

Charakterisierung und biologische Testung  
cyanobakterieller Exopolysaccharide von  
*Arthrospira platensis*, *Gloeotheca membranacea*  
und *Phormidium spec.*



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Esther Maria Friedrich**

Kiel 2013



Erster Gutachter: Prof. Dr. W. Blaschek

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. C. Peifer

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2013

Zum Druck genehmigt: 24.10.2013

Prof. Dr. W. J. Duschl  
(Dekan)



Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,  
das Erforschliche erforscht zu haben  
und das Unerforschliche ruhig zu verehren.

(Johann Wolfgang von Goethe)

*In Liebe meiner Familie*



# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis</b> .....	I
<b>II. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	V
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Systematik.....	1
1.2. Zytologie & Morphologie.....	2
1.3. Cyanobakterielle Stoffwechselprodukte .....	5
1.3.1. Toxine.....	6
1.3.2. Pharmazeutisch nutzbare Stoffwechselprodukte .....	7
1.3.3. Weitere Anwendungen.....	8
1.4. Cyanobakterielle Exopolysaccharide .....	10
1.4.1. Aufbau und Funktion .....	10
1.4.2. Mögliche Anwendungen .....	11
1.5. Komplementsystem .....	13
<b>2. Zielsetzung</b> .....	16
<b>3. Material und Methoden</b> .....	17
3.1. Allgemein verwendete Geräte und Chemikalien .....	17
3.2. Kultivierung .....	19
3.2.1. Cyanobakterienstämme.....	19
3.2.2. Kultivierungsmedium .....	19
3.2.3. Kultivierungsbedingungen .....	20
3.2.4. Erhaltungs- und Vorkultur .....	20
3.2.5. Wachstumsverlauf und -dokumentation.....	20
3.2.6. Abernten .....	21
3.3. Isolierung der Exopolysaccharide .....	22
3.4. Polysaccharid-Analytik .....	23
3.4.1. Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung .....	23
3.4.2. Quantitative Bestimmung von Uronsäuren .....	25
3.4.3. Sulfatgehalt .....	25
3.4.3.1. Konduktometrische Bestimmung .....	25
3.4.3.2. Elementaranalyse.....	26
3.4.4. Acetatgehalt .....	26
3.4.5. Pyruvatgehalt.....	27

3.4.6. Oxalsäurehydrolyse .....	27
3.4.7. Desulfatierung .....	28
3.4.8. Uronsäurereduktion.....	28
3.4.9. Analyse der Bindungstypen .....	28
3.4.9.1. Methylierung nach Harris .....	30
3.4.9.2. Methylierung mit NaOH-Brei .....	31
3.5. Chromatographische Methoden .....	32
3.5.1. Gelpermeationschromatographie .....	32
3.5.2. Ionenaustauschchromatographie.....	33
3.6. Proteinanalytik .....	35
3.6.1. Proteinquantifizierung.....	35
3.6.1.1. Elementaranalyse.....	35
3.6.1.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	35
3.6.1.3. Proteinbestimmung mit Ninhydrin.....	35
3.6.2. Proteinzusammensetzung .....	36
3.7. Testung der biologischen Aktivität .....	37
3.7.1. Testung der Zytotoxizität .....	37
3.7.2. Testung auf antimikrobielle Aktivität .....	37
3.7.3. Testung der Wirkung auf das humane Komplementsystem .....	38
<b>4. Ergebnisse <i>Arthrospira platensis</i> .....</b>	<b>40</b>
4.1. Kultivierung und Ernte .....	40
4.2. Polysaccharidanalytik .....	42
4.2.1. Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung .....	42
4.2.2. Quantitative Bestimmung von Uronsäuren.....	43
4.2.3. Sulfatgehalt .....	43
4.2.4. Acetatgehalt .....	44
4.2.5. Pyruvatgehalt .....	44
4.2.6. Oxalsäurehydrolyse .....	44
4.2.7. Uronsäurereduktion.....	46
4.2.8. Analyse der Bindungstypen .....	46
4.3. Chromatographische Methoden .....	50
4.3.1. Gelpermeationschromatographie .....	50
4.3.2. Ionenaustauschchromatographie.....	50
4.4. Proteinanalytik .....	53
4.4.1. Proteinquantifizierung.....	53

---

4.4.2. Proteinzusammensetzung.....	53
4.5. Testung der biologischen Aktivität .....	55
4.5.1. Testung auf Zytotoxizität .....	55
4.5.2. Testung auf antimikrobielle Wirkung .....	55
4.5.3. Testung der Wirkung auf das humane Komplementsystem .....	55
<b>5. Ergebnisse <i>Gloeotheca membranacea</i> .....</b>	<b>57</b>
5.1. Kultivierung und Ernte.....	57
5.2. Polysaccharidanalytik .....	59
5.2.1. Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung .....	59
5.2.2. Quantitative Bestimmung von Uronsäuren .....	60
5.2.3. Sulfatgehalt .....	60
5.2.4. Acetatgehalt .....	61
5.2.5. Pyruvatgehalt.....	61
5.2.6. Oxalsäurehydrolyse .....	61
5.2.7. Uronsäurereduktion .....	63
5.2.8. Analyse der Bindungstypen .....	63
5.3. Chromatographische Methoden.....	67
5.3.1. Gelpermeationschromatographie .....	67
5.3.2. Ionenaustauschchromatographie .....	67
5.4. Proteinanalytik.....	70
5.4.1. Proteinquantifizierung .....	70
5.4.2. Proteinzusammensetzung.....	70
5.5. Testung der biologischen Aktivität .....	72
5.5.1. Testung auf Zytotoxizität .....	72
5.5.2. Testung auf antimikrobielle Wirkung .....	72
5.5.3. Testung der Wirkung auf das humane Komplementsystem .....	72
<b>6. Ergebnisse <i>Phormidium spec.</i>.....</b>	<b>74</b>
6.1. Kultivierung und Ernte.....	74
6.2. Polysaccharidanalytik .....	77
6.2.1. Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung .....	77
6.2.2. Quantitative Bestimmung von Uronsäuren .....	78
6.2.3. Sulfatgehalt .....	78
6.2.4. Acetatgehalt .....	78
6.2.5. Pyruvatgehalt.....	78
6.2.6. Oxalsäurehydrolyse .....	78

6.2.7. Uronsäurereduktion.....	80
6.2.8. Analyse der Bindungstypen .....	81
6.3. Chromatographische Methoden .....	85
6.3.1. Gelpermeationschromatographie .....	85
6.3.2. Ionenaustauschchromatographie.....	86
6.4. Proteinanalytik .....	88
6.4.1. Proteinquantifizierung.....	88
6.4.2. Proteinzusammensetzung .....	88
6.5. Testung der biologischen Aktivität .....	90
6.5.1. Testung auf Zytotoxizität .....	90
6.5.2. Testung auf antimikrobielle Wirkung.....	90
6.5.3. Testung der Wirkung auf das humane Komplementsystem .....	90
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>92</b>
7.1. Kultivierung.....	92
7.2. Charakterisierung der EPS.....	95
7.2.1. Neutralzuckerzusammensetzung.....	95
7.2.2. Uronsäure- und Sulfatgehalt .....	97
7.2.3. Weitere Substituenten .....	99
7.2.4. Analyse der Bindungstypen .....	99
7.2.5. Oxalsäurehydrolyse .....	102
7.3. Chromatographische Methoden .....	105
7.3.1. Gelpermeationschromatographie und Ionenaustauschchromatographie .....	105
7.4. Proteinanalytik .....	107
7.5. Biologische Aktivität .....	110
<b>8. Zusammenfassung/Abstract.....</b>	<b>112</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>124</b>
<b>11. Lebenslauf .....</b>	<b>125</b>
<b>12. Ehrenwörtliche Erklärung zu §8 Absatz 1 der Promotionsordnung....</b>	<b>126</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

