

Bernburg
Dessau
Köthen



Hochschule Anhalt
Anhalt University of Applied Sciences

**FB Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik (BWP)**

Thema:

Optimierung der Extraktion von Naturstoffen aus Bodenbakterien
und filamentösen Pilzen

Bachelorarbeit

Zur Erlangung des akademisches Grades
Bachelor of Science
(B.Sc.)

Von: Sarah Elisabeth Müller
Geboren am: 27.05.1993

Studiengang: Biotechnologie

Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Meusel
Prof. Dr. Reinhard Pätz

Köthen, den 25.09.2014

Bibliografische Angaben und Zusammenfassung

MÜLLER, Sarah: Optimierung der Extraktion von Naturstoffen aus Bodenbakterien und filamentösen Pilzen, Hochschule Anhalt, Biotechnologie, Bachelorarbeit, 2014, 94 Seiten, 27 Quellen, 13 Seiten Anhang

Der Begriff der Aufarbeitung beschreibt die verfahrenstechnischen Grundoperationen zur Isolierung des im Fermenter enthaltenen Wertproduktes. Bei der mikrobiellen Herstellung verschiedenster Produkte ist die Aufarbeitung aber der kosten- und arbeitsintensivste Faktor, so dass Optimierungen hinsichtlich der Effizienz wichtig sind. Die vorliegende Arbeit wurde im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung angefertigt. Die Arbeitsgruppe Mikrobielle Wirkstoffe beschäftigt sich mit der Suche nach neuen antibiotisch wirkenden Sekundärmetaboliten aus Bodenbakterien und filamentösen Pilzen. Die Feststoff- Flüssig- Extraktion wird dabei zur Isolierung der Sekundärmetabolite genutzt. Das Myzel wird standardmäßig im Labormaßstab mit einer 30-minütigen Extraktion im Ultraschallbad behandelt. Die durchgeführten Versuche zeigen jedoch, dass andere Methoden des Leistungseintrages weniger Zeit beanspruchen, höhere Substanzausbeuten hervorbringen können und geringere Lösungsmittelvolumen zur Extraktion der Sekundärmetabolite genutzt werden können. Doch neben den genannten Vorteilen zeigte sich auch, dass der Verschmutzungsgrad mit intrazellulären Substanzen durch den mechanischen Energieeintrag zunehmen kann. Die Vor- und Nachteile der anzuwendenden Methoden müssen deshalb im Einzelfall untersucht und abgewogen werden. Neben der Feststoff- Flüssig- Extraktion des Myzels spielt auch die Extraktion eines standardmäßig eingesetzten Adsorberharzes XAD16 in der Arbeitsgruppe MWIS eine große Rolle. Dies wird zur Adsorption der Sekundärmetabolite aus der Fermentationsbrühe oder Überstand genutzt, nach der Fermentation mittels Filtration abgeerntet und anschließend extrahiert. Für diesen Schritt wurden verschiedene Downstreammethoden mit unterschiedlichen Lösungsmittelvolumen und Extraktionszeiten hinsichtlich der Substanzausbeute untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Festbettextraktion mit einer durchschnittlichen Erhöhung der Substanzausbeute von 250% die Aufarbeitung verbessern kann.

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Dr. Marc Stadler und Herrn Dipl. Ing. Wolfgang Kessler danken für die Möglichkeit meine Bachelorarbeit unter ihrer Verantwortung anfertigen zu dürfen. Ich konnte mit der Arbeit viel Erfahrung sammeln und das im Studium erlernte Wissen vertiefen.

Einem besonderen Dank gilt auch Herrn Dipl. Ing. Steffen Bernecker mit dessen Hilfe ich die Herausforderungen meistern konnte und der mir mit Rat und Tat stets zur Seite stand. Auch Amelie Beckmann und Marc Allenstein danke ich für ihre Ratschläge und Hilfe.

Einem nicht unerheblichen Dank gilt auch den technischen Assistenten Axel, Reinhard, Burkhard und Andrew die mir gezeigt haben, mich im Labor zurechtzufinden und eine angenehme Arbeitsatmosphäre schafften.

Frau Dr. Katrin Wittstein und Frau Dr. Jutta Niggemann danke ich für die Hilfe bei chemischen Fragestellungen und Herrn M.S. Erik Kuhnert und Frau Philine Wotsch für die Hilfe bei dem Umgang mit Pilzkulturen. Auch Silke, Cäcilia und den vielen weiteren Arbeitskollegen in der Arbeitsgruppe MWIS danke ich für ihre Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freund Tobias danken, dass sie mir immer Rückhalt während des gesamten Studiums gegeben haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	3
2.1 Verwendete Stämme.....	3
2.1.1 <i>Streptomyces</i> JCB7731.....	3
2.1.2 <i>Hypoxylon rickii</i> MUCL 53309	4
2.1.3 <i>Chitinophaga sancti</i> FX7914	5
2.2 Extraktion von Metaboliten	6
2.3 Verwendete Lösemittel.....	8
2.4 Adsorberharz Amberlite® XAD16	9
3. Methoden.....	11
3.1 Vorgehensweise zur Herstellung des Extraktionsguts	11
3.1.1 Anzucht <i>Streptomyces</i> JCB7713.....	11
3.1.2 Anzucht <i>Hypoxylon rickii</i> MUCL 53309	13
3.1.3 Anzucht <i>Chitinophaga sancti</i> FX7914.....	14
3.2 Versuche zur Optimierung der Extraktion von Biomasse.....	18
3.2.1 Ausgangsmethodik zur Extraktion von Biomasse	19
3.2.2 Versuch 1: Vergleich Extraktion frischer Biomasse und aufgetauter Biomasse ...	20
3.2.3 Versuch 2: Extraktionskinetik Ultraschallbad	20
3.2.4 Versuch 3: Extraktionskinetik Magnetrührstab.....	21
3.2.5 Versuch 4: Extraktionskinetik Dispergierstab.....	21
3.2.6 Versuch 5: Volumenvariation Aceton Ultraschallbad	22
3.2.7 Versuch 6: Extraktionskinetik Schüttler	22
3.2.8 Versuch 7: Variation des Leistungseintrages Dispergierstab	22
3.2.9 Versuch 8: Variation der Leistungseintrag Dispergierstab +10 min Einwirkung ...	22

3.2.10	Versuch 9:Volumenvariation Aceton Dispergierstab	23
3.2.11	Versuch 10: Stufenextraktion der Fest-Flüssig-Extraktion	23
3.2.12	Versuch 11: Extraktion 50g Biomasse.....	23
3.2.13	Versuch 12: Extraktion mit 80% Aceton+ 20 % deionisiertem Wasser.....	23
3.3	Versuche zur Optimierung der Extraktion des Adsorberharzes	24
3.3.1	Standardaufarbeitung zur Extraktion der Elansolide.....	24
3.3.2	Versuch 1: Ermittlung der rel. Standardabweichung.....	25
3.3.3	Versuch 2: Extraktionskinetik ohne Leistungseintrag.....	25
3.3.4	Versuch 3: Extraktionskinetik Schüttler	25
3.3.5	Versuch 4: Extraktionskinetik Ultraschallbad	25
3.3.6	Versuch 5: Festbett-Extraktion	25
3.4	Analytische Messungen	27
3.4.1	UV/VIS-Spektroskopie.....	28
3.4.2	Massen-Spektroskopie.....	28
4.	Ergebnisse & Diskussion der Aufarbeitungsmethoden	30
4.1	Versuche zur Aufarbeitung des Myzels von <i>Streptomyces</i> JCB7713.....	30
4.1.1	Versuch 1: Vergleich frische und eingefrorene Biomasse.....	31
4.1.2	Versuch 2: Extraktionskinetik Ultraschallbad	32
4.1.3	Versuch 3: Extraktionskinetik Magnetührstab	33
4.1.4	Versuch 4: Extraktionskinetik Dispergierstab + Schüttler.....	33
4.1.5	Versuch 5: Variation des Lösungsmittelvolumens Aceton im Ultraschallbad	34
4.1.6	Versuch 6: Extraktionskinetik Schüttler	35
4.1.7	Versuch 7+ 8: Variation Leistungseintrag Dispergierstab + Variation Leistungseintrag Dispergierstab + 10 minütiger Einwirkung	36
4.1.8	Versuch 9: Volumenvariation Aceton Dispergierstab	37
4.1.9	Versuch 10: Stufenextraktion	38
4.1.10	Versuch 11: Extraktion 50g Biomasse.....	39

4.1.11	Versuch 12: Extraktion mit 80 % Aceton+ 20 % deionisiertem Wasser.....	39
4.1.12	Methodenvergleich und deren Bewertung	40
4.2	Versuch zur Aufarbeitung des Myzels von <i>Hypoxylon rickii</i> MUCL 53309.....	43
4.2.1	Versuch 1: Vergleich Extraktion frischer und aufgetauter Biomasse.....	44
4.2.2	Versuch 2: Extraktionskinetik Ultraschallbad	45
4.2.3	Versuch 3: Extraktionskinetik Magnetrührer	46
4.2.4	Versuch 4: Extraktionskinetik Dispergierstab + Schüttler.....	46
4.2.5	Versuch 7: Variation Einwirkung Dispergierstab	47
4.2.6	Versuch 12: Extraktion mit 80% Aceton und 20% deionisiertem Wasser.....	48
4.2.7	Methodenvergleich.....	49
4.3	Fehlerbetrachtung der Biomasseaufarbeitung	50
4.4	Versuche zur Aufarbeitung des Adsorberharzes XAD16	53
4.4.1	Versuch 1: Ermittlung der relativen Standardabweichung	54
4.4.2	Versuch 2: Extraktionskinetik ohne Leistungseintrag.....	54
4.4.3	Versuch 3: Extraktionskinetik Schüttler	56
4.4.4	Versuch 4: Extraktionskinetik Ultraschallbad	57
4.4.5	Versuch 5: Festbettextraktion.....	59
4.4.6	Methodenvergleich.....	60
5.	Fazit und Ausblick	61
5.1	Aufarbeitung der Biomasse	61
5.2	Aufarbeitung des Adsorberharzes XAD16	64
6.	Literaturverzeichnis	a
7.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	A
8.	Anhang.....	- 1 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der neu eingeführten Antibiotikaklassen	1
Abbildung 2: Foto Streptomyces JCB771	3
Abbildung 3: Strukturformeln und Molekulargewichte der Phenelfamycine a-f.....	4
Abbildung 4: Hypoxylon rickii.....	4
Abbildung 5: Fruchtkörper unbekannter Hypoxylon-Arten auf Holz“	5
Abbildung 6: Chitinophaga sancti FX7914.....	5
Abbildung 7: Strukturformel Aceton	8
Abbildung 8: Strukturformel Ethylacetat.....	9
Abbildung 9: Adsorberharz XAD16.....	10
Abbildung 10: Rührwerk im 70L-Fermenter	12
Abbildung 11: Rührerelement des Intermig-rührwerk.....	12
Abbildung 12: Zentrifuge	13
Abbildung 13: 15L-Glasfermenter.....	14
Abbildung 14: Bioreaktor	17
Abbildung 15: Bioreaktor	17
Abbildung 16: Ablaufschema Grundmethodik (Dunkelgrün) mit Variationen (hellgrün)	19
Abbildung 17: Schematische Darstellung Extraktion im Scheidetrichter	20
Abbildung 18: Magnetrührstab.....	21
Abbildung 19: Dispergierstab.....	22
Abbildung 20: Übersicht Versuche	24
Abbildung 21: Aufbau Festbett-Extraktion.....	26

Abbildung 22: Diagramm Gradientenelution (Quelle: Müller 2014)	28
Abbildung 23: Aufbau des Massenspektrometers amaZon Spped™	29
Abbildung 24: Chromatogramm Rohextrakt Streptomyces JCB7713.....	30
Abbildung 25: Diagramm Vergleich der rel. Peakflächen von frischer und aufgetauter Biomasse Streptomyces JCB7713.....	31
Abbildung 26:Extraktionskinetik Ultraschallbad Streptomyces JCB7713	32
Abbildung 27:Extraktionskinetik Magnetrührstab Streptomyces JCB7713	33
Abbildung 28: Extraktionskinetik Dispergierstab Streptomyces JCB7713	34
Abbildung 29: Volumenvariation Lösungsmittel Streptomyces JCB7713	35
Abbildung 30: Extraktionskinetik Schüttler Streptomyces JCB7713.....	36
Abbildung 31: Diagramm verschiedene Dispergierzeiten + 10 min Schütteln Streptomyces JCB7713	37
Abbildung 32: Diagramm verschiedene Dispergierzeiten Streptomyces JCB7713.....	37
Abbildung 33: Volumenvariation Aceton mit Dispergierstab Streptomyces JCB7713.....	38
Abbildung 34: Stufenextraktion des Myzels Streptomyces JCB7713	38
Abbildung 35: Scale-Up Verhältnis 1:10 Streptomyces JCB7713	39
Abbildung 36: Vergleich der Extraktionen mit einem Lösungsmittel und einem Lösungsmittelgemisch Streptomyces JCB7713.....	40
Abbildung 37: Vergleich Extraktionsmethoden Peak 1 Streptomyces JCB7713	40
Abbildung 38: Vergleich Extraktionsmethoden Peak 3 Streptomyces JCB7713	40
Abbildung 39: Vergleich Extraktionsmethoden Peak 5 Streptomyces JCB7713	41
Abbildung 40: Methodenvergleich zur Aufarbeitung des Streptomyces JCB7731	42
Abbildung 41: Chromatogramm Myzelextrakt Hypoxylon rickii MUCL 53309	44
Abbildung 42: Vergleich Extraktion frischer und aufgetauter Biomasse H. rickii MUCL 53309 ..	45

Abbildung 43: Extraktionskinetik Ultraschallbad <i>H. rickii</i> MUCL 53309	45
Abbildung 44: Extraktionskinetik magnetrührer <i>H. rickii</i> MUCL 53309.....	46
Abbildung 45: Extraktionskinetik Dispergierstab + Schüttler <i>H. rickii</i> MUCL 53309	47
Abbildung 46: Variation Einwirkung Dispergierstab	48
Abbildung 47: Extraktion mit binären Lösungsmittelgemisch <i>H. rickii</i> MUCL 53309	49
Abbildung 48: Methodenvergleich Peak 1	49
Abbildung 49: Methodenvergleich Peak 3	49
Abbildung 50: Methodenvergleich Peak 7	50
Abbildung 51: Abweichungen Extraktionen Biomasse	52
Abbildung 52: Chromatogramm Extrakt <i>Chitinophaga sancti</i> FX7914.....	53
Abbildung 53: Aufarbeitung 3 gleicher Proben XAD16	54
Abbildung 54: Extraktionskinetik XAD16 ohne Leistungseintrag 5ml Lösungsmittelvolumen	55
Abbildung 55: Extraktionskinetik XAD16 ohne Leistungseintrag 10ml Lösungsmittelvolumen ..	55
Abbildung 56: Extraktionskinetik XAD16 ohne Leistungseintrag 20ml Lösungsmittelvolumen ..	55
Abbildung 57: Extraktionskinetik XAD16 Schüttler 5ml Lösungsmittel	56
Abbildung 58: Extraktionskinetik XAD16 Schüttler 10ml Lösungsmittel	56
Abbildung 59: Extraktionskinetik XAD16 Schüttler 20ml Lösungsmittel	57
Abbildung 60: Extraktionskinetik XAD16 Ultraschallbad 5 ml Lösungsmittel	58
Abbildung 61: Extraktionskinetik XAD16 Ultraschallbad 10 ml Lösungsmittel	58
Abbildung 62: Extraktionskinetik XAD16 Ultraschallbad 20ml Lösungsmittel	58
Abbildung 63: Werte der Festbettextraktion XAD16.....	59
Abbildung 64: Methodenvergleich Aufarbeitung XAD-Proben.....	60

Abbildung 65: Aufarbeitungsschritte	63
Abbildung 66: Kultur	64
Abbildung 67: Schematischer Aufbau Modul Nassmühle.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Rezept Medium M1	11
Tabelle 2: Rezept Reaktormedium	11
Tabelle 3: Rezept Medium YM6.3	13
Tabelle 4: Rezept Medium M/H	15
Tabelle 5: Rezept T5-1/X.....	15
Tabelle 6: Verwendete Geräte und deren Hersteller.....	A
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller	B

Abkürzungsverzeichnis

AU	adsorbance units
C	Konzentration
°C	Grad Celcius
DAD	Dioden-Array-Detektor
DSP	Downstream Processing
g_D	Diffusionsgeschwindigkeit

HPLC	high performance liquid chromatography
HPLC-MS	high performance liquid chromatography - mass spectrometry
Kg	Kilogramm
konst.	konstant
L	Liter
m	Meter
MWIS	Arbeitsgruppe Mikrobielle Wirkstoffe
NL	Normluft
RSD	relative standard deviation
s	Sekunde
rpm	rounds per min
Δx	Standardabweichung
\bar{x}	empirische Mittelwert
x_i	Merkmalsausprägung am i-ten Element der Stichprobe
n	Stichprobenumfang

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung Diffusionsgeschwindigkeit.....	6
Formel 2: Berechnung Diffusionsgeschwindigkeit 2. Möglichkeit.....	7
Formel 3: Ermittlung der Standardaufarbeitung	31

1. Einleitung

Die mikrobielle Herstellung verschiedenster Produkte wird heutzutage in vielen Anwendungsbereichen genutzt. Neben Produkten wie Bier und Wein in der Genussmittelindustrie, Zitronensäure und Glutamat in der Lebensmittelindustrie spielen fermentierte Produkte ebenso in der Pharmabranche eine große Rolle. Als ein Meilenstein der heutigen Medizin zählt dazu die Entdeckung antibiotisch wirkender Substanzen, die durch Mikroorganismen gebildet werden. Rund 32 % der heutzutage klinisch eingesetzten Antibiotika sind Naturstoffe oder semisynthetische Derivate. Diese werden für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten genutzt, doch finden sie auch Anwendung in Krebstherapien, als Immunsuppressiva und zur Senkung des Cholesterinspiegels. (Sahm 2013, S.150)

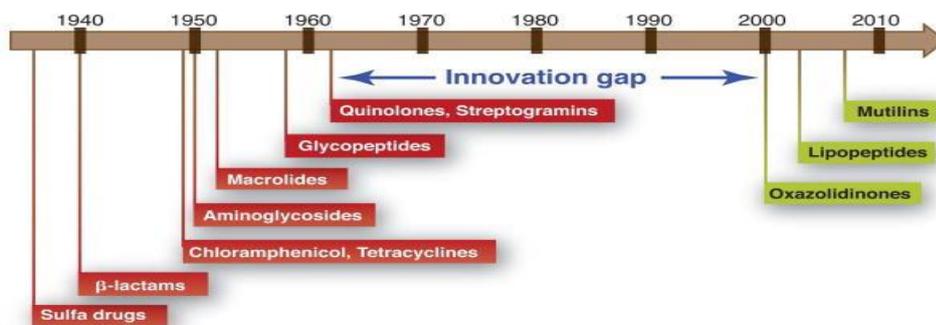


ABBILDUNG 1: ZEITLICHER VERLAUF DER NEU EINGEFÜHRTEN ANTIBIOTIKAKLASSEN (FISCHBACH, 2009)

Wie aus der Abbildung 1 hervorgeht, könnte ein Grund für das zunehmende Problem der Resistenzen sein, dass seit 1960 kaum an neuen antibiotischen Wirkstoffklassen geforscht worden ist. Nach den Entdeckungserfolgen in den sechziger Jahren entwickelte man nur verschiedene Derivate als Ergänzung zu den bereits bekannten Klassen. (Fischbach 2009)

Aus diesem Grund wird es immer wichtiger, möglichst zeitnah neue Antibiotika zu finden und diese auf dem pharmazeutischen Markt zu etablieren. Das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung hat es sich daher in der Abteilung Mikrobielle Wirkstoffe (MWIS) zur Aufgabe gemacht, nach neuen antibiotisch wirkenden Sekundärmetaboliten aus Bodenbakterien (Myxobakterien und Aktinomyceten) und filamentösen Pilzen zu suchen. Dafür werden verschiedene Methoden entwickelt, um diese aus Habitatproben als Reinkultur zu isolieren, ein Screening nach neuen Sekundärmetaboliten durchzuführen und deren chemische Struktur

aufzuklären. Zudem besitzt die Abteilung MWIS ein Biotechnikum, in welchem die neuen Substanzen in einem Maßstab bis zu 2000 l produziert und aufgearbeitet werden können.

Der Begriff der Aufarbeitung beschreibt die verfahrenstechnischen Grundoperationen zur Isolierung des im Fermenter enthaltenen Wertproduktes. Ziel ist es, dieses Produkt in möglichst hoher Qualität, hoher Ausbeute und in einer geeigneten Konfektionierung zu erhalten. Dabei spielt jedoch auch der ökonomische Effekt eine große Rolle. In der Aufarbeitung spiegeln sich oft 30-50 % der Produktionskosten wieder (Sahm 2013, S.21), sodass es ein hohes Maß an Zusammenarbeit von Biologen, Verfahrenstechnikern und Chemikern bedarf, um das Produkt in möglichst effizienter Weise herzustellen. Im „Downstream Processing“, kurz DSP, wie die Aufarbeitung auch genannt wird, wird in der Regel nach folgenden Schritten vorgegangen:

1. Zellernte
2. Zellaufschluss (falls nötig)
3. Produktgewinnung und Konzentrierung
4. Produktreinigung
5. Konfektionierung

In dieser Bachelorarbeit soll eine Optimierung der Produktgewinnung erprobt werden. Die Effektivität verschiedener Extraktionsmethoden zur Gewinnung von Sekundärmetaboliten wird hinsichtlich unterschiedlicher Ziele des Downstream-Prozess beurteilt. Eine wichtige Rolle spielt dabei vor allem die Erhöhung der Extraktionsausbeute des Wertproduktes im möglichst ökonomischsten Verhältnis zum Lösemittelverbrauch und Arbeitsaufwand. Die zuvor angefertigte Praktikumsarbeit von Müller 2014 beschreibt die Ausgangsmethodik zur Aufarbeitung der Biomasse. Dort erfolgte eine intensive Fehlerbetrachtung der Standardmethodik und es wurden mehrere Organismen auf die Bildung von Sekundärmetaboliten hin überprüft. Ausgewählt für die Versuche zu den Extraktionsprozessen wurde der filamentöse Pilz *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 und das Bodenbakterium *Streptomyces* JCB7713. Die Aufarbeitung des Myzels soll durch die Variation von Extraktionszeiten, Leistungseinträgen, Lösemittelvolumen und mehreren Extraktionsstufen verbessert werden. Weiterhin soll die Feststoff- Flüssig- Extraktion des hydrophoben Adsorberharzes XAD16 untersucht werden. Zurzeit werden verschiedene Aufarbeitungsmethoden für die Desorption der Sekundärmetabolite in der Arbeitsgruppe MWIS genutzt. Daher ist es ein weiteres Ziel dieser Arbeit aufzuzeigen, ob es Unterschiede in der Effektivität zwischen diesen Methoden gibt. Die quantifizierten Substanzen der Versuche gehören zur Naturstoffgruppe der Elansolide und wurden mit der Fermentation des Bakteriums *Chitinophaga sancti* FX7914 produziert.

2. Grundlagen

2.1 Verwendete Stämme

2.1.1 *Streptomyces* JCB7731

Der gram-positive Stamm *Streptomyces* JCB 7713 (Abbildung 2) gehört zu der Klasse der Actinobacteria und bildet unter aeroben Bedingungen ein dichtes Myzel sowie teilweise Sporen aus. Eine Besonderheit der Gattung *Streptomyces* ist, dass sie eine große Diversität an Sekundärmetaboliten hervorbringen. Rund 50 %, die auf naturstoffbasierten therapeutisch eingesetzten Antibiotika, werden aus der Gattung *Streptomyces* gewonnen (*Tamehiro et al., 2003*).

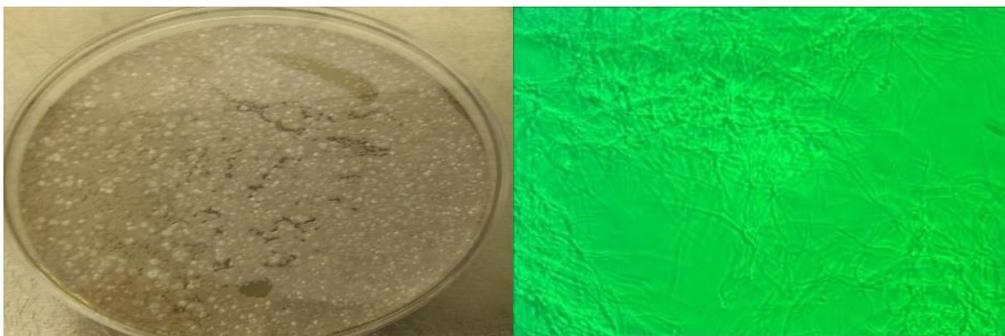


ABBILDUNG 2: FOTO *STREPTOMYCES* JCB7713; LINKS AUF GYM-MEDIUM; RECHTS UNTERM MIKROSKOP (400-FACHE VERGRÖßERUNG)

Ein Grund für die vielfältige Bildung der Naturstoffe der *Streptomyces*-Arten könnte sein, dass ein Großteil der 2500 Spezies Bodenbakterien sind und daher stets in Konkurrenz mit vielen anderen Bakterien und Pilzen zusammenleben. Die Produktion der antibiotischen Wirkstoffe könnte daher zur Abwehr dienen. (*Müller & Wink 2013*) In der Biotechnologie setzt man sie auch aufgrund ihrer guten extrazellulären Transportmöglichkeiten zur heterologen Expression von Proteinen aus Eukaryonten ein.

In dieser Bachelorarbeit wird einerseits die Quantifizierung der Extraktionsausbeute anhand der Naturstoffgruppe der Phenelfamycine durchgeführt. Diese Substanzen gehören zu der Stoffgruppe der antibiotisch wirkenden Elfamycine und wirken besonders inhibierend auf anaerobe, gram-positive Bakterien. Sie werden bereits wegen des wachstumsfördernden Effektes in der Tierhaltung eingesetzt. (*Swanson et al 1989*) Phenelfamycine lassen sich in der

Fermentationsbrühe und Myzel finden. In der nachfolgenden Abbildung 3 sind die Strukturformeln mit den zugehörigen Molekulargewichten der Phenelfamycine dargestellt:

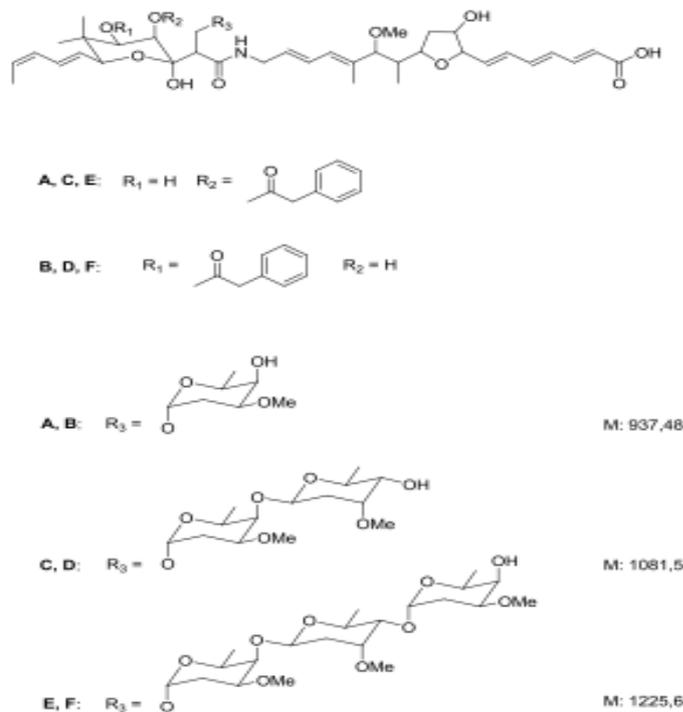


ABBILDUNG 3: STRUKTURFORMELN UND MOLEKULARGEWICHTE DER PHENELFAMYCINE A-F (QUELLE: HOCHLOWSKI ET AL. 1988)

2.1.2 *Hypoxylon rickii* MUCL 53309



ABBILDUNG 4: HYPOXYLON RICKII AUF YM.6.3-AGARPLATTE MIT AUSGESCHNITTENEN GELSTÜCKEN

Der *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 (Abbildung 4) wird zu den Schlauchpilzen gezählt, da er Sporen in Asci bildet. 75 Gattungen gehören zu der Familie der *Xylariaceae*, wovon *Hypoxylon spp.* die artenreichste ist. (Whalley 1998). Die Familie ist global verteilt, doch besitzt sie die größte Vielfalt in den Tropen. Da Pilze nicht in der Lage sind, sich autotroph zu ernähren, bilden die *Xylariaceae* als fakultative Saprobionten oder als fakultative Parasiten Fruchtkörper auf Holz (Abbildung 5) und absorbieren so die nötigen Nährstoffe. (Ju & Rogers 1996) Eine Besonderheit der *Xylariaceae* ist die Bildung vieler verschiedener Sekundärmetabolite, die in der Regel biologisch aktiv sind und somit einen Nutzen für den Menschen darstellen könnten. Mehr als 500 verschiedene Stoffe wurden bereits

entdeckt und auch weiterhin wird nach neuen Naturstoffen der *Xylariaceae* gesucht. (Stadler 2007)



ABBILDUNG 5: FRUCHTKÖRPER UNBEKANNTER HYPOXYLON-ARTEN AUF HOLZ; QUELLE: JU,Y-M ; INTERNETSEITE: „THE GENUS HYPOXYLON“

2.1.3 *Chitinophaga sancti* FX7914

Die Versuche zur Optimierung der Feststoff-Flüssig-Extraktion von dem Adsorberharz XAD 16 werden mit der Betrachtung der Sekundärmetabolite der Elansolide durchgeführt. Dieses wird vom Bakterium *Chitinophaga sancti* FX7914 gebildet, der zur Familie der *Cytophagaceae* gehört. Die gram-negativen Bakterien lassen sich vor allem in Boden-oder Wasserhabitaten finden, wo ein großes Vorkommen an organischen Material ist, da sie dieses als Nahrungsgrundlage verwenden. (Lewin 1969) Die Zellen besitzen ein hohes Maß an Flexibilität und durch eine gleitende Bewegung sind sie auf Oberflächen motil, in Flüssigkulturen jedoch unbeweglich. Die Morphologie verändert sich je nach Wachstumsstadium (Abbildung 6). So sehen jüngere Kulturen aus wie lange Fäden und ältere Kulturen wie kurze Stäbchen. Im Gegensatz zur Gruppe der oben genannten Phenelfamycinen wirken Elansolide sich auch auf gram-positive Humanpathogene aus und könnte daher in der Zukunft als Therapeutika für Menschen eingesetzt werden.

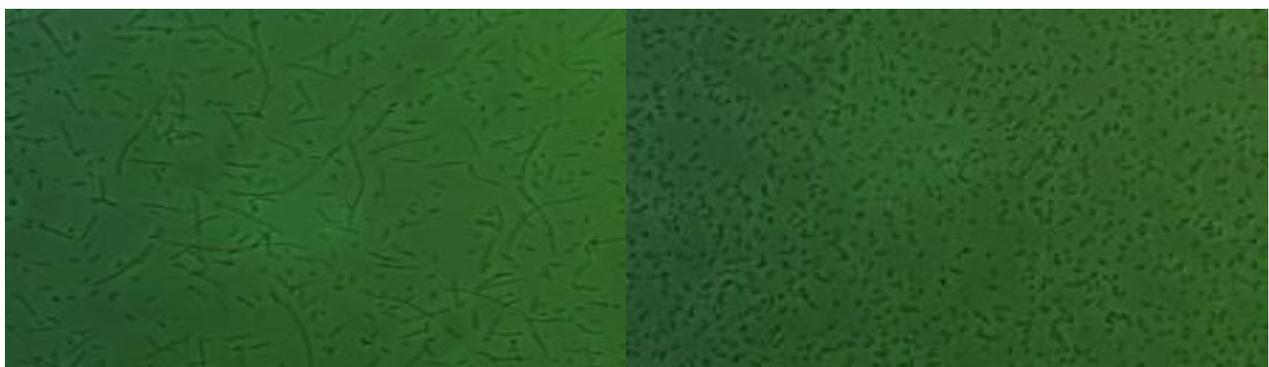


ABBILDUNG 6: CHITINOPHAGA SANCTI FX7914 (400-FACHE VERGRÖßERUNG) LINKS JUNGE KULTUR; RECHTS ALTE KULTUR

2.2 Extraktion von Metaboliten

Zur Isolierung organisch-chemischer Substanzen verwendet man hauptsächlich physikalische Trennverfahren, da bei chemischen Isolierungen oft schwer regenerierbare Intermediate entstehen. Ein häufig angewandtes physikalisches Trennverfahren ist die Extraktion. Bei der Feststoff-Flüssig-Extraktion liegt die Wertkomponente in einem Feststoff vor und muss von einem Lösungsmittel aus diesem herausgelöst werden. Industriell wird der Vorgang besonders bei dem *Auslaugen* angewendet, wenn Wasser die Substanzen bei der Zuckergewinnung, bei der Gerberei und bei der Farbstoffgewinnung herauslöst. Am bekanntesten für die Deutschen scheint jedoch die Feststoff-Flüssig-Extraktion bei der Herstellung des Getränkes Kaffee zu sein, da der Pro-Kopf-Verbrauch 2013 bei 165 L lag (*Deutscher Kaffeeverband 2013*).

