm und einen einzelligen und einen myzelbildenden Pilz aus Tabelle 06 getestet. Das genaue Vorgehen bei der Testierung ist unter II.12.1 beschrieben.

## 9.2 HPLC-DAD-Screening

Beim chemischen Screening mittels standardisierter Reversed-Phase HPLC, gekoppelt mit Diodenarray-Detektion wurden die Extrakte in Methanol und das Kulturfiltrat analysiert. Bei der unter II.11.1 beschriebenen Methode wurde von allen auftretenden Signalen das UV/Vis-Spektren aufgenommen. Dadurch ist es möglich, diese Spektren mit denen von Referenzsubstanzen, die in einer HPLC-UV/Vis-Datenbank gespeichert vorliegen, zu vergleichen und so eine Substanzklassenzugehörigkeit zu ermitteln (HUBER & FIEDLER, 1991; FIEDLER, 1993). Die Übereinstimmung von UV/Vis-Spektren wird über den vom Computer errechneten Matchfaktor ausgedrückt. Dieser liegt bei vollständiger Identität bei 1000, ab 997 kann von identischen UV/Vis-Spektren gesprochen werden. Stimmt zusätzlich die Retentionszeit überein, so kann ein unbekanntes Signal identifiziert werden.

Im Screening waren besonders solche Signale interessant, die einen niederen Matchfaktor und somit gute Chancen für eine neuartige Substanz besaßen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe einer HPLC-UV/Vis-Datenbank (Spektrenbibliothek), in welcher die Daten von etwa 700 Referenzsubstanzen gespeichert sind.

## 10 Isolierung und Reinigung der Metabolite

### 10.1 Trennung von Kulturfiltrat und Biomasse

Die Trennung von Kulturfiltrat und Biomasse erfolgte bei Volumina bis zu 100 ml durch Zentrifugation.

Größere Volumina wurden nach dem Zusatz von 2–3% Celit über eine Mehrschichtfilterpresse, bestückt mit T-1500 Filterschichten (Seitz-Schenk, Waldstetten), geklärt.

### 10.2 Extraktionsverfahren

#### 10.2.1 Extraktion der Biomasse

Falls nicht explizit erwähnt wurde die Biomasse drei Mal für 30 Minuten mit Methanol extrahiert. Bei kleineren Volumina erfolgte die Durchmischung durch einen Überkopfschüttler, für größere Volumina wurde ein Rührer verwendet.

Nach Einengung des Extrakts bis zum wässrigen Anteil wurde weiter wie mit dem Kulturfiltrat verfahren (II.10.2.2).

### 10.2.2 Extraktion des Kulturfiltrates

#### Vorversuche:

Jeweils 5 ml Kulturfiltrat wurden auf pH-Wert 5, 7 und 9 eingestellt und mit 5 ml unterschiedlicher organischer Lösungsmittel extrahiert (Butanol, Ethylacetat, Cyclohexan, Petrolether). Die Durchmischung erfolgte für 30 min im Überkopfschüttler. Nach einer Zentrifugation zur Phasentrennung wurde die organische Phase eingedampft, in 0,5 ml Methanol aufgenommen und mit HPLC analysiert.

#### Versuchsdurchführung:

Unter Einbeziehung der Ergebnisse aus den Vorversuchen wurde der gewünschte pH-Wert eingestellt und mit dem passenden organischen Lösungsmittel (10% des Volumens) extrahiert. Die Fraktionen wurden auf der HPLC analysiert, anschließend vereinigt und zur Trockene eingeengt.

Bei einigen Aufreinigungen wurden mehrere Extraktionen hintereinander durchgeführt, da durch die Kombination von unterschiedlichen pH-Werten und organischen Lösungsmitteln eine höhere Reinheit der Rohextrakte erreicht werden konnte.

## 10.3 Chromatographische Verfahren

### 10.3.1 RP-Chromatographie an Adsorberharzen

#### Vorversuche:

Um das Adsorberharz zu finden, das für die Anreicherung der Metabolite aus dem Kulturfiltrat am besten geeignet war, wurden Vorversuche im kleinen Maßstab durchgeführt. Getestet wurden die Materialien Amberlite XAD-7, XAD-8, XAD-16 (Rohm und Haas Deutschland, Frankfurt) und Sepabead Sp-207 (Mitsubishi Chemicals Europe, Düsseldorf). Dabei wurden 30 ml Kulturfiltrat an 3 ml chromatographiert. Die Elution erfolgte stufenweise

mit jeweils fünf Bettvolumina H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH (8+2), H<sub>2</sub>O/MeOH (6+4), H<sub>2</sub>O/MeOH (4+6), H<sub>2</sub>O/MeOH (2+8) und MeOH. Nach dem Einengen der Eluate zur Trockenheit wurden diese 10fach angereichert im gleichen Methanol-Wasser-Gemisch resuspendiert. Die Auswertung erfolgte auf Basis von HPLC-DAD-Analysen.

#### Versuchsdurchführung:

Entsprechend der Erkenntnisse aus den Vorversuchen wurde das Kulturfiltrat am geeigneten Adsorberharz chromatographiert und aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen eine Auftrennung von hydrophileren und lipophileren Bestandteilen erreicht. Das Bettvolumen des entgasteten Harzes betrug 10% des Auftragsvolumens. Der Auftrag des Kulturfiltrats erfolgte mit einem maximalen Fluss 5 BV pro Stunde, zum Spülen und Eluieren wurde die Flussrate auf 10 BV pro Stunde erhöht. Zunächst wurde die beladene Säule mit 10 BV H<sub>2</sub>O und im Anschluss mit 5 BV des Fließmittels gespült, bei dem die Komponenten gerade noch nicht eluiert werden. Zuletzt folgte die Elution der Komponenten mit dem bei den Vorversuchen ermittelten Fließmittel. Dieses Eluat wurde zur wässrigen Phase eingengt.

### **10.3.2 Adsorptionschromatographie an LiChrorep Diol**

#### Geräteausstattung:

Pumpe: B 681 (Büchi, Buchs, Schweiz)  
Gradientenformer: B 687 (Büchi)  
Detektor: Zweikanal-Detektor ISCO UA-5 (Axel Semrau, Sprockhöfel)  
Fraktionssammler: Ultrorac II (Pharmacia-LKB, Freiburg)

#### Trennparameter:

Säulenmaterial: LiChrorep Diol (40 – 63 µm, Merck)  
Säulen: 40 cm x 2,6 cm I.D. (Büchi)  
Flussrate: 5 ml/min  
Mobile Phase: A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
B: MeOH



Gradienten:

<u>Gradient A1:</u>		
Zeit [Minuten]	A [%]	B [%]
0	100	0
60	100	0
240	0	30

<u>Gradient A2:</u>		
Zeit [Minuten]	A [%]	B [%]
0	100	0
30	100	0
240	0	10

### 10.3.3 Ausschlusschromatographie an Sephadex oder Fractogel

Die zur Trockene eingegangenen Fraktionen wurden in maximal 3 ml eines geeigneten Lösungsmittels (MeOH, MeOH + 0,1% Essigsäure) resuspendiert, aufgetragen und an Sephadex oder Fractogel chromatographiert.

#### Geräteausstattung:

Detektor: Zweikanal-Detektor ISCO UA-5 (Colora Messtechnik)  
Fraktionssammler: Ultrorac II (Pharmacia-LKB)

#### Trennparameter:

Säulenmaterial: Sephadex LH-20 (Amersham BioScience, Freiburg)  
Fractogel TSK HW40S (32-63  $\mu\text{m}$ , Merck)  
Säulen: 90 cm x 2,5 cm I.D.  
Mobile Phasen: A: MeOH  
B: MeOH + 0,1% Essigsäure  
C: H<sub>2</sub>O  
D: H<sub>2</sub>O + 0,1% Essigsäure  
Flussrate: 20 ml/Std (2,5 cm I.D.)

Es wurden Fraktionen von 10-15 ml Volumen aufgefangen und mit HPLC-DAD analysiert.

### 10.3.4 Präparative HPLC

Für jede Substanz wurde mit Vorversuchssäulen (250 mm x 4,6 mm I.D.) an der analytischen HPLC ein optimierter Gradient mit den geeigneten mobilen Phasen ausgearbeitet.

#### Geräteausstattung:

Chromatograph: 2 x Sepapress HPP 200/100 High Performance Pump (Kronwald, Sinsheim)  
 Gradientenmodul: Sepacon GCU-311 Gradient Control Unit (Kronwald)  
 Detektor: UV-Detektor Gilson Modell 116 (Abimed, Langenfeld)  
 Schreiber: 2-Kanal Schreiber, Modell N-2 (Abimed)  
 Injektor: Valco Mod. 6UW mit 5 ml-Probenschlaufe (Macherey & Nagel)

#### Trennparameter:

Säulen: Nucleosil-100 C-18, 10 µm, 250 mm x 16 mm I.D. (Maisch)  
 LiChrospher RP-Select B, 10 µm, 250 x 16 mm I.D.(Grom)

Mobile Phase: A: H<sub>2</sub>O  
 B: 0,5% Ameisensäure  
 C: MeOH

#### Gradienten: Gradient P1:

Zeit [Minuten]	A oder B [%]	C [%]
0	80	20
20	40	60

#### Gradient P2:

Zeit [Minuten]	A oder B [%]	C [%]
0	60	40
20	20	80

#### Gradient P3:

Zeit [Minuten]	A oder B [%]	C [%]
0	20	80
20	0	100

Injektionsvolumen: 2–5 ml  
Flussrate: 24 ml/min

## 11 Physikalische und chemische Charakterisierung

### 11.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die Detektion der von der HPLC eluierten Komponenten erfolgte über ein Diodenarray-System (II.8.2). Die UV/Vis-Spektren wurden im Bereich von 200 bis 600 nm aufgezeichnet, sobald Absorption gemessen wurde. Die Auswertung der Spektren erfolgte computergestützt durch den Vergleich mit den Spektren der HPLC-UV/Vis-Datenbank des AG Mikrobiologie/Antibiotika der Universität Tübingen (FIEDLER, 1993). Über die UV/Vis-Spektren und die Retentionszeiten lassen sich bei standardisierten Bedingungen Aussagen über die Zugehörigkeit zu bestimmten Naturstoffgruppen machen, oder bei Übereinstimmung von beiden ist eine Identifizierung der Substanzen möglich (HUBER & FIEDLER, 1991).

### 11.2 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung der einzelnen Substanzen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Bringmann, Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg von Dipl. Chem. Andreas Hamm, Dipl. Chem. Gerhard Lang und Dipl. Chem. Robert Pfeifer und in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Jung, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen von Dr. Alexandra Höltzel und Dipl. Chem. Dietmar Schmid durchgeführt. Sie erfolgte durch das Zusammenspiel verschiedenster spektroskopischer Verfahren wie Massenspektrometrie, hochauflösende FT-ICR-Massenspektrometrie,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie, sowie zweidimensionaler NMR-Techniken.

## 12 Biologische Charakterisierung

### 12.1 Agardiffusionstests

#### Durchführung des Agardiffusionstests:

Nach dem Herstellen der im Anschluss beschriebenen Testplatten, wurden diese mit Filterrondellen mit 6 mm Durchmesser (Macherey & Nagel) bestückt, welche vorher mit 20

µl der Probenlösung beschickt und bei Raumtemperatur getrocknet worden waren. Nach 24- bis 48-stündiger Inkubation wurden die Durchmesser der Hemmhöfe oder Wachstumshöfe ausgemessen. Die Kultivierungsbedingungen der einzelnen Organismen finden sich in Tabelle 06.

### **12.1.1 Nachweis einer antibiotischen Aktivität**

Zum Nachweis einer antibiotischen Aktivität wurde ein Agardiffusionstest mit den unter II.3.3 aufgeführten Teststämmen durchgeführt (ZÄHNER & MAAS, 1972).

#### Übernachtskulturen:

Die Kultivierung der Testorganismen erfolgte über Nacht in 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich, gefüllt mit 100 ml Komplexmedium auf einer Schüttelmaschine (Typ RC 106, Infors) mit 120 Upm.

Das Pellet der Übernachtskultur wurde nach dem Abzentrifugieren bei 3500 x g in Saline resuspendiert und eine OD<sub>546nm</sub> von 1,3 eingestellt. 1 ml Zellsuspension diente als Inokulum für 100 ml flüssiges Agarmedium (50°C). Petrischalen wurden mit je 10 ml Agar beschickt. Bei Verwendung von chemisch-definierten Agarmedien wurde ein Waschschrift mit Saline zwischengeschaltet.

#### Sporen:

Zur Herstellung von Testplatten mit Sporen wurden 1 ml Sporensuspension mit 10<sup>9</sup> Sporen pro Milliliter zu 100 ml flüssigem Agar (50°C) gegeben. Petrischalen wurden mit 10 ml des beimpften Agars beschickt.

#### Test an der Riesenkolonie:

Der Test an Riesenkolonien von langsam wachsenden Pilzen beruht auf der Methode von HÜTTER et al. (1965). Aus einer bewachsenen Platte wurde mit einem sterilen Korkbohrer ein Agarstück ausgestanzt und ins Zentrum einer frischen Agarplatte (17,5 ml, KM2) platziert. Die Platte wurde vor der Testdurchführung über 3 Tage bei 24°C vorinkubiert.

### 12.1.2 Nachweis von algizider Aktivität (Chlorella-Test)

Die Grünalge *Chlorella fusca* wurden in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit MM7 als Standkultur für etwa 3 Tage vorinkubiert. Die Algen wurden in sterilen Falcon-Tubes bei 3000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und danach eine OD<sub>578nm</sub> von 4 eingestellt. Pro Testplatte wurden 5 ml MM7-Weichagar (56°C) mit 0,1 ml der Algensuspension vermischt und gleichmäßig auf eine Petrischale mit 10 ml MM7-Grundagar geschichtet.

### 12.1.3 Nachweis einer DNA-schädigenden Wirkung

Der  $\lambda$ -lysogene Stamm *E. coli* K12 ROW und der Kontrollstamm *E. coli* K12 wurde in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich in 100 ml KM 1 bei 37°C auf einer Schüttelmaschine mit 120 Upm über Nacht kultiviert. Die Kulturen wurden mit  $\lambda$ -dil Puffer auf eine OD<sub>546nm</sub> von 0,2 verdünnt. Pro Testplatte wurden 100  $\mu$ l Zellsuspension mit 2,5 ml geschmolzenem KM 8-Agar (40°C) am Vortex gemischt und die Mischung auf eine vorbereitete Platte mit 10 ml KM 8-Grundagar ausgegossen.

Durch eine DNA Schädigung entsteht bei dem  $\lambda$ -lysogenen *E. coli* ein Hemmhof mit deutlichen Lysehöfen. Zeigt sich bei der Kontrolle ebenfalls ein Hemmhof, so ist der Hemmhof allerdings der antibiotischen Wirkung zuzuschreiben. Kontrollzellen und der  $\lambda$ -lysogene Stamm werden gleichermaßen gehemmt.

### 12.1.4 Untersuchung zur Phagen-hemmenden Wirkung

Dieser Test ist nur mit Komponenten möglich, die keine Aktivität gegen *E. coli* haben.

#### Herstellung des Phagenlysats

*E. coli* K12 wurde in ca. 1 ml KM 9 Medium unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> über 0,1 angezogen. 2,5 ml TY-Weichagar (ca. 40°C) wurden mit 0,05 ml sterilem CaCl<sub>2</sub> (0,1 M), 0,1 ml T5-Phagenlysats in verschiedenen Verdünnungen und 0,1 ml Zellsuspension versetzt und nach dem Mischen gleichmäßig auf eine KM 9-Grundagarplatte gegossen. Nach 8-16 Stunden Inkubation bei 37°C konnte man bei einigen Platten eine konfluente Lyse (relativ klare Platte, einzelne Kolonien) beobachten. Der Weichagar dieser Platten wurde mit 3 ml Saline vermischt, die Suspension in ein steriles Falcontube überführt und 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcontube überführt, mit etwa 0,3 ml

Chloroform versetzt und bei 37°C 15 min geschüttelt. Dieses Phagenlysat ist im Kühlschrank über Monate haltbar.

### Testdurchführung

Eine Übernachtskultur von *E. coli* K12 wurde in KM 1 unter Schütteln bei 37°C angezogen und in Anschluss mit Saline auf eine OD<sub>546nm</sub> von 0,2 verdünnt. Vom Phagenlysat wurden mit λ-dil Puffer die Verdünnungen 10<sup>-3</sup> und 10<sup>-6</sup> hergestellt. Zu 100 µl Zellsuspension wurden 5 µl Phagenlysat gegeben und in einem Vortex ordentlich gemixt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2,5 ml geschmolzener KM 9-Weichagar (40°C) hinzugegeben, das ganze am Vortex gemischt und die Mischung auf eine vorbereitete Platte mit 10 ml KM 9-Grundagar ausgegossen. Nach dem Erkalten wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet. Die Verdünnung, welche eine konfluente Lyse erzeugte, wurde für die Tests verwendet. Dabei wurde nach dem Erkalten die Platten mit den Testplättchen bestückt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch die Hemmung der Phagen durch die aufgebrauchten Substanzen kommt es zu einem Wachstumshof um das Testplättchen.

## **12.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)**

Die zu testenden Antibiotika wurden in den folgenden Konzentrationen in DMSO gelöst: 2 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,006 mg/ml, und 0,002 mg/ml. Die Testorganismen (Tab. 06) wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich in 100 ml Komplexmedium bei 27°C bzw. 37°C auf einer rotierenden Schüttelmaschine (Typ RC 106, Infors) mit 120 Upm über Nacht inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 3500 x g und einem Waschschrift in Saline wurde die OD<sub>546nm</sub> auf 0,1 eingestellt.

### Testdurchführung:

Die Teströhrchen hatten einen Innendurchmesser von 16 mm.

Kontrolle 1: 1,8 ml NL + 0,1 ml DMSO

Kontrolle 2: 1,8 ml NL + 0,2 ml Zell- oder Sporensuspension

Kontrolle 3: 1,8 ml NL + 0,1 ml DMSO + 0,2 ml Zell- oder Sporensuspension

Testansatz: 1,8 ml NL + 0,1 ml Antibiotikumlösung + 0,2 ml Zellsuspension

Die Teströhrchen wurden bei 27°C über Nacht auf einer rotierenden Schüttelmaschine (Typ HT, Infors) bei 160 Upm inkubiert. Die Testauswertung erfolgte über die visuelle Begutachtung der Trübung nach 24 und 48 Stunden sowie durch mikroskopische Kontrolle. Als MHK wurde die minimale Konzentration des Antibiotikums im Testansatz gewertet, bei der noch keine Trübung zu erkennen war.

### 12.3 Test zum Nachweis der herbiziden Aktivität (Lemna-Test)

Etwa 7 Tage vor Testbeginn wurde die Wasserlinse *Lemna minor* in 300 ml Weithals-Erlenmeyerkolben gefüllt mit 150 ml MM6 in einer Klimakammer mit Hell/Dunkel-Wechsel bei 24°C vorgezogen.

#### Testdurchführung:

Die Testierung wurde in 24-Loch-Platten (Corning Glass Works, Corning, New York) im Doppelansatz durchgeführt. In die Vertiefungen wurden je 200 µl der gelösten Substanz (1mg/ml) pipettiert und das Lösungsmittel abgedampft. Nach der Zugabe von 1 ml Nährlösung MM7 mit Agar wurde auf den erstarrten Agar ein Lemna-Pflänzchen mit 2 Blättern und zurückgeschnittener Wurzel aufgelegt. Die Auswertung erfolgte nach 3 bzw. 5 Tagen Inkubation in der Klimakammer bei 24°C und 60% unter Verwendung einer Boniturskala von 0 bis 8 (Tab.11). Dabei wurde das Wachstum (Zunahme der Blattzahl), Bleichungseffekte und der Gesamteindruck der Pflanze im Vergleich zu einer Kontrolle beurteilt.

Tab.11: Boniturskala *Lemna minor*

<b>Bonitur:</b>	<b>Wirkung:</b>
0	keinerlei Wirkung
2	weniger als 50% Bleichung, 50-90% Wachstum
5	Mindestens 50% Bleichung; 10-50% Wachstum
8	vollständige Wachstumshemmung und Ausbleichung

## 12.4 Hemmung von Tumorzellen in Zellkulturen

### 12.4.1 Hemmung von Tumorzellen

#### HMO2, MCF7 und HEPG2

Die Testierung auf zytotoxische Aktivität wurde am Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover von Herrn Prof. Dr. W. Beil durchgeführt. Der Test beruht auf der Methode von GREVER et al. (1992).

Es wurden folgende Zelllinien zur Testierung verwendet: HMO2 (Magenadenokarzinom), MCF7 (Mammakarzinom) und HEPG2 (Leberkarzinom). Diese Tumorzellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% Kälberserum in 96-Loch-Mikrotiterplatten inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die zu prüfenden Substanzen gelöst in DMSO hinzugefügt. Die Konzentrationen im Prüfansatz betragen 0,1; 0,5; 1; 5; 10 und 50 µg/ml, wobei die DMSO-Konzentration nie mehr als 1% überstieg. Die Tumorzellen wurden für weitere 24 Stunden inkubiert und danach die Lebendzellzahl mit Hilfe von Sulforhodamin ermittelt. Über die so erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven konnten folgende Werte bestimmt werden:

**GI<sub>50</sub>**: Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung des Zellwachstums bewirkt

**TGI**: Konzentration, die eine vollständige Hemmung des Zellwachstums bewirkt

**LC<sub>50</sub>**: Konzentration, bei der eine halbmaximale zytotoxische Wirkung auftritt

#### L5178y und HeLa S3

Die zweite Testierung auf zytotoxische Aktivität wurde in der Abteilung Angewandte Molekularbiologie des Instituts für Physiologische Chemie der Universität Mainz im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. E. G. Müller durchgeführt. Der Test beruht auf der Methode von MÜLLER et al. (1985) und SCHRÖDER et al. (1991).

Die in II.3.3 beschriebenen Zelllinien L5178y und HeLa S3 wurden in RPMI-Medium mit 10% Kalbsserum und die Zelllinie PC-12 in RPMI-Medium mit 10% Pferde- und 3% fötalem Kalbsserum kultiviert. Zum Zeitpunkt 0 wurden zu 200 µl Kultur unterschiedliche Konzentrationen der zu testenden Substanz hinzugegeben, wobei die maximale Konzentration 20 µg/ml betrug. Die Kulturen wurden mit 5x10<sup>4</sup> Zellen/ml (L5178y) bzw. 30x10<sup>4</sup> Zellen/ml (HeLa S3) beimpft und für 72 Stunden bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl Methylthiazoltetrazolium (2



mg/ml) und einer dreistündigen Inkubationsperiode wurden 50 µl wässriges SDS (20%) zugegeben und die OD<sub>595 nm</sub> über ein ELISA Lesegerät bestimmt. Die 50% Hemmung (GI<sub>50</sub>) wurde über eine logarithmische Regressionsgerade bestimmt.

#### 12.4.2 Zellzyklusanalyse

Mit dieser Methode kann bestimmt werden, in welcher Zellzyklusphase das Wachstum der HepG2 Zellen unterbrochen wird. Die Verteilung über die verschiedenen Phasen wurde durch eine Färbung der DNA mit Propidium Jodid bestimmt. HepG2 Zellen wurden für 24 Stunden mit 5µl/ml (6R, 10S)-10-Methyl-6-dodecanolid behandelt, über Trypsinisierung geerntet, mit RPMI 1640 mit 1% fötalem Rinderserum gewaschen und in 125 µl einer Lösung mit 150 µg Propidium Jodid, 1% Triton X-100, 1% fötalem Rinderserum und 4 mM Natrium-Citrat-Puffer bei pH 7,4 resuspendiert. Nach 15 Minuten Inkubation unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur wurde das gleiche Volumen RNase A (10mg/ml in 10 mM Tris und 15 mM NaCl, pH 7,4) zugegeben und der Ansatz für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Am Ende der Inkubationsperiode folgte die Analyse der Zellen über einen Becton Dickinson FACSscan und Lysis II Software.

#### 12.5 Test auf Hemmung unterschiedlicher parasitärer Krankheitserreger

Die Testierung wurde am Schweizerischen Tropeninstitut in Basel im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. R. Brun durchgeführt.

##### *Plasmodium falciparum*

Der Test beruht auf der Methode von DESJARDINS et al. (1979) und RIDLEY et al. (1996). Infizierte humane Blutzellen wurden in 96-Loch-Platten unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Komponenten ausgesetzt und für 48 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre mit erniedrigtem Sauerstoff und erhöhtem CO<sub>2</sub> Gehalt inkubiert. Nach einer Zugabe von [<sup>3</sup>H] Hypoxanthin wurden die Kulturen erneut 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte, indem die Kulturen auf Glasfiltern geerntet und die Zellzahl über einen Szintillationszähler bestimmt wurde. Über die sigmoidale Kurve der Ergebnisse wurde der IC<sub>50</sub> (halbmaximale Hemmung) bestimmt.

*Trypanosoma cruzi*

Der Test wurde in 96-Loch Mikrotiterplatten mit je 100 µl RPMI 1640-Medium mit 10% fötalem Kälberserum und 2mM L-Glutaminin durchgeführt. Die einzelnen Ansätze wurden mit 2000 L-6 Zellen gestartet und nach 24 Stunden 5000 Trypomastigotes von *T. cruzi* und unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Komponenten zugesetzt und die Ansätze für 96 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Gehalt inkubiert. Die Auswertung erfolgte über eine Zugabe von CPRG/Nonidet zu den Kulturen. Die Färbereaktion, die sich in den nächsten 2-4 Stunden entwickelte, wurde photometrisch bei 540 nm vermessen und der IC 50 aus der Hemmungskurve bestimmt. Die Zytotoxizität der Substanzen wurde über einen Ansatz mit nicht-infizierten L-6 Zellen bestimmt, die nach 4 Tagen mikroskopisch ausgewertet wurden.

*Trypanosoma brucei rhodensiense*

96-Loch Mikrotiterplatten wurden mit 50 µl Minimum-Essential-Medium (BALTZ et al., 1985) mit 2-Mercaptoethanol und 15% hitzeinaktiviertem Pferdeserum bestückt. Unterschiedliche Verdünnungen der zu testenden Droge und je 50 µl Trypanosomen-suspension wurden in die Vertiefungen pipettiert und für 72 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> Gehalt inkubiert. Nach einer Zugabe von [<sup>3</sup>H] Hyproxanthin wurden die Kulturen erneut 24 Stunden inkubiert. Zur Auswertung wurden 10 µl Alamar blue in jede Probe pipettiert und erneut 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte an einem Millipore Cytofluor 2300 mit einer Ausgangswellenlänge von 530 nm und einer Emmisionswellenlänge von 590 nm (RÄZ et al., 1997).

### III Ergebnisse

#### 1. Das Screening

Bearbeitet wurden insgesamt 86 Actinomyceten (s. II.3.1), die aus Erdproben unterschiedlichsten Ursprungs isoliert worden waren. Nach der Herkunft dieser Sedimentproben erfolgte eine Einteilung in vier Gruppen: Tiefseeorganismen, antarktische, acidophile und alkalophile Organismen. Um sie auf ihre Fähigkeit zur Produktion von Sekundärmetaboliten zu untersuchen, wurden diese Stämme in Schüttelkulturen angezogen, wobei die Kultivierungsbedingungen den vier Typen angepasst waren. Die verwendeten Nährlösungen und die Zeitpunkte der Probenahme sind in Tabelle 12 aufgelistet. Die Analyse der Proben aus dem Screening erfolgte über einen antibiotischen Plattendiffusionstest und durch ein chemisches Screening über HPLC-DAD. Die detaillierten Ergebnisse für die einzelnen Stämme finden sich im Anhang.

Tab. 12: Verwendete Nährlösungen im Screening

<b>Herkunft</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Nährlösungen</b>	<b>pH-Wert</b>	<b>Inkubationsdauer [Stunden]</b>
Tiefsee	34	NL 19, SGG, NL 500	7,0	72, 120
Antarktis	8	NL 19, SGG, NL 500	7,0	72, 120
Acidophil	15	NL 19, SGG	4,0 - 7,0	72, 96, 144
Alkalophil	29	NL 19, SGG	7,0	72, 120

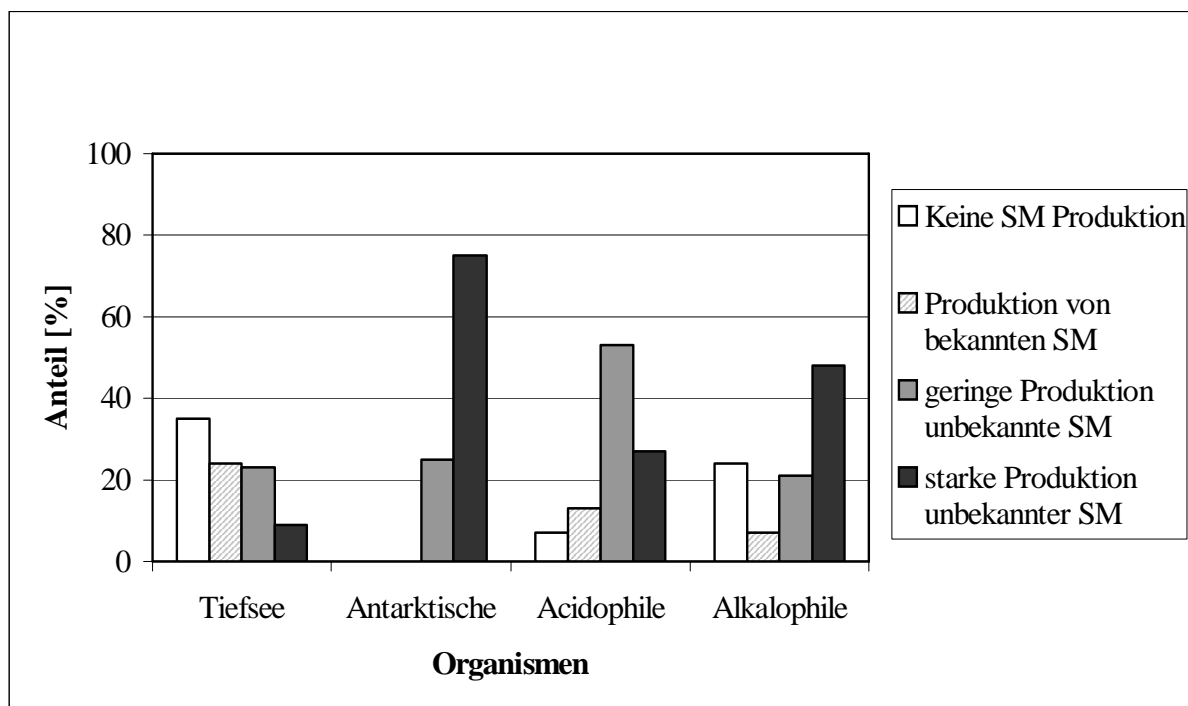
#### 1.1 Das chemische Screening

Das chemische Screening mit HPLC-DAD (II.9.2) wurde sowohl mit dem Kulturfiltrat als auch mit den Gesamtkulturextrakten durchgeführt. Die Proben wurden über Reversed-Phase-Chromatographie aufgetrennt und die UV/Vis-Spektren im Bereich von 200 bis 600 nm mit einem Diodenarray-Detektor aufgezeichnet. Die Spektren wurden mit den Spektren anderer Naturstoffe verglichen, die in der HPLC-UV/Vis-Datenbank der AG Mikrobiologie/Antibiotika der Universität Tübingen gespeichert sind (FIEDLER, 1993). Bereits bekannte Sekundärmetabolite konnten darüber identifiziert werden.

Die Stämme wurden nach den Ergebnissen des chemischen Screenings in Gruppen eingeordnet: Organismen, die keine Sekundärmetabolite produzieren, Stämme, die nur über

HPLC-DAD identifizierte Metabolite bilden und Produzenten von unbekanntem Naturstoffen. Die Produzenten unbekannter Naturstoffe wurden in Stämme mit starker und geringer Produktion unterteilt, wobei stark produzierende Stämme mindestens zwei unbekannte Metabolite in großer Menge (Höhe der Peaks größer als 500 mAU) oder mehr als drei unbekannte Metabolite produzieren.

Wie in Abbildung 01 zu sehen, fiel im chemischen Screening besonders die Gruppe der antarktischen Organismen positiv auf. Für alle acht Stämme konnte eine geringe oder starke Produktion von bislang unbekanntem Metaboliten nachgewiesen werden. Des Weiteren fanden sich in den Gruppen der Acidophilen und Alkalophilen viele Produzenten nicht identifizierter Substanzen. Bei den Tiefseeorganismen konnte für einen beträchtlichen Teil der Stämme keine Produktion oder nur die Produktion bekannter Substanzen nachgewiesen werden.



SM= Sekundärmetabolite

Abb. 01: Ergebnisse aus dem chemischen Screening der vier Gruppen

## 1.2 Biologisches Screening

Im biologischen Screening wurden die Gesamtkulturextrakte auf antibiotische Wirkung hin untersucht. Die Analyse erfolgte über einen Agardiffusionstest (II.12.1) mit den Testorganismen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Botrytis cinerea*. Die Auswertung erfolgte optisch über die Erfassung der Hemmhofgröße. Eine Kategorisierung der Ergebnisse erfolgte in drei Gruppen. Ohne Hemmhof lag keine Aktivität vor, während alle Extrakte von Stämmen als gering aktiv bezeichnet wurden, deren Hemmhöfe maximal einen Durchmesser von 12 mm aufwiesen. Eine Einordnung als stark aktiv wurde vorgenommen, sobald ein Hemmhof einen Durchmesser von mehr als 12 mm aufwies.

In Abbildung 02 sind die Ergebnisse aus den einzelnen Gruppen grafisch dargestellt. Man sieht, dass beim antibiotischen Screening die für eine weitere Bearbeitung attraktivste Gruppe die der antarktischen Mikroorganismen war. Es folgt die Gruppe der Alkalophilen, von denen 97% aller Stämme antibiotische Wirkung zeigten. Beachtet man ausschließlich die Stämme mit starker Hemmwirkung, so war der Anteil bei den Alkalophilen mit 76% am größten.

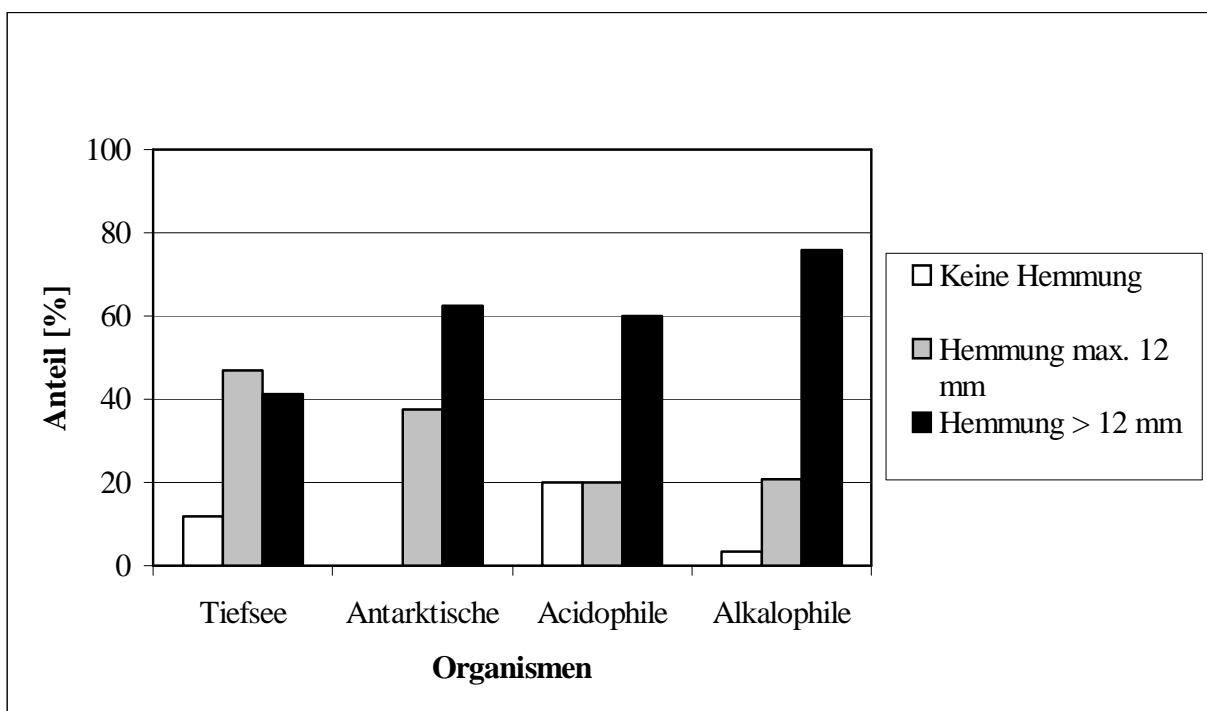


Abb. 02: Darstellung der Ergebnisse aus dem biologischen Screening

### 1.3 Vergleich der Ergebnisse aus dem chemischen und biologischen Screening

Bei einer Gegenüberstellung der Resultate, die man aus dem biologischen und chemischen Screening erhält, sieht man zum Teil deutliche Unterschiede. Während beim chemischen Screening unter den Alkalophilen nur 76% als Sekundärstoffproduzenten identifiziert wurden, zeigten doch 97% der Stämme im biologischen Screening antibiotische Aktivität. Auch die Tiefseeorganismen, von denen im chemischen Screening 65% unbekannte Naturstoffe produzierten, zeigten mit 85% einen höheren Anteil an Stämmen, die antibiotische Substanzen bildeten. So konnte ein durch den Biotest als interessant eingestufte Stamm im chemischen Screening durchaus unauffällig sein. Aber auch das Gegenteil war der Fall. Beispielsweise waren bei den alkalophilen Actinomyceten acht Organismen über das chemische Screening als nicht bearbeitenswert eingestuft worden, im biologischen Screening jedoch waren die Extrakte aller bis auf einen Organismus aktiv. Den umgekehrten Fall findet man bei den acidophilen Organismen. Hier zeigten die Extrakte von drei Organismen keine biologische Aktivität, während über das chemische Screening zwei von ihnen als bearbeitenswert eingestuft worden waren.

In Abbildung 03 ist graphisch aufgeschlüsselt, zu welchem Prozentsatz die Stämme nur beim chemischen oder antibiotischen Screening eine positive Bewertung erhielten und welcher Anteil der Stämme mit beiden Methoden keine positiven Ergebnisse erbrachte.

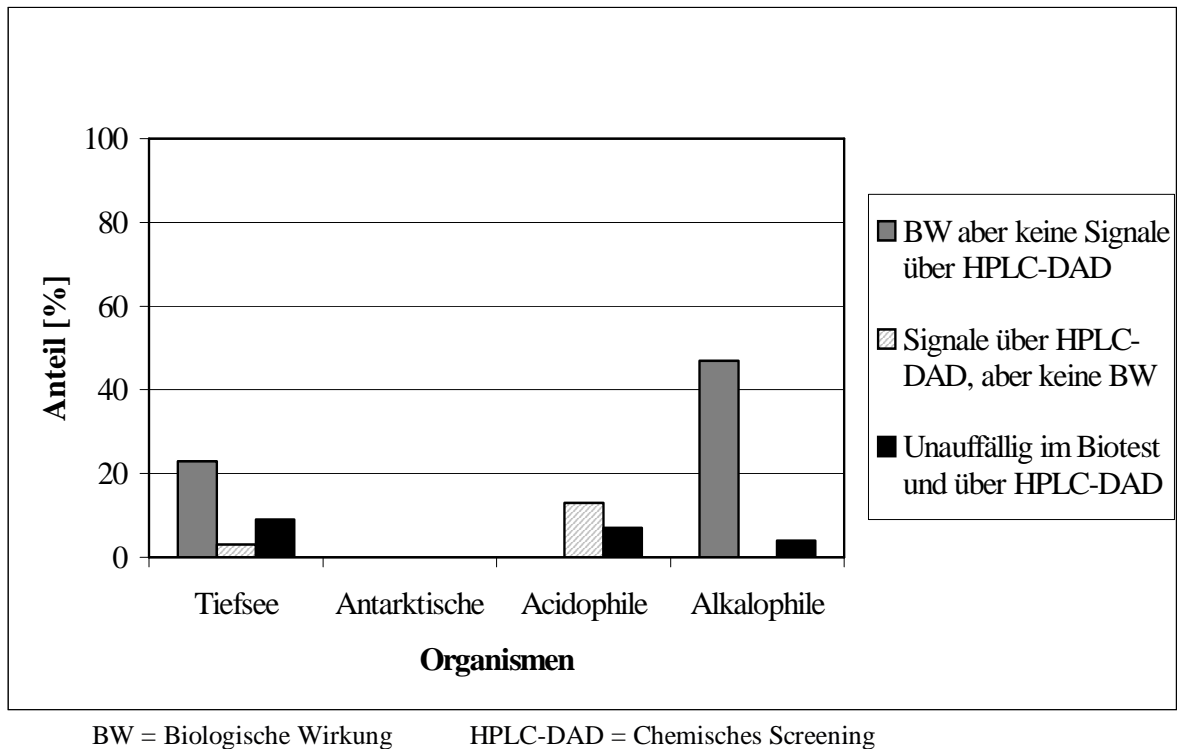


Abb. 03: Vergleich der Ergebnisse aus dem biologischen und chemischen Screening

#### 1.4 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus dem chemischen Screening

Große Unterschiede zwischen den einzelnen Actinomycetengruppen gab es auch bei der Reproduzierbarkeit der Produktion. Bei den Acidophilen war die Reproduzierbarkeit extrem schlecht. Bei vier Stämmen, die zunächst in großem Maße neue Naturstoffe gebildet hatten, konnte diese Produktion nicht wiederholt gezeigt werden. Deshalb wurde von einer weiteren Bearbeitung der weniger interessanten Stämme abgesehen. Bei den Tiefseestämmen produzierten drei der 14 positiv bewerteten Organismen (21%) bei einer erneuten Kultivierung keine Naturstoffe mehr. Recht stabil waren dagegen die alkalophilen und antarktischen Stämme, bei denen jeweils nur ein Stamm bei erneuter Kultivierung keine Sekundärmetabolite mehr bildete.

## 2 Bearbeitung einzelner Stämme

### 2.1 *Streptomyces* sp. AK 409

#### 2.1.1 Herkunft und Taxonomie

Der Stamm AK 409 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Goodfellow aus Stahlwerkabraum in Consett (County Durham, UK) isoliert. Er gehört zu der Gruppe der alkalophilen Organismen. Seine Zellwand enthält LL-Diaminopimelinsäure, was ihn als *Streptomyces* identifiziert. Kultiviert man ihn auf KM 4-Agar, so ist das Myzel braungelb, das Luftmyzel ist weiß und die Sporen beige gefärbt. Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von AK 409 sind in Abbildung 04 zu sehen.

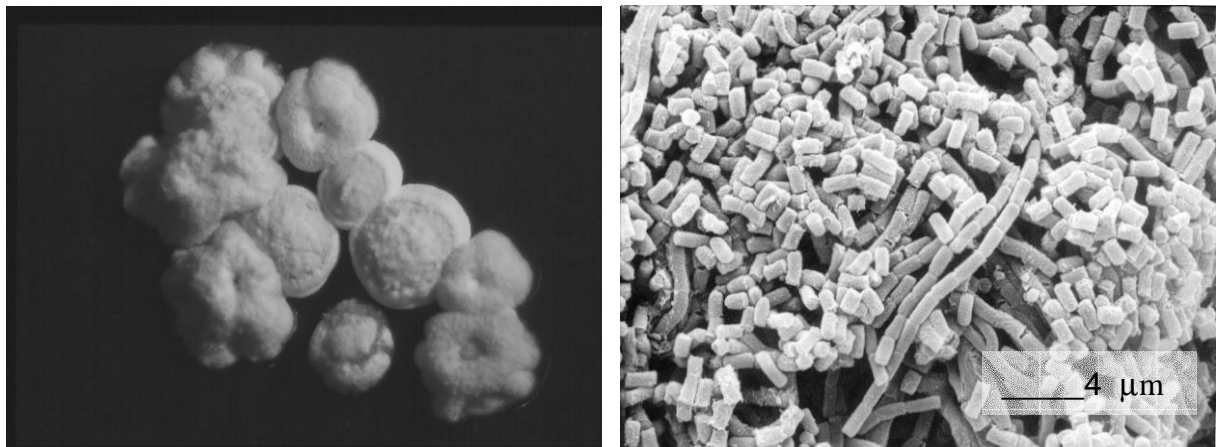


Abb. 04: Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahme von AK 409

#### 2.1.2 Screening

AK 409 wurde in NL 19 und SGG mit den pH-Werten 7,0, 8,5 und 10,0 kultiviert und nach 72 und 120 Stunden wurde je ein Kolben wie unter II.9 beschrieben aufgearbeitet.

##### 2.1.2.1 Chemisches Screening

Kulturfiltrat und Extrakte wurden über HPLC-DAD charakterisiert (II.9.2). Bei der HPLC-Analyse fielen zwei Komponenten mit Retentionszeiten von Rt 5,1 min und Rt 7,9 min auf. Die Spektren zeigten keine Ähnlichkeiten zu den Referenzspektren in der HPLC-UV/Vis-Datenbank. In Abbildung 05 sind das Chromatogramm einer HPLC-Analyse des



Gesamtkulturextrakt von AK 409 bei einer Wellenlänge von 280 nm und die UV/Vis-Spektren der Substanzen zu sehen.

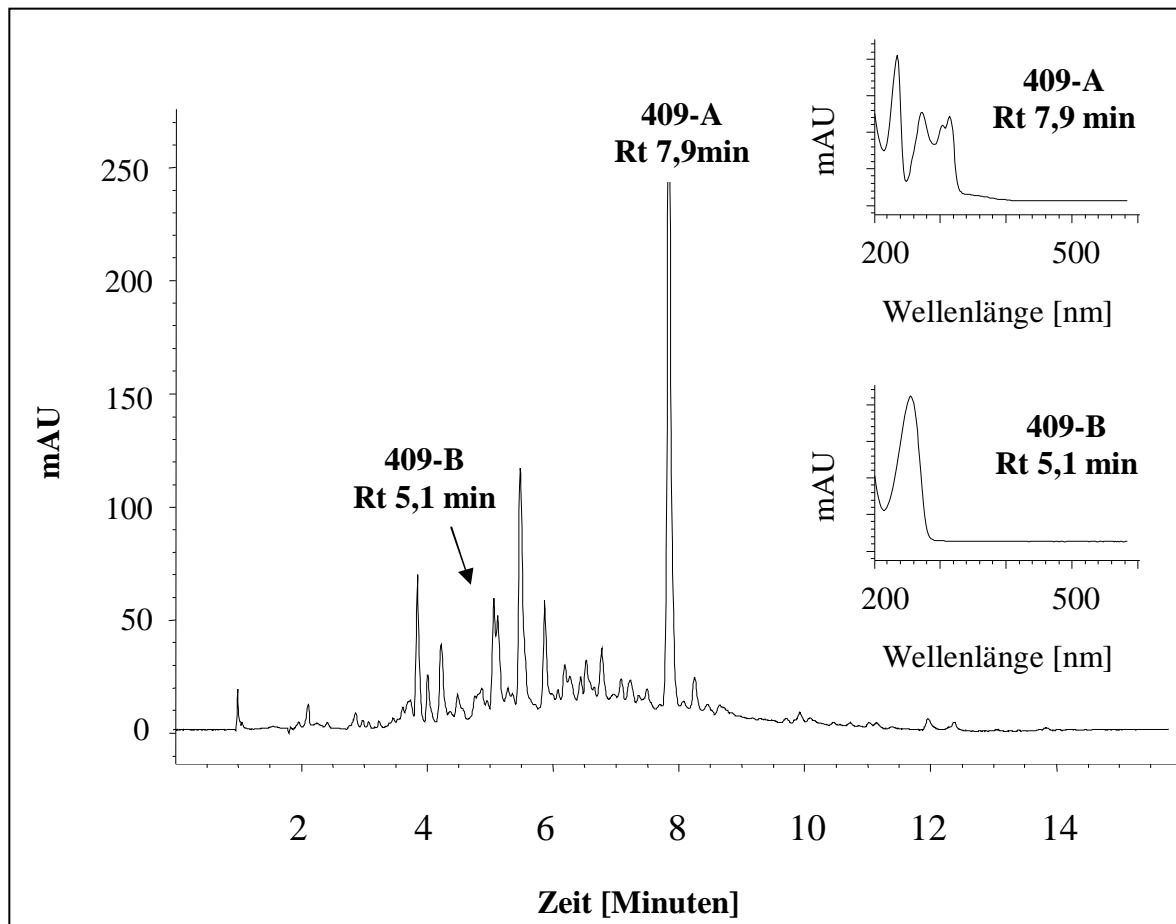


Abb.05: HPLC-Chromatogramm eines Gesamtkulturextrakt von AK 409 bei 280 nm und die UV/Vis-Spektren der Komponenten 409-A und 409-B

### 2.1.2.2 Biologisches Screening

Über einen Agardiffusionstest wurden die Extrakte aus dem Screening analysiert (II.12.1). Als Testorganismen wurden *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Botrytis cinerea* verwendet. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Proben zeigten eine sehr starke Wirkung gegen den Pilz *Botrytis cinerea* und eine etwas weniger starke Wirkung gegen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*.