2-O-Me-Xyl	2-O-Methyl-Xylose
AHL	<i>N</i> -Acyl-Homoserin-Lacton
Ala	Alanin
Arg	Arginin
<i>A. plat.</i>	<i>Arthrospira platensis</i>
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
Ara	Arabinose
AS	Aminosäure
Asp	Asparagin
Asx	Asparagin und -säure
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Ca-SP	Calcium-Spirulan
conc.	Konzentriert
Cys	Cystein
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
DS	Degree of Sulphation, Anzahl Sulfatmoleküle pro Zuckermonomer
EA	Elementaranalyse
EPS	Exopolysaccharid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
Fuc	Fucose
GABA	γ-aminobutyric acid, γ-Aminobuttersäure
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
Glu	Glutamin
Glx	Glutamin und -säure
Gly	Glycin
<i>G. memb.</i>	<i>Gloeotheca membranacea</i>

GPC	Gelpermeationschromatographie
HCl	Salzsäure
HClO <sub>4</sub>	Perchlorsäure
His	Histidin
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
hV	hydrodynamisches Volumen
Hyp	Hydroxyprolin
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IEC	Ion Exchange Chromatography, Ionenaustauschchromatographie
Ig	Immunglobulin
Ile	Isoleucin
Ino	Inositol
kDa	Kilodalton
KDO	Ketodeoxyoctonat
l	Liter
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
Lsgm	Lösungsmittel
Lys	Lysin
MAA	mycosporin-like amino acid
MAK	Membrangriffskomplex
MALLS	Multiangle-Laser-Light Scattering
Man	Mannose
MASP	MBL-assozierte Serin-Proteasen
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MeI	Methyljodid
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molecular weight cut off
N	Stickstoff
NaBD <sub>4</sub>	Natriumbordeuterid
NaBH <sub>4</sub>	Natriumborhydrid

---

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
Orn	Ornithin
Phe	Phenylalanin
PMAA	Permethylierte Alditolacetate
Pro	Prolin
<i>P. sp.</i>	<i>Phormidium sp.</i>
Rha	Rhamnose
Rib	Ribose
RPS	released polysaccharides
Rt	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
SAG	Sammlung von Algenkulturen in Göttingen
Ser	Serin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TIC	total ion chromatogram
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
$\bar{x}$	Mittelwert
Xyl	Xylose

---

# 1. Einleitung

## 1.1. Systematik

Cyanobakterien sind weltweit verbreitete Organismen mit etwa 2000 Arten und kommen auch an teilweise extremen Standorten, wie heißen Quellen (Bresinsky et al., 2008) oder in Wüsten (Hu et al., 2003) vor. Sie existieren schon seit mindestens 2,5 Milliarden Jahren (Gantt, 2011).

Zur systematischen Einordnung der Cyanobakterien gibt es verschiedene Ansätze. Besonders in der Ebene der Ordnungen gibt es viele Diskussionen. Die Einteilung nach Rippka et al., 1979, erfolgt nach morphologischen, physiologischen, biochemischen und genetischen Charakteristika und ergibt 5 sogenannte „Sub-Klassen“. Die Einteilung des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) beruht auch auf morphologischen Eigenschaften der Cyanobakterien; hierbei wird allerdings in 7 Ordnungen unterschieden. Bei beiden Klassifizierungssystemen gehören die Stämme der Gattung *Gloeotheca* zur Ordnung der Chroococcales (einzellig, evtl. als Aggregate vorliegend, Vermehrung durch Querteilung oder Knospung), die Gattungen *Arthrospira* und *Phormidium* gehören zur Ordnung der Oscillatoriales (filamentöse Formen, binäre Zellteilung zur Vermehrung, keine Heterocysten) (Abbildung 1).

Nach Leão et al., 2012, scheinen diese Einteilungen aber aufgrund der hohen Bio- und Chemodiversität der Cyanobakterien zu einfach.

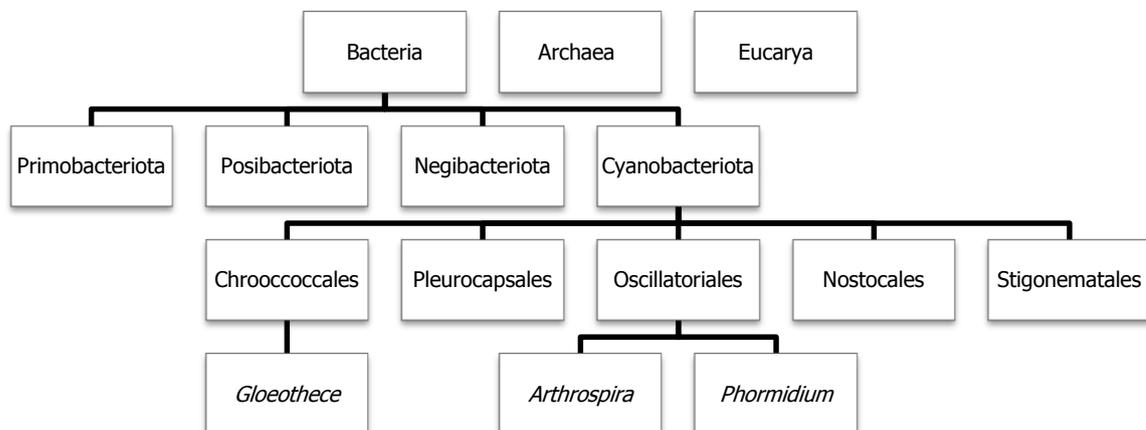


Abbildung 1: Systematische Einordnung der untersuchten Stämme  
(nach Bresinsky et al., 2008; Whitton & Potts, 2000; Rippka et al., 1979)

## 1.2. Zytologie & Morphologie

Cyanobakterien wurden früher als Blaualgen oder Blau-Grün-Algen bezeichnet (Whitton & Potts, 2000). Dies beruht zum einen darauf, dass einige Arten eine fädige Erscheinung haben und damit algenähnlich wirken (Bresinsky et al., 2008). Zum anderen sind Cyanobakterien in der Lage, das Phycobilin-Pigment Phycocyanin zu produzieren. Dieses verleiht den Organismen unter bestimmten Bedingungen eine bläuliche Farbe (Whitton & Potts, 2000). Im Unterschied zu den eukaryotischen Algen zeigt sich jedoch ein prokaryotischer Zellaufbau der Cyanobakterien. Es fehlen Zellkern, Mitochondrien, Lysosomen, endoplasmatisches Reticulum, membranbegrenzte Chloroplasten und eine Zellsaftvakuole. Die DNA liegt als sogenannter Chromatinapparat frei im Centroplasma vor (Bresinsky et al., 2008).

Cyanobakterien sind Photosynthese-betreibende Prokaryoten (Whitton & Potts, 2000). Einzigartig unter den Bakterien erfolgt dies mithilfe von Chlorophyll a. Auch andere gramnegative Bakterien sind zur Photosynthese befähigt, allerdings durch die sogenannten Bakterienchlorophylle a-e. Das Chlorophyll a liegt als Assoziationspigment an Thylakoide gebunden im Plasma vor. Außerdem liegen auch Carotinoide und die oben bereits erwähnten Phycobiline Phycocyanin und auch Phycoerythrin als akzessorische Pigmente vor (Bresinsky et al., 2008).