Sekundärmetabolite werden meistens in der Idiophase von der Zelle abgegeben, sodass sich eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten in der Kulturbrühe finden lassen. Sekundärmetabolite, die aus dem Myzel aufgearbeitet werden, haften an der äußeren Zellwand, wodurch ein Zellaufschluss nur bei Ausnahmen nötig ist. Für eine Optimierung eines Verfahrens ist es wichtig, die Einflussfaktoren auf die ablaufenden Prozesse zu kennen. Im Folgenden sollen daher die zwei wichtigsten physikalischen Phänomene der Extraktion erklärt werden:

Die sogenannte Diffusion ist die molekulare Stoffleitung innerhalb eines Zweistoffgemisches (Temperatur = konst., Druck = konst.), die durch die molekulare Triebkraft eines Konzentrationsgefälles $\frac{dc}{ds}$ erzeugt wird. Ein Konzentrationsgefälle bezeichnet die Änderung der Konzentration bezogen auf einen bestimmten Weg in einem Punkt des Systems. Genauso kann eine Diffusion bei Konzentrationsunterschieden über eine Phasengrenzfläche hin stattfinden. Der *Stefan-Strom* ist die eindimensionale Diffusion, die senkrecht zur Phasengrenzfläche verläuft. Die Diffusionsgeschwindigkeit g_D wird als Komponenten-Massestrom \dot{m} je Flächeneinheit definiert (Formel 1) oder in direkter Proportionalität zum Konzentrationsgefälle stehend (Formel 2).

FORMEL 1: BERECHNUNG DIFFUSIONSGESCHWINDIGKEIT

$$g_D = \frac{\dot{m}}{A}$$

FORMEL 2: BERECHNUNG DIFFUSIONSGESCHWINDIGKEIT 2. MÖGLICHKEIT

$$g_D = -D * \frac{dc}{ds}$$

Die Diffusionszahl D (nach A. Fick) kann mittels empirischen Gleichungen rechnerisch ermittelt werden, doch erfolgt eine Bestimmung meist experimentell. Sie ist eine Konstante, die die Fähigkeit zum Stoffübergang darstellt und hat die Einheit Fläche je Zeit. Die Diffusionszahl ist temperaturabhängig, wodurch ebenso einen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit und damit die Extraktionsgeschwindigkeit besteht. Als ein weiterer Einfluss auf die Diffusion ist zudem die Prandtl-Grenzschicht zu nennen. Bekannt ist sie besonders als Hauptwiderstand des Wärmeübergangs, doch auf Grund der Analogie zum Stofftransport vermindert die Prandtl-Grenzschicht auch mit zunehmender Dicke die Diffusion. Die Prandtl-Grenzschicht ist eine auf der Phasengrenze aufliegende Grenzschicht zur festen Phase. Bei der Feststoff-Flüssig-Extraktion diffundiert das Lösungsmittel in die Festphase zur Aufnahme der Wertsubstanzen. Die Wertsubstanzen verteilen sich aber auch durch die Diffusion im Lösungsmittel bis zum Konzentrationsausgleich. (Vauck & Müller 1982, S.486-487)

Weiterhin ist die Löslichkeit der Substanzen in dem Lösungsmittel bei der Extraktion ein entscheidender Faktor, denn sie beschreibt die maximale Sättigungskonzentration des Lösungsmittels und der gelösten Komponente. Ist mehr an Substanz vorhanden, als von dem Lösungsmittel aufgenommen werden kann, stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem Bodenkörper und der gesättigten Lösung ein. Die Löslichkeit ist eine Funktion der Temperatur und kann aber auch durch Änderung des pH-Wertes verschoben werden, sodass auch hier wieder Einflüsse auf die Extraktion geschlossen werden können. (Vauck & Müller 1982, S. 462)

Auf Grund der genannten Faktoren kann angenommen werden, dass die Extraktion abhängig ist von:

- 1) Größe Phasengrenzfläche
- 2) Prandtl-Grenzschicht
- 3) pH-Wert
- 4) Konzentrationsgefälle $\frac{dc}{ds}$
- 5) Temperatur
- 6) Auswahl des Lösungsmittels

Bei der Feststoff-Flüssig-Extraktion in der vorliegenden Arbeit kann eine Temperaturerhöhung des Systems bis auf maximal 40°C erfolgen, da Naturstoffe wie Proteine und Lipide bei sehr hohen Temperaturen zerstört werden. Der pH-Wert nimmt Einfluss auf die intramolekularen Bindungen und kann somit die Stoffzusammensetzung ändern. Aus diesem Grund soll auch dieser in der vorliegenden Arbeit nicht systematisch variiert werden.

2.3 Verwendete Lösemittel

In der Arbeit findet zuerst eine Feststoff-Flüssig-Extraktion der Biomasse mit Aceton statt. Aceton ist der Trivialname für die Verbindung Propanon beziehungsweise Dimethylketon. Die Strukturformel soll in der folgenden Abbildung 7 gezeigt werden:

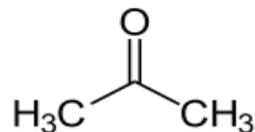


ABBILDUNG 7: STRUKTURFORMEL ACETON

Aus der Strukturformel ist erkennbar, dass eine Polarisierung an dem Sauerstoffatom identisch zu der Polarisierung in einem Wassermolekül erzeugt wird. Doch der positive induktive Effekt der Methylgruppen schwächt die Polarität ab. Folglich ist Aceton schwach polar und schwach unpolar. Dies macht Aceton zu einem vielseitig einsetzbaren Lösungsmittel, da es in jedem Verhältnis mit Wasser und mit den meisten organischen Verbindungen mischbar ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass Aceton einen geringen Dampfdruck besitzt, sodass es folglich schon nach einer gewissen Zeit bei Raumtemperatur aus dem gelösten Stoff verdampft.

In der Arbeit wird zusätzlich nach der Abtrennung des Acetons das restliche wässrige Rohextrakt mit Ethylacetat versetzt. Diese Flüssig-Flüssig-Extraktion dient dazu, die sehr polaren Substanzen wie Zucker oder Salze von den meist unpolaren Metaboliten aus dem Rohextrakt herauszulösen. Ethylacetat oder Essigester ist- wie Aceton- ein farbloses und beißend riechendes Lösemittel. Die Strukturformel in Abbildung 8 zeigt, dass Ethylacetat aufgrund der drei Methylgruppen deutlich unpolarer als Wasser ist. Somit kann eine Phasentrennung nach der Extraktion stattfinden.

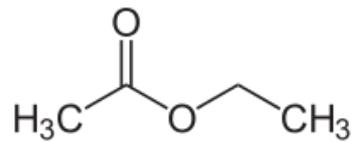


ABBILDUNG 8:STRUKTURFORMEL ETHYLACETAT

Die Abtrennung des Lösemittels erfolgt mit einem Rotationsverdampfer. Dieser senkt durch Erzeugung von Unterdruck die Siedetemperatur der Lösemittel, sodass sie schon bei mäßigen Temperaturen anfangen zu verdampfen. Verbessert wird die Verdampferleistung durch die Rotation des Kolbens, da der Flüssigkeitsfilm vergrößert wird.

2.4 Adsorberharz Amberlite® XAD16

Unter Adsorption versteht man die Anlagerung eines Stoffes aus einem Fluid an einen Feststoff. Der Absorber ist der Aufnehmer des Stoffes der fluiden Phase. Um Sekundärmetabolite aus der Fermentationsbrühe zu gewinnen, wird in der Abteilung MWIS neben der Flüssig-Flüssig-Extraktion auch das Adsorberharz XAD16 standardmäßig genutzt. Dabei handelt es sich um ein verzweigtes Polymer, welches nichtionisch und unpolar ist. Der aromatische Charakter und die Verzweigung wird in der Abbildung 9 gezeigt. Ein weiterer Faktor für die hohe Adsorptionskapazität der im Durchmesser 0,56 bis 0,71 mm kleinen weißen Kugeln ist die Oberflächenvergrößerung durch Porosität. Ein Gramm XAD16 erreicht somit eine maximale Oberfläche von 800 m². Vorteilhaft bei der Anwendung des Adsorberharzes ist, dass man die Verwendung großer Lösungsmittel vermeidet und die anschließenden Verdampfungsprozesse zum Einengen der Extrakte. Bei der Fermentation von Myxobakterien wird mithilfe des Adsorberharzes eine prozessintegrierte Produktgewinnung durchgeführt, wodurch die Produkte vor abbauenden Stoffen geschützt werden können.

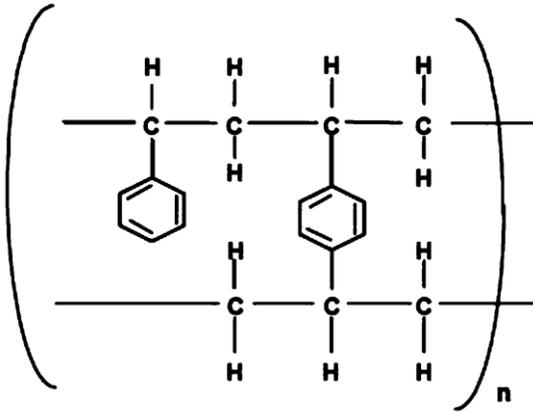


ABBILDUNG 9: ADSORBERHARZ XAD16 (QUELLE: ROHM & HAAS COMPANY 2008)

3. Methoden

3.1 Vorgehensweise zur Herstellung des Extraktionsguts

3.1.1 Anzucht *Streptomyces* JCB7713

Für die Anzucht des Stammes *Streptomyces* JCB7713 wurde das Medium M1 verwendet:

TABELLE 1: REZEPT MEDIUM M1

Medienbestandteil	Konzentration	Hersteller
Mannitol	10,0 g/kg	AppliChem GmbH
Sojamehl (entfettet)	10,0 g/kg	Cargill
Natriumchlorid	1,0 g/kg	AppliChem GmbH
Calciumcarbonat	1,0 g/kg	AppliChem GmbH

Als Lösungsmittel wurde deionisiertes Wasser verwendet. Der pH-Wert entsprach der Vorgabe von rund 7, sodass eine Zugabe von einer Lauge oder Säure nicht erforderlich war. Für die Anzucht des Stammes *Streptomyces* JCB7713 im Bioreaktor wurde das folgende Reaktormedium verwendet:

TABELLE 2: REZEPT REAKTORMEDIUM

Medienbestandteil	Konzentration	Hersteller
Mannitol	10,0 g/kg	AppliChem GmbH
Sojamehl (entfettet)	10,0 g/kg	Cargill
Natriumchlorid	1,0 g/kg	AppliChem GmbH
Calciumcarbonat	1,0 g/kg	AppliChem GmbH
Fleischextrakt	5,0 g/kg	Roth®

Die erste Flüssigführung zur Reaktivierung des Stammes *Streptomyces* JCB7713 wurde aus einer Kryokonserve (1,8 ml) in einem mit 100 ml M1-Medium gefüllten Kolben (Fassungsvolumen: 250 ml) angeimpft. Die Anzucht wurde bei 160 rpm, Amplitude 5 cm und 30°C in einem Schüttelinkubator durchgeführt.

Für die zweite Flüssigführung wurden fünf Kolben (Fassungsvermögen: 1L) mit je 300 ml M1-Medium aus der ersten Flüssigführung (je 10 ml Kultur) unter sterilen Bedingungen inokuliert. Dieser Schritt war erforderlich, um eine möglichst hohe Animpfdichte für die Inokulation des Fermenters zu erzielen. Nach der Überprüfung auf Kontaminationen mittels Lichtmikroskop, wurde von der ersten Führung für jeden der fünf Kolben 10 ml Kultur entnommen. Die zweite Flüssigführung wurde 96 h bei 160 rpm, Amplitude 5 cm und 30°C in einem Brutschrank inkubiert. Zur Inokulation des Fermenters wurden die Vorkulturen in eine sterile Vorlagenflasche (Fassungsvolumen: 2L) überführt und im Vorfeld wurde die Kultur erneut unter dem Lichtmikroskop auf Kontaminationen überprüft.

Die Kultivierung des *Streptomyces* JCB7731 erfolgte im Batchprozess für 50 h in einem 70 L-Bioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 50 L. Nach einer Stunde, 23 h und 48 h der Inokulation wurden ca. 100 g Probe aus dem Fermenter zur Analyse der Substrate und Produkte entnommen. Das verwendete zweistufige InterMIG-Rührwerk (Abbildung 10), besitzt an jedem Rührer zwei Blätter, die in verschiedenen Winkeln angestellt sind. Jedes Rührerblatt endet dann in kleineren, geteilten Blättern (Abbildung 11), die auch in verschiedenen Winkeln angestellt sind, sodass eine Förderung der Fermentationsbrühe in verschiedene Richtungen gegeben ist. Folglich findet eine optimale Homogenisierung der Kulturbrühe und ein erleichteter Stoffübergang statt. Die Bioprozessdaten lassen sich im Anhang finden.



ABBILDUNG 10: RÜHRWERK IM 70L-FERMENTER



ABBILDUNG 11: RÜHRERELEMENT DES INTERMIG-RÜHRWERK

Prozessparameter:

pO ₂ -Regelung:	>20% (Reglung durch Erhöhung der Drehzahl des Rührers)
pH-Wert-Regelung:	ungeregelt (pH-Wert Prozessstart: 7,0)
Temperatur:	30°C
Rührerdrehzahl	>100 rpm
Begasungsrate:	6,0 NL/min (Submers-Begasung)



ABBILDUNG 12: ZENTRIFUGE

Die Zellernte erfolgte mit einer Röhrenzentrifuge (Abbildung 12) bei 17000-facher Erdbeschleunigung, deren Röhrenkapazität laut Hersteller 6L beträgt.

3.1.2 Anzucht *Hypoxylon rickii* MUCL 53309

Für die Anzucht des Pilzstammes wurde das Medium YM pH 6.3 verwendet:

TABELLE 3: REZEPT MEDIUM YM6.3

Medienbestandteil	Konzentration	Hersteller
Malz-Extrakt	10,0 g/kg	BD
Glucose Monohydrat	4,4 g/kg	Cerestar
Hefeextrakt	4,0 g/kg	Ohly® Kat

Als Lösungsmittel wurde deionisiertes Wasser verwendet und mit 10%- igem Kaliumhydroxid-Lösung wurde das Medium auf den gewünschten pH-Wert von 6,3 eingestellt.

Für die Vorkultur wurde ein Kolben (Fassungsvermögen: 500 ml) mit 200 ml YM6.3-Medium durch drei Pellets (0,75 cm²) von einer Agarplatte mit der Kultur inokuliert. Die Kultivierung fand bei einer Schüttlerdrehzahl von 140 rpm und 22°C statt. Nach ca. 120 Stunden erfolgte eine

sterile Homogenisierung mittels Dispergierstab der Kultur und nach 192 h wurde der Fermenter angeimpft.

Die Hauptkultivierung des Stammes *Hypoxyton rickii* MUCL 53309 erfolgte im Batchprozess für 144 h in einem 15 L- Fermenter (Abbildung 13) mit einem Arbeitsvolumen von 10 L. Eine Probenahme von ca. 100 g erfolgte nach 1 h, 18,5 h, 114 h und 138 h des Kultivierungsbeginns. Es wurde ein Rührwerk mit drei 6-Blattscheibenrührer verwendet. Die Bioprozessdaten lassen sich im Anhang finden.



ABBILDUNG 13: 15L-GLASFERMENTER

Prozessparameter:

pO ₂ -Regelung:	keine
pH-Wert- Regelung:	ungeregelt (pH-Wert beim Prozessstart: 6,3)
Temperatur:	26 °C
Rührerdrehzahl:	150 rpm
Begasungsrate:	0,7 NL/min (Submers-Begasung)

Die Trennung des Myzels von der Fermentationsbrühe erfolgt mithilfe einer Röhrenzentrifuge bei 17000-facher Erdbeschleunigung.

3.1.3 Anzucht *Chitinophaga sancti* FX7914

Für die Anzucht des Stammes im Schüttelkolben wurde das M/H-Medium mit dem folgendem Rezept verwendet:

TABELLE 4: REZEPT MEDIUM M/H

Medienbestandteil	Konzentration	Hersteller
Sojapepton	10,0 g/kg	MarCOR
Calciumchlorid Dihydrat	1,0 g/kg	Roth®
Magnesiumsulfat Heptahydrat	1,0 g/kg	VWR
Na-Fe-EDTA	8 mg/kg	Roth®
HEPES	11,9 g/kg	Roth®

Als Lösungsmittel wurde deionisiertes Wasser verwendet und ein pH-Wert von 7,6 mit Kaliumhydroxid-Lösung eingestellt. Für die Anzucht des Stammes im Fermenter wurde das Medium T5-1/X mit dem folgendem Rezept verwendet:

TABELLE 5: REZEPT T5-1/X

Medienbestandteil	Konzentration	Hersteller
Lactose Monohydrat	10,5 g/kg	Roth®
Kaliumnitrat	3,3 g/kg	Roth®
Kaliumdihydrogenphosphat	0,7 g/kg	AppliChem
Magnesium Heptahydrat	0,2 g/kg	Merck
Na-Fe-EDTA	8 mg/kg	Fluka
Mangan (II)-sulfat Monohydrat	5 mg/kg	Merck
Zinkchlorid	1 mg/kg	Merck
XAD16	1 g/kg	Amberlite®
1-Docosanol	100 mg/kg	Merck

Für die erste Flüssigführung des Stammes *Chitinophaga sancti* FX7914 wurde eine Kryokonserven (1,5 ml) der Stammhaltung der Arbeitsgruppe MWIS in einem mit 100 ml M/H-Medium gefüllten Kolben (Fassungsvolumen: 250 ml) gegeben. Die Anzucht wurde bei 160 rpm, Amplitude 5 cm und 25 °C in einem Schüttelinkubator durchgeführt.

Für die zweite Flüssigführung wurden fünf Kolben (Fassungsvermögen: 1 L) mit je 400 ml M/H-Medium aus der ersten Flüssigführung unter sterilen Bedingungen inokuliert. Dafür wurde von der ersten Führung für jeden der fünf Kolben 4 ml Kultur entnommen. Die zweite Flüssigführung wurde 24 h unter denselben Bedingungen wie die erste Passage inkubiert. Zur Inokulation des Fermenters wurden 1000 ml der Vorkulturen in eine sterile Vorlagenflasche (Fassungsvolumen: 1 L) überführt und im Vorfeld wurde die Kultur unter dem Lichtmikroskop auf Kontaminationen überprüft.

Die Hauptkultivierung des Stammes *Chitinophaga sancti* FX7914 erfolgte im Batchprozess für 96 h in einem 150 L-Fermenter mit einem Arbeitsvolumen von 100 L (Abbildung 14 und Abbildung 15). Eine Probenahme erfolgte nach 26, 52, 69, 76, 93 und 95 h. Es wurde eine Rührwerk mit drei 6-Blattscheibenrührer verwendet. Die Bioprozessdaten lassen sich im Anhang finden.

Prozessparameter:

pO ₂ - Regelung:	20 % (geregelt über Drehzahl)
pH-Wert-Regelung mit Kaliumhydroxid (10 %) und Schwefelsäure (5 %):	pH-Wert _{min} :6,9 pH-Wert _{max} :7,1
Temperatur:	25°C
Rührerdrehzahl:	>100 rpm
Begasungsrate:	5,0 NL/min (Oberflächenbegasung)

Die Abtrennung des XAD16 von der Fermentationsbrühe erfolgte durch Absieben mit einem mobilen Prozessfilter.



ABBILDUNG 15: BIOREAKTOR (INNEN)



ABBILDUNG 14: BIOREAKTOR (AUßEN)

3.2 Versuche zur Optimierung der Extraktion von Biomasse

Zur Optimierung der Extraktion von Naturstoffen aus dem Myzel von Bodenbakterien und filamentösen Pilzen wurden als Modellorganismen der Stamm *Streptomyces* JCB7713 und der Stamm *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 verwendet. Im Rahmen dieser Bachelorarbeit konnten nicht alle Versuche mit beiden Organismen durchgeführt werden.

Mittels der Anwendung verschiedener Leistungseinträge soll in dieser Arbeit erprobt werden, ob es Möglichkeiten zur Verringerung des Arbeitsaufwands und Erhöhung der Substanzausbeute im Vergleich zur Standardaufarbeitungsweise der Biomasse in der Arbeitsgruppe MWIS gibt. Die Anwendung eines Ultraschallbads, eines Schüttlers, eines Magnetrührstabs und eines Dispergierstabs führt einerseits zu einer Zerkleinerung der Biomasse und damit zu einer Erhöhung der Phasengrenzfläche. Andererseits wird, abgesehen von der Behandlung im Ultraschallbad, aber auch eine Strömung erzeugt. Bei der Homogenisierung mittels Schüttler, Dispergierstab und Magnetrührstab wird die Dicke der Prandtl-Grenzschicht durch die Strömung nach *Vauck & Müller* verringert und eine schnellere Verteilung der Wertkomponente im Lösungsmittel erfolgt. Im Ultraschallbad wird die Extraktionsgeschwindigkeit und Ausbeute durch eine Temperaturerhöhung und durch die auftretende Kavitation beeinflusst. Die Stufenextraktion erzwingt durch wiederholte Zugabe von unbeladenen Lösungsmitteln einen anhaltenden hohen Konzentrationsgradienten als bei einem Batchverfahren, um die im Myzel verbliebenen Wertkomponentenmoleküle schneller herauszuziehen. Die Volumenvariation dient dazu, den minimalen Verbrauch an Lösemittel bei einer maximalen Sättigung zu ermitteln. In den folgenden Versuchen wird überprüft, ob die genannten Erwartungen bestätigt werden können und in welchem Maß die Substanzausbeute erhöht werden kann. Die Abbildung 16 zeigt ein zusammenfassendes Schema über die durchgeführten Versuche, wobei die dunkelgrün unterlegten Flächen die Schritte der Ausgangsmethodik benennen. Nachfolgend werden die Versuche ausführlicher beschrieben.

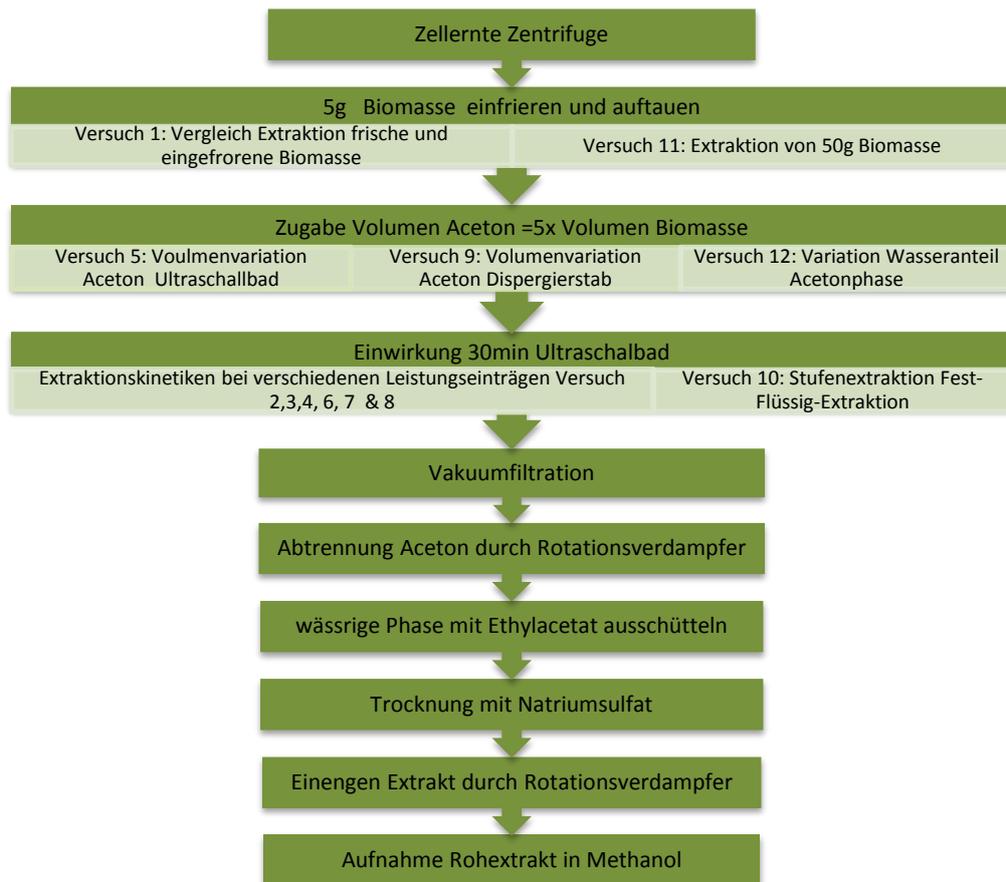


ABBILDUNG 16: ABLAUFSCHEMA GRUNDMETHODIK (DUNKELGRÜN) MIT VARIATIONEN (HELLGRÜN)

3.2.1 Ausgangsmethodik zur Extraktion von Biomasse

Bei jedem der in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche wurde zuerst eine Feststoff-Flüssig-Extraktion durchgeführt. Zu der Biomasse wurde dafür das fünffache Volumen an Aceton gegeben. Mittels kurzem Schütteln konnte die Probe grob homogenisiert und anschließend für 30 min bei 40°C im Ultraschallbad behandelt werden. Nach der Extraktion wurde die Biomasse vom Überstand per Dead-End-Filtration getrennt und über einen Faltenfilter in einen 50 ml Rundkolben überführt. Das Extrakt konnte durch den Einsatz eines Rotationsverdampfers (35°C, 250 mbar) eingengt werden. Die im Kolben verbliebene wässrige Phase wurde mit deionisiertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt und in einen Scheidetrichter überführt. Das Ausschütteln des Extraktes (Flüssig- Flüssig- Extraktion) erfolgte mit Hilfe von 50 ml Ethylacetat. In Abbildung 17 wird schematisch die Phasentrennung in einem Scheidetrichter gezeigt.

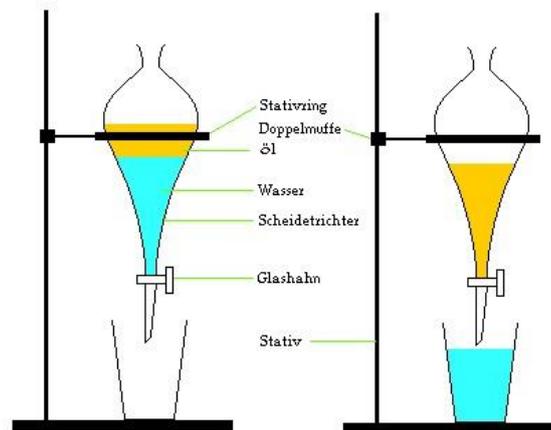


ABBILDUNG 17: SCHEMATISCHE DARRSTELLUNG EXTRAKTION IM SCHEIDETRICHTER (QUELLE INTERNET:WWW.W3.RESTENA.LU)

Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet, über einen Faltenfilter in einen 50 ml Kolben gefüllt und mittels Rotationsverdampfer destilliert. Während der Verdampfung des Lösemittels fand eine Überführung des Essigester-Extraktes von einem 50 ml Kolben in einen kleinen 10 ml Kolben statt. Somit sollte der Verlust des Extraktes durch späteres Anhaften an der Glaswand verringert werden.

3.2.2 Versuch 1: Vergleich Extraktion frischer Biomasse und aufgetauter Biomasse

Verwendete Organismen: *Streptomyces* JCB7713, *Hypoxyton rickii* MUCL 53309

In diesem Versuch wurden drei Proben der frisch geernteten Biomasse nach der Standardmethode aufgearbeitet und drei Proben mit Biomasse, die zuvor einmal eingefroren und im Wasserbad wieder aufgetaut wurden.

3.2.3 Versuch 2: Extraktionskinetik Ultraschallbad

Verwendete Organismen: *Streptomyces* JCB7713, *Hypoxyton rickii* MUCL 53309

In diesem Versuch wurde 25ml Aceton für die Fest- Flüssig- Extraktion der Biomasse verwendet. Die sechs Proben wurden nach der Zugabe des Lösungsmittels in ein 40°C temperiertes Ultraschallbad gestellt und nach unterschiedlichen Zeiten entnommen. Die Extraktion erfolgte für 2, 5, 10, 20, 4 und 60 min. Für den Stamm *Hypoxyton rickii* wurde eine dreifache Bestimmung für die Extraktionszeiten 10, 20 und 45 min durchgeführt.

3.2.4 Versuch 3: Extraktionskinetik Magnetrührstab

Verwendete Organismen: *Streptomyces* JCB7713, *Hypoxyton rickii* MUCL 53309

In diesem Versuch wurde die Extraktion mit 90 ml Aceton in einem Glasbehälter (250 ml Flasche der Fa. Schott) durchgeführt. Das System wurde dabei von einem Hantelmagnetrührer (Abbildung 18) mit einer Umdrehung von 350 rpm homogenisiert. Es wurden zehn Proben zur Erstellung einer Extraktionskinetik verwendet. Dabei erfolgte die Extraktion der Proben für 30, 60, 90, 2, 5, 10, 20, 30, 45 und 60 min. Für den Stamm *Hypoxyton rickii* wurde eine dreifache Bestimmung der Extraktionsausbeute für die Extraktionszeiten 10, 20 und 45 min durchgeführt.



ABBILDUNG 18: MAGNETRÜHRSTAB

3.2.5 Versuch 4: Extraktionskinetik Dispergierstab

Verwendete Organismen: *Streptomyces* JCB7713, *Hypoxyton rickii* MUCL 53309

In diesem Versuch wurden elf Proben mit 90ml Aceton für 15s bei 15000 rpm von einem Dispergierstab (Abbildung 19) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Laborschüttler bei 350 rpm für jeweils 30, 60, 90, 2, 5, 10, 20, 30, 45 und 60 min bewegt. Für den Stamm *Hypoxyton rickii* wurde eine dreifache Bestimmung für die Extraktionszeiten 10min, 20min und 45 min durchgeführt.



ABBILDUNG 19: DISPERGIERSTAB

3.2.6 Versuch 5: Volumenvariation Aceton Ultraschallbad

Verwendeter Organismus: *Streptomyces* JCB7713

In diesem Versuch wurde der Einfluss des Volumens an Solvent untersucht. Die Proben wurden mit 50 ml Aceton, 75 ml Aceton, 100 ml und 125 ml Aceton in einem 40°C temperierten Ultraschallbad für 30 min extrahiert.

3.2.7 Versuch 6: Extraktionskinetik Schüttler

Verwendeter Organismus: *Streptomyces* JCB7713

In diesem Versuch wurde 90 ml Aceton auf die Proben gegeben. Anschließend wirkten die 10 Proben für unterschiedliche Zeiten auf einem Laborschüttler mit einer Drehzahl von 350 rpm ein. Die Zeiten der Entnahme waren 2, 5, 10, 20, 30, 45 und 60 min.

3.2.8 Versuch 7: Variation des Leistungseintrages Dispergierstab

Verwendete Organismen: *Streptomyces* JCB7713, *Hypoxylon rickii* MUCL 53309

In diesem Versuch wurde 90 ml Aceton zu den Proben gegeben und mit einem Dispergierstab für 30, 45, 60 und 90s bei 15000 rpm dispergiert.

3.2.9 Versuch 8: Variation der Leistungseintrag Dispergierstab +10 min Einwirkung

Verwendeter Organismus: *Streptomyces* JCB7713

In diesem Versuch wurde 90 ml Aceton zu den Proben gegeben und mit einem Dispergierstab für 30, 45, 60 und 90 s bei 15000 rpm dispergiert. Anschließend wurden die Proben 10 min auf einen Laborschüttler gestellt.