Tab.13: Biologische Wirkung der Extrakte aus dem Screening von AK 409

Nährlösung	Start pH-Wert der Nährlösung	Zeitpunkt [Stunden]	Testorganismus - Hemmhof [mm]								
			<i>B. sub.</i> KM	<i>B. sub.</i> MM	<i>Staph. au.</i> KM	<i>Myc. phl.</i> KM	<i>Strep. Tü</i> 57 KM	<i>E. coli</i> KM	<i>E. coli</i> MM	<i>Sacch. cerv.</i> KM	<i>Bot. ciner.</i> KM
NL 19	7.0	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		120	0	0	0	0	0	0	0	0	16
	8.5	72	0	0	0	0	0	0	0	0	18
		120	0	7	0	0	0	0	0	0	18
	10.0	72	7	12	7	0	0	0	0	0	26
		120	8	13	8	0	0	0	0	0	30
SGG	7.0	72	9	14	8	0	0	0	0	0	28
		120	8	15	0	0	0	0	0	0	22
	8.5	72	10	12	9	0	0	0	0	0	24
		120	10	13	9	0	0	0	0	0	24
	10.0	72	11	11	9	0	0	0	0	0	24
		120	0	0	0	0	0	0	0	0	0

KM = Komplexmedium

MM = Minimalmedium

### 2.1.3 Nährlösungsvariation

Da die verwendete Nährlösung die Produktion von Sekundärmetaboliten maßgeblich beeinflusst, wurde der Stamm in Schüttelkulturen mit den Nährlösungen SGG, OM, NL 111, NL 19, NL 200, NL 300, NL 333, NL 400, NL 410 und NL 500 kultiviert (II.5.2). Zur HPLC-Analyse wurden die Proben einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat bei pH 5 unterzogen (II.8.1). Die 10fach in Methanol angereicherten Extrakte wurden mittels HPLC untersucht (II.8.2).

In Tabelle 14 sind die Messdaten der Nährlösungsvariation dargestellt. AK 409 zeigte in NL 400 und NL 410 das beste Wachstum mit einem Biomasseanteilanteil von 40% bzw. 44% nach 120 Stunden. Der pH-Wert stieg gegen Ende der Kultivierungszeit in allen Medien an, allerdings begann der Anstieg zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Der tiefste Wert wurde in NL 500 mit pH 5,7 gemessen, der höchste pH-Wert wurde in NL 111 mit pH 9,1 erreicht.

Tab.14: Biomasse- und pH-Verlauf von AK 409 in unterschiedlichen Nährlösungen

Medium	pH-Wert						Biomasse [%]					
	Probenahme [Stunden]						Probenahme [Stunden]					
	24	48	72	96	120	144	24	48	72	96	120	144
<b>SGG</b>	6,6	7,0	6,8	7,0	7,5	n.b.	7	18	20	16	20	n.b.
<b>NL 300</b>	7,8	6,8	6,7	7,0	7,8	n.b.	12	20	20	16	20	n.b.
<b>NL 400</b>	6,8	6,9	7,1	7,2	7,9	n.b.	7	30	25	30	40	n.b.
<b>NL 400*</b>	n.b.	n.b.	6,0	5,9	6,9	6,8	n.b.	n.b.	8	13	20	25
<b>NL 410</b>	6,6	5,9	7,1	7,5	7,8	n.b.	12	20	18	20	44	n.b.
<b>OM</b>	6,4	6,6	6,6	6,6	6,7	n.b.	10	14	10	10	10	n.b.
<b>NL 19</b>	n.b.	6,9	6,6	6,3	7,0	7,7	n.b.	30	28	31	32	35
<b>NL 111</b>	n.b.	7,5	8,3	8,7	8,9	9,1	n.b.	36	19	12	8	5
<b>NL 200</b>	n.b.	7,3	7,3	7,5	7,8	8,5	n.b.	24	22	30	24	12
<b>NL 333</b>	n.b.	6,6	6,8	6,9	7,4	8,1	n.b.	16	19	21	13	9
<b>NL 500</b>	n.b.	5,7	5,8	6,0	6,6	7,6	n.b.	21	21	27	19	13

Die stärkste Produktion von 409-A fand mit 37 mg/l in NL 400 statt, gefolgt von NL 410, in dem 27 mg/ml gebildet wurden (Abb. 07). Die stärkste Produktion von 409-B fand in NL 19 mit 153 mg/l statt. In einigen Medien tauchte eine neue Komponente 409-D bei Rt 3,8 min auf. Sie wurde am stärksten in NL 400\* mit 50,2 mg/l produziert. Das UV/Vis-Spektrum von 409-D ist in Abbildung 06 zu sehen.

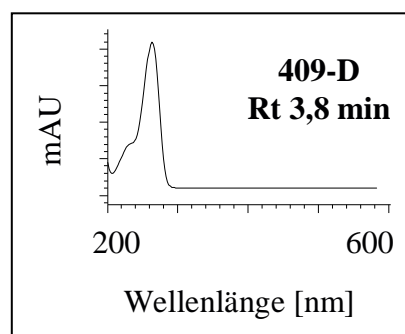


Abb. 06: UV/Vis-Spektrum von Komponente 409-D

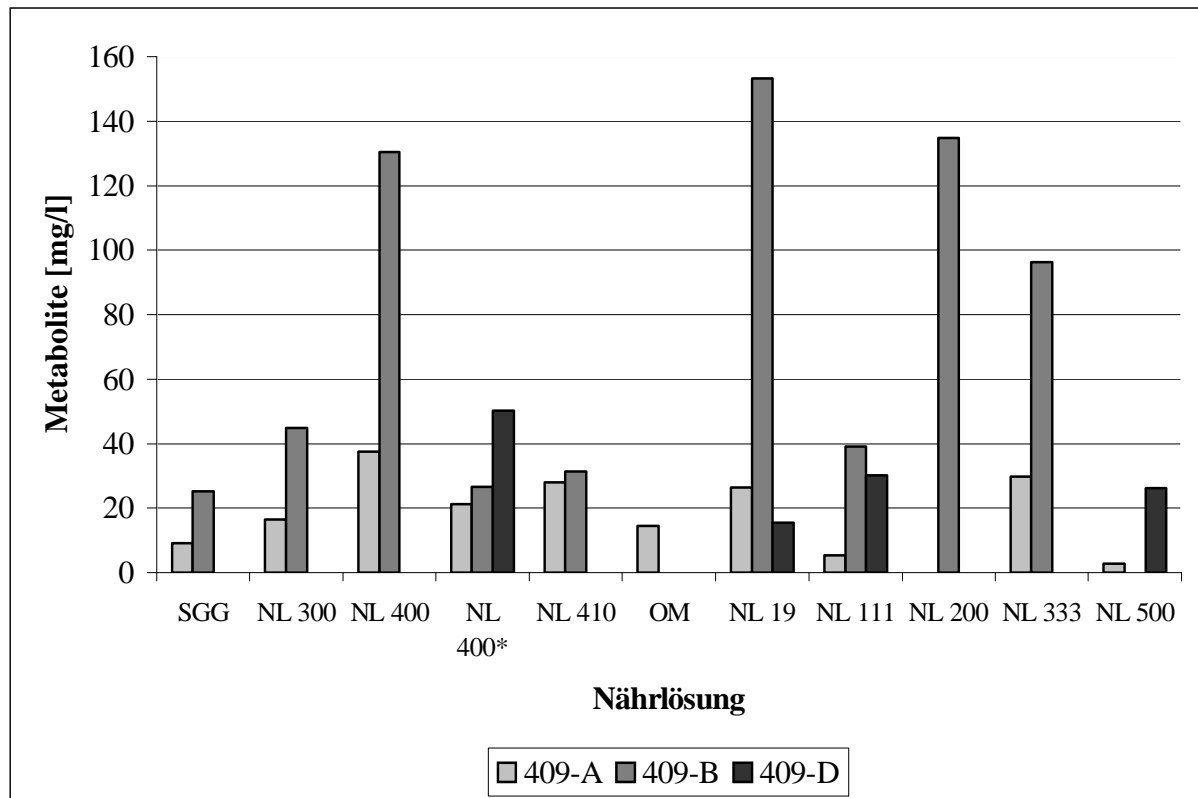


Abb. 07: Metabolitproduktion des Stammes AK 409 in unterschiedlichen Nährlösungen

#### 2.1.4 Dirigierte Biosynthese

Durch einen Puls von Aminosäuren und Salzen sollte der Stamm in Schüttelkultur (II.5.2) zur verstärkten Produktion von 409-A oder zur Produktion neuer Substanzen angeregt werden. Die Aminosäuren Prolin, Tryptophan und Hydroxyprolin, sowie Indol wurden mit einer Konzentration von 5 g/l zugesetzt, die Salze NaCl und NaBr wurden den Kulturen in Konzentrationen von 1, 2, 3 und 4 g/l beigemischt. Dazu wurden die eingesetzten Substanzen in 10 ml deion. Wasser gelöst, sterilfiltriert und einer 48 Stunden alten Schüttelkultur mit Medium NL 400 zugesetzt.

Zur HPLC-Analyse wurden die Proben einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat bei pH 5 unterzogen (II.8.1). Die 10fach in Methanol angereicherten Extrakte wurden mittels HPLC untersucht (II.8.2). Eine Produktionssteigerung konnte in keinem der Versuche verzeichnet werden. Durch den Zusatz der Aminosäure Hydroxyprolin konnte die Bildung von 409-D induziert werden.

### 2.1.5 Kultivierung im Bioreaktor mit der Nährlösung SGG

Für das Scale-up in Medium SGG wurden die in Tabelle 15 aufgeführten Bioreaktoren und Kultivierungsbedingungen verwendet. Im Verlauf der Kultivierung wurde etwa alle 24 Stunden eine Probe entnommen und diese nach Bestimmung von Biomasseanteil und pH-Wert bei pH 5 mit Ethylacetat wie unter II.8.1 beschrieben extrahiert. Die organische Phase wurde aufkonzentriert und mittels HPLC analysiert (II.8.2).

Tab. 15: Parameter bei den Fermentationen 1 und 2 von AK 409

	<b>Fermentation 1</b>	<b>Fermentation 2</b>
<b>Medium:</b>	SGG	SGG
<b>Temperatur:</b>	27 °C	27 °C
<b>Reaktortyp:</b>	Biostat S	Biostat S
<b>Rührsystem:</b>	Blattrührer	Blattrührer-Umwurf-Kombi
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	300 Upm	400 Upm
<b>pH-Regelung:</b>	ungeregelt	ungeregelt
<b>Belüftung:</b>	0,5 vvm	0,5 vvm
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Freier Verlauf	Freier Verlauf

Wie in Abbildung 08 zu sehen ist, fiel der Gelöstsauerstoffanteil in Fermentation 1 innerhalb der ersten 19 Stunden nach dem Animpfen von 100 auf 0%. Der Wert stieg nach 40 Stunden wieder leicht an. Im Gegensatz dazu war bei Fermentation 2 die geringste Sauerstoffkonzentration nach 41 Stunden mit 48% erreicht. Die Biomasse erreichte bei beiden Fermentationen nach 41 Stunden ihr Maximum, wobei in Fermentation 2 mit 50% eine höhere Biomasse als bei Fermentation 1 mit 36% erreicht wurde. Der pH-Wert fiel bei Fermentation 1 und 2 parallel zum Absinken des Gelöstsauerstoffanteils von anfangs pH 7,1 auf pH 6,6, um dann im weiteren Verlauf der Fermentation auf über pH 7,5 anzusteigen.

Der Produktionsverlauf der Metabolite 409-A und 409-B ist in Abbildung 09 dargestellt. Metabolit 409-A lag in Fermentation 2 mit einer maximalen Konzentration von 5,8 mg/l vor. In Fermentation 1 lag das Produktionsmaximum bei 3,8 mg/l. Die maximale Produktion von Komponente 409-B war in Fermentation 1 mit 68,5 mg/l und in Fermentation 2 mit 60,8 mg/l erreicht. 409-D wurde nicht gebildet.

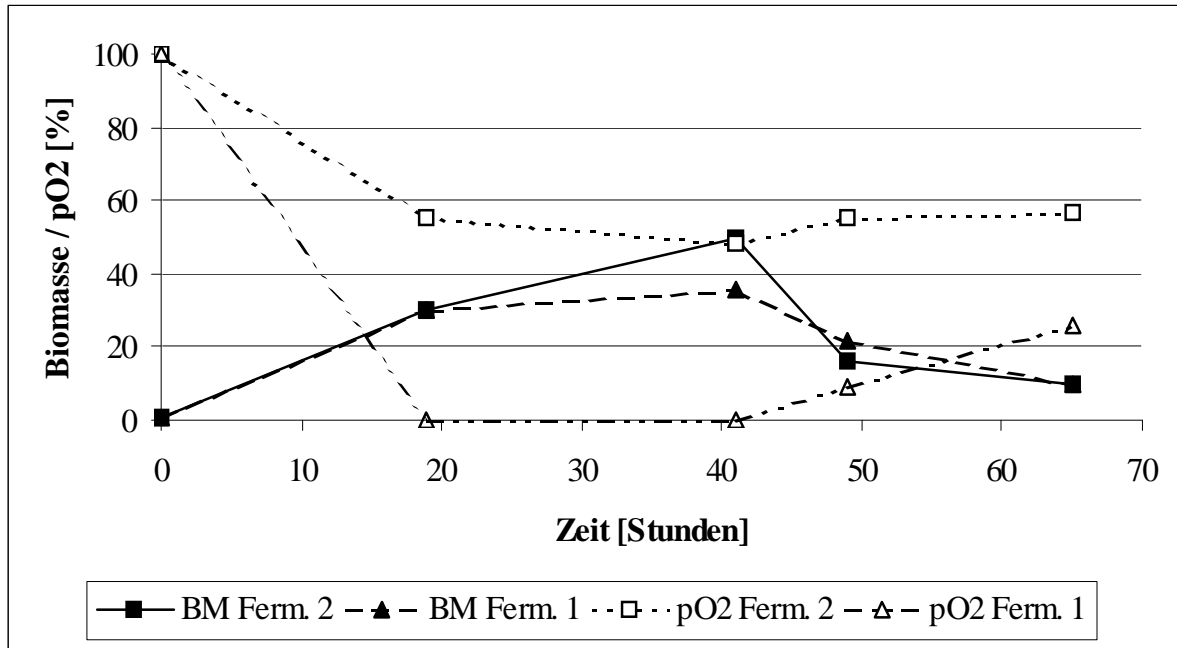


Abb. 08: Biomasse und Sauerstoffpartialdruck in den Fermentationen 1 und 2 von AK 409

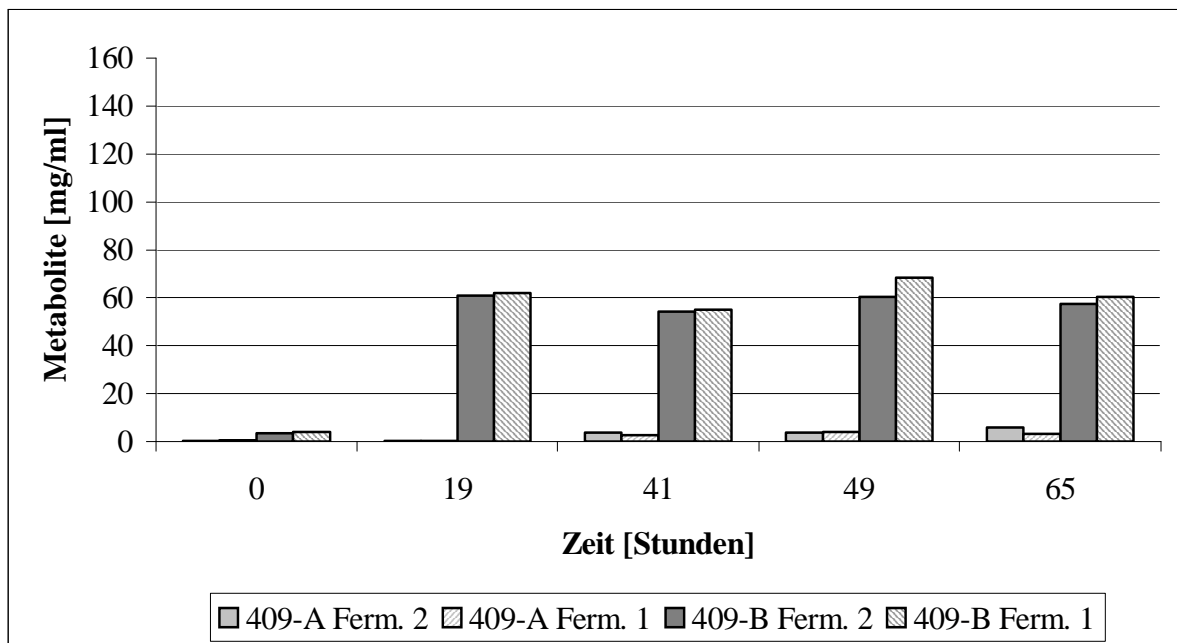


Abb. 09: Produktionsverlauf in Fermentation 1 und 2 von AK 409

### 2.1.6 Kultivierung im Bioreaktor mit NL 400\*

Stamm AK 409 wurde unter den in Tabelle 16 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Fermenterproben wurden mit Ethylacetat bei pH 5 extrahiert, zur Trockene eingengt und der Rückstand 10fach konzentriert in Methanol gelöst (II.8). Die Extrakte wurden über HPLC-DAD analysiert.

Tab.16: Parameter bei den Fermentationen 3 und 4 von AK 409

	Fermentation	
	3	4
<b>Medium:</b>	NL 400*	NL 400*
<b>Temperatur:</b>	27 °C	27 °C
<b>Reaktortyp:</b>	Biostat E	b 20
<b>Rührsystem:</b>	Blattrührer	Propellerschleife
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	250 Upm	1000 Upm
<b>pH-Regelung:</b>	ungeregelt	ungeregelt
<b>Belüftung:</b>	0,4 vvm	0,4 vvm
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Freier Verlauf	Freier Verlauf

Wie in Abb. 10 zu sehen, waren die Fermentationen 3 und 4 nach etwa 40 Stunden Kultivierung im Sauerstoff limitiert. Der erneute Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks trat bei Fermentation 3 nach 48 Stunden und bei Fermentation 4 nach 72 Stunden ein. Die Biomasse, ebenfalls in Abbildung 10 dargestellt, erreichte in beiden Fermentationen nach 24 Stunden das Maximum mit 30% (Fermentation 3) bzw. 38% (Fermentation 4). Der pH-Wert sank zunächst in beiden Fermentern innerhalb von 24 Stunden um etwa eine pH-Einheit auf den tiefsten Punkt. Dann stiegen die Werte bis 56 Stunden wieder an, bis sie in etwa den Startwert erreicht hatten. Im Anschluss daran fielen sie erneut um 0,5 Einheiten ab. Nach 72 Stunden stiegen die Werte kontinuierlich an.

Die maximale Produktion von AK 409-A war in Fermentation 3 mit 21,8 mg/l, in Fermentation 4 mit 8,0 mg/l erreicht. Die Komponente 409-B lag in Fermentation 3 und 4 mit einer maximalen Konzentration von 87,2 mg/l und 90 mg/l vor. Es wurde ebenfalls die Komponente 409-D gebildet. Hier lagen maximal 10,6 mg/l (Fermentation 3) und 12,8 mg/l vor (Abb. 11).

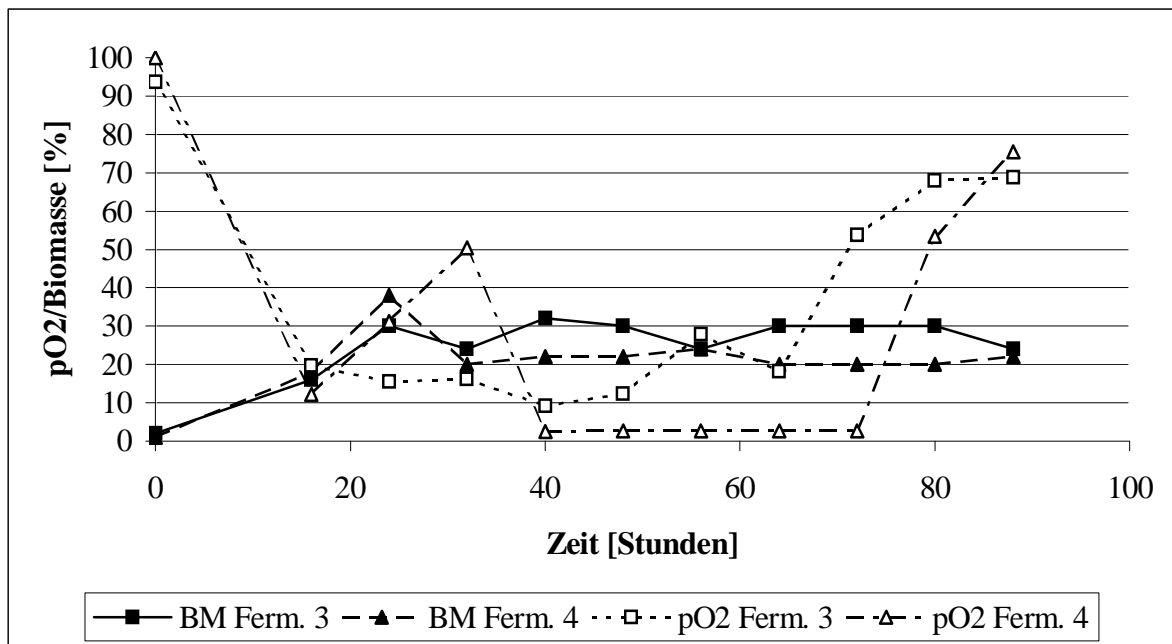


Abb. 10: Wachstum und Sauerstoffpartialdruck im Verlauf von Fermentation 3 und 4

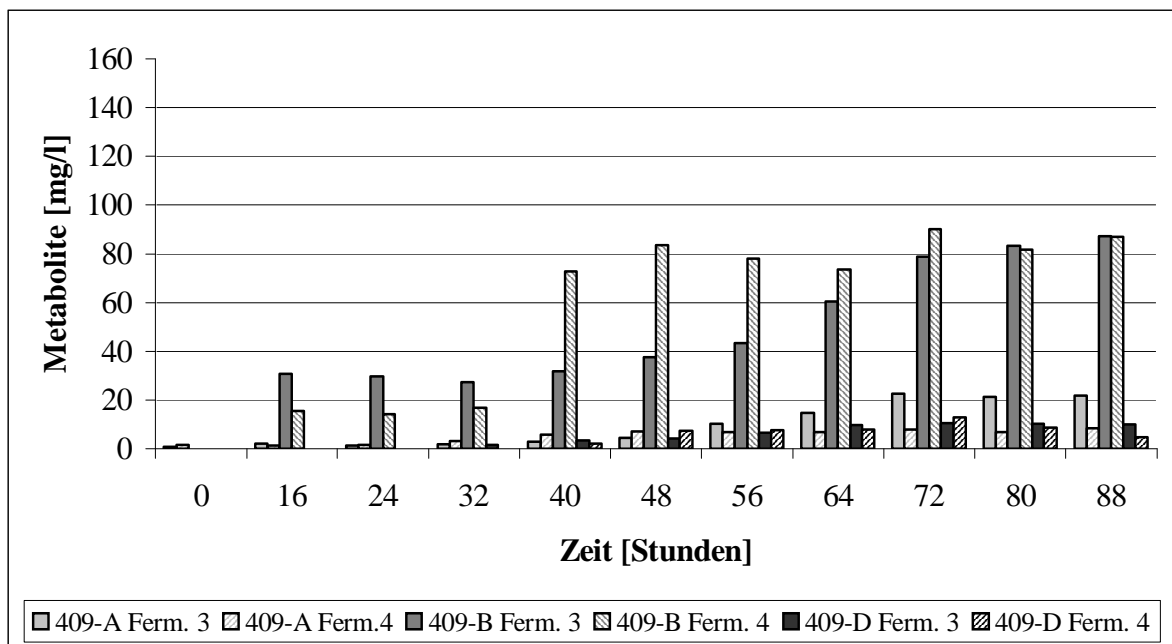


Abb. 11: Produktion von 409-A in Fermentation 3 und 4

### 2.1.7 pH-statische Kultivierung im Bioreaktor

Um Informationen über den optimalen pH-Wert für das Wachstum von AK 409 zu erhalten, wurde der Stamm pH-statisch kultiviert. Im Verlauf wurde etwa alle 10 - 14 Stunden eine



Probe entnommen. Die Bestimmung der gebildeten Biomasse erfolgte über Biomasseanteil und Trockengewicht (II.7.1). Die Bedingungen für die Fermentationen sind in Tabelle 17 beschrieben.

Tab. 17: Parameter bei den Fermentationen 5 bis 8 von AK 409

	Fermentation			
	5	6	7	8
<b>Vorkultur:</b>	In Medium NL 400, 72 Stunden kultiviert			
<b>Medium:</b>	NL 400			
<b>Temperatur:</b>	27 °C			
<b>Reaktortyp:</b>	Mini			
<b>Rührsystem:</b>	Magnetrührstäbchen			
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	850 Upm			
<b>pH-Regelung:</b>	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5	pH 9,0
<b>Belüftung:</b>	0,5 vvm			
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Nicht bestimmt			

Der Verlauf der Biomassebildung ist in Abbildung 12 zu sehen. Die maximale Biomasse wurde bei beiden Methoden in Fermentation 8 mit einem Trockengewicht von 20,6 g/l bzw. 30% Volumen nach 21,5 Stunden erreicht.

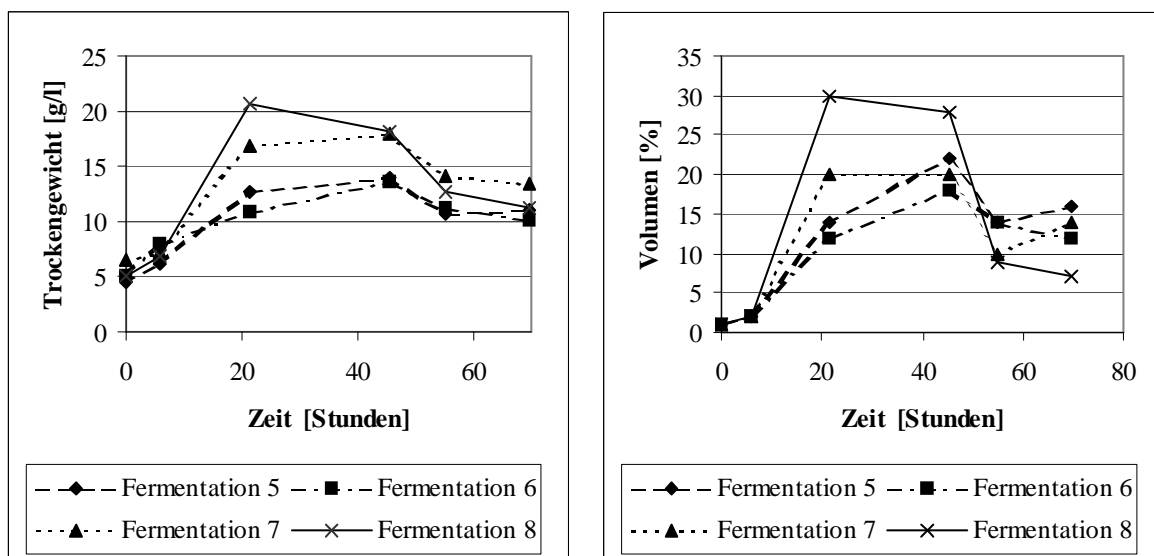


Abb. 12: Biomassebildung bei den pH-statischen Fermentation von AK 409

### 2.1.8 Isolierung und Reinigung der Metabolite 409-A, 409-B und 409-D

Zu insgesamt 30 Schüttelkulturen mit Medium NL 400 (II.5.2) wurde nach 48 Stunden Kultivierungszeit je 0,5 g Hydroxyprolin zugegeben. Nach insgesamt 96 Stunden wurden die Kulturen vereinigt und mittels Filterpresse in Biomasse und Kulturfiltrat aufgetrennt (II.10.1). Das Kulturfiltrat wurde wie in Abbildung 13 dargestellt drei Flüssig-Flüssig-Extraktionen in Folge unterworfen (II.10.2.2). Zunächst wurde mit Cyclohexan (Extrakt 1) bei pH 9, dann mit Ethylacetat bei pH 7 (Extrakt 2) und zuletzt mit Ethylacetat bei pH 5 (Extrakt 3) extrahiert.

Extrakt 1 (103,0 mg) wurde unter Einsatz der präparativen HPLC an Nucleosil C-18 mit Gradient 2 in 5,7 mg Komponente 409-A überführt (II.10.3.4).

Extrakt 2 (489,7 mg) wurde zunächst über Ausschlusschromatographie an Sephadex (II.10.3.3) in 224,8 mg Rohprodukt zwei und unter Einsatz der präparativen HPLC an Nucleosil C-18 mit Gradient 1 (II.10.3.4) in 15,5 mg Komponente 409-B überführt.

Extrakt 3 (1876,2 mg) konnte über Ausschlusschromatographie an Fractogel (212,8 mg) und den Einsatz der präparativen HPLC an Nucleosil C-18 mit Gradient 1 in 18,2 mg Komponente 409-D überführt werden.

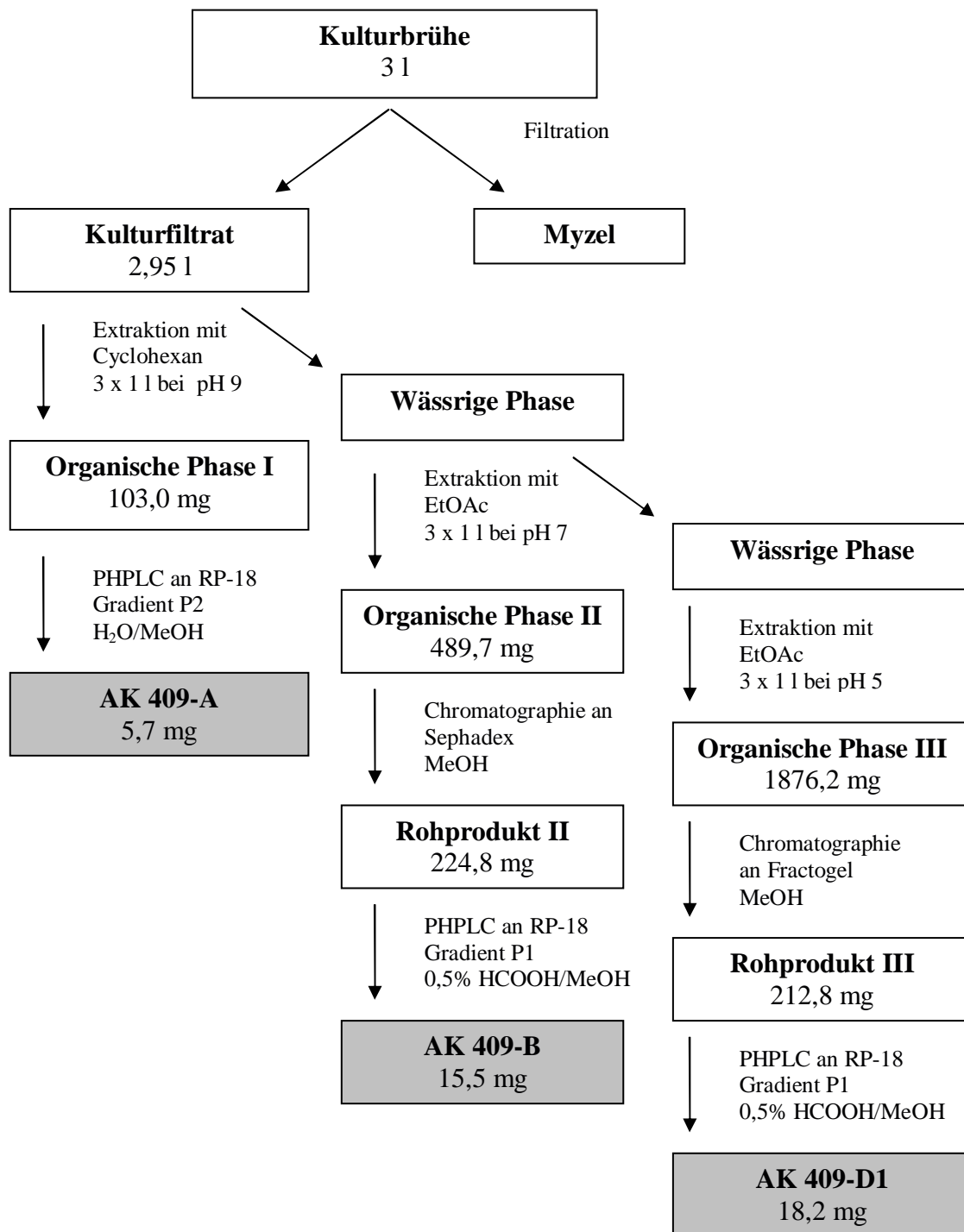


Abb. 13: Schematische Darstellung der Isolierung der Metabolite A, B und D aus AK 409

### 2.1.9 Strukturaufklärung der Komponenten

Die Strukturaufklärung von 409-A und 409-D wurde von Herrn Dipl. Chem. Andreas Hamm aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Bringmann, am Institut für Organische Chemie in Würzburg durchgeführt. Es zeigte sich, dass es sich bei 409-A um das literaturbekannte Pyrocoll handelt, das aber bisher nicht als Naturstoff beschrieben wurde (SCHUMACHER et al., 1977; GROSS & WENTRUP, 1982; QIAO et al., 1996). Bei AK 409-D handelt es sich um die Pyrrol-2-Carbonsäure (HÖFLE & WOLF, 1983), die schon aus Streptomyceten isoliert wurde. Die Strukturen beider Komponenten sind in Abbildung 14 zu sehen. Die Struktur von 409-B konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

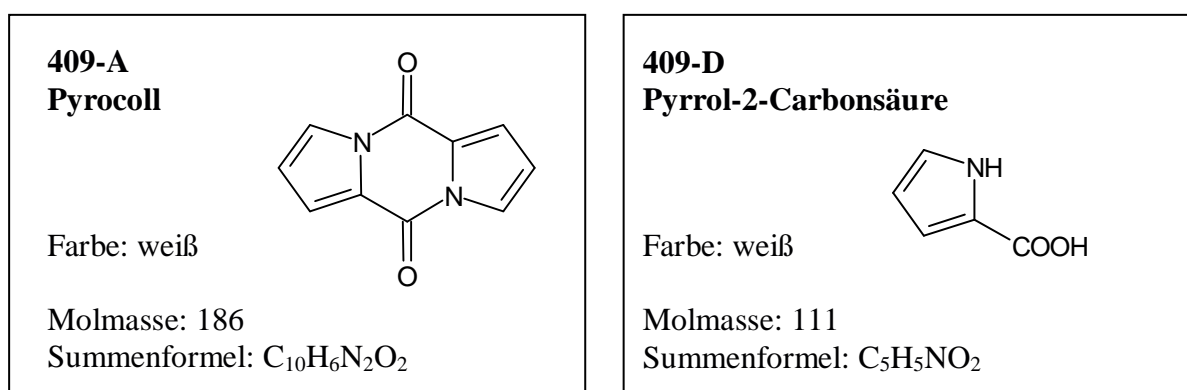


Abb. 14: Strukturformeln der identifizierten Komponenten aus AK 409

### 2.1.10 Biologische Wirkung

#### 2.1.10.1 Antibiotisches Wirkspektrum von AK 409-A

Die Reinsubstanz AK 409-A wurden gegen die in Tabelle 06 aufgeführten Testorganismen im Agardiffusionstest auf ihre antibiotische Aktivität getestet (II.12.1.1). Bei den eingesetzten Konzentrationen von 0,01 bis 1 mg/ml konnte eine antibiotische Wirkung gegen *Arthrobacter* und myzelbildende Pilze nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tab. 18: Biologische Wirkung von AK 409-A gegen Mikroorganismen im Plattendiffusionstest

Organismus	Konzentration				
	1 mg/ml	0,3 mg/ml	0,1 mg/ml	0,03 mg/ml	0,01 mg/ml
<b>Gram-positive Eukarionten</b>	<b>Hemmung Durchmesser [mm]</b>				
<i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 20166	9	7	-	-	-
<i>Arthrobacter globiformis</i> DSM 20124	15	11	8	-	-
<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 6612	14	7	-	-	-
<i>Arthrobacter pascens</i> DSM 20545	14	9	7	-	-
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 1069	10	7	-	-	-
<b>Pilze</b>					
<i>Aspergillus viridi nutans</i> CBS 12756	(11)	-	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> Tü 157	+	+	-	-	-
<i>Penicillium notatum</i> Tü 136	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i> Tü 137	9	7	-	-	-

+ Hemmung

- keine Hemmung

() Hemmhof ist trüb

### 2.1.10.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von AK 409-A

Wie in II.12.2 beschrieben wurde ein MHK-Test mit AK 409-A gegen einige Gram-positive Bakterien durchgeführt, gegen die im Plattendiffusionstest eine Hemmung nachgewiesen worden war. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt. Die stärkste Hemmungswirkung trat gegen *A. globiformis* mit einer MHK von 0,3 µg/ml auf. Etwas schwächer war die Hemmung gegen *A. pascens* mit einer MHK von 1 µg/ml. *A. aurescens*, *A. oxydans* und *R. erythropolis* wurden bei einer Konzentration von 3 µg/ml im Wachstum gehemmt.

Tab. 19: MHK der Komponente AK 409-A gegen *Arthrobacter* - und *Rhodococcus* Stämme

Organismus	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<i>Arthrobacter aureescens</i> DSM 20166	3
<i>Arthrobacter globiformis</i> DSM 20124	0,3
<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 6612	3
<i>Arthrobacter pascens</i> DSM 20545	1
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 1069	3

### 2.1.10.3 Test auf algizide Wirkung von AK 409-A

Im Test gegen die Grünalge *Chlorella fusca* (II.12.1.2) erwies sich 409-A in einer maximal verwendeten Konzentration von 1 mg/ml als wirkungslos.

### 2.1.10.4 Test auf herbizide Wirkung von AK 409-A

Für 409-A konnte mit einer maximal verwendeten Konzentration von 1 mg/ml keine Wirkung gegen *Lemna minor* mit dem unter II.12.3 beschriebenen Test nachgewiesen werden.

### 2.1.10.5 Wirkung von AK 409-A gegen unterschiedliche Tumor Zelllinien

Die Testierung der Komponente 409-A wurde freundlicherweise von mehreren Kooperationspartnern wie unter II.12.4.1 beschrieben durchgeführt. Die Testierung mit den Zelllinien HM02, HEP G2 und MCF 7 erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Beil am Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen Hochschule in Hannover. Die Wirkung auf die Tumorzelllinien L5178y und HeLa S3 wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. W. E. G. Müller am Institut Physiologische Chemie der Universität Mainz untersucht. Eine weitere Untersuchung der Wirkung gegen 14 humane Tumorzelllinien wurde von der Fa. Oncotest (Freiburg) durchgeführt.

Bei den Testierungen, welche in Hannover und Mainz durchgeführt wurden, zeigte AK 409-A, wie in Tabelle 20 dargestellt, die beste Wirkung gegen das Magenkarzinom HM02 und das Lymphkarzinom L5178y mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0,28  $\mu\text{g/ml}$ . Ebenfalls eine starke Hemmung bewirkte 409-A beim Leberkarzinom HEP G2 und dem Epithelkarzinom HeLa S3

mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,42 µg/ml. Das Mammakarzinom MCF 7 wurde mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 2,2 µg/ml schwach gehemmt.

Tab. 20: *In vitro*-Aktivität von 409-A gegen Tumorzelllinien

Zelllinie	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	TGI [µg/ml]	LC <sub>50</sub> [µg/ml]
<b>409-A</b>			
HM02	0,28	5,1	>10
HEP G2	0,42	>10a	>10
MCF 7	2,2	>10b	>10
L5178y	0,28	n.b.	n.b.
HeLa S3	0,42	n.b.	n.b.

n. b.: nicht bestimmt

IC<sub>50</sub>: 50% Wachstumshemmung

TGI: 100% Wachstumshemmung

LC<sub>50</sub>: 50% Verringerung der Zellzahl nach 24 Stunden im Vergleich zum Zeitpunkt 0

<sup>a</sup>

77% Wachstumshemmung bei 10 µg/ml

<sup>b</sup>

70% Wachstumshemmung bei 10 µg/ml

Die Testierung bei der Firma Onkotest erfolgte über einen Monolayer-Proliferationshemmtest. Die Ergebnisse in Tabelle 21 zeigen einen relativ niedrigen Durchschnitts-IC<sub>70</sub>-Wert von 0,8 [µg/ml]. Eine besonders gute Wirkung konnte mit einem IC<sub>70</sub>-Wert von 0,2 bzw 0,22 µg/ml gegen die Mammakarzinome MCF7 und 401NL nachgewiesen werden. Ebenfalls sehr wirksam mit einem IC<sub>70</sub>-Wert unter 0,25 µg/ml zeigte sich 409-A gegen das Lungenkarzinom 1072L, das Melanom 514L und das Nierenkarzinom 393NL.

Tab. 21: *In vitro*-Aktivität von 409-A gegen Tumorzelllinien

Zelllinie	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	IC <sub>70</sub> [µg/ml]	IC <sub>90</sub> [µg/ml]
<b>409-A</b>			
HT29 <sup>a</sup>	1,362	5,078	> 3.000
H460 <sup>b</sup>	0,247	1,019	5,051
629L <sup>b</sup>	0,165	0,496	3,490
66NL <sup>b</sup>	0,702	> 3.000	> 3.000
1072L <sup>b</sup>	0,112	0,174	0,269
529L <sup>b</sup>	0,325	1,002	> 3.000
MCF7 <sup>c</sup>	0,105	0,222	3,349
401NL <sup>c</sup>	0,108	0,197	> 3.000
276L <sup>d</sup>	0,238	> 3.000	> 3.000
462NL <sup>d</sup>	0,225	1,316	> 3.000
514L <sup>d</sup>	0,115	0,209	2,322
393NL <sup>e</sup>	0,91	0,180	1,078
631L <sup>e</sup>	1,366	1,987	2,889
944L <sup>e</sup>	0,692	2,978	> 3.000

- <sup>a</sup> Magen-Karzinom  
<sup>b</sup> Lungen-Karzinom  
<sup>c</sup> Mamma-Karzinom  
<sup>d</sup> Melanom  
<sup>e</sup> Nieren-Karzinom
- IC<sub>50</sub>: 50% Wachstumshemmung  
IC<sub>70</sub>: 70% Wachstumshemmung  
IC<sub>90</sub>: 90% Wachstumshemmung

#### 2.1.10.6 Wirkung von AK 409-A gegen Erreger von Tropenerkrankungen

Die Testierung wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Brun am Schweizerischen Tropeninstitut in Basel (Schweiz) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt. Für Komponente 409-A konnte eine moderate Wirkung gegen alle in Tabelle 09 geführten Organismen nachgewiesen werden.



Tab. 22: *In vitro*-Aktivität von Pyrocoll gegen Plasmodien und Trypanosomen

Organismus	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	
	409-A	Standard
<i>Plasmodium falciparum</i>	1,19	0,078 <sup>a</sup>
<i>Trypanosoma brucei rhodensiense</i>	1,97	0,001 <sup>b</sup>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	17,6	1,27 <sup>c</sup>

IC<sub>50</sub>: 50% Wachstumshemmung<sup>a</sup>Chloroquine<sup>b</sup>Melasoprol<sup>c</sup>Benznidazol

## 2.2 *Streptomyces* sp. AK 623

### 2.2.1 Herkunft und Taxonomie

Der Stamm AK 623 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Goodfellow aus dem Humus des „Hamsterley Forest“, eines Pinienwaldes in Consett (County Durham, UK) isoliert und konnte über die Bestimmung des Diaminopimelinsäuremusters als *Streptomyces* identifiziert werden. Er gehört der Gruppe der alkalophilen Organismen an. Bei einer Kultivierung auf KM 4-Agar hatte das Myzel die Farbe hellgelb, das Luftmyzel war weiß und die Sporen grüngrau gefärbt. Eine Photographie von AK 623 ist in Abbildung 15 zu sehen.



Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahme von *Streptomyces* AK 623

### 2.2.2 Screening

Der Stamm wurde in Schüttelkulturen mit NL 19 und SGG bei den pH-Werten 7.0 und 10.0 kultiviert und nach 72 und 120 Stunden wurde je ein Kolben wie unter II.9 beschrieben aufgearbeitet.

#### 2.2.2.1 Chemisches Screening

Kulturfiltrat und Extrakte wurden über HPLC-DAD analysiert (II.8.2). Dabei fiel der Stamm durch zwei Produkte mit Rt 6,2 min und Rt 7,9 min auf. Keines der Spektren zeigte Ähnlichkeiten zu den Referenzspektren in der HPLC-UV/Vis-Datenbank (II.9.2). Das

Chromatogramm bei 310 nm und die Spektren der Substanzen sind in Abbildung 16 dargestellt.

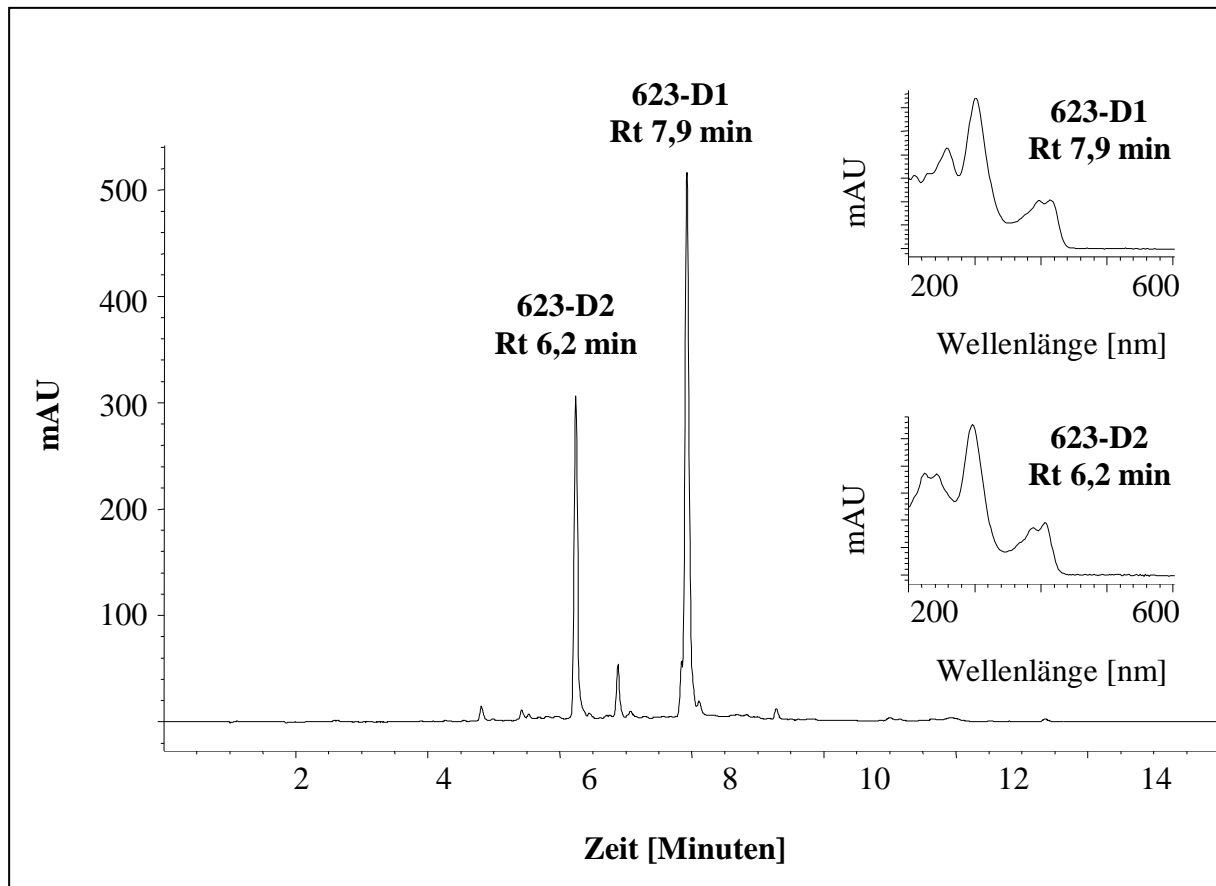


Abb. 16: HPLC-Chromatogramm eines Gesamtkulturextraktes von AK 623 bei 310 nm und UV/Vis-Spektrum der Komponenten

### 2.2.2.2 Biologisches Screening

Die Extrakte wurden über einen Agardiffusionstest auf ihre Wirkung gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Botrytis cinerea* untersucht (II.12.1). Dabei fielen sie durch ihre starke Hemmung der Organismen *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Streptomyces* auf. Die Auswertung des biologischen Screenings ist in Tabelle 23 zusammengestellt.

Tab. 23: Biologische Wirkung der Extrakte aus dem Screening von AK 623

Nährlösung	Start pH-Wert der Nährlösung	Zeitpunkt [Stunden]	Testorganismus - Hemmhof [mm]								
			<i>B. subt.</i> KM	<i>B. subt.</i> MM	<i>Staph. au.</i> KM	<i>Myc. phlei</i> KM	<i>Strep. Tü 57</i> KM	<i>E. coli</i> KM	<i>E. coli</i> MM	<i>Sacch. cerv.</i> KM	<i>Bot. ciner.</i> KM
NL 19	7.0	72	15	17	12	0	15	0	0	0	0
		120	18	21	14	0	16	0	0	0	0
	10.0	72	0	7	0	0	0	0	0	0	0
		120	16	20	14	20	0	20	0	0	0
SGG	7.0	72	21	24	16	0	24	0	0	0	0
		120	22	24	17	0	26	0	0	0	0
	10.0	72	22	23	16	0	20	0	0	0	0
		120	24	26	18	0	28	0	0	0	0

KM = Komplexmedium

MM = Minimalmedium

### 2.2.3 Nährlösungsvariation in Schüttelkolben

AK 623 wurde in Schüttelkulturen mit den Medien SGG, NL 300, NL 400, NL 410 und OM kultiviert (II.5.2). Nach Bestimmung des pH-Wertes und des Biomasseanteils (Tab. 24) wurden die Proben einer Flüssig-Flüssig Extraktion bei pH 5 mit EthOAc unterzogen (II.8.1). Die organische Phase wurde 10fach in Methanol angereichert und mittels HPLC analysiert (II.8.2).