Der Zellwandaufbau der Cyanobakterien wird allgemein dem gramnegativen zugeordnet (Bresinsky et al., 2008). Die Zellen werden durch eine Plasmamembran, eine Mureinschicht (Peptidoglykane) und eine äußere Schicht aus Lipopolysacchariden begrenzt. Allerdings ist die Zellwanddicke mit 10 nm bis 700 nm teilweise beträchtlich größer als bei den klassisch gramnegativen Bakterien mit 2 nm bis 6 nm (Hoiczky & Hansel, 2000). Auch ist die Peptidoglykanschicht der cyanobakteriellen Zellwand deutlich dicker und stärker vernetzt als bei gramnegativen Bakterien. Hiermit entspricht sie eher dem Aufbau der grampositiven Zellwand, allerdings fehlen dafür die bei grampositiven Bakterien vorkommenden Teichonsäuren. Die cyanobakteriellen Lipopolysaccharide (LPS, siehe auch 1.3.1) sprechen wiederum für den gramnegativen Zellwandaufbau. Doch auch hier ist die Zusammensetzung leicht variiert: es sind teilweise ungewöhnliche Fettsäuren wie  $\beta$ -Hydroxy-Palmitinsäure im Lipid A-Teil zu finden. Das typische Ketodeoxyoctonat (KDO) fehlt dafür meist (Hoiczky & Hansel, 2000). Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die cyanobakterielle Zellwand sowohl gramnegative als auch –positive Eigenschaften besitzt und damit eine Zwischenposition einnimmt.

Als Reservestoffe sind bei den Cyanobakterien Cyanophyceenstärke, ein Glykogen-ähnliches Glucan, gespeichert zwischen den Thylakoiden (Bresinsky et al., 2008), und Cyanophycinkörnchen zu finden. Diese werden aus Polypeptiden gebildet, welche aus Asparaginsäure und Arginin zu gleichen Teilen bestehen. Die Polymere dienen als eine Art

Stickstoffspeicher und kommen vermehrt in Heterocysten vor, welche besonders bei Stickstoffmangel gebildet werden. Durch das in Heterocysten enthaltene Enzym Nitrogenase kann Luftstickstoff ( $N_2$ ) fixiert werden (Schlegel, 1992). Erkennen lassen sich diese Heterocysten lichtmikroskopisch durch eine verdickte Zellwand mit Celluloseeinlagerung und durch höckerartige Ausbildungen (polare Noduli) an den Zellenden (van den Hoek, 1978).

Viele Cyanobakterienarten produzieren Polymere mit einem hohen Zuckeranteil und geben diese nach außen ab. Dabei kann in Hülle, Kapsel und Schleim unterschieden werden. Von einer Hülle spricht man, wenn die Polysaccharide in einer dünnen Schicht die Zellen locker umgeben. Eine Kapsel liegt vor, wenn die abgegebenen Polysaccharide etwas viskoser sind, eng an den Zellen anliegen und eine scharfe Abgrenzung zeigen. Die Bezeichnung Schleim wird verwendet, wenn die Polysaccharide die Zellen als diffuse Schicht umgeben und dabei keine scharfe Abgrenzung zeigen. Werden Cyanobakterien in Kultur gehalten, können sich im Kulturmedium die Polysaccharide von Kapsel und Schleim wiederfinden lassen, da diese meist leicht wasserlöslich sind. Sie haben unterschiedliche Bezeichnungen, u.a. RPS (released polysaccharides, De Philippis & Vincenzini, 1998). In der vorliegenden Arbeit werden sie als Exopolysaccharide (EPS) bezeichnet (siehe auch 1.4).

Das Aussehen von Cyanobakterien ist sehr vielgestaltig. Es lassen sich ein-, wenig- bis vielzellige Organismen finden. Die Form kann von Kokken über Stäbchen bis hin zu Filamenten variieren. Diese können einzeln oder auch in Aggregaten, umgeben von Kapseln bzw. Schleimen, vorliegen. Bei den fädigen Formen können echte und unechte Verzweigungen (durch Zerfall der Trichome mit anschließender Zellteilung innerhalb einer Hülle) vorliegen (Whitton & Potts, 2000).

Wie in 1.1 bereits kurz erwähnt, gehört die Gattung *Gloeotheca* mit der in dieser Arbeit untersuchten Art *Gloeotheca membranacea* zur Ordnung der Chroococcales. Hierbei liegen die Zellen in einer besonderen Weise vor. Jeweils 1 bis 2 Zellen sind von einer inneren Hülle umgeben. Mehrere Zellgruppen werden dann von einer äußeren Hülle umgeben (Tease et al., 1991; Abbildung 2, c).



Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Stämme

a) *Arthrospira platensis*; b) *Phormidium spec.*; c) *Gloeotheca membranacea*

Die auch in dieser Arbeit untersuchten Cyanobakterienstämme *Arthrospira platensis* und *Phormidium spec.* gehören zur Ordnung der Oscillatoriales. Zu dieser Gruppe gehören filamentöse Formen ohne Heterocysten. Die Organismen von *Phormidium spec.* bilden fädige Trichome aus; die Organismen von *Arthrospira platensis* sind helikal, also spiralförmig, geformt (Abbildung 2, b) und a)).

Als erste zur Photosynthese-befähigte Organismen wird den Cyanobakterien die Rolle der ersten Lieferanten der heutigen Sauerstoffatmosphäre zugesprochen. Laut der Endosymbiontentheorie wurden vor ca. 1,6 Milliarden Jahren Cyanobakterien von Eukaryoten phagozytiert und bildeten damit die Basis für die Photosynthese-betreibenden Chloroplasten der Pflanzen (Gantt, 2011). Belegt scheint dies dadurch, dass die Plastiden durch eine doppelte Membran kompartimentiert vom Zytoplasma getrennt vorliegen, wobei die innere Membran aus den bakterientypischen Peptidoglykanen besteht (Bryant, 1994). Außerdem zeigt sich bei der eigenen, zirkulären Plastiden-DNA eine Sequenzverwandschaft mit denjenigen der Cyanobakterien (Bresinsky et al., 2008).

### 1.3. Cyanobakterielle Stoffwechselprodukte

Cyanobakterien zeigen eine Vielfalt an interessanten Stoffwechselprodukten, darunter Toxine (1.3.1), aber auch pharmazeutisch (1.3.2) und industriell (1.3.3) nutzbare Stoffe. Exopolysaccharide und deren Anwendungsmöglichkeiten werden in Kapitel 1.4 gesondert besprochen.

Als Photosynthese-betreibende Organismen sind Cyanobakterien von Sonnenlicht abhängig, gleichzeitig müssen sie sich vor übermäßiger UV-Einstrahlung schützen. Dies geschieht neben Expositionsvermeidung, antioxidativen Mechanismen und zellulären Reparaturmechanismen durch Produktion von Mycosporinen, Mycosporin-ähnlichen Substanzen (MAAs, mycosporin-like amino acids) und Scytonemin, welche wie ein Sonnenschutzmittel wirken. Die beiden erstgenannten werden in die Zelle eingelagert und erfüllen zusätzlich noch weitere Aufgaben wie antioxidative Funktionen und osmotische Regulation. Scytonemin hingegen wird sekretiert und in die Exopolysaccharid-Hülle eingelagert (Leão et al., 2012).

Auch der Fraßschutz ist ein wichtiger Grund zur Produktion von Stoffwechselprodukten, hierbei handelt es sich insbesondere um Toxine (1.3.1). Eine Reihe von weiteren sekundären Stoffwechselprodukten bildet die Grundlage der Allelopathie, z.B. die Wachstumshemmung anderer Spezies durch Sekretion von bestimmten Substanzen. Auch das „Quorum sensing“ basiert auf Sekretion von Signalstoffen wie *N*-Acyl-Homoserin-Lactonen (AHLs), über welche innerhalb und seltener zwischen verschiedenen Spezies kommuniziert werden kann. Als Beispiel: AHLs werden kontinuierlich von allen Zellen einer Kolonie produziert. Wird eine bestimmte Konzentration überschritten, erfolgt eine Veränderung in der Genexpression. Auf diese Weise lassen sich zelluläre Prozesse wie Bewegung, Biolumineszenz oder Biofilmproduktion steuern. Die Regulation der Genexpression erfolgt also abhängig von der Populationsdichte. Auch im Wettbewerb um rare Nährstoffe nutzen Cyanobakterien die Produktion von bestimmten Substanzen, die Siderophore, welche hochaffine Liganden für Metallionen darstellen (Leão et al., 2012). Es zeigt sich also eine Vielzahl von Gründen und Motivationen, Stoffwechselprodukte zu generieren. Weitere Substanzen werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