3.2.10 Versuch 9:Volumenvariation Aceton Dispergierstab

Verwendete Organismen: *Streptomyces* JCB7713, *Hypoxyton rickii* MUCL 53309

In diesem Versuch erfolgte eine Veränderung des Lösemittelvolumens. Die Proben wurden mit 5 ml Aceton, 10 ml Aceton, 20 ml Aceton und 50 ml Aceton versetzt und von einem Dispergierstab für 15 s bei 15000 rpm homogenisiert.

3.2.11 Versuch 10: Stufenextraktion der Fest-Flüssig-Extraktion

Verwendeter Organismus: *Streptomyces* JCB7713

In diesem Versuch wurde die Biomasse mehrmals extrahiert. Die drei Proben wurden hierfür zweimal, dreimal oder viermal mit 10 ml Aceton versetzt und von einem Dispergierstab für 15 s bei 15000 rpm homogenisiert. Nach der Homogenisierung erfolgte eine Abtrennung der Biomasse vom Extrakt in einer Zentrifuge für 20 min bei 14000-facher Erdbeschleunigung. Der Überstand wurde nach jeder Stufe per Vakuumfiltration in einen Kolben aufgenommen.

3.2.12 Versuch 11: Extraktion 50g Biomasse

Verwendeter Organismus: *Streptomyces* JCB7713

In diesem Versuch wurden 50 g Biomasse mit 200 ml Aceton versetzt. Eine Probe wurde 30 min im 40 °C temperierten Ultraschallbad inkubiert und eine weitere Probe mit einem Dispergierstab für 15 s bei 15000 rpm homogenisiert. Dies entspricht einem 1: 10 Up Scale der Standardmethodik .

3.2.13 Versuch 12: Extraktion mit 80% Aceton+ 20 % deionisiertem Wasser

Verwendeter Organismus: *Hypoxyton rickii* MUCL 53309

In diesem Versuch wurde die Feststoff-Flüssig-Extraktion einer Probe mit 72,5 ml Aceton und 17,5 ml deionisierten Wasser durchgeführt. Eine Homogenisierung erfolgte mit einem Dispergierstab für 15 s bei 15000 rpm.

3.3 Versuche zur Optimierung der Extraktion des Adsorberharzes

Die Elansolide werden mithilfe des Adsorptionsmittels XAD16 aus der Fermentationsbrühe gewonnen. Da die Naturstoffe sehr instabil sind, wird schon vor der Inokulation XAD16 zum Medium hinzugegeben. Dies ermöglicht eine Anlagerung der Sekundärmetabolite schon während der Fermentation.

Wie bei der Biomasseextraktion soll eine Verringerung der Prandtl-Grenzschicht durch die Verwendung eines Schüttlers erfolgen. Im Ultraschallbad wird die Extraktion durch eine Temperaturerhöhung beeinflusst und eventuell durch die auftretende Kavitation. Der fünfte Versuch dient zum permanenten Aufrechterhalten des Konzentrationsgradienten. Die Proben der Extraktion mit verschiedenen Leistungseinträgen werden verglichen mit Proben ohne jeglichen Leistungseintrag. Für die genannten Versuche soll weiterhin die Extraktion in Abhängigkeit der Solventvolumina und Extraktionszeit untersucht werden.

In der Abbildung 20 wird ein Überblick über die Versuche zu der Feststoff-Flüssig-Extraktion des Adsorberharzes gegeben:

Extraktionsversuche XAD16				
Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5
Extraktion dreier Proben zur Ermittlung der Standardabweichung mithilfe der Ausgangsmethodik	Extraktion ohne Leistungseintrag mit 5,10 & 20ml Lösungsmittel für 5,10,30 & 60 min	Extraktion Schüttler mit 5,10 & 20ml Lösungsmittel für 5,10,30 & 60 min	Extraktion Ultraschallbad mit 5,10 & 20ml Lösungsmittel für 5,10,30 & 60 min	Festbettextraktion mit 10,20,40 & 80 ml Lösungsmittel

ABBILDUNG 20: ÜBERSICHT VERSUCHE

3.3.1 Standardaufarbeitung zur Extraktion der Elansolide

Die Feststoff-Flüssig-Extraktion erfolgte mit einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton und Essigsäure (Mischungsverhältnis 99:1), wovon 5 ml auf 2 g XAD gegeben wurde. Anschließend wurde die Probe mit einem Schüttler 10 min geschwenkt. Nach der Überführung von 1 ml des

Extrakt in ein Zentrifugenröhrchen erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 16000-facher Erdbeschleunigung. Anschließend wurden 100 µl des Überstandes in ein Vial zur analytischen Messung pipettiert.

3.3.2 Versuch 1: Ermittlung der relativen Standardabweichung

In diesem Versuch sollte die Vorgehensweise zur Extraktion der Elansolide aus XAD-Proben hinsichtlich ihrer Standardabweichung untersucht werden. Dafür wurden drei Proben, wie in der Ausgangsmethodik beschrieben steht, extrahiert.

3.3.3 Versuch 2: Extraktionskinetik ohne Leistungseintrag

In diesem Versuche wurden die Proben ohne einen Leistungseintrag für verschiedene Zeiten und Lösungsmittelvolumen extrahiert. Es wurden für die Lösungsmittelvolumen 5, 10 und 20 ml Proben nach 5, 10, 30 und 60 min genommen.

3.3.4 Versuch 3: Extraktionskinetik Schüttler

In diesem Versuch wurden die Extraktionskinetiken für die Proben bei einer Einwirkung auf einem Laborschüttler bei 300 rpm durchgeführt. Für die Lösungsmittelvolumen 5, 10 und 20 ml wurden Proben nach 5, 10, 30 und 60 min genommen.

3.3.5 Versuch 4: Extraktionskinetik Ultraschallbad

In diesem Versuch wurden Extraktionskinetiken bei einer Einwirkung der Proben im Ultraschallbad erstellt. Für die Volumen 5, 10 und 20 ml wurden Proben nach 5, 10, 30 und 60 min genommen.

3.3.6 Versuch 5: Festbett-Extraktion

In diesem Versuch wurde eine Festbett-Extraktion (Abbildung 21) mit verschiedenen Volumen an Lösemittel durchgeführt. Die Festbett-Extraktion erfolgte mit einer Glasfritte (Porenweite: 16-40 µm), welche mit ca. 1 cm Seesand zum Schutz vor Verstopfungen durch Zellfragmente bedeckt war. Das XAD16 wurde auf das Sandbett gegeben und mit Lösemittel benetzt. In der nachfolgenden Abbildung ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Verwendet wurden 10, 20, 40 und 80 ml des Lösungsmittelgemisches Aceton und Essigsäure (99:1). Zur Erhöhung der Kontaktzeit des Lösungsmittels und des XAD16 wurde die Flüssigkeitssäule über dem XAD16 gering gehalten, sodass eine gleichmäßige und langsame Extraktionsgeschwindigkeit gegeben

war. Für die Volumen 20 ml, 40 ml und 80 ml des Lösungsmittel wurde ein Scheidetrichter über die beladene Glasfritte gehängt und minimal geöffnet. Die Zugabe an Lösungsmittel erfolgte so tropfenweise. Die Elutionszeit betrug für die Extraktionen ca. 40-60 min. Nach dem Verbrauch des Lösungsmittels erfolgte eine Trocknung des XAD- und des Sandbettes durch Anlegen eines Vakuums an der Saugflasche.

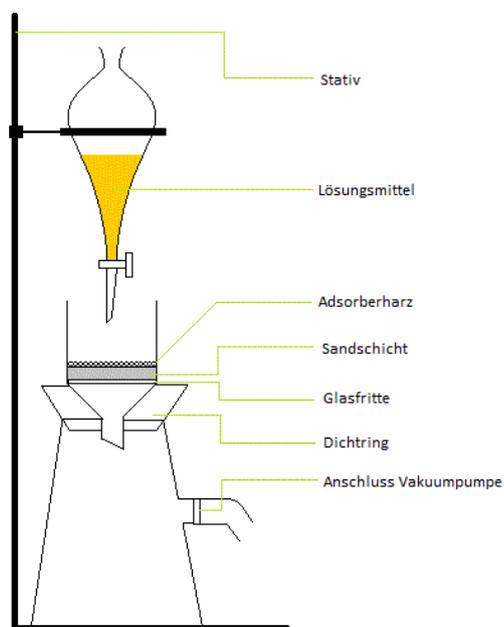


ABBILDUNG 21: AUFBAU FESTBETT-EXTRAKTION

3.4 Analytische Messungen

Die Proben der Myzelextrakte wurden nach der Aufnahme in Methanol mithilfe einer Laborzentrifuge bei 14000 -facher Erdbeschleunigung für 10 min zentrifugiert. Analog wurden die in Aceton und Essigsäure gelösten Extrakte der Elansolide behandelt. Die Zentrifugation war erforderlich um unlösliche Schwebestoffe zu sedimentieren, da sonst die Gefahr von Verunreinigungen der HPLC-Säule bestünde. Nach der Zentrifugation wurden 100 µl des geklärten Extraktes in ein Vial zum Messen der Probe überführt.

Die chemische Analytik der Rohextrakte wurde mittels spektroskopischer Methoden durchgeführt. Dafür wurden die einzelnen Substanzen des Rohextraktes durch eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Abkürzung HPLC) aufgetrennt.

Diese Separation gelingt durch die verschiedenen Wechselwirkungen der einzelnen Substanzen mit einer Trennsäule, welche die stationäre Phase des Systems bildet. Die zu analysierende Probe wird innerhalb des Injektionsports in einen kontinuierlich eingepumpten Volumenstrom des Laufmittels injiziert. Bei der in der Arbeit angewendeten Methode werden zwei Laufmittel verwendet, deren Mischungsverhältnis sich mit der Zeit ändert. Diese Gradientenelution dient bei der analytischen HPLC dazu, um Stoffe mit unterschiedlichen Polaritäten in einem Chromatogramm darstellen zu können. Bei der präparativen HPLC können so Stoffe mit sehr unterschiedlichen Polaritäten voneinander getrennt werden, um nachfolgend mit ihnen weiter zuarbeiten. Bleibt die mobile Phase über die Zeit hin konstant, nennt man das eine isokratische Methode.

Die mobile Phase wird nach Aufnahme der Probe konstant über die Trennsäule gepumpt. Die in dieser Arbeit verwendete Trennsäule besteht aus einem modifizierten, unpolaren Kieselgel. Wenn die mobile Phase polar und die Trennsäule unpolar ist, wird die Auftrennung der Substanzen auch Reverse-Chromatographie genannt. Polare Substanzen haben somit eine kurze Retentionszeit und unpolare Stoffe benötigen mehr Zeit, um sich von der Säule zu lösen. Die Trennung der einzelnen Substanzen erfolgt dadurch, dass die Säule, je nach Bindung, die Substanzen (Eluenten) länger und kürzer zurückhält. Die Rückhaltezeit oder auch Retentionszeit genannt, ist innerhalb einer Methodik mit der gleichen Säule für die einzelnen Substanzen sehr spezifisch. In der nachstehenden Abbildung wird der schematische Aufbau einer HPLC-Anlage dargestellt und in der Abbildung 22 wird die Zusammensetzung der Laufmittel gezeigt, sowie die Polaritätsbereiche.

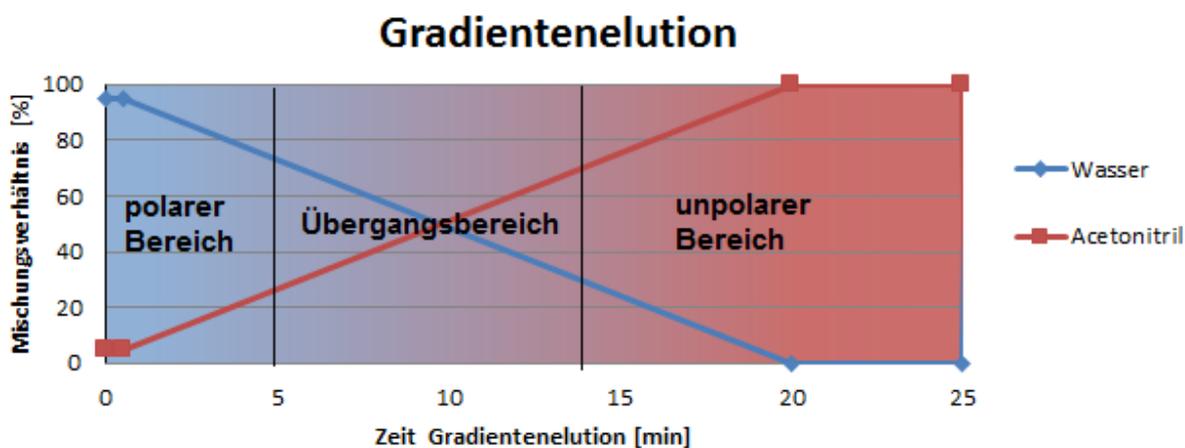


ABBILDUNG 22: DIAGRAMM GRADIENTENELUTION (QUELLE: MÜLLER 2014)

Der Eluent wurde in der Arbeit nach dem Austritt aus der Säule auf zwei verschiedenen Weisen detektiert:

- UV/VIS-Spektroskopie (alle Rohextrakte)
- Massenspektroskopie (nur Rohextrakte des *Streptomyces JCB7731*)

3.4.1 UV/VIS-Spektroskopie

Sind die Moleküle einer sich in Lösung befindlichen Substanz in der Lage elektromagnetische Strahlung zu adsorbieren, so kann es zu einer messbaren Abschwächung der Intensität eines monochromatischen Lichtstrahls kommen. Die Adsorption des Analyten kann von Festwellendetektoren erfasst werden oder auch von Photo-Dioden-Array-Detektoren (DAD). Der Unterschied der zwei Detektorenarten besteht darin, dass der in dieser Arbeit verwendete DAD auch polychromatisches Licht einfangen und somit zu jedem Zeitpunkt im Chromatogramm ein vollständiges UV/VIS-Spektrum des eingestellten Wellenlängenbereichs erzeugen kann.

3.4.2 Massen-Spektroskopie

Mithilfe von massenspektrometrischen Methoden lassen sich relative Molekülmassen und Elementarzusammensetzungen einer Verbindung bestimmen. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer gearbeitet. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, fließen die vom DAD detektierten Moleküle durch ein Elektronspray-System und eine positive sowie negative Ionisation der Moleküle erfolgt. Über Spannungs- und Druckgradienten werden die

Molekülionen in eine Ionenfalle geleitet, in welcher sie von einem Detektor erfasst werden können (Bruker Daltonics User manual zu amaZon Series 2009).

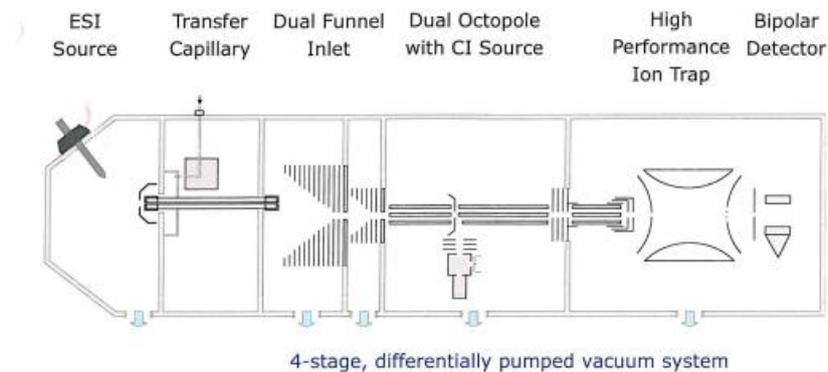


ABBILDUNG 23: AUFBAU DES MASSENSPEKTROMETERS AMAZON SPPED™ (BRUKER DALTONICS USER MANUAL ZU AMAZON SERIES 2009)

Mit der HPLC-MS -Anlage war es somit möglich einer retendierten Substanz ein individuelles Adsorptionsspektrum sowie ein spezifisches Masse-Ladungsverhältnis zuzuordnen. Die Adsorptionsspektren und die Massenspektren der quantifizierten Peaks sowie die absoluten Werte der Peakflächen aller Messungen lassen sich im Anhang finden.

Angaben zur chromatographischen Methode der Extrakte:

- mobile Phase:
 - Laufmittel A: H₂O + 0,1% Ameisensäure
 - Laufmittel B: Acetonitril + 0,1% Ameisensäure
- Stationäre Phase: Waters Acquity UPLC C18
- Injektionsvolumen: 2 µl (Proben *Streptomyces JCB 7713*; Proben *XAD16*)
10 µl (Proben *Hypoxyton rickii* MUCL 53309)
- Durchfluss: 0,6 ml/min
- Temperatur Säulenofen: 40°C

4. Ergebnisse & Diskussion der Aufarbeitungsmethoden

In dem folgenden Ergebnisteil dieser Arbeit werden die Peakflächen jeder Methodenveränderung in Relation zu den Peakflächen der Standardaufarbeitungsmethodik eines jeden Extraktionsguts dargestellt. Die Werte der Standardaufarbeitungsmethodik entsprechen 100 % und werden durch eine rot markierte Linie im Diagramm verdeutlicht.

4.1 Versuche zur Aufarbeitung des Myzels von *Streptomyces* JCB7713

Das nachfolgende Chromatogramm zeigt die im UV/VIS- Bereich adsorbierenden Substanzen aus dem Rohextrakt des Myzels von *Streptomyces* JCB7713. Mithilfe der Massenspektroskopie (Methodik Kapitel 2.5.2) konnte den markierten fünf Peaks die charakteristischen Molekülmassen von 938 g/mol (Phenelfamycin A/B = Peak 3 & Peak 4) und 1038 g/mol (Phenelfamycin C/D = Peak 1 & Peak 2) und 1225 (Phenelfamycin E/F = Peak 5) zugeordnet werden sowie das UV-Adsorptionsmaximum von 224 nm. In der Abbildung 24 wird ein beispielhaftes Chromatogramm gezeigt, in welchen die Peakflächen der fünf untersuchten Substanzen markiert sind.

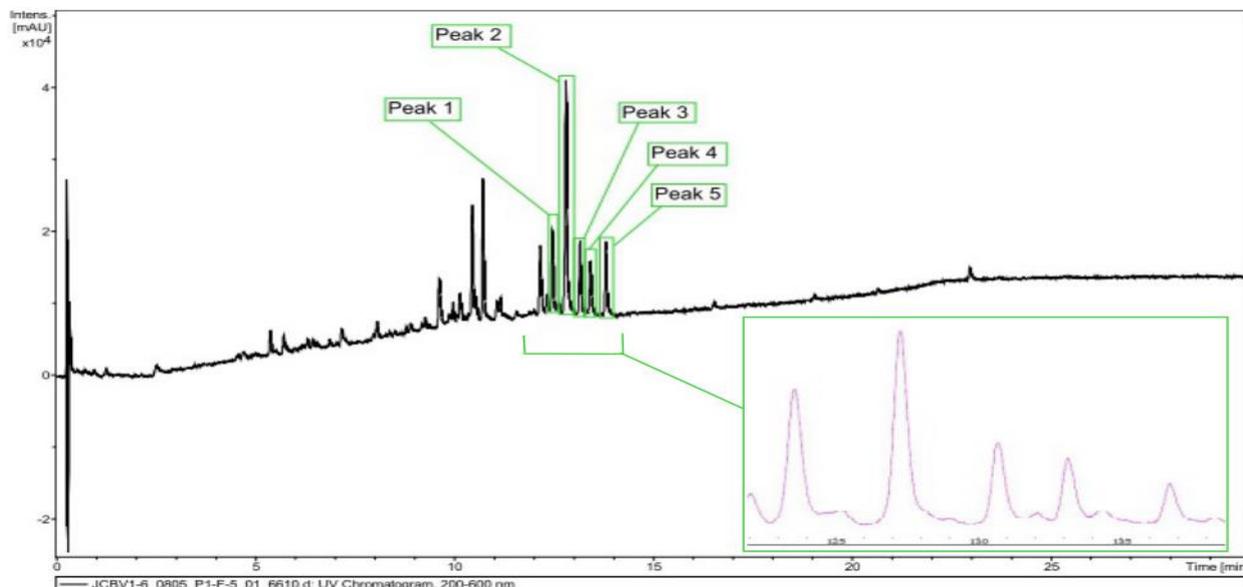


ABBILDUNG 24: CHROMATOGRAMM ROHEXTRAKT *STREPTOMYCES* JCB7713

4.1.1 Versuch 1: Vergleich frische und eingefrorene Biomasse

Mit dem ersten Extraktionsversuch soll gezeigt werden, welchen Einfluss das Einfrieren der Biomasse auf den Aufarbeitungserfolg hat und wie groß die relative Standardabweichung zwischen drei gleich aufgearbeiteten Proben ist. Die Standardabweichung lässt sich mit der folgenden Formel berechnen:

FORMEL 3: ERMITTLUNG DER STANDARDABWEICHUNG

$$\Delta x = s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1}{n \cdot (n-1)} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Bei Division des erhaltenen Wertes mit dem Mittelwert und der Multiplikation um den Faktor 100 erhält man die relative Standardabweichung, oder auch RSD (englisch: relative standard deviation) genannt. In dem Säulendiagramm (Abbildung 25) sind die Mittelwerte der Peakflächen der frischen Biomasseproben und aufgetauten Biomasseproben zu erkennen.

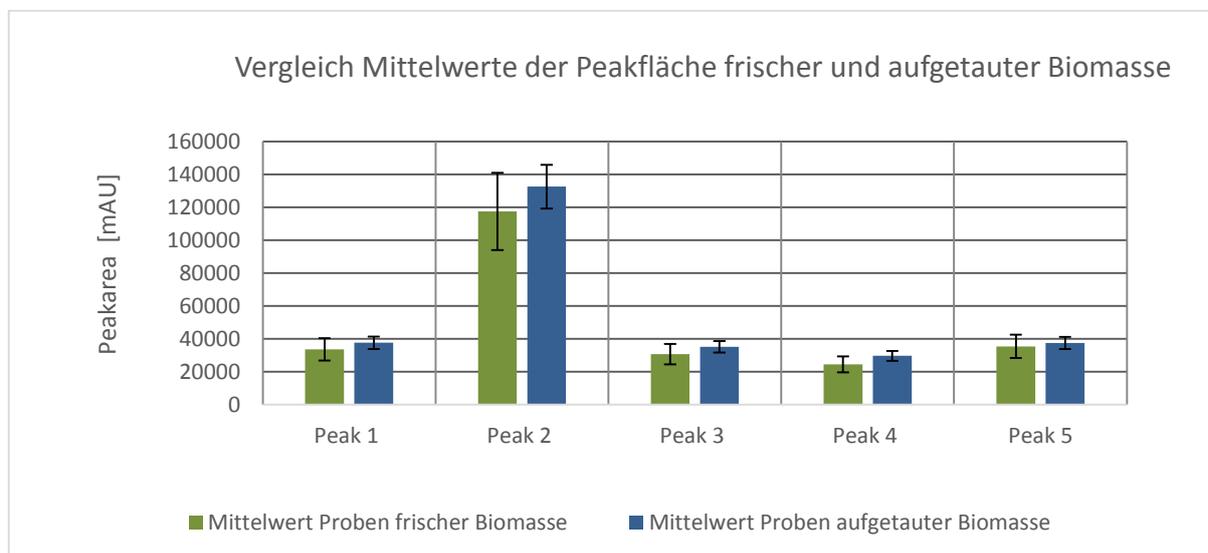


ABBILDUNG 25: DIAGRAMM VERGLEICH DER REL. PEAKFLÄCHEN VON FRISCHER UND AUFGETAUTER BIOMASSE *STREPTOMYCES JCB7713*

Wie sich aus der Abbildung 25 ablesen lässt, sind die Abweichungen der Peakflächen (schwarze Fehlerindikatoren) zwischen den frischen Biomasseproben deutlich größer als die Abweichungen der aufgetauten Biomasseproben. Die relative Standardabweichung beträgt bei den frischen

Proben 19,7 % und bei den aufgetauten Proben 8,75 %. Letztere Angabe entspricht ungefähr den Angaben der zuvor angefertigten Praktikumsarbeit von Müller 2014 zur Aufarbeitung der Biomasse. Bei den frischen Proben unterscheidet sich eine Probe deutlich von den beiden anderen Proben. Ein Grund hierfür könnte sein, dass Fehler in der Durchführung der Aufarbeitung passiert sind und die Konzentrierung der dritten Probe deutlich höher ist, als in den anderen beiden Proben. Trotz dem lässt sich ein Unterschied zwischen den Proben der frischen Biomasse und der aufgetauten Biomasse erkennen. Denn bei der Extraktion der aufgetauten Biomasse konnten im Durchschnitt 13 % mehr Substanzausbeute gewonnen werden, als bei der Extraktion der frischen Biomasse. Eine Erklärung dafür könnte die Bildung von Eiskristallen bei Einfrieren sein, die die Struktur des Hyphenverbundes lockern und somit eine erfolgreichere Benetzung der Biomasse durch Vergrößerung der Oberfläche mit Lösungsmittel erfolgt.

4.1.2 Versuch 2: Extraktionskinetik Ultraschallbad

Bei dem zweiten Extraktionsversuch wurde die Einwirkzeitzeit der Feststoff- Flüssig- Extraktion im Ultraschallbad variiert. In dem folgenden Zweipunkte- Diagramm (Abbildung 26) wird gezeigt, wie groß die prozentualen Ausbeuten der Phenelfamycine zu verschiedenen Zeitpunkten sind. Der im Diagramm zu erkennende Verlauf entspricht einer Sättigungskurve, wobei die verschiedenen Phenelfamycine ungefähr gleich schnell extrahiert werden. Nach ca. 10 Minuten wird die maximale Ausbeute mit durchschnittlich 0,5 % mehr Ausbeute im Vergleich zu den Werten der Standardmethodik erreicht, danach ist ein Abfall der Ausbeute zu verzeichnen. Dieses Verhalten könnte damit begründet werden, dass sich das Löslichkeitsgleichgewicht zugunsten anderer Stoffe verschiebt, die erst später extrahiert werden oder durch den Zellaufschluss freigesetzt werden. Weiterhin könnte es möglich sein, dass die Phenelfamycine bei langer Einwirkung von Aceton zerfallen.

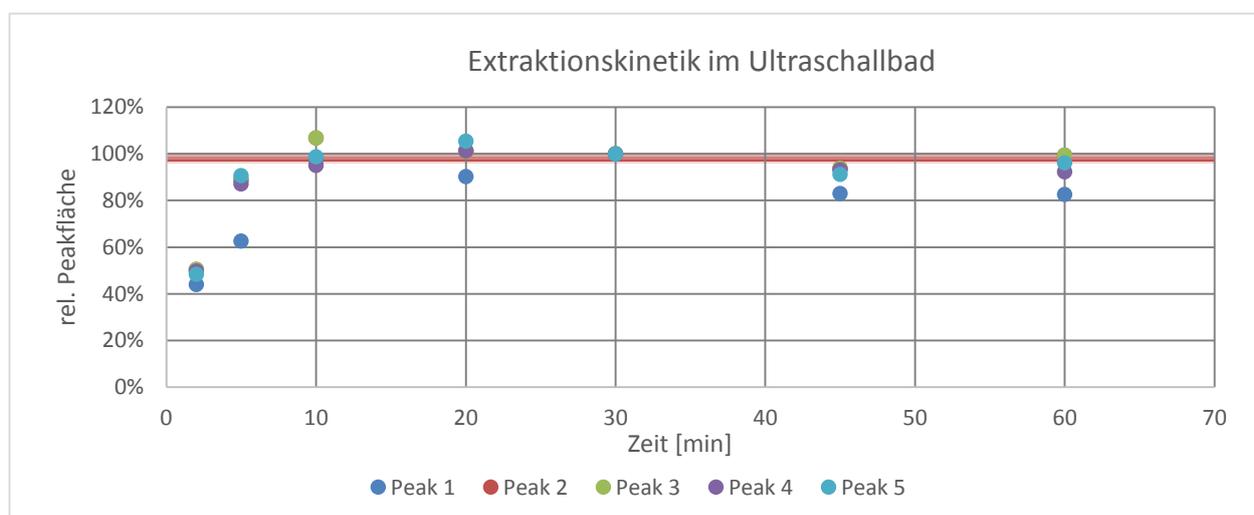


ABBILDUNG 26:EXTRAKTIONSKINETIK ULTRASCHALLBAD STREPTOMYCES JCB7713

4.1.3 Versuch 3: Extraktionskinetik Magnetrührstab

Bei dem dritten Versuch erfolgt die Extraktion, während das Myzel und das Aceton von einem Magnetrührstab homogenisiert wurden. Der kinetische Verlauf wird in der Abbildung 27 dargestellt. Bei der Extraktion der Phenelfamycine mit der Homogenisierung durch einen Magnetrührer lässt sich eine sehr schnelle Aufnahme der Sekundärmetabolite durch das Lösungsmittel erkennen, die jedoch auch erst nach zehn Minuten ihre maximale Sättigung erreicht. Schon nach 30 s konnten im Durchschnitt 75 % der maximalen Ausbeute an den Phenelfamycinen gewonnen werden. Ab 20 min lässt sich wie bei der Extraktion im Ultraschallbad eine Abnahme der extrahierten Sekundärmetabolite feststellen. Auch hier könnte der Grund in der zunehmenden Extraktion intrazellulärer Substanzen zu finden sein oder dem Zerfall der Phenelfamycine. Im Vergleich zur standardmäßig eingesetzten 30-minütigen Ultraschallbadbehandlung konnten 39 % mehr Ausbeute durch die zehnmütigen Einwirkung und Verwendung des Magnetrührers gewonnen werden.

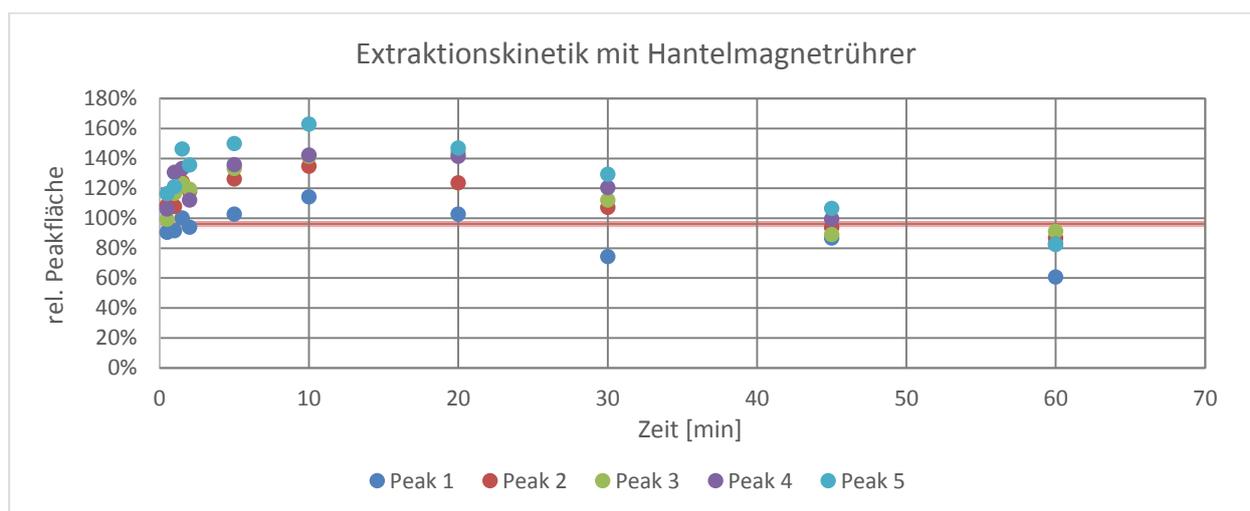


ABBILDUNG 27:EXTRAKTIONSKINETIK MAGNETRÜHRSTAB STREPTOMYCES JCB7713

4.1.4 Versuch 4: Extraktionskinetik Dispergierstab + Schüttler

Bei dem vierten Extraktionsversuch erfolgt die Extraktion auf einem Schüttler, während die Probe erst von einem Dispergierstab für 15 s homogenisiert wurde. Der kinetische Verlauf wird in der Abbildung 28 dargestellt. Der bei diesem Versuch entstandene Kurvenverlauf gleicht dem Kurvenverlauf, der durch die Homogenisierung mittels Magnetrührstab entstanden ist. Bereits nach 15 s dispergieren, ohne die anschließende Einwirkung auf dem Schüttler, konnte im Durchschnitt 73 % der max. Ausbeute an den Phenelfamycinen gewonnen werden. Nach zehn Minuten lässt sich die max. Ausbeute der extrahierten Naturstoffgruppe finden. Diese Ausbeute

nimmt danach aber nicht so sehr ab. Hier wird deutlich, dass die Abnahme der Phenelfamycinmenge im weiteren Extraktionsverlauf mit hoher Wahrscheinlichkeit von vorherrschenden intrazellulären Substanzen abhängig ist. Der Leistungseintrag ist beim Schüttler sichtbar geringer, als bei Anwendung des Magnetrührers, wodurch kein permanenter Zellaufschluss gegeben ist. Die Extraktion intrazellulären Substanzen ist somit geringer, als bei der Homogenisierung mittels Magnetrührstab. Die Ausbeuten der zehninütigen Extraktion liegen mit 48% über denen der Standardaufarbeitungsmethodik.