Das beste Wachstum zeigte AK 623 in NL 400 und NL 410 nach 72 Stunden mit einem Volumen von 15 bzw. 18%. Nach 120 Stunden war in allen Medien ein erneuter Anstieg des Biomasseanteils zu beobachten. Der pH-Wert stieg in den Nährlösungen SGG, NL 300, NL 400 und NL 410 im Verlauf an, in OM blieb der Wert etwa bei pH 6.

Tab. 24: Biomasse- und pH-Wertverlauf von AK 623 in SGG, NL 300, NL 400, NL 410 und OM-Medium

Medium	pH-Wert					Biomasse [%]				
	Probenahme [Stunden]					Probenahme [Stunden]				
	24	48	72	96	120	24	48	72	96	120
<b>SGG</b>	7,1	7,2	7,2	7,7	7,9	8	6	8	8	22
<b>NL 300</b>	7,6	8,4	8,8	9,0	9,2	10	8	8	8	10
<b>NL 400</b>	7,1	7,0	7,6	8,3	8,7	15	10	15	6	8
<b>NL 410</b>	7,0	7,0	7,2	7,8	8,3	16	16	18	12	20
<b>OM</b>	6,2	6,2	6,0	6,1	6,0	10	10	12	6	16

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist, fand sich die höchste Konzentration an 623-D1 in SGG. Hier lagen 219,3 mg/l vor. Die maximale Produktion von Metabolit 623-D2 (Abb. 18) war in Medium NL 410 mit 40 mg/l zu beobachten. In NL 300 fand keine Produktion statt. Zudem wurden in Medium OM zwei weitere nicht über die HPLC-UV/Vis-Datenbank identifizierbare Komponenten bei Rt 5,7 min (623-A1) und Rt 6,6 min (623-A2) produziert. Die UV/Vis-Spektren dieser Komponenten sind in Abbildung 19 zu sehen.

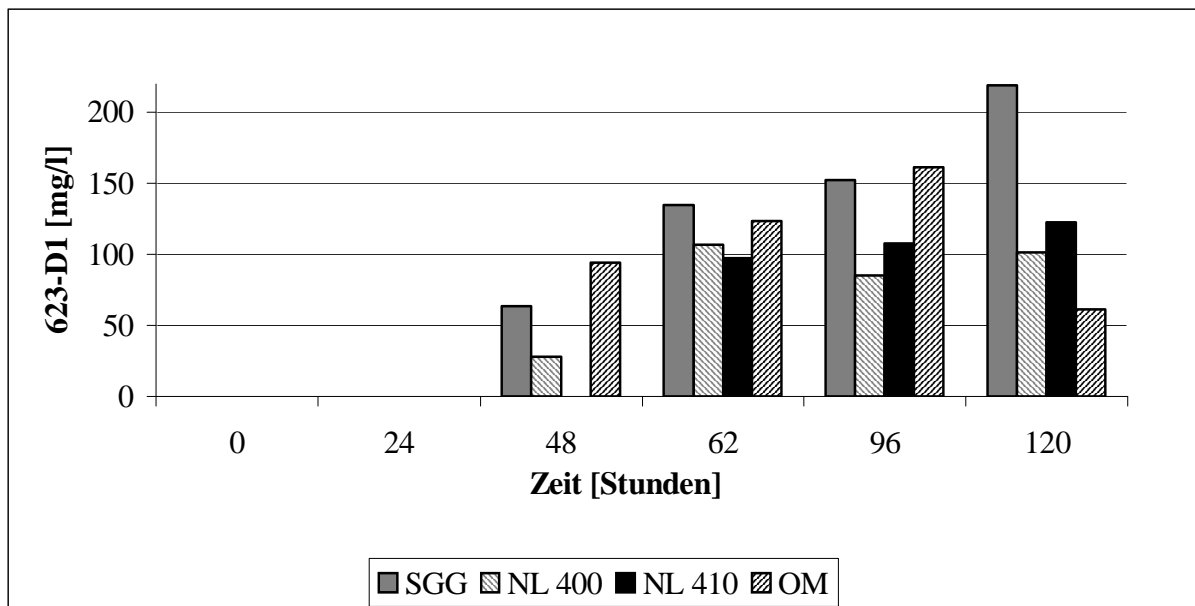


Abb. 17: Produktion der Komponente 623-D1 in unterschiedlichen Nährlösungen

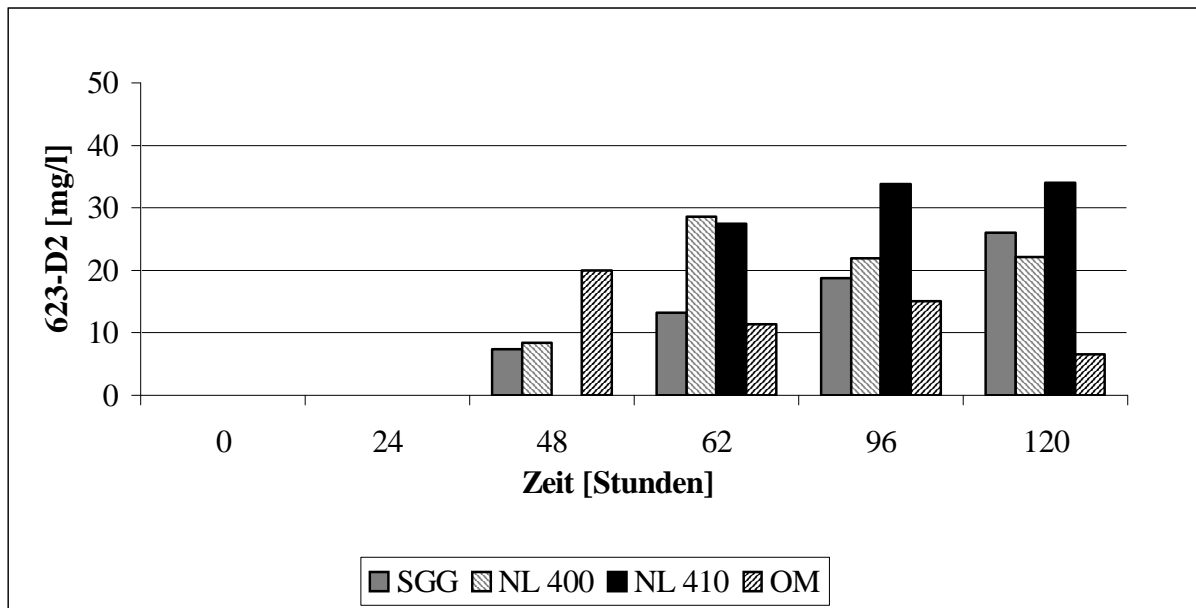


Abb. 18: Produktion der Komponente 623-D2 in unterschiedlichen Nährlösungen

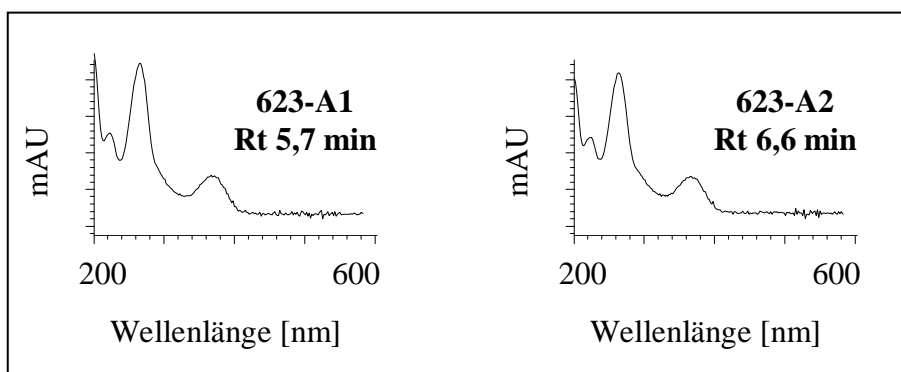


Abb. 19: UV/Vis-Spektren der Komponenten 623-A1 und 623-A2

#### 2.2.4 Kultivierung im Bioreaktor mit Medium OM

Stamm AK 623 wurde unter den in Tabelle 25 aufgeführten Bedingungen kultiviert. Im Verlauf der Kultivierung wurde etwa alle 24 Stunden eine Probe entnommen und diese nach Bestimmung von Biomasseanteil und pH-Wert bei wie unter II.8 beschrieben aufgearbeitet und über HPLC-DAD auf die Produktbildung untersucht.

Tab. 25: Parameter bei Fermentation 1 und 2 von AK 623

	Fermentation	
	1	2
<b>Medium:</b>	OM	OM
<b>Temperatur:</b>	27 °C	27 °C
<b>Reaktortyp:</b>	Biostat S	b 20
<b>Rührsystem:</b>	Blattrührer-Umwurf-Kombi	Propellerschleife
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	450 Upm	1000 Upm
<b>pH-Regelung:</b>	ungeregelt	ungeregelt
<b>Belüftung:</b>	0,4 vvm	0,5 vvm
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Nicht bestimmt	Freier Verlauf

Der Gelöstsauerstoffanteil wurde nur in Fermentation 2 bestimmt (Abb. 20) und erreichte nach 18 Stunden mit 20% seinen Tiefpunkt, um dann langsam wieder anzusteigen. Die maximale Biomasse (Abb. 20) wurde bei Fermenter 2 zum Erntezeitpunkt (66 Stunden) mit 10%, in Fermenter 1 waren nach 70 Stunden mit 10% Biomasse Messbar. In Abbildung 21 ist der pH-Verlauf zu sehen. Der pH-Wert fällt in Fermentation 2 zunächst auf 5,7 um kurz wieder auf 6,1 anzusteigen und im Anschluss auf 5,8 abzufallen. In Fermentation 1 fällt der Wert innerhalb von 22 Stunden auf 6,6 und im weiteren Verlauf auf 6,5.

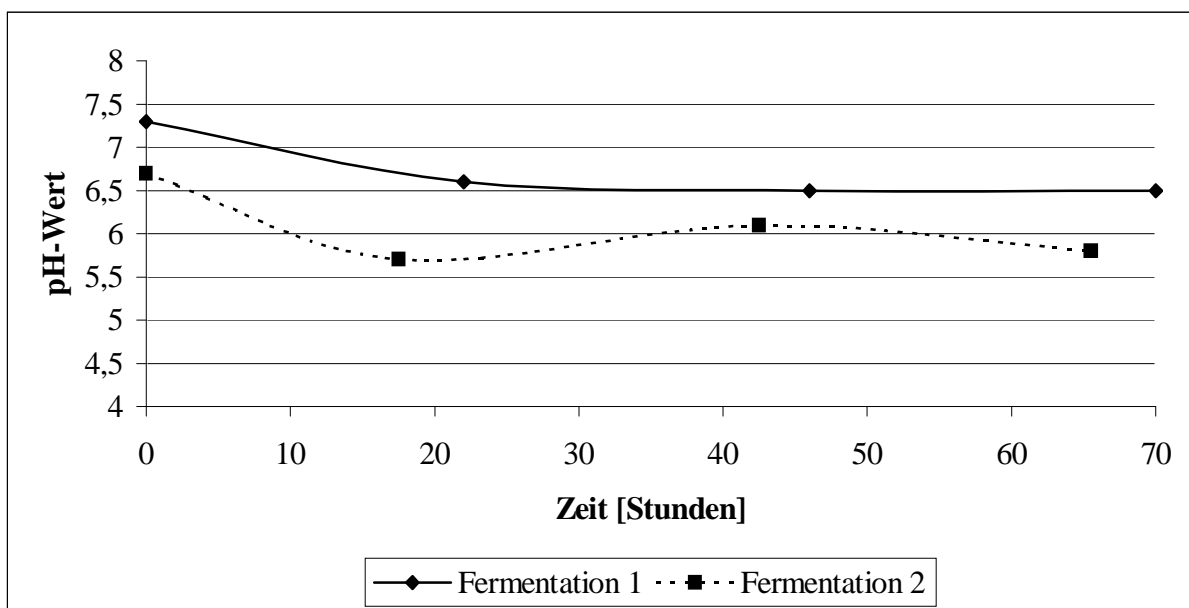


Abb. 20: Biomasse in der Fermentation 1 und 2 von AK 623

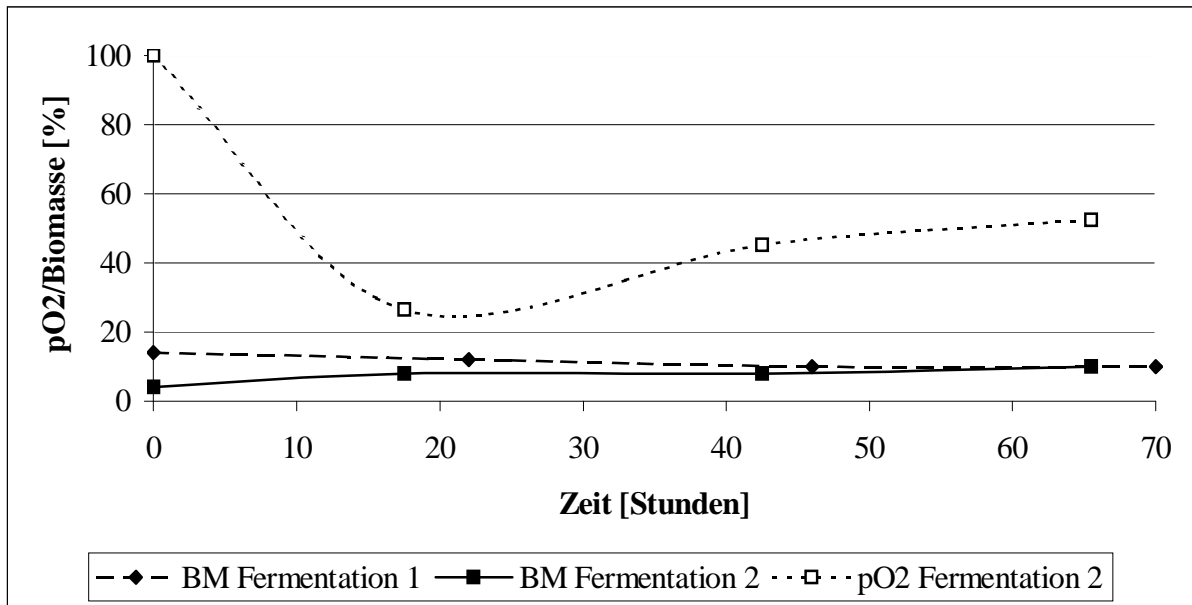


Abb. 21: Entwicklung des pH-Wertes in Fermentation 1 und 2 von AK 623

In Fermentation 1 wurde keine der Substanzen 623-D1, 623-D2 und 623-B produziert, während sich in Fermentation 2 die Komponente 623-D1 und 623-D2 in einer maximalen Konzentration von 24,4 mg/l bzw. 5,2 mg/l. Die in der Medienvariation neu aufgetretenen Komponenten 623-A1 und 623-A2 wurden jedoch nicht gebildet. Neu trat die Komponente 623-B bei Rt 3,9 min auf, deren UV/Vis-Spektren in Abbildung 22 zu sehen ist. Es liegt keine Ähnlichkeit mit den in der HPLC-UV/Vis-Datenbank gespeicherten Naturstoffen vor. Der Produktionsverlauf in Fermentation 2 ist in Abbildung 23 dargestellt. Eine zur Fermentation parallel kultivierte Schüttelkultur in OM-Medium brachte vergleichbare Ergebnisse zur Fermentation 2.

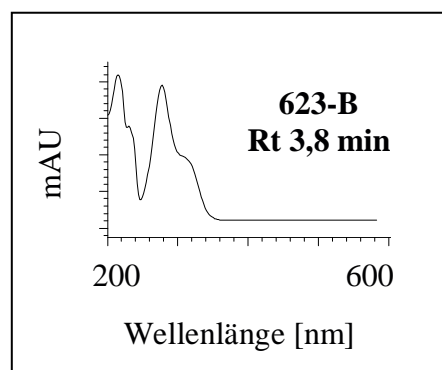


Abb. 22: UV/Vis-Spektrum der Komponente 623-B



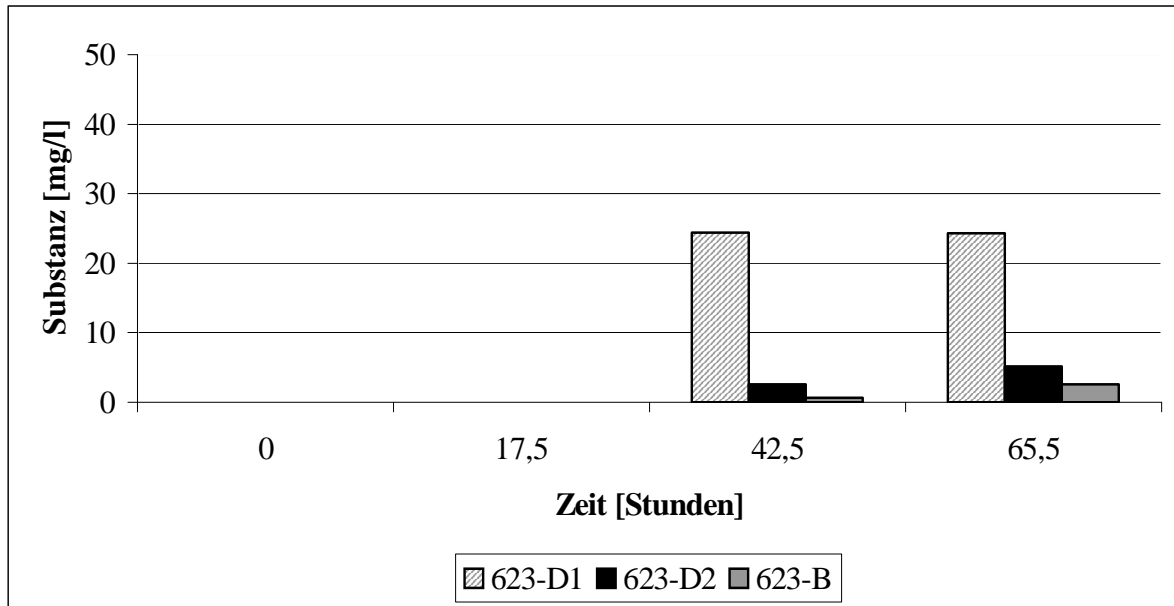


Abb. 23: Produktion der Komponenten 623-B, 623-D1 und 623-D2 in Fermentation 2

### 2.2.5 Kultivierung im Bioreaktor mit Medium SGG

Um größere Mengen an 623-D1 und 623-D2 zu isolieren, wurde AK 623 unter den in Tabelle 26 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Im Verlauf der Fermentation wurde alle 24 Stunden eine Probe gezogen und nach der Dokumentation von pH-Wert und Biomasseanteil wie in II.8 beschrieben aufgearbeitet. Die Proben wurden über HPLC-DAD analysiert (II.9.2).

Tab. 26: Parameter bei der Fermentation 3 von AK 623

	<b>Fermentation 3</b>
<b>Medium:</b>	SGG
<b>Temperatur:</b>	27 °C
<b>Reaktortyp:</b>	Giovanola
<b>Rührsystem:</b>	Propellerschleife
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	1000 Upm
<b>pH-Regelung:</b>	ungeregelt
<b>Belüftung:</b>	0,5 vvm
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Freier Verlauf

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, erreichte der Gelöstsauerstoffanteil nach 25 Stunden mit 39,7% seinen Tiefpunkt, um dann langsam wieder anzusteigen. Die maximale Biomasse war nach 69 Stunden mit 18% erreicht. Der pH-Wert stieg von Beginn an langsam an, das Maximum war zum Erntezeitpunkt mit 8,1 erreicht (s. Abb. 24).

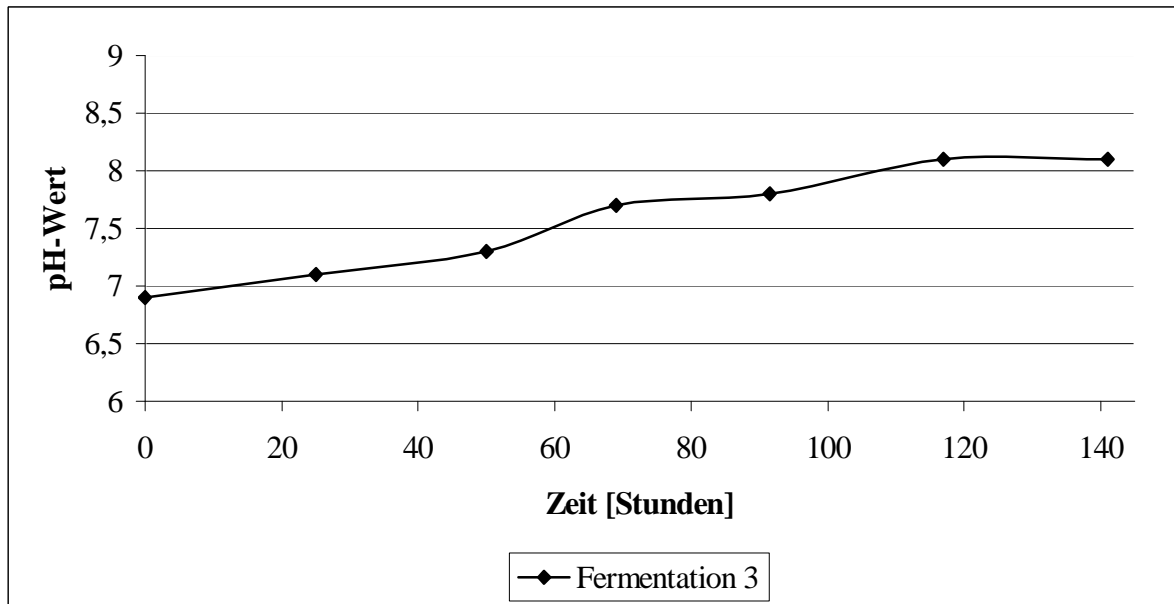


Abb. 24: Verlauf des pH-Wertes in Fermentation 3 des Stammes AK 623

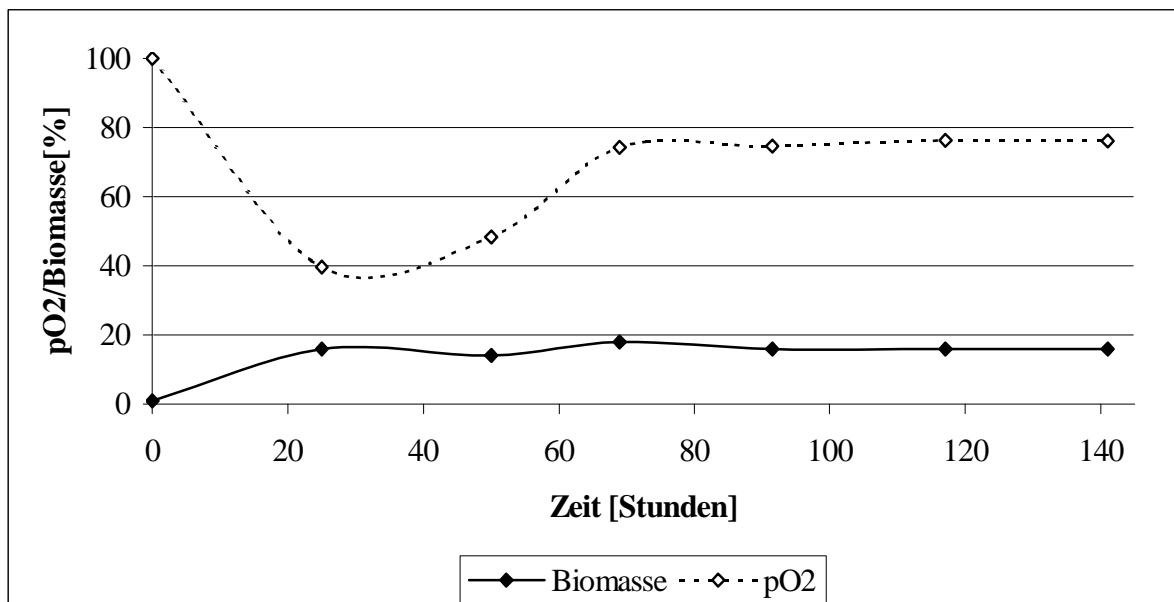


Abb. 25: Verlauf von Biomassebildung und pO<sub>2</sub> in Fermentation 3 des Stammes AK 623

Wie Abbildung 26 zeigt, setzte die Produktion der beiden Komponenten 623-D1 von 623-D2 nach 69 Stunden ein. 623-D1 wurde in einer maximalen Menge von 28,9 mg/ml produziert, während 623-D2 nur mit in einer maximalen Menge von 3,2 mg/l vorlag.

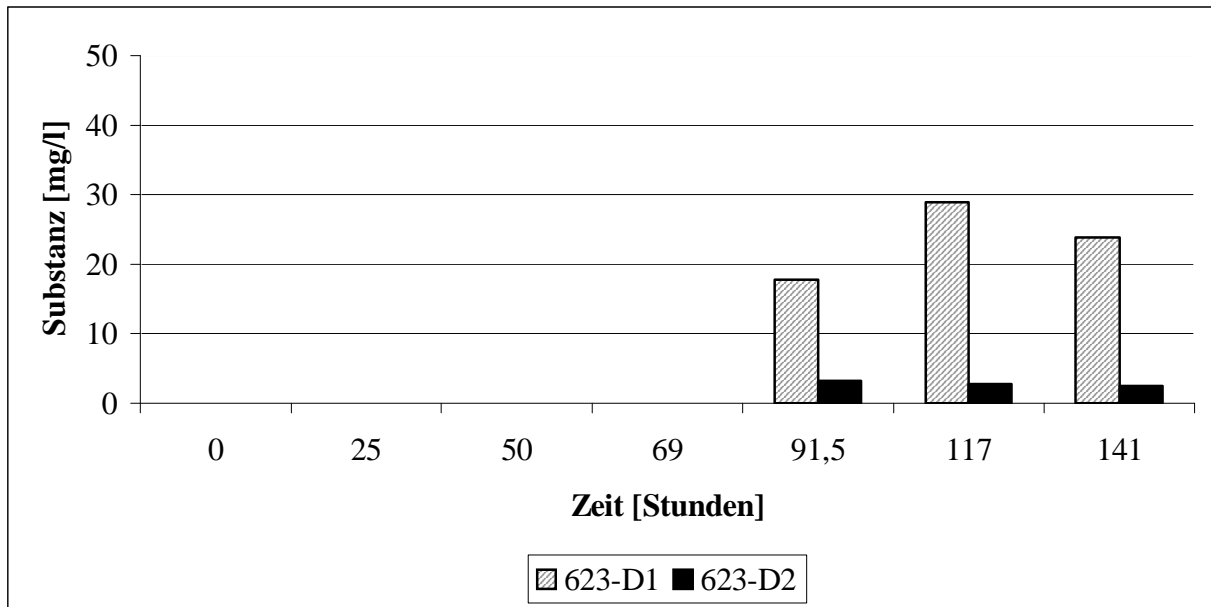


Abb. 26: Produktionsverlauf in Fermentation 3 von AK 623

### 2.1.6 pH-statische Kultivierung im Bioreaktor

In vier Bioreaktoren Typ Mini wurde der Stamm AK 623 pH statisch für 69,5 Stunden kultiviert. Die Bedingungen für die Kultivierung sind in Tabelle 27 beschrieben. Im Verlauf der Fermentation wurde etwa alle 10 - 14 Stunden eine Probe entnommen und die vorhandene Biomasse über das Trockengewicht und den Biomasseanteil bestimmt (II.7.1).

Tab. 27: Parameter der Fermentationen 4 bis 7 von AK 623

	Fermentation			
	4	5	6	7
<b>Vorkultur:</b>	In Medium NL 400, 72 Stunden kultiviert			
<b>Medium:</b>	NL 410			
<b>Temperatur:</b>	27 °C			
<b>Reaktortyp:</b>	Mini			
<b>Rührsystem:</b>	Magnetrührstäbchen			
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	850 Upm			
<b>pH-Regelung:</b>	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5	pH 9,0
<b>Belüftung:</b>	0,5 vvm			
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Nicht bestimmt			

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, hat man sowohl über die Bestimmung des Trockengewichts als auch bei der volumetrischen Bestimmung der Biomasse ein klares maximales Biomassemaximum nach 31 Stunden bei einem pH-Wert von 9,0.

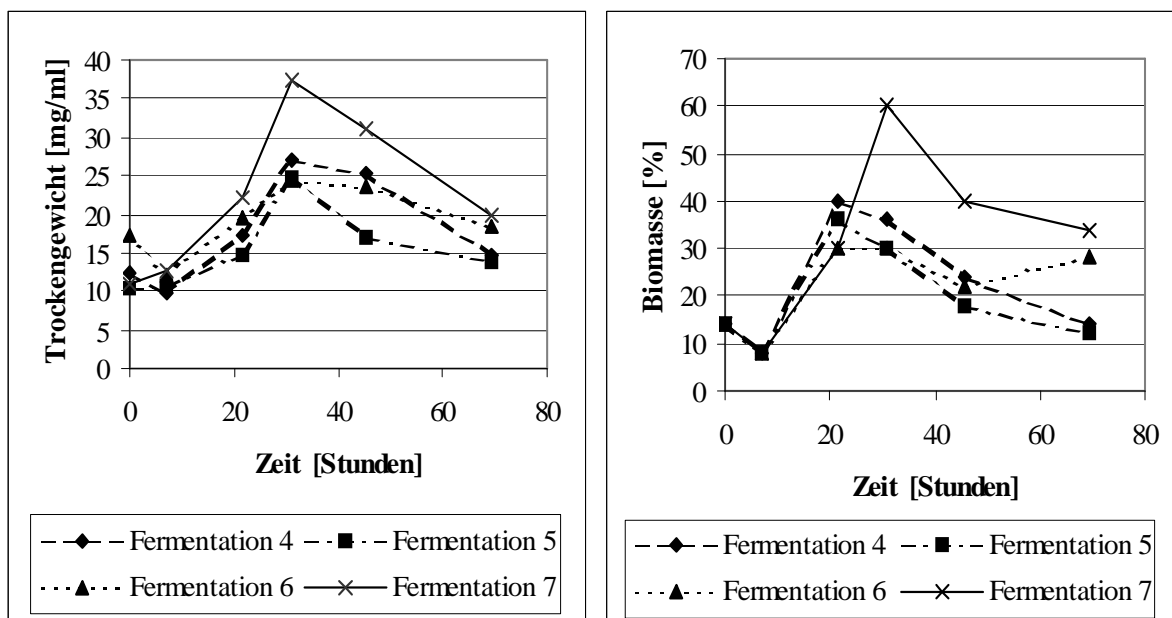


Abb. 27: Verlauf der Biomasse Bildung in den Fermentationen 4 bis 7

## 2.2.7 Isolierung und Reinigung

### 2.2.7.1 Isolierung und Reinigung aus einer Kultur in OM

Die 19 l Kulturbrühe aus Fermenter 2 wurden wie unter II.10.1 beschrieben über Filtration in Myzel und Kulturfiltrat getrennt. Myzel und Kulturfiltrat wurden wie in Abbildung 28 dargestellt aufgearbeitet.

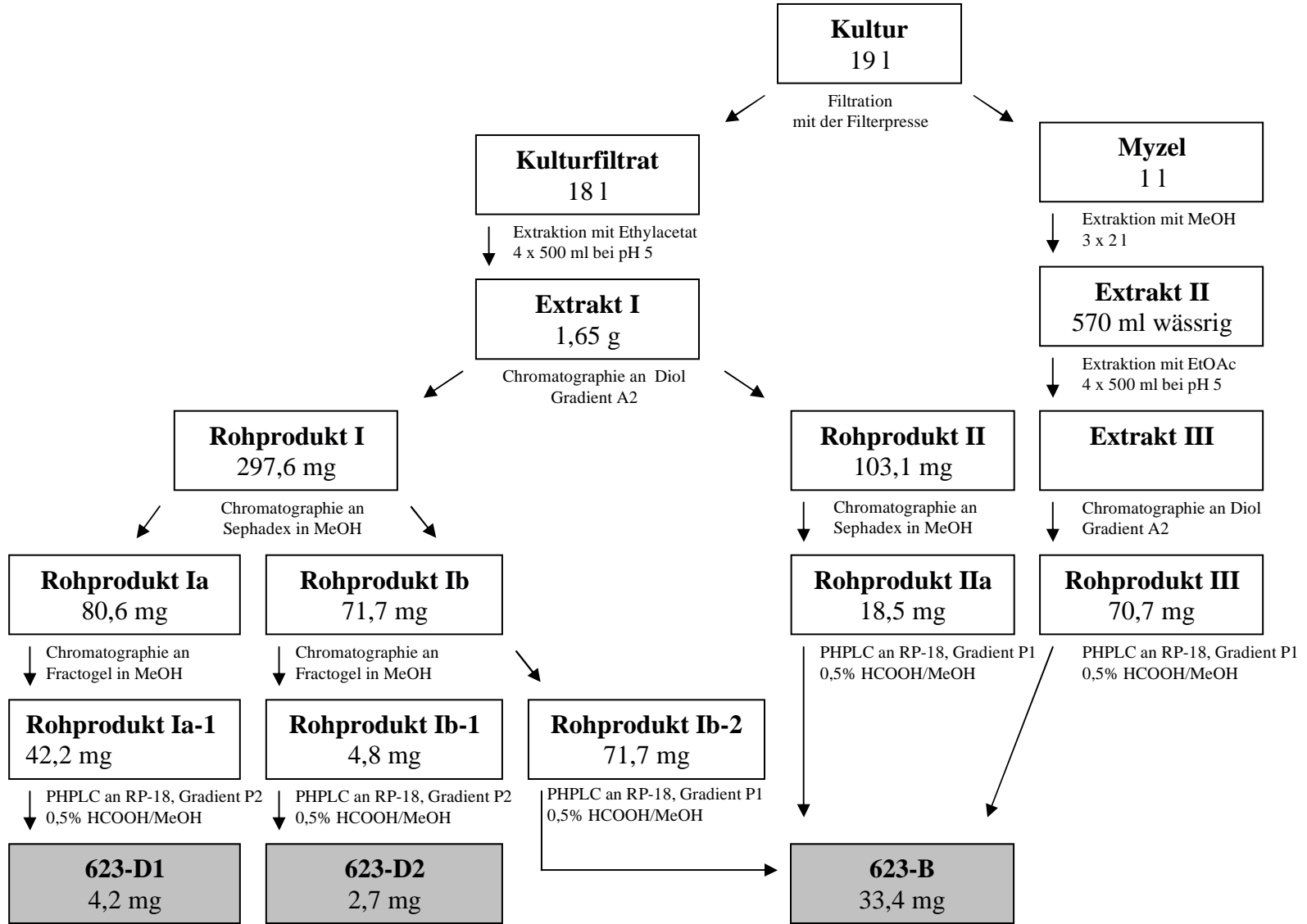
#### Myzel:

Nach dreimaliger Extraktion mit 2 l Methanol wurde der Gesamtextrakt auf den wässrigen Rückstand (570 ml) eingengt und vier Mal mit 500 ml Ethylacetat bei pH 5 extrahiert (II.10.2). Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Adsorptionschromatographie an Diol mit dem Gradienten A2 (II.10.3.2) in Rohprodukt III überführt. Die weitere Reinigung erfolgte nach Vereinigung mit den Rohprodukten Ia und Ib-2 über PHPLC.

#### Kulturfiltrat:

Das Kulturfiltrat wurde auf pH 7 eingestellt und vier Mal einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit 4 l Ethylacetat unterworfen (II.10.2). Die erste chromatographische Reinigung der vereinigten Extrakte (1,65 g) in Rohprodukt I und Rohprodukt II erfolgte über Adsorptionschromatographie an Diol mit dem Gradienten A2 (II.10.3.2). Rohprodukt II (103,1 mg) wurde über Ausschlusschromatographie (II.10.3.3) an Sephadex in Rohprodukt IIa (18,5 mg) überführt und mit den Rohprodukt III und Ib-2 über PHPLC gereinigt. Die Auftrennung von Rohprodukt I in Rohprodukt Ia und Rohprodukt Ib erfolgte ebenfalls über Ausschlusschromatographie an Sephadex. Rohprodukt Ia (80,6 mg) wurde über Ausschlusschromatographie an Fractogel in 42,2 mg Rohprodukt Ia-1 überführt und im Anschluss über PHPLC an RP-18 und dem Gradienten P2 (II.10.3.4) in 4,2 mg 623-D1 überführt. Rohprodukt Ib (71,7 mg) ergab nach einer Ausschlusschromatographie an Fractogel in Methanol die Rohprodukte Ib-1 und Ib-2. Rohprodukt Ib-1 konnte über PHPLC an RP-18 mit dem Gradienten P2 in 2,7 mg 623-D2 überführt werden. Rohprodukt Ib-2 wurde mit Rohprodukt III und Rohprodukt Ia über PHPLC an RP-18 mit dem Gradienten P2 (II.10.3.4) in 33,4 mg 623-B überführt.

Abb. 28: Isolierung der Komponenten 623-D1, 623-D2 und 623-B aus Fermentation 2



Bei einer Bilanzierung der Aufreinigung in Tabelle 28 stellt man fest, dass für eine Erst-Isolierung bei der Komponente 623-B verhältnismäßig geringe Verluste von insgesamt 40% auftraten. Den höchsten Verlust von 20% hatte man hier bei der Chromatographie an der Diolphase. Sehr hohe Verluste traten dagegen bei der Isolierung von 623-D1 und 623-D2 auf. Von anfänglich 58 mg 623-D1 konnten nur 4,2 mg (7,2%) in Reinsubstanz überführt werden. Wieviel 623-D2 im Ethylacetatextrakt enthalten war, konnte nicht festgemacht werden, da die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag. Aber hier sind riesige Verluste bei der PHPLC zu vermerken.

Tab. 28: Bilanzierung der Aufreinigung aus einer Kultur aus OM

	<b>623-D1</b>		<b>623-D2</b>		<b>623-B</b>			
	[mg]	[%]	[mg]	[%]	[mg]		[%]	
<b>Isolation aus ...</b>	<b>KF</b>	<b>KF</b>	<b>KF</b>	<b>KF</b>	<b>KF</b>	<b>My</b>	<b>KF</b>	<b>My</b>
<b>Ethylacetat -Extrakt</b>	58,0	100	n.b.	100	47,7	6,9	87,3	12,7
<b>Adsorptionschromatographie</b>	42,0	72,3	n.b.	?	35,5	6,3	65,0	11,5
<b>Gelchromatographie 1</b>	29,9	51,4	n.b.	?	n.b.	-	?	-
<b>Gelchromatographie 2</b>	21,0	36,2	21,1	?	n.b.	-	?	-
<b>PHPLC</b>	4,2	7,2	2,7	?	33,4		61,1	

### 2.2.7.2 Isolierung und Reinigung aus einer Kultur in SGG

Fermentation 3 des Stammes AK 623 dauerte 141 Stunden. Die Trennung von Kulturfiltrat und Myzel erfolgte über Filtration (II.10.1) und die Biomasse wurde anschließend verworfen. Wie in Abbildung 29 graphisch dargestellt wurde das Kulturfiltrat (18 l) zunächst einmal mit 2 l Cyclohexan bei pH 7 extrahiert (II.10.2.2) und die organische Phase verworfen. Es folgte eine weitere Extraktion der wässrigen Phase mit Ethylacetat bei pH 5 (sechs Mal mit 2 l). Die Auftrennung dieses Rohextraktes in die Rohprodukte D1 und D2 erfolgte über Adsorptionschromatographie an Diol mit dem Gradienten A2 (II.10.3.2). Beide Rohprodukte wurden über Ausschlusschromatographie an Fractogel in Methanol (II.10.3.3) in 48 mg 623-D1 und 11,4 mg 623-D2 überführt.

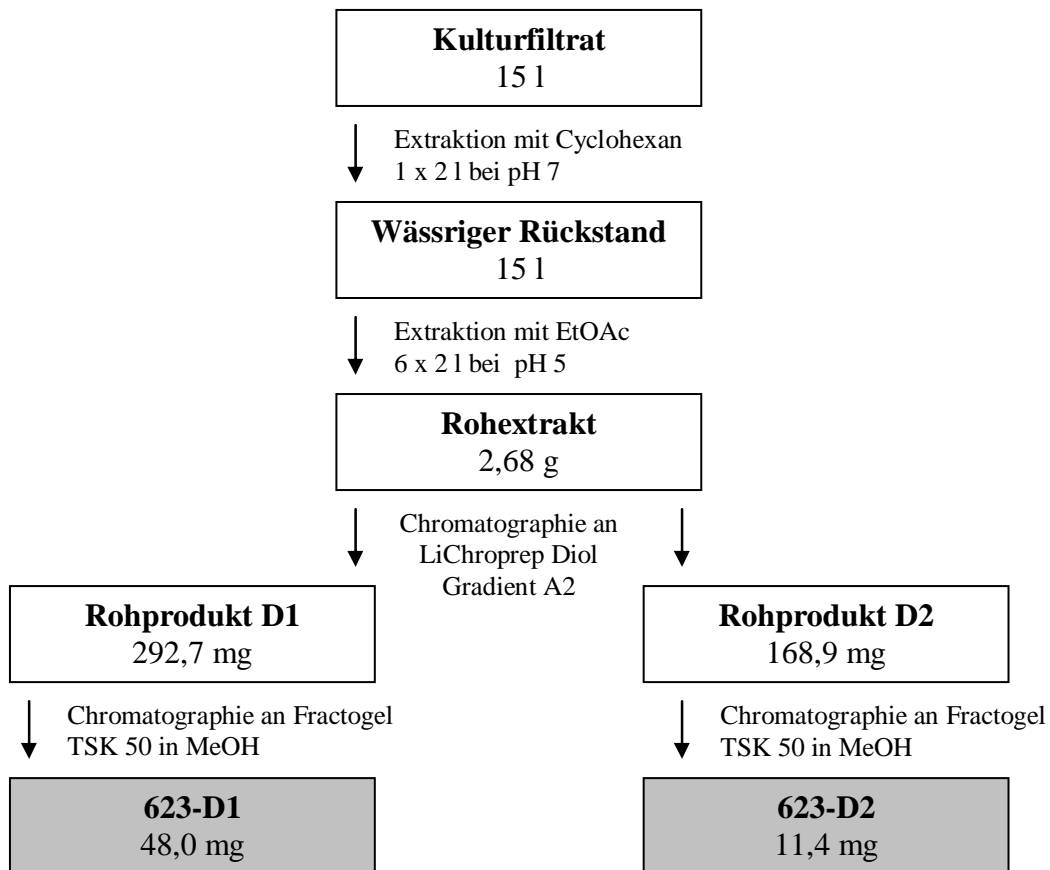


Abb. 29: Aufreinigung der Komponenten 623-D1 und 623-D2 aus Fermentation 3

Bei der Bilanzierung der Aufreinigung in Tabelle 29 zeigt sich, dass die Verluste deutlich geringer als bei der ersten Aufreinigung waren (III.2.2.7.1). Wie bei der ersten Aufreinigung traten ebenfalls hohe Verluste von 623-D1 bei der Adsorptionschromatographie auf.

Tab. 29: Bilanzierung der Aufreinigung aus einer Kultur in SGG

	<b>623-D1</b>		<b>623-D2</b>	
	[mg]	[%]	[mg]	[%]
<b>Ethylacetat -Extrakt</b>	85,8	100	n.b.	100
<b>Diolchromatographie</b>	56,4	65,8	21,5	?
<b>Gelchromatographie 1</b>	48	56,0	11,4	?



### 2.2.8 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung der Komponente 623-B wurde von Herrn Dipl. Chem. Gerhard Lang aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Bringmann, am Institut für Organische Chemie in Würzburg durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass es sich um 4-Hydroxyscytalon handelt, dessen Struktur in Abbildung 30 zu sehen ist. Hydroxyscytalon ist als Naturstoff aus Pilzen bekannt, jedoch bislang noch nicht bei Prokaryonten beobachtet worden (IWASAKI et al., 1973; BELL et al., 1976; SANKAWA et al., 1981; DAHIYA & RIMMER, 1988; GREMAUD & TABACCHI, 1996).



Abb. 30: Strukturformel der isolierten Reinsubstanz 623-B (4-Hydroxyscytalon)

Die Strukturaufklärung der Komponenten 623-D1 und 623-D2 wurde von Frau Dr. A. Höltzel und Herrn Dipl. Chem. D. Schmid aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Jung am Institut für Organische Chemie in Tübingen durchgeführt. Dr. T. Tsuchida aus der Mercian Corporation in Fujisawa (Japan) stellte freundlicherweise Lactonamycin als Referenzsubstanz bereit. Bei Komponente 623-D2 mit einer Masse von 455,38 und der Summenformel C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>10</sub> handelt es sich um das Aglykon des Lactonamycins (MATSUMOTO et al., 1999). Bei 623-D1 konnte eine Masse von 585,53 ermittelt werden. Es handelt sich um den Grundkörper des Lactonamycin mit einem  $\alpha$ -Digitoxose-Zucker. Die Strukturen sind in Abbildung 31 dargestellt.

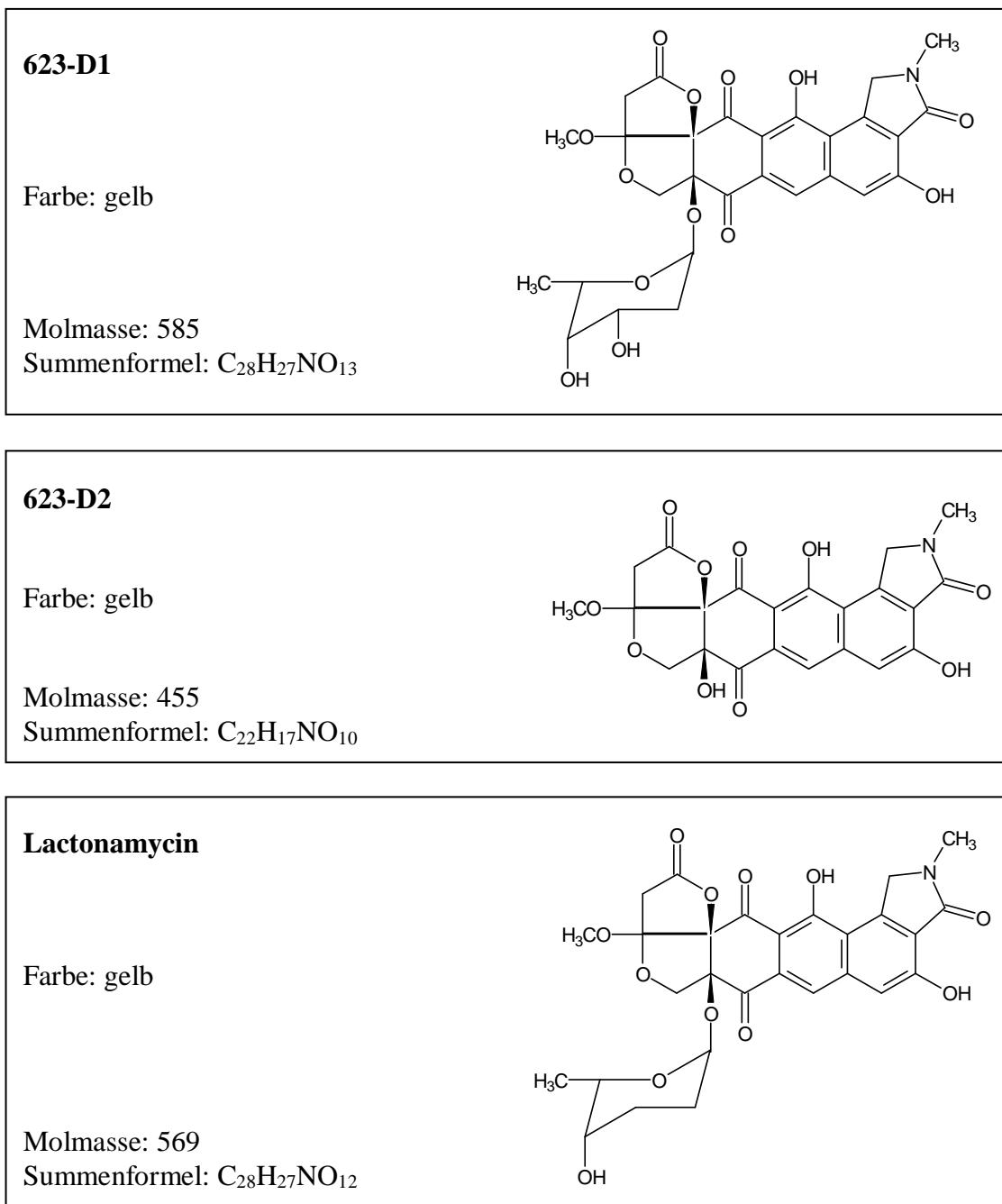


Abb. 31: Beschreibung von 623-D1, 623-D2 und von Lactonamycin

## 2.2.9 Biologische Wirkung der Metabolite aus AK 623

### 2.2.9.1 Antibiotisches Wirkspektrum

Die Reinsubstanzen aus AK 623 wurden gegen die in Tabelle 30 aufgeführten Testorganismen in einem Agardiffusionstest auf ihre antibiotische Eigenschaften untersucht (II.12.1.1). Bei der eingesetzten Konzentration von 1 mg/ml konnte für 623-B keine

antibiotische Wirkung nachgewiesen werden. Die Metabolite 623-D1 und 623-D2 zeigten Aktivität gegen Gram-positive Bakterien, wobei die Hemmwirkung von 623-D1 stets größer als die von 623-D2 war.

Tab. 30: Antibiotisches Wirkspektrum der Metabolite aus AK 623

	Hemmung - Durchmesser [mm]		
	623-D1	623-D2	623-B
<i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 20116	25	10	-
<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 6612	27	24	-
<i>Arthrobacter pascens</i> DSM 20545	23	21	-
<i>Bacillus brevis</i> DSM 30	n.b.	n.b.	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	-	-	-
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 750	14	7	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	13	9	-
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü 57	29	17	-

n.b. = nicht bestimmt

### 2.2.9.2 Test auf DNA-schädigende Wirkung

Bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 1 mg/ml konnte für 623-B, 623-D1 und 623-D2 keine DNA-schädigende Wirkung über den unter II.12.1.3 beschriebenen Test nachgewiesen werden.