Die Kultivierung von Cyanobakterien als Lieferanten von Stoffwechselprodukten bietet vielen anderen Organismen gegenüber zahlreiche Vorteile. Sie zeigen adäquate Wachstumsraten und haben nur geringe Ansprüche an Nährstoffe. Als Energie- und Kohlenstoffquellen sind Sonnenlicht und CO<sub>2</sub> ausreichend (Ducat et al., 2011). Cyanobakterien sind im Vergleich zu z.B. Pflanzen auch deutlich einfacher genetisch zu verändern, um höhere Ausbeuten an bestimmten Produkten zu erreichen (Machado & Atsumi, 2012). Die Cyanobakterienkultivierung steht auch nicht in Konkurrenz zu Anbauflächen für Lebensmittel, wie Ethanol aus Mais für Biodiesel kontra Mais als Lebensmittel, da sie hauptsächlich in Bioreaktoren vonstattengeht und dafür auch

unwirtlichere Flächen genutzt werden können. Allerdings ist der Wasserbedarf für die Kultivierung heutzutage noch recht hoch. Durch neue Bioreaktorendesigns könnte dieser aber weiter gesenkt werden. Insgesamt ist die Gewinnung von cyanobakteriellen Produkten allerdings noch recht kostenintensiv, da die Ernte, besonders von kleinen einzelligen Cyanobakterien, oder die Isolierung von Inhaltsstoffen oft recht aufwendig ist. Damit die cyanobakterielle Produktion effizient wird und das zukunftsweisende Potential voll ausgeschöpft werden kann, sind also noch einige Verbesserungen notwendig (Ducat et al., 2011).

### **1.3.1. Toxine**

Über 300 verschiedene cyanobakterielle Alkaloide aus marinen Stämmen sind bisher bekannt, darunter 128 stickstoffhaltige (Uzair et al., 2012). Diese lassen sich besonders oft in cyanobakteriellen Blüten finden, welche sich speziell in eutrophen Gewässern bilden, da hier ein Überschuss an Nitraten und Phosphaten vorliegt. Dieses Phänomen wird vor allem durch eine hohe Temperatur im Sommer, welche das optimale Wachstum von z.B. Grünalgen und Diatomeen (Kieselalgen) überschreitet, gefördert. Die Cyanobakterien-Blüten haben einen großen Einfluss auf die Wasserqualität und damit auf Pflanzen und Fische. Aber auch Säugetiere und schlussendlich auch der Mensch tragen gesundheitliche Schäden durch Konsum des kontaminierten Wassers bzw. Verzehr der darin lebenden Fische oder Muscheln davon. Auch schon der Hautkontakt z.B. durch Wassersport oder das Einatmen feinsten Wassertröpfchen kann Gesundheitsschäden nach sich ziehen (Valério et al., 2010).

Die bisher bekannten cyanobakteriellen Toxine lassen sich in 4 toxikologische Hauptgruppen einordnen: Hepatotoxine, Cytotoxine, Neurotoxine und Dermatotoxine (Pearson et al., 2010).

Das weltweit am häufigsten vorkommende Alkaloid ist Microcystin mit ca. 90 bekannten Varianten und gehört zu den hepatotoxischen Stoffen. Microcystin wird u.a. von verschiedenen Arten der Gattungen *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* und *Oscillatoria* produziert. Es inhibiert die eukaryotischen Protein-Phosphatasen und aktiviert die Phosphorylasen, was zu einer extremen Phosphorylierung des Cytoskeletts der Hepatocyten führt und letztlich die Apoptose der Zellen einleitet (Valério et al., 2010). Nodularin, bisher nur isoliert aus *Nodularia spumigena*, wird ebenfalls den hepatotoxischen Stoffen zugeordnet und hat die gleiche Wirkung wie Microcystin. Beide Stoffe zeigen außerdem eine leberkarzinogene Wirkung bei subletalen Dosierungen (Pearson et al., 2010).

Saxitoxin und dessen Analoga gehören zu den Neurotoxinen. Sie werden von bestimmten Cyanobakterienarten wie *Anabaena circinalis* oder *Lyngbya wollei*, aber auch von Dinoflagellaten produziert und reichern sich in Meeresfrüchten an. Durch deren Konsum kommt es beim Menschen zur paralytischen Form der Muschelvergiftung (paralytic shellfish poisoning). Saxitoxin blockiert spannungsabhängige Natrium-Kanäle, hemmt aber auch Calcium-Kanäle und

verlängert die Passage von Kalium in die Herzmuskelzellen. Dies führt bei letalen Dosen zu Herzversagen (Pearson et al., 2010).

Ein weiteres wichtiges Cyanotoxin ist Cylindrospermopsin aus *Cylindrospermopsis raciborskii* oder auch *Aphanizomenon flos-aquae*. Da es aber nicht nur Effekte auf die Leber, sondern auch auf die Nieren, den Thymus und das Herz hat, gehört es zu den Cytotoxinen (Valério et al., 2010). Es hemmt Glutathion, die Protein-Synthese und Cytochrom P450. Außerdem gilt auch Cylindrospermopsin als potentiell Karzinogen (Pearson et al., 2010).

Anatoxin-a und dessen Abkömmlinge sind rein cyanobakterielle Toxine, u.a. aus den Gattungen *Anabaena*, *Microcystis* und *Phormidium*. Sie sind potente Agonisten sowohl am muskulären als auch am neuronal-nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor und führen so zu einer Überstimulierung der Zellen. Sind Atemmuskeln betroffen, sind die Folgen tonisch-klonische Krämpfe und Asphyxie (Valério et al., 2010).

Bekannt sind auch die Lipopolysaccharide (LPS, siehe auch 1.2), welche sowohl bakteriellen als auch cyanobakteriellen Ursprungs sein können. Diese pyrogenen Endotoxine haben außerdem eine inflammatorische und eine haut- und schleimhautreizende Wirkung. Insgesamt gelten cyanobakterielle LPS als nicht ganz so toxisch wie bakterielle LPS, jedoch können sie, speziell in Cyanobakterien-Blüten, sehr hohe Konzentrationen erreichen (Bernadová et al., 2008).

### **1.3.2. Pharmazeutisch nutzbare Stoffwechselprodukte**

Cyanobakterien bieten eine Unzahl von bioaktiven Inhaltsstoffen, davon auch viele mit pharmazeutisch nutzbarer Wirkung. Es haben sich antibakterielle, antivirale, antifungale und antikanzerogene Wirkungen feststellen lassen (Burja et al., 2001; Abed et al., 2009). Einige Substanzen sollen im Folgenden beispielhaft erläutert werden.

So zeigt z.B. das Protein Cyanovirin-N aus *Nostoc ellipsosporum* eine antivirale Wirkung, indem es die Fusion des HI-Virus (human immunodeficiency virus, HIV) mit der Wirtszelle verhindert (Burja et al., 2001). Eine vergleichbare Wirkung hat Calcium-Spirulan (Ca-SP), ein sulfatiertes Polysaccharid aus einem Heiß-Wasser-Extrakt aus *Arthrospira platensis*. Die Penetration von Herpes simplex-Viren Typ 1, humanen Cytomegalieviren, Masernviren, Influenza A-Viren und HI-1-Viren in die Wirtszelle wird verhindert und damit deren Replikation (Hayashi et al., 1996; Lee et al., 2001, Rechter et al., 2006). Ca-SP zeigt zusätzlich noch antikoagulatorische Eigenschaften, indem durch Interaktion mit dem Heparin-Cofaktor II (Prothrombin) die Freisetzung von Thrombin inhibiert wird (Majdoub et al., 2009). Dolastatin 10, ein Pentapeptid aus *Symploca*, zeigte in ersten klinischen Studien antikanzerogene Eigenschaften durch Bindung an Tubulin. Dadurch wird die Bildung der Mikrotubuli in der Metaphase der Zellteilung inhibiert. In einer Phase II-Studie zur Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs und Ovarialkarzinomen

kristallisierten sich allerdings neurotoxische Nebenwirkungen heraus, was zum Abbruch der Studie führte. Dolastatin 10 diente im Anschluss aber als Ausgangsstoff für semisynthetische Weiterentwicklungen wie Soblidotin mit noch höherer Antitumoraktivität und reduzierter Neurotoxizität (Simmons et al., 2005). Diese Substanz hat mittlerweile zwei Phase II-Studien zu nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und zu Weichteilsarkomen durchlaufen und wurde als sicher eingestuft (Patel et al., 2006; Montaser & Luesch, 2011, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Die in Cyanobakterien enthaltenen Pigmente wie  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin und C-Phycocerythrin zeigen antioxidative, antiinflammatorische und teilweise antikanzerogene Wirkungen (Stengel et al., 2011).