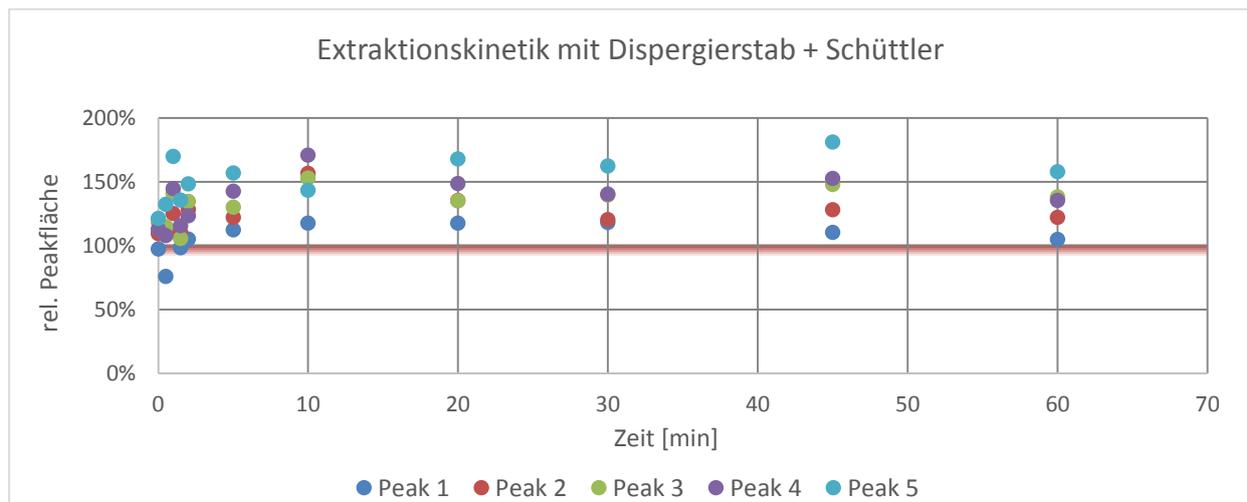


ABBILDUNG 28: EXTRAKTIONS KINETIK DISPERGIERSTAB STREPTOMYCES JCB7713

4.1.5 Versuch 5: Variation des Lösungsmittelvolumens Aceton im Ultraschallbad

Bei dem fünften Extraktionsversuch erfolgte die Extraktion im Ultraschallbad mit verschiedenen Lösungsmittelvolumen. Die Korrelation der extrahierten Stoffmengen von dem Volumen wird in dem folgenden Diagramm dargestellt:

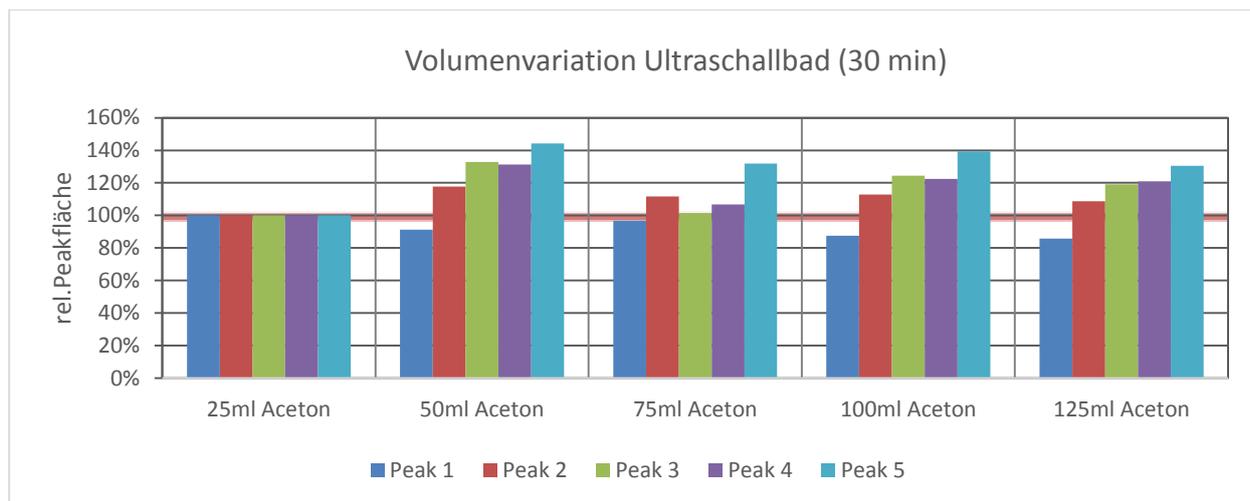


ABBILDUNG 29: VOLUMENVARIATION LÖSUNGSMITTEL STREPTOMYCES JCB7713

Wie in der Abbildung 29 zu erkennen ist, konnte mit der doppelten Menge an Aceton vom Ausgangswert durchschnittlich 15,5 % mehr Extraktionsausbeute gewonnen werden (Grundmethodik des Verfahrens siehe Abbildung 16). Der leichte Anstieg der Extraktionsausbeuten zwischen der ersten Probe und den weiteren Proben könnte mit einer Erhöhung des Konzentrationsgefälles und damit der Diffusionsgeschwindigkeit zusammenhängen. Nach *Vauck & Müller* ist dieses Phänomen bei großen Extraktionsmittelmengen zu erwarten. Eine Erklärung für die deutlich bessere Extraktion des Peak 1 bei weniger Lösungsmittelverbrauch ist der höhere Wasseranteil durch die Feuchtigkeit der Biomasse. Da Aceton und Wasser mischbar sind, würde sich durch die Hydratisierung des Acetons die Polarität des Lösungsmittels zu Gunsten polarer Stoffe verschieben. In dem Chromatogramm in Abbildung 24 ist zu erkennen, dass der Peak 1 mit einer Retentionszeit von 12,5 min mehr im polaren Bereich (siehe Polaritätsgradient Abbildung 22) liegt und somit von einem polaren Lösungsmittel eher aufgenommen werden kann.

4.1.6 Versuch 6: Extraktionskinetik Schüttler

Bei dem sechsten Extraktionsversuch erfolgt die Extraktion, während die Probe zur Durchmischung der Biomasse und des Lösungsmittels auf einen Schüttler zur Einwirkung gestellt wurde. Der kinetische Verlauf wird in der Abbildung 30 dargestellt. Bei der Vermischung mittels Schüttler kann analog zu den vorhergegangenen Kinetiken festgestellt werden, dass nach 10 min die maximale Ausbeute erreicht wurde. Doch im Gegensatz zu den Ergebnissen der Versuche 3 und 4 erreichte die Extraktion nach 2 min durchschnittlich nur 37 % der maximalen Ausbeute. Begründet werden kann diese verzögerte Extraktion damit, dass die durch den Schüttler erzeugte Strömungsgeschwindigkeit das Extraktionsgut nur langsam im Lösungsmittel verteilen konnte und

die Phasengrenzfläche damit kleiner ist. Mit der zehnmütigen, geschüttelten Extraktion konnten durchschnittlich 13 % mehr Ausbeute im Vergleich zur Standardmethodik gewonnen werden.

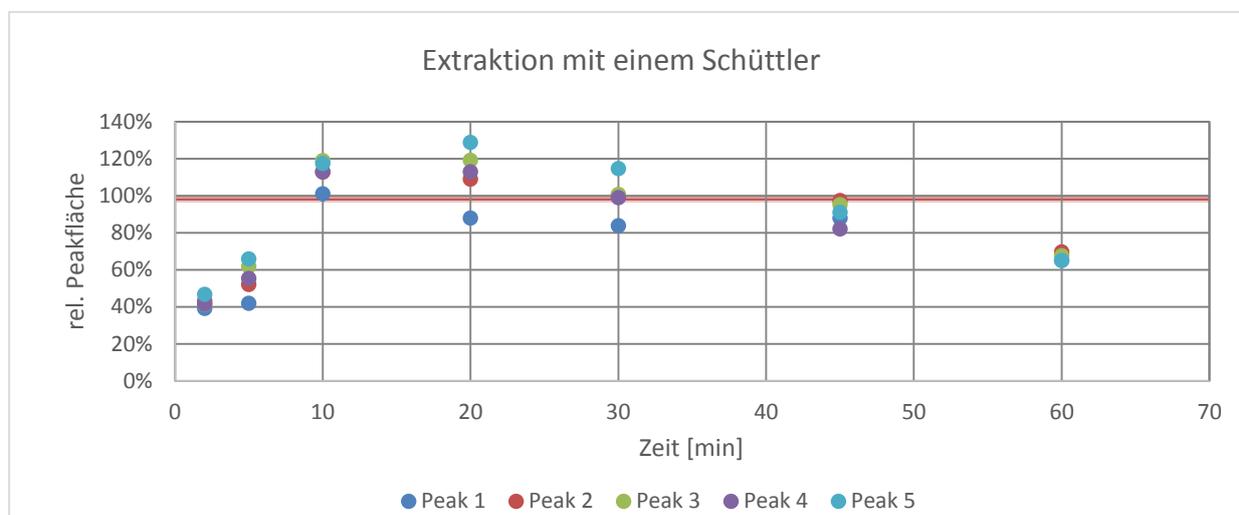


ABBILDUNG 30: EXTRAKTIONS KINETIK SCHÜTTLER STREPTOMYCES JCB7713

4.1.7 Versuch 7+ 8: Variation Leistungseintrag Dispergierstab + Variation Leistungseintrag Dispergierstab + 10 minütiger Einwirkung

Bei dem siebten Extraktionsversuch erfolgte die Extraktion der Proben, während die Biomasse mit dem Aceton per Dispergierstab unterschiedlich lang homogenisiert wurde. In dem Versuch 8 wurden die Proben danach zusätzlich auf einen Schüttler für 10 min gestellt. Die Abhängigkeit der extrahierten Stoffmengen von den Dispergierzeiten wird in den folgenden Diagrammen (Abbildung 31 und 32) dargestellt. Durch die Variation der Eintragszeit konnte keine Erhöhung der Extraktionsausbeute erfolgen. Nach 10 min der Einwirkung auf dem Schüttler schwanken die Werte der Ausbeuten mehr. Auch hierfür könnte ein Grund in der Elution von intrazellulären Substanzen mit zunehmender Extraktionszeit zu finden sein. Weiterhin könnte zu dem auch die Verschiebung von Löslichkeitsgleichgewichten oder der Zerfall der Phenelfamycine eine Rolle spielen. Die Ausbeuten der Standardaufarbeitungsmethodik (100 %) konnten auch mithilfe dieser Methoden übertroffen werden.

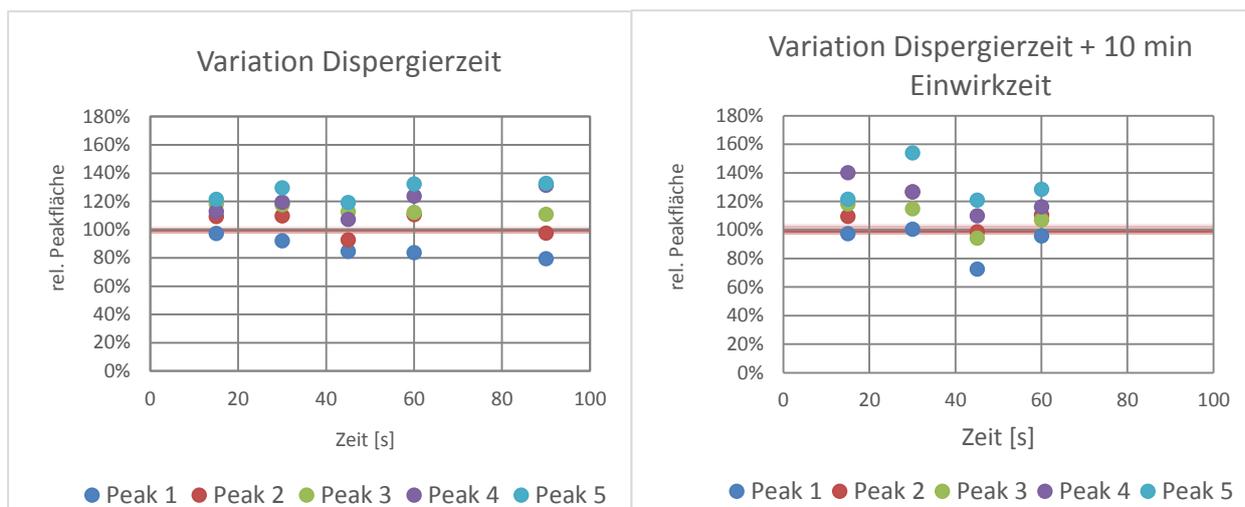


ABBILDUNG 31: DIAGRAMM VERSCHIEDENE DISPERGIERZEITEN
STREPTOMYCES JCB7713

ABBILDUNG 32: DIAGRAMM VERSCHIEDENE DISPERGIERZEITEN + 10
MIN SCHÜTTLEN STREPTOMYCES JCB7713

4.1.8 Versuch 9: Volumenvariation Aceton Dispergierstab

Bei diesem Versuch wurde das Lösungsmittelvolumen bei der Homogenisierung mit einem Dispergierstab variiert. In dem nachstehenden Diagramm (Abbildung 33) ist zu sehen, dass die Werte sich nur bei 5 ml Aceton deutlich von den anderen Proben unterscheiden. Begründet könnte das damit werden, dass einerseits das geringe Volumen an Aceton gesättigt ist und keine Naturstoffe mehr lösen kann. Die maximalste Rohextraktmenge, die in der ganzen Versuchsdurchführung gewonnen wurde, lag bei $4 \frac{\text{mg}_{\text{Rohextrakt}}}{\text{g}_{\text{Biomasse}}}$. Andererseits könnte ein Problem auch im Verlust des Extraktes bestehen, da sich das Extrakt mit dem hohen Feststoffanteil schwer von dem Dispergierstab abspülen lässt. Die Erzeugung eines stärkeren Konzentrationsgefälles mithilfe höherer Lösungsmittelmengen scheint durch die starke Strömung keinen Einfluss mehr zu haben, da sonst eine Steigerung der Ausbeute bis zu 50 ml wie bei dem Ultraschallbad erwartet wurden wäre. Im Vergleich zu der Standardmethodik (100 %) konnte trotz der geringeren Lösungsmittelvolumina eine höhere Substanzausbeute erreicht werden.

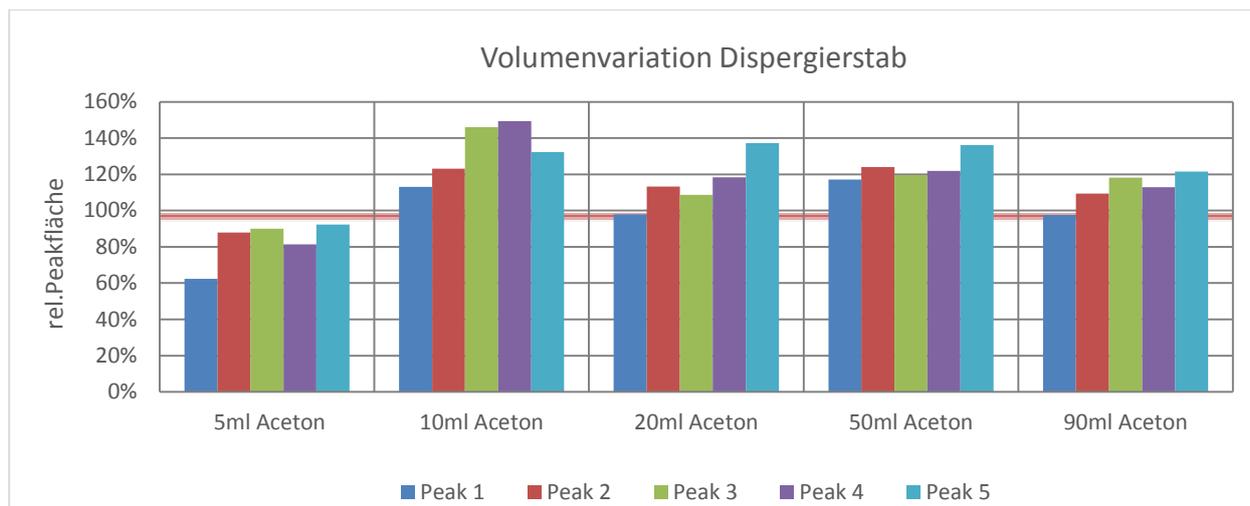


ABBILDUNG 33: VOLUMENVARIATION ACETON MIT DISPERGIERSTAB *STREPTOMYCES JCB7713*

4.1.9 Versuch 10: Stufenextraktion

In diesem Versuch wurde das Myzel mehrfach mit 10 ml Aceton versetzt. In dem nachfolgendem Diagramm (Abbildung 34) ist zu sehen, dass zwischen der ersten Stufe und zweiten Stufe im Durchschnitt 18% mehr aller Phenelfamycine extrahiert werden konnte. Für die Proben 3 (dreimal extrahiert) und 4 (viermal extrahiert) blieben die Ausbeuten analog zu denen der zweiten Stufe. Durch die 2. Stufe konnte im Vergleich zu den Werten der Ausgangsmethodik (100 %) durchschnittlich 26 % mehr der Phenelfamycine gewonnen werden.

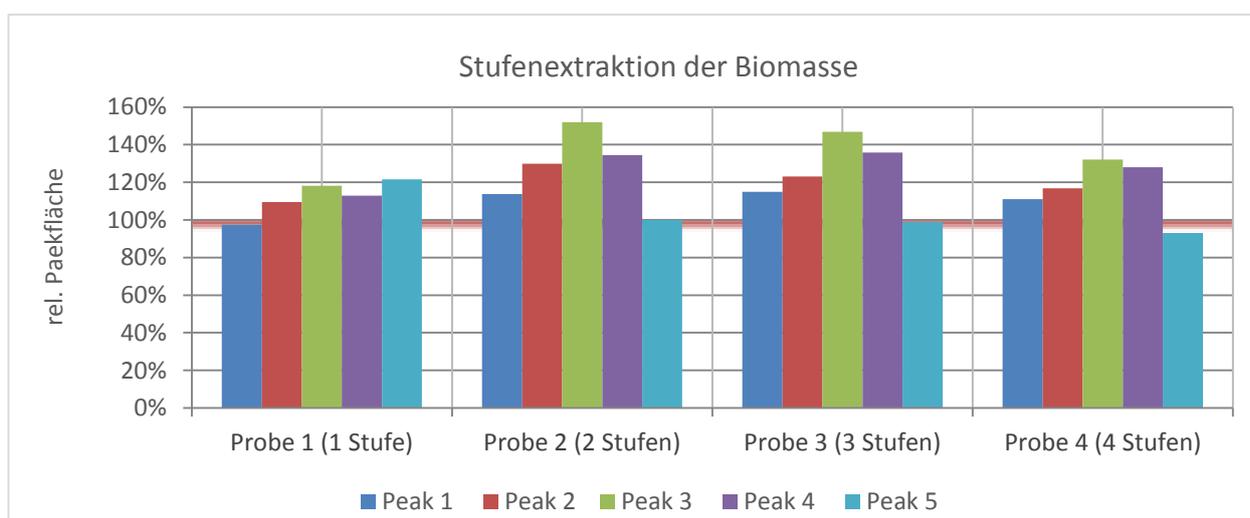


ABBILDUNG 34: STUFENEXTRAKTION DES MYZELS *STREPTOMYCES JCB7713*

4.1.10 Versuch 11: Extraktion 50g Biomasse

In diesem Versuch wurde ein Scale Up im Verhältnis 1:10 zu den Vorversuchen durchgeführt. Dies wurde als Parallelansatz für einen Vergleich zwischen der Homogenisierung mittels Ultraschallbad und mithilfe eines Dispergierstabs für die 10-fache Menge an Biomasse und Aceton verwendet. In Abbildung 35 ist zu erkennen, dass die Ausbeuten aller Phenelfamycine bei der Ultraschallbehandlung im Durchschnitt um 11 % gesteigert werden bei Anwendung des Dispergierstabs.

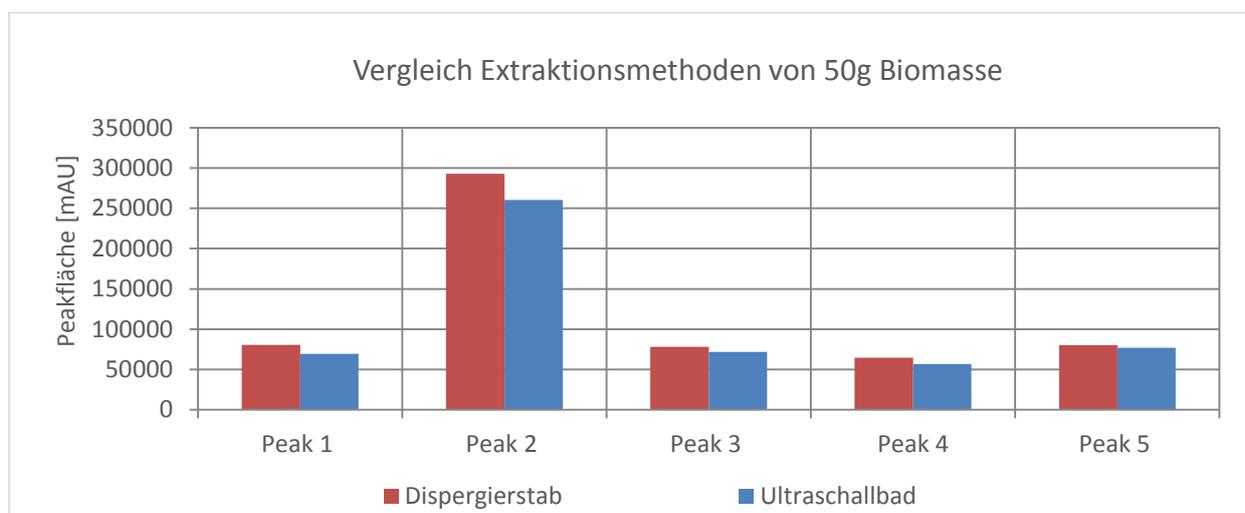


ABBILDUNG 35: SCALE-UP VERHÄLTNIS 1:10 STREPTOMYCES JCB7713

4.1.11 Versuch 12: Extraktion mit 80 % Aceton+ 20 % deionisiertem Wasser

In diesem Versuch wurde zur Extraktion der Proben ein binäres Gemisch aus 80 % Aceton und 20 % Wasser genutzt. Eine Homogenisierung der Proben erfolgte mit einem Dispergierstab für 15 s. In der Abbildung 36 wird die Ausbeute der Phenelfamycine bei einer Extraktion mit Aceton (100 %) und dem Aceton- Wasser-Gemisch dargestellt. Aus den Daten wird eine deutliche Ausbeutesteigerung von 70 % bei der Verwendung des polarereren Lösungsmittels ersichtlich. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um eine weitere Möglichkeit aufzuzeigen, die Extraktionsausbeute zu erhöhen. Die Polarität ist ein wesentlicher Faktor der Löslichkeit und somit auch der Extraktion. Ist die Substanz bekannt und deren Polarität, ist die Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels besonders für das Upscaling von Bedeutung. Für das Screening nach Sekundärmetaboliten ist die Verwendung von Aceton jedoch optimal, da es einen großen Polaritätsbereich abdeckt.

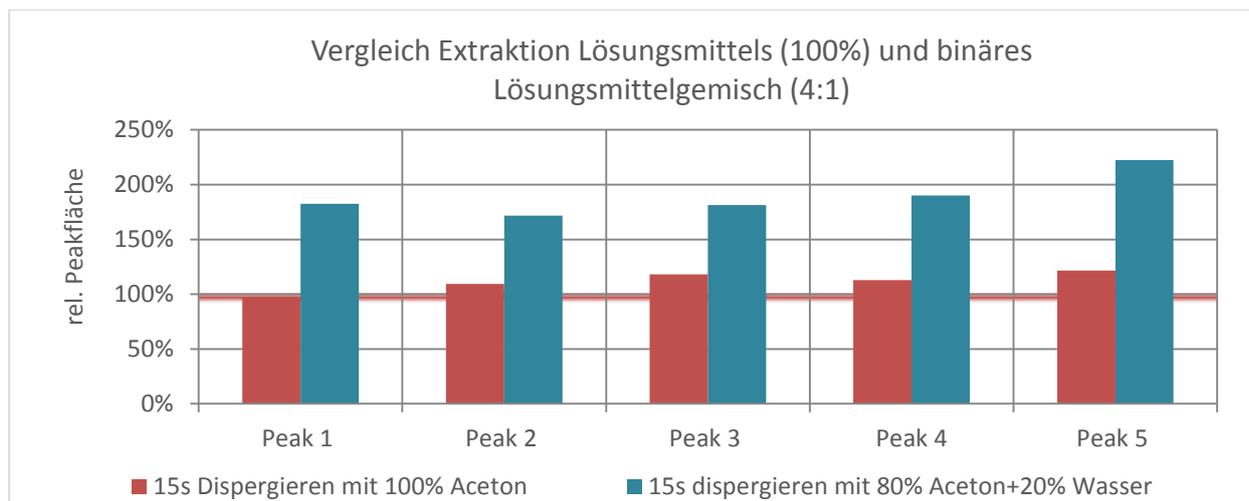


ABBILDUNG 36: VERGLEICH DER EXTRAKTIONEN MIT EINEM LÖSUNGSMITTEL UND EINEM LÖSUNGSMITTELGEMISCH STREPTOMYCES JCB7713

4.1.12 Methodenvergleich und deren Bewertung

In dem vorangegangenen Abschnitt wurden die Ergebnisse für die einzelnen Versuche zur Extraktion des Myzels vom *Streptomyces* JCB7713 dargestellt. In diesem Abschnitt erfolgt ein Vergleich zwischen den einzelnen Methoden. Dafür wird in den nachfolgenden Diagrammen aufgezeigt, wie sich die Extraktionsausbeuten der einzelnen Phenelfamycine hinsichtlich der verwendeten Homogenisierungsmethoden unterscheiden.

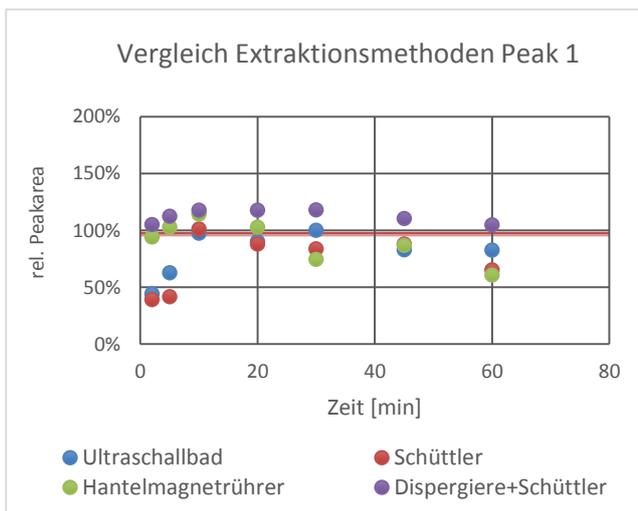


ABBILDUNG 37: VERGLEICH EXTRAKTIONSMETHODEN PEAK 1 STREPTOMYCES JCB7713

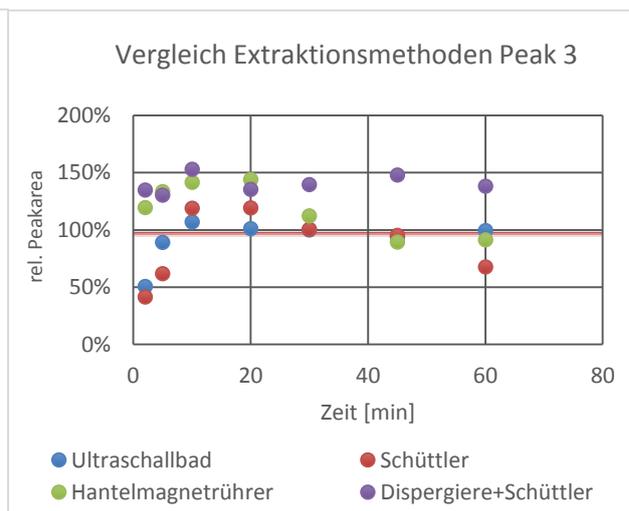
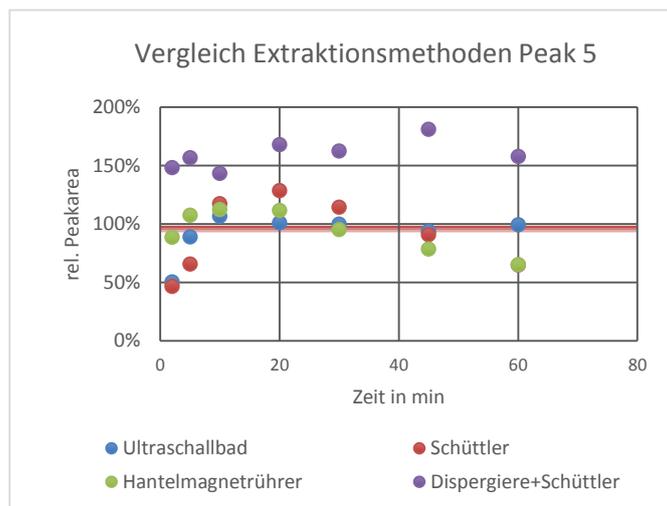


ABBILDUNG 38: VERGLEICH EXTRAKTIONSMETHODEN PEAK 3 STREPTOMYCES JCB7713



**ABBILDUNG 39: VERGLEICH EXTRAKTIONSMETHODEN PEAK 5
STREPTOMYCES JCB7713**

Standardmäßig wird in der Arbeitsgruppe MWIS das Ultraschallbad mit einer Einwirkzeit von 30 min zur Homogenisierung des Lösungsmittels und Myzels eingesetzt. Für die Naturstoffgruppe der Phenelfamycine konnte jedoch eine ausreichende Einwirkzeit von 10 min zum maximalen Gewinn nachgewiesen werden. Bei längeren Einwirkzeiten ist ein Verlust der Ausbeute zu verzeichnen. Eine bessere Möglichkeit zum Homogenisieren des Myzels ist die Verwendung eines Dispergierstabs. In den Diagrammen sticht diese Methode deutlich durch eine höhere Ausbeute hervor. Nach 10 min der Einwirkzeit konnte durch diese Methode ca. 48% mehr aller Phenelfamycine gewonnen werden als durch die Homogenisierung mittels 30-minütiger Ultraschallbadbehandlung. Für die Aufarbeitung des Myzels vom *Streptomyces* JCB7713 ist es daher vom Vorteil einen Dispergierstab zur Durchmischung der Biomasse und des Lösungsmittels zu verwenden. Die Notwendigkeit der nachträglichen Einwirkung auf einem Laborschüttler richtet sich nach dem Ziel des Downstream-Prozesses. Benötigt man eine maximale Ausbeute so wäre die nachträgliche Einwirkzeit zweckmäßig. Besonders für qualitative Analysen von Kultivierungsverläufen oder von Screening- bzw. Vergleichskultivierungen im Schüttelkolben wäre es aber auch sachdienlich, den zusätzlichen Arbeitsaufwand einzusparen.

Bei der Verwendung eines Dispergierstabs konnte zudem nachgewiesen werden, dass vermutlich aufgrund der hohen Strömungsgeschwindigkeiten die variierten Solventvolumen keinen Einfluss wie beim Ultraschallbad auf die Substanzausbeute haben. Trotz dem geringeren Volumen an 10 ml Aceton bei Verwendung des Dispergierstabs ist die Ausbeute um 32 % gesteigert wurden im Verhältnis zur Standardmethodik. Bei gleichen Einwirkzeiten wurde kein Unterschied zwischen dem zweifachen Volumen an Lösungsmittel und dem achtzehnfachen Volumen an Lösungsmittel

im Verhältnis zur Biomasse festgestellt. Lediglich bei demselben Volumen an Aceton wurde eine geringere Ausbeute festgestellt, was einerseits durch den hohen Verlust des Extraktes am Werkstück zu erklären ist oder einer gesättigten Lösung bei dem geringen Lösungsmittelvolumen.