### 2.2.9.3 Test auf antivirale Wirkung

Die Komponente 623-D2 erzeugte im unter II.12.1.4 beschriebenen Test bei der eingesetzten Konzentration von 1 mg/ml einen kleinen Wachstumshof von 9 mm, was auf eine geringe antivirale Wirkung hindeutet. Für die Metabolite 623-B und 623-D1 konnte bei dieser Konzentration keine Wirkung nachgewiesen werden.

### 2.2.9.4 Test auf antitumorale Wirkung

Die Testierung der Komponenten wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Beil am Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen Hochschule in Hannover wie unter II.12.4.1 beschrieben durchgeführt.

Wie die in Tabelle 31 aufgelisteten Daten zeigen, hatte vor allem Substanz 623-D1 eine gute Wirkung mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,19 µg/ml bzw. 0,24 µg/ml gegen das Magenkarzinom HM02 und das Mammakarzinom MCF 7. Ebenfalls noch gut ist die Wirkung gegen das Leberkarzinom HEP G2 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,48 µg/ml. Entschieden weniger potent wirkt 623-D2 gegen die drei getesteten Zelllinien, wobei hier die beste Wirkung gegen das Mammakarzinom MCF 7 entfaltet wird.

Tab. 31: *In vitro*-Aktivität von 623-D1 und 623-D2 gegen Tumorzelllinien

Zelllinie	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	TGI [µg/ml]	LC <sub>50</sub> [µg/ml]
<b>623-D1</b>			
HM02	0,19	0,5	3,0
HEP G2	0,48	>10 <sup>a</sup>	>10
MCF 7	0,24	1,3	>10
<b>623-D2</b>			
HM02	1,9	>10 <sup>b</sup>	>10
HEP G2	5,1	>10 <sup>c</sup>	>10
MCF 7	0,85	9,5	>10

IC<sub>50</sub>: 50% Wachstumshemmung

TGI: 100% Wachstumshemmung

LC<sub>50</sub>: 50% Verringerung der Zellzahl nach 24 Stunden im Vergleich zum Zeitpunkt 0

<sup>a</sup> 67% Wachstumshemmung bei 10 µg/ml

<sup>a</sup> 90% Wachstumshemmung bei 10 µg/ml

<sup>a</sup> 60% Wachstumshemmung bei 10 µg/ml

Über eine Zellzyklusanalyse konnte gezeigt werden, dass durch 623-D1 die Zellen in der G2/M-Phase arretiert werden (vgl. Tab. 32).

Tab. 32: Analyse des Einflusses der Komponente 623-D1 auf den Zellzyklus

	Zellzyklusphase - Zellzahl [%]			
	Sub G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	$2,3 \pm 1,0$	$56 \pm 0,8$	$23,8 \pm 1,9$	$17,2 \pm 2,0$
623-D1	$1,9 \pm 0,3$	$53 \pm 3,9$	$18,9 \pm 1,5$	$25,5 \pm 3,1$

G1, S, G2/M = Zellzyklusphasen

Sub G1 = apoptotische Zellen

## 2.3 *Streptomyces* sp. AK 671

### 2.3.1 Herkunft und Taxonomie

AK 671 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Goodfellow aus dem Humus des „Hamsterley Forest“, eines Pinienwaldes in Consett (County Durham, UK) isoliert und wurde über das chemotaxonomische Merkmal LL-Diaminopimelinsäure als den Streptomycceten zugehörig identifiziert. Er gehört zu der Gruppe der Alkalophilen. Bei Kultivierung auf KM 4 Agar hat das Myzel die Farbe hellgelb, das Luftmyzel ist weiß und die Sporen elfenbeinweiß gefärbt. Der Stamm bildet Guttationströpfchen und gibt orange-gelbe Pigmente ins Medium ab. Eine Photographie von AK 671 ist in Abbildung 32 zu sehen.

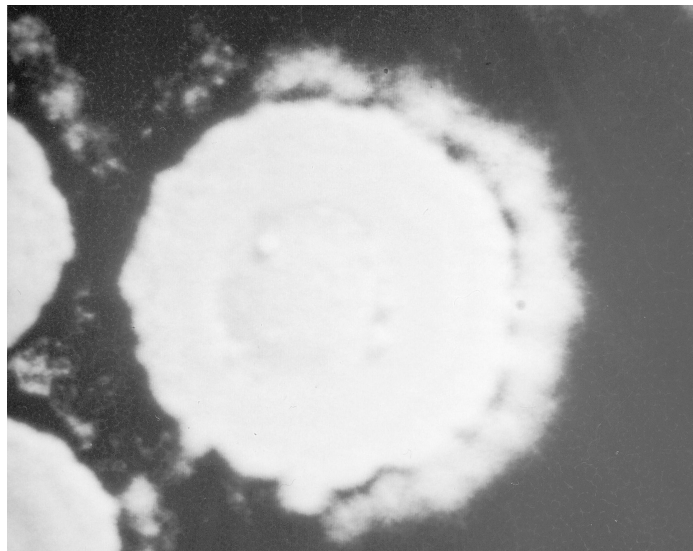


Abb. 32: Lichtmikroskopische Aufnahme von *Streptomyces* AK 671

### 2.3.2 Screening

AK 409 wurde in Schüttelkulturen mit den Nährlösungen NL 19 und SGG mit den pH-Werten 7,0 und 10,0 kultiviert (II.5.2). Da in den Medien mit pH 10 kein Wachstum stattfand, wurden diese Proben nicht weiter bearbeitet. Von den anderen Kulturen wurden wie unter II.8.1 beschrieben Gesamtkulturextrakte hergestellt.

### 2.3.2.1 Chemisches Screening

Die Gesamtkulturextrakte und Kulturüberstände wurden über HPLC analysiert (II.8.2). Ein Chromatogramm bei 260 nm ist in Abbildung 33 zu sehen. In beiden Medien wurden unbekannte Sekundärmetabolite mit Rt 7,5 min, Rt 7,9 min und Rt 8,1 min produziert. Zusätzlich fanden sich in NL 19 weitere unbekannte Substanzen mit Rt 8,6 min, Rt 9,5 min und Rt 10,6 min. Die in Abbildung 34 dargestellten Spektren zeigten keine Ähnlichkeiten zu den Referenzspektren in der HPLC-UV/Vis-Datenbank (II.9.2).

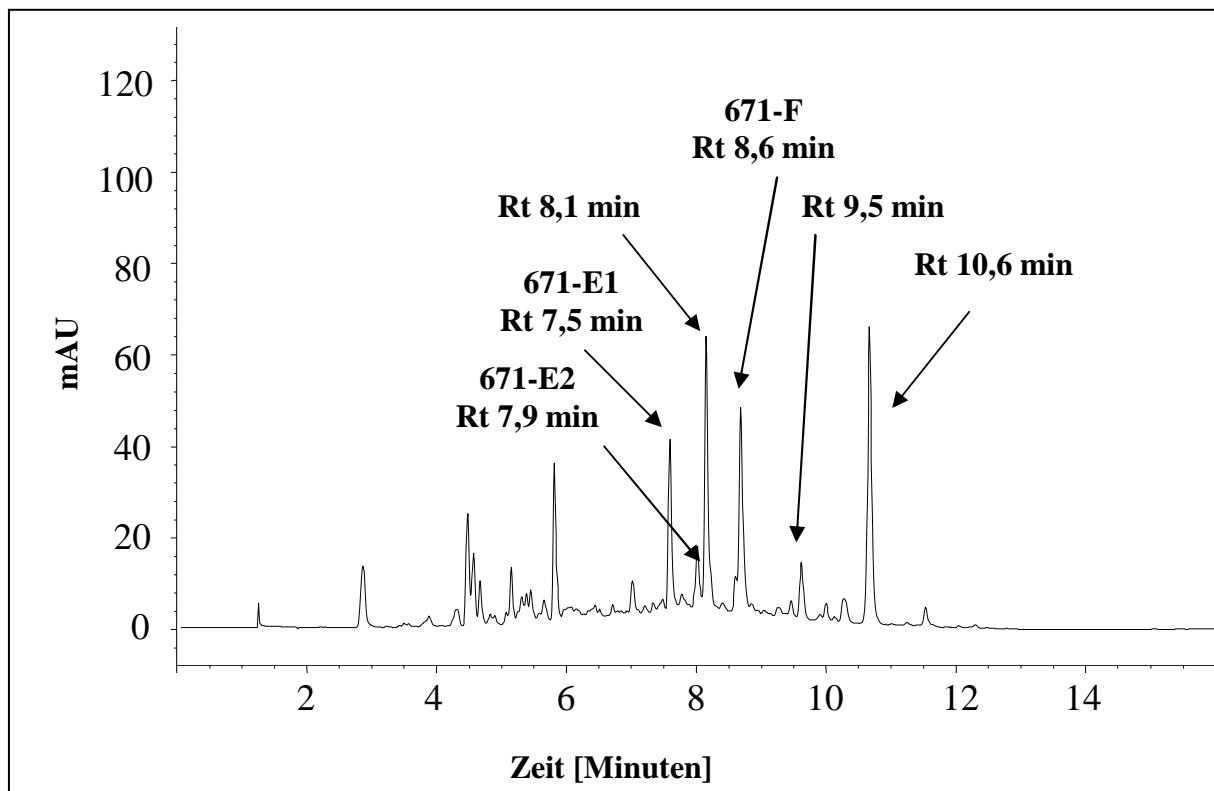


Abb. 33: HPLC-Chromatogramm eines Gesamtkulturextraktes von AK 671 bei 260 nm

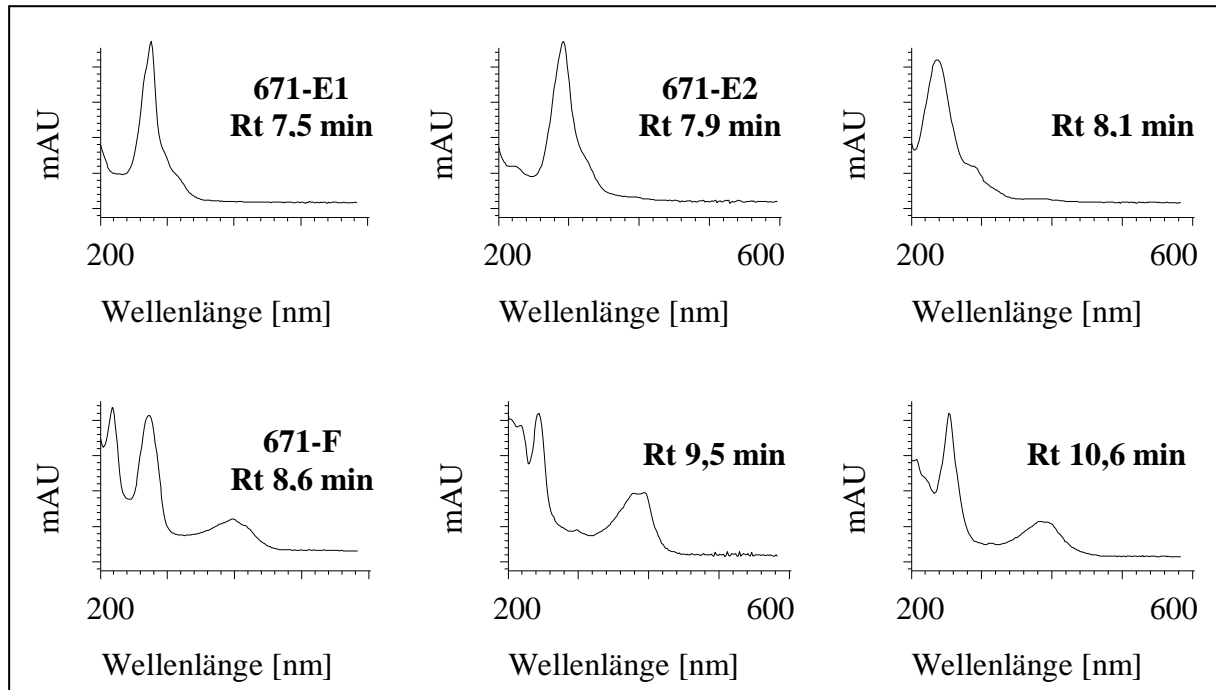


Abb. 34: UV/Vis-Spektren der Substanzen von AK 671 im Screening

### 2.3.2.2 Biologisches Screening

Die Gesamtkulturextrakte wurden über den Agardiffusionstest auf eine Hemmwirkung hin untersucht (II.9.1). Gegen die Organismen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*, *Streptomyces* TÜ 57, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Botrytis cinerea* konnte keine Wirkung festgestellt werden.

### 2.3.3 Medienvariation im Schüttelkolben

AK 671 wurde in Schüttelkulturen mit den Medien NL 19, NL 300, NL 400, NL 410 und OM kultiviert (II.5.2). Alle 24 Stunden wurde eine Probe entnommen, deren pH-Wert und Biomasseanteil bestimmt (II.7) wurde, bevor sie einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat bei pH 5 unterzogen wurde (II.8.1). Die organische Phase wurde 10fach in Methanol angereichert mittels HPLC analysiert (II.8.2).

Wie in Tabelle 33 dargestellt zeigte AK 671 in NL 19 und NL 410 das stärkste Wachstum mit einem Biomasseanteil von 32 bzw. 30% nach 72 Stunden. Danach nahm die Biomasse ab, doch nach 120 Stunden war in allen Medien ein erneuter Anstieg des Biomasseanteils zu beobachten. Der pH fiel bei NL 19 und NL 410 in den ersten 48 Stunden geringfügig und



stieg danach auf pH-Werte von 8 an. In NL 300 und NL 400 stieg der pH-Wert kontinuierlich bis auf Werte von 8,6 bzw. 8,7, während er in OM in den ersten 72 Stunden auf 5,8 fiel und anschließend wieder moderat anstieg.

Tab. 33: Biomasse- und pH- Verlauf von AK 671 in NL 19, NL 300, NL 400, NL 410 und OM-Medium

Medium	pH-Wert					Biomasse [%]				
	Probenahme [Stunden]					Probenahme [Stunden]				
	24	48	72	96	120	24	48	72	96	120
<b>NL 19</b>	6,9	6,2	7,4	7,5	7,9	20	22	32	22	40
<b>NL 300</b>	6,2	6,4	7,7	8,3	8,6	16	20	26	10	32
<b>NL 400</b>	7,2	7,2	7,8	8,3	8,7	16	12	16	8	24
<b>NL 410</b>	7,1	6,8	7,0	8,0	8,4	28	20	30	16	38
<b>OM</b>	6,9	6,2	5,8	6,1	6,0	12	16	16	14	16

Wie in Tabelle 34 zu sehen wurden die Komponenten 671-E1 und 671-E2 in Medium NL 400, NL 300 und OM produziert, am stärksten in den beiden zuletzt erwähnten. Die Komponenten bei Rt 8,1 min, Rt 9,5 min und Rt 10,6 min wurden nicht mehr gebildet. Neu traten in NL 19, NL 300 und NL 410 die Metabolite bei Rt 8,2 min und Rt 10,2 min auf. In NL 400 und NL 410 trat ein neuer Metabolit bei Rt 7,8 min auf. Von den schon im Screening gebildeten Substanzen fanden sich in OM neben den oben erwähnten Metaboliten 671-E1 und 671-E2 noch die Komponente 671-F. Dazu wurden in diesem Medium eine Vielzahl von neuen Substanzen produziert: Rt 5,3 min (671-A), Rt 5,6 min (671-B), Rt 5,8 min (671-C), Rt 6,3 min und Rt 6,0 min (671-D). Keine der Substanzen, deren Spektren in Abbildung 35 dargestellt sind, konnte über die Datenbank (II.9.2) identifiziert werden.

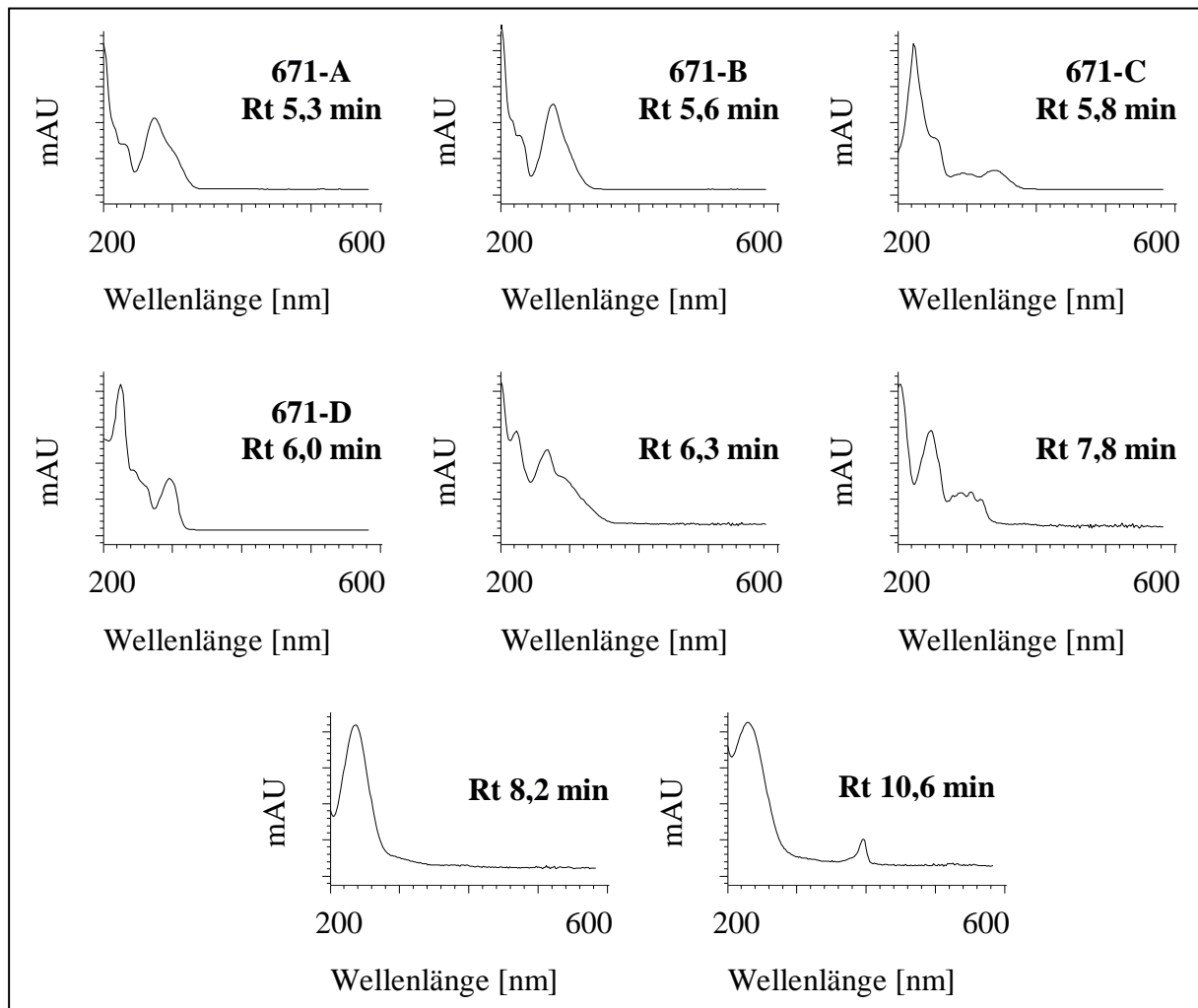


Abb. 35: UV/Vis-Spektren der in der Nährlösungsvariation neu gebildeten Komponenten

Tab. 34: Substanzproduktion in der Nährlösungsvariation

	671-A	671-B	671-C	671-D	671-E1	671-E2	671-F
<b>NL 19</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>NL 300</b>	-	-	-	-	++	++	-
<b>NL 400</b>	-	-	-	-	+	+	-
<b>NL 410</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>OM</b>	++	+	++	+	++	++	++

- = keine Produktion    + = geringe Produktion    ++ = mittelstarke Produktion    +++ = starke Produktion

### 2.3.4 Kultivierung im Bioreaktor

Fermentationen von Stamm AK 671 fanden in den in Tabelle 35 beschriebenen Bioreaktoren statt. Bei Fermentation 1 und 2 wurde etwa alle 24 Stunden eine Probe entnommen und wie in II.8 beschrieben aufgearbeitet und der Analyse über HPLC zugeführt. Bei Fermentation 3 wurden nur zum Erntezeitpunkt Daten aufgenommen.

Tab. 35: Parameter bei der Fermentation von AK 671 im Bioreaktor

	Fermentation		
	1	2	3
<b>Medium:</b>	OM	OM	OM
<b>Temperatur:</b>	27 °C	27 °C	27 °C
<b>Reaktortyp:</b>	Govanola b 20	Biostat S	Biostat E
<b>Rührsystem:</b>	Propellerschleife	Blattrührer	Blattrührer
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	1000 Upm	200 Upm	200 Upm
<b>pH-Regelung:</b>	ungeregelt	ungeregelt	ungeregelt
<b>Belüftung:</b>	0,5 vvm	0,5 vvm	0,5 vvm
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Freier Verlauf	Nicht bestimmt	Nicht bestimmt

Während der Fermentation 1 sank der Gelöstsauerstoffanteil innerhalb der ersten 39,5 Stunden schwach auf 77,5% und stieg im Anschluss wieder an. Der pH-Wert fiel, wie in Abbildung 37 dargestellt, im Verlauf der Fermentation 1 auf einen Wert von 4,7 ab. Bei Fermentation 2 sank der pH-Wert ebenfalls kontinuierlich im Verlauf der Fermentation und erreichte einen Wert von 5,7. Die Biomasseproduktion (Abb. 36) erreichte in Fermentation 2 ein Maximum von 16% nach 46 Stunden, während in der Fermentation 1 der maximale Biomasseanteil von 14% zum Erntezeitpunkt erreicht wurde.

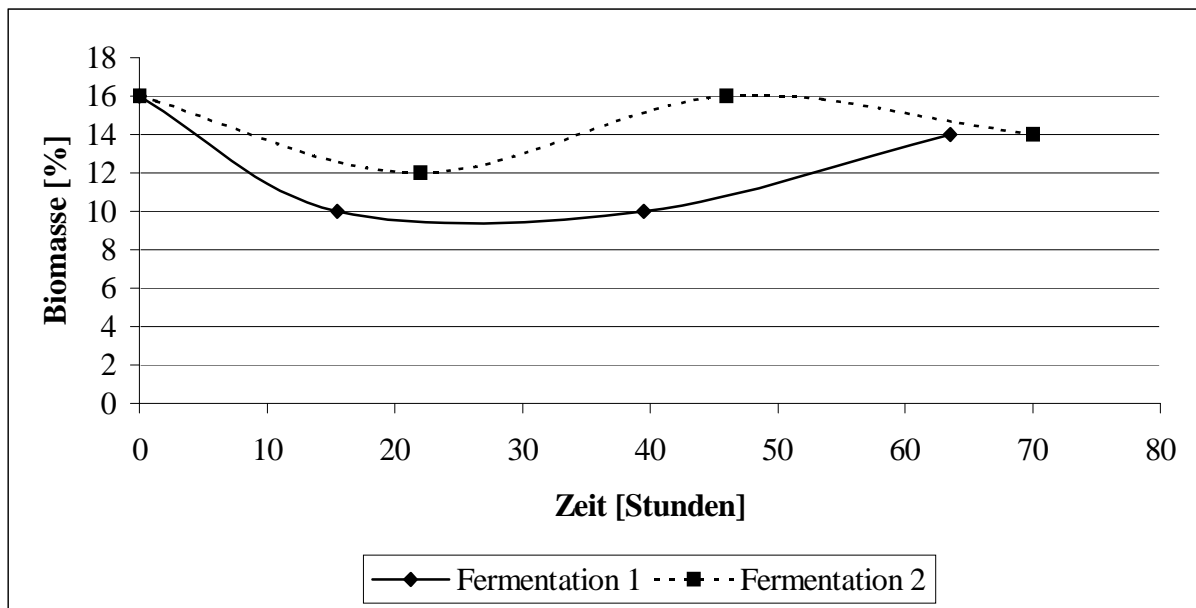


Abb. 36: Verlauf der Biomassebildung von AK 671 bei Fermentation 1 und 2

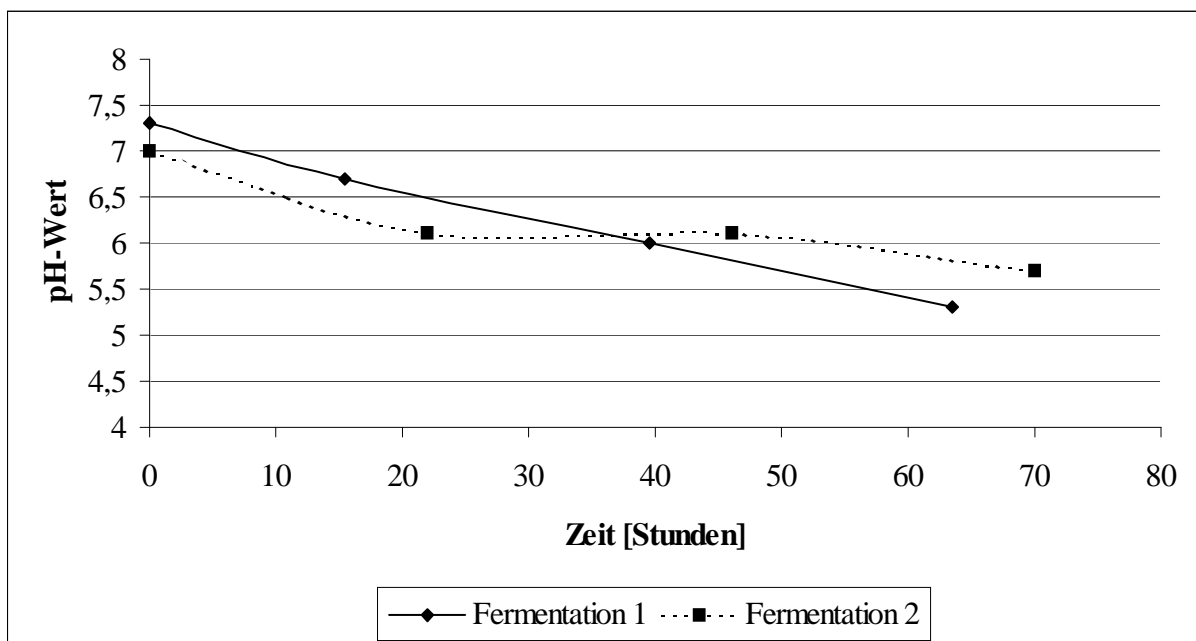


Abb. 37: pH-Wert Verlauf von AK 671 bei Fermentation 1 und 2

In Fermentation 1 lagen alle Substanzen nach 63,5 Stunden in ihrer maximalen Konzentration vor: 671-A mit 4,0 mg/l, 671-B mit 14,6 mg/l, 671-C mit 3,4 mg/l und 671-F mit 11,2 mg/l (Abb. 38). 671-D wurde nicht gebildet. In Fermentation 2 war die Produktion besser (Abb. 39). Nach 70 Stunden lagen 4,7 mg/l 671-A, 21,9 mg/l 671-B, 6,4 mg/l 671-C und 0,7 mg/l 671-D vor. Die Menge an 671-F konnte wegen überlagernder Substanzen nicht bestimmt

werden. Ebenfalls konnte eine Komponente 671-G nachgewiesen werden, die das gleiche UV/Vis-Spektrum wie 671-C aufweist, aber erst bei Rt 7,9 min eluiert wird.

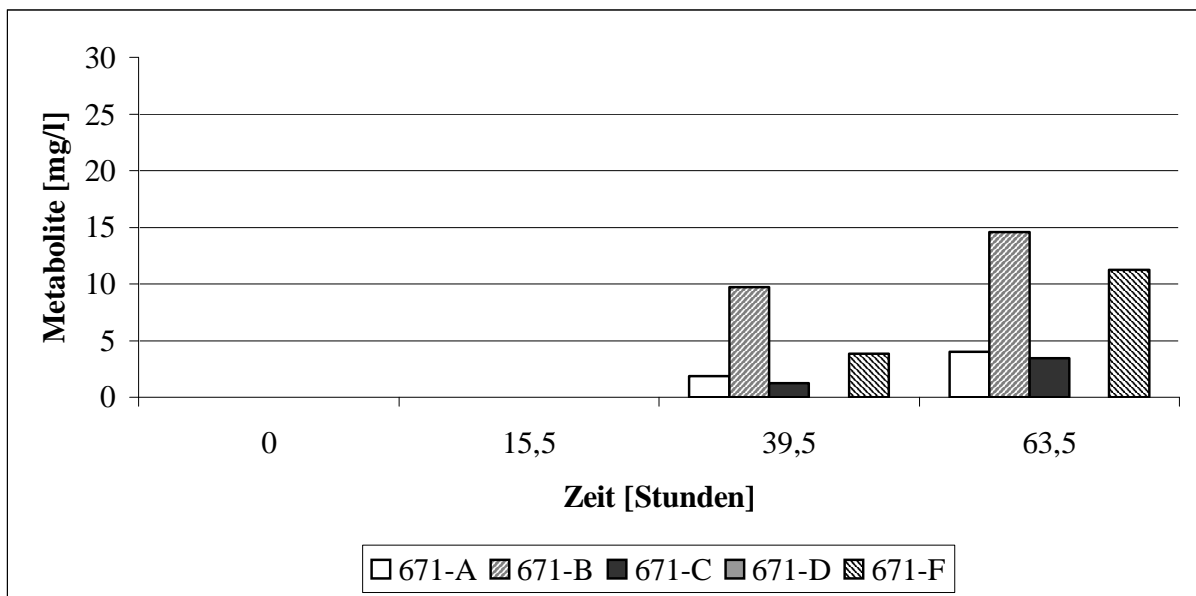


Abb. 38: Metabolitproduktion von AK 671 im Verlauf von Fermentation 1

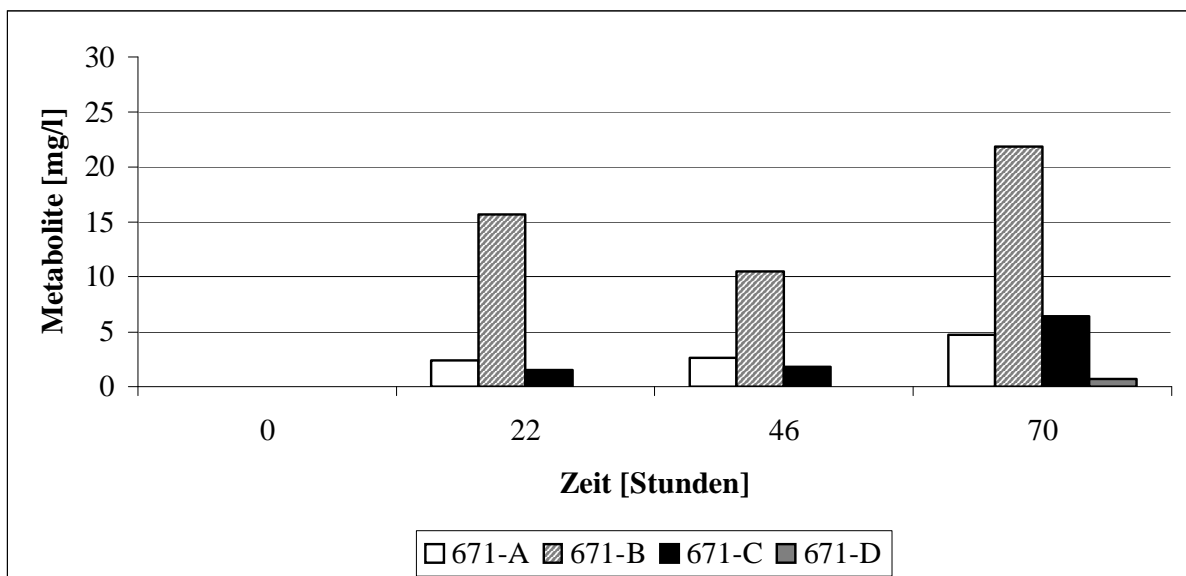


Abb. 39: Metabolitproduktion von AK 671 im Verlauf von Fermentation 2

### 2.3.5 pH-statische Kultivierung im Bioreaktor

In vier Bioreaktoren Typ Mini wurde der Stamm AK 623 pH-statisch für 69,5 Stunden kultiviert. Die Bedingungen der Fermentationen sind unter Tabelle 36 beschrieben.

Tab. 36: Kultivierungsbedingungen bei den pH-statischen Fermentationen von AK 671

	Fermentation			
	4	5	6	7
<b>Vorkultur:</b>	In Medium SGG, 72 Stunden kultiviert			
<b>Medium:</b>	NL 410			
<b>Temperatur:</b>	27 °C			
<b>Reaktortyp:</b>	Mini			
<b>Rührsystem:</b>	Magnetrührstäbchen			
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	850 Upm			
<b>pH-Regelung:</b>	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5	pH 9,0
<b>Belüftung:</b>	0,5 vvm			
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Nicht bestimmt			

Im Verlauf der Kultivierung wurde etwa alle 10 - 14 Stunden Probe entnommen und die Biomasse über Trockengewicht und Sediment bestimmt (II.7.1). Der Kulturüberstand wurde über HPLC analysiert (II.8.2).

Wie Abbildung 40 zeigt, stimmen die Ergebnisse von Trockengewichtsbestimmung und volumetrischer Biomassebestimmung nicht überein. Bei der Trockengewichtsbestimmung war der maximale Biomasseanteil nach 45,5 Stunden in Fermentation 6 erreicht. Dagegen zeigte die volumetrische Bestimmung ein klares Maximum des Biomasseanteils nach 45,5 Stunden in Fermentation 7.

Aus den HPLC-Analysen ist ersichtlich, dass sich in den Fermentationen 4 und 5 neben 671-C auch große Mengen von 671-G fanden, in Fermentation 6 und 7 war nur wenig 671-G nachweisbar.

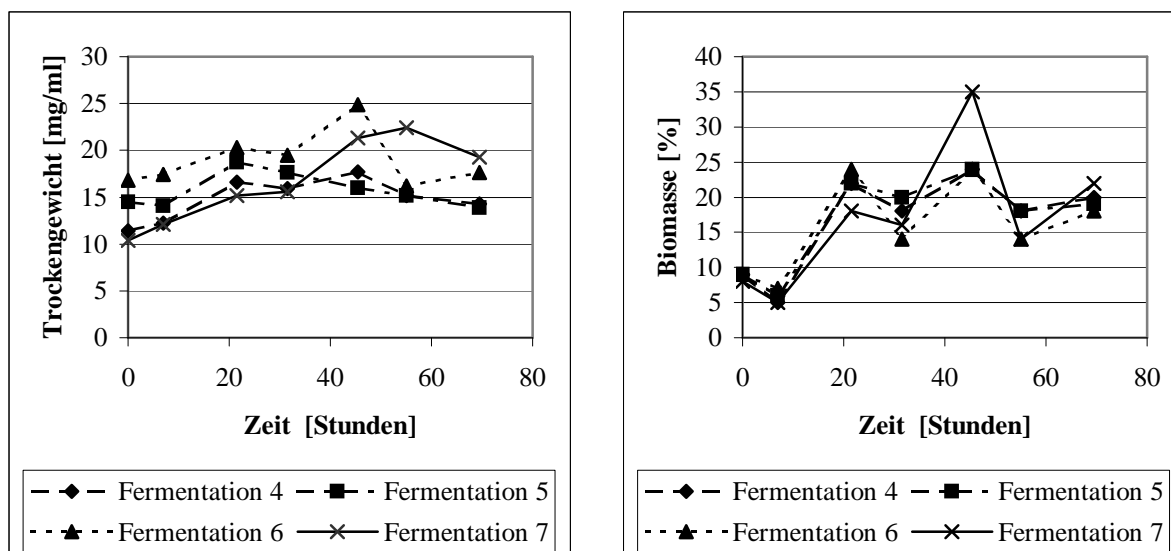


Abb.40: Entwicklung der Biomassebildung bei pH-statischer Fermentation

### 2.3.6 Isolierung und Reinigung der Komponenten

Die Kulturbrühe (8 l) von Fermentation 3 (III.2.3.5) wurde nach 72 Stunden - wie unter Abschnitt II.10.1 beschrieben - über Druckfiltration in Kulturüberstand und Myzel getrennt.

Die Biomasse wurde verworfen, während das Kulturfiltrat auf pH 5 eingestellt und, wie in Abbildung 41 dargestellt, zehn Mal mit 1,5 l Ethylacetat extrahiert wurde. Nach dem Trocknen des Ethylacetatextraktes hatte der 2,965 g schwere Rückstand eine ölige Konsistenz und wies einen sauren Geruch auf. Dieser Rohextrakt konnte über Adsorptionschromatographie an Diol mit dem Gradienten A1 (II.10.3.2) in die vier Fraktionen Rohprodukt A/B-1, C-1, D-1 und F-1 aufgetrennt werden.

Rohprodukt A/B-1 (179,3 mg) wurde zunächst über Ausschlusschromatographie an Fractogel (II.10.3.3) weiter aufgereinigt. Das resultierende Rohprodukt A/B-2 mit einem Gewicht von 94,9 mg wurde unter Einsatz der präparativen HPLC an Nucleosil C-18 mit dem Gradienten P1 (II.10.3.4) in 10,4 mg Komponente 671-A und in 94,9 mg Rohprodukt B-3 überführt. 9,6 mg 671-B konnten über Ausschlusschromatographie an Fractogel aus Rohprodukt B-3 gewonnen werden.

Rohprodukt C-1 (237,8 mg) wurde nach einer Ausschlusschromatographie an Fractogel (171,2 mg) unter Einsatz der präparativen HPLC an Nucleosil C-18 mit Gradient P1 in Komponente 671-C (12,2 mg) überführt.

Aus Rohprodukt D-1 (1337,9 mg, ölig) wurden über Ausschlusschromatographie an Fractogel zu 23,4 mg Rohprodukt D-2 gewonnen, das unter Einsatz der präparativen HPLC an Nucleosil C-18 mit Gradient P1 in 3,6 mg Komponente 671-D überführt werden konnte.

Rohprodukt F-1 (137,5 mg, ölig) wurde über Gelchromatographie an Fractogel in 35,6 mg Komponente 671-F überführt.

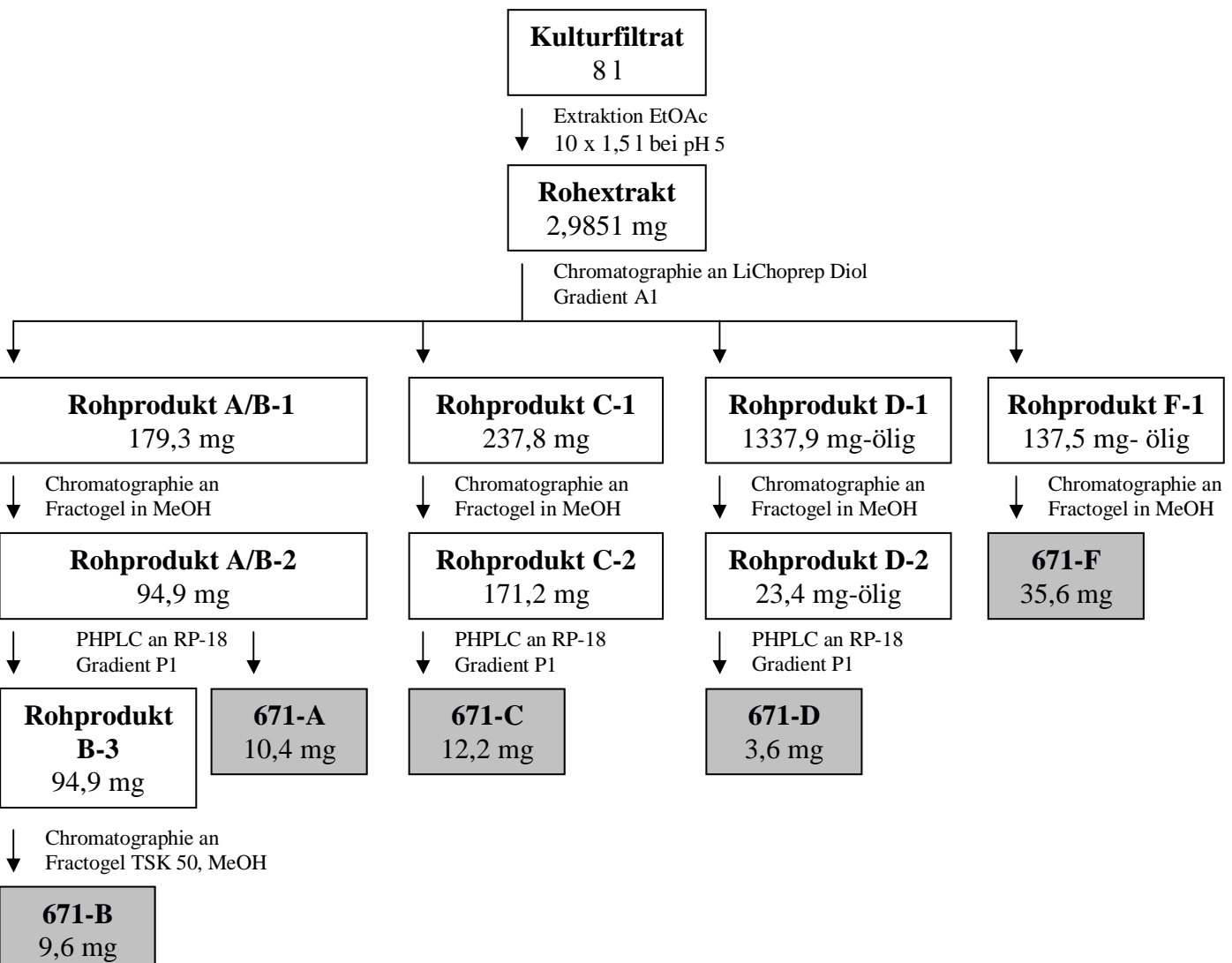


Abb. 41: Isolierungsschema der Metabolite von AK 671



### 2.3.7 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung der Komponente 671-D wurde von Herrn Dipl. Chem. Robert Pfeifer und die von 671-C von Herrn Dipl. Chem. Andreas Hamm, beide aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Bringmann, am Institut für Organische Chemie in Würzburg, durchgeführt.

Die Strukturen der identifizierten Komponenten sind in Abbildung 42 zu sehen. Bei 671-D handelt es sich um die bislang noch nicht beschriebene Komponente (2-Methyl-4-oxo-4H-Chromen-5-yl)Acetylsäure. Die Komponente 671-F ist 3,8-Dihydroxy-1-Methylantrachinon-2-Carbonsäure. Die erste Beschreibung erfolgte 1989 durch KRUPA et al., der es ebenfalls aus einem Streptomyceten isolieren konnte. Bemerkenswert ist, dass es zu den relativ selten vorkommenden  $\alpha$ -Methylantrachinonen gehört, die lange Zeit nur in Insektenpigmenten und als Inhaltsstoffe einzelner Pflanzen gefunden worden waren. Bei dem Diketonaphthol-Glucoronid 671-C handelt es sich um eine bislang unbekannte Komponente. Bei 671-G handelt es sich um Diketonaphthol, das 1974 zum ersten Mal synthetisch hergestellt wurde (HARRIS et al., 1974).

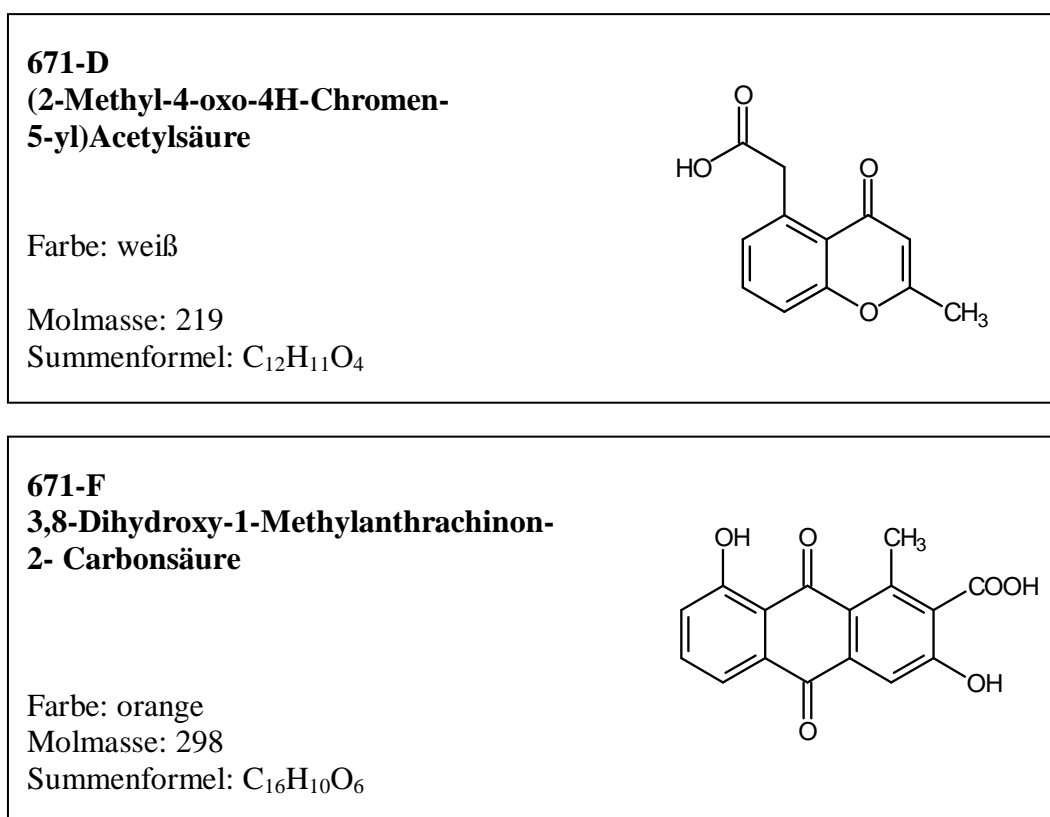


Abb.42a: Beschreibung der identifizierten Substanzen aus AK 671

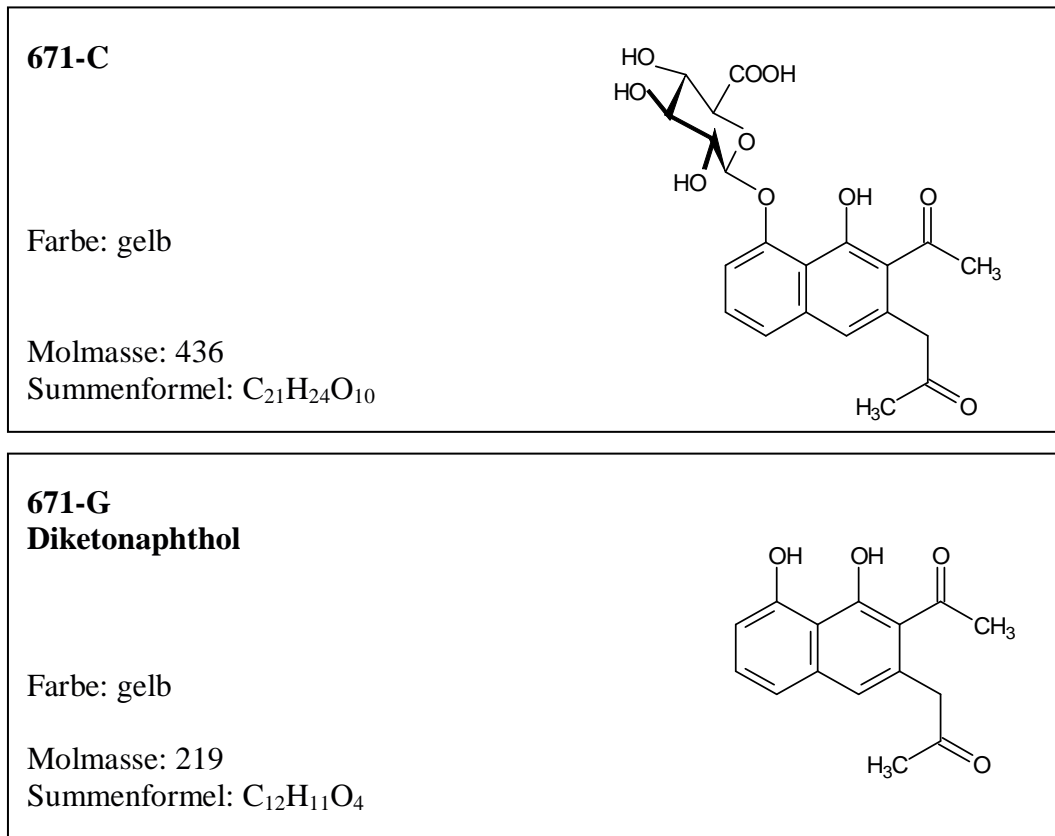


Abb.42b: Beschreibung der identifizierten Substanzen aus AK 671

## 2.3.8 Biologische Wirkung

### 2.3.8.1 Antibiotisches Wirkspektrum der Metabolite aus AK 671

Die Reinsubstanzen aus AK 671 wurden gegen die in Tabelle 06 aufgeführten Testorganismen im Agardiffusionstest auf ihre antibiotische Aktivität getestet (II.12.1.1). Bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 1 mg/ml konnte für keinen der Metabolite eine antibiotische Wirkung nachgewiesen werden.

### 2.3.8.2 DNA-schädigende Wirkung der Metabolite aus AK 671

Der Test wurde wie unter II.12.1.3 beschrieben durchgeführt und bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 1 mg/ml konnte für keinen der Metabolite eine DNA-schädigende Wirkung nachgewiesen werden.