*Arthrospira platensis* wird unter dem Namen „Spirulina“ als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet. Hierbei sollen ein hoher Proteingehalt von ca. 65% des Trockengewichts und ein hoher Vitamin B<sub>12</sub>- und Provitamin A-Gehalt der Gesundheit förderlich sein. Auch die essentielle Fettsäure  $\gamma$ -Linolensäure ist in den Zellen enthalten, welche über die Prostaglandinsynthese blutdruck- und cholesterolsenkende Eigenschaften hat (Sánchez et al., 2003; Uzair et al., 2012). *Aphanizomenon flos-aquae* wird ebenfalls als Nahrungsergänzungsmittel mit ähnlichen Inhaltsstoffen vertrieben. Doch besonders bei dieser Cyanobakterienart stellt sich das Problem, dass die Biomasse in der Regel aus natürlichen Vorkommen geerntet wird, die mit *Microcystis* verunreinigt sein können. Dadurch wird aus dem „gesunden“ Nahrungsergänzungsmittel oft ein gesundheitsschädliches Produkt (Vichi et al., 2012).

### **1.3.3. Weitere Anwendungen**

Weitere nicht-pharmazeutische Anwendungsmöglichkeiten sind in den letzten Jahren durch intensive Forschung aufgezeigt worden.

So werden akzessorische Pigmente wie  $\beta$ -Carotin und die Phycobiliproteine in der Geflügelzucht dem Futter beigelegt, um eine Farbvertiefung von Eigelb zu erzielen (Uzair et al., 2012).

Einige Cyanobakterienarten, wie verschiedene *Arthrospira*- oder *Synechocystis*-Arten, produzieren Polyhydroxyalkanoate. Diese bilden nach Polymerisation ein bioabbaubares Plastik, welches ähnliche Eigenschaften wie Polypropylen und damit ideale Voraussetzungen besitzt, petrochemisch basiertes Plastik zu ersetzen (Abed et al., 2008; Ducat et al., 2011).

Cyanobakterien bieten großes Potential als Energiequelle der Zukunft. So können Nitrogenase-haltige Heterocysten in Cyanobakterien unter Stickstoffmangel-Bedingungen Wasserstoff produzieren, welches als erneuerbare Energie genutzt werden kann. Auf diese Weise können fossile Ressourcen geschützt werden (Abed et al., 2008). Auch eine Alkoholproduktion durch genetisch veränderte Cyanobakterien ist möglich. Ethanol und besonders Isobutanol dienen hierbei als Ersatz für klassische Kraftstoffe wie Benzin

(Machado & Atsumi, 2012). Rekombinante Cyanobakterien sind in der Lage, Lipide bzw. Fettsäuren (Roessler et al., 2009) in großen Mengen mit CO<sub>2</sub> als Kohlenstoff- und Sonnenlicht als Energiequelle zu produzieren, aus welchen dann durch Veresterung Biodiesel gewonnen werden kann. Der größte Vorteil dabei ist, dass der Platzbedarf für die Kultivierung von Cyanobakterien nicht mit den Flächen zur Lebensmittelproduktion in Konkurrenz steht, sondern auch eher unwirtliche Flächen genutzt werden können (1.3; Machado & Atsumi, 2012).

Auf die Anwendungsmöglichkeiten von Exopolysacchariden bzw. exopolysaccharidproduzierenden Cyanobakterien wird in Kapitel 1.4.2 eingegangen.

## 1.4. Cyanobakterielle Exopolysaccharide

### 1.4.1. Aufbau und Funktion

Wie in 1.2 bereits erläutert, sekretieren viele Cyanobakterienarten Polysaccharide. Diese EPS können zunächst in 2 Gruppen eingeteilt werden, zum einen diejenigen, die an der Zelloberfläche gebunden bleiben, zum anderen diejenigen, die in die Umgebung abgegeben werden (RPS, Pereira et al., 2009). Es drängt sich die Frage auf, ob die RPS nur aus gelösten Teilen von Kapsel oder Schleim entstehen oder ob unterschiedliche Biosynthesewege für diese EPS bestehen (De Philippis et al., 2001). Für einige Arten, z.B. *Gloeothece sp.* PCC 6909, scheint das zweitgenannte durch eine unterschiedliche Zusammensetzung von Hülle und RPS bestätigt (Tease et al., 1991; Ortega-Calvo & Stal, 1994).

Strukturell können Exopolysaccharide in Homo- und Heteropolysaccharide unterteilt werden (Sutherland, 2001). Die cyanobakteriellen EPS gehören bis auf wenige Ausnahmen zu den Heteropolysacchariden (De Philippis et al., 2001; Pereira et al., 2009). 75% von ihnen sind aus 6 oder mehr verschiedenen Monosacchariden aufgebaut (Pereira et al., 2009). EPS aus Bakterien oder Algen hingegen bestehen in der Regel aus weniger als 4 verschiedenen Zuckern (De Philippis & Vincenzini, 1998). Insgesamt wurden bisher aber nur 10 unterschiedliche Monosaccharide in cyanobakteriellen EPS festgestellt: die Hexosen Glucose (Glc), Galactose (Gal) und Mannose (Man), die Pentosen Ribose (Rib), Arabinose (Ara) und Xylose (Xyl) und die Desoxyhexosen Fucose (Fuc) und Rhamnose (Rha). Hinzu gehören noch die Uronsäuren Glucuron- und Galacturonsäure (GlcA und GalA). Diese sind bei ca. 90 % der cyanobakteriellen EPS zu finden, selten hingegen bei anderen Mikroorganismen (De Philippis et al., 2001). Das am häufigsten zu findende und in der Regel auch am höchstkonzentrierte Monosaccharid ist Glc; dennoch wurden auch EPS beschrieben, bei denen Xyl, Ara, Gal oder Fuc die höchsten Anteile hatten (Pereira et al., 2009). Die Anwesenheit von Methyl- und/oder Aminozucker wird selten beschrieben (Weckesser et al., 1987; Filali-Mouhim et al., 1993; Flamm, 2012). Zusätzlich zu den Uronsäuren wird der anionische Charakter der EPS oft durch geladene Substituenten wie Sulfat- oder Pyruvatgruppen verstärkt. Außerdem sind häufig hydrophobe Anteile wie Acetatgruppen oder Proteinanteile zu finden (De Philippis et al., 2001). Die Zusammensetzung der EPS ist abhängig von Stamm und Kulturbedingungen, aber auch vom Alter bzw. der Wachstumsphase der Kultur (Nicolaus et al., 1999; De Philippis & Vincenzini, 1998).