Der Versuch der Stufenextraktion zeigte, dass die prozentuale Ausbeute der Phenelfamycine bei einer zweifachen Extraktion des Myzels etwas steigt. Betrachtet man jedoch die absoluten Werte, ist zu erkennen, dass die gleiche Ausbeute erreicht wird wie bei einer Behandlung mit dem Dispergierstab mit anschließender Einwirkung auf einem Schüttler. Die Stufenextraktion stellt mit dem 20-minütigem Zentrifugieren sowie dem doppelten Verbrauch an Aceton einen hohen zeitlichen und materiellen Aufwand dar. Aus diesem Grund sollten zur effizienten Erzielung einer maximalen Ausbeute die Proben nach der Behandlung mit dem Dispergierstab eine Einwirkung auf einem Schüttler erfolgen.

Ein Überblick über die durchgeführten Methodenvariationen mit den maximalsten Ausbeuten wird zur Veranschaulichung in Abbildung 40 ins Verhältnis zur Standardmethodik gesetzt. Dabei wird für jede Variation der gesamte Arbeitsaufwand zur Extraktion der Sekundärmetabolite betrachtet, die Kosten an Lösungsmittel und die Ausbeute. 100% der Standardmethodik entsprechen einem Arbeitsaufwand von insgesamt 100 min zur Herstellung eines Extraktes und Kosten an Aceton von 0,07 Euro.

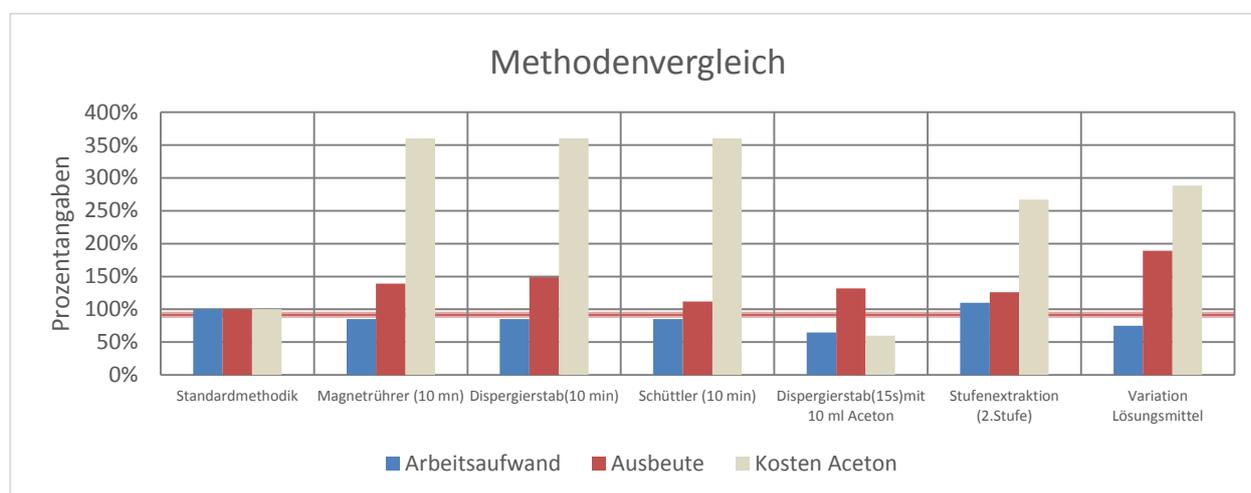


ABBILDUNG 40: METHODENVERGLEICH ZUR AUFARBEITUNG DES STREPTOMYCES JCB7731

4.2 Versuch zur Aufarbeitung des Myzels von *Hypoxylon rickii* MUCL 53309

In dem nachstehenden Chromatogramm sind die im UV/VIS- adsorbierenden Substanzen des Rohextraktes aus dem Myzel von dem filamentösen Pilz *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 zu erkennen. Zur Quantifizierung der Ausbeuten sollen die in dem beispielhaften Chromatogramm (Abbildung 41) markierten neun Peaks verwendet werden. Diese wurden ausgewählt um die Extraktion von Substanzen über einen großen Polaritätsbereich zu vergleichen. Den ersten vier Peaks konnte durch einen Massenvergleich mit hoher Zuverlässigkeit Sekundärmetaboliten zugeordnet werden, deren Veröffentlichung jedoch noch aussteht. Den Peaks 5-9 kann keine bekannte Substanz zugeordnet werden. Aufgrund der hohen Hydrophobie sowie der gleichmäßigen Fragmentierung der negativen Ionen im Massenspektrum könnte eine Folgerung sein, dass es sich bei den Peaks 7-9 um Fettsäuren aus dem Zellinneren oder der Zellwand handelt. Fettsäuren sind als Phospholipide essentielle Bestandteile von Zellmembranen und als Triacylglyceride Energiespeicher für Organismen. Doch sind nur sehr wenige freie Fettsäuren wie die Sorbinsäure und Cyclopentensäuren bekannt, die konservierend oder sogar antibiotisch wirken können (Habermehl 2002). Aus diesem Grund sind die Peaks mit hoher Unpolarität für die Antibiotikaforschung weniger relevant.

Besonders in der Pharmabranche ist neben einer hohen Ausbeute wichtig, das Produkt in hoher Reinheit durch eine Optimierung des Downstream- Prozesses zu erhalten. Beide Ziele beeinflussen sich meistens gegenseitig, da viele Reinigungsschritte oft einen Wertproduktverlust mit sich bringen. Auch hier muss ein Gleichgewicht zwischen den Kosten und des Aufwandes hinsichtlich des Zieles gefunden werden. Bei der Auswertung der Extraktionen vom Myzel des *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 werden die unpolaren Peaks (5 -9) als verunreinigende Substanzen betrachtet, deren Elution möglichst vermieden werden sollte.

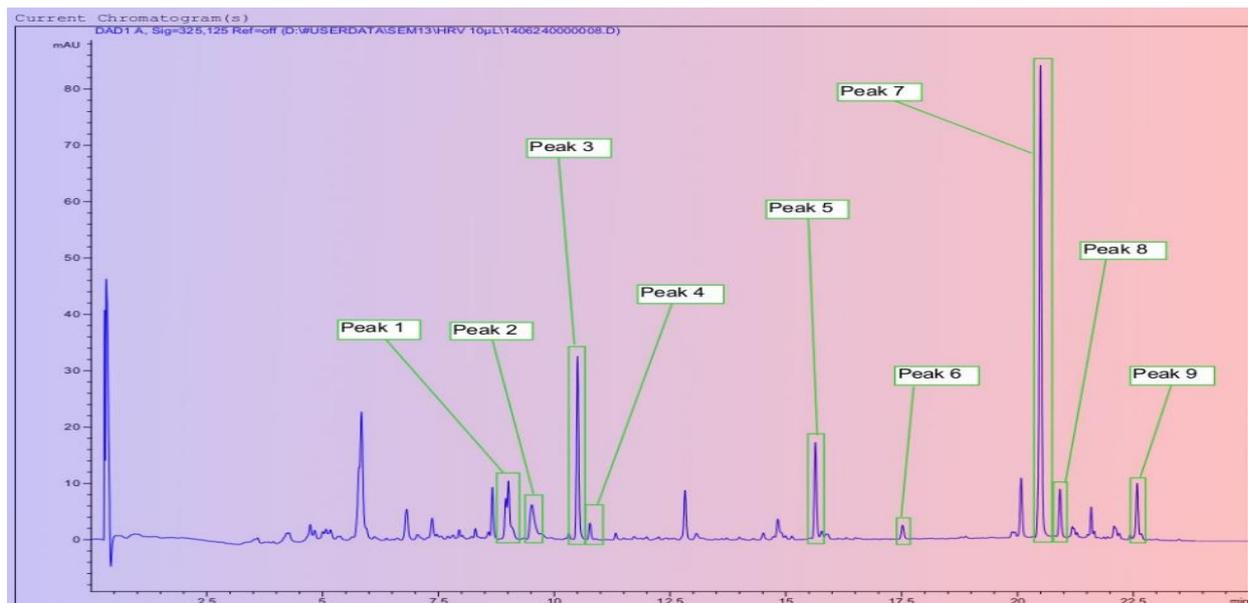


ABBILDUNG 41: CHROMATOGRAMM MYZELEXTRAKT *HYPOXYLON RICKII* MUCL 53309, POLARITÄTSGRADIENT IM HINTERGRUND EINGEFÜGT (BLAU SEHR POLAR, ROT SEHR UNPOLAR)

4.2.1 Versuch 1: Vergleich Extraktion frischer und aufgetauter Biomasse

Mithilfe des Versuches soll die Extraktion von drei Proben frisch geernteter Biomasse mit drei Proben aufgetauter Biomasse verglichen werden. Wie in der nachfolgenden Abbildung 42 zu erkennen ist, sind die Abweichungen zwischen drei gleich aufgearbeiteten Proben sehr hoch. Gründe hierfür werden ausführlicher in der Fehlerbetrachtung unter dem Punkt 5.3 dargelegt. Trotz der Schwankungen lässt sich tendenziell aus der Abbildung 42 ableiten, dass die hydrophileren Peaks (1-4), unter Vernachlässigung der ersten Probe, 15 % mehr extrahiert werden konnten, als die Biomasse frisch geerntet war. Dagegen konnten die unpolaren Peaks 37 % besser extrahiert werden, als die Proben zuvor tiefgefroren waren. Begründet werden könnte die Beobachtung damit, dass die Zellwände durch die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren zum Teil zerstört werden. Folglich würden die Zellen im Ultraschallbad stärker dazu neigen aufzubrechen und eine vermehrte Elution von intrazellulären Substanzen wäre gegeben.

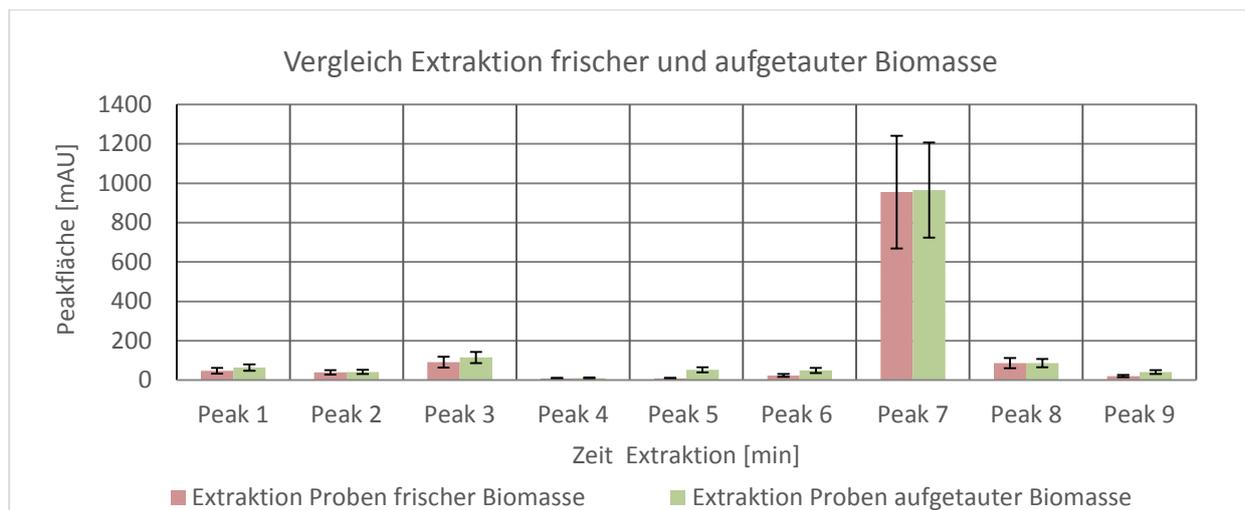


ABBILDUNG 42: VERGLEICH EXTRAKTION FRISCHER UND AUFGETAUTER BIOMASSE *H. RICKII* MUCL 53309

4.2.2 Versuch 2: Extraktionskinetik Ultraschallbad

In diesem Versuch wurde die Substanzausbeute bei verschiedenen Einwirkungszeiten im Ultraschallbad untersucht. Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, schwanken die Werte der polaren Peaks um einen gleichbleibenden Mittelwert schon ab der zweiten Minute. Diese Substanzen scheinen sehr schnell in das Lösungsmittel überzugehen. Bei den lipophileren Peaks (5-9) ist kein eindeutiges Sättigungsverhalten zu erkennen, was einerseits möglich durch den andauernden Zellaufschluss ist. Besonders die Werte der 10. Minute und 60. Minute sind unverhältnismäßig.

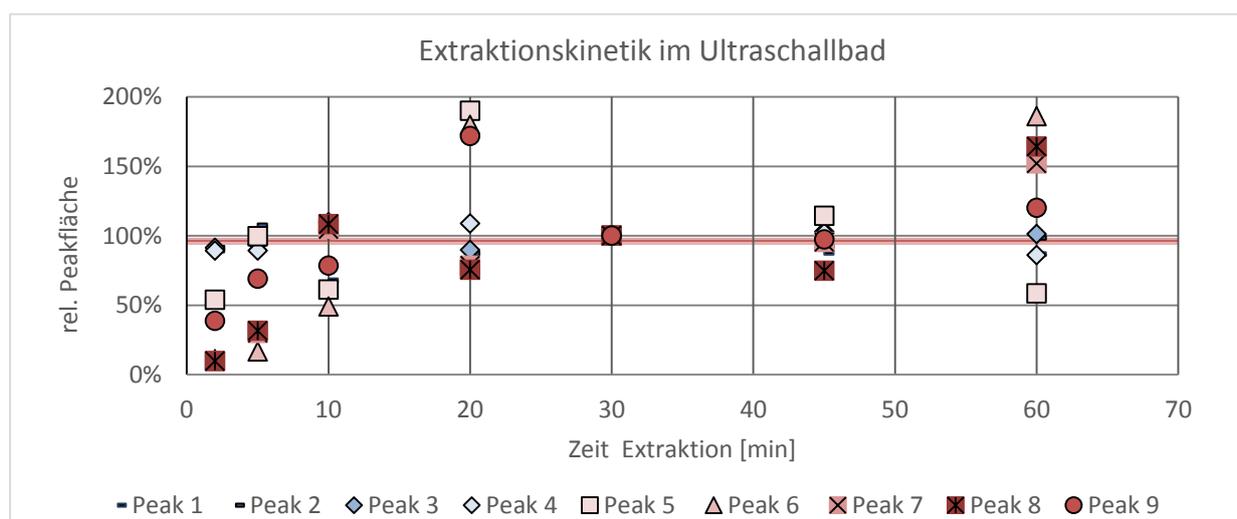


ABBILDUNG 43: EXTRAKTIONSKINETIK ULTRASCHALLBAD *H. RICKII* MUCL 53309

4.2.3 Versuch 3: Extraktionskinetik Magnetrührer

In diesem Versuch wurde die Substanzausbeute hinsichtlich ihrer Einwirkungszeit untersucht, während die Proben mithilfe eines Rührstabs homogenisiert wurden. Wie schon in den vorangegangenen Versuchen kann aus der Abbildung 44 abgeleitet werden, dass die hydrophileren Peaks von Beginn an der Messung gänzlich extrahiert waren. Die lipophileren Peaks dagegen erst zu einem späteren Zeitpunkt. Eine vereinheitlichende Aussage zum Sättigungsverhalten der Peaks 5-9 kann bei diesem Versuch auch nicht erfolgen, da unverhältnismäßige Schwankungen auftreten, deren Ursache im Rahmen dieser Ausarbeitung nicht geklärt werden konnte. Besonders die Werte aller Peaks bei der fünften Probe (30-minütige Einwirkzeit) weichen von den erwarteten Werten ab.

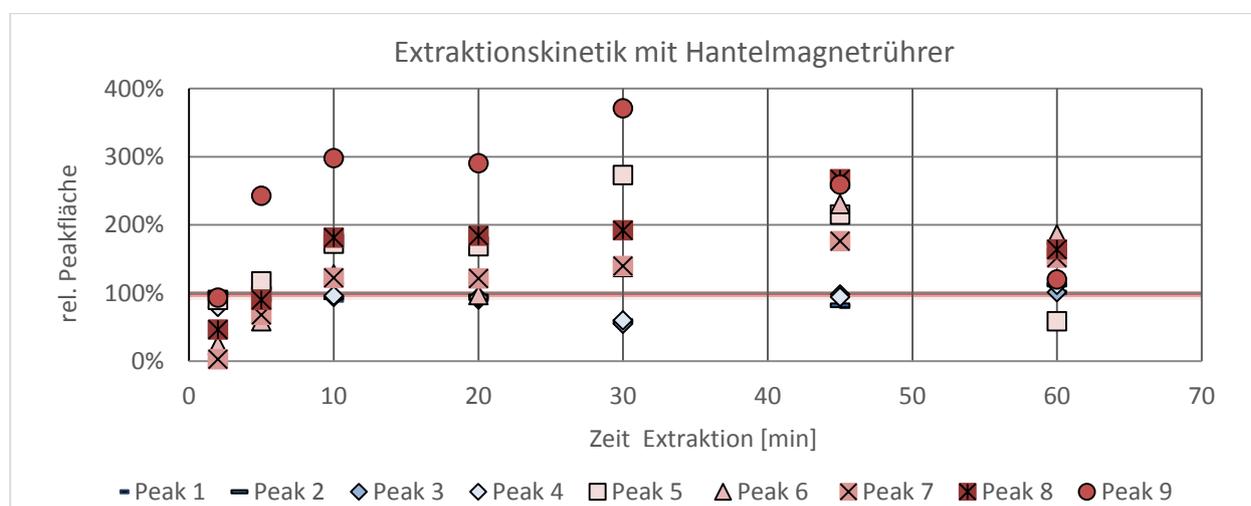


ABBILDUNG 44: EXTRAKTIONSKINETIK MAGNETRÜHRER *H. RICKII* MUCL 53309

4.2.4 Versuch 4: Extraktionskinetik Dispergierstab + Schüttler

Bei diesem Versuch wurden die Proben nach dem Homogenisieren mittels Dispergierstab auf einen Schüttler zur nachträglichen Einwirkung gestellt. Die nachfolgende Abbildung 45 zeigt, dass alle Peaks, nach den 15 Sekunden des Homogenisierens bereits im Mittel zu 61 % extrahiert wurden. Die Extraktionsausbeute der lipophileren Peaks nimmt mit der Zeit zu, doch ist auch hier kein eindeutiger Sättigungsverlauf der Substanzen durch Schwankungen zu erkennen. Im Vergleich zu der Standardmethodik wurde ein Produktverlust von 33% festgestellt.

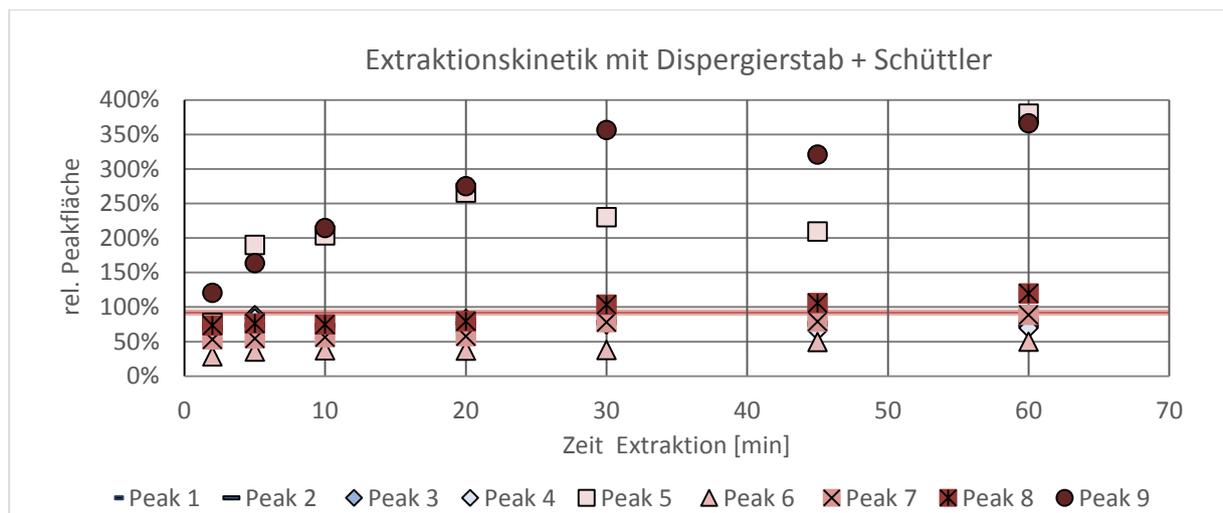


ABBILDUNG 45:EXTRAKTIONSKINETIK DISPERGIERSTAB + SCHÜTTLER H. RICKII MUCL 53309

4.2.5 Versuch 7: Variation Einwirkung Dispergierstab

Bei diesem Versuch wurde die Biomasse unterschiedlich lang dispergiert. Die Variation der Einwirkzeiten auf das Pilzmyzel ist in der nachstehenden Abbildung 46 zu sehen. Erwartet wurde eine deutliche Zunahme der unpolaren Substanzen durch einen sehr hohen Leistungseintrag, was sich tendenziell auch beobachten lässt. Nur tendenziell, da, wie schon zuvor beobachtet, starke Schwankungen besonders der Werte der unpolaren Peakflächen auftreten. Da die Werte der anderthalb minütigen Homogenisierung deutlich niedriger als die vorherigen Werte liegen, wurde nachträglich untersucht, ob Temperaturerhöhungen durch den mechanischen Energieeintrag oder pH-Wert-Änderungen durch den Zellaufschluss stattfinden und damit die Extraktionsverhältnisse verschieben. Mithilfe eines Thermometers konnte ein Gesamtanstieg der Temperatur in den 90 s um 3,1 Kelvin nachgewiesen werden. Da der pH-Wert nur für wässrige Lösungen definiert ist, wurde die Untersuchung der pH-Werts mit Wasser durchgeführt. Die Teststreifen zeigen jedoch keine Änderung des Farbumschlags. Aufgrund der geringen Änderungen der Temperatur und kein Hinweis auf Änderung des pH-Werts zu erkennen ist, scheint ein Einfluss dieser physikalischen Größen auf die Werte der Extraktion kaum zu bestehen.

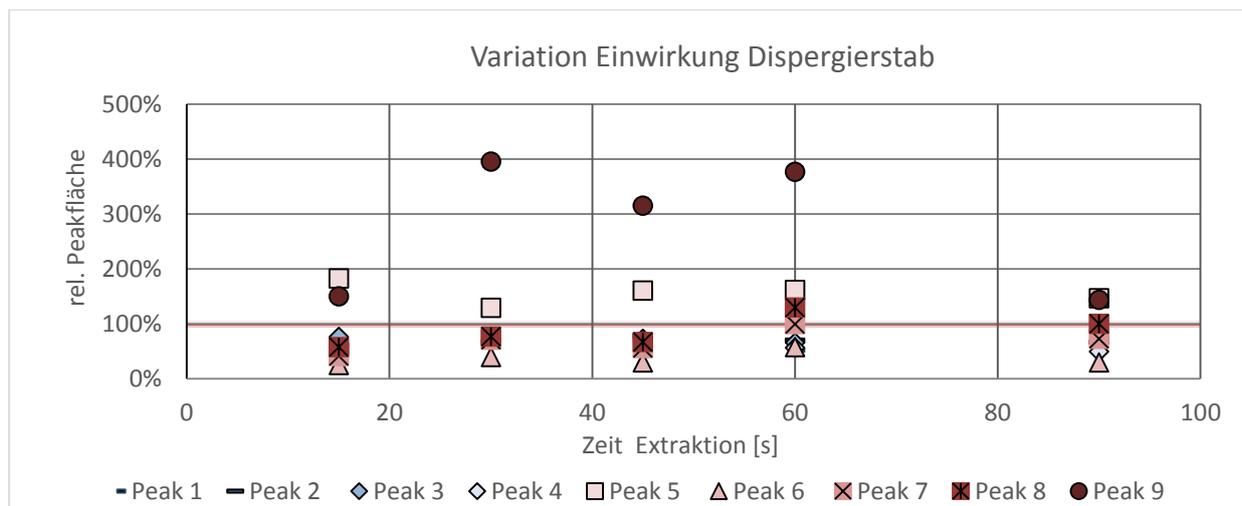


ABBILDUNG 46: VARIATION EINWIRKUNG DISPERGIERSTAB

4.2.6 Versuch 12: Extraktion mit 80% Aceton und 20% deionisiertem Wasser

Dieser Versuch soll aufzeigen, dass es möglich ist, mithilfe eines hydrophileren Lösungsmittels die Aufnahme der unpolaren Substanzen zu vermindern. Wie in der Abbildung 47 zu sehen ist, konnten die Peaks 1-6 um durchschnittlich 70 % mehr extrahiert werden mit dem polareren Lösungsmittel, als bei der Verwendung von 100 %-igen Aceton. Die Peaks 7-9 dagegen wurden durchschnittlich um 46 % schlechter extrahiert. Die Produkte wurden mit dem polareren Lösungsmittels trotz der Verwendung eines Dispergierstabs genauso viel extrahiert wie in der Standardmethodik. Auch hier ist, analog zum *Streptomyces* JCB7713, die Bedeutung der Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels für den Up Scale hinsichtlich einer Zielsubstanz zu sehen.

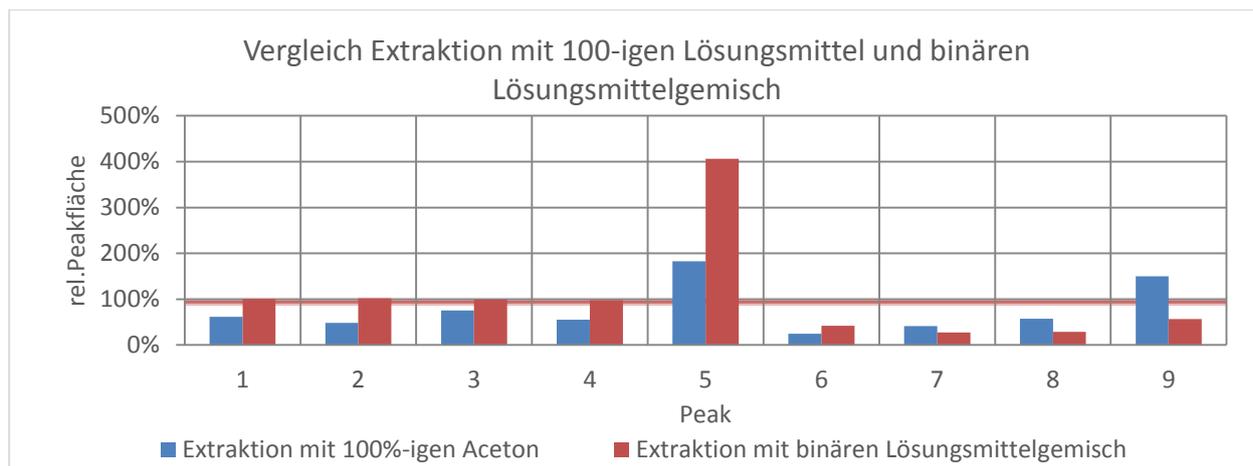


ABBILDUNG 47: EXTRAKTION MIT BINÄREN LÖSUNGSMITTELGEMISCH H .RICKII MUCL 53309

4.2.7 Methodenvergleich

Im Gegensatz zum *Streptomyces* JCB7713 scheinen deutlich mehr Substanzen, besonders im unpolaren Bereich, an den Extraktionsprozessen Teil zu haben. Ungewiss ist zu einem wie sich die Löslichkeiten der polaren Produkte verhalten, wenn in Abhängigkeit der Zeit immer mehr unpolare Substanzen eluieren. Möglich ist, dass diese die Aufnahme der polaren Produkte vermindern. Der Vergleich der Homogenisierungsmethoden soll anhand der nachstehenden Abbildungen 48, 49 und 50 erfolgen. Die Verläufe der Extraktionen des ersten Peaks und des dritten Peaks zeigen, dass die Ausbeute der Aufarbeitungsmethoden mittels Ultraschallbads und Rührstabs relativ ähnlich sind.

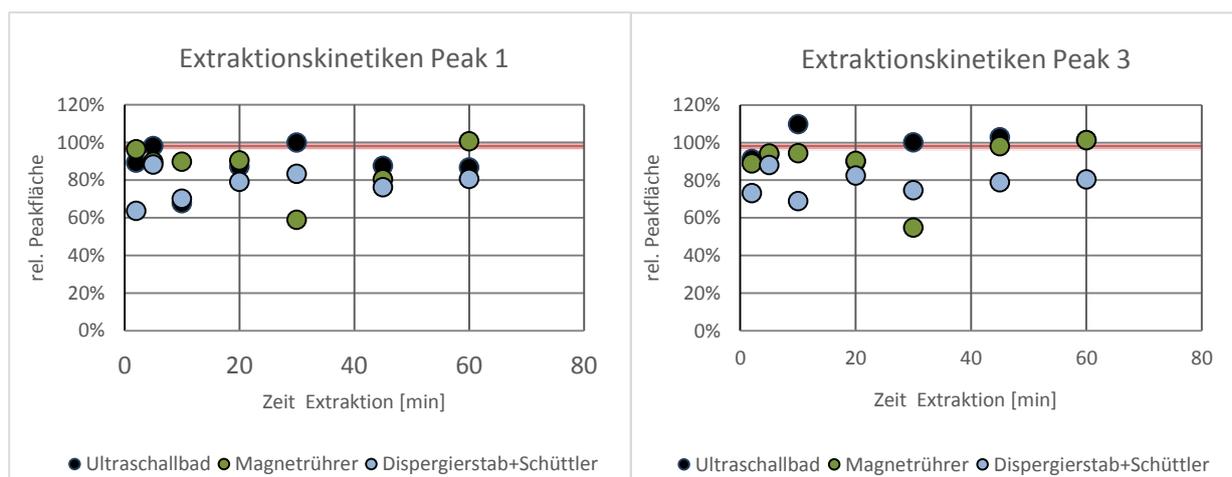


ABBILDUNG 48: METHODENVERGLEICH PEAK 1

ABBILDUNG 49: METHODENVERGLEICH PEAK 3

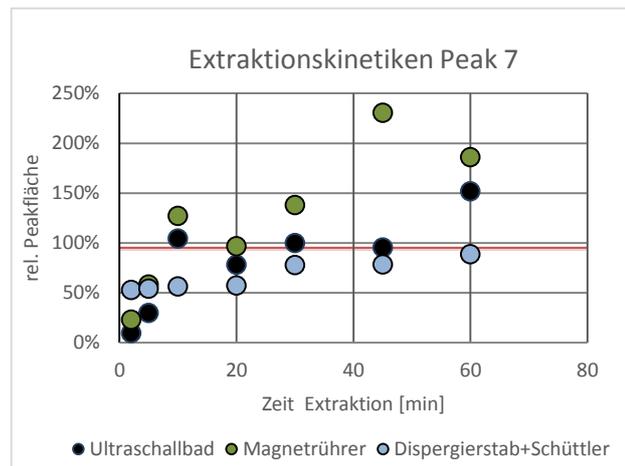


ABBILDUNG 50:METHODENVERGLEICH PEAK 7

Mit durchschnittlich 33 % weniger Ausbeute im Vergleich zur Standardmethodik steht die Extraktionsausbeute des Dispergierstabs. Eine Erklärung dafür könnte in dem kurzfristig hohen Leistungseintrag gleich zu Beginn des Prozesses zu finden sein. Die Aufnahme der lipophilen Stoffe ist somit von Beginn an der Extraktion gegeben. Dieser Unterschied könnte sich daher durch Verdrängungen der einzelnen Substanzen untereinander äußern oder durch eine andere Beeinflussung der Diffusionsprozesse. Dieser sollte in weiteren Untersuchungen nochmals überprüft werden.

Auffällig ist zudem, dass die Elution der unpolaren Peaks bei dem Rührstab und dem Ultraschallbad mit der Zeit deutlich zunimmt. Der Anstieg der Substanzausbeute beim Dispergierstab ist verhältnismäßig gering. Vermutlich reicht der Zellaufschluss bei dem kurzen Leistungseintrag nicht aus, um die Zellen gänzlich aufzuschließen, weshalb die unpolaren Substanzen mit zunehmender Zeit nicht so stark extrahiert werden, wie bei einem dauernden Eintrag.