### 2.3.8.3 Antivirale Eigenschaften der Metabolite aus AK 671

Keine der Reinsubstanzen war bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 1 mg/ml in dem unter II.12.1.3 beschriebenen Test antiviral wirksam.

### 2.2.8.4 Test auf antitumorale Wirkung

Die Testierung der Komponenten wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Beil am Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen Hochschule in Hannover wie unter II.12.4.1 beschrieben durchgeführt.

Für AK 671-A und 671-B konnte bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 10 µg/ml keine Wirkung nachgewiesen werden. Komponente 671-C zeigte die stärkste Wirkung gegen das Mammakarzinom MCF 7 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,9 µg/ml. 671-D wirkte schwach wachstumshemmend auf alle Zelllinien (Tab. 37). Über eine Zellzyklusanalyse konnte gezeigt werden, dass 671-C die Zellen in der S-Phase arretiert (Tab. 38).

Tab. 37 : *In vitro*-Aktivität von 671-C gegen Tumorzelllinien

Zelllinie	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	TGI [µg/ml]	LC <sub>50</sub> [µg/ml]
<b>671-C</b>			
HM02	1,0	6,3	8,6
HEP G2	2,1	8,0	>10
MCF 7	0,9	3,0	8,0
<b>671-D</b>			
HM02	8,0	>10	>10
HEP G2	>10 <sup>a</sup>	>10	>10
MCF 7	>10 <sup>b</sup>	>10	>10

IC<sub>50</sub>: 50% Wachstumshemmung

TGI: 100% Wachstumshemmung

LC<sub>50</sub>: 50% Verringerung der Zellzahl nach 24 Stunden im Vergleich zum Zeitpunkt 0

<sup>a</sup> 45% Wachstumshemmung bei 10 µg/ml

<sup>b</sup> 40% Wachstumshemmung bei 10 µg/ml

Tab. 38: Analyse des Einflusses der Komponente 671-C auf den Zellzyklus

	Zellzyklusphase - Zellzahl [%]			
	Sub G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	$2,2 \pm 0,7$	$53,0 \pm 1,2$	$26,0 \pm 0,5$	$18,0 \pm 1,2$
671-C	$2,4 \pm 0,8$	$28,0 \pm 1,1$	$57,0 \pm 0,5$	$12,1 \pm 1,5$

G1, S, G2/M = Zellzyklusphasen

Sub G1 = apoptotische Zellen

## 2.4 *Streptomyces* sp. KC 1030

### 2.4.1 Herkunft und Taxonomie

KC 1030 (Abb. 43) wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. T. Bull aus Erdproben des Terra Nova Bay (Antarktis) isoliert und gehört zu der Gruppe der antarktischen Actinomyceten. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Goodfellow wurde der Stamm über chemische Merkmale (LL-DAP) als *Streptomyces* identifiziert. Die Farbe des Myzel auf KM 4-Agar ist hellgelb, das Luftmyzel ist weiss gefärbt und die Sporen beige-grau. Der Stamm sekretiert bräunliche Pigmente ins Medium und bildet manchmal Guttationströpfchen.

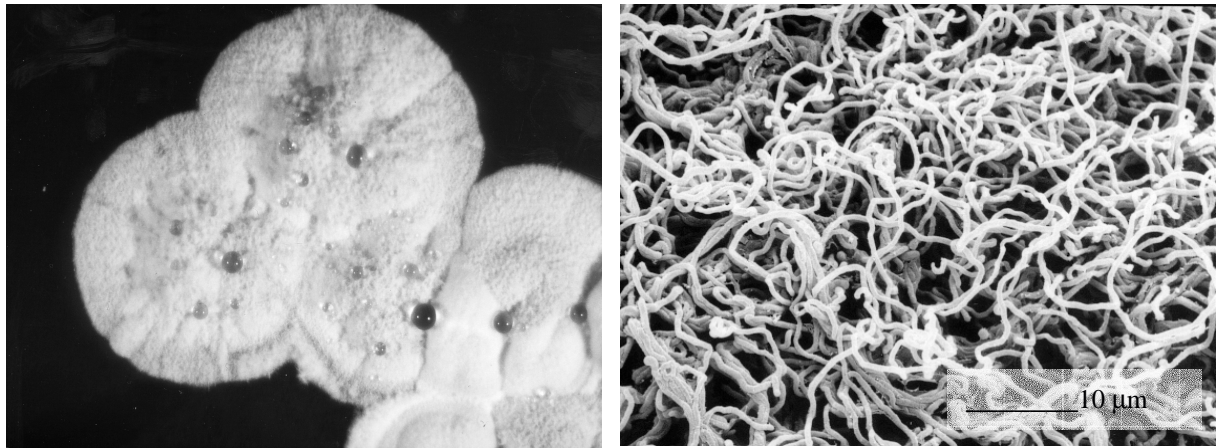


Abb. 43: Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahme von *Streptomyces* KC 1030

### 2.4.2 Screening

KC 1030 wurde in Schüttelkulturen in den Medien NL 19, NL 500 und SGG kultiviert (II.5.2) und nach 72 und 120 Stunden wurde je ein Kolben wie in II.9 beschrieben aufgearbeitet.

#### 2.4.2.1 Chemisches Screening

Die Extrakte und die Kulturfiltrate wurden mit HPLC-DAD analysiert (II.8.2). In Medium SGG fanden sich unbekannte Komponenten bei Rt 6,1 min (1030-G) und Rt 6,7 min (1030-D), und in NL 500 konnte eine Komponente bei Rt 7,0 min (1030-B) detektiert werden. In Abbildung 44 sind die UV/Vis-Spektren der Metabolite zu sehen. Das UV/Vis-Spektrum der Substanz bei Rt 6,1 min ähnelt Urdamycin B, und das der Komponente bei Rt 6,7 min weist Ähnlichkeiten mit dem Spektrum von Fridamycin E auf. Da aber die Retentionszeiten bei

beiden Komponenten nicht mit denen der Referenzsubstanzen übereinstimmen, handelt es sich nicht um die identischen Metabolite. Das Spektrum der Komponente mit Rt 7,0 min ähnelt keinem der in der Datenbank gespeicherten Spektren (II.9.2).

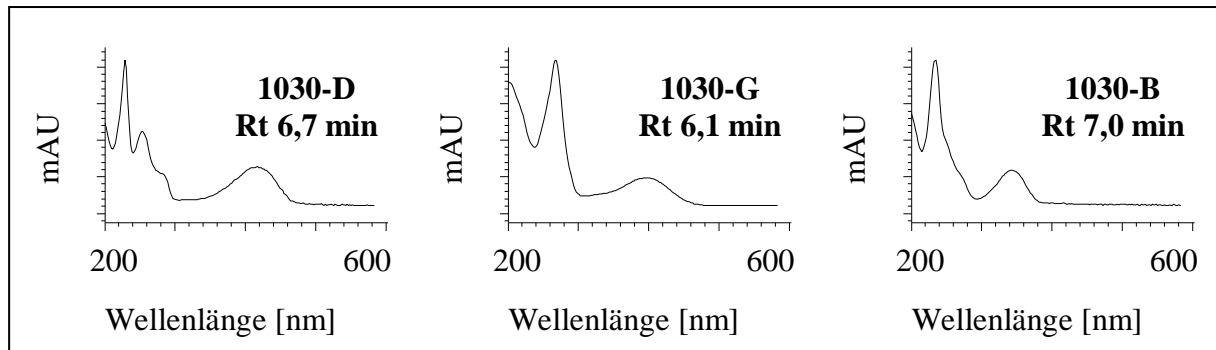


Abb. 44: UV/Vis-Spektren der Komponenten von KC 1030 im Screening

#### 2.4.2.2 Biologisches Screening

Bei der Analyse der Extrakte von KC 1030 über Agardiffusionstest (II.9.1) fiel besonders die hemmende Wirkung gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Botrytis cinerea* auf. In Tabelle 39 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tab. 39: Antibiotische Wirkung der Extrakte von KC 1030 aus dem Screening

Nährlösung	Zeitpunkt [Stunden]	Testorganismus - Hemmhof [mm]								
		<i>B. subt.</i> KM	<i>B. subt.</i> MM	<i>Staph. au.</i> KM	<i>Myc. phlei</i> KM	<i>Strep. Tü 57</i> KM	<i>E. coli</i> KM	<i>E. coli</i> MM	<i>Sacch. cerv.</i> KM	<i>Bot. ciner.</i> KM
NL 19	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	16
NL 500	72	0	0	0	0	0	0	0	0	18
	120	0	7	0	0	0	0	0	0	18
SGG	72	7	12	7	0	0	0	0	0	26
	120	8	13	8	0	0	0	0	0	30

KM = Komplexmedium

MM = Minimalmedium

### 2.4.3 Produktionsverhalten auf KM 4-Festagar

Um das Produktionsverhalten von Stamm KC 1030 bei Wachstum auf Festmedien zu untersuchen, wurden KM 4-Platten (17,5 ml) mit einer Glycerinkultur beimpft und bei 27°C inkubiert. Alle 24 Stunden wurde je eine Platte mit 10 ml Methanol für 30 Minuten auf dem Überkopfschüttler extrahiert. Danach wurde abzentrifugiert und der Überstand über HPLC analysiert (II.9.2). Des Weiteren wurden die nach etwa 8 Tagen auftretenden Guttationströpfchen mit einer Pipette abgenommen und ebenfalls über HPLC analysiert (II.9.2). Zu diesem Zeitpunkt war die gesamte Platte mit Luftmyzel bedeckt.

In den Extrakten waren die Komponenten 1030-G und 1030-D nach 168 Stunden Kultivierung nachweisbar. Im weiteren Verlauf nahm die Menge an 1030-G langsam ab, während die Konzentration an 1030-D konstant blieb. In den Guttationströpfchen waren die Komponenten 1030-G, 1030-D und Coproporphyrin zu finden.

### 2.4.4 Schüttelkolbenversuche

#### 2.4.4.1 Nährlösungsvariation

KC 1030 wurde in Schüttelkulturen mit den Medien SGG, OM, OM+, NL 14, NL 111, NL 200, NL 200+, NL 300, NL 333, NL 400 und NL 410 kultiviert (II.5.2). Alle 24 Stunden wurde eine Probe entnommen, deren pH-Wert und Biomasseanteil bestimmt wurde (II.7), bevor sie einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat bei pH 7 unterzogen wurde (II.8.1). Die organische Phase wurde, 10fach in Methanol angereichert, mittels HPLC analysiert (II.9.2).

Wie in Tabelle 40 genauer dargestellt, zeigte KC 1030 in NL 11 und NL 333 das stärkste Wachstum. Nach 72 Stunden betrug der Biomasseanteil 50% bzw. 45%. Der pH-Wert fiel bei den meisten Medien zunächst ab und stieg später auf Werte bis auf 9,0 an.

Tab. 40: Biomasse- und pH- Verlauf von der Medienvariation von KC 1030

Medium	pH-Wert					Biomasse [%]				
	Probenahme [Stunden]					Probenahme [Stunden]				
	48	72	96	120	168	48	72	96	120	168
<b>SGG</b>	n.b.	7,2	7,4	7,0	8,3	n.b.	20	6	8	9
<b>SGG*</b>	5,2	5,3	5,8	6,7	8,1	10	12	12	10	40
<b>OM</b>	7,7	6,9	8,6	6,6	6,5	4	14	10	10	18
<b>OM+</b>	n.b.	7,2	7,5	7,5	7,3	n.b.	8	9	11	12
<b>NL 14</b>	n.b.	8,1	8,4	8,7	9,1	n.b.	8	10	6	8
<b>NL 111</b>	n.b.	7,7	8,5	8,7	9,0	n.b.	50	39	29	14
<b>NL 200</b>	6,7	7,0	7,8	8,3	9,0	34	10	10	10	12
<b>NL 200+</b>	n.b.	7,6	7,8	7,8	8,4	n.b.	16	20	20	20
<b>NL 300</b>	7,0	6,3	6,8	7,5	8,2	12	10	8	9	6
<b>NL 333</b>	n.b.	6,8	7,1	7,8	8,4	n.b.	45	28	11	7
<b>NL 400</b>	n.b.	6,9	7,4	7,6	8,4	n.b.	30	15	17	10
<b>NL 410</b>	n.b.	5,7	7,5	7,9	8,6	n.b.	25	28	34	30

Neben den aus dem Screening bekannten Metabolite 1030-B, 1030-D und 1030-G produzierte Stamm KC 1030 in der Medienvariation weitere Metabolite mit Rt 3,8 min (1030-J), Rt 9,6 min und Rt 13,2 min (1030-A). Die UV/Vis-Spektren der neuen Substanzen sind in Abbildung 45 zu sehen. Das Spektrum von Metabolit 1030-A bei Rt 13,2 min zeigte keine Ähnlichkeit zu den in der Datenbank gespeicherten Naturstoffspektren (II.9.2). Das UV/Vis-Spektrum von 1030-J bei Rt 3,8 min gleicht dem von Urdamycin A, da aber die Retentionszeiten nicht überein stimmen, handelt es sich nicht um die identische Substanz. Der Metabolit bei Rt 9,6 min konnte über die Datenbank als Fridamycin E identifiziert werden.

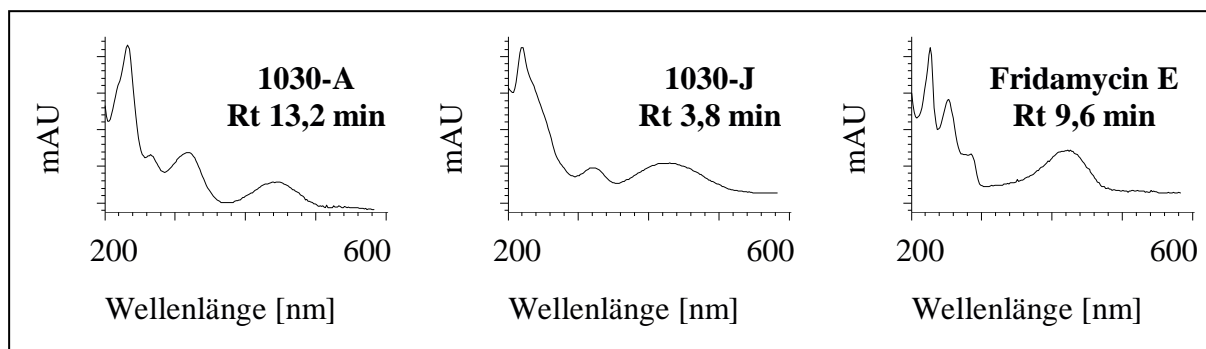


Abb. 45: UV/Vis-Spektren der in der Medienvariation gebildeten Komponenten von KC 1030



In Tabelle 41 ist dargestellt, in welche Metabolite Stamm KC 1030 in den unterschiedlichen Medien produzierte. In Medium SGG wurde 1030-A, 1030-B, 1030-D, 1030-G, 1030-J und Fridamycin E gebildet. In Medium NL 200+ und NL 333 waren die Komponenten 1030-D, 1030-G und 1030-J nachweisbar, in NL 400 und OM+ fanden sich die Komponenten 1030-A, 1030-D, 1030-G und 1030-J. In NL 410 wurden lediglich die Komponenten 1030-A und 1030-B in sehr geringer Menge gebildet. Gar keine Substanzproduktion fand in den Nährlösungen OM, NL 14, NL 111, NL 200 und NL 300 statt. Interessant war, dass die Metabolite 1030-A und 1030-B bzw. 1030-G und 1030-D meist gekoppelt auftraten. In SGG fanden sich zu einem früheren Zeitpunkt der Kultivierung nur die Komponenten 1030-A und 1030-B und erst zu einem späteren Zeitpunkt konnten die Metabolite 1030-D und 1030-G nachgewiesen werden. Die Mengen an 1030-A und zum Teil auch 1030-B nahmen ab, sobald 1030-D und 1030-G auftraten.

Tab. 41: Substanzproduktion in der Nährlösungsvariation

	1030-A	1030-B	1030-D	1030-G	Frida. E	1030-J
<b>SGG</b>	+	++	++	+++	+	-
<b>SGG*</b>	-	+	-	-	-	-
<b>OM</b>	-	-	-	-	-	-
<b>OM+</b>	-	-	+++	+++	-	+++
<b>NL 14</b>	-	-	-	-	-	-
<b>NL 111</b>	-	-	-	-	-	-
<b>NL 200</b>	-	-	-	-	-	-
<b>NL 200+</b>	-	-	++	+++	-	-
<b>NL 300</b>	-	-	-	-	-	-
<b>NL 333</b>	-	-	++	+++	-	++
<b>NL 400</b>	-	-	++	+++	-	++
<b>NL 410</b>	+	+	-	-	-	-

- = keine Produktion    + = geringe Produktion    ++ = mittelstarke Produktion    +++ = starke Produktion

#### 2.4.4.2 Einfluss des Puffers auf die Metabolitproduktion

In Versuch III.2.4.3.1 war aufgefallen, dass in den Nährlösungen, die kein CaCO<sub>3</sub> enthielten, keine Metabolite gebildet wurden. Um zu ergründen ob das CaCO<sub>3</sub> unerlässlich für eine Produktion ist, wurde Stamm KC 1030 in Schüttelkulturen mit SGG, SGG\* und in SGG\* mit

unterschiedlichen Additiven kultiviert. Die Additive und der Zweck ihres Einsatzes sind in Tabelle 42 genauer beschrieben.

Tab. 42: Nährlösungen bei der Puffervariation

Medium	Additiv zu SGG*	Funktion
MP1	CaCO <sub>3</sub> (9 g/l)	Einfluss der Menge an CaCO <sub>3</sub>
MP2	CaCO <sub>3 p.A.</sub> (3 g/l)	Einfluss der Verunreinigungen im CaCO <sub>3</sub>
MP3	Ca (OH) <sub>2</sub> (2,2 g/l)	Alternativer Ca-Puffer
MP4	SE <sub>CaCO3</sub> (3 ml/l)	Einfluss der Verunreinigungen im CaCO <sub>3</sub>
MP5	NaPO <sub>4</sub> (22,8 g/l)	Alternativer Nicht-Ca-Puffer
MP6	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (3 g/l) und KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7 g/l)	Alternativer Nicht-Ca-Puffer

Im Versuchsverlauf wurde alle 24 Stunden eine Probe entnommen, deren pH-Wert und Biomasseanteil bestimmt (II.7) wurde, bevor sie einer Flüssig-Flüssig-Extraktion bei pH 7 mit Ethylacetat unterzogen wurden (II.8.1). Die organische Phase wurde, 10fach in Methanol angereichert, mittels HPLC analysiert (II.8.2).

Der pH-Verlauf in den unterschiedlichen Ansätzen ist in Abbildung 46 dargestellt. Man sieht deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Nährlösungen. In den Medien mit Phosphatpuffer (MP5 und MP6) blieb der pH-Wert nahezu stabil bei 6,6. In Nährlösung MP3, MP4 und SGG\* stieg der pH-Wert von einem Bereich bei 5,4 auf einen Wert zwischen 6 und 7 an. Die pH-Werte von SGG, MP1 und MP2 bewegten sich in einem Bereich zwischen 7 und 8,5 und erreichten am Ende der Kultivierung einen Wert von 8,2.

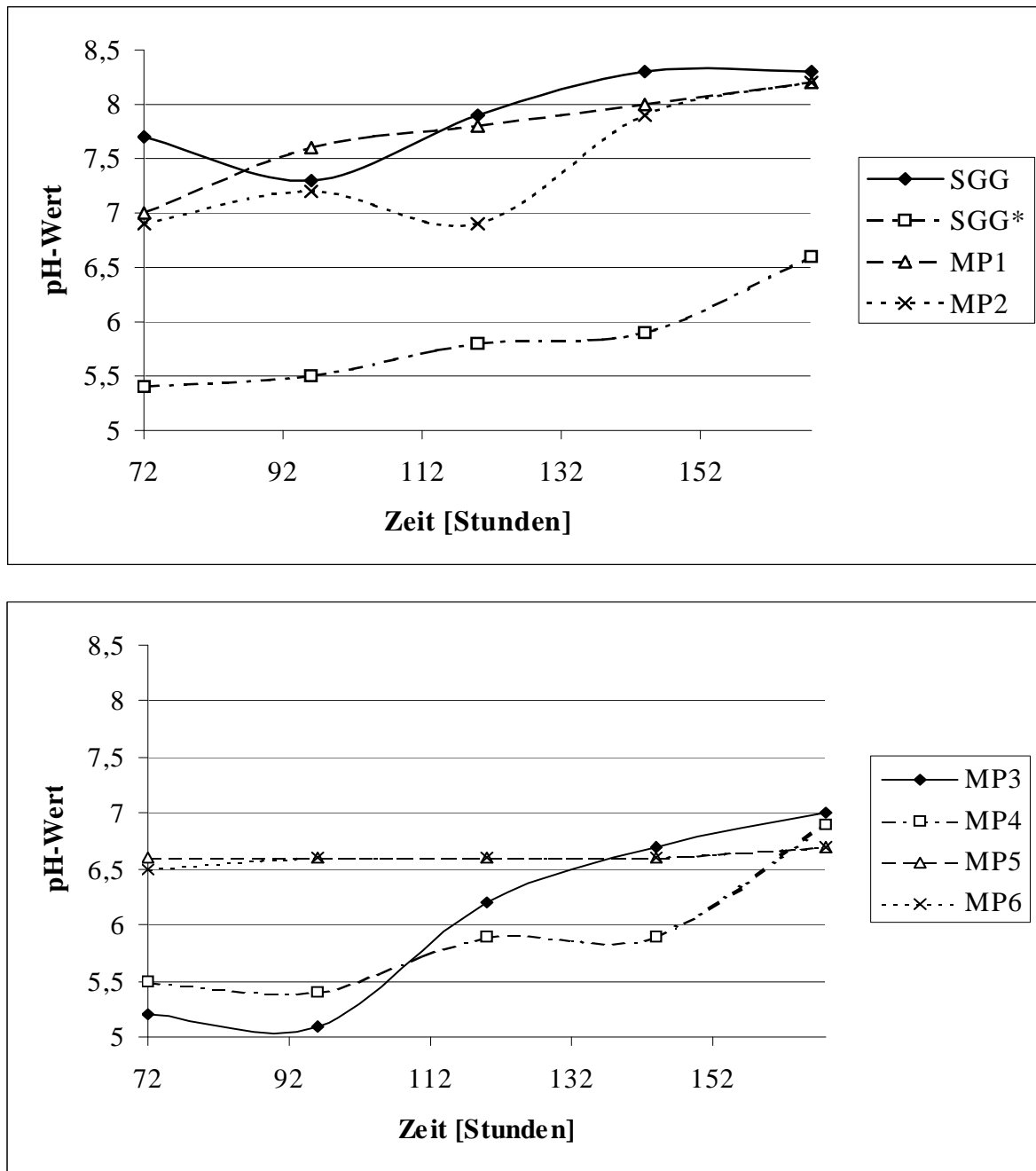


Abb. 46: pH-Verläufe in den Ansätzen der Puffervariation

Das Produktionsverhalten des Stammes war in den unterschiedlichen Ansätzen ebenfalls unterschiedlich. Die Produktion der isolierten Metabolite 1030-A, -B, -G und -J ist in Abbildung 47 dargestellt. In den Nährlösungen SGG und MP2 fiel die Produktion der Sekundärmetaboliten ungefähr gleich aus. Es wurden die Komponenten 1030-A, 1030-B, 1030-D, Fridamycin und 1030-G produziert. In MP1 wurden große Mengen an 1030-G und 1030-D produziert. In MP5 und MP6 konnten große Mengen an 1030-J und geringere

Mengen an 1030-G und 1030-D nachgewiesen werden. In Nährlösung SGG\* fanden sich lediglich geringe Mengen an 1030-B. Die Metabolite 1030-B, 1030-D, 1030-G und 1030-J waren in Nährlösung MP3 in geringen Mengen nachweisbar und in MP4 wurden geringe Mengen an 1030-B und 1030-G produziert.

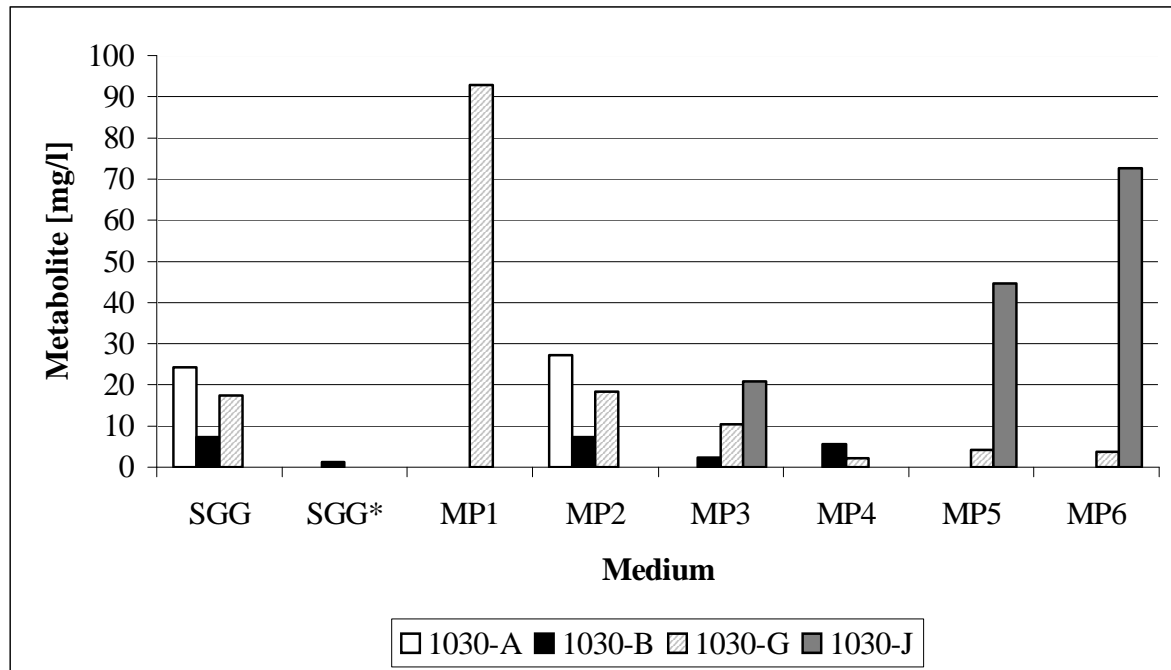


Abb. 47: Produktion der Metabolite 1030-A, -B, -G und -J bei der Puffervariation

#### 2.4.4.3 Optimierung der Nährlösung für die Produktion von 1030-B

Um größere Mengen der neuen Komponente 1030-B in die Hand zu bekommen, wurde ein verbessertes Produktionsmedium entwickelt. Da die Produktion dieser Komponente nur in SGG, NL 410 und NL 500 stattfand und in SGG die Produktion am besten war, wurde SGG als Startmedium gewählt und die Bestandteile Stärke, Glucose, Glycerin, Cornsteep Powder, Pepton, Hefeextrakt NaCl und CaCO<sub>3</sub> in ihrer Menge variiert. Die Kulturen wurden mit 5 ml 48 Stunden in SGG gewachsener Schüttelkultur gestartet (II.5.2). Alle 24 Stunden wurde eine Probe entnommen und pH-Wert und Biomasseanteil bestimmt (II.7). Im Anschluss wurde sie einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat bei pH 7 unterzogen (II.8.1) und 10fach in Methanol angereichert mittels HPLC analysiert (II.8.2).

Wie in Abbildung 48 zu sehen konnten die besten Ergebnisse mit den Nährlösungen MO1, MO2, MO3 und MO4 erzielt werden, die im Vergleich zu SGG mehr Glycerin und zum Teil

weniger NaCl und eine erhöhte CaCO<sub>3</sub> Menge enthielten (II.2.2). Die Produktion von 1030-B konnte von etwa 7 mg/l in SGG auf 10 mg/l verbessert werden. Neben diesem Ergebnis war auffällig, dass in einem Medium bei guter, reproduzierbarer Produktion von 1030-B die Metabolite 1030-D, -G und -J nicht oder nur in geringer Menge gebildet wurden.

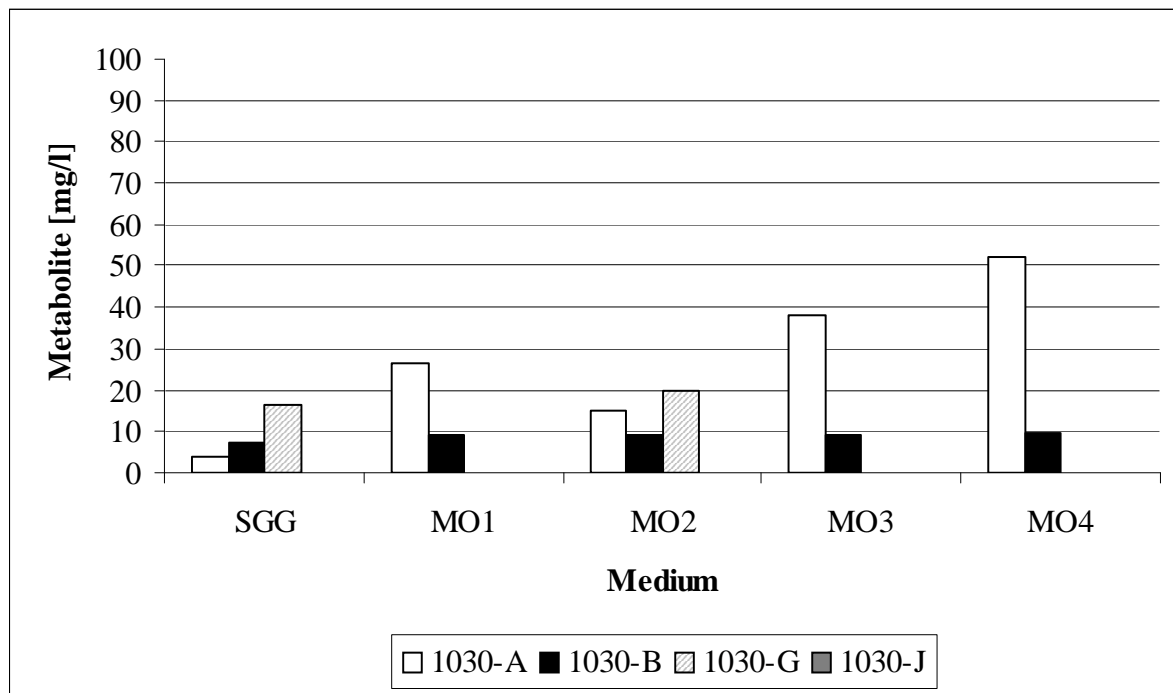


Abb. 48: Substanzproduktion in den besten Medien aus der Medienoptimierung für die Produktion von KC1030-B

#### 2.4.4.4 Optimierung der Vorkultur für die Produktion von 1030-B

Um herauszufinden, ob die Vorkultur Einfluss auf das Produktionsmenge von KC 1030-B hat, wurden Schüttelkulturen mit Nährlösung MO2 mit Vorkulturen in unterschiedlichen Nährlösungen beimpft (II.5.2). Als Vorkultur verwendet wurden Schüttelkulturen mit den Nährlösungen NL 19, NL 200, NL 14, NL 300, NL 111 und OM. Diese wurden mit Glycerinkulturen gestartet. Es wurden dann jeweils zwei Hauptkulturen mit je 5 ml der 48 Stunden alten Vorkultur beimpft. Bei dem ersten Ansatz wurde das Inokulum direkt in die Nährlösung gegeben und bei dem zweiten Ansatz wurde das Myzel zuvor mit einem Ultraschallhomogenisator (Art-Micra D 8, Micra, Mühlheim) homogenisiert (23500/min für 20 sec). Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 27°C auf dem Schüttler. Alle 24 Stunden wurde eine Probe entnommen, morphologisch untersucht, deren pH-Wert und Biomasseanteil bestimmt (II.7) und einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat bei pH 7,0 unterzogen

(II.8.1). Die organische Phase wurde, 10fach in Methanol angereichert, mittels HPLC analysiert (II.8.2).

Die Morphologie des Stammes KC 1030 ist in den Vorkulturen (Tab. 43) nicht überall gleich. Myzel liegt in allen Zuständen zwischen homogen und 2 mm grossen Pellets vor. In NL 14, NL 200, NL 300 und OM waren nach 48 Stunden vor allem Pellets zu beobachten, wobei die Pellets in NL 14 eher klein und fest wie Gries waren. In 200, NL 300 und OM waren die Pellets größer und lockerer. In den anderen beiden Vorkulturen lag das Myzel mehr oder minder homogen mit einzelnen Pellets unterschiedlicher Größe vor

Tab. 43: Myzelmorphologie in den Vorkulturen nach 48 Stunden

<b>Medium</b>	<b>Morphologie des Mycels</b>
<b>NL 14</b>	Lockere Myzelverbände; viele, kugelförmige Pellets bis 1 mm Ø
<b>NL 19</b>	Lockere Myzelverbände; wenige, kugelförmige Pellets < 0,5 mm Ø
<b>NL 111</b>	Lockere Myzelverbände; wenige ovale Pellets < 0,5 mm Ø
<b>NL 200</b>	Lockere Myzelverbände; viele ovale Pellets bis 2 mm Ø
<b>NL 300</b>	Lockere Myzelverbände; viele unförmig Pellets bis 2 mm Ø
<b>OM</b>	Lockere Myzelverbände; viele runde oder ovale Pellets bis 2 mm Ø

Ø = Durchmesser

Wie in Tabelle 44 zu sehen, unterschieden sich die Vorkulturen ansonsten stark im pH-Wert, in der gebildeten Biomasse und in der Viskosität der Kulturbrühe. Die höchste Viskosität wurde in der Nährlösung NL 111 erreicht, in der sich auch die meiste Biomasse fand. Den geringsten Biomasseanteil erreichte der Stamm KC 1030 in Nährlösung NL 14. Die pH-Werte lagen in einem Bereich zwischen pH 6,3 und 7,5.

Tab. 44: Beschreibung von pH-Wert, Viskosität und Biomasse in den Vorkulturen nach 48 Stunden

Medium	pH-Wert	Biomasseanteil	Viskosität
NL 14	7,2	6	flüssig
NL 19	6,5	12	flüssig
NL 111	7,5	40	hochviskos
NL 200	6,3	25	viskos
NL 300	6,9	12	flüssig
OM	6,5	9	flüssig

Die Morphologie des Stammes KC 1030 war in den Hauptkulturen nicht so unterschiedlich wie in den Vorkulturen (Tab. 45). Lediglich mit homogenisierter Vorkultur aus NL 14, NL 111 und NL 200 beimpfte Kulturen wuchsen homogen, ansonsten variierte nur die Größe der Pellets leicht. Im Laufe der Kultivierung wurde die Kulturbrühe bei allen Ansätzen viskoser und homogener.

Tab. 45: Myzelmorphologie in den Hauptkulturen nach 72 Stunden

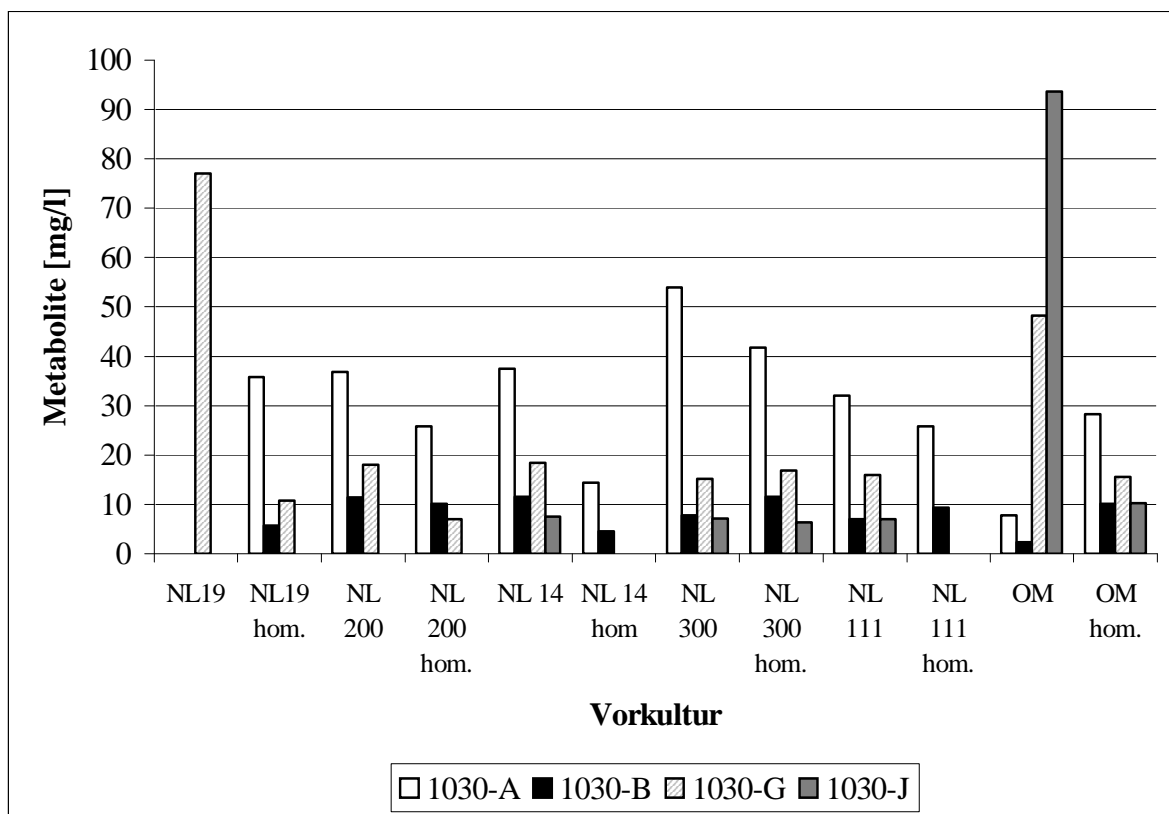
Vorkultur	Morphologie des Myzels
NL 14	Lockere Myzelverbände; viele ovale Pellets < 1mm Ø
NL 14 hom.	Lockere Myzelverbände
NL 19	Lockere Myzelverbände und viele, sonnenartige Pellets bis 1mm Ø
NL 19 hom.	Lockere Myzelverbände und viele, kugelförmige Pellets < 0,5 mm Ø
NL 111	Lockere Myzelverbände und viele, kugelförmige Pellets < 0,5 mm Ø
NL 111 hom.	Lockere Myzelverbände
NL 200	Lockere Myzelverbände und viele, kugelförmige Pellets < 0,5 mm Ø
NL 200 hom.	Lockere Myzelverbände
NL 300	Lockere Myzelverbände und viele, sonnenartige Pellets bis 1mm Ø
NL 300 hom.	Lockere Myzelverbände und viele, kugelförmige Pellets < 1mm Ø
OM	Lockere Myzelverbände und viele, kugelförmige Pellets bis 1mm Ø
OM hom.	Lockere Myzelverbände und viele, kugelförmige Pellets < 1mm Ø

hom. = homogenisiert

Ø = Durchmesser

Die Produktion der Metabolite variierte stark von Ansatz zu Ansatz (Abb. 49). In den Kulturen, die mit Vorkulturen in NL19 und OM beimpft wurden, war nur eine geringe bzw.

keine Produktion von 1030-B zu beobachten. Durch das Homogenisieren der Vorkulturen stieg die Produktion jedoch an. Diesen Effekt konnte man auch bei den Vorkulturen in NL 111 und NL 300 beobachten. Der gegenteilige Effekt trat bei den Vorkulturen in NL 14 und NL 200 auf. Hier wurden ohne Homogenisieren der Vorkultur etwa 12 mg/l gebildet und durch das Homogenisieren ging die Produktion zurück. Die beste Produktion von 1030-B wurde mit Vorkulturen in NL 14, NL 200 und mit homogenisierter Vorkultur in NL 300 erreicht. Die Produktion von 1030-B erreichte hier 11,6 mg/l.



hom. = homogenisiert

Abb. 49: Einfluss der Vorkultur auf die Substanzproduktion von KC 1030 in M7



## 2.4.5 Kultivierung im Bioreaktor

### 2.4.5.1 Kultivierung im Bioreaktor ohne pH-Wert-Regelung

Die Kultivierung von Stamm KC 1030 fand unter den in Tabelle 46 beschriebenen Bedingungen statt. Im Verlauf der Fermentationen 1 und 2 wurde etwa alle 24 Stunden eine Probe entnommen und deren Biomasseanteil und pH-Wert wie unter II.7 beschrieben bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine Extraktion bei pH 5 mit Ethylacetat durchgeführt (II.8.1). Die organische Phase wurde 10fach konzentriert über HPLC analysiert (II.8.2).

Tab. 46: Parameter bei der Fermentation 1 bis 3 von KC 1030

	<b>Fermentation</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Medium:</b>	SGG	SGG	SGG
<b>Temperatur:</b>	27 °C	27 °C	27 °C
<b>Reaktortyp:</b>	Govanola b 20	Biostat E	Govanola b 20
<b>Rührsystem:</b>	Propellerschleife	Blattrührer	Propellerschleife
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	1000 Upm	300 Upm	1000 Upm
<b>pH-Regelung:</b>	ungeregelt	ungeregelt	ungeregelt
<b>Belüftung:</b>	0,4 vvm	0,4 vvm	0,5 vvm
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Freier Verlauf	Freier Verlauf	Nicht bestimmt

Im Verlauf von Fermentation 2 sank der Gelöstsauerstoffanteil in den ersten 22 Stunden auf 8,4% und die Kultivierung erfolgte über die gesamte Dauer unter sauerstofflimitierten Bedingungen (Abb. 50). In Fermentation 1 dagegen war die geringste Sauerstoffsättigung nach 22 Stunden mit 43% erreicht, im Anschluss stieg der Wert langsam wieder an. Der maximale Biomasseanteil wurde in Fermentation 2 mit 50% nach 39 Stunden erreicht, während der maximale Biomasseanteil in Fermentation 1 zwischen 22 und 39 Stunden erreicht wurde, da an beiden Zeitpunkten wurde ein Biomasseanteil von 24% gemessen wurde.

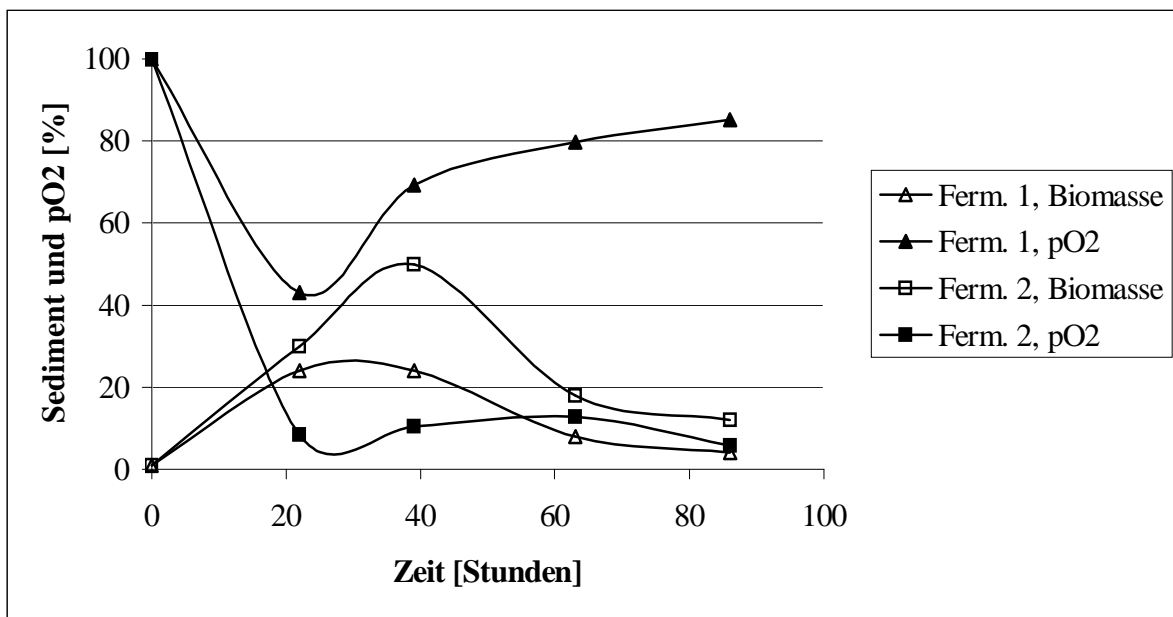


Abb. 50: Biomasse- und pO<sub>2</sub>-Verlauf von KC 1030 in Fermentation 1 und 2

Die pH-Werte der Kulturbrühen entwickelten sich in Fermentation 1 und 2 unterschiedlich (Abb.51). In Fermentation 1 fiel der Wert innerhalb von 39 Stunden auf pH 5,5 und stieg im weiteren Verlauf nicht wieder an. In Fermentation 2 hingegen fiel der Wert zunächst innerhalb von 39 Stunden auf pH 6,2 und stieg im Anschluss wieder an. Nach 86 Stunden war ein pH-Wert von 7,5 erreicht.

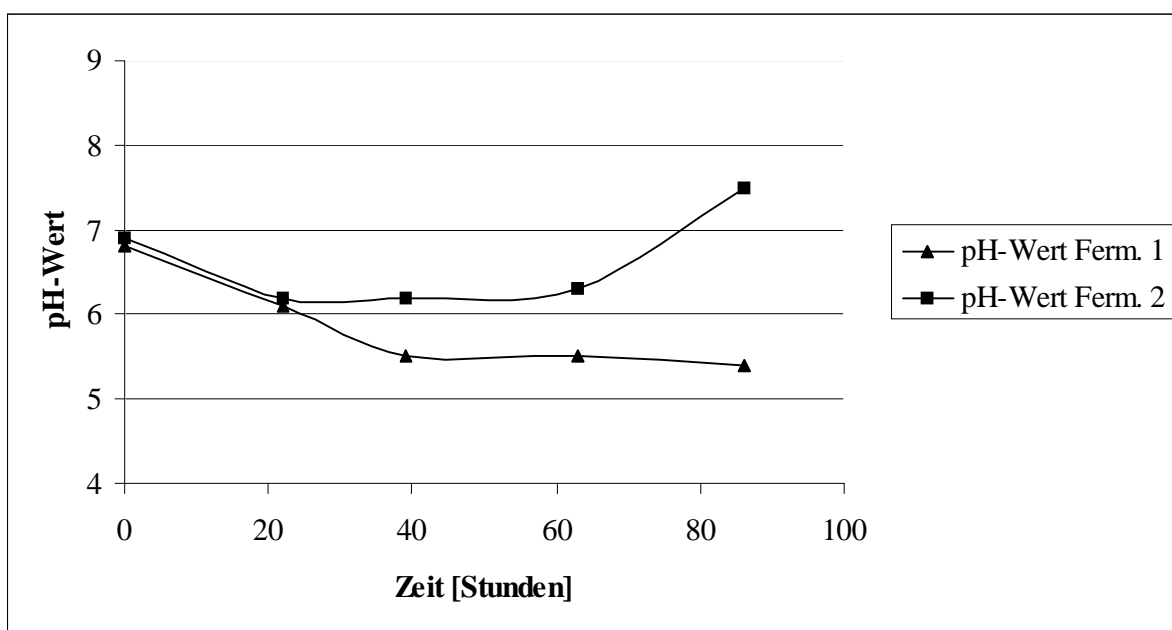


Abb. 51: pH-Verläufe von KC 1030 in Fermentation 1 und 2

Die Verläufe der Produktion der Metabolite 1030-A und -B sind in Abbildung 52 dargestellt. Die maximale Produktion der Komponenten 1030-A und 1030-B fand in Fermentation 1 statt. Die maximale Konzentration von 1030-A lag nach 22 Stunden bei 75,9 mg/l und von 1030-B nach 63 Stunden bei 4,9 mg/l. In Fermentation 2 waren die maximal produzierten Substanzmengen 8,6 mg/l für 1030-A (63 Stunden) und 3,8 mg/l für 1030-B (86 Stunden). Die Produktion von 1030-D, -G und -J wurde nicht erfasst, da diese Substanzen sich bei pH 5 nicht extrahieren lassen.

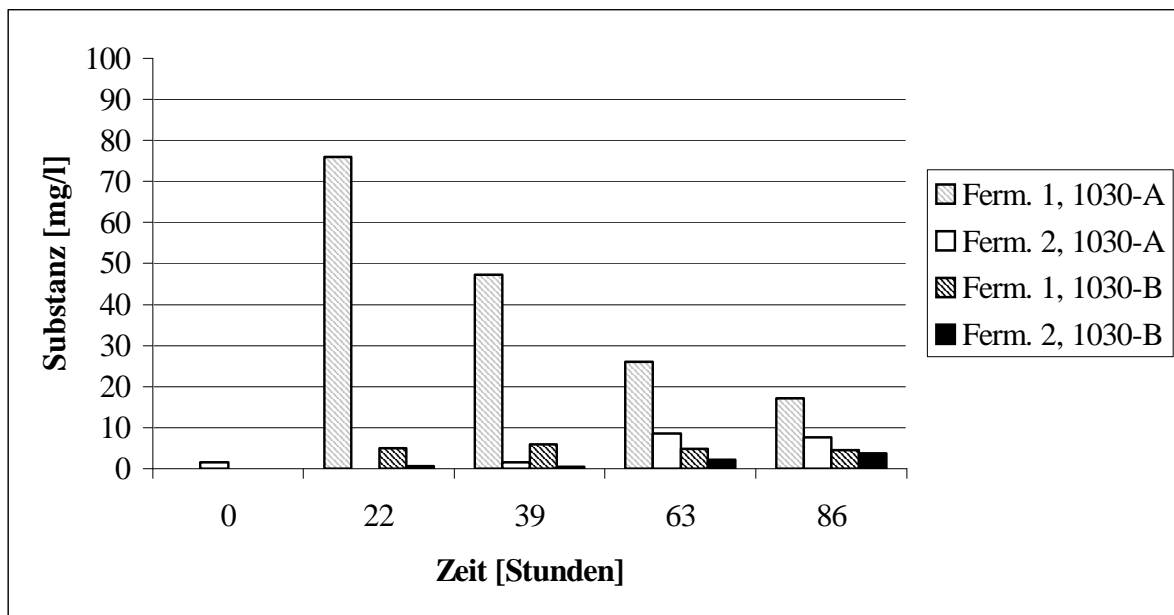


Abb. 52: Produktionsverlauf bei den Fermentationen 1 und 2 von KC 1030

#### 2.4.5.2 Kultivierung im Bioreaktor mit pH-Wert Regelung

Stamm KC 1030 wurde bei geregelterm pH-Wert unter den in Tabelle 47 beschriebenen Bedingungen im Bioreaktor kultiviert. Etwa alle 24 Stunden wurde eine Probe von 5 ml entnommen, nach Bestimmung von pH-Wert und Biomasseanteil (II.7) wie unter II.8 beschrieben aufgearbeitet und mittels HPLC analysiert.