Den EPS werden verschiedene Rollen bzw. Aufgaben je nach Stamm und Lebensraum zugesprochen. Zum einen dient die Polysaccharid-Kapsel dem Schutz vor Austrocknung und damit als Wasserspeicher, besonders in extremen Gebieten wie Wüsten oder in salzhaltiger Umgebung. Zum anderen wird die Haftung an Oberflächen und damit die Biofilmbildung durch die hydrophoben Regionen der EPS gesichert und ein Wegspülen verhindert. Eine weitere

Funktion, die den EPS zugesprochen wird, ist der Schutz der Heterocysten vor Sauerstoff, da dieser die enthaltene Nitrogenase (1.2) inaktivieren würde. Zusätzlich können durch die anionische Ladung der EPS Kationen, besonders Metall-Ionen, gebunden werden. Dies verschafft einen Vorteil im Kampf um mangelnde Nährstoffe. Eisen und Calcium sind dabei essentiell für die Stickstofffixierung, Mangan und auch Eisen für das Zellwachstum (De Philippis & Vincenzini, 1998). Die Affinität zu Metall-Ionen ist allerdings nicht nur abhängig von der Menge der negativen Ladungen, sondern auch von deren Verteilung innerhalb des Moleküls und damit deren Zugänglichkeit (Pereira et al., 2009). Wie in 1.3 bereits erläutert, tragen die EPS außerdem zum UV-Schutz der Zelle bei: Scytonemin wird in die Polysaccharid-Hülle eingelagert (Leão et al., 2012). Auch die Beteiligung an der Fähigkeit zur Fortbewegung einiger Cyanobakterienarten wird diskutiert. Hierbei soll durch ein Zusammenspiel von Oberflächenfibrillen und Sekretion von Polysacchariden aus bestimmten Poren ein Gleiten möglich sein (Hoiczky & Hansel, 2000).

#### **1.4.2. Mögliche Anwendungen**

EPS mit einem hohen Molekulargewicht ergeben in wässriger Lösung oft hochviskose Gele. Eine Anwendung als Verdickungsmittel in Lebensmitteln wäre denkbar. Die EPS von z.B. *Anabaena* ATCC 33047 und *Cyanospira capsulata* zeigen rheologische Eigenschaften vergleichbar oder besser als Xanthangummi bakteriellen Ursprungs, welches in der Lebensmittelindustrie als Gelier- und Verdickungsmittel eingesetzt wird (De Philippis et al., 2001; García-Ochoa et al., 2000). Aufgrund der lipophilen Anteile, wie Acetatgruppen, die Desoxyzucker Fuc und Rha und/oder Proteinanteilen, ist auch eine emulgierende Wirkung vorhanden (De Philippis & Vincenzini, 1998). Durch die Anwesenheit geladener Gruppen entsteht ein gutes Wasserbindungsvermögen, was Möglichkeiten zur Formulierung kosmetischer Produkte aufzeigt (Sutherland, 1994).

Exopolysaccharidproduzierende Cyanobakterien können einen wertvollen Beitrag zur Abwasserreinigung leisten. Durch die negative Ladung der EPS können diese als Chelatbildner für positiv geladene Schwermetalle dienen (De Philippis et al., 2011; Pereira et al., 2010).

Für verschiedene sulfatierte Polysaccharide aus marinen Spezies wurde eine antivirale oder antikanzerogene Wirkung festgestellt (Witvrouw & De Clerq, 1997; Guerra et al., 2013). Wie in 1.3.2 bereits erwähnt, zeigt auch das mit heißem Wasser extrahierte sulfatierte Ca-Spirulan aus *Arthrospira platensis* antivirale Aktivität (Hayashi et al., 1996). Eine entsprechende Wirkung von cyanobakteriellen sulfatierten Exopolysacchariden wäre ebenso denkbar (De Philippis & Vincenzini, 1998).

Der Vorteil der Nutzung der EPS ist, dass diese im Medium gelöst vorliegen und nicht so aufwendig zu gewinnen sind wie Stoffe, die zunächst noch aus den Zellen isoliert werden müssen.

## 1.5. Komplementsystem

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen, humoralen Immunsystems, verstärkt aber z.T. auch das adaptive Immunsystem. Es kann also als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem, sowohl in den humoralen als auch in den zellulären Reaktionsketten angesehen werden (Vollmar & Dingermann, 2005).

Das Komplementsystem wird von einer Kaskade aus über 35 Proteinen gebildet (Tudoran & Kirschfink, 2012). Dabei gibt es drei unterschiedliche Aktivierungswege, die alle in einer gemeinsamen Endstrecke, der Bildung des lytischen Membran-Angriffs-Komplexes (MAK), ausgehend von der C5-Konvertase, münden.

Der am längsten bekannte ist der klassische Weg (Ehrnthaller et al., 2011). Nachdem die Antikörper IgM oder IgG an ein Antigen eines Pathogens gebunden haben, erfolgt eine Konformationsänderung an deren Fc-Region. Dies ermöglicht die Bindung des Komplementproteins C1 an die Komplement-bindenden Bereiche der Antikörper. Im Folgenden kommt es durch die Aktivierung von C1 zur Spaltung von C2 und C4 in deren a- und b-Untereinheiten. C4b und C2a bilden dann die C3-Konvertase C4b2a. Diese spaltet C3 in C3a und C3b. C3b wiederum bindet an C4b2a und es entsteht die C5-Konvertase des klassischen Wegs C4b2a3b. Zusätzlich zur Antikörper-vermittelten Aktivierung lässt sich der klassische Weg auch durch C-reaktives Protein, virale Proteine und nekrotische oder apoptotische Zellen induzieren.

Zur Aktivierung des alternativen Wegs kommt es durch Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen oder virus-infizierte Zellen, ischämisch geschädigtes Gewebe oder Fremdoberflächen. Auch C-reaktives Protein gilt als Aktivator. Dieser Weg basiert auf der andauernd ablaufenden spontanen Hydrolyse von C3 zu C3(H<sub>2</sub>O). Dieses wiederum bindet an Faktor B, der nun von Faktor D, einer Serinprotease, gespalten wird. Es entsteht die C3-Konvertase C3(H<sub>2</sub>O)Bb, welche vom Protein Properdin stabilisiert wird. Das durch diese Konvertase erhaltene C3b kann sich an Oberflächen von Bakterien, Pilzen, Viren oder Tumorzellen anlagern. Erfolgt dies nicht, wird C3b schnell wieder inaktiviert. An das oberflächengebundene C3b kann sich nun wieder Faktor B anlagern und wird von Faktor D gespalten, eine neue C3-Konvertase wird gebildet (Tudoran & Kirschfink, 2012). Es entsteht also ein positiver Rückkopplungseffekt (Ehrnthaller et al., 2011). Bindet jetzt noch mehr C3b an die C3-Konvertase, entsteht die C5-Konvertase des alternativen Wegs C3(H<sub>2</sub>O)BbP3b.

Der Lektin-Weg wird aktiviert, indem Mannose-bindendes Lektin (MBL) an Mannose-enthaltene Proteine auf Mikroorganismenoberflächen bindet. Auch eine Aktivierung durch Ficolin, lösliche kollagen-ähnliche Proteine, welche Zuckerstrukturen binden können, ist möglich. Die MBL-assoziierten Serinproteasen, MASP-1 und -2, werden nun aktiv. MASP-2 katalysiert die Spaltung von C2 und C4 in deren Untereinheiten und es bildet sich, wie im klassischen Weg, die C3-

Konvertase C4b2a. MASP-1 spaltet hingegen C2 und C3. Mit dem sich anlagernden C3b entsteht die C5-Konvertase C4b2a3b (Ehrnthaller et al., 2011).

Die gemeinsame Endstrecke aller drei Wege, ausgehend von den C5-Konvertasen, beginnt mit der Spaltung von C5 in die entsprechenden a- und b-Untereinheiten. C5b bleibt an der Zielzelle gebunden und assoziiert mit C6 und C7, was die Oberflächenbindung verstärkt. Durch die Anlagerung von C8 erfolgt eine Penetration in die Membran der Zielzelle. Eine stabile Pore wird durch die Anlagerung von 10-15 C9-Proteinen erreicht. Eine genügend große Anzahl von MAK sorgt dafür, dass die Zielzelle den Ein- und Ausfluss von Ionen, Wasser und kleinen Molekülen nicht mehr kontrollieren kann und schließlich zugrunde geht (Ehrnthaller et al., 2011, Tudoran & Kirschfink, 2012).