4.3 Fehlerbetrachtung der Biomasseaufarbeitung

Aufgrund auftretender zufälliger und meist auch systematischer Fehler ist es nicht möglich ein exakt gleiches Ergebnis zu reproduzieren. Um zu erkennen, wie zuverlässig die gewonnenen Angaben aus Experimenten sind, ist es daher immer wichtig, bei Gegenüberstellungen die Fehler der einzelnen Proben miteinzubeziehen. In der Praktikumsarbeit von Müller 2014 wurde eine ausführliche Fehlerbetrachtung der Extraktion von Biomasse für die Standardmethodik erläutert.

Für drei Proben des *Streptomyces* JCB7713 wurde im Durchschnitt eine RSD von 8,6 % festgestellt. Dies entspricht den Ergebnissen der Voruntersuchungen. Im Gegensatz dazu stehen die relativen Standardabweichungen der Aufarbeitungen des *Hypoxylon rickii* MUCL 53309. Hier erhält man für die vier Dreifachbestimmungen der Aufarbeitungen mittels Ultraschallbad eine RSD von 25 %, wovon sich die polaren Peaks um ca. 10 % unterscheiden und die lipophileren Peaks um 30-40 %. Für die drei Dreifachbestimmungen der Aufarbeitung mittels Handmagnetrührer und für die Aufarbeitung mithilfe eines Dispergierstabs erhält man Werte von 20 %.

Diese hohen Abweichungen spiegeln sich auch in den Versuchsergebnissen beim *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 wider. Hier lassen die ermittelten Werte kaum eine zuverlässige Aussage über die Extraktionskinetiken und Methodenvergleiche zu. Aus Zeitgründen konnte keine Dreifachbestimmung aller Versuchspunkte erfolgen, sodass nur Tendenzen über das Elutionsverhältnis gemacht werden können.

Fraglich ist, woher diese hohen Standardabweichungen (Abbildung 51) bei der Aufarbeitung des *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 stammen. Da keine Veränderung der Methodendurchführung zum *Streptomyces* JCB7713 erfolgte, ist es wahrscheinlicher, dass die Variationen in der aufgearbeiteten Biomasse selbst teilweise zu finden sind. Möglicherweise unterscheiden sich die Aliquotes in den intrazellulären Substanzen. Fettsäuren und organische Substanzen liegen besonders dort vor, wo Wachstums- und Differenzierungsprozesse stattfinden. Das Myzel einer submersen Kultur besteht daher aus vielen unterschiedlich alten Hyphen (Weete 1982, S. 44), wodurch eine Variation des Gehaltes an Fetten und Fettsäuren in den Proben möglich ist. Zudem stellt die Probenahme eine weitere Fehlerquelle dar. Nach *Vauck & Müller* sollte eine Trocknung des Extraktionsgutes auf bis zu einem maximalen Wassergehalt von 10 % erfolgen, da das Wasser oder das Fluid die extraktive Wirkung des Lösungsmittels beeinflussen kann. Die Biomasse wurde in diesem Fall jedoch nicht vor der Behandlung getrocknet. Der Anteil der Biotrockenmasse für den *Streptomyces* JCB7713 beträgt im Mittelwert der frischen Proben 20,5 %. Deutlich feuchter ist das Myzel des Pilzes mit einem Biotrockenmasseanteil von durchschnittlich 9,6 %. Wahrscheinlich ist, dass eine Feuchtigkeitsvariation ebenfalls ausschlaggebend für die größere Standardabweichung der lipophileren Substanzen ist, da die intrazellulären Substanzen in der Biotrockenmasse vorhanden sind. Die Sekundärmetabolite sind nicht so sehr von der Biotrockenmasse abhängig, da sie auch in dem Feuchtfilm des Myzels vorhanden sein können.

Print of window 38: Current Chromatogram(s)

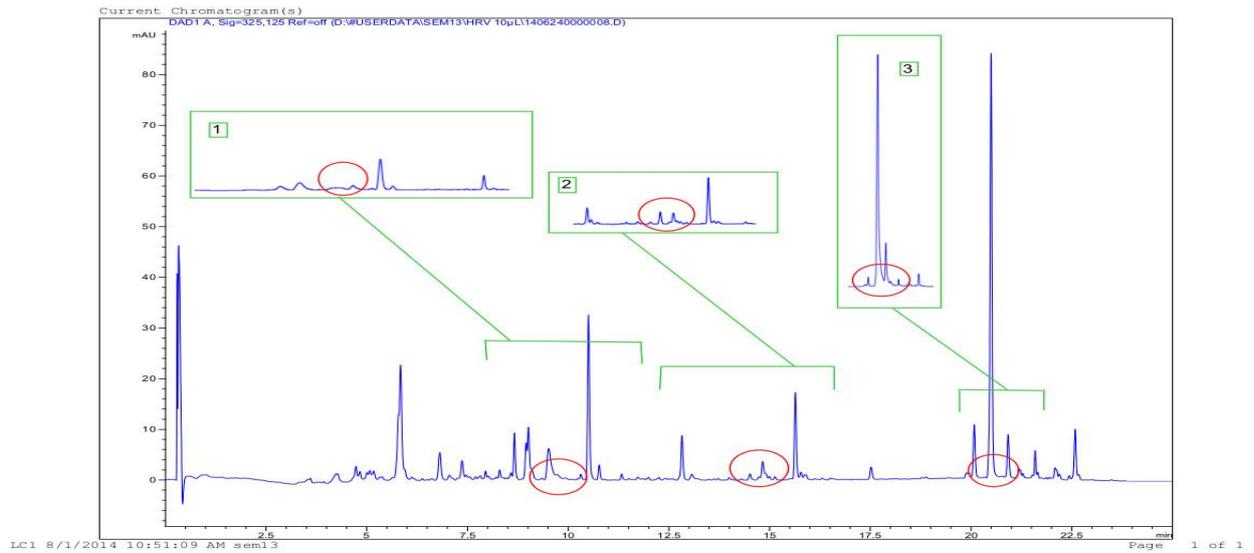


ABBILDUNG 51: ABWEICHUNGEN EXTRAKTIONEN BIOMASSE; BILD 1: EIN PEAK FEHLT GÄNZLICH; BILD 2: VERHÄLTNISSE DER PEAKS ZUEINANDER VARIIEREN; BILD 3: PEAKS VERSCHMELZEN MITEINANDER

4.4 Versuche zur Aufarbeitung des Adsorberharzes XAD16

Das Adsorberharz XAD16 wurde zur Gewinnung der Naturstoffgruppe der Elansolide aus einer Fermentation mit dem Bakterium *Chitinophaga sancti* FX7914 eingesetzt. Zur Desorption der Sekundärmetabolite wurde eine Feststoff- Flüssig- Extraktion mit einem binären Lösungsmittelgemisch aus Aceton und Essigsäure (99:1) eingesetzt. Die Extraktion soll einerseits hinsichtlich der Extraktionsausbeute bei verschiedenen Zeiten und Volumen bei ruhenden Phasen untersucht werden. Ein Vergleich wird gezogen zu den Ergebnissen bei einer Durchmischung des Extraktionsguts und Lösungsmittels mit Hilfe Schüttlers und mit Ergebnissen einer Temperaturerhöhung auf 40°C im Ultraschallbad. Diese Versuche erfolgen alle im Batchansatz. Weiterhin wird die Gewinnung der Elansolide mithilfe einer Festbettextraktion beurteilt. In dem folgenden, beispielhaften Chromatogramm (Abbildung 52) werden die quantifizierten Elansolide gezeigt:

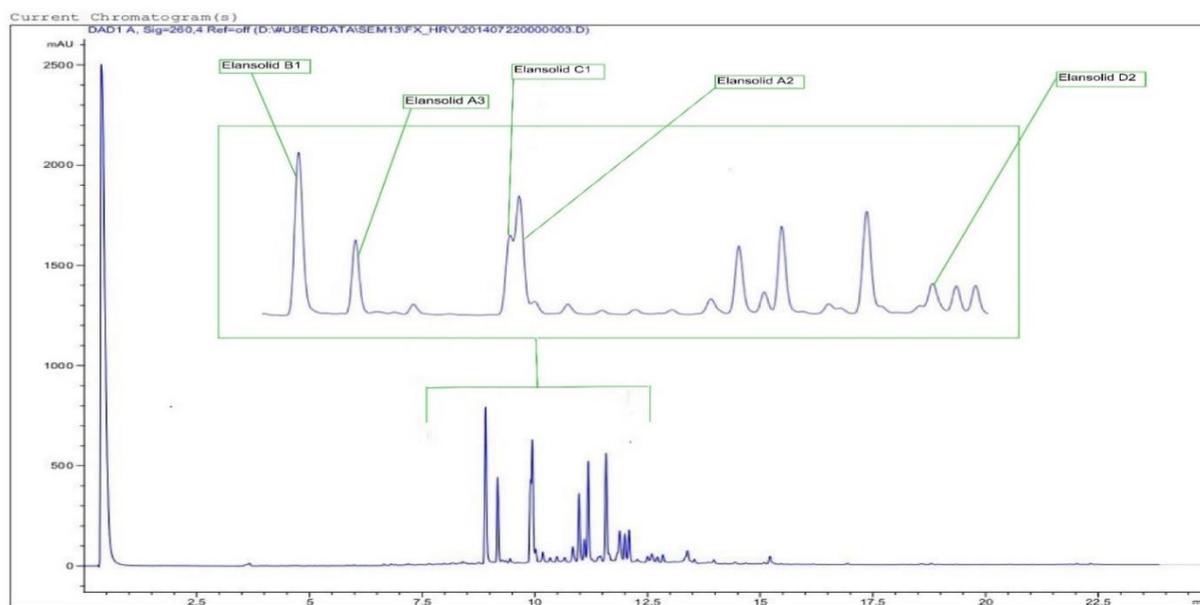


ABBILDUNG 52: CHROMATOGRAMM EXTRAKT CHITINOPHAGA SANCTI FX7914

4.4.1 Versuch 1: Ermittlung der relativen Standardabweichung

Zur Ermittlung der RSD wurden drei Proben mithilfe der Ausgangsmethodik (siehe 3.3.1) gleichermaßen extrahiert. Wie in dem nachfolgenden Diagramm (Abbildung 53) und aus Berechnungen der absoluten Werte hervorgeht, unterliegen der Methodik Schwankungen um einen Mittelwert der Peakflächen von ca. 9 %.

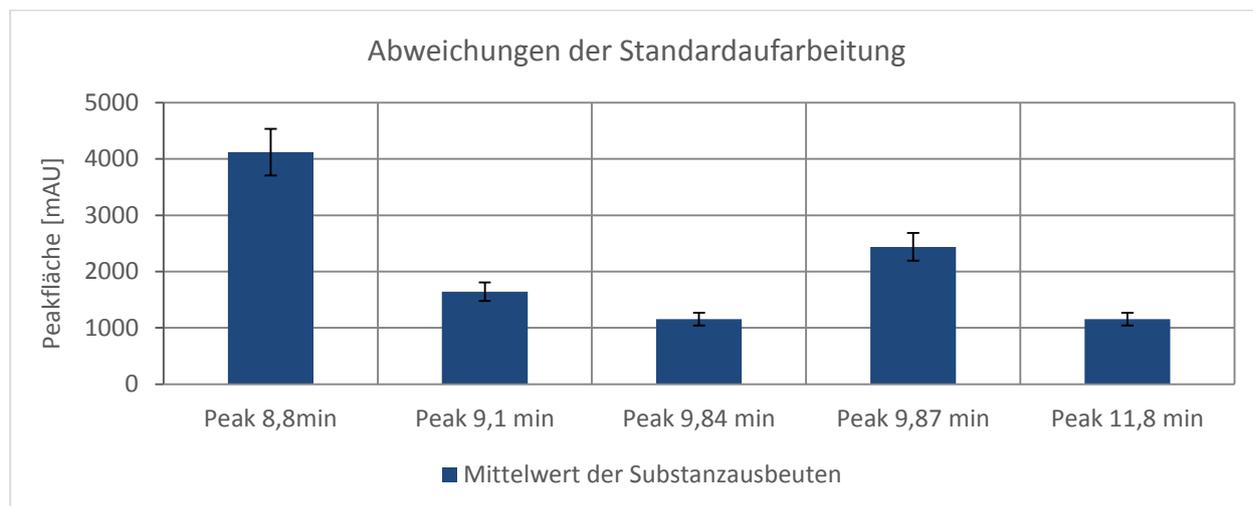


ABBILDUNG 53: AUFARBEITUNG 3 GLEICHER PROBEN XAD16

4.4.2 Versuch 2: Extraktionskinetik ohne Leistungseintrag

Die folgenden Diagramme (Abbildung 54, 55, 56) stellen die Extraktionsausbeuten aller Peakflächen in Abhängigkeit von der Zeit für unterschiedliche Lösemittelvolumen dar. Wie erwartet, lassen sich aus den Daten Sättigungsverläufe für die Elution der einzelnen Elansolide gewinnen. Bei den Verläufen ist jedoch auffällig, dass sich die Ausbeute-Zeit-Verhältnisse je nach Lösemittelvolumen unterscheiden. So ergibt sich nach einer Extraktionszeit von 10 min bei einem Lösemittelvolumen von 5 ml eine durchschnittliche Ausbeute aller Elansolide von 58 % der maximalen Ausbeute. Bei einem Volumen von 10 ml des binären Lösemittelgemisches wurden nach 10 min 82 % der maximalen Ausbeute erreicht und bei 20 ml Lösemittel 92 % der maximal zu erreichende Ausbeute an Elansoliden. An diesen Werten wird deutlich, dass die Extraktionsgeschwindigkeit abhängig ist von den Konzentrationsgradienten der zu lösenden Komponenten. In einem geringen Volumen ist der Diffusionsweg der Wertekomponenten relativ kurz und das Verhältnis zwischen der Konzentration der Substanzen im Lösungsmittel und der Konzentration der Komponenten im Feststoff an der Phasengrenzfläche geringer, sodass die Triebkraft für den molekularen Stofftransport verringert ist. Ist mehr Lösungsmittel vorhanden, wird der Konzentrationsgradient länger erhalten, wodurch eine Erhöhung des Ausbeute-Zeit-

Verhältnisses stattfindet. Weiterhin ist zu verzeichnen, dass sich die Ausbeuterelationen zur Standardmethodik für jedes Volumen unterschiedlich verhalten. Durchschnittlich liegen die Werte der Extraktion ohne einen Leistungseintrag für 5 ml an Lösungsmittel mit 20 % unterhalb der Standardaufarbeitungsmethodik. Die Werte der Aufarbeitung mit 10 ml Aceton dagegen zeigen eine Steigerung von 8 % und mit 20 ml Lösungsmittel konnten die Ausbeute um 23 % gesteigert werden.

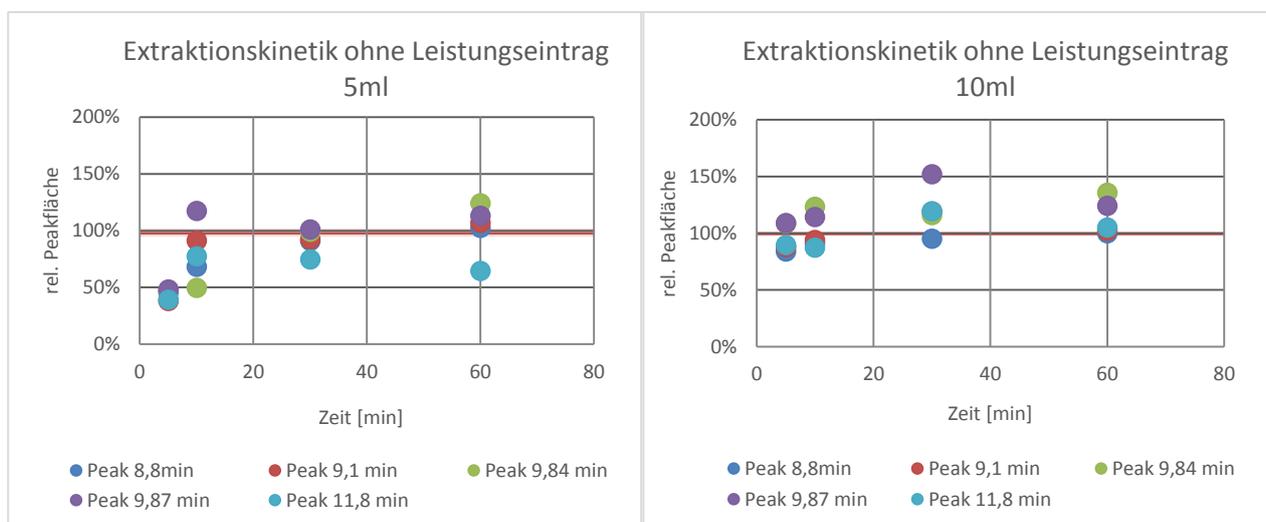


ABBILDUNG 54: EXTRAKTIONSKINETIK XAD16 OHNE LEISTUNGSEINTRAG 5ML LÖSUNGSMITTELVOLUMEN

ABBILDUNG 55: EXTRAKTIONSKINETIK XAD16 OHNE LEISTUNGSEINTRAG 10ML LÖSUNGSMITTELVOLUMEN

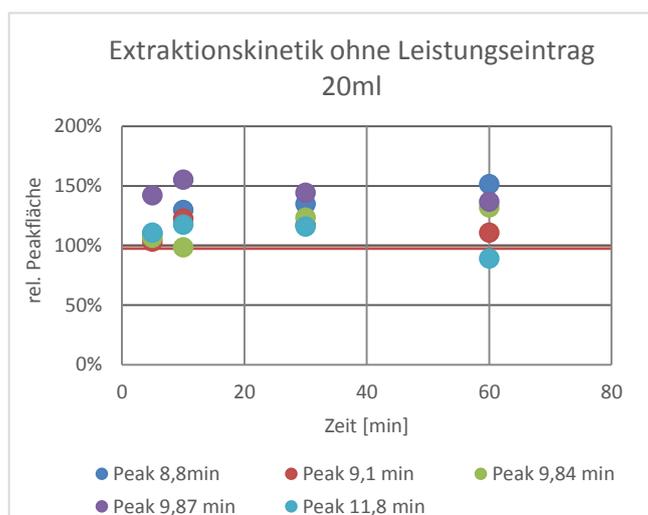
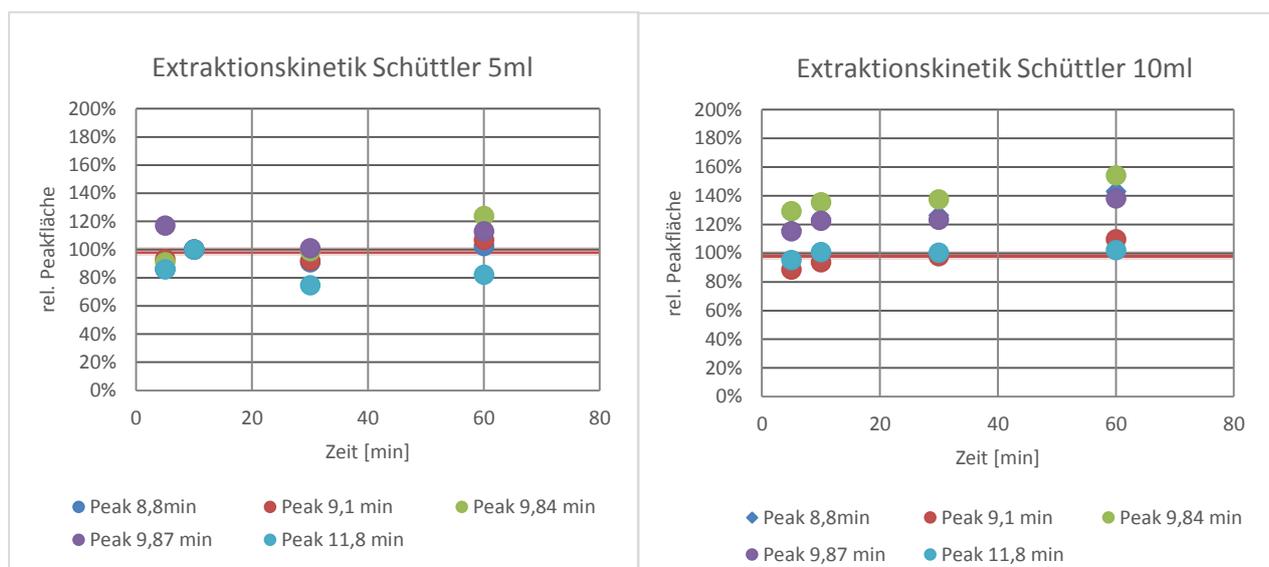


ABBILDUNG 56: EXTRAKTIONSKINETIK XAD16 OHNE LEISTUNGSEINTRAG 20ML LÖSUNGSMITTELVOLUMEN

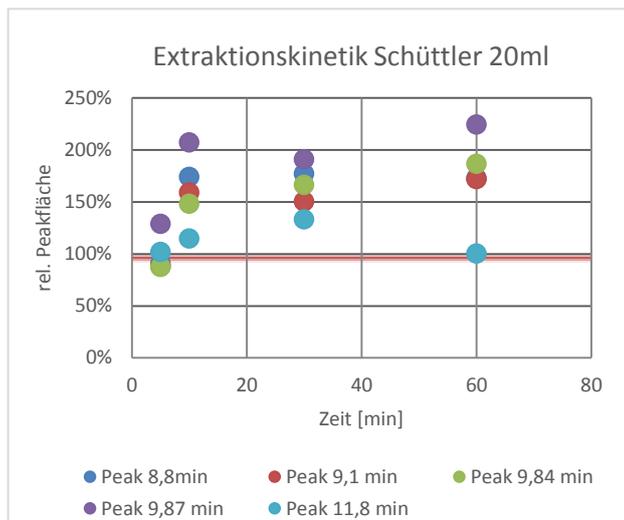
4.4.3 Versuch 3: Extraktionskinetik Schüttler

In diesem Versuch wurde die Extraktionskinetik zur Desorption der Elansolide untersucht, während das Extraktionsgut mittels Schüttler bewegt wurde. In den nachfolgenden Diagrammen (Abbildungen 57-59) ist das Elutionsverhalten der Elansolide in verschiedenen Lösungsmittelvolumen zu erkennen. Bei jedem Volumen ist nach zehn Minuten im Durchschnitt 90 % der maximalen Sättigung erreicht. Im Gegensatz zur unbewegten Methode dient, die durch den Schüttler erzeugte Strömung des Lösemittels, dazu, die Dicke der Prandtl- Grenzschicht zu verringern. Weiterhin ist zu verzeichnen, dass sich die Ausbeuterelationen zur Standardmethodik für jedes Volumen unterschiedlich verhalten. Durchschnittlich liegen die Werte der Extraktion mit einem Leistungseintrag mittels Schüttler für 5 ml an Lösungsmittel mit 2 % unterhalb der Standardaufarbeitungsmethodik. Die Werte der Aufarbeitung mit 10 ml Aceton dagegen zeigen eine Steigerung von 18 % und mit 20 ml Lösungsmittel konnten die Ausbeute um 49 % gesteigert werden.



**ABBILDUNG 57:EXTRAKTIONSKINETIK XAD16 SCHÜTTLER
5ML LÖSUNGSMITTEL**

**ABBILDUNG 58: EXTRAKTIONSKINETIK XAD16
SCHÜTTLER 10ML LÖSUNGSMITTEL**



**ABBILDUNG 59: EXTRAKTIONS KINETIK XAD16 SCHÜTTLER 20ML
LÖSUNGSMITTEL**

4.4.4 Versuch 4: Extraktionskinetik Ultraschallbad

Die Werte der Substanzausbeuten bei der Extraktion im Ultraschallbad schwanken sehr, weshalb kein erwarteter Sättigungsverlauf für alle Peaks zu erkennen ist. Eine Ursache der Schwankungen kann in der Verschiebung der Löslichkeitsgleichgewichte und den Diffusionsprozessen durch die Temperaturgradienten im Lösungsmittel und die Erwärmung des Adsorberharz zu finden sein. Aus den Kinetiken der nachfolgenden Diagramme (Abbildung 60, 61, 62) lässt sich zudem ablesen, dass die Geschwindigkeit der Extraktion der Substanzen mit einem geringeren Lösungsmittelvolumen zunimmt, was mit einer schnelleren Erwärmung des geringeren Lösungsmittelvolumens in einem Zusammenhang stehen könnte. Weiterhin ist zu verzeichnen, dass sich die Ausbeuterelationen zur Standardmethodik für jedes Volumen unterschiedlich verhalten. Durchschnittlich liegen die Werte der Extraktion mit einem Leistungseintrag mittels Schüttler für 5 ml an Lösungsmittel mit 30 % oberhalb der Standardaufarbeitungsmethodik. Die Werte der Aufarbeitung mit 10 ml Aceton zeigen eine durchschnittliche Steigerung von 33 % und mit 20 ml Lösungsmittel konnten die Ausbeute um 60 % gesteigert werden.

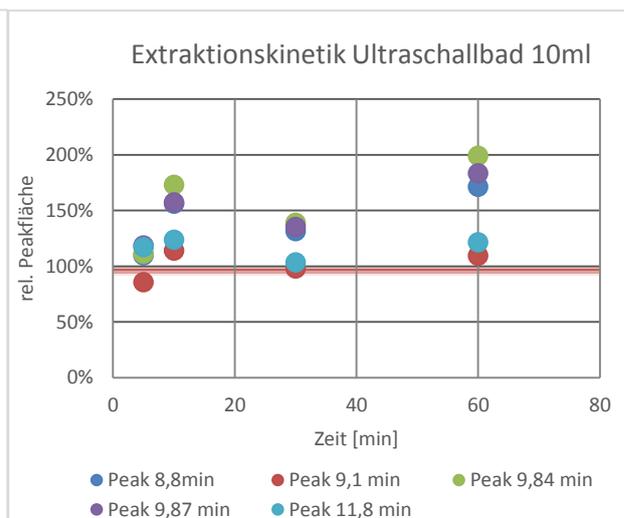
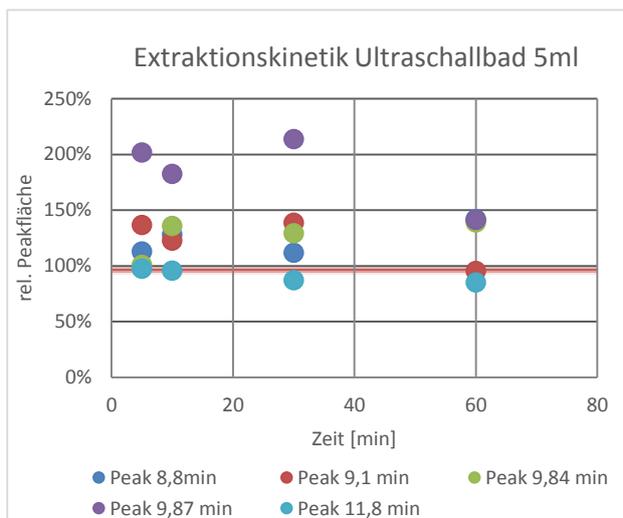


ABBILDUNG 60: EXTRAKTIONSKINETIK XAD16 ULTRASCHALLBAD 5 ML LÖSUNGSMITTEL

ABBILDUNG 61: EXTRAKTIONSKINETIK XAD16 ULTRASCHALLBAD 10 ML LÖSUNGSMITTEL

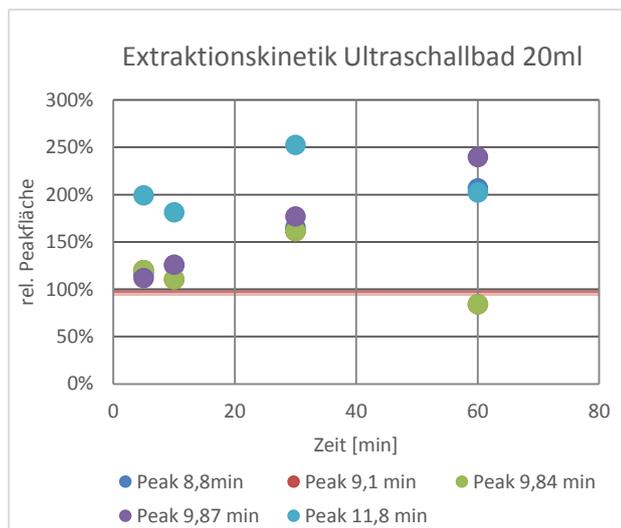


ABBILDUNG 62: EXTRAKTIONSKINETIK XAD16 ULTRASCHALLBAD 20ML LÖSUNGSMITTEL

4.4.5 Versuch 5: Festbettextraktion

Bei einer Festbettextraktion wird ein hoher Konzentrationsgradient der Wertkomponente zwischen dem Extraktionsgut und dem Lösungsmittel durch die wiederholte Zugabe von unbeladenem Lösungsmittel aufrechterhalten. Die Diffusionsgeschwindigkeit wird dadurch gesteigert und ist bei allen Proben trotz kleinerer Lösungsmittelmengen gleich. In der Abbildung 63 sind diese Ergebnisse der Methode grafisch dargestellt. Im Vergleich zur Standardmethodik konnte durchschnittlich eine Steigerung der Ausbeute um 250 % erfolgen.

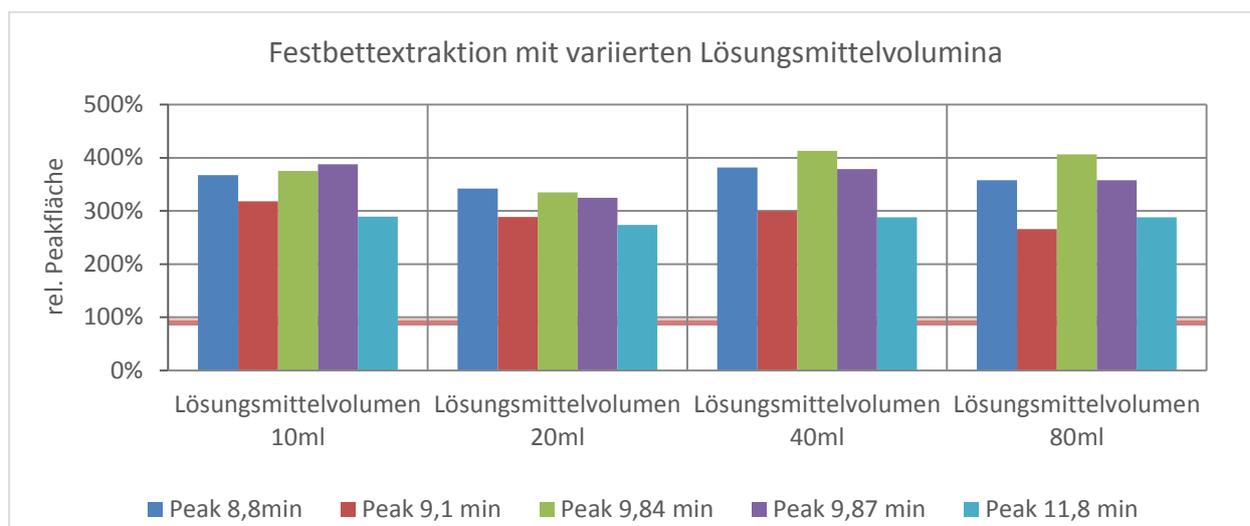


ABBILDUNG 63: WERTE DER FESTBETTEXTAKTION XAD16

4.4.6 Methodenvergleich

Das nachfolgende Diagramm (Abbildung 64) dient zur Gegenüberstellung der Substanzausbeuten der einzelnen Methoden. Die für den Vergleich genutzten Werte können der Methodenvariation zugeordnet werden, mit deren Aufarbeitung in kürzester Einwirkzeit mindestens 90 % der maximalen Ausbeute für die jeweilige Methode erreicht werden konnte. Für die Einwirkung ohne Leistungseintrag konnten 90 % der maximalen Ausbeute bei einer 10-minütigen Extraktion mit 20 ml Lösungsmittel erreicht werden. Das gleiche gilt für die Extraktion auf einem Schüttler. 90 % der maximalen Ausbeute bei dem Ultraschallbad erhält man für die 30-minütige Behandlung mit 20 ml Lösungsmittel. Analog bei den drei Versuchen ist, dass das größte Lösungsmittelvolumen die höchste Ausbeute der Substanzen enthielt. Bei der Festbettextraktion ist jedoch schon eine maximale Ausbeute bei 10 ml Lösungsmittel zu verzeichnen. Hier zeigt sich, dass die wiederholte Extraktion mit unbeladenem Lösungsmittel Ausbeutesteigerungen von durchschnittlich 200 % hervorbringt, als eine einfache Extraktion mit großen Lösungsmittelmengen.