Tab. 47: Parameter der Fermentationen 4 bis 7 von KC 1030

	Fermentation			
	4	5	6	7
<b>Medium:</b>	SGG			
<b>Temperatur:</b>	27 °C			
<b>Reaktortyp:</b>	Mini			
<b>Rührsystem:</b>	Magnetrührstäbchen			
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	400 Upm			
<b>pH-Regelung:</b>	pH 5,5	pH 7,0	pH 8,5	frei
<b>Belüftung:</b>	0,5 vvm			
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Freier Verlauf			

Wie in Abbildung 53 zu sehen sank der Gelöstsauerstoffanteil während der 141 Stunden dauernden Kultivierung der Fermentation 5 und 7 in den ersten 28 Stunden auf einen Wert nahe 0. Bei den Fermentation 4 und 6 fiel der  $pO_2$  langsamer ab. Erst nach 70 Stunden trat eine Sauerstofflimitierung ein.

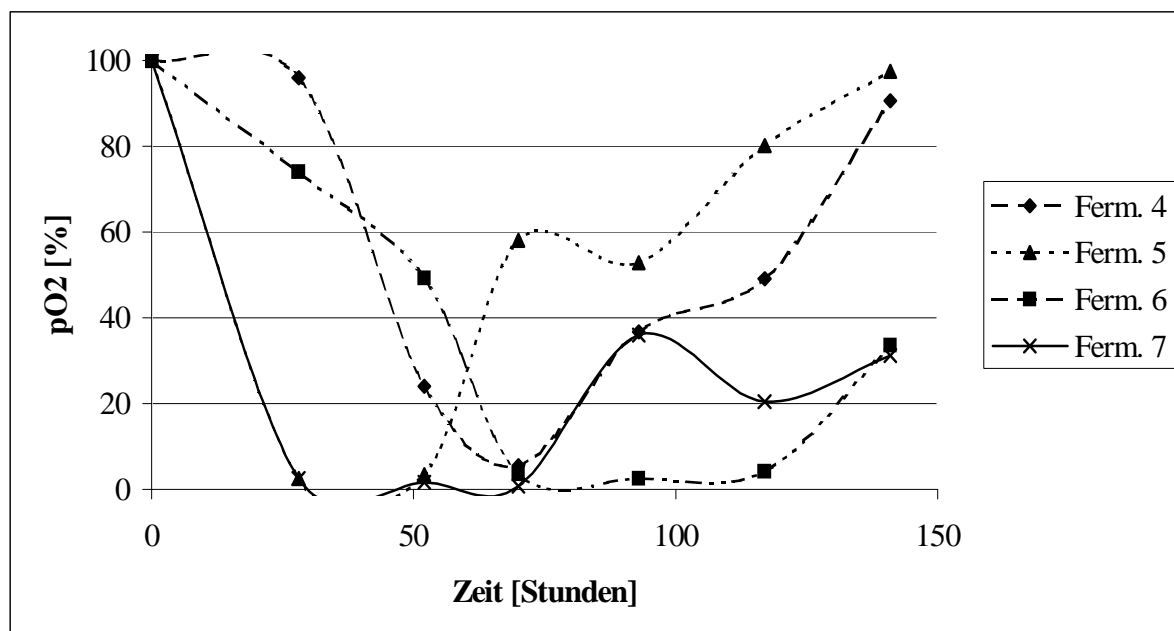


Abb. 53: Entwicklung des Sauerstoffpartialdrucks bei den Fermentationen 4 bis 7

Die maximale Biomasse wurde bei den Fermentation 5 und 7 mit 30% nach 70 Stunden erreicht (Abb. 54). In den Fermentation 4 und 6 war das Maximum nach 117 Stunden

Kultivierung mit 16% und 18% Biomasseanteil erreicht. Bei beiden Fermentationen existierte ein zweites, kleineres Maximum bei 70 Stunden.

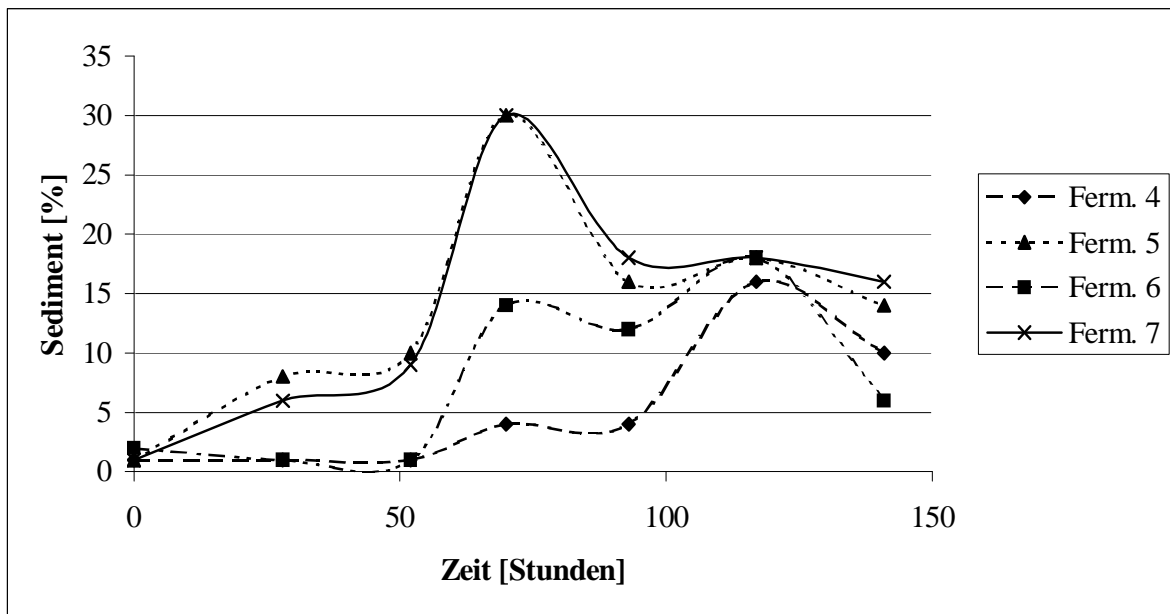


Abb. 54: Biomasse in den Fermentationen 4 bis 7

Die mit Abstand beste Produktion von 1030-A fand in Fermentation 6 mit 100 mg/l nach 117 Stunden Kultivierung statt (Abb. 55). 1030-B wurde am stärksten in Fermentation 7 mit gut 4 mg/l produziert (Abb. 56). Die höchste Menge an 1030-G fand in Fermentation 5 nach 117 Stunden mit knapp 32 mg/l (Abb. 57). 1030-J wurde nicht produziert

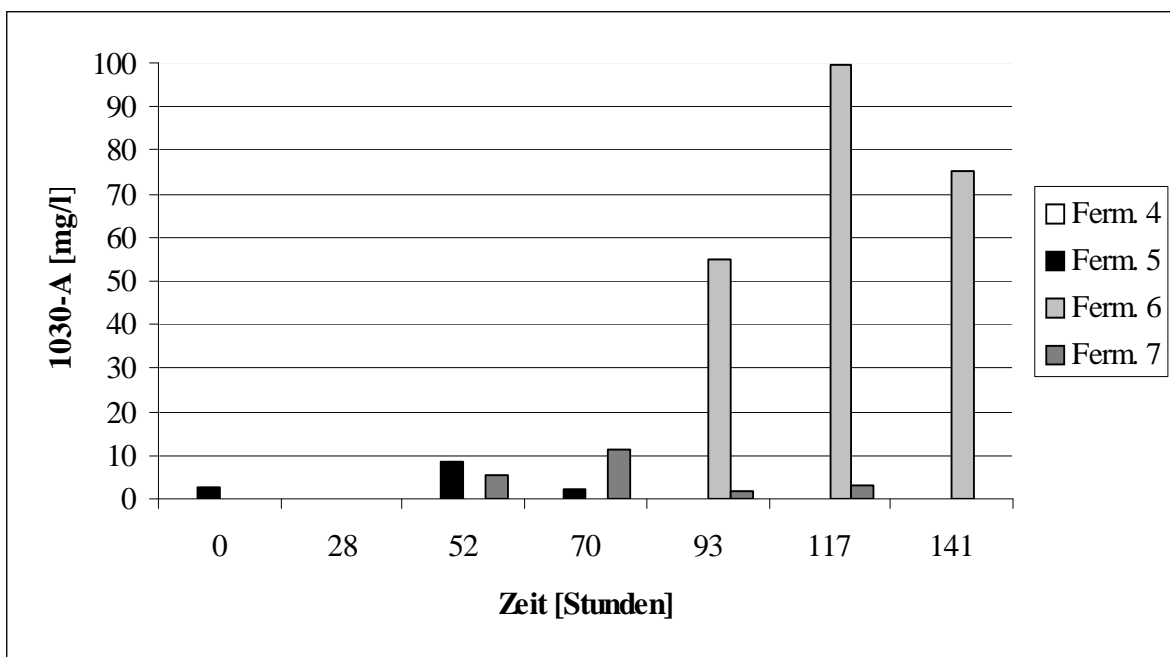


Abb. 55: Produktion von 1030-A in den Fermentationen 4 bis 7

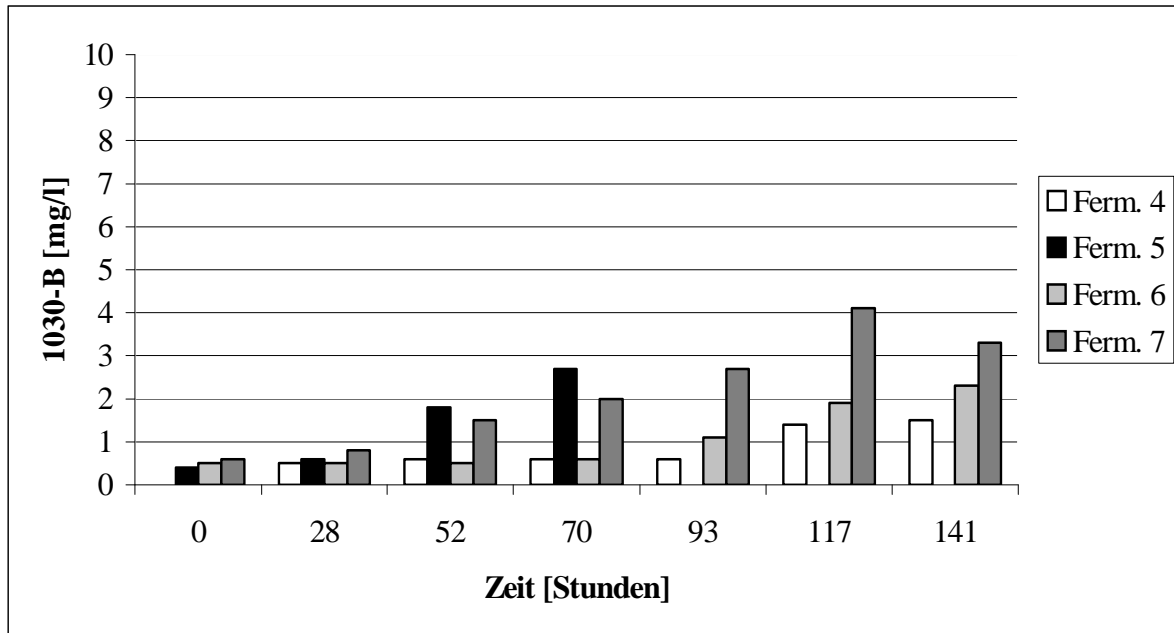


Abb. 56: Produktion von 1030-B in den Fermentationen 4 bis 7

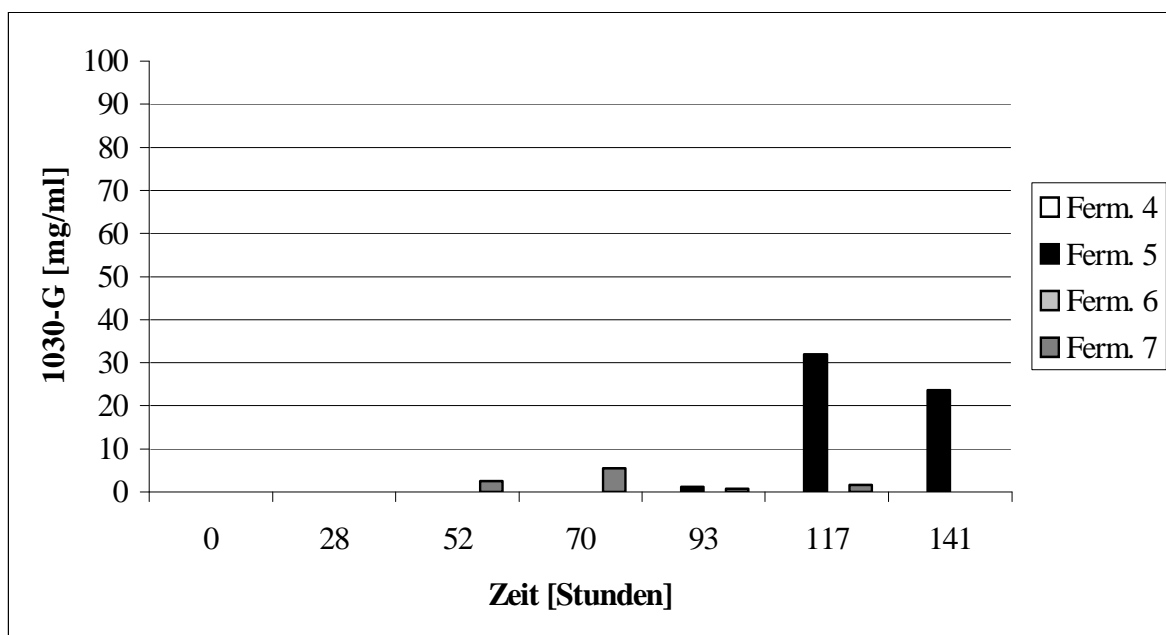


Abb. 57: Produktion von 1030-G in den Fermentationen 4 bis 7

### 2.4.5.3 Kultivierung im Bioreaktor mit unterschiedlichen Puffern

Die Kultivierung von Stamm KC 1030 wurde zu den in Tabelle 48 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Etwa alle 24 Stunden wurde eine Probe entnommen, wie unter II.8 beschrieben aufgearbeitet und der Analyse über HPLC zugeführt.

Tab. 48: Parameter bei den Fermentationen 8 bis 10 von KC 1030

	Fermentation		
	8	9	10
<b>Medium:</b>	SGG	SGG* mit KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (6 g/l) und KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (14 g/l)	
<b>Temperatur:</b>	27 °C	27 °C	27 °C
<b>Reaktortyp:</b>	Bio S 4 l	Bio S 4 l	Bio E
<b>Rührsystem:</b>	Blattrührer	Blattrührer	Blattrührer
<b>Rührgeschwindigkeit:</b>	250 Upm	250 Upm	250 Upm
<b>pH-Regelung:</b>	ungeregelt	ungeregelt	ungeregelt
<b>Belüftung:</b>	0,5 vvm	0,5 vvm	0,5 vvm
<b>Sauerstoffpartialdruck:</b>	Freier Verlauf		

Wie in Abbildung 58 zu sehen, fiel der pO<sub>2</sub> in allen drei Fermentationen in den ersten 22 Stunden ab. Danach war der weitere Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks unterschiedlich. Bei Fermentation 10 stieg der Wert nach 26 Stunden langsam wieder an. In Fermentation 9 stieg der Wert nach 54 Stunden schlagartig auf 100% und hielt sich im weiteren Verlauf dort, was vermutlich auf einen Messfehler zurückzuführen ist. Nach 54 Stunden Kultivierung stieg der pO<sub>2</sub> Wert in Fermentation 8 zunächst wieder an, erreichte bei 97 Stunden noch einen zweiten Tiefpunkt und stieg dann wieder an.

Wie in Abbildung 59 dargestellt startete der pH-Wert von Fermentation 8 bei 6,8, fiel in 48 Stunden auf pH 6,3 und stieg im weiteren Verlauf auf 8,0 an. In Fermentation 9 blieb der pH-Wert bei Werten um 7. Zunächst fiel der Wert innerhalb der ersten 48 Stunden geringfügig von 6,9 auf 6,7 und stieg dann auf 7,1. Bei Fermentation 10 lag der pH-Wert am Anfang und am Ende der Fermentation bei 6,8. Im Verlauf sank der Wert vorübergehend auf 6,5. Der maximale Biomasseanteil (Abb. 60) wurde in Fermentation 8 nach 142 Stunden mit 80% erreicht. In Fermentation 9 wurden zur gleichen Zeit 40% Biomasseanteil gemessen und in Fermentation 10 war das Maximum nach 41 Stunden mit 60% erreicht

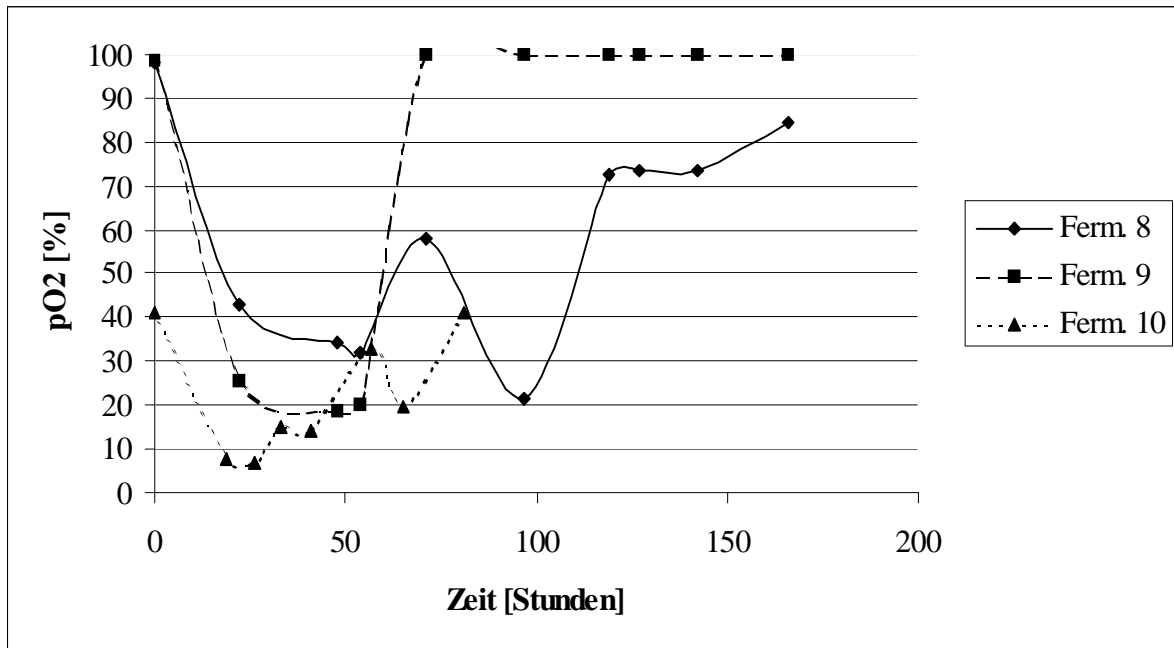


Abb. 58: Entwicklung des Sauerstoffpartialdrucks bei den Fermentationen 8 bis 10

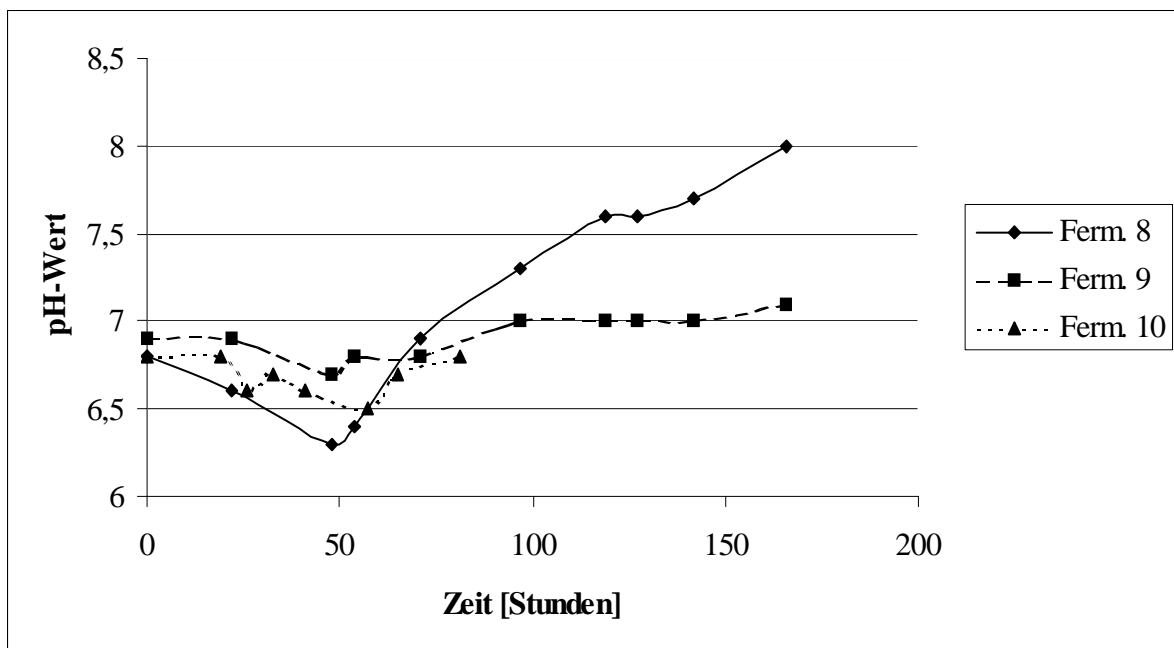


Abb. 59: Entwicklung des pH-Werts bei den Fermentationen 8 bis 10



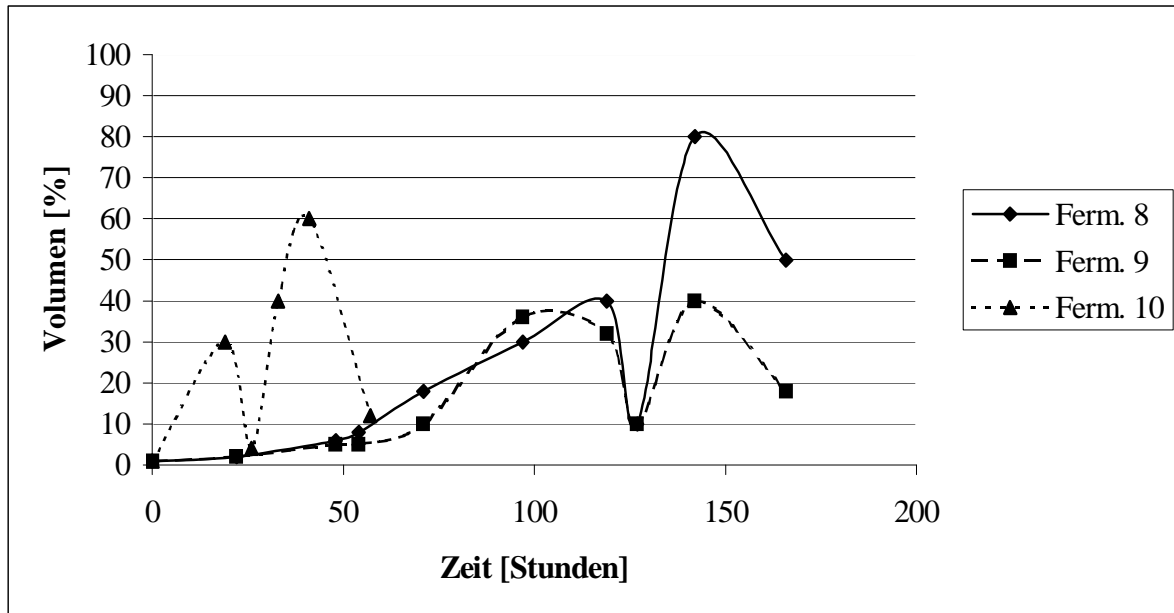


Abb. 60: Entwicklung der Biomasse bei den Fermentationen 8 bis 10

Bei der Fermentation 8 wurden die Produkte 1030-A, 1030-B und 1030-G in einer maximalen Konzentration von 16,1, 4,1 und 16,7 mg/l gebildet (Abb. 61). Wie in Abbildung 62 zu sehen fanden sich in Fermentation 9 vor allem 1030-G (64,5 mg/l) und 1030-G (16,7 mg/l) und etwas 1030-B (1,1 mg/l). In Fermentation 10 fanden sich Komponente: 1030-A mit 19,7 mg/ml, 1030-B mit 0,8 mg/ml, 1030-G mit 3,7 mg/ml und 1030-A mit 27,4 mg/ml (Abb. 63).

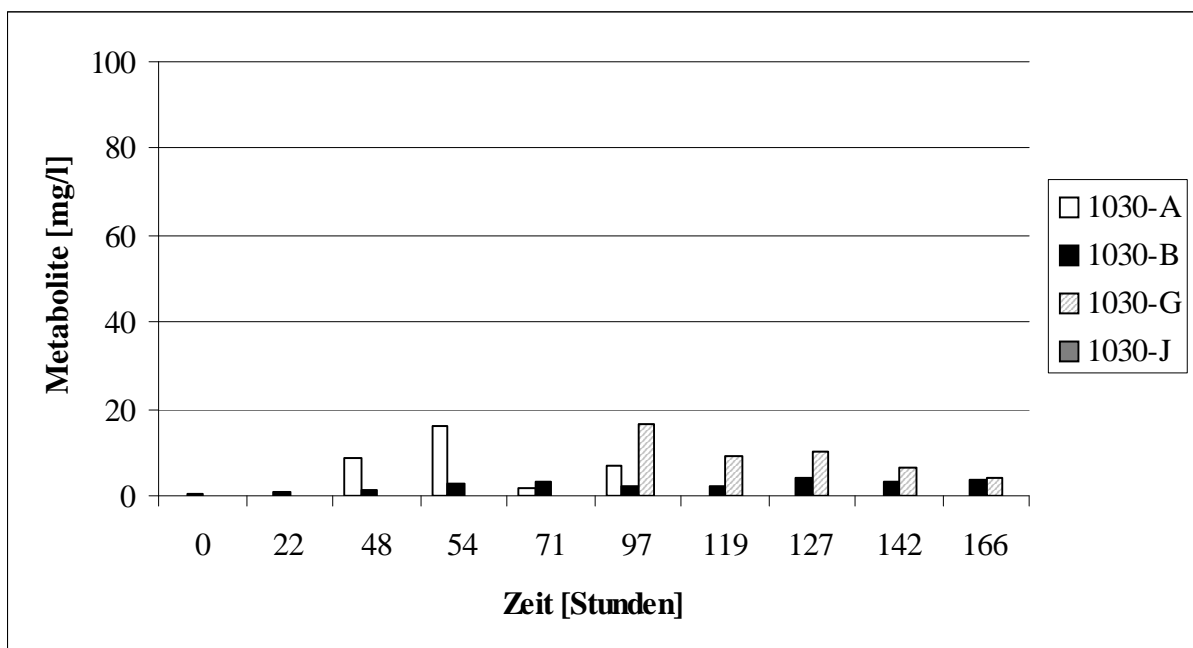


Abb. 61: Substanzproduktion bei Fermentation 8

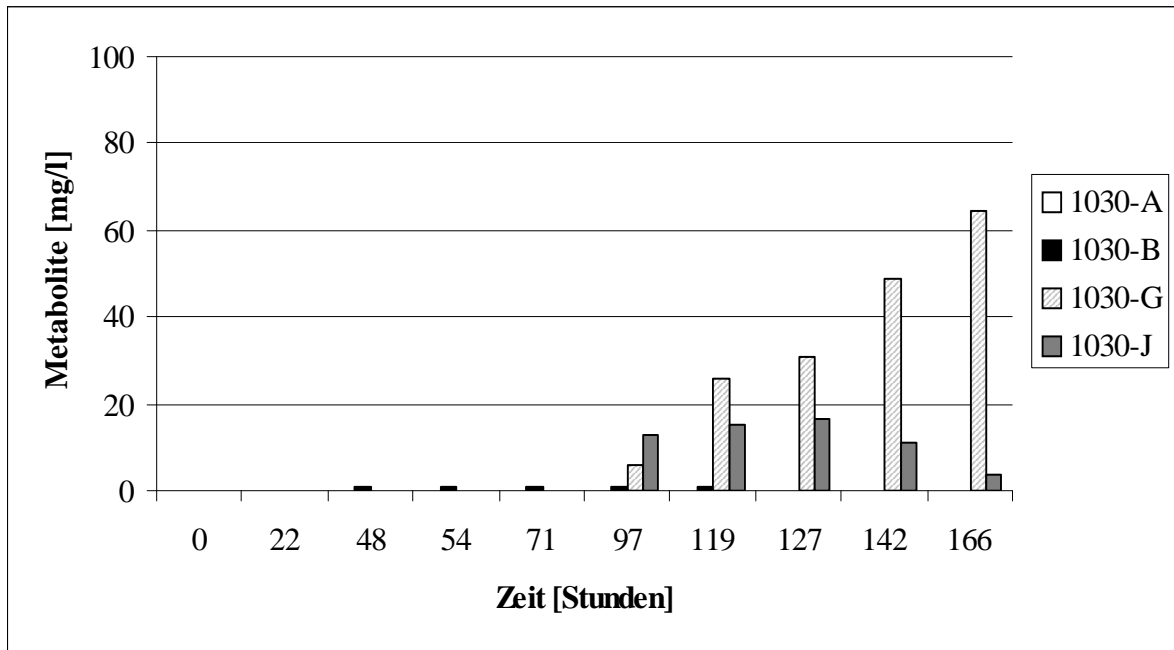


Abb. 62: Substanzproduktion bei Fermentation 9

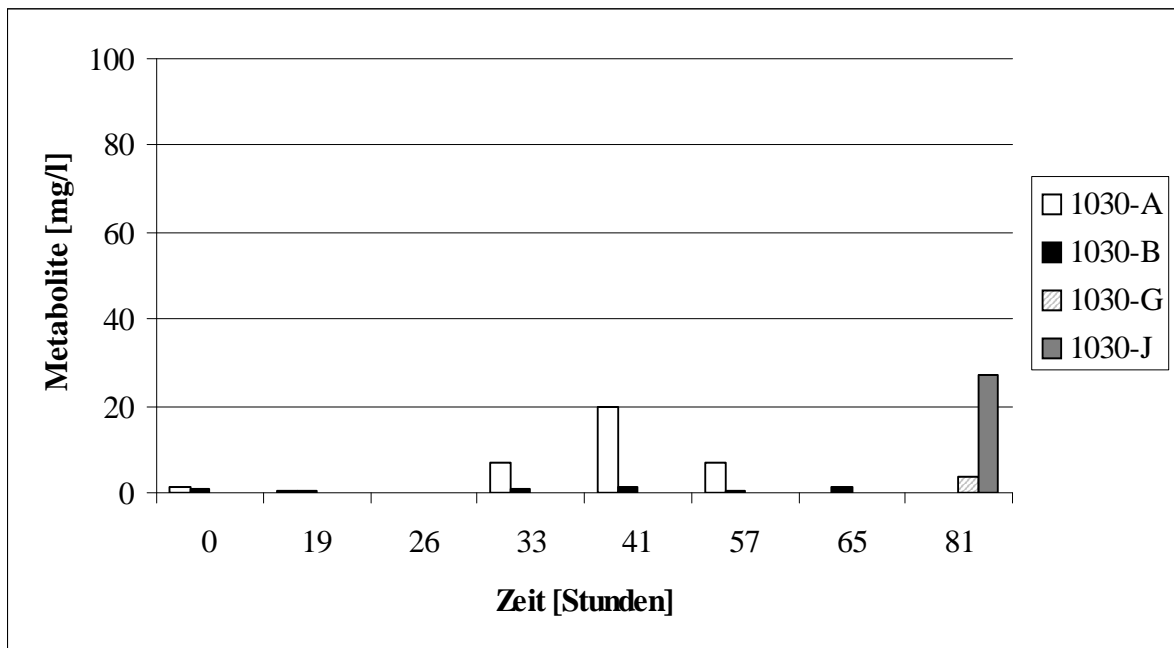


Abb. 63: Substanzproduktion bei Fermentation 10

## 2.4.6 Isolierung und Reinigung der Komponenten

### 2.4.6.1 Isolierung und Reinigung der Komponenten 1030-A und 1030-B

Die 17 l Kulturbrühe von Fermentation 3 wurde, wie unter Abschnitt II.10.1 beschrieben, über Druckfiltration in Kulturüberstand und Myzel getrennt. Das Kulturfiltrat wurde verworfen, die Biomasse drei Mal mit 3 l Methanol extrahiert. Dieser Extrakt wurde auf 1 l wässrige Lösung eingengt und der pH-Wert wurde auf 9,0 eingestellt. Im Anschluss folgte eine fünfmalige Extraktion mit 500 ml Ethylacetat (II.10.2.2). Die organischen Phasen wurden nach dem Vereinigen getrocknet und man erhielt einen öligen Extrakt mit saurem Geruch, der ein Trockengewicht von 2,845 g aufwies. Dieser Extrakt wurde über Adsorptionschromatographie an Diol in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt. Eine weitere Auftrennung dieser Rohfraktionen erfolgte über Gelchromatographie und PHPLC (II.10.3). Die genaue Vorgehensweise ist in Abbildung 64 dargestellt.

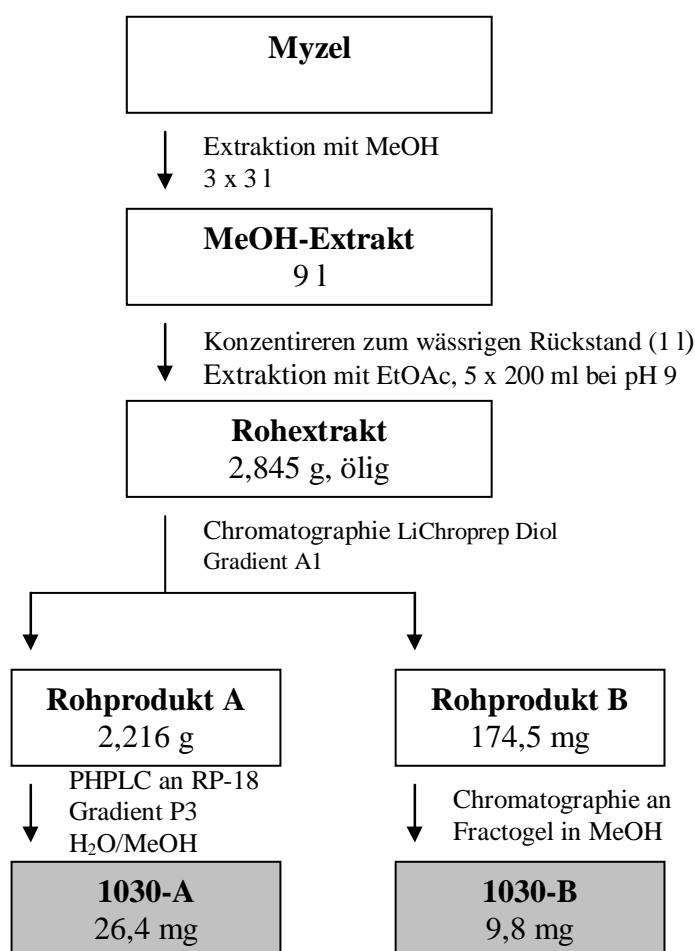


Abb. 64: Isolierungsschema der Metabolite 1030-A und 1030-B aus KC 1030

Komponente 1030-A konnte im Rohextrakt in einer Menge von 85,4 mg nachgewiesen werden. In Rohprodukt A waren noch 32,0 mg enthalten und nach der PHPLC erhielt man 26,4 mg Reinsubstanz, was etwa einem Drittel der Menge im Rohextrakt entspricht.

Komponente 1030-B war das erste Mal im wässrigen Rückstand des Mycelextraktes gut nachweisbar, in dem insgesamt 20,3 mg enthalten waren. Im Rohextrakt lagen 16,6 mg und in Rohprodukt B 11,8 mg vor. Nach der Gelchromatographie blieben 9,8 mg Reinsubstanz, etwa die Hälfte der im wässrigen Rückstand enthaltenen Menge.

#### **2.4.6.2 Isolierung und Reinigung der Komponenten 1030-G und 1030-J**

Die 9 l Kulturbrühe von Fermentation 10 wurde über Druckfiltration in Kulturüberstand und Myzel getrennt. Die Biomasse wurde verworfen und das Kulturfiltrat (7 l) weiter über XAD 16 aufgereinigt. Gewaschen wurde mit 60% Methanol in Wasser. Die Elution erfolgte zunächst über 100% Methanol (Eluat I) und im Anschluss über Methanol mit 1 N HCl (9:1) (Eluat II). Elutat I hatte nach dem Trocknen ein Gewicht von 1,2295 g. Eluat II wurde auf einen pH-Wert von 11 titriert und neun Mal mit 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen ergaben nach dem Trocknen ein Gewicht von 324,5 mg. Die weitere Aufreinigung erfolgte über die Kombination von Adsorptionschromatographie an LiChroprep Diol, RHPLC an RP-18 und Adsorptionschromatographie an Sephadex und Fractogel. Das genaue Vorgehen ist in Abbildung 65 dargestellt.

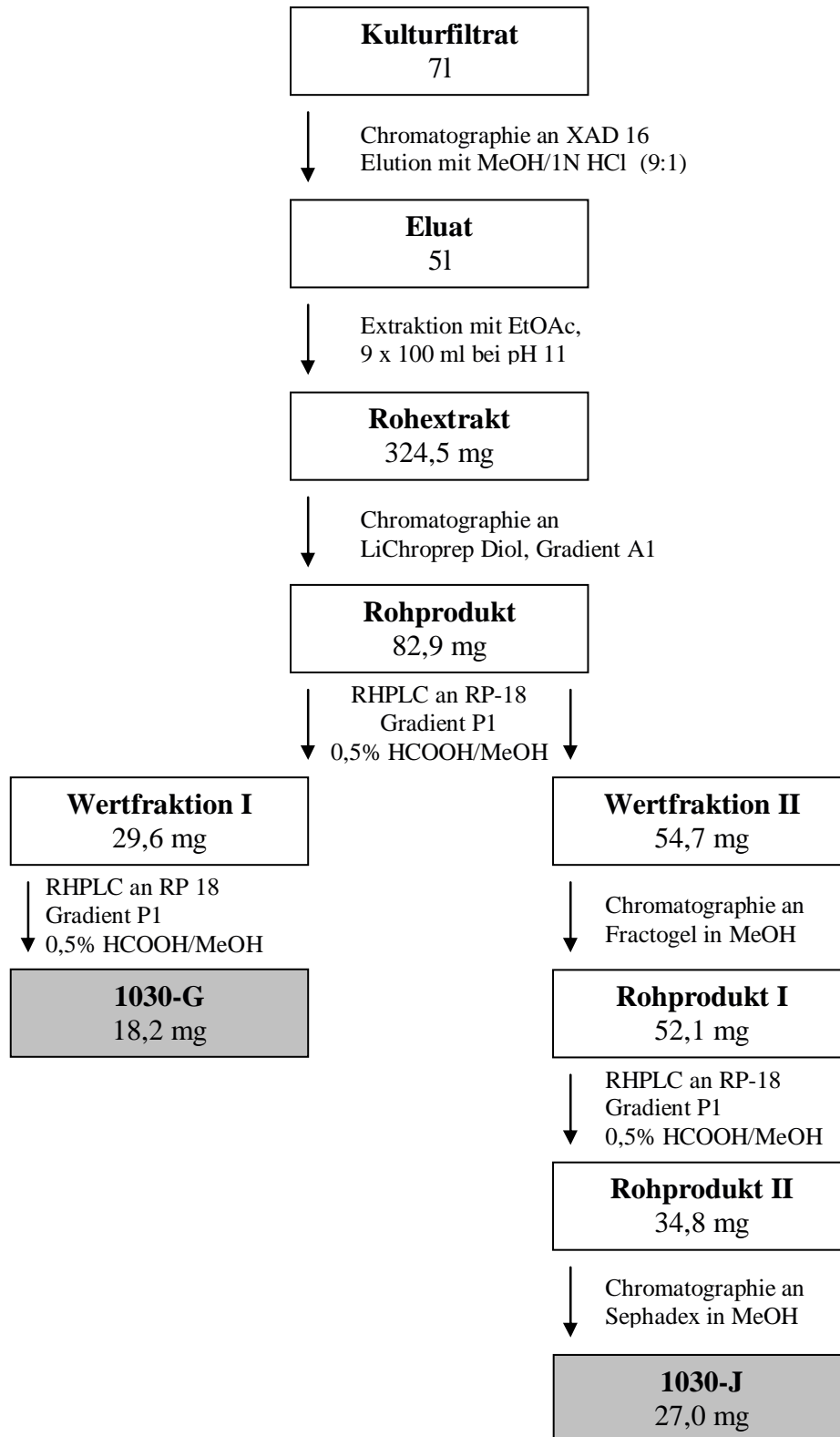


Abb. 65: Aufreinigung der Komponenten 1030-G und 1030-J

### 2.4.7 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung der Komponente 1030-A wurde von Herrn Dipl. Chem. Andreas Hamm und die von 1030-B von Herrn Dipl. Chem. Gerhard Lang, beide aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Bringmann, am Institut für Organische Chemie in Würzburg durchgeführt. Bei 1030-A handelt es sich um das erstmalig 1970 isolierte Dehydrorabelomycin (LIU et al., 1970). 1030-B ist ein bislang unbekanntes Angucyclinon mit neuartiger Struktur. Die Strukturen sind in Abbildung 66 zu sehen.

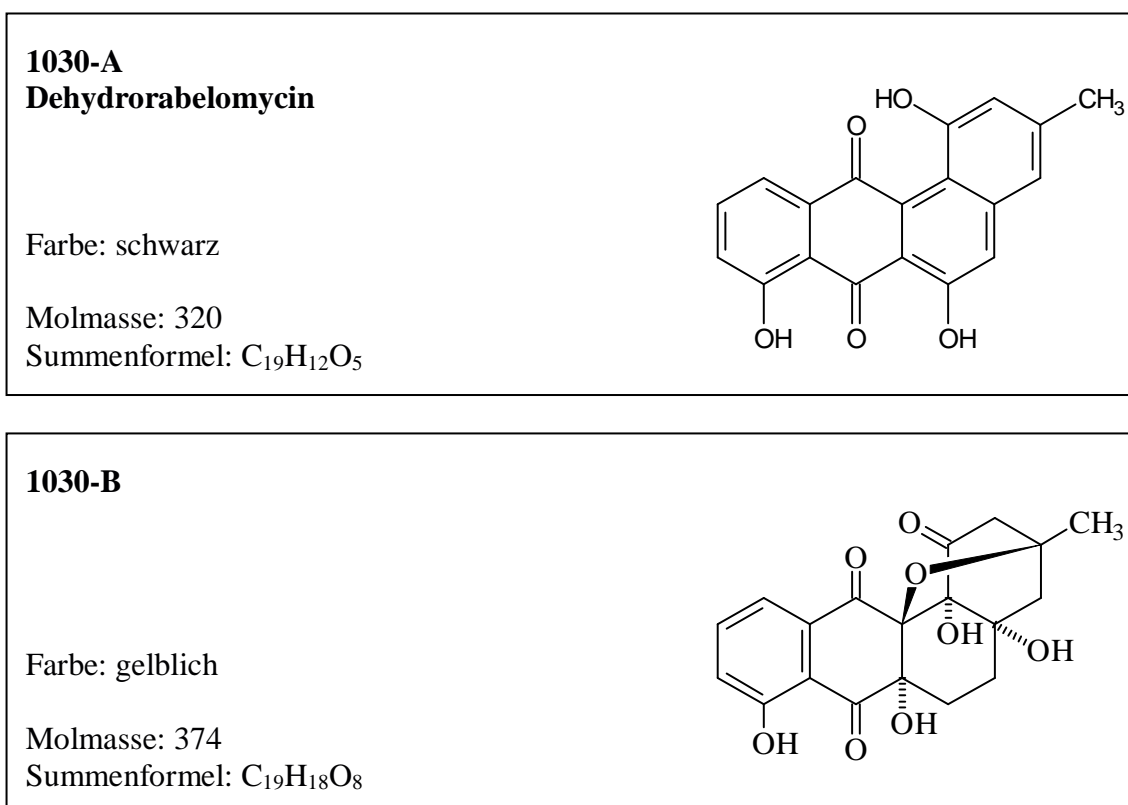


Abb. 66: Beschreibung der identifizierten Substanzen aus KC 1030

Die Strukturaufklärungen von 1030-G und 1030-J waren bis zum Abschluss dieser Arbeit noch nicht beendet. Aufgrund der starken Ähnlichkeit der UV/Vis-Spektren handelt es sich bei 1030-G mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Derivat von Urdamycin B (Rt 7,7 min) und bei 1030-J um eine strukturverwandte Komponente von Urdamycin A (Rt 7,0 min) (DRAUTZ et al., 1986). Da 1030-G und 1030-J in der HPLC (II.8.2) früher eluiert werden als Urdamycin A bzw. B, müssen die hier isolierten Substanzen polarer sein.

## 2.4.8 Biologische Wirkung

### 2.4.8.1 Antibiotisches Wirkspektrum der Metabolite aus KC 1030

Die Reinsubstanzen aus KC 1030 wurden gegen die in Tabelle 49 aufgeführten Testorganismen im Agardiffusionstest auf ihre antibiotische Aktivität getestet (II.12.1.1). Bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 1 mg/ml konnte für Metabolit 1030-B keine antibiotische Wirkung nachgewiesen werden. Die Wirkungen von 1030-A, 1030-G und 1030-J sind in Tabelle 49 dargestellt.

Tab. 49: Antibiotisches Wirkspektrum der Komponenten 1030-A, 1030-G und 1030-J (1mg/ml)

Testorganismus	Hemmhofdurchmesser [mm]		
	1030-A	1030-G	1030-J
<i>Arthrobacter aureescens</i> DSM 20116	16	17	18 / (29)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	-	17	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	-	10	11 / (20)
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü 57	(10)	22 / (30)	15

( ) = Hemmhof ist trüb

### 2.4.8.2 DNA-schädigende Wirkung der Metabolite aus KC 1030

Der Test wurde wie unter II.12.1.3 beschrieben durchgeführt und bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 1 mg/ml konnte für keinen der Metabolite 1030-A, 1030-B, 1030-G und 1030-J eine DNA-schädigende Wirkung nachgewiesen werden.

### 2.4.8.3 Antivirale Eigenschaften der Metabolite aus AK KC 1030

Keine der Reinsubstanzen 1030-A, 1030-B, 1030-G und 1030-J war bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 1 mg/ml gegen den Phagen T5 im unter II.12.1.4 beschriebenen Test wirksam.

#### 2.4.8.4 Test auf antitumorale Wirkung

Die Testierung der Komponenten wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. BEIL am Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen Hochschule in Hannover durchgeführt.

Die Ergebnisse sind Tabelle 50 dargestellt. Für 1030-B konnte bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 10 µg/ml keine Wirkung nachgewiesen werden. Komponente 1030-G entfaltete ihre beste Wirkung gegen das Magenkarzinom HM02 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,24 µg/ml. Aber auch gegen HEP G2 und MCF 7 zeigte 1030-G eine gute Wirkung.

Tab. 50: *In vitro*-Aktivität von 1030-G gegen Tumorzelllinien

Zelllinie	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	TGI [µg/ml]	LC <sub>50</sub> [µg/ml]
<b>1030-G</b>			
HM02	0,24	1,4	3,1
HEP G2	1,3	5,0	>10
MCF 7	0,5	1,6	3,2

IC<sub>50</sub>: 50% Wachstumshemmung

TGI: 100% Wachstumshemmung

LC<sub>50</sub>: 50% Verringerung der Zellzahl nach 24 Stunden im Vergleich zum Zeitpunkt 0

Über eine Zellzyklusanalyse konnte festgestellt werden, dass die Zellen von 1030-G in der S-Phase arretiert werden (s. Tab. 51).

Tab. 51: Analyse des Einflusses der Komponente 1030-G auf den Zellzyklus

	Zellzyklusphase - Zellzahl [%]			
	Sub G1	G1	S	G2/M
Kontrolle	2,0 ± 1,0	56 ± 1,0	23,0 ± 1,9	18,4 ± 2,0
1030-G	2,4 ± 0,6	47 ± 2,8	35,0 ± 3,7	15,2 ± 2,0

G1, S, G2/M = Zellzyklusphasen

Sub G1 = apoptotische Zellen



## IV Diskussion

### 1. Das Screening

Unter den mikrobiellen Naturstoffproduzenten gehören die Actinomyceten, und unter ihnen vor allem die Streptomyceten, zu den besten Quellen (SANGLIER et al., 1993). Seit der Entdeckung des Streptomycins durch Waksman (SCHATZ et al., 1944) konnten noch viele andere Metabolite aus Vertretern dieser Gattung isoliert werden (SANGIER et al., 1996). Doch eben wegen der intensiven Bearbeitung über bald 60 Jahre hinweg ist es sinnvoll, sich Gedanken darüber zu machen, wodurch man die Anzahl der wiederholten Isolierungen von Stämmen reduzieren kann. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, welche Auswirkungen das Isolierungshabitat auf die chemische Diversität der isolierten Organismen hat. Dafür wurden 84 Stämme untersucht, die aus unterschiedlichen Lebensräumen isoliert worden waren. Die Habitate waren antarktischer Boden, Tiefseesediment und Böden, die saurer oder besonders basischer Natur sind. Da die Medienzusammensetzung einen entscheidenden Punkt für die Produktion von Sekundärmetaboliten darstellt (IWAI & OMURA, 1982), wurden für das Screening an den jeweiligen Organismen typ angepasste Medien verwendet.