Die durch die verschiedenen Schritte entstehenden Proteine C3a, C4a und C5a sind potente Anaphylatoxine (Ehrnthaller et al., 2011). Sie sorgen für eine Entleerung von Mastzellen. Durch die Ausschüttung von Histamin kommt es zur Permeabilität der Blutgefäße, außerdem wird die Produktion von Sauerstoffradikalen von Makrophagen und bestimmten Granulozyten angeregt. Zusätzlich werden die Zielzellen durch C3b, C4b und C5b opsonisiert und damit für die Phagozytose markiert. Die C3-Spaltungsprodukte bilden die Brücke zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Dabei werden opsonisierte Antigene an den Komplement-Rezeptor 2 auf B-Zellen gebunden. Dies induziert die Bildung von spezifischen Antikörpern und die Differenzierung von B-Gedächtniszellen.

Da die verschiedenen Wege aber nicht nur durch Fremdorganismen bzw. -oberflächen, sondern auch durch körpereigene Strukturen aktiviert werden können, bestehen vielfältige Kontrollmechanismen. Zum einen gibt es die löslichen Komplementregulatoren, wie den C1-Inhibitor, den Faktor I, Vitronectin und Clusterin und die Carboxypeptidase N. Der C1-Inhibitor bindet an den C1-Komplex und sorgt für deren irreversible Inaktivierung, außerdem kann er auch MASP-1 und -2 inhibieren. Faktor I sorgt mithilfe verschiedener Co-Faktoren (Faktor H, C4-bindendes Protein, CD35 und CD46) für die Spaltung von C3b und C4b. Faktor H verhindert zudem noch die Bildung von C3-Konvertasen, indem es mit Faktor B konkurriert. Vitronectin und Clusterin verhindern die Anbindung von C7 zur Bildung des MAK. Die Carboxypeptidase N inaktiviert die Anaphylatoxine durch Abspaltung terminaler Aminosäuren. Die hingegen membrangebundenen Regulatoren des Komplementsystems sind CD35, CD46, CD55 und CD59. CD35 sorgt für den Zerfall von C3- und C5-Konvertasen und agiert als Co-Faktor für Faktor I. Man findet ihn hauptsächlich auf der Oberfläche von Erythrozyten und Leukozyten und in der Niere. CD46 ist ubiquitär im Körper, außer auf Erythrozyten, vorhanden und bildet einen der Co-Faktoren für die Spaltung von C3b. CD55 ist für den Zerfall von C3-Konvertasen verantwortlich, indem es verschiedene Fragmente ersetzt. CD59 verhindert die Anbindung der C9-Proteine zur Bildung des MAK (Ehrnthaller et al., 2011).

Ein überschießendes oder fehlreguliertes Komplementsystem, aufgrund von genetischen Defekten, schweren Infektionen, aber auch eines zu hohen Verbrauchs der Komplemente, kann zu schwerwiegenden Erkrankungen wie einer Sepsis oder Multi-Organ-Versagen führen. Auch verschiedene Formen der Glomerulonephritis, eine Transplantatabstoßung oder die Entstehung der rheumatoiden Arthritis werden auf eine übermäßige Aktivität des Komplementsystems zurückgeführt (Tudoran & Kirschfink, 2012). Durch fehlreguliertes Komplement kann zudem die Entwicklung verschiedener neurologischer Erkrankungen, wie Multiple Sklerose oder Morbus Alzheimer, gefördert werden.

Einige schwere Erkrankungen können heutzutage durch Komplementmodulation therapiert werden. Beim hereditären Angioödem, bei dem es durch einen genetischen Defekt zu einem Mangel an C1-Inhibitor kommt (Mutschler et al., 2001), wird ein humanes C1-Inhibitor-Konzentrat (Berinert<sup>®</sup> P) eingesetzt (Tudoran & Kirschfink, 2012). Der rekombinante, humanisierte monoklonale C5-Antikörper Eculizumab (Soliris<sup>®</sup>) ist zur Therapie der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie zugelassen (Ricklin & Lambris, 2007). Bei dieser Erkrankung liegt ein Gen-Defekt vor, bei dem es zur fehlerhaften Verankerung von Oberflächenproteinen, u.a. auch CD59 (s.o.), kommt (Vollmar & Dingermann, 2005). Der Antikörper blockiert die terminale Aktivierung zum MAK und verhindert so die Lyse von körpereigenen Erythrozyten. Auch zur Behandlung des sehr seltenen atypischen hämolytisch urämischen Syndroms, ausgelöst durch eine chronisch überschießende Aktivierung des Komplementsystems mit komplement-vermittelter thrombotischer Mikroangiopathie, ist Eculizumab seit 2011 zugelassen ([www.soliris.net](http://www.soliris.net)).

Aber auch noch viele weitere potentielle Arzneistoffe, u.a. lösliche Komplementregulatoren, Antikörper und Anaphylatoxin-Rezeptor-Antagonisten, werden derzeit in klinischen und präklinischen Studien untersucht (Ricklin & Lambris, 2007).

## 2. Zielsetzung

Cyanobakterien bieten vielfältige und interessante potentielle Nutzungsmöglichkeiten. Trotz der geringen Nährstoffansprüche ist die Cyanobakterienkultivierung heutzutage noch sehr kostenintensiv. Um sie ökonomisch interessant zu gestalten, ist eine Wertschöpfungskette unerlässlich (De Philippis et al., 2001). Das heißt, dass durch eine Multiprodukt-Strategie verschiedene Anwendungsmöglichkeiten einer Kultivierungslinie möglich gemacht werden. Sinnvoll ist es, z.B. hochpreisige Produkte wie Pharmazeutika oder andere Biopolymere mit dem gleichen Stamm zu produzieren, der auch zur Gewinnung von Energie genutzt werden kann.

Besonders die cyanobakteriellen Exopolysaccharide bieten ein breites Anwendungsspektrum und ein großes Potential auf hochpreisige Biopolymere. Besonderes Augenmerk wird auf die sulfatierten EPS gelegt, die in verschiedenen Untersuchungen antivirale und antikanzerogene Aktivität zeigten (De Philippis & Vincenzini, 1998). Besonders die in dieser Arbeit untersuchte Art *Arthrospira platensis* ist in Hinblick auf die Wertschöpfungskette interessant. Weltweit wird die tablettierte Biomasse als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet, aber auch Stoffwechselprodukte, wie das Polysaccharid Calcium-Spirulan, zeigen eine hohe biologische Aktivität (siehe 1.3.2). Mit *Gloeotheca membranacea* wurde eine Art der Gattung *Gloeotheca* ausgewählt, die sulfatierte EPS produzieren kann (Tease & Walker, 1987), welche bisher aber noch keiner biologischer Testung unterzogen wurden. Verschiedene *Phormidium*-Arten sind laut Literatur ebenfalls in der Lage sulfatierte Polysaccharide mit antiinflammatorischer Wirkung bzw. als Flockungsmittel zur Abwasserreinigung zu produzieren (Bar-Or & Shilo, 1987; Garbacki et al., 2000). Daher wurde *Phormidium spec.* zur Untersuchung auf bioaktives Potential ausgewählt.

Ziel dieser Arbeit ist die Kultivierung der verschiedenen Cyanobakterienarten, die Isolierung der EPS und deren Strukturaufklärung. Weiterhin soll durch verschiedene biologische Testungen das Potential dieser EPS für die pharmazeutische Nutzung untersucht werden; zum einen durch Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität, zum anderen zur Modulation des humanen Komplementsystems.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Allgemein verwendete Geräte und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten pharmazeutische oder eine höherwertige Qualität.

Wenn nicht anders bezeichnet, stammten alle verwendeten Glasgeräte von Fa. Duran Group GmbH, Wertheim/Main.