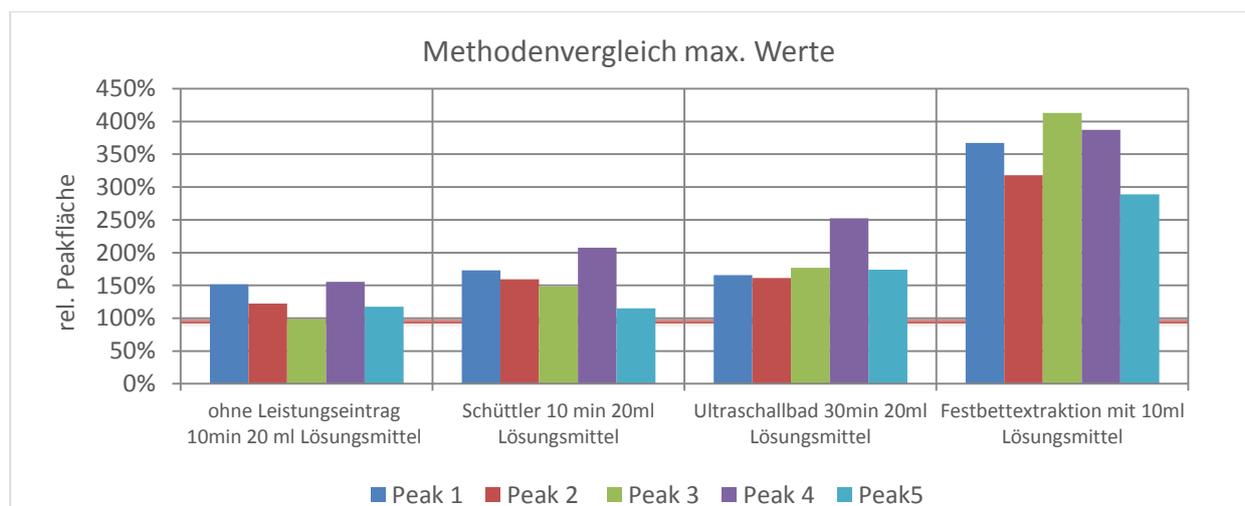


ABBILDUNG 64: METHODENVERGLEICH AUFARBEITUNG XAD-PROBEN

5. Fazit und Ausblick

5.1 Aufarbeitung der Biomasse

Die Versuche der Feststoff- Flüssig- Extraktion wurden an der Biomasse des *Streptomyces* JCB7731 und des Pilzes *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 durchgeführt. Die Actinobacteria bilden ein myzelähnliches, filamentöses Geflecht, welches der vegetativen Wuchsform der filamentösen Pilze gleicht. Jedoch sind Bakterien im Gegensatz zu den Pilzen Prokaryonten. Die Hyphen der Bakterien sind mit einem Durchschnitt von 1 µm dünner als die der Pilze und zusätzlich unterscheiden sie sich im Zellwandaufbau. Die biologischen Unterschiede der Bodenbakterien und filamentösen Pilzen, sowie eine große Vielfalt an unterschiedlich chemischen Verbindungen der Wirkstoffe in der Antibiotikaforschung erschwert die Konzipierung und Optimierung einer Standardmethodik zur Feststoff- Flüssig- Extraktion.

In der Abbildung 40 unter dem Punkt 4.1.12 werden die effizientesten Versuche zur Optimierung der Aufarbeitung der Biomasse des *Streptomyces* JCB7713 mit deren Ausbeute, Zeitaufwand und den Lösungsmittelkosten im Vergleich zur Standardaufarbeitungsmethodik dargestellt. Dabei zeigte sich, dass 49 % mehr Ausbeute an Phenelfamycinen durch Verwendung eines Dispergierstabs (siehe 4.1.4) extrahiert werden konnten als mit dem üblich verwendeten Ultraschallbad. Zudem konnte nach zehn Minuten Einwirkzeit bei allen angewandten Homogenisierungsmethoden eine Sättigung der Produktaufnahme festgestellt werden, wodurch eine deutliche Verkürzung des Arbeitsaufwands im Vergleich zur Standardmethodik erfolgte. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass eine Stufenextraktion (siehe 4.1.9) nicht empfehlenswert ist. Ein hoher Zeitaufwand, ein geringer Nutzen und mögliche Verunreinigungen mit intrazellulären Bestandteilen durch mehrfaches Homogenisieren sprechen gegen den Aufarbeitungsschritt. Positiv dagegen zu werten, sind die Resultate der Variation an Lösungsmittelvolumen. Aufgrund der geringen Rohextraktmengen, ist die Verwendung von großen Lösungsmittelvolumina nicht erforderlich. Das vierfache Volumen an Lösungsmittel im Verhältnis zum Biomassegewicht sollte zur Aufnahme der Sekundärmetabolite bei Anwendung des Ultraschallbads ausreichen. Besonders für den Up Scale ist es wichtig, Lösungsmittel einzusparen. Denn neben den höheren Kosten für große Lösungsmittelmengen steigen auch die Kosten für die Gerätschaften zum DSP und die Energiekosten zum Einengen der Extrakte. Große Lösungsmittelmengen erschweren zudem die Extraktion der Naturstoffe im Technikumsmaßstab durch die Handhabung und den einhergehenden Sicherheitsbestimmungen.

Bei den Versuchen mit der Biomasse des Pilzes *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 waren die Produkte bereits nach sehr kurzer Zeit in das Lösungsmittel übergegangen. Die Extraktionsausbeuten zeigen, dass ab dem Beobachtungsbeginn keine Steigerung der Produktgewinnung festgestellt werden konnte. (siehe 4.2.2-4). Ein Grund für die schnelle Extraktion könnte die bessere Löslichkeit der Substanzen im Aceton sein. Weiterhin ist die Biomasse des *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 um 10% feuchter, als die des *Streptomyces* JCB7713. *Vauck & Müller* beschreiben in ihrem Buch die Veränderung der Diffusionsbedingung mit einer hohen Feuchtigkeit des Extraktionsgutes, sodass auch hier Ursachen für die frühzeitige Elution der Substanzen zu finden sein könnten.

Bei dem Betrachten der Chromatogramme der Pilzextrakte, wurde deutlich, dass die verschiedenen Homogenisierungsmethoden unterschiedlich starke Zellaufschlüsse mit zunehmender Zeit gefordert haben, wie unter den Kapiteln 4.2.2-5 deutlich wird. Neben der Extraktion der gewünschten Produkte erfolgte zudem die Extraktion intrazellulärer Substanzen. Sekundärmetabolite werden jedoch bis auf wenige Ausnahmen wie der Autoregulator Hormaomycin (*Zähner et.al. 2004*) von den Zellen nach der Produktion ausgeschieden. Bei der Gewinnung von antibiotisch wirkenden Sekundärmetaboliten gelten daher intrazelluläre Substanzen als Verunreinigungen, deren Elution möglichst vermindert werden sollte. Für das Screening nach biologisch aktiven Substanzen in dem Myzel von Biomasse wird in der Arbeitsgruppe MWIS die Extraktion 30 Minuten im Ultraschallbad (40°C) durchgeführt. Stellt man die Werte der Standardmethodik mit den Werten der Aufarbeitung mittels Dispergierstab (15 s) gegenüber, erhält man deutlich andere Ergebnisse im Vergleich zur Aufarbeitung des *Streptomyces*. Unter Berücksichtigung der hohen Standardabweichung kann man davon ausgehen, dass bei einer kurzen Homogenisierung mittels Dispergierstab nicht mehr intrazelluläre Substanzen extrahiert werden, als bei der 30-minütigen Ultraschallbehandlung, jedoch auch die Produktaufnahme um 33 % verringert ist. Dieser Ausbeuteverlust ist relativ hoch, wodurch die Verwendung des Dispergierstabs bei der Aufarbeitung des Stammes *Hypoxylon rickii* MUCL 53309 trotz dem geringen Zeitaufwand nicht empfohlen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur die Extraktion der Biomassen zweier Organismen näher betrachtet werden. Versuchsreihen mit mindestens drei weiteren Stämmen wären für zuverlässigere Aussagen bezüglich eines Standardverfahrens wichtig. Folgende Aufarbeitungsschritte können vorerst aus den gewonnenen Ergebnissen zur Extraktion von Naturstoffen aus dem Myzel von Bodenbakterien mit einem hohen Biomassetrockenanteil empfohlen werden:

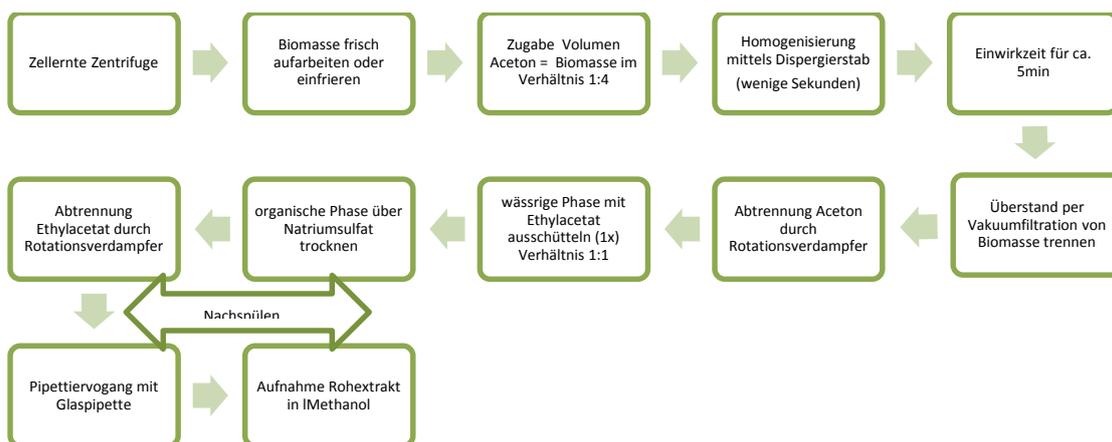


ABBILDUNG 65: AUFARBEITUNGSSCHRITTE

Für das Screening nach Sekundärmetaboliten in Pilzkulturen aus Schüttelkolben sollte jedoch die Extraktion im Ultraschallbad erfolgen. Zur Vermeidung der Aufnahmen von intrazellulären Substanzen sollte die Extraktionszeit dabei von 30 min (Standardmethodik) auf 10 min heruntersetzt werden.

In der Arbeitsgruppe MWIS wird zudem viel an den Sekundärmetabolitprofilen der Basidiomyceten geforscht. Diese bilden ihr Myzel in vielen kleinen Kugeln (Abbildung 66), was wiederum Einfluss auf die Notwendigkeit einer geeigneten Homogenisierungsmethode haben könnte. Vor der Verwendung der empfohlenen Homogenisierungsmethode sollten gegebenenfalls zur Aufarbeitung dieser Wuchsform Versuche hinsichtlich der Extraktionsausbeuten erfolgen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt sind Möglichkeiten zur Extraktion im größeren Maßstab. Die Arbeitsgruppe MWIS besitzt für die Zerkleinerung und Homogenisierung von Biomasse eine Dispergiermaschine mit einer Kolloidmühle (Abbildung 67), die einen Durchsatz von 30-300 l/h zermahlen kann. Diese soll einerseits die Zellernte erleichtern, andererseits ist sie explosionsgeschützt und lösungsmittelbeständig. Somit kann die Mühle auch zur Extraktion von Biomasse genutzt werden. Dabei ist zu beachten, dass auch hier durch den mechanischen Leistungseintrag ein Zellaufschluss stattfindet. Es sollten daher besonders Studien für ein geeignetes Lösungsmittel erfolgen. Denn wie unter den Punkten 4.1.11 und 4.2.6 aufgeführt wird, konnte durch die Verwendung eines hydrophileren Lösungsmittels einerseits die Aufnahme der gewünschten Produkte um ca. 70 % (*Streptomyces* JCB7713) und ca. 46 % (*Hypoxylon rickii* MUCL 53309) erhöht werden, andererseits die Aufnahme der intrazellulären Substanzen verringert werden.



ABBILDUNG 66: KULTUR, ZUGEHÖRIG
ABTEILUNG BASIDOMYCETES

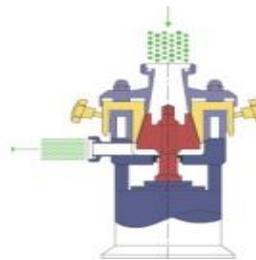


ABBILDUNG 67: SCHEMATISCHER AUFBAU
MODUL NASSMÜHLE

5.2 Aufarbeitung des Adsorberharzes XAD16

Das Adsorberharz XAD16 wird in der Arbeitsgruppe MWIS zur In-Situ-Gewinnung von Produkten bei Fermentationsprozessen eingesetzt. Weiterhin werden Kulturfiltrate von Pilzen und Actinobacteria nach Abtrennung der Biomasse mit XAD im Downstream-Prozess um Wertstoffe zu adsorbieren. Mithilfe der Feststoff-Flüssig-Extraktion werden die adsorbierten Substanzen wieder vom Absorber abgelöst. In den vorangegangenen Versuchen wurde die Effizienz verschiedener Extraktionsmethoden zum Herauslösen von fünf Substanzen untersucht, die der Naturstoffgruppe der Elansolide angehören. Dafür wurden die Ausbeuten über einen 60-minütigen Zeitraum mit verschiedenen Lösungsmittelvolumina für eine Ultraschallbehandlung, einer Extraktion von geschüttelten Proben und einer Extraktion der Proben ohne mechanischen oder thermischen Leistungseintrag untersucht. Weiterhin wurde die Isolierung der Elansolide durch eine Festbett-Extraktion mit variierten Lösungsmittelvolumina geprüft. Den Ergebnissen zu Folge konnten eindeutig die höchsten Ausbeuten mit der Festbettextraktion erlangt werden. Durchschnittlich konnte eine Ausbeutesteigerung von 200 % der Elansolide (siehe 4.4.6) bei geringeren Lösungsmittelverbrauch erfolgen im Vergleich zu den anderen Aufarbeitungsmethoden.

Besonders die Ermittlung von Produktkonzentrationen bei Fermentationsprozessen ist von der bestmöglichen Desorption abhängig, da an den Adsorberharz oder Biomasse verbliebene Reste falsche Rückschlüsse auf die Produktausbeuten schließen lassen. Aus diesem Grund

sollten die Proben des Adsorberharzes zukünftig für alle Sekundärmetabolite mithilfe der Festbettextraktion gelöst werden.

Ein Nachteil der Methodik findet sich jedoch in einem hohen Zeitaufwand. Um dies zu umgehen, gäbe es die Möglichkeit eine stoffspezifische Wiederfindungsrate für das Produkt mithilfe einer anderen Methodik zu bestimmen und den prozentualen Verlust dieser Methode auf die isolierte Produktmenge zu berechnen. Zu empfehlen wäre hier die Aufarbeitung auf dem Schüttler. Die besten Ausbeuten der Ultraschallbehandlung lagen zwar mit durchschnittlich 8 % (siehe 4.4.3- 4) über denen der Extraktion auf dem Schüttler, doch traten starke Schwankungen der Ergebnisse auf, die vermutlich auf den Temperaturgradienten zurück zu führen sind. Für die Aufarbeitung im Technikumsmaßstab wird in der Arbeitsgruppe MWIS bereits die optimale Rückgewinnung der Metabolite über eine Festbettextraktion erzielt.

6. Literaturverzeichnis

Chmiel, H. : Bioprozesstechnik; 3.Auflage 2011, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2011 ISBN 978-3-8274-2476-1

Deutscher Kaffeeverband, GfK Consumer Trink Trends: Kaffeemarkt 2013; Internetseite: <http://www.kaffeeverband.de/presse/zahlen-daten-fakten>, PDF-Datei

Eberhardt, F.: Fermentation von Antibiotika in Streptomyceten; Masterarbeit, Technische Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig, 2013

Fischbach M.; Walsh, C.: Antibiotics For Emerging Pathogens, Science. Aug 28, 2009; 325(5944): 1089–1093.

Habermehl, G.; Hammann, P.; Krebs, H.C.: Naturstoffchemie; 2.Auflage Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2002; ISBN: 3-540-43952-8

Hochlowski, J; Buytendorp, M; Whittern D.; Buko, A.; Chen, R.; McAlpine, J.: Phenelfamycins, a novel of elfamycin typ antibiotics II. Isolation and structure determination; The journal of antibiotics May 1988 vol. XLI number 10, S. 1300-15

Ju, Y.-M., J. D. Rogers.: A revision of the genus Hypoxylon. Mycologia Memoir no. 20. APS Press, 1996 St. Paul, MN. 365 pp

Ju, Y.-M., J. D. Rogers, M.-J. Adams: The genus Hypoxylon. Internetseite: http://www.google.de/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fmycology.sinica.edu.tw%2FXylariaceae%2FFormat%2Flogo_Hypoxylon.JPG&imgrefurl=http%3A%2F%2Fmycology.sinica.edu.tw%2FXylariaceae%2FGenusHypoxylon.asp&h=220&w=400&tbnid=TBwaClDyoo9y6M%3A&zoom=1&docid=d-aTttohfa6IM&ei=-fZU4LdClqE4gTv8oH4BA&tbn=isch&iact=rc&uact=3&dur=131&page=1&start=0&ndsp=25&ved=0CCgQrQMwAg . Aufrufdatum: 31.07.2014

Lewin, R.A: A Classification of Flexibacter; J.gen. Microbiol. (1969), 58, 189-206), Printed in Great Britain

Snyder, L. ; Kirkland, J.; Glajch, J.: Practical HPLC Method Development (Google eBook); John Wiley & Sons, 03.12.2012

Müller, S.: Überprüfung der Bildung von Naturstoffen aus Bodenbakterien und filamentösen Pilzen sowie eine Fehlerbetrachtung der Standardaufarbeitungsmethodik zur Extraktion von Biomasse; Praktikumsarbeit Hochschule Anhalt 2014

Najafpour, G.: Biochemical Engineering And Biotechnology; First Edition 2007 Elsevier B.V. ISBN-10: 0-444-52845-2

Präve, Paul; Faust, U.; Sittig, Wolfgang; Sukatsch, D.A: Handbuch der Biotechnologie, Oldenburg Verlag GmbH, München 1994

Rogers, J : "The Genus Hypoxylon", Internet: http://www.google.de/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fmycology.sinica.edu.tw%2FXylariaceae%2FFormat%2Flogo_Hypoxylon.JPG&imgrefurl=http%3A%2F%2Fmycology.sinica.edu.tw%2FXylariaceae%2FGenusHypoxylon.asp&h=220&w=400&tbnid=TBwaClDyoo9y6M%3A&zoom=1&docid=d-aTttohfa6IM&ei=-fZU4LdClqE4gTv8oH4BA&tbn=isch&iact=rc&uact=3&dur=131&page=1&start=0&ndsp=25&ved=0CCgQrQMwAg , Abrufdatum: 04.08.2014

Rohm & Haas Company: Product Data sheet Amberlite® XAD16 2008, pdf-Datei

Sahm, H.; Antranikian, G.; Stahmann, K.-P.; Takors, R. (Hrsg.), Industrielle Mikrobiologie, DOI 10.1007/978-3-8274-3040-3_8, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Schmid, R.: Taschenatlas Der Biotechnologie Und Gentechnik, 2. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim 2006

Schügerl, Karl: Solvent Extraction In Biotechnology; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1994 ISBN: 3-540-57694-0

Sell, D. : Mengenangaben Biotechnologisch Hergestellter Produkte. DECHEMA, Frankfurt Am Main 2010

Stadler, M, Hellwig, V.: Chemotaxonomy of the Xylariaceae and remarkable bioactive compounds from Xylariales and their associated asexual stages. Recent Research Developments in Phytochemistry 9: 41-93.2005

Swanson, R.N ; Dwight J. Hardy, Nathan L. Shipkowitz, Charles W. Hanson, Nancy R. Rammer, Lyle J. Coen And Prabhavathi B. Fernandes (1988) Phenelfamycins, A Novel Complex Of Efamycin-Type Antibiotics III Activity In Vitro And In Hamster Colitis Model. The Journal Of Antibiotics January 1989 Vol. XLII Number 1, S 94: 100

Tamehiro, N; Takeshi Hosaka, J.X.; Haifeng H., Noboru, O.; Kozo, O. (2003): Innovative Approach For Improvement Of An Antibiotic-Overproducing Industrial Strain Of Streptomyces Albus; Applied and Environmental Microbiology, November 2003 Vol. 69 Nr.11, S 6412

Unbekannter Autor : Bild Scheidetrichter; Internetseite:

http://www.google.de/imgres?imgurl=http://w3.restena.lu/ddnuc/COURS/images/225mi1.gif&imgrefurl=http://w3.restena.lu/ddnuc/COURS/2/220m.htm&h=320&w=417&tbnid=ZdYQusHqEMKIRM:&zoom=1&tbnh=93&tbnw=121&usq=__5OSB4Bi_RaUpUMvoAGYzQaboglw=&docid=-lwotlwpUcAOAM&sa=X&ei=UWjfU67bJ4rb4QSG7oC4Aw&sqi=2&ved=0CIEBEP4dMAs. Letzter Aufruf : 01.09.2014

Vauck, W; Müller, H.: Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik; Verlag Chemie 1982, 6. bearbeitete Auflage, ISBN: 3-527-25997-X

Weete, J.D.: Lipid biochemistry of fungi and other organisms; 1986 ,Plenum Press, New York 1980; ISBN: 0-306-4050-9

Whalley, A , Edwards, R.: The *Xylariaceae*: A case study in biological and chemical diversity. Pure and Applied Chemistry 70(11) 1998 2123 -2134

WHO: Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014; Internet: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>; April 2014; ISBN: 978 92 4 156474 8; Abfragedatum: 03.07.2014

Zähner, H.; Wolf, H., Andres, N.; Rössner, E.; Zeek ,A.; König, W.; Sinnwell, V. : Hormaomycin, ein neues Peptid- Lacton mit morphogener Aktivität auf Streptomyceten; Helvetica Chimica Acta Volume 72, Issue 3, erstes Erscheinungsdatum online: 25.10.2004

7. Geräte und Verbrauchsmaterialien

TABELLE 6: VERWENDETE GERÄTE UND DEREN HERSTELLER

Gerät	Hersteller
Bioreaktor	<ol style="list-style-type: none"> 1. 15L-Glasfermenter Fermenter 10b von Fa.Aktiengesellschaft für biotechnologisches Verfahrenstechnik 2. 70L-Fermenter von Fa. B.Braun Melsung AG/Type 8015.101 Nr 101 3. 150L-Fermenter Chemap® bioreactor von E. Greminger AG, Oberaach
Dispergierstab	SilentCrusher von Fa. Heidolph
HPLC –Anlage	Fa. Agilent 1260Infinity Series
Laborschüttler	<ol style="list-style-type: none"> 1. Thermomixer 5437 von Fa. Eppendorf GmbH 2. Minishaker von Fa.ET 3. HAT AG15 Fa. Infors
Massenspektrometer	amaZon speed™ von Fa. Bruker
Mikroskop	Fa. Carl Zeiss AG
Rotationsverdampfer	Heidolph, Rotavapor-EL von Fa.Büchl
Schüttelschrank	HAT INFORS Multitron von Fa.Infors AG
Thermometer	Thermometer EExia 2 CT5 von Fa. Digitron

Ultraschallbad	Sonorex Digitat 10 P von Fa. Bandelin
Zentrifuge	<ol style="list-style-type: none"> 1. 5804 R, Rotor A4-44 von Fa. Eppendorf 2. 5415c von Fa. Eppendorf 3. mini Spin von Fa. Eppendorf 4. Zentrifuge Z61 G Fa. Eppendorf

TABELLE 7: VERBRAUCHSMATERIALIEN UND DEREN HERSTELLER

Material	Hersteller
Aceton	Applichem GmbH
Deionisiertes Wasser	k.A
Essigsäure (98%)	Roth®
Ethylacetat	Avantor Performance Materials
Glukose-Teststreifen	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Glycerin	k.A
Methanol	Merck KGaA Materials
Natriumsulfat	AppliChem GmbH
Reines Wasser für HPLC	Avantor Performance Materials

8. Anhang

Inhaltsverzeichnis

8.1 absolute Werte Phenelfamycine.....	-2-
8.2 absolute Werte Substanzen <i>Hypoxylon rickii</i> MUCL 53309.....	-3-
8.3 absolute Werte Elansolide.....	-5-
8.4 Bioprozessdaten Fermentation <i>Streptomyces JCB7731</i>	-6-
8.5 Bioprozessdaten Fermentation <i>Hypoxylon rickii</i> MUCL 53309.....	-7-
8.6 Bioprozessdaten Fermentation <i>Chitinophaga sancti</i> FX79.....	-7-
8.7 Adsorptionsspektren und Massenspektren Extrakte Kultur <i>Streptomyces JCB7731</i>	-8-
8.8 Adsorptionsspektren und Massenspektren Extrakte Kultur <i>Hypoxylon rickii</i> MUCL 53309..	-9-
8.9 Adsorptionsspektren und Massenspektren Extrakte XAD 16.....	-11-

8.1 Absolute Werte der Rohextrakte *Streptomyces* JCB7713:

Probe	Peak 1 [mAU]	Peak 2 [mAU]	Peak 3 [mAU]	Peak 4 [mAU]	Peak 5 [mAU]
V1-Probe 1 fr.BM	26662	112116	29164	23183	31193
V1-Probe 2 fr.BM	32214	104958	26107	20766	29217
V1-Probe 3 fr. BM	41904	135149	36888	29602	45729
V1-Probe 1 at. BM	39452	137521	37386	30781	37365
V1-Probe 2 at. BM	37036	137480	36285	31582	43153
V1-Probe 3 at. BM	36483	122508	31824	26602	31911
V2-2 min	16598	86140	17756	14780	18171
V2-5min	23065	107080	31299	25854	34000
V2-10min	36746	138302	37594	28199	37009
V2-20min	33987	135017	35554	30074	39520
V2-30min	37657	132503	35165	29655	37476
V2-45min	31269	120968	33022	27639	34190
V2-60min	31108	117912	34971	27410	36047
V3-30s	34147	143811	34926	31502	43620
V3-60s	34543	143017	41044	38766	45398
V3-90s	46083	177437	45091	40742	55723
V3-2min	35410	156658	42033	33270	50841
V3-5min	38719	167352	46851	40317	56194
V3-10min	43016	178516	49746	42225	61061
V3-20min	38719	163920	50652	41930	55108
V3-30min	28028	142243	39422	35751	48527
V3-45min	32667	124451	31379	29530	39997
V3-60min	22867	115135	32067	24538	30911
V4-0s	36725	145034	41573	33503	45551
V4-30s	28609	146244	40438	31979	49628
V4-60s	41981	165941	49435	42934	63660
V4-90s	33148	150355	45123	41002	56641
V4-2min	39572	170329	47331	36623	55645
V4-5min	42318	161802	45827	42297	58792
V4-10min	44356	207645	53777	50691	53777
V4-20min	44356	179490	47572	44082	62973
V4-30min	44475	159440	49091	41641	60918
V4-45min	41553	170028	52010	45247	67900
V4-60min	39502	161908	48573	40166	59165
V5-25ml	37657	132503	35165	29655	37476
V5-50ml	34357	156044	46684	38904	54060
V5-75ml	36416	148039	35663	31671	49450
V5-100ml	32952	149467	43784	36296	52195
V5-125ml	32305	144000	41910	35829	48899
V6-2min	14740	57293	14552	12314	17517

V6-5min	15740	68912	21732	16404	24674
V6-10min	38045	149447	41826	33473	43997
V6-20min	33116	144361	41883	33497	48263
V6-30min	31531	132891	35367	29334	42936
V6-45min	33082	129116	33473	24343	34117
V6-60min	24519	92260	23780	18998	24348
V7-30s	34732	145420	41386	35432	48588
V7-45s	31968	123245	39679	31809	44714
V7-60s	31604	146645	39508	36754	49647
V7-90s	30007	129475	39011	39011	49771
V8-30s	37884	168022	40388	37603	57727
V8-45s	27378	130860	33127	32632	45332
V8-60s	36084	146645	37615	34489	48129
V9-5ml	23464	116480	31640	24150	34595
V9-10ml	42605	163050	51348	44313	49582
V9-20ml	36855	149962	38245	35098	51392
V9-50ml	44127	164330	42075	36142	51017
V10-2.Stufe	42826,3	172102,7	53452,3	39865,1	49152,4
V10-3.Stufe	43307	163169,6	51641,7	40262,2	48593,6
V10-4.Stufe	41834,1	154821,7	46472,8	37948,9	45702,8
V11-Dispergierer	80337	292698	78247	64698	79973
V11-Ultraschallbad	69500	260492	71869	56640	76956
V12- 20% Wasser	68683,6	227700,4	63769,6	56367,2	83364,8

8.2 Absolute Werte Rohextrakt *Hypoxylon rickii* MUCL53309:

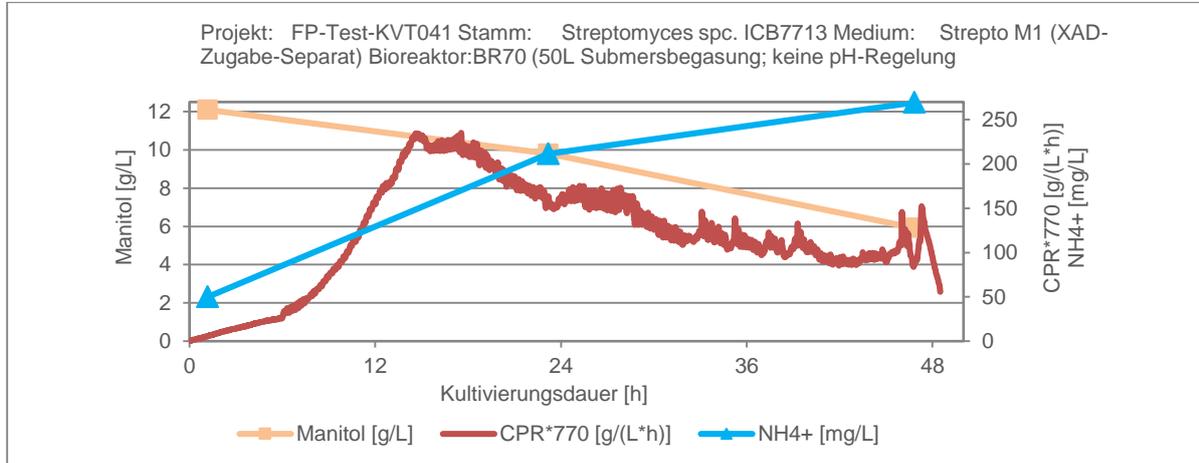
Probe	Peak 1 [mAU]	Peak 2 [mAU]	Peak 3 [mAU]	Peak 4 [mAU]	Peak 5 [mAU]	Peak 6 [mAU]	Peak 7 [mAU]	Peak 8 [mAU]	Peak 9 [mAU]
V1-Probe 1 fr.BM	0	19	13	0	9	29	968	91	12
V1-Probe 2 fr.BM	68	52	135	12	10	19	887	74	17
V1-Probe 3 fr. BM	74	47	126	14	8	24	1010	94	32
V1-Probe 1 at. BM	64	42	107	12	44	53	1054	109	48
V1-Probe 2 at. BM	62	35	120	9	54	47	921	85	35
V1-Probe 3 at. BM	65	49	118	10	60	47	923	65	40
V2-2 min	57	38	105	9	28	6	94	8	16
V2-5min	62	45	108	9	52	8	289	27	28
V2-10min	43	42	126	11	32	24	1010	94	32
V2-10min (2)	34	26	65	6	108	19	470	45	25
V2-10min (3)	34	25	78	5	126	15	482	49	20
V2-20min	55	36	103	11	100	89	757	65	70
V2-20min (2)	36	23	85	9	96	37	676	69	19