Im chemischen Screening hatte man vor allem bei den antarktischen und den acidophilen Actinomyceten die meisten Produzenten unbekannter Naturstoffe (III.1.1). Im biologischen Screening wiesen die Antarktischen und die Alkalophilen die meisten Stämme auf, die biologisch aktive Substanzen bildeten (III.1.2). Auffällig war, dass ein positives Ergebnis bei der einen Screeningmethode nicht unbedingt ein positives Ergebnis bei der anderen nach sich ziehen muss (III.1.3). Die Erklärung für dieses Phänomene liegt darin, dass beide Methoden nicht in der Lage sind, alle gebildeten Metabolite zu erfassen, sondern auf ein bestimmtes Fenster festgelegt sind. So werden im chemischen Screening nur Substanzen mit einer Absorption zwischen 200 und 600 nm erfasst und im biologischen Screening ausschließlich Komponenten, die antibiotisch wirken.

Unter Einbeziehung beider Ergebnisse lassen sich folgende Tendenzen für die vier Actinomycetengruppen ableiten. Besonders vielversprechend sind die antarktischen Actinomyceten. Ebenfalls gute Produktivitäten zeigten die Gruppen der Alkalophilen und die Acidophilen, jedoch waren die Ergebnisse der Acidophilen extrem schlecht zu reproduzieren (III.1.4). Am wenigsten attraktiv für eine weitere Bearbeitung war die Gruppe der Tiefseestämme, die aber in der biologischen Testierung bessere Ergebnisse als im chemischen Screening aufwiesen. Dass die Resultate in den einzelnen Gruppen so unterschiedlich

ausfallen, zeigt deutlich, dass die Wahl des Isolierungsortes entscheidend zum Erfolg bei einem Screening beiträgt (BULL et al., 1992). Besonders erstaunte das gute Ergebnis bei den Alkalophilen. Da bislang nur wenige Naturstoffe aus dieser Gruppe isoliert werden konnten, wurde von HORIKOSHI (1999) gemutmaßt, dass sie keine gute Quelle für neue Naturstoffe abgeben, da viele Naturstoffe bei hohen pH-Werten instabil seien. Dieser Aussage widersprechen die Resultate im Screening.

Ebenso wie bei der Ausbeute im Screening gab es zwischen den vier Organismengruppen große Unterschiede bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (III.1.1). Negativer Spitzenreiter in Sachen Stammstabilität waren die acidophilen Streptomyceten, da hier bei sämtlichen bearbeiteten Stämmen die Produktion der Naturstoffe nicht wiederholt beobachtet werden konnte. Besonders unproblematisch waren die alkalophilen und antarktischen Actinomyceten, bei denen jeweils nur ein Stamm bei erneuter Kultivierung nicht mehr die unbekanntenen Komponenten bildete. Dass Mikroorganismen bei erneuter Kultivierung nicht mehr das gleiche Produktionsverhalten wie zuvor zeigen, ist vor allem bei den Streptomyceten schon oft beobachtet worden. Dieses Phänomen hat seinen Ursprung in der besonderen Genstruktur der Streptomyceten. Das Streptomyceten-Chromosom ist linear und weist eine auffällig große Instabilität auf, die in der Natur eine schnelle Anpassung möglich macht. Es wurde gezeigt, dass bis zu 5% der kolonieformenden Sporen nicht mehr dem Originalstamm entsprechen und unter Laborbedingungen bis zu 25% des Genoms entbehrlich sind (VOLFF & ALTENBUCHNER, 1998; REDENBACH & ALTENBUCHNER, 2002). Die große Zahl der instabilen Stämme bei den acidophilen Organismen könnte auf die Stammhaltung zurückzuführen sein. Da die Bedingungen nicht an die einzelnen Gruppen angepasst waren, könnten die Stammhaltung zu einer Selektion von Stämmen geführt haben, die Teile ihrer biosynthetischen Fähigkeiten verloren haben. Ein Einfluss der Stammhaltung auf die Produktion eines Streptomyceten wurden beispielsweise schon von NOVÁK et al. beschrieben (1993), die Versuche zum Einfluss von Kulturpassagen in flüssigen und auf festen Nährlösungen auf die Produktion von Avermectin in *Streptomyces avermitilis* durchgeführt hatten.

## 2 Bearbeitung einzelner Stämme

Von den Stämmen aus dem Screening wurden vier für eine weitere Bearbeitung ausgewählt, wobei drei Stämme (AK 409, AK 623 und AK 671) zur Gruppe der Alkalophilen gehören und ein Stamm (KC 1030) aus der Gruppe der antarktischen Organismen stammt. Die Auswahl erfolgte aufgrund der Ergebnisse des chemischen Screenings (II.9.2) und zum Teil aufgrund einer besonders starken antibiotischen Wirkung im biologischen Screening (II.9.1).

### 2.1 *Streptomyces* sp. AK 409

AK 409 wurde aus dem Abraum eines Stahlwerks isoliert und gehört zur Gruppe der Streptomyceten, die aus einem alkalischen Habitat stammen (II.3.1). Über pH-statische Kultivierung im Bioreaktor konnte gezeigt werden, dass das Wachstumsoptimum von AK 409 bei pH 9 oder höher liegt (III.2.1.7), was bestätigt, dass es sich um einen alkalophilen Stamm handelt (GRANT et al., 1990). Die Auswahl für eine weitere Bearbeitung erfolgte aus zwei Gründen. Zum einen zeigte der Stamm im biologischen Screening eine sehr starke Wirkung gegen den pflanzenpathogenen Pilz *Botrytis cinerea* (III.2.1.2.2) und zum anderen konnten über HPLC-DAD zwei Komponenten detektiert werden, die über die Datenbank nicht identifiziert werden konnten (III.2.1.2.1).

#### 2.1.1 Kultivierung im Bioreaktor

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Schüttelkolben auf größere Volumina zu untersuchen, wurde AK 409 in Bioreaktoren mit 10 und 20 l Arbeitsvolumen kultiviert (III.2.1.5, III.2.1.6). Die Ergebnisse aus den Schüttelkulturen ließen sich nicht direkt auf die verwendeten Bioreaktoren übertragen. In den Bioreaktoren erreichte AK 409 größere Biomassen als im Schüttelkolben (III.2.1.3) und es gab ebenfalls Unterschiede bei der Produktion der Metabolite, die sich auch stark je nach Reaktortyp unterschied. Komponente 409-B fand sich in allen Bioreaktoren in höherer Konzentration als in der Schüttelkultur. Pyrocoll wurde in den Bioreaktoren in geringerer bis gleicher Menge wie in Schüttelkultur gebildet. Dass eine direkte Übertragung von Ergebnissen aus einer Schüttelkultur in einen Bioreaktor oft nicht gelingt, hat verschiedene Gründe. Zum einen ist die Sauerstoffversorgung anders und dazu kommen weitere Faktoren wie veränderte Scherkräfte oder die andere Mischqualität in der Kulturbrühe (HUMPHREY, 1998).

### 2.1.2 Strukturaufklärung der Komponenten und Überlegungen zur Biosynthese

Zwei der drei aus AK 409 isolierten Komponenten konnten in ihrer Struktur aufgeklärt werden (III.2.1.9). Bei 409-A handelt es sich um Pyrocoll, das schon als Syntheseprodukt (GROSS & WENTRUP, 1982; QIAO et al., 1996) und Inhaltsstoff von Tabakrauch beschrieben worden war (SCHUMACHER et al., 1977), jedoch als Naturstoff unbekannt ist. Bei 409-D handelt es sich um Pyrrol-2-Carbonsäure, die bereits 1983 aus Streptomyceten isoliert worden war (HÖFLE & WOLF, 1983). Durch eine Zufütterung von Hydroxyprolin kurz vor Beginn der Produktion konnte eine verstärkte Bildung von Pyrrol-2-Carbonsäure induziert werden, die aber nicht mit einer Erhöhung der Konzentration an 409-A einher ging (III.2.1.4). Dieses Ergebnis lässt die folgenden Mutmaßungen über eine Biosynthese zu. Pyrrol-2-Carbonsäure könnte aus Hydroxyprolin entstehen. Durch die Verbindung von zwei Pyrrol-2-Carbonsäure-Einheiten unter Abspaltung von zwei Wassermolekülen an den Carboxylgruppen könnte Pyrocoll gebildet werden. Da die Fütterung von Hydroxyprolin die Konzentration an 409-A nicht erhöhte, sondern eine Anreicherung von Pyrrol-2-Carbonsäure zur Folge hatte, kann man annehmen, dass es sich bei der Umsetzung von Pyrrol-2-Carbonsäure zu Pyrocoll um einen langsamen Schritt in der Biosynthese handelt. Die aus diesen Überlegungen abgeleitete hypothetische Biosynthese von Pyrocoll ist in Abbildung 67 dargestellt.

Für eine weitere Bearbeitung von AK 409 wäre eine Fütterung von markiertem Hydroxyprolin interessant, um die Hypothese der Biosynthese überprüfen zu können. Des Weiteren könnte untersucht werden, ob der Stamm AK 409 in der Lage ist weitere Metabolite zu produzieren und wenn ja, ob diese Komponenten ebenfalls mit Pyrocoll und Pyrrol-2-Carbonsäure verwandt sein könnten.

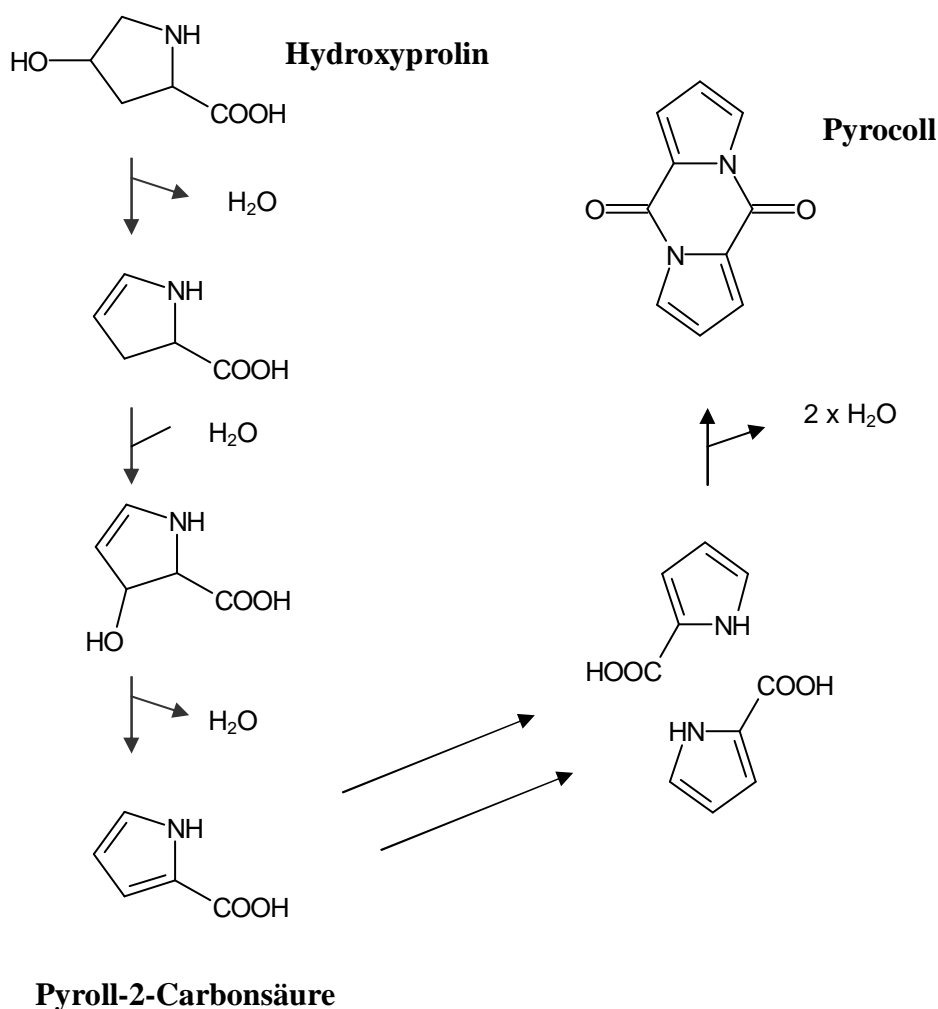


Abb. 67: Hypothese zur Biosynthese von Pyrocoll

### 2.1.3 Biologische Wirksamkeit von Pyrocoll

Pyrocoll zeigte keine Wirkung gegen die Alge *Chlorella fusca* und die Pflanze *Lemna minor* (III.2.1.10.3, III.2.1.10.4), zeichnet sich aber ansonsten durch vielfältige biologische Aktivitäten aus. Neben einer moderaten Wirkung gegen die Erreger von Malaria, der Chagas- und Schlafkrankheit (III.2.1.10.6) zeigte es eine gute antibiotische Wirkung gegen die Gram-positiven Bakterien *Rhodococcus* und *Arthrobacter* und gegen myzelbildende Pilze, wie den pflanzenpartogenen *Botrytis cinerea* (III.2.1.10.1, III.2.1.10.2). In besonderem Maße fiel Pyrocoll durch seine außergewöhnlich gute Wirkung gegen viele Tumorzelllinien auf (III.2.1.10.5). Worauf die Wirkung beruhen könnte ist nicht bekannt, aber Veränderungen können das Molekül unwirksam machen, wie das Beispiel der strukturverwandten Komponente PD 125375 (Abb. 68) zeigt, die weder antitumorale noch antibiotische Wirkung

hat (RITHNER et al., 1987). Aus diesem Grund wäre es interessant, Derivate von Pyrocoll synthetisch herzustellen und die Veränderung in der Wirkung zu untersuchen.

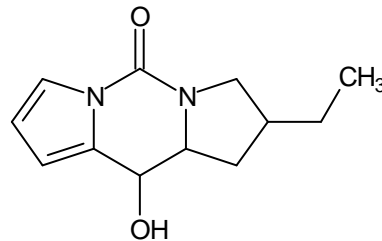


Abb. 68: Struktur von PD 125375

## 2.2 *Streptomyces* sp. AK 623

*Streptomyces* AK 623 wurde aus Humus des Hamsterley Forest, eines alkalischen Habitats, isoliert (II.3.1). Bei einer pH-statischen Kultivierung im Bioreaktor konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert für ein optimales Wachstum von AK 623 bei pH 9 oder höher liegt (III.2.2.6), was seine alkalophile Natur belegt (GRANT et al., 1990). Die Auswahl für eine weitere Bearbeitung erfolgte aufgrund einer starken Hemmwirkung gegen die Organismen *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Streptomyces* im biologischen Screening (III.2.2.2.2) und auf Grund von zwei Komponenten, die im chemischen Screening nicht identifiziert werden konnten (III.2.2.2.1).

### 2.2.1 Kultivierung im Bioreaktor mit Medium OM

Zur Substanzisolierung wurde mit AK 623 ein Scale-up in den 10 und 20 l Maßstab durchgeführt (III.2.2.4, III.2.2.5). Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse aus der Nährlösungsvariation (III.2.2.3) nicht reproduziert werden konnten. In allen Fermentationen, ob in Nährlösung OM oder SGG, wurden die Komponenten 623-D1 und 623-D2 in einer fünf bis zehn Mal geringeren Konzentration gebildet, als zuvor in den Schüttelkulturen. Zwei Komponenten wurden nicht mehr und eine Komponente neu gebildet. Da parallel zu den Fermentationen kultivierten Schüttelkulturen die gleichen Ergebnisse zeigten kann ausgeschlossen werden, dass es sich um den Einfluss des Reaktortyps handelt. Es ist deshalb anzunehmen, dass hier möglicherweise die oft erwähnte genetische Instabilität für den Abfall

der Substanzproduktion verantwortlich ist. Sie betrifft alle Aspekte des Wachstums, jedoch ist der Sekundärmetabolismus in besonderem Maße betroffen (BIRCH et al., 1990). Die Ursache dafür liegt in der Chromosomenstruktur der Streptomyceten begründet. Sie gehören zu den wenigen Bakterien, die ein lineares Chromosom aufweisen (REDENBACH & ALTENBUCHNER, 2002). Die Genverteilung auf dem Chromosom ist dabei nicht willkürlich, sondern essentielle Gene konzentrieren sich im Zentrum und die Gene des Sekundärmetabolismus liegen eher in den Randbereichen. Durch die Instabilität der Chromosomenstruktur können Deletionen auftreten, die bis zu 25% des Genoms betragen können. Da diese DNA-Verluste aber meist nur die Enden der Chromosomen betreffen, sind elementare Gene in der Regel nicht betroffen, wohl aber häufig sekundäre Stoffwechselwege (VOLFF & ALTENBUCHNER, 1998).

### **2.2.2 Isolierung und Reinigung**

Die von AK 623 gebildeten Komponenten 623-D1, 623-D2 und 623-B wurden aus dem Kulturfiltrat und Myzel einer Kultur in OM isoliert (III.2.2.7.1). Bei der Aufreinigung waren bei Komponente 623-D1 und 623-D2 starke Verluste zu verzeichnen. Besonders kritisch waren die Schritte der Adsorptionschromatographie und der PHPLC. Gerade Mal 7,2% der ursprünglich vorhandenen Substanz 623-D1 konnte letztendlich als Reinsubstanz dargestellt werden. Bei einer zweiten Aufreinigung (III.2.2.7.2) aus einer Kultur in SGG wurde deshalb bei der Adsorptionschromatographie ein flacherer Gradient gewählt und so eine deutlich höhere Reinheit der Substanzen in den Rohprodukten erreicht. Dadurch lagen die Komponenten bereits nach einer anschließenden Ausschlusschromatographie in Reinform vor. Von 623-D1 konnten bei der zweiten Aufreinigung 56% der Ausgangssubstanz in Reinform dargestellt werden. Für eine weitere Optimierung der Aufreinigung müsste man vor allem über Alternativen zur Adsorptionschromatographie nachdenken, da hier immer noch ein Verlust von über 30% auftrat.

### **2.2.3 Metabolite aus AK 623**

Aus AK 623 wurden 4-Hydroxycytalon und die Komponenten 623-D1 und 623-D2 isoliert (III.2.2.7.1) und in ihrer Struktur aufgeklärt (III.2.2.8). Bei 623-D1 und 623-D2 handelt es um Strukturverwandte des Lactonamycin, das 1996 das erste Mal von MATSUMOTO et al. (1996) beschrieben wurde. Die Isolierung erfolgte damals ebenfalls aus einem Streptomyceten-Stamm.

4-Hydroxyscytalon wurde das erste Mal 1973 von IWASAKI et al. (1973) aus dem Pilz *Pyricularia oryzae* isoliert. Auch spätere Arbeiten beschreiben 4-Hydroxyscytalon ausschließlich als Pilzmetabolite (BELL et al., 1976; SANKAWA et al., 1981; DAHIYA & RIMMER, 1988; GREMAUD & TABACCHI, 1996), so dass 4-Hydroxyscytalon im Rahmen dieser Arbeit das erste Mal aus einem Bakterium isoliert werden konnte. Bei 4-Hydroxyscytalon handelt es sich um ein Shuntprodukt aus der Melaninbiosynthese, die vor allem im Pilz *Verticillium dahliae* gut untersucht ist (BELL & WHEELER, 1986). Die Biosynthese dieses Metaboliten ist in Abbildung 69 zu sehen.

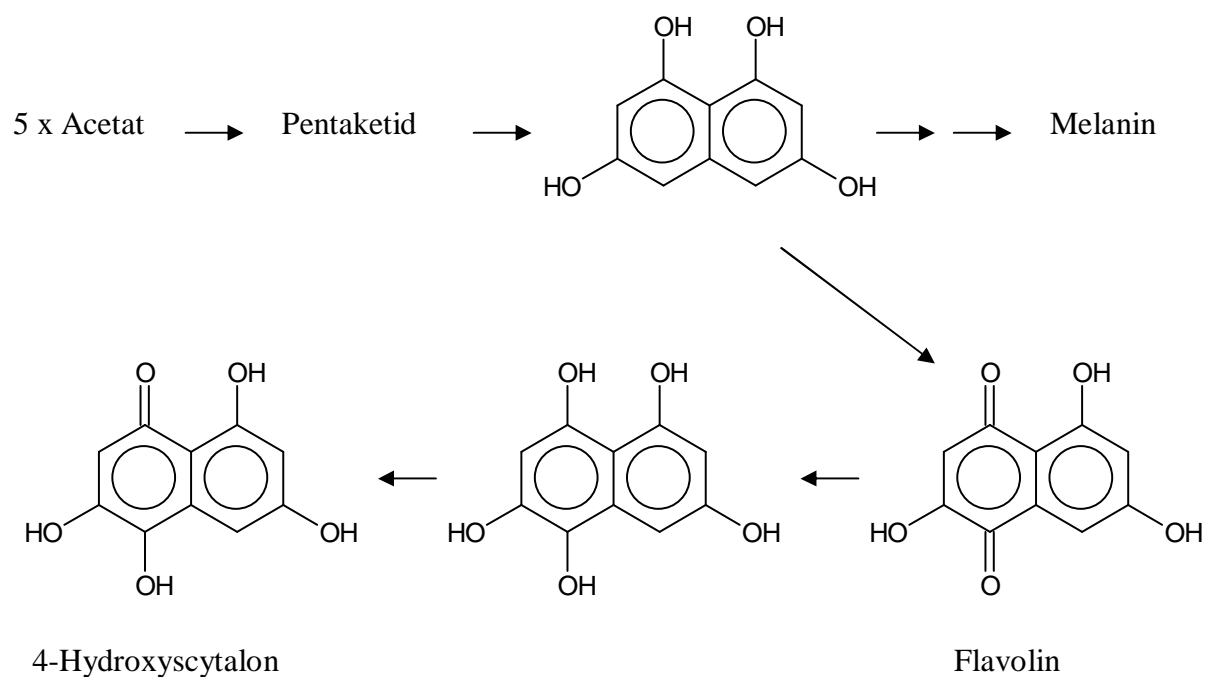


Abb. 69: Biosynthese von 4-Hydroxyscytalon (nach BELL & WHEELER, 1986)

#### 2.2.4 Biologische Wirkung der Metabolite aus AK 623

4-Hydroxyscytalon war in allen durchgeführten Tests inaktiv (III.2.2.9). Auch in der Literatur ist keine biologische Wirkung beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigen die beiden Komponenten 623-D1 und 623-D2 antibiotische Aktivität gegen einige Gram-positive Bakterien (III.2.2.9.1) und wachstumshemmende Aktivität gegen Tumorzelllinien (III.2.2.9.4), wobei die Aktivität von 623-D2 immer schwächer als die von 623-D1 war. Gegen den *E. coli* pathogenen Phagen T5 zeigte allein 623-D2 Aktivität (III.2.2.9.3). Die



Wirkung des Aglycons 623-D2 gegen den T5 Phagen konnte erstmalig gezeigt werden, während für Lactonamycin keine antiviralen Eigenschaften beschrieben sind.

Vergleicht man diese biologischen Eigenschaften mit denen von Lactonamycin (MATSUMOTO et al., 1999) so legen die Ähnlichkeiten ebenfalls nahe, dass es sich bei den Substanzen 623-D1 und 623-D2 um Strukturverwandte von Lactonamycin handelt. Lediglich die Wirkung gegen *Bacillus* konnte nicht bestätigt werden. Das könnte zum einen daran liegen, dass unterschiedliche Spezies des Testkeims verwendet wurden, oder dass die geringen strukturellen Unterschiede für die unterschiedliche Wirkung verantwortlich sind. Da sowohl die antibiotische als auch die antitumorale Wirkung von 623-D2 entschieden geringer als die von 623-D1 ist, liegt die Annahme nahe, dass die biologische Wirkung durch den Zucker verbessert wird.

### 2.3. *Streptomyces* sp. AK 671

Wie *Streptomyces* sp. AK 623 wurde *Streptomyces* sp. AK 671 aus dem Humus des Hamsterley Forest isoliert und gehört zur Gruppe der Alkalophilen (II.3.1). Bei einer pH-statischen Kultivierung konnte die alkalophile Natur bestätigt werden, da der Stamm sein Wachstumsmaximum bei 8,5 bis 9,0 hat (III.2.3.2). Interessant für eine weitere Bearbeitung war der Stamm aufgrund von sechs nicht identifizierbaren Komponenten im chemischen Screening (III.2.3.2.1). Die Extrakte waren im biologischen Screening nicht aktiv (III.2.3.2.2).

#### 2.3.1 Kultivierung im Bioreaktor

Bei den unregulierten Kultivierungen war die Übertragbarkeit von Wachstum und pH-Verlauf aus dem Schüttelkolben (III.2.3.3) in den Blattrühr-Fermenter (III.2.3.4) gut. Deutlich unterschied sich jedoch das Spektrum und die Menge der gebildeten Metabolite, was auf die anderen Kultivierungseinflüsse in einem Bioreaktor im Vergleich mit einer Schüttelkultur zurückzuführen sein könnte (HUMPHREY, 1998). Bemerkenswert an beiden Fermentationen war, dass der  $pO_2$  nur schwach absinkt (III.2.3.4). Hier war also der Sauerstoff nicht wie häufig der limitierende Faktor für das Wachstum bei der Kultivierung (NAGY, 2002). Bei den pH-statischen Kultivierungen in NL 410 war das Spektrum der gebildeten Substanzen stark vom pH-Wert abhängig (III.2.3.5) und unterschied sich deutlich von dem einer freien Kultivierung im Schüttelkolben (III.2.3.3). Da der pH-Wert erwiesenermaßen einen großen

Einfluss auf die Produktion haben kann (BAKER et al., 1996), wäre eine breite Untersuchung zum Einfluss des pH-Wertes auf die Produktion sehr vielversprechend.

### 2.3.2 Strukturaufklärung

Von den fünf von AK 671 produzierten Komponenten, die als Reinsubstanz dargestellt werden konnten, sind bislang drei in ihrer chemischen Struktur aufgeklärt worden (III.2.3.7). Bei 671-C handelt es sich um eine bislang unbekannte Komponente. Durch das Abspalten des Zuckers von diesem Metabolit erhält man das lediglich als Syntheseprodukt bekannte Diketonaphthol (HARRIS et al., 1974), das sich ebenfalls in den Kulturen von Stamm AK 671 findet, aber im Rahmen dieser Arbeit nicht isoliert wurde. An weiteren Komponenten bildete der Stamm 3,8-Dihydroxy-1-Methylantrachinon-2-Carbonsäure, das schon 1989 ebenfalls aus einem Streptomyces isoliert worden war (KRUPA et al., 1989). Das Besondere dieser Komponente ist, dass es sich um ein als Naturstoff seltenes  $\alpha$ -Methylantrachinon handelt. Die dritte isolierte Komponente ist (2-Methyl-4-oxo-4H-chromen-5-yl)acetylsäure, die bislang noch unbekannt war.

Bei den identifizierten Komponenten handelt es sich, mit Ausnahme von 671-D, um Komponenten, die aus der Anthrachinon-Biosynthese stammen könnten. Die Biosynthese der Anthrachinone startet vermutlich mit einer Verkettung von acht Acetateinheiten, welche im Anschluss gefaltet und zyklisiert werden (Abb. 70; FRANK & STANGE, 1981). Bislang war es jedoch noch nicht gelungen, einer dieser teilzyklisierten Zwischenstufen habhaft zu werden. Die Erhärtung der Biosynthese-Theorie erfolgte lediglich über Fütterungsexperimente, bei denen der Einbau von hypothetischen Zwischenstufen in Anthrachinone nachgewiesen werden konnte. Das hier isolierte Diketonaphthol ist eine potentielle Zwischenstufe, mit der Fütterungsversuche erfolgreich durchgeführt wurden und so ist anzunehmen, dass es sich hierbei um eine der teilzyklisierten Vorstufen handelt. Der Naturstoff Chrysophanol, der ein Endprodukt der Anthrachinonbiosynthese darstellt (FAIRBAIRN & MUHTADI, 1972), konnte allerdings nicht in den Kulturen von AK 671 nachgewiesen werden. Bei Chrysophanol handelt es sich um einen Naturstoff, der wiederholt in höheren Pflanzen und in Pilzen nachgewiesen werden konnte. Die erste Beschreibung erfolgte 1911 von TSCHIRCH & BROMBERGER (1911), die Chrysophanol aus *Rhamnus cathartica* isolieren konnten. Die erste Isolierung aus einem Pilz erfolgte 1954 (HOWARD & RAINSTICK, 1954). Das Vorhandensein

einer teilzyklisierten Vorstufe, aber nicht des Endprodukts, könnte darauf hinweisen, dass der weitere Biosyntheseweg zum Chrysophanol blockiert ist.

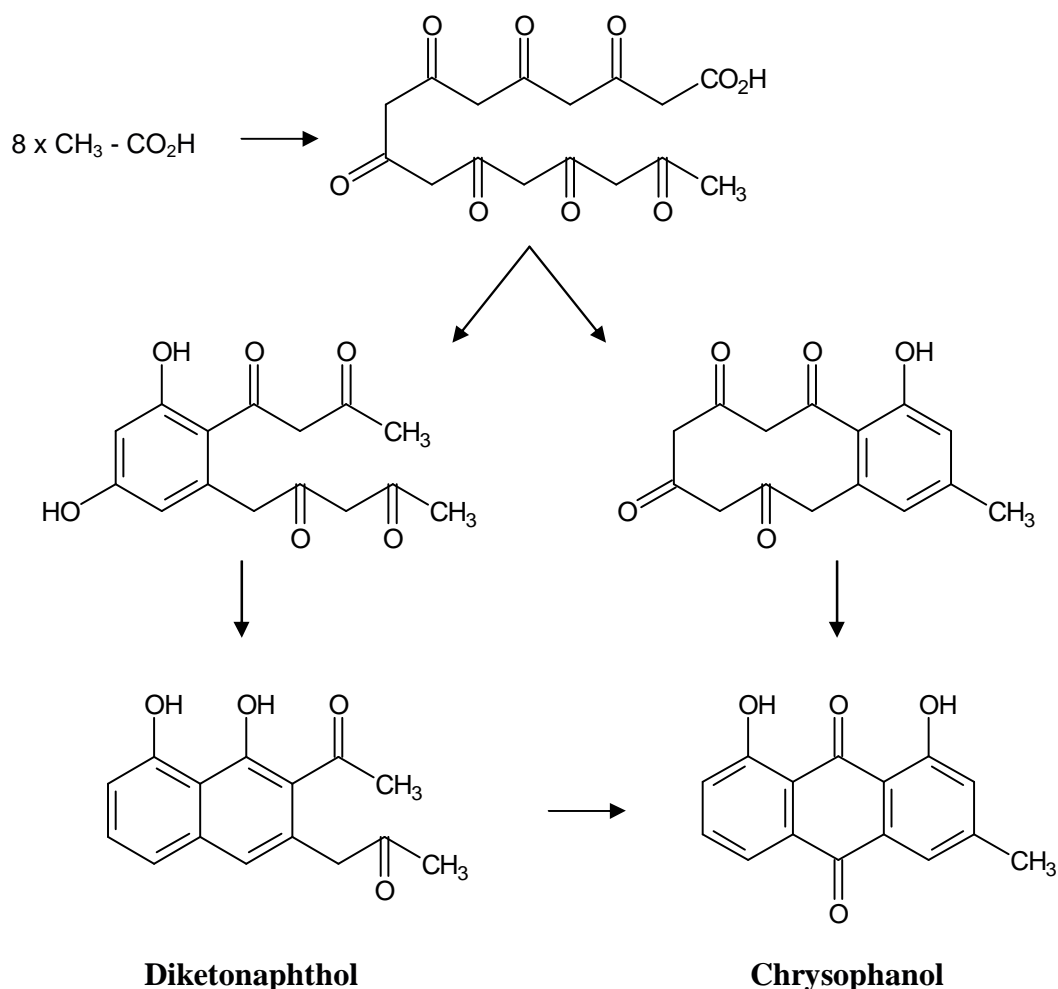


Abb. 70: Mögliche Zwischenprodukte in der Anthrachinon-Biosynthese (FRANK & STANGE, 1981)

### 2.3.3 Biologische Wirkung

Keine der isolierten Reinsubstanzen hat antibiotische, antifungische oder DNA-schädigende Eigenschaften (III.2.3.8). Im Test gegen humane Tumorzelllinien zeigte Metabolit 671-C eine gute und 671-D eine leichte wachstumshemmende Wirkung (III.2.3.8.4). Da schon für Chrysophanol eine hemmende Wirkung auf Tumorzelllinien nachgewiesen wurde (DARZYNKIEWICS et al., 1989), war die Wirkung von 671-C nicht überraschend. 3,8-Dihydroxy-1-Methylantrachinon-2-Carbonsäure war in allen durchgeführten biologischen Tests inaktiv (III.2.3.8). In der Literatur ist jedoch eine antioxidante Wirkung beschrieben, die

stärker als die von Vitamin E sei (ISA, 1992). Überhaupt wurde eine antioxidante Wirkung für Anthrachinone häufig beschrieben, so konnten YEN et al. (2000) gleich für mehrere Substanzen eine solche Wirkung nachweisen. Aber in der großen Gruppe der Anthrachinone finden sich auch Vertreter mit anderen biologischen Eigenschaften. Neben dem oben schon erwähnten Chrysophanol mit antitumorale Wirkung (DARZYNKIEWICS et al., 1989) zeigt das Haematomon Hemmungswirkung gegen eine Proteinkinase (BAUERS et al., 2000) und Knipholon wirkt antiplasmodisch und zytotoxisch (BRINGMANN et al., 1999).

## 2.4 *Streptomyces* sp. KC 1030

Der antarktische Stamm KC 1030 wurde aus einer Erdprobe vom Terra nova Bay isoliert und gehört zu der Gruppe der antarktischen Organismen (II.3.1). Es handelt sich hier, wie bei den anderen bearbeiteten Stämmen, um einen Vertreter der Gattung *Streptomyces*. In die engere Auswahl kam der Stamm aufgrund einer Komponente, die über HPLC-DAD nicht identifiziert oder einer Struktur-Klasse zugeordnet werden konnte (III.2.4.2.1). Des weiteren waren zwei Komponenten interessant, die aufgrund identischer UV/VIS-Spektren eine starke Verwandtschaft mit den Urdamycinen bzw. den Fridamycinen zu haben schienen. Im biologischen Test zeigten die Extrakte Wirkung gegen die Organismen *Bacillus subtilis*, *Streptomyces viridochromogenes* und *Botrytis cinerea* (III.2.4.2.1).

### 2.4.1 Produktionsverhalten in der Schüttelkultur

Schon in der Nährlösungsvariation zeichnete sich ab, dass die Produktion durch die Anwesenheit des Puffers  $\text{CaCO}_3$  beeinflusst wird. Eine Produktion fand ausschließlich in Nährlösungen mit diesem Puffer statt (III.2.4.4.1). Dass die An- oder Abwesenheit des Puffers  $\text{CaCO}_3$  Einfluss auf die Produktion haben kann ist bekannt (GURTU & HEDING, 1978). Es ist jedoch unbekannt, ob dieser Effekt ausschließlich auf den pH-stabilisierenden Effekt oder auch auf andere Faktoren zurückzuführen ist. So wurden beispielsweise auch schon Änderungen in der Pelletgröße durch die Zugabe von  $\text{CaCO}_3$  beobachtet (MACEDO et al., 1999).

Um im speziellen Fall von KC 1030 herauszufinden, worauf die entscheidende Wirkung von  $\text{CaCO}_3$  beruht, wurde Nährlösung SGG\*, die kein  $\text{CaCO}_3$  enthält, mit unterschiedlichen Zusätzen versetzt (s. Tab. 42) und der Effekt dieser Zusätze untersucht (III.2.4.4.2). Durch die

Verwendung von hochreinem  $\text{CaCO}_3$  konnte ausgeschlossen werden, dass mit  $\text{CaCO}_3$  eingeschleppte Spurenelemente für den Effekt verantwortlich sind (WEINBERG, 1989). Der pH-Wert könnte also ein wichtiger, aber nicht alleiniger Faktor sein, der das Produktionsverhalten des Stammes KC 1030 beeinflusst, da eine Stabilisierung des pH-Wertes über alternative Puffer den Stamm ebenfalls zur Produktion anregte, aber sich das Spektrum der Metabolite änderte. Auch eine höhere Menge an  $\text{CaCO}_3$  führte nicht zu den gleichen Ergebnissen wie mit Nährlösung SGG, obwohl der pH-Verlauf sich nur unwesentlich unterschied. Insofern muss  $\text{CaCO}_3$  außer über die puffernden Eigenschaften noch über andere Eigenschaften verfügen, welche Einfluss auf den Stoffwechsel und so auf die Produktion nehmen.

#### **2.4.2 Optimierung der Produktion von 1030-B in Schüttelkultur**

Ausgehend von den Ergebnissen aus der Nährlösungsvariation wurde basierend auf dem Medium SGG eine Optimierung der Medienbestandteile durchgeführt (III.2.4.4.3). Dabei folgte man einer geschlossenen Strategie, bei der die vorhandenen Medienbestandteile prozentual erhöht und erniedrigt werden (KENNEDY et al., 1999). Im Verlauf zeigte sich, dass es für eine gute Produktion von 1030-B entscheidend zu sein scheint, dass die Komponenten 1030-D, 1030-G und 1030-J nicht oder nur in geringem Maße gebildet werden. Neben der Optimierung der Nährlösung für die Produktion von Komponente 1030-B wurde auch der Einfluss der Vorkultur auf die Produktion untersucht (III.2.4.4.4), da diese häufig einen Einfluss auf das Produktionsverhalten der Hauptkultur hat (NEVES et al., 2001). Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Vorkultur einen Einfluss hat. Welche Faktoren allerdings auf die Produktion einwirkten, ließ sich nicht eindeutig klären. Weder ergab sich ein direkter Zusammenhang mit der Zellmorphologie in den Vor- oder Hauptkulturen, noch schien die Biomasse, der pH-Wert oder die Viskosität der Vorkultur die entscheidende Rolle zu spielen. Eine Aussage, welche Faktoren die Produktion maßgeblich beeinflussen, kann erst durch weitere Untersuchungen getroffen werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Wachstumsmorphologie in den Fermentationen oder die Biomasse eine entscheidende Rolle spielen, da sie durch ein Homogenisieren verändert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch ein Homogenisieren der Vorkultur die Produktion beeinflusst wird. Dass die Morphologie einen Einfluss auf die Produktion eines Stammes haben kann, ist ein bekanntes Phänomen bei Streptomycceten, das für einzelne Vertreter auch schon näher untersucht wurde (SARRA et al., 1999; TAMURA et al., 1997).

Über die Kombination von optimiertem Medium (MO2) und optimierte Vorkultur (NL 200 oder NL 300 homogenisiert) konnte die Produktion von 1030-B von 7,3 auf 11,6 mg/l erhöht werden (III.2.4.4.4).

### **2.4.3 Kultivierung im Bioreaktor**

Bei unregelmäßigem pH-Wert war das Produktionsverhalten im Bioreaktor (III.2.4.5.1, III.2.4.5.3) dem im Schüttelkolben (III.2.4.4.1, III.2.4.4.2) sehr ähnlich. Das galt sowohl für die Kultivierung in SGG als auch für die Kultivierung in SGG\* mit Phosphatpuffer.

Die Ergebnisse der Schüttelkolbenversuche ließen vermuten, dass der pH-Wert eine wichtige Rolle bei der Produktbildung von KC 1030 spielt (III.2.4.4.2). Dass eine pH-statische Fermentation die Produktbildung beeinflussen kann, wurde schon für andere Stämme beschrieben (BAKER et al., 1996). Aus diesem Grund wurde der Produktionsstamm KC 1030 im sauren, neutralen und basischen Bereich kultiviert (III.2.4.5.2). Zur Kontrolle wurde ohne pH-Regelung bei einem Start-Wert von pH 7,0 kultiviert. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Beeinflussung der Produktion durch den pH-Wert gegeben ist. Gerade bei der Untersuchung zur optimalen Kultivierung des Stammes bleiben noch viele interessante Fragen offen, die man bei einer weiteren Bearbeitung klären könnte. Nachdem die Reaktion auf eine pH-Regelung so deutlich war, könnte man weitere Untersuchungen bei anderen pH-Werten oder auch mit einem geregelten pH-Verlauf durchführen. Da sich bei den Schüttelkolbenversuchen zur Produktionsoptimierung für 1030-B herauskristallisierte, dass ein weiterer entscheidender Punkt bei der Produktion die Myzelmorphologie während der Kultivierung zu sein scheint (III.2.4.4.4), wäre eine umfassende Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Parameter im Bioreaktor naheliegend, da hier die Möglichkeiten der Regulation unvergleichlich besser als im Schüttelkolben sind (HUMPHREY, 1998). Fragen von Interesse wären beispielsweise, welchen Einfluss eine Veränderung der Scherkräfte auf Pelletbildung und Produktion hätte, die man durch eine höhere Rührgeschwindigkeit erhöhen oder über die Verwendung eines Airliftfermenters reduzieren könnte (SCHÜGERL, 1990; GARVRILESCU & ROMAN, 1998). Interessant wäre auch zu untersuchen, wie sich eine kontinuierliche Fermentation auf den Produktionsverlauf auswirken würde, bei der Pellets häufig zerfallen (LOHR et al., 1989).

#### 2.4.4 Metabolite aus KC 1030

Über HPLC-DAD konnte ein Metabolit als Fridamycin E identifiziert werden. Fridamycin E wurde von Zähler und Lazar aus *Streptomyces parvulus* isoliert und die chemische Struktur von Kricke und Zeeck (KRICKE, 1984) aufgeklärt. Die erste Synthese erfolgte 1988 (KROHN et al., 1988), und weitere Synthesen von Derivaten folgten, da man sich von dieser Komponente und ihren Derivaten gute antitumorale Eigenschaften erhoffte (MATSUMOTO et al., 1991). Neben den identifizierten Komponenten Fridamycin E und Dehydrorabelomycin wurde mit 1030-B ein bislang unbekanntes Angucyclinon mit neuartiger Struktur produziert. Die Strukturen der Komponenten 1030-D, 1030-G und 1030-J sind bislang nicht aufgeklärt, aber aufgrund ihrer UV/Vis-Spektren muss es sich um Strukturverwandte von Urdamycin A (1030-J) und B (1030-G) sowie Fridamycin D (1030-D) handeln. Fridamycin D wurde ebenfalls von Zähler und Lazar aus *Streptomyces parvulus* isoliert und die chemische Struktur von Kricke und Zeeck aufgeklärt (KRICKE, 1984). Die Urdamycine A und B wurden das erste Mal 1986 aus *Streptomyces fradiae* isoliert (DRAUTZ et al., 1986). Bei all diesen Naturstoffen handelt es sich um Angucycline oder Angucyclin-Abkömmlinge. Die Benennung der Angucycline-Gruppe erfolgte durch DRAUTZ et al. (1984). Der Name leitet sich aus dem lateinischen „angus“ für Winkel ab und bezieht sich auf die gewinkelte Molekülstruktur des Tetracyclus. Naturstoffe aus dieser bisher über 100 Vertreter umfassenden Gruppe wurden bislang interessanterweise ausschließlich aus Actinomyceten isoliert (ROHR & THIERICKE, 1992). Biosynthetisch entstehen sie aus zehn miteinander verbundenen Acetateinheiten, welche nach der Verkettung zu vier Ringen cyclisiert werden (ROHR, 1992). Bei den Fridamycinen wird sekundär der abgewinkelte Ring geöffnet (Abb. 71). Die Verknüpfung mit einem Zucker erfolgt bei den Fridamycinen, im Unterschied zu den Vineomycinen, nach der Ringöffnung (IMAMURA et al., 1982; KRICKE, 1984).

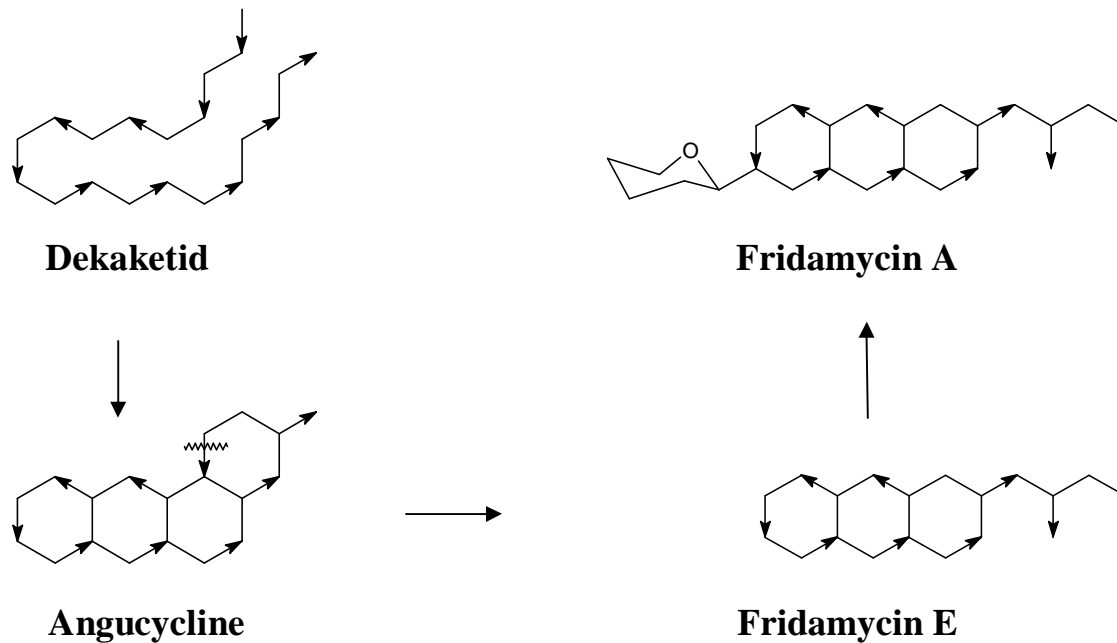


Abb. 71: Biosynthese der Angucycline und Fridamycine (KRICKE, 1984)

### 2.4.5 Biologische Wirkung

Die Komponenten 1030-A, 1030-G und 1030-J zeigten antibiotische Wirkung gegen einige Gram-positive Organismen (III.2.4.8.1). Für Metabolit 1030-G konnte zudem eine Hemmung von humanen Tumorzelllinien nachgewiesen werden, bei der die Zellen in der S-Phase arretiert wurden (III.2.4.8.4). Diese biologische Wirkung überrascht nicht, da sich unter den Angucyclinen einige Vertreter mit antibiotischer und antitumoraler Wirkung befinden. Beispiele sind das Capoamycin (HAYAKAWA et al., 1985-1), die Kerriamycine (HAYAKAWA et al., 1985-2) und die Simocyclinone (SCHIMANA et al., 2000). Besonders interessant ist, dass sich die Wirkung auch auf Zelllinien erstreckt, die gegen Anthracycline wie das klinisch relevante Doxorubicin resistent sind. Da die antitumoralen Eigenschaften aber von einer hohen Zytotoxizität begleitet sind, scheiterte bislang der Einsatz in der Medizin (ROHR & THIERICKE, 1992). Über den genauen Wirkmechanismus ist nicht viel bekannt. Es ist lediglich erwiesen, dass das Aglycon der entscheidende Strukturteil für die zytotoxische Aktivität ist (KROHN & ROHR, 1997).



## V Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 86 Actinomyceten aus der Tiefsee und der Antarktis, sowie aus basischen und sauren Böden einem vergleichenden Screening unterworfen. Die Ergebnisse wurden im Vergleich miteinander ausgewertet. Bei der weiteren Bearbeitung von drei alkalophilen und einem antarktischen Stamm konnten 15 Metabolite in Reinform isoliert werden. Von diesen Substanzen konnten bislang neun in ihrer Struktur aufgeklärt werden, sechs davon sind neue Naturstoffe.

### 1. Screening

Es konnte gezeigt werden, dass man mit einem biologischen oder einem chemischen Screening zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann, was die Beurteilung einer Organismengruppe in bezug auf die Bildung interessanter Verbindungen angeht. Im chemischen Screening waren 54 von 81 Stämmen als interessant und 26 davon als besonders bearbeitenswert eingestuft worden. 19 Stämme produzierten ausschließlich schon bekannte Naturstoffe. Im biologischen Screening waren lediglich 8 Stämme überhaupt nicht biologisch aktiv. Durch den Vergleich der Ergebnisse des biologischen und chemischen Screenings sowie unter Einbeziehung der Reproduzierbarkeit der Produktion, konnten vor allem die alkalophilen und antarktischen Organismen als eine gute Quelle für neue Naturstoffe charakterisiert werden.

### 2. Bearbeitung ausgewählter Stämme

#### 2.1 *Streptomyces* sp. AK 409

Der als *Streptomyces* identifizierte Stamm AK 409 stammt aus Stahlwerkabraum in Consett (GB). Die Bestätigung, dass es sich um einen alkalophilen Organismus handelt, erfolgte durch eine pH-statische Kultivierung.

Aus dem Kulturfiltrat konnten drei Komponenten isoliert werden, von denen eine bislang nicht identifiziert werden konnte. Bei den anderen beiden handelt es sich um Pyrrol-2-Carbonsäure, eine aus Streptomyceten bekannte Verbindung und um Pyrocoll, das bislang

nicht als Naturstoff beschrieben wurde. Über Fütterungsversuche im Schüttelkolben konnte eine Hypothese zur Biosynthese dieser Komponenten erstellt werden.