V2-20min (3)	34	25	78	5	126	15	482	49	20
V2-30min	63	42	115	10	53	49	966	86	41
V2-45min	56	39	118	10	60	47	923	65	40
V2-45min (2)	49	30	87	7	213	20	1086	116	43
V2-45min (3)	59	36	108	9	323	49	1138	127	62
V2-60min	55	41	117	9	31	92	1467	142	49
V3-2min	61	42	102	8	47	12	28	40	38
V3-5min	57	45	108	8	62	29	656	78	99
V3-10min	57	39	108	10	91	63	1181	157	122
V3-10min (2)	60	38	112	10	78	30	1153	153	92
V3-10min (3)	47	46	114	10	121	85	1308	187	193
V3-20min	57	40	104	10	89	48	1172	159	119
V3-20min (2)	60	38	112	10	78	32	1152	153	91
V3-20min (3)	44	44	99	9	108	55	1123	160	112
V3-30min	37	24	63	6	144	68	1349	166	152
V3-45min	40	26	106	78	73	66	1599	205	164
V3-45min (2)	55	40	124	9	128	87	1242	177	115
V3-45min (3)	51	34	113	10	113	114	1702	231	106
V3-60min	64	47	117	11	31	92	1467	142	49
V4-2min	40	28	84	7	41	14	512	63	50
V4-5min	56	31	101	9	100	17	525	66	67
V4-10min	44	31	79	6	107	18	545	65	88
V4-10min (2)	45	28	70	6	94	20	492	58	92
V4-10min (3)	52	37	85	7	184	26	757	84	147
V4-20min	50	32	95	7	140	18	555	69	113
V4-20min (2)	46	33	99	6	127	22	583	70	124
V4-20min (3)	50	34	95	8	152	12	598	77	111
V4-30min	53	33	86	8	121	19	752	89	146
V4-45min	48	32	91	7	110	24	760	91	131
V4-45min (2)	46	31	99	6	74	23	645	78	114
V4-45min (3)	48	29	82	7	70	25	655	80	135
V4-60min	51	31	93	7	200	25	858	103	150
V7-30s	38	28	81	7	68	20	683	66	162
V7-45s	32	33	83	7	84	15	540	57	129
V7-60s	33	29	76	6	85	28	959	112	155
V7-90s	48	28	74	5	77	15	699	86	59
V12-20% Wasser	59	37	110	9	163	12	200	19	14
V12- 20%Wasser	65	42	108	10	216	22	329	31	30
V12- 20%Wasser	67	50	125	11	261	29	261	24	26

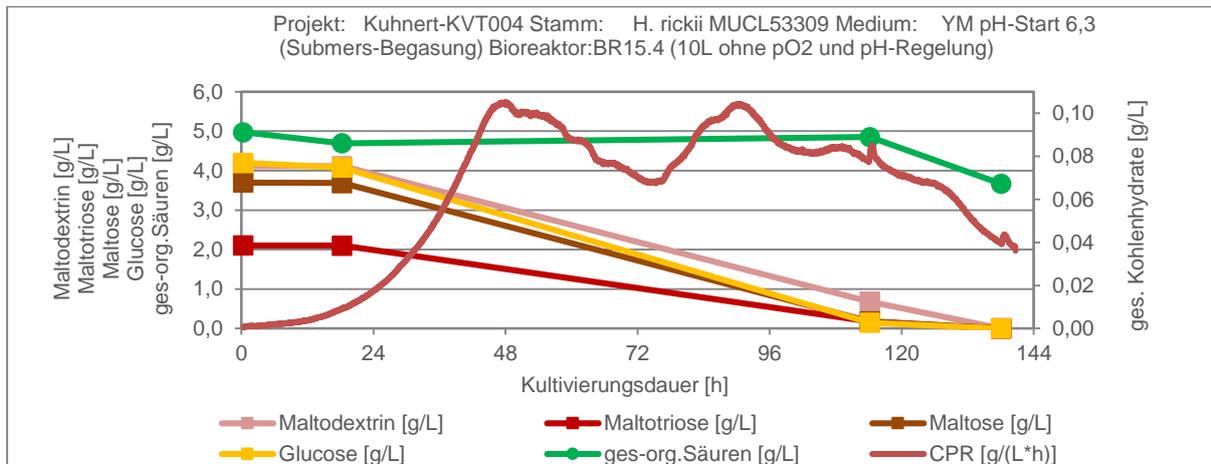
8.3 Absolute Werte Rohextrakt Elansolide:

Werte [mAU*L Lösemittel/kg XAD]	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak5
V1-5ml	3743	1473	1543	2333	1213
V2-5ml-5min	4373	1865	1913	2610	1128
V1-5ml	4248	1828	1478	2375	1128
V2-5ml-5min	1878	655	780	1173	453
V2-5ml-10min	2805	1570	815	2860	895
V2-5ml-30min	3750	1588	1628	2465	863
V2-5ml-60min	4225	1840	2038	2758	745
V2-10ml-5min	4395	1510	1785	2655	1035
V2-10ml-10min	4755	1620	2025	2785	1010
V2-10ml-30min	4990	2050	1905	3705	1380
V2-10ml-60min	5240	1760	2230	3030	1215
V2-20ml-5min	4550	1780	1750	3470	1280
V2-20ml-10min	5350	2110	1620	3790	1360
V2-20ml-30min	5560	2020	2030	3520	1340
V2-20ml-60min	6250	1910	2170	3340	1030
V3-5ml-5min	3558	1608	1498	2858	995
V3-5ml-10min	4121	1722	1644	2439	1156
V3-5ml-30min	3750	1588	1628	2465	863
V3-5ml-60min	4225	1840	2038	2758	950
V3-10ml-5min	4795	1525	2125	2810	1100
V3-10ml-10min	5120	1615	2230	2990	1165
V3-10ml-30min	5205	1685	2260	3010	1160
V3-10ml-60min	5900	1890	2535	3370	1180
V3-20ml-5min	3750	1520	1440	3150	1180
V3-20ml-10min	7180	2740	2440	5060	1330
V3-20ml-30min	7310	2590	2740	4660	1540
V3-20ml-60min	7130	2960	3070	5480	1160
V4-5ml-5min	4660	2358	1660	4923	1128
V4-5ml-10min	5288	2113	2238	4460	1110
V4-5ml-30min	4613	2393	2130	5215	1008
V4-5ml-60min	5848	1645	2290	3450	985
V4-10ml-5min	4525	1475	1830	2890	1355
V4-10ml-10min	6430	1965	2845	3835	1430
V4-10ml-30min	5415	1685	2285	3295	1195
V4-10ml-60min	7065	1885	3275	4475	1405
V4-20ml-5min	4770	2070	1840	4860	1690
V4-20ml-10min	5160	1900	2070	4420	1880
V4-20ml-30min	6820	2780	2910	6160	2010
V4-20ml-60min	8520	1450	3940	4930	1640
V5-10ml	15135	5475	6165	9450	3340
V5-20ml	14100	4970	5510	7920	3160
V5-40ml	15740	5160	6790	9240	3330
V5-80ml	14730	4580	6680	8720	3330

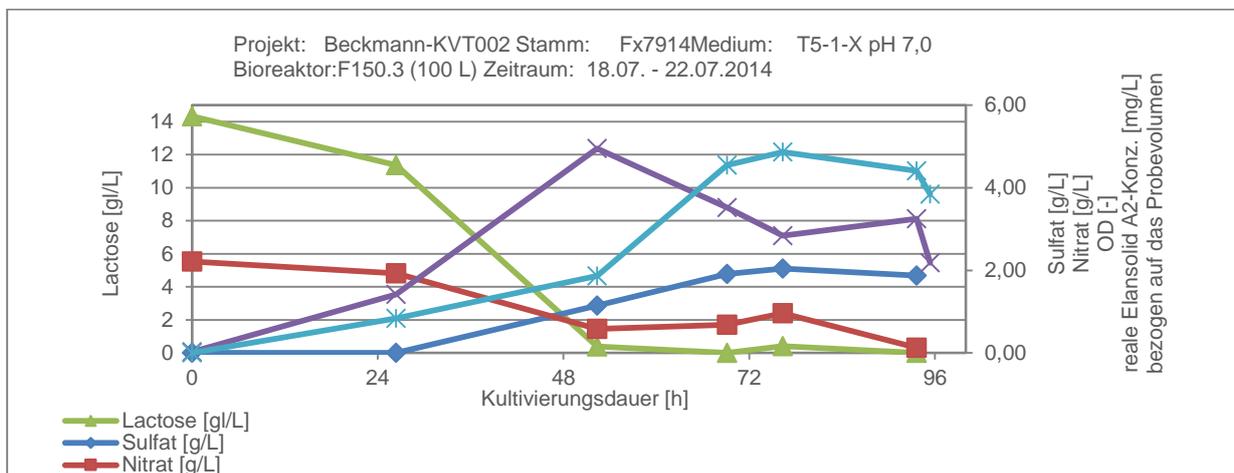
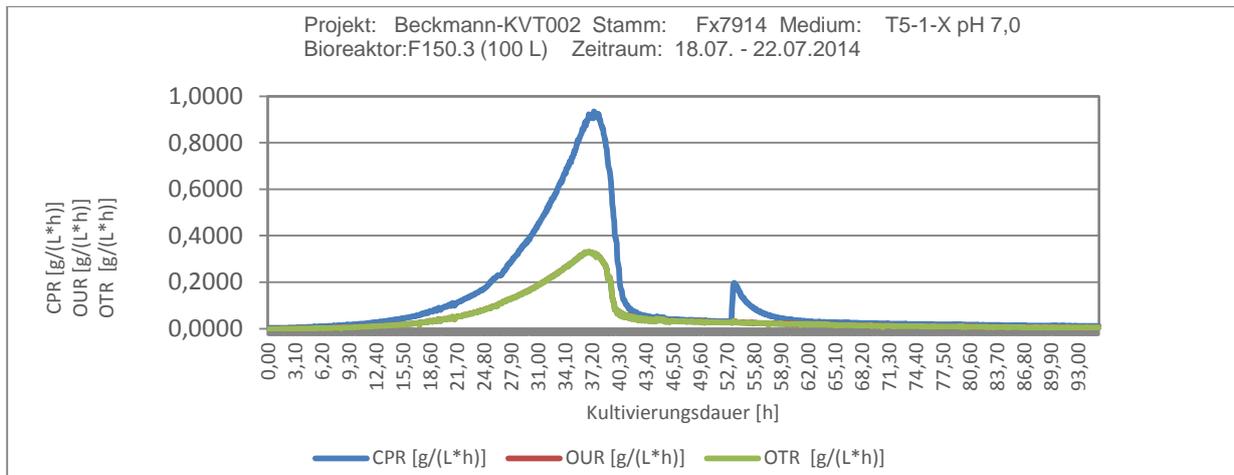
8.4 Bioprozessdaten der Kultivierung *Streptomyces* JCB7731 :



8.5 Bioprozessdaten der Kultivierung *Hypoxylon rickii* MUCL 53309:



8.6 Bioprozessdaten der Kultivierung *Chitinophaga sancti* FX7914 :



8.7 Adsorptionsspektren und Massenspektren Extrakte Kultur *Streptomyces* JCB7731

Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Phenelfamycin Peak 1

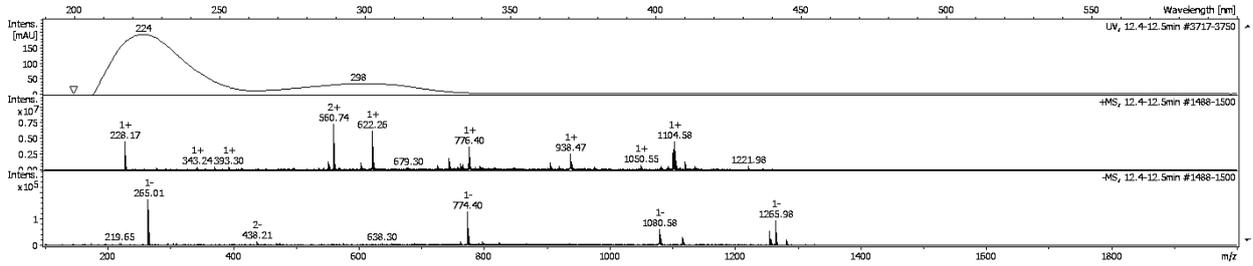


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Phenelfamycin Peak 2

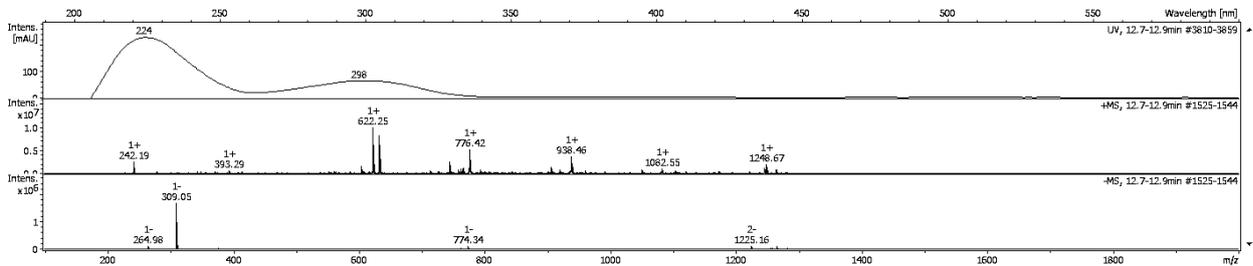


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Phenelfamycin Peak 3

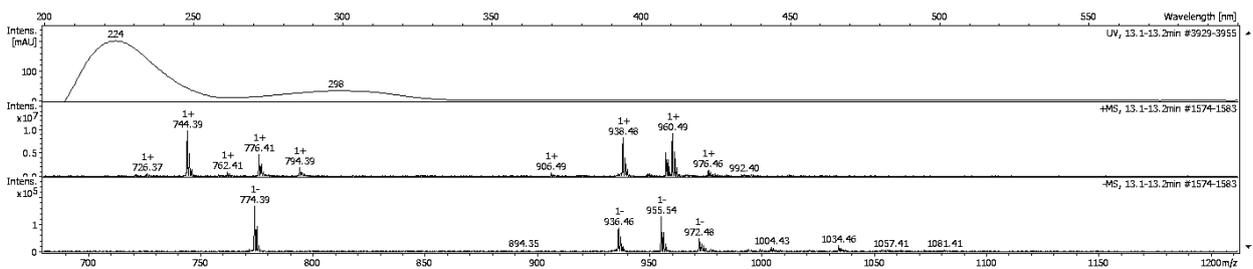


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Phenelfamycin Peak 4

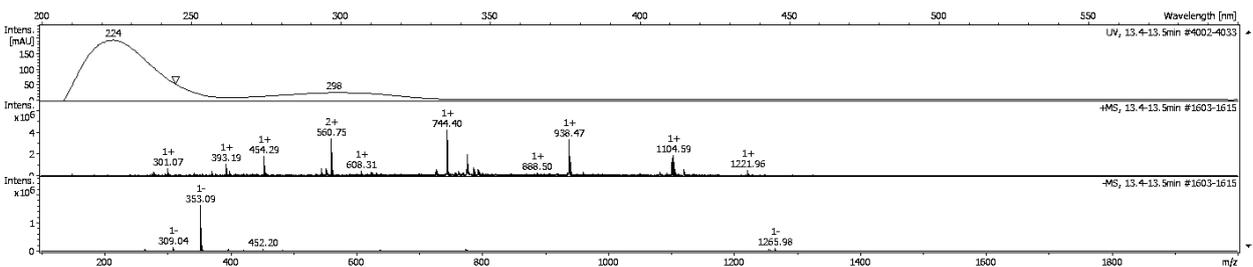
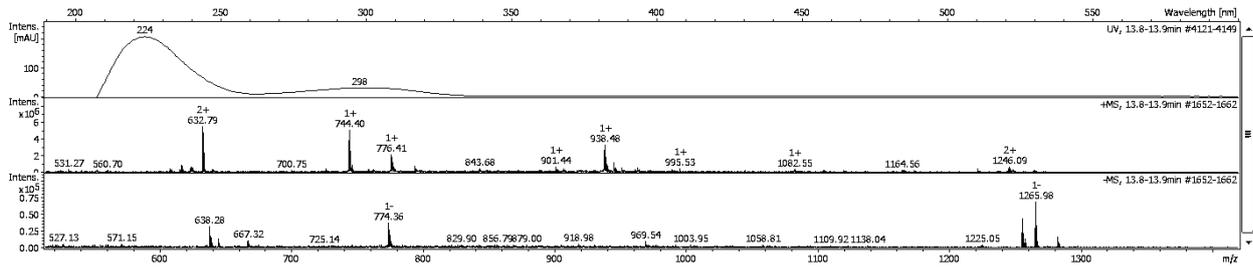
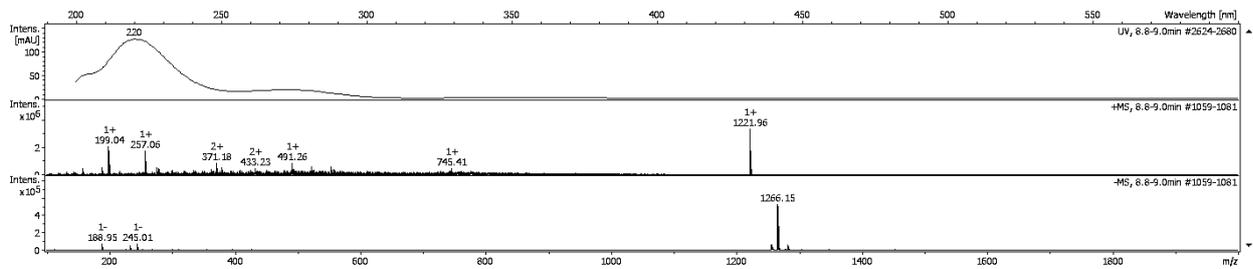
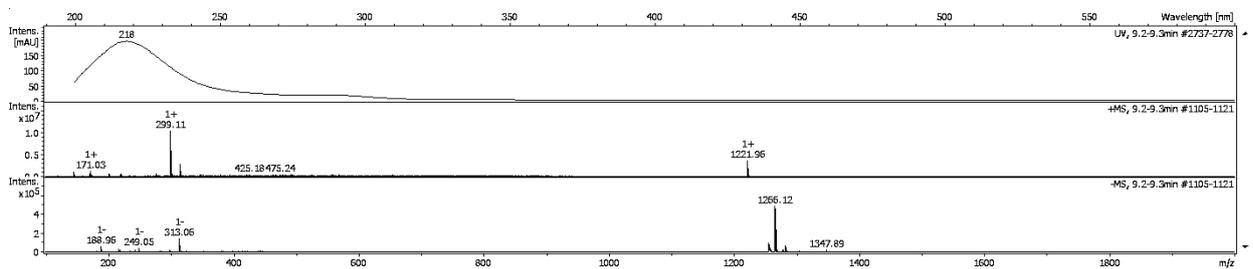


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Phenelfamycin Peak 5

8.8 Adsorptionsspektren und Massenspektren Extrakte Kultur *Hypoxylon rickii* MUCL 53309:Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Rohextraktes *H. rickii* MUCL 53309 Peak 10Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Rohextraktes *H. rickii* MUCL 53309 Peak 2Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Rohextraktes *H. rickii* MUCL 53309 Peak 3

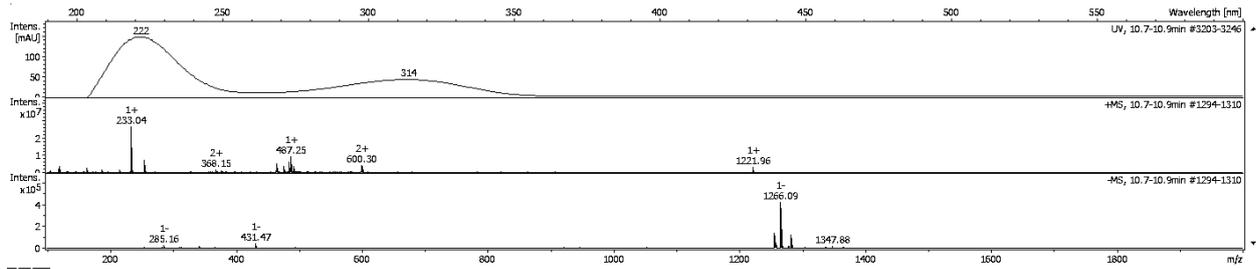


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Rohextraktes *H. rickii* MUCL 53309
Peak 4

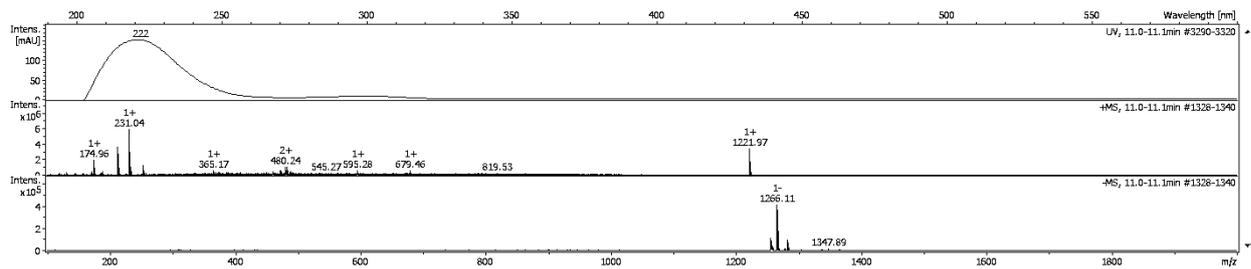


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Rohextraktes *H. rickii* MUCL 53309
Peak 5

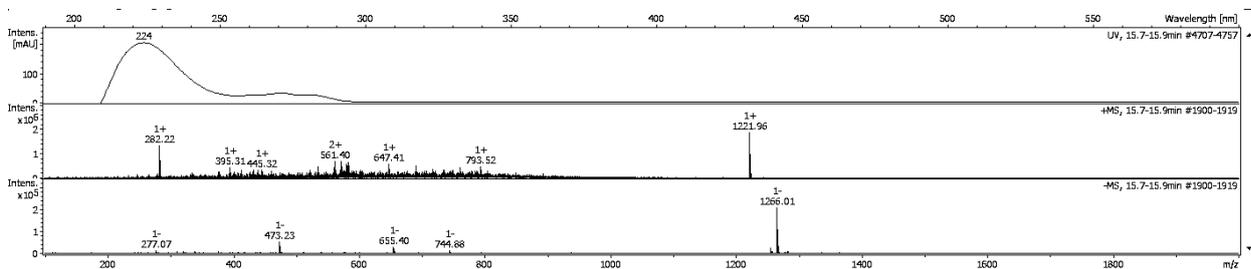


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Rohextraktes *H. rickii* MUCL 53309
Peak 6

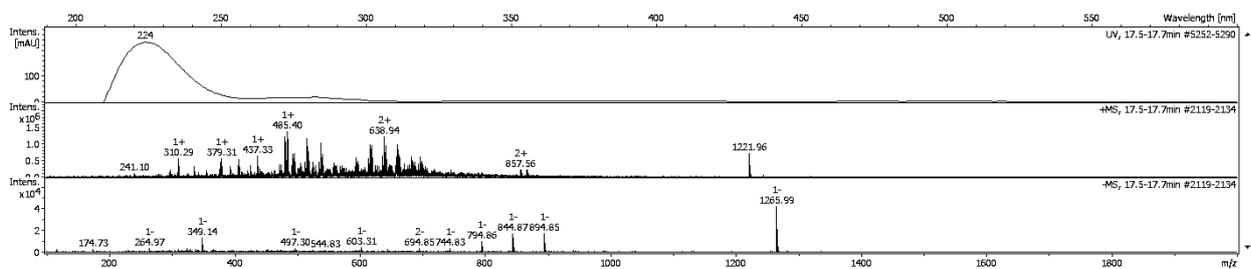


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Rohextraktes *H. rickii* MUCL 53309
Peak 7

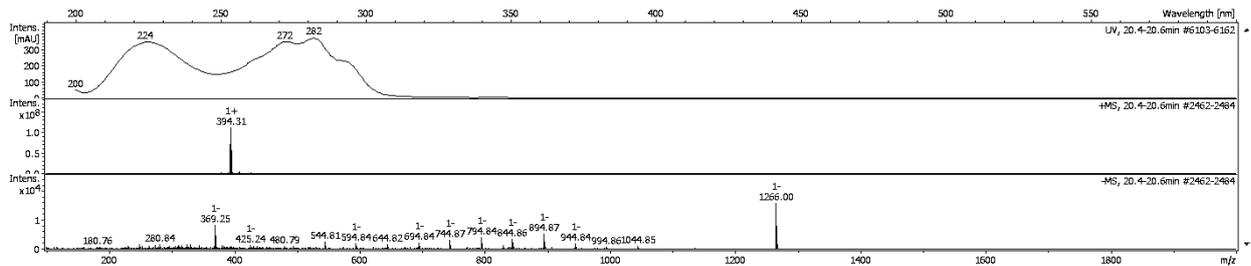


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Rohextraktes *H. rickii* MUCL 53309
Peak 8

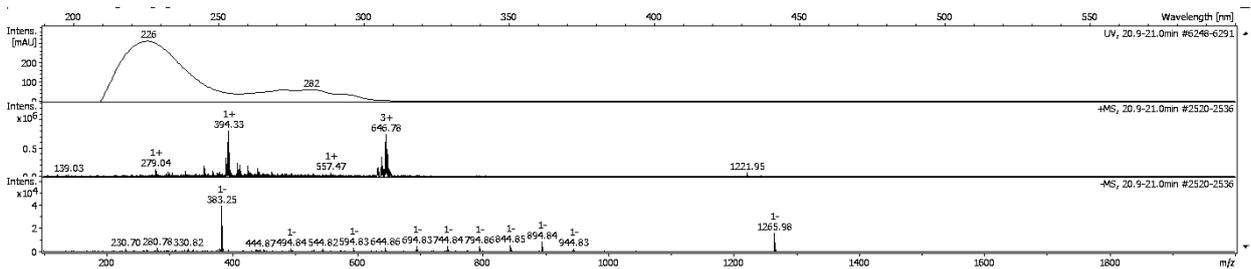
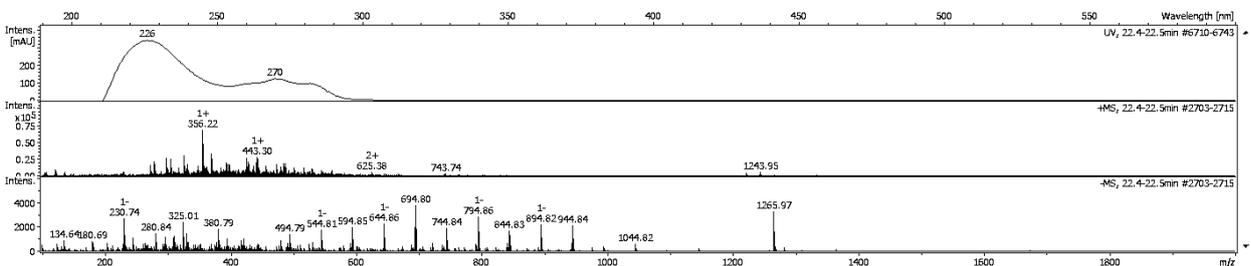


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums des Rohextraktes *H. rickii* MUCL 53309
Peak 9



8.9 Adsorptionsspektren und Massenspektren Extrakte XAD 16

Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums der Elansolide Peak 1

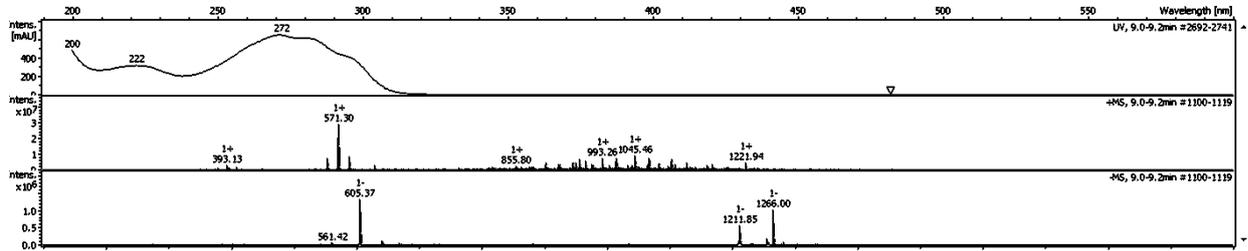


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums der Elansolide Peak 2

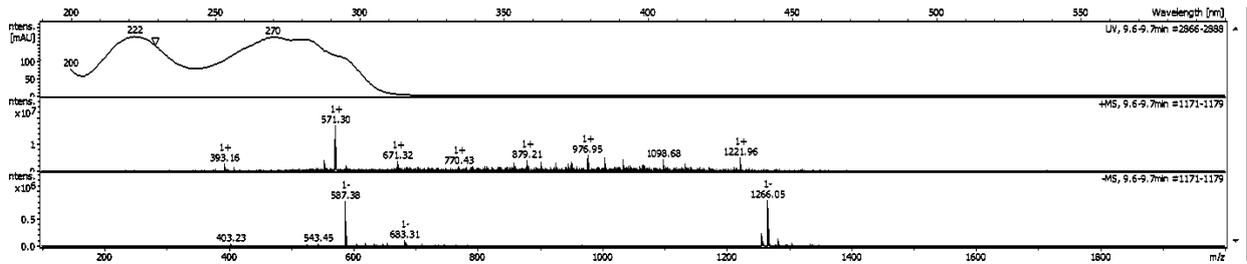


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums der Elansolide Peak 3

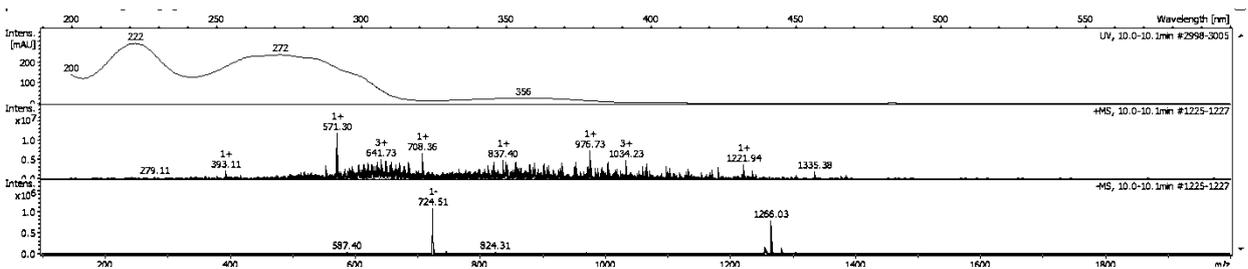


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums der Elansolide Peak 4

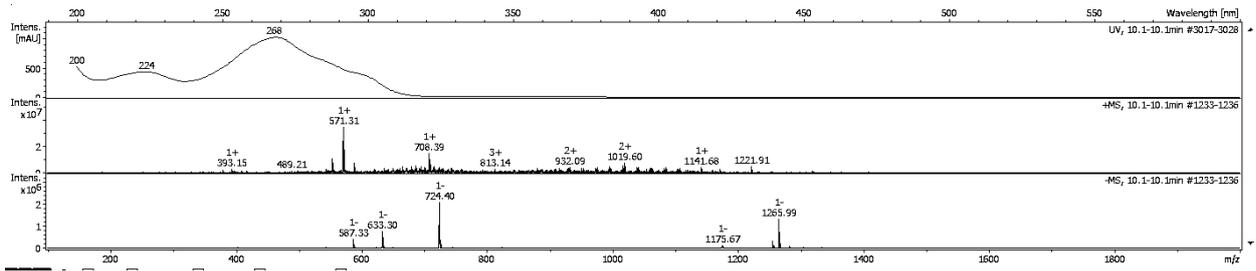
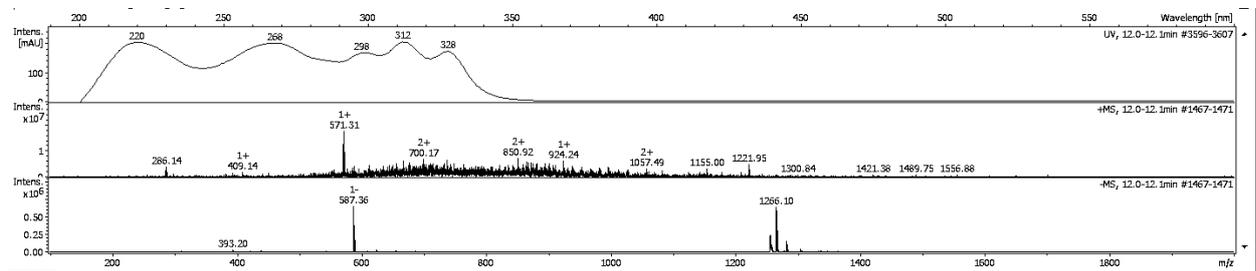


Bild des Massenspektrums und Adsorptionsspektrums der Elansolide Peak 5



EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig angefertigt und mir zuteil gewordenen Hilfen sowie das benutzte Schrifttum in dieser Arbeit angegeben habe.

Diese Arbeit hat in dieser oder abgeänderter Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Köthen, den 25.09.2014

Sarah Elisabeth Müller