Die biologische Wirkung von Pyrocoll ist vielfältig, neben antibiotischen Eigenschaften gegen manche Gram-positive Organismen und filamentöse Pilze konnte eine schwache Hemmung der Erreger von Malaria, Chagas- und Schlafkrankheit gezeigt werden. Pyrocoll zeigt zudem außergewöhnlich gute zytotoxische Eigenschaften gegen Tumorzelllinien.

## **2.2 *Streptomyces* sp. AK 623**

Aus dem Humus des Hamsterley Forest (GB) stammt der Streptomyces AK 623. Über eine Nährlösungsvariation wurden die besten Bedingungen für einen Scale-up in den Fermenter-Maßstab ermittelt. Über eine pH-statische Kultivierung wurde bestätigt, dass es sich um einen alkalophilen Actinomyceten handelt. Aus der Kultur von AK 623 konnten drei Metabolite isoliert werden. Die Struktur von allen drei aus AK 623 isolierten Komponenten konnte aufgeklärt werden. Es handelt sich um 4-Hydroxycytalone, das bislang nur als Naturstoff aus Pilzen bekannt war, und um zwei Strukturverwandte des Lactonamycin, das schon zuvor aus Streptomyces isoliert worden war. Eine Optimierung bei der Aufreinigung der Komponente 623-D1 erhöhte die Ausbeute von 7,2 auf 56,0%.

Für die mit Lactonamycin verwandten Metabolite 623-D1 und 623-D2 konnte eine gute Wirkung gegen Gram-positive Mikroorganismen und Tumorzelllinien nachgewiesen werden. 623-D2 zeigte zudem eine schwache antivirale Wirkung. Für 4-Hydroxycytalone konnte keine biologische Wirkung nachgewiesen werden.

## **2.3 *Streptomyces* sp. AK 671**

Wie Stamm AK 623 stammt AK 671 aus dem Humus des Hamsterley Forest und wurde als *Streptomyces* identifiziert. Die Bestätigung der alkalophilen Natur des Stammes erfolgte ebenfalls über eine pH-statische Kultivierung. Über eine Nährlösungsoptimierung wurde das interessanteste Produktionsmedium für einen Scale-up in den Fermenter-Maßstab ermittelt. Aus dem Kulturfiltrat konnten fünf Substanzen in Reinform dargestellt werden. Bislang konnten drei davon in ihrer chemischen Struktur aufgeklärt werden, es handelt sich um zwei unbekannte Komponenten, eine mit dem Namen (2-Methyl-4-oxo-4H-chromen-5-

yl)acetylsäure, und um 3,8-Dihydroxy-1-Methylantrachinon-2-Carbonsäure. Eine vierte, nicht isolierte Komponente mit dem Namen Diketonaphthol konnte indirekt über Zuckerabspaltung nachgewiesen werden. Bei der vierten Substanz handelt es sich um eine bislang unbekannte Komponente. Drei der vier Substanzen sind Vorstufen oder Produkte der Anthrachinonbiosynthese.

Sämtliche Komponenten sind weder antibiotisch noch antiviral aktiv, noch schädigen sie die DNA. Aber 671-C und 671-D sind gegen Tumorzelllinien aktiv, wobei die Wirkung von 671-C die stärkere ist. Die Wachstumsinhibition bei 671-C erfolgt durch Arretierung der Zellen in der S-Phase der Zellentwicklung.

#### 2.4 *Streptomyces* sp. KC 1030

Der Streptomycet KC 1030 stammt aus einer Erdprobe, die aus dem Terra Nova Bay (Antarktis) entnommen wurde. Durch eine Nährlösungsvariation im Schüttelkolben wurde ein Einfluss des Puffers auf die Produktion nachgewiesen und ebenfalls in Schüttelkultur wurde die Produktion von 1030-B über eine Optimierung der Nährlösung und der Vorkultur in Schüttelkultur von 7,3 auf 11,6 mg/l erhöht. Durch eine pH-geregelte Kultivierung im Bioreaktor konnte ein Einfluss des pH-Wertes auf die Produktion der Metabolite gezeigt werden. Aus der Kulturbrühe von zwei Fermentationen konnten insgesamt vier Substanzen als Reinsubstanz gewonnen und der Strukturaufklärung zugeführt werden. Von diesen vier konnten bislang zwei in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Es handelt sich um Dehydro-Rabelomycin und ein völlig neuartiges Angucyclinon. Bei den zwei Metaboliten, deren Strukturaufklärung noch nicht abgeschlossen ist, handelt es sich aufgrund ihrer UV/Vis-Spektren mit hoher Wahrscheinlichkeit um Urdamycinderivate. Eine nicht isolierte Komponente konnte über HPLC-DAD als Fridamycin E identifiziert werden.

Keine der vier Substanzen war antiviral wirksam oder schädigte die DNA. Eine antibiotische Wirkung gegen manche Gram-positiven Testorganismen zeigten die Komponenten Dehydro-Rabelomycin, 1030-G und 1030-J. Für 1030-G konnte zudem eine gute Wirkung gegen humane Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Die Inhibition fand durch eine Arretierung der Zellen in der S-Phase der Zellentwicklung statt.

## VI Literatur

- ALBERT, A.: Liquid chromatography – nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chrom. A* 856: 199-211, 1999
- AMANN, R. I.; W. LUDWIG & K. H. SCHLEIFER: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169, 1995
- BACHOFEN, R.; P. FERLONI & I. FLYNN: Microorganisms in the subsurface. *Microbiol. Res.* 153: 1-22, 1998
- BAHN, Y.-S.; J.-M. PARK, D.-H. BAI, S. TAKASE & J.-H. YU: YUA001, a novel aldose reductase inhibitor isolated from alkalophilic *Corynebacterium* sp. YUA25: I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterisation. *J. Antibiot.* 51: 902-907, 1998
- BAKER, R. C.; K. WINKOWSKI & T. J. MONTVILLE: pH-controlled fermentors to increase production of leuconocin S by *Leuconostoc paramesenteroides*. *Proc. Biochem.* 31: 225-228, 1996
- BALTZ, T.; D. BALTZ, C. GIROUD & J. CROCKETT: Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *EMBO J.* 4: 1273-1277, 1985
- BAUERS, G., R. A. EDRAHA, R. EBEL, P. PROKSCH, V. WRAY, A. BERG, U. GRÄFE, C. SCHACHTELE, F. TROTZKE, G. FINKENZELLER, D. MARME, J. KLAUS, M. MUNCHBACH, M. MICHAEL, G. BRINGMANN & K. SCHAUFELMANN. Anthraquinones and betaenone derivatives from sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: novel inhibitors of protein kinases. *J. Nat. Prod.* 63: 739-745, 2000
- BÄUMLER, E.: Paul Ehrlich: Scientist for Life. Holmes and Meier, New York, 1984
- BELL, A. A. & M. H. WHEELER: Biosynthesis and functions of the fungal melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 411-451, 1986
- BELL, A. A.; R. D. STIPANOVIC & J. E. PUHALLA: Identification of (+)-scytalone as natural precursor to melanin. *Tetrahedron* 32: 1353-1356, 1976
- BENTLEY, R.: Microbial secondary metabolites play important roles in medicine; prospects for discovery of new drugs. *Perspect. Biol. Med.* 40: 364-394, 1997
- BIRCH, A.; A. HÄUSLER & R. HÜTTER: Genom rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. *J. Bact.* 172: 4138-4142, 1990
- BÉRDY, J.: Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? *Biotekhnologiya* 8: 13-34, 1995
- BLONDEAU, J. M. & D. VAUGHAN: A review of antimicrobial resistance in Canada. *Can. J. Microbiol.* 46, 867-877, 2000

- BOK, S. H., M. SEIDMAN & P. W. WOPAT: Selective isolation of acidophilic *Streptomyces* strains for glucose isomerase production. *Appl. Env. Microbiol.* 47: 1213-1215, 1984
- BRAUERS, G.; R. A. EDRADA, R. EBEL, P. PROKOSCH, V. WRAY, A. BERG, U. GRÄFE, C. SCHACHTELE, F. TOTZKE, G. FINKERNZELLER, D. MARME, J. KRAUS, M. MUNCHBACH, M. MICHEL, G. BRINGMANN & K. SCHAUMANN: Anthraquinones and betaenone derivates from the sponge-associated fungus *Microphaeropsis* sp.: novel inhibitor of protein kinases. *J. Nat. Prod.* 63: 739-745, 2000
- BRINGMANN, G.; D. MENCHE, M. BEZABIH, M. B. ABEGAZ, B. M. ABEGAZ & R. KAMINSKY: Antiplasmodial activity of knipholone and related natural phenylanthraquinones. *Plant. Med.* 65: 757-758, 1999
- BRUUN, A. F.: Deep sea and abyssal depths. *Geol. Soc. Am.* 67: 641-672, 1957
- BULL, A. T.; M. GOODFELLOW & J. H. SLATER: Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 219-252, 1992
- BULL, A. T.; A. C. WARD & M. GOODFELLOW: Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 573-606, 2000
- CANGANELLA, F.: Recent insights into the ecology of deep sea microorganisms and their potential application. *Annali Microbiol. Enzym.* 46: 65-77, 1996
- CHENG, Y.; J. HU & C. QI: Antibiotics produced by soil fungus strain C3368 from Antarctica. I. Taxonomy of strain C3368, fermentation and biological activity of antibiotics. *Zhongguo Kangshengsu Zazhi* 17: 401-403, 1992-1
- CHENG, Y.; C. QI & W. CHEN: Antibiotics from *Chrysosporium* sp. strain C3368 one of the psychophiles from Antarctica. II. Isolation and structure determination of antibiotics C3368. *Zhongguo Kangshengsu Zazhi* 17: 404-410, 1992-2
- COLQUHOUN, J. A.; J. MEXSON, M. GOODFELLOW, A. C. WARD, K. HORIKOSHI & A. T. BULL: Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek* 74, 27-40, 1998-1
- COLQUHOUN, J. A.; S. C. HEALD, L. LI, J. TAMAOKA, C. KATO, K. HORIKOSHI & A. T. BULL: Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes. *Extremophiles* 2: 269-277, 1998-2
- DAHIYA, J. S. & S. R. RIMMER: Accumulation of flavolin, 4-hydroxyscytalone and 2-hydroxyjuglone in tricyclazole-treated cultures of *Leptosphaeria maculans*. *Phytochem.* 27: 3481-3482, 1988
- DARZYNKIEWICS, Z.; S. P. CARTER, J. KAPUSCINSKI & K. A. WATANABE: Effects of derivates of chrysophanol, a new type of potential antitumor agents of anthraquinone family, on growth and cell cycle of L1210 leukemic cells. *Can. Lett.* 46: 181-187, 1989
- DELILLE D. & B. DELILLE: Field observation on the variability of crude oil impact on indigenous hydrocarbon-degrading bacteria from sub-antarctic intertidal sediments. *Marine Envir. Res.* 49: 403-417, 2000

- DELONG, E. F., D. G. FRANKS & A. A. YAYANOS: Evolutionary relationship of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Appl. Envir. Microbiol.* 63: 2105-2108, 1997
- DEMAIN, A. L.: Microbial natural products: alive and well in 1998. *Nature Biotechnol.* 16: 3-4, 1998
- DEMAIN, A. L.: Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 455-463, 1999
- DESJARDINS, R.E.; C.J. CANFIELD, D. HAYNES & J. CHULAY: Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16: 710-718, 1979
- DOWNIE, A.W & J. CRUICKHANK: The resistance of *Streptococcus faecalis* to acid and alkaline media. *Brit. J. Expil. Path.* 9: 171-173, 1928
- DRAUTZ, H.; H. ZÄHNER, J. ROHR & A. ZEECK: Metabolic products of microorganisms. 234. Urdamycines, new angucycline antibiotics from *Streptomyces fradiae*. I. Isolation, characterisation and biological properties. *J. Antibiot.* 39: 1657-1669, 1986
- ERHARD, M.; H. V. DÖHREN & P. R. JUNGBLUT: MALDI-TOF-Massenspektrometrie: Schnelles Screening und Strukturanalyse von Sekundärmetaboliten. *Biospektrum* 4: 42-46, 1998
- FAIRBAIRN, J. W. & F. J. MUHTADI: The biosynthesis and metabolism of anthraquinones in *Rumex obtusifolius*. *Pytochem.* 11: 215-2195, 1972
- FANG, J.; W. HUANG & G. SU: Antibiotic substances produced by the alkaline-resistant or basophilic actinomycetes from sea: I. Antibiotic substance 2B-B. *Zhongguo Haiyang Yaowu* 12: 3-5, 1993
- FAULKNER, D. J.: Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 19: 1-48, 2002
- FIEDLER, H.-P.: Screening for new microbial products by high-performance liquid chromatography using a photodiode array detector. *J. Chromatogr.* 316: 487-494, 1984
- FIEDLER, H.-P.: Biosynthetic capacities of actinomycetes. 1. Screening for secondary metabolites by HPLC and UV-visible absorbance spectral libraries. *Nat. Prod. Lett.* 2: 119-128, 1993
- FLOWERS, T. H. & S. T. WILLIAMS: The influence of pH on the growth rate and viability of neutrophilic and acidophilic *Streptomyces*. *Microbios* 18: 223-228, 1977
- FRANK, B. & A. STANGE: Nachweis einer bicyclischen Zwischenstufe der Anthrachinon-Biosynthese. *Liebings Ann. Chem.* 1981: 2106-2116, 1981
- FRANKLIN, T. J. & G. A. SNOW: Die Entwicklung antimikrobieller Wirkstoffe in Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft. *In: FRANKLIN, T. J. & G. A. SNOW (ed.): Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe*, pp. 1-22, Springer-Verlag, Berlin, 1973

- GAGE, J. D. & P. A. TYLER: Metabolic processes: microbial ecology, and organism and community respiration at the deep-sea bed. *In*: GAGE, J. D. & P. A. TYLER (ed.): Deep Sea Biology: a Natural History of Organisms at the Deep-Sea Floor, pp. 283-296, Cambridge University Press, Cambridge, 1991
- GAVRILESCU, M. & R. V. ROMAN: Performance of airlift bioreactors in the cultivation of some antibiotic producing microorganisms. *Acta Biotech.* 18: 201-229, 1998
- GILMORE, S. G. & J. A. HOCH: A vancomycine surprise. *Nature* 399: 524-527, 1999
- GRABLEY, S.; R. THIERICKE & I. SATTler: Tools for drug discovery: natural product-based libraries. *In*: J. MULZER & R. BOHLMAN (ed.): The Role of Natural Products in Drug Discovery, pp. 217-252, Springer-Verlag, Berlin, 2000
- GRANT, W. D.; W. E. MWATHA & B. E. JONES: Alkaliphiles: ecology, diversity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 255-270, 1990
- GREMAUD, G. & R. TABACCHI: Relationship between the fungus *Ceratocystis fimbriata coffea* and the canker disease of the coffee tree. *Phytochem.* 42: 1547-1549, 1996
- GREVER, M. R.; S. A. SCHEPARTZ & B. A. CHABNER: The national cancer institute: cancer drug discovery and development program. *Semin. Oncol.* 19: 622-638, 1992
- GROSS, G. & C. WENTRUP: Direct observation of 1-azafulven-6-one and annealed deviates. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 6: 360-361, 1982
- GURTU, A. K. & H. HEDING: Fermentation studies on elimination of carbonate form streptomycin production medium. *Hind. Antibiot. Bull.* 21: 1-10, 1978
- HAYAKAWA, Y.; T. IWAKIRI, K. IMAMURA, H. SETO & N. ŌTAKE: Studies on the isotetracenone antibiotics. I. Capoamycin, a new antitumour antibiotic. *J. Antibiot.* 38: 957-959, 1985-1
- HAYAKAWA, Y.; T. IWAKIRI, K. IMAMURA, H. SETO & N. ŌTAKE: Studies on the isotetracenone Antibiotics. II. Kerriamycins A, B and C, new antitumor antibiotics. *J. Antibiot.* 38: 960-963, 1985-2
- HALLBERG, K. B. & D. B. JOHNSON: Biodiversity of acidophilic prokaryotes. *Adv. Appl. Microbiol.* 49: 37-84, 2001
- HALLBERG, K. B.; Á. K. KOLMERT, D. B. JOHNSON & P. A. WILLIAMS: A novel metabolic phenotype among acidophilic bacteria: aromatic degradation and the potential use of these organisms for the treatment of wastewater containing organic and inorganic pollutants. *Proc. Metall.* 9A: 719-728, 1999
- HARRIS, T. M.; C. M. HARRIS & K. B. HINDLEY: Biogenetic-type syntheses of polyketide metabolites. *Fort. Chem. Org. Nat.* 31: 217-282, 1974
- HARVEY, A.: Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today* 5: 294-300, 2000

- HARVEY, A. L.: Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *TiPS* 20: 196-198, 1999
- HENKEL, T.; R. M. BRUNNE, H. MÜLLER & F. REICHEL: Statistische Untersuchung zur Strukturkomplexität von Naturstoffen und synthetischen Substanzen. *Angew. Chem.* 111: 688-691, 1999
- HÖFLE, G. & H. WOLF: Isolierung,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren und Biogenese von Resistomycin und Resistoflavin aus *Streptomyces grisoflavus* B 71 (Actinomycetales). *Liebings Ann. Chem.* 1983: 835-843, 1983
- HORIKOSHI, K.: Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment. *Curr. Op. Microbiol.* 1: 291-295, 1999
- HOWARD, B. H. & H. RAINSTRICK: Biochemistry of microorganisms. XCI. Coloring matters of *Penicillium islandicum*. 3. Skyrin and flavoskyrin. *Biochem. J.* 56: 56-65, 1954
- HU, J.; C. ZHANG, R. NA & Y. LI: Actinomycete strain C3905 producing antitumor antibiotic sandramycin from Antarctica. *Weishengwu Xuebao* 40: 646-651, 2000
- HUBER, L. & H.-P. FIEDLER: HPLC with computerised diode array detection in pharmaceutical research, *In: FONG, G. W. & S. K. LAM (ed.): HPLC in the Pharmaceutical Industry*, pp. 123-146. Marcel Dekker, New York, 1991
- HUMPHREY, A.: Shake flask to fermentor: what have we learned. *Biotechnol. Prog.* 14: 3-7, 1998
- HÜTTER, R. ; W. KELLER-SCHIERLEIN, J. NÜESCH & H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung. Scopamycine. *Arch. Mikrobiol.* 51: 264-267, 1965
- IHN, W.; S. HEINZE & U. GRÄFE: Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie: Screening und Identifizierung mikrobieller Naturstoffe. *Biospektrum* 3: 39-42, 1997
- IMAMURA, N.; K. KAKINUMA, N. IKEKAWA, H. TANAKA & S. ŌMURA: Biosynthesis of vineomycins A<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. *J. Antibiot.* 35, 602-608, 1982
- ISA, T. (Q. P. Corp., Inc.): An antioxidant isolated from callus of saffron crocus. JP 04353592, 1992
- IVANOVA, V.; M. ORIOL, M. J. MONTES, A. GARCIA & J. GUINEA: Secondary metabolites from a *Streptomyces* strain isolated from Livingston Island, Antarctica. *J. Biosci.* 56: 1-5, 2001
- IWAI, Y. & S. ŌMURA: Culture conditions for screening of new antibiotics. *J. Antibiot.* 35: 123-141, 1982
- IWASAKI, S.; H. MURO, K. SASAKI, S. NOZOE & S. OKUDA: Isolation of phytotoxic substances produced by *Pyricularia oryzae* cavara. *Tetrah. Lett.* 37: 3537-3542, 1973



- JENSEN, H. L.: *Actinomyces acidophilus* N. sp. – a group of actinomyces isolated from soil. *Soil Science* 25: 225-233, 1928
- JIANG, C.-L.; L.-H. XU, Y.-R. YANG, L.-F. WANG, Z.-W. SHI & G.-Y. GUO: A study on alkalophilic actinomycetes in Yunnan. *Actinomycetologica* 7: 58-64, 1993
- JOHNES, B. E. & W. D. GRANT: Microbial diversity and ecology of alkaline environments. *Cel. Orig. Life Extr. Habit.* 2: 179-190, 2000
- JOHNSON, D. B.: Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27: 307-317, 1998
- JORDAN, M. A.; S. MCGUINNES & C. V. PHILLIPS: Acidophilic bacteria: their potential mining and environmental applications. *Min. Eng.* 9: 169-181, 1996
- KARL, D. M.; D.F. BIRD, K. BJÖRKMAN, T. HOULIHAN, R. SHACKRLFORD & L. TULPAS: Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica. *Science* 286: 2144-2147, 1999
- KENNEDY, M. & D. KROUSE: Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23: 456-475, 1999
- KRICKE, P.: Fridamycine, Anthracyclin-analoge Antibiotika aus TÜRKEI 1989: Strukturaufklärung und Syntheseveruche. Dissertation Universität Göttingen, 1984
- KROHN, K. & W. BALTUS: Synthesis of *rac*- and *ent*- fridamycine E. *Tetrahedron* 44: 49-54, 1988
- KROHN, K. & J. ROHR: Angucyclines: total syntheses, new structures, and biosynthetic studies of an emerging new class of antibiotics. *Top. Curr. Chem.* 188: 127-195, 1997
- KRULWICH, T. A. & A. A. GUFFANTI : Alkalophilic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 435-463, 1989
- KRUPA, J.; H. LESSMAN & H. LACKNER: Ein  $\alpha$ -Methylanthrachinon aus Streptomyceten. *Liebigs Ann. Chem.* 1989: 699-701, 1989
- KUMAR, C. G. & H. TAKAGI: Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotech. Adv.* 17: 561-594, 1999
- LAWSON, P. A.; M. D. COLLINS, P. SCHUHMAN, B. J. TINDALL, P. HIRSCH & M. LABREZ: New LL-diaminopimelic acid-containing actinomycetes from hypersaline, heliothermal and meromictic Antarctic Ekho Lake: *Nocardioides aquaticus* sp. nov. and *Friedmanniella lacustris* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 219-229, 2000
- LAZZARINI, A.; L. CAVALETTI, G. TOPPO & F. MARINELLI: Rare genera of actinomycetes as producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 399-405, 2000
- LIU, W.-C.; W. L. PARKER, D. S. SLUSARCHYK, G. L. GREENWOOD, S. F. GRAHAM & E. MEYERS: Isolation, characterization and structure of rabelomycin, a new antibiotic. *J. Antibiot.* 13: 437-441, 1970

- LOHR, D.; T. BUSCHULTE & E.-D. GILLES: Continuous cultivation of *Streptomyces tendae* in different media. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 274-279, 1989
- MACEDO, J. M. B.; L. M. F. GOTTSCHALK & E. P. S. BON: Lignin peroxidase and protease production by *Streptomyces viridosporus* T7A in the presence of calcium carbonate: nutritional and regulatory carbon sources. App. Biochem. Biotech. 77-79: 735-744, 1999
- MARGESIN, R. & F. SCHINNER: Biological decontamination of oil spills in cold environments. J. Chem. Technol. Biotechnol. 77-79: 735-744, 1999
- MARING, K. W. & R. W. STEINMANN: Abgekürztes Verfahren zur Bestimmung von organischem Stickstoff mit einer Ammoniumelektrode. Chem. Rundschau 26: 27, 1980
- MATSUMOTO, N.; T. TSUCHIDA, M. MARUYAMA, R. SAWA, N. KINOSHITA, Y. HOMMA, Y. TAKAHASHI, H. IINUMA, H. NAGANAWA, T. SAWA., M. HAMADA & T. TAKEUCHI: Lactonamycin, a new antimicrobial antibiotic produced by *Streptomyces rishiriensis*. J. Antibiot. 49: 953-954, 1996
- MATSUMOTO, N.; T. TSUCHIDA, M. MARUYAMA, N. KINOSHITA, Y. HOMMA, H. IINUMA, T. SAWA., M. HAMADA & T. TAKEUCHI: Lactonamycin, a new antimicrobial antibiotic produced by *Streptomyces rishiriensis* MJ773-88K4. I. Taxonomy, fermentation, isolation physico-chemical properties and biological activities. J. Antibiot. 52: 269-275, 1999
- MATSUMOTO, T.; H. JONA, M. KATSUKI & K. SUZUKI: Efficient method for introducing vineomycin-fridamycin-type side strain chain. Total synthesis of fridamycin E. Tetrah. Lett. 32: 5103-5106, 1991
- MIKAMI, Y.; K. MIYASHITA & T. ARAI: Alkalophilic actinomycetes. J. Gen. Microbiol. 128: 1709-1712, 1982
- MIKAMI, Y.; K. MIYASHITA & T. ARAI: Diaminopimelic acid profiles of alkalophilic and alkaline-resistant strains of actinomycetes. Actinomycetes 19: 179-91, 1986
- MORITA, R. Y.: Microbial life in the deep sea. Can. J. Microbiol. 26: 1375-1385, 1980
- MORITA, R. Y. & C. E. ZOBELL: Occurrence of bacteria in pelagic sediments collected during the Mid-Pacific expedition. Deep-Sea Res. 3: 66-73, 1955
- MÜLLER, W.E.G.; A. MAIDHOF, R.K. ZAHN, H.C. SCHRÖDER, M.J. GASIC, D. HEIDEMANN, A. BERND, B. KURELEC, E. EICH & G. SEIBERT: Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogues *in vitro* and *in vivo*. Cancer Res. 45: 4822-4827, 1985
- NARA, T.; I. KAWAMOTO, R. OCKACHI & T. OKA: Source of antibiotics other than streptomyces. Jap. J. Antibiot. 30: S-174-189, 1977

- NEVES, A. A.; L. M. VIEIRA & J. C. MENEZES: Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation. *Biotech. Bioeng.* 72: 628-633, 2001
- NICHOLS, D.; J. BOWMAN, K. SANDERSON, C. M. NICHOLS, T. LEWIS, T. McMEEKIN & P. D. NICHOLS: Developments with antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Curr. Opin. Biotech.* 10: 240-246, 1999
- NOVÁK, J.; O. KOFROŇOVÁ & Z. VANĚK: Instability of the production of avermectins, sporulation, and pigmentation in *Streptomyces avermitilis*. *Can. J. Microbiol.* 39: 265-267, 1993
- PARK, Y.-H.; D.-G. YIM, E. KIM, E. KHO, T.-I. MHEEN, J. LANSDALE & M. GOODFELLOW: Classification of acidophilic, neurotolerant and neutrophilic streptomycetes by nucleotide sequencing of 5S ribosomal DNA. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2265-2269, 1991
- PASCUAL, M. E.; M. E. CARRETERO, K. V. SLOWING & A. VILLAR: Simplified screening by TLC of plant drugs. *Pham. Biol.* 40: 139-143, 2002
- PAUSLER, M. G. & P. S. RUTLEDGE: Experiments direct towards the synthesis of anthracyclonones. XXIII A synthesis of fridamycin E. *Aust. J. Chem.* 47: 2135-2147, 1994
- PLAGA, A.; STÜMPFEL, J. & H.-P. FIEDLER: Determination of carbohydrates in fermentation process by high-performance liquid chromatography. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 45-49, 1989
- QIAO, G. G.; W. MEUTERMAN, M. W. WONG, M. TRÄUBEL & C. WENTRUP: (Cyanovinyl)ketenes from azafulvenones. An apparent retro-Wolff rearrangement. *J. Am. Soc.* 118: 3852-3861, 1996
- RÄZ, B.; M. ITEN, Y. GREETHER-BÜHLER, R. KAMINSKY & R. BRUN: The Alamar blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b.rhodesiense* and *T.b.gambiense*) *in vitro*. *Acta Trop.* 68: 139-147, 1997
- REDENBACH, M. & J. ALTENBUCHER: Warum haben einige Bakterien lineare Chromosome und Plasmide? *Biospektrum* 8: 158-163, 2002
- RIDLEY, R.G.; W. HOFHEINZ, H. MATILE, C. JACQUET, A. DORN, R. MASCIADRI, S. JOLIDON, W.F. RICHTER, A. GUENZI, M.A. GIROMETTA, H. URWYLER, W. HUBER, S. THAITONG & W. PETERS: 4-Aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1846-1854, 1996
- RITHNER, C. D.; R. H. BUNGE, R. J. BLOEM & J. C. FRENCH: PD 125375, a novel metabolite coproduced with tomaymycin. *J. Org. Chem.* 52: 298-300, 1987
- RIOS, J. L.; M. C. RECIO & A. VILLAR: Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharm.* 23: 127-149, 1988

- ROHR, J.: Comparison of multicyclic polyketides by folding analyses: a novel approach to recognise biosynthetic and/or evolutionary interrelationships the natural products or intermediates and its exemplification on hepta-, okta-, and dekaketides. *J. Org. Chem.* 57: 5217-5223, 1992
- ROHR, J. & R. THIERICKE: Angucycline group antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* 9: 103-137, 1992
- SANGLIER, J. J.; E. M. H. WELLINGTON, V. BEHAL, H.-P. FIEDLER, R. E. GHORBEL, C. FINANCE, M. HACENE, A. KAMOUN, C. KELLY, D. K. MERCER, S. PRINZIS & C. TRIGO: Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Res. Microbiol.* 144: 661-663, 1993
- SANGLIER, J. J.; H. HAAG, T. A. HUCK & T. FEHR: Anti-infectives. Review of actinomycetes compounds 1990-1995. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 5: 207-223, 1996
- SANKAWA, U.; H. SHIMADA, T. SATO, T. KINOSHITA & K. YAMASAKI: Biosynthesis of scytalone. *Chem. Pharm. Bull.* 29: 3536-3542, 1981
- SARRA, M.; J. A. PEREZ-PONS, F. GODIA & C. C. ALVERO: Importance of growth form on the production of hybrid antibiotic by *Streptomyces lividans* TK21 fed-batch and continuous fermentation. *App. Biochem. Biotech.* 75: 235-248, 1999
- SATO, M.; T. BEPPU & K. ARAMA: Properties and structure of a novel peptide antibiotic No 1907. *Agric. Biol. Chem.* 44: 3037-3040, 1980
- SATO, M.; T. BEPPU & K. ARAMA: Studies on antibiotics produced at high alkaline pH. *Agric. Biol. Chem.* 47: 2019-2027, 1983
- SAUER, C.; B. HÖLDOBLER & R. GROSS: Bakterielle Endosymbionten in Insekten. *Biospektrum* 5: 359-363, 2000
- SCHATZ, A.; E. BUGIE & S. A. WAKSMAN: Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 55: 66-69, 1944
- SCHIMANA, J.; H.-P. FIEDLER, I. GROTH, R. SÜBMUTH, W. BEIL M. WALKER & A. ZEECK: Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibiotics* Tü 6040. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* 54: 779-787, 2000
- SCHRÖDER, H.C.; M. BÉGIN, R. KLÖCKING, E. MATTHES, A.S. SARMA, M. GASIC & W.E.G. MÜLLER: Avarol restores the altered prostaglandin and leukotriene metabolism in monocytes infected with human immunodeficiency virus type 1. *Virus Res.* 21: 213-223, 1991
- SCHÜGERL, K.: Comparison of the performances of stirred tank and airlift tower loop reactors. *J. Biotech.* 13: 251-256, 1990
- SCHUHMACHER, J. N.; C. R. GREEN, F. W. BEST & M. P. NEWELL: Smoke composition. An extensive investigation of the water-soluble portion of cigarette smoke. *J. Agric. Food Chem.* 25: 310-320, 1977

- SCHUHMANN, P.; H. PRAUSER, F. A. RAINEY, E. STACKEBRANDT & P. HIRSCH: *Friedmanniella antarctica* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid containing actinomycete from antarctic sandstone. *Int. J. Syst. Bact.* 47: 278-283, 1997
- SECKBACH, J.: Acidophilic microorganisms. *Cel. Orig. Life Extr. Habit.* 2: 109-116, 2000
- STROHL, R. W.: Industrial antibiotics today and in future. *In*: STROHL, R. W. (ed.): *Biotechnologie of Antibiotics*, 2<sup>nd</sup> edition, pp. 1-47, Marcel Dekker, New York, 1997
- SUZUKI, K.-I.; J. SASAKI, M. URAMOTO, T. NAKASE & K. KOMAGATA: *Cryobacterium psychophilum* gen. nov., sp. nov., nom. rev. comb. nov., an obligatory psychrophilic actinomycete to accommodate "*Curtobacterium psychophilum*" Inoue and Komagata 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 474-478, 1997
- TAKAMI, H.; A. INOUE, F. FUJI & K. HORIKOSHI: Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. *FEMS Microbiol. Lett.* 152: 279-285, 1997
- TAMURA, S.; Y. PARK, M. TORIYAMA & M. OKABE: Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferm. Bioeng.* 86: 523-528, 1997
- TSCHIRCH, A. & H. BROMBERGER: The bark of *Rhamnus cathartica*. *Arch. Pharm.* 249: 218-223, 1911
- TSYGANOV, V. A.; E. YU. E. KONEV, O. P. KAMYSHKO, I. F. RYABININ & L. A. PODOLYAN: Detection and morphological-cultural characteristics of actinomyces from Antarctic. *Mikrobiologiya* 39: 821-826, 1970
- VOLFF, J.-N. & J. ALTENBUCHNER: Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol. Microbiol.* 27: 239-246, 1998
- VOLLERT, H.; B. JORDAN & I. WINKLER: Wandel in der Wirkstoffsuche – Ultra-High-Throughput-Screening-Systeme in der Pharmaindustrie. *Transkript Laborwelt* 1: 5-10, 2000
- WEINBERG, E. G.: Roles of micronutrients in secondary metabolism of actinomycetes. *In*: SHAPIRO, S (ed.): *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*, pp. 239-261, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989
- WHITEMAN, W. B.; D. C. COLEMAN & W. J. WIEBE: Prokariotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 6578-6583, 1998
- WILLIAMS, S. T. & T. H. FLOWERS: The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic *Streptomyces*. *Microbios* 20: 99-106, 1978
- WITTE, W.: Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279: 996-997, 1998
- WANG, Z.; C. QI, W. CHEN, J. HU, X. AN & C. ZHANG: C3905 A, an antitumor antibiotic from rare actinomycete in Antarctica, isolation, properties and identification. *Zhongguo Kangshengsu Zazhi* 24: 388-391, 1999

- WOLFENDER, J.-L.; C. TERREAUX & K. HOSTETTMANN: The importance of LC-MS and LC-NMR in the discovery of new lead compounds from plants. *Pham. Biol.* 38: 41-54, 2000
- WÖFL, S.: Biochip-Technologien. *Transkript Laborwelt* 3: 12-20, 2000
- YAYANOS, A. A.: Microbiology to 10.500 meters in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 777-805, 1995
- YAYANOS, A. A.: Deep-sea bacteria. *Cel. Orig. Life Extr. Habit.* 2: 163-174, 2000
- YARBROUGH, G. G.; D. P. TAYLOR, R. T. ROWLANDS, M. S. CRAWFORD & L. L. LASURE: Screening microbial metabolites for new drugs – theoretical and practical issues. *J. Antibiot.* 46: 535-544, 1993
- YEN, G.-C.; P.-D. DUH & D.-Y. CHUANG: Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chem.* 70: 437-441, 2000
- ZÄHNER, H. & H.-P. FIEDLER: The need for new antibiotics: possible ways forward. *In: HUNTER, P. A.; G. K. DARBY & N. J. RUSSELL (ed.): Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends*, pp. 67-84, Cambridge University Press, Cambridge, 1995
- ZÄHNER, H. & W. K. MAAS: *Biology of Antibiotics*, Springer Verlag, New York, 1972
- ZOBELL, C.: Studies on the bacterial flora of marine bottom sediments. *J. Sed. Petro.* 8: 10-18, 1938

## Anhang

### Anhang

#### 1. Das chemische Screening

Stamm	Beurteilung	Identifizierte Naturstoffe	Nicht identifizierte Naturstoffe
KC 291	+	4-Hydroxyzimtsäure	Rt 4,2 min
KC 377-1	-	-	-
KC 377-2	-	-	-
KC 409	-	-	-
KC 447	(+)	Indol-3-Carbonsäure	-
KC 453	++	Antimycine Anthranilsäure	Rt 4,2 min Rt 9,4 min Rt 9,9 min Rt 10,6 min
KC 458	(+)	Indol-3-Carbonsäure	-
KC 503	-	-	-
KC 520	+	-	Rt 4,7 min Rt 5,9 min
KC 530	+	-	Rt 4,7 min (s. KC 520) Rt 5,9 min (s. KC 520)
KC 554	+	-	Rt 4,7 min Rt 5,9 min
KC 558	+	-	Rt 4,7 min (s. KC 520) Rt 5,9 min (s. KC 554)
KC 574	(+)	Anthranilsäure	-
KC 576	-	-	-
KC 582	-	-	-
KC 591	++		Rt 7,6 min Rt 8,7 min Rt 9,1 min Rt 9,3 min Rt 9,7 min Rt 10,4 min
KC 641	-	-	-
KC 643	-	-	-
KC 644	(+)	Elaiomycin	-
KC 647	(+)	Elaiomycin	-
KC 659	-	-	-

## Anhang

<b>Stamm</b>	<b>Beurteilung</b>	<b>Identifizierte Naturstoffe</b>	<b>Nicht identifizierte Naturstoffe</b>
<b>KC 674</b>	++	Antimycine	Rt 2,8 min Rt 3,8 min Rt 4,8 min Rt 6,3 min Rt 7,5 min Rt 8,9 min Rt 9,1 min Rt 9,9 min Rt 10,6 min
<b>KC 680-1</b>	+	Antimycine	Rt 7,0 min Rt 12,7 min
<b>KC 680-2</b>	+	Antimycine	Rt 9,9 min (s. KC 453) Rt 10,6 min (s. KC 453)
<b>KC 691</b>	(+)	Lumichrom	-
<b>KC 695</b>	(+)	Tetracenomycine	-
<b>KC 697</b>	-	-	-
<b>KC 775</b>	(+)	Lumichrom	-
<b>KC 780</b>	-	-	-
<b>KC 782</b>	+	-	Rt 5,6 min
<b>KC 783</b>	+	-	Rt 4,5 min Rt 4,5 min (anders) Rt 5,7 min
<b>KC 784</b>	-	-	-
<b>KC 786</b>	+	-	Rt 4,2 min
<b>KC 793</b>	+	-	Rt 4,2 min (s. KC 786)
<b>KC 1027</b>	+	6021-A	Rt 6,5 min Rt 7,0 min Rt 8,1 min
<b>KC 1030</b>	++	-	Rt 6,1 min Rt 6,7 min Rt 7,0 min
<b>KC 1031</b>	++	Polyene	Rt 3,2 min Rt 4,7 min Rt 8,5 min Rt 9,1 min Rt 9,7 min Rt 10,7 min



## Anhang

Stamm	Beurteilung	Identifizierte Naturstoffe	Nicht identifizierte Naturstoffe
<b>KC 1032</b>	++	-	Rt 4,7 min Rt 5,7 min Rt 6,9 min Rt 7,9 min Rt 8,1 min Rt 8,4 min Rt 8,7 min Rt 9,3 min Rt 9,7 min (s. KC 1031)
<b>KC 1050</b>	++	-	Rt 6,2 min Rt 6,3 min (s. KC 1030) Rt 6,9 min (s. KC 1030) Rt 6,9 min Rt 9,5 min
<b>KC 1063</b>	+	Isoflavone	Rt 8,6 min
<b>KC 1090</b>	++	-	Rt 4,7 min Rt 5,7 min Rt 6,2 min Rt 7,8 min Rt 7,9 min (s. KC 1032) Rt 8,5 min (s. KC 1031) Rt 9,3 min Rt 9,7 min (s. KC 1031)
<b>KC 1130</b>	++	-	Rt 4,7 min Rt 6,2 min Rt 6,3 min (s. KC 1030) Rt 6,9 min (s. KC 1030)
<b>JL 83</b>	+	Antimycine	Rt 2,5 min Rt 2,7 min Rt 4,2 min
<b>JL 164</b>	++	-	Rt 2,5 min (s. JL 83) Rt 2,7 min (s. JL 83) Rt 6,2 min Rt 8,8 min
<b>JL 236</b>	+	Polyene	Rt 7,5 – 8,0 min
<b>JL 256</b>	(+)	Antimycine Lumichrom	-
<b>JL 264</b>	(+)	4-Methyl-Amino-Benzoessäure	-
<b>JL 272</b>	++	Antranilsäure Dihydroxybenzolserin Tü 4105-A	Rt 3,5 min Rt 3,8 min Rt 7,1 min Rt 7,8 – 10,5 min (s. JL 236)
<b>JL 300</b>	++	Lumichrom Polyene	Rt 7,8 – 10,5 min (s. JL 236)

## Anhang

Stamm	Beurteilung	Identifizierte Naturstoffe	Nicht identifizierte Naturstoffe
<b>JL 336</b>	+	Aranchiamycine Zn-Coproporphyrin Coproporphyrin	Rt 2,8 min Rt 4,6 min
<b>JL 365</b>	+	Polyene Aranchiamycine Indolessigsäure	Rt 2,8 min (s. JL 336)
<b>JL 367</b>	+	Polyene Aranchiamycine Indolessigsäure	Rt 2,8 min (s. JL 336) Rt 3,4 min
<b>JL 415</b>	+	-	Rt 2,8 min (s. JL 336)
<b>JL 445</b>	++	Tü 4105-A Polyene Coproporphyrin	Rt 2,8 min (s. JL 336) Rt 4,6 min Rt 7,8 min Rt 9,2 min Rt 10,5 min
<b>JL 470</b>	+	Indolessigsäure Dihydroxybenzolserin Tü 4105-A	Rt 2,8 min (s. JL 336)
<b>CN 671</b>	+		Rt 2,8 min (s. JL 336) Rt 7,6 min Rt 8,1 min
<b>CN 732</b>	-	-	-
<b>AK 33</b>	+	Actinomycin D	Rt 6,1 min
<b>AK 61</b>	++	-	Rt 10,0 min Rt 10,6 min Rt 12,1 min Rt 15,3 min
<b>AK 75</b>	++	-	Rt 6,1 min Rt 6,5 min Rt 7,8 min Rt 12,1 min (s. AK 61) Rt 15,3 min
<b>AK 78</b>	++	-	Rt 7,9 min Rt 8,7 min Rt 9,5 min Rt 10,2 min
<b>AK 112</b>	++	-	Rt 10,1 min Rt 10,3 min Rt 11,0 min Rt 11,2 min Rt 11,7 min
<b>AK 149</b>	+	Polyene	Rt 11,6 min Rt 12,4 min
<b>AK 187</b>	+	Thiotetronicsäure Actinomycin D	Rt 6,2 min

## Anhang

<b>Stamm</b>	<b>Beurteilung</b>	<b>Identifizierte Naturstoffe</b>	<b>Nicht identifizierte Naturstoffe</b>
<b>AK 197</b>	++	-	Rt 10,3 min (s. AK 112) Rt 11,0 min (s. AK 112) Rt 11,7 min (s. AK 112)
<b>AK 209</b>	++	-	Rt 10,2 min Rt 11,2 min Rt 11,7 min (s. AK 112)
<b>AK 274</b>	+	-	Rt 3,4 min Rt 5,4 min
<b>AK 276</b>	+	Actinophenol	Rt 3,4 min (s. AK 274)
<b>AK 277</b>	(+)	Tirandamycin A und B	-
<b>AK 289</b>	++	-	Rt 10,0 min Rt 10,3 min (s. AK 112) Rt 11,0 min (s. AK 112) Rt 11,2 min (s. AK 112) Rt 11,7 min (s. AK 112)
<b>AK 340</b>	(+)	Chromomycin SEK 15	-
<b>AK 363</b>	++	-	Rt 3,4 min (s. AK 274) Rt 4,4 min Rt 6,4 min Rt 7,4 min Rt 8,3 min
<b>AK 382</b>	+	-	Rt 3,4 min (s. AK 274) Rt 4,4 min (s. AK 363)
<b>AK 384</b>	++	-	Rt 6,2 min Rt 11,0 min Rt 11,2 min Rt 11,7 min
<b>AK 409</b>	++	-	Rt 5,1min Rt 7,8 min (s. AK 75)
<b>AK 420</b>	-	-	-
<b>AK 473</b>	++	Zn-Coproporphyrin Coproporphyrin	Rt 8,4 min Rt 10,3 min (s. AK 112) Rt 11,0 min (s. AK 112) Rt 11,7 min (s. AK 112)
<b>AK 503</b>	-	-	-
<b>AK 532</b>	-	-	-
<b>AK 540</b>	-	-	-
<b>AK 623</b>	++	Zn-Coproporphyrin	Rt 6,2 min Rt 7,9 min
<b>AK 645</b>	-	-	-



## Anhang

Stamm	Beurteilung	Identifizierte Naturstoffe	Nicht identifizierte Naturstoffe
AK 671	++	Zn-Coproporphyrin Anthranilsäure	Rt 7,5 min Rt 7,9 min Rt 8,0 min Rt 8,6 min Rt 9,5 min Rt 10,6 min
AK 686	-	-	-
AK 698	++		Rt 9,0 min Rt 9,6 min Rt 10,6 min
AK 713	-	-	-

- keine SM      (+) = bekannte SM      + = wenig nicht bekannte SM      ++ = viele nicht bekannte SM  
SM= Sekundärmetabolite

### 1. Das biologische Screening

Stamm	Gram positive Bakterien	Gram negative Bakterien	Pilze
KC 291	+	-	++
KC 377-1	-	-	+
KC 377-2	-	-	++
KC 409	+	-	++
KC 447	+	-	++
KC 453	+	-	++
KC 458	+	-	-
KC 503	+	-	-
KC 520	-	-	-
KC 530	+	-	-
KC 554	+	-	-
KC 558	+	-	-
KC 574	+	-	-
KC 576	+	-	-
KC 582	-	-	-
KC 591	++	-	++
KC 641	-	-	-
KC 643	-	-	-
KC 644	++	++	-
KC 647	++	++	-
KC 659	+	-	-
KC 674	++	-	++
KC 680-1	++	-	++

## Anhang

<b>Stamm</b>	<b>Gram positive Bakterien</b>	<b>Gram negative Bakterien</b>	<b>Pilze</b>
<b>KC 680-2</b>	++	-	++
<b>KC 691</b>	+	-	++
<b>KC 695</b>	+	-	-
<b>KC 697</b>	+	-	-
<b>KC 775</b>	+	-	-
<b>KC 780</b>	+	-	-
<b>KC 782</b>	+	-	++
<b>KC 783</b>	+	-	-
<b>KC 784</b>	++	-	-
<b>KC 786</b>	+	-	-
<b>KC 793</b>	+	-	-
<b>KC 1027</b>	++	-	-
<b>KC 1030</b>	++	-	-
<b>KC 1031</b>	+	-	-
<b>KC 1032</b>	++	-	-
<b>KC 1050</b>	++	-	-
<b>KC 1063</b>	+	-	-
<b>KC 1090</b>	+	-	-
<b>KC 1130</b>	++	-	-
<b>JL 83</b>	-	-	++
<b>JL 164</b>	-	-	-
<b>JL 235</b>	++	++	++
<b>JL 256</b>	+	-	++
<b>JL 264</b>	+	-	++
<b>JL 272</b>	++	++	-
<b>JL 300</b>	++	++	++
<b>JL 336</b>	++	-	-
<b>JL 365</b>	++	-	-
<b>JL 367</b>	++	-	-
<b>JL 415</b>	-	-	-
<b>JL 445</b>	+	-	-
<b>JL 470</b>	+	+	-
<b>CN 671</b>	+	-	-
<b>CN 732</b>	-	-	-
<b>AK 33</b>	++	-	++
<b>AK 61</b>	+	-	++
<b>AK 75</b>	++	-	++
<b>AK 78</b>	+	-	+
<b>AK 112</b>	++	-	++
<b>AK 149</b>	++	-	-
<b>AK 187</b>	++	-	+

## Anhang

<b>Stamm</b>	<b>Gram positive Bakterien</b>	<b>Gram negative Bakterien</b>	<b>Pilze</b>
<b>AK 197</b>	+	-	++
<b>AK 209</b>	+	-	++
<b>AK 274</b>	+	-	-
<b>AK 276</b>	++	-	++
<b>AK 277</b>	++	-	++
<b>AK 289</b>	+	-	++
<b>AK 340</b>	++	-	-
<b>AK 363</b>	++	-	-
<b>AK 382</b>	++	-	++
<b>AK 384</b>	++	-	-
<b>AK 409</b>	++	-	++
<b>AK 420</b>	++	-	++
<b>AK 473</b>	++	-	++
<b>AK 503</b>	+	-	++
<b>AK 532</b>	+	-	-
<b>AK 540</b>	+	-	++
<b>AK 623</b>	++	-	-
<b>AK 645</b>	+	-	-
<b>AK 671</b>	+	-	-
<b>AK 686</b>	-	-	-
<b>AK 698</b>	+	-	-
<b>AK 713</b>	+	-	++

- kein Hemmhof

+ = Hemmhof  $\leq 12$  mm

++ = Hemmhof  $> 12$  mm

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Anke Dieter  
Geburtsdatum und Ort: 07.05.1973 in Mannheim  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Ausbildung:**

1979 - 1983 Grundschole in Mannheim-Rheinau  
1983 - 1993 Liselotte-Gymnasium Mannheim  
1993 - 1999: Diplomstudiengang Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
1998 – 1999: Diplomarbeit an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. H.-P. Fiedler  
1999 – 2002: Promotion an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. H.-P. Fiedler

### **Studienschwerpunkte:**

Prüfungsfächer: Mikrobiologie  
Parasitologie  
Humanphysiologie

Diplomarbeit: „Untersuchung des Metabolitenspektrums von Streptomyceten in Feststoffkultur“

Promotionsarbeit: „Screening nach Naturstoffen aus acidophilen und alkalophilen Streptomyceten, sowie Actinomyceten aus der Antarktis und der Tiefsee“



Im Selbstverlag herausgegeben von:

Anke Dieter

Brunnenstr.20

72074 Tübingen