Dialysierschläuche	12-14 kDa, Fa. Mediacell International Ltd., London, UK
Gefriertrocknung	Alpha 1-4 LSC, Fa. Martin Christ, Osterode am Harz mit Vakuubrand RC 6, Fa. Vakuubrand, Wertheim
Heizblock	Thermolyne Bioblock Scientific Code 92607, Fa. Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA mit 10 ml V-Vials, Fa. Wheaton, Millville New Jersey, USA
pH-Messgerät	pH-Meter 761 Calimatic, Fa. Knick, Berlin
Pipetten	Eppendorf Research, Fa. Eppendorf, Hamburg mit Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße	1,5 ml und 2 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Rotationsverdampfer	Laborota 4000 efficient, Fa. Heidolph, Schwabach
Spektrophotometer	Varian Cary 50 UV-Vis-Spektrophotometer, Fa. Varian, Kalifornien, USA mit Polystyrol-Küvetten 67.741 und 67.742, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Trockenschrank	T6060, Fa. Heraeus, Waltham, Massachusetts, USA
Tubes	15 ml und 50 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Ultraschallgerät	Sonorex Super 10P Digital, Fa. Bandelin, Berlin
Vortexer	Vortex Genie 2, Fa. Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA
Waagen	Sartorius laboratory, Fa. Sartorius AG, Göttingen Sartorius genius, Fa. Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL 1002, Fa. GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Zentrifugen

Megafuge 1.0, Fa. Thermo Fischer, Waltham,  
Massachusetts, USA

Sigma 3K30, Fa. Sigma Laborzentrifugen, Osterode

## 3.2. Kultivierung

### 3.2.1. Cyanobakterienstämme

Die untersuchten Cyanobakterienstämme entstammen der „Sammlung von Algenkulturen“ (SAG) der Universität Göttingen, Deutschland.

- *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Gomont SAG 21.99, früher als *Spirulina platensis* bezeichnet
- *Gloeotheca membranacea* (Rabenhorst) Bornet SAG 26.84, auch als *Gloeocapsa spec.* bezeichnet
- *Phormidium spec.* SAG 47.90

Im Folgenden werden die Stämme mit *A. plat.*, *G. memb.* und *P. sp.* bezeichnet.

### 3.2.2. Kultivierungsmedium

Als Kulturmedium wurde NLDSN-10-Medium verwendet. Dabei handelte es sich um eine Abwandlung des DS-Mediums (Pohl et al., 1987) mit 10% Instant Ocean®-Lösung (35 g/l, künstliches Meersalz, Aquarium Systems, Ohio, USA) anstatt Meerwasser, um die Ionenkonzentrationen zu standardisieren (Junge, 2008).

Lösung A	Konzentration (mg/l)	Lösung B	Konzentration (mg/l)
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,4	FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	4
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,1	Na <sub>2</sub> EDTA*H <sub>2</sub> O	5,5
CoSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *3H <sub>2</sub> O	50
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,1		
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,01		
KNO <sub>3</sub>	500		
Instant Ocean®	3500		

Tabelle 1: Ionenkonzentrationen im Nährmedium

Für 1 l Nährmedium wurden 930 ml von Lösung A und 70 ml von Lösung B verwendet.

Beide Lösungen autoklavierte man getrennt voneinander (121°C, 30 min, Dampfsterilisator VST 40/60 S, Fa. Zirbus, Bad Grund), um Komplexbildungen zu vermeiden. Nach dem Abkühlen wurden sie unter sterilen Bedingungen vereint.

### 3.2.3. Kultivierungsbedingungen

Die Cyanobakterien wurden in 8 l-Batchkulturen in 10 l-Weithalsflaschen bei einer Temperatur von  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  und einer Lichtintensität von ca.  $120 - 150 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  (Lichtmessgerät: LI-185B Quantum/Radiometer/Photometer, Fa. LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) kultiviert. Das Medium beimpfte man mit einer kleinen Menge einer ca. 1 Woche alten Vorkultur (3.2.4). Es erfolgte eine dauerhafte Belüftung mit Druckluft über Belüftungskerzen (ca. 1 ml/min), was gleichzeitig für eine leichte Durchmischung sorgte. Da die Zellen aber leicht agglomerierten und sedimentierten bzw. sich an der Gefäßwand anhefteten, wurde zusätzlich regelmäßig (2x pro Tag) umgeschwenkt. Es wurden zwei parallele Ansätze kultiviert.

### 3.2.4. Erhaltungs- und Vorkultur

Sowohl die Erhaltungskulturen als auch die Vorkulturen wurden in 250 ml Nährmedium in einem 500 ml Kolben unter Standardkultivierungsbedingungen (3.2.3) auf einem Orbitalschüttler (ca. 100 U/min) gehalten, um Agglomeration und Sedimentation zu vermeiden. Ca. alle 6 Monate wurde eine kleine Menge der Erhaltungskultur in frisches Nährmedium überführt.

Alle Beimpfungsvorgänge erfolgten unter Laminar-Air-Flow-Bedingungen.

### 3.2.5. Wachstumsverlauf und -dokumentation

Alle 3-4 Tage wurden zur Wachstumsüberprüfung 10 ml-Proben unter aseptischen Bedingungen gezogen. Um den Volumenverlust durch Verdunstung und die damit einhergehende Erhöhung der Zelldichte rechnerisch auszugleichen, wurde bei jedem Probenzug die Höhe des Flüssigkeitsstandes in den Weithalsflaschen bestimmt und ein Korrekturfaktor errechnet (Volk, 2007). Die Weithalsflaschen hatten einen Innenradius von 10,5 cm. Das Volumen der gezogenen Probe wurde in die entsprechende hypothetische Höhe im Kulturgefäß umgerechnet:

$$H_p \text{ (cm)} = V(\text{cm}^3) / \pi * r^2(\text{cm}) \quad H_p = \text{rechnerische Höhe der gezogenen Probe (cm)}$$

Der Korrekturfaktor berechnete sich wie folgt:

$$\text{Korrekturfaktor} = (H_0 - H_v) / (H_0 - \sum H_p) \quad H_0 = \text{Höhe des Kulturmediums an Tag 0 (cm)}$$

$$H_v = \text{Höhe des Flüssigkeitsstandes am betreffenden Tag (cm)}$$

Für die gezogenen Proben erfolgte zunächst eine genaue Volumenermittlung. Im Anschluss wurde die Biomasse mittels Chlorophyllabsorptionsmessung bei 440 nm bestimmt.

Aufgrund der besonders starken Agglomeration der Zellen von *P. sp.* sedimentierten diese während der Absorptionsmessung schnell. Als zusätzlicher Indikator für das Wachstum der

Biomasse wurde hier auch das Sedimentationsvolumen der 10 ml-Proben in einem Messzylinder bestimmt.

Die entnommenen Proben wurden außerdem auf ihren Kohlenhydratgehalt hin untersucht (Dubois et al., 1956). Die Schwefelsäure sorgt für eine Umsetzung der Polysaccharide zu Furfuralen, welche durch Kondensation mit Phenol eine Farbveränderung zeigen. Hierzu wurde jeweils 0,259 ml EPS-haltige Nährlösung in ein Pyrex-Gefäß mit Schraubdeckel (Fa. Corning Inc., Corning, New York, USA) gegeben und 0,259 ml 5% wässrige Phenollösung hinzugefügt. Anschließend gab man zügig 1,3 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. dazu und mischte mit einem Vortexer. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde erneut gemischt und dann 20 min im Wasserbad bei 30°C inkubiert. Nun musste die Lösung laut Originalpublikation bei 490 nm (Hexosen) und 480 nm (Pentosen) vermessen werden. Diese Differenzierung war im Gemisch nicht immer möglich, daher wurde auf die Vermessung bei 480 nm verzichtet. Die Kalibrierung erfolgte mit Glucose-Lösungen mit Konzentrationen von 10 µg/ml bis 100 µg/ml. Als Blindwert diente Nährmedium.

Es wurden zudem mögliche Änderungen des pH-Werts während der Kultivierungszeit dokumentiert, indem bei den entnommenen Proben der pH-Wert bestimmt wurde.

### **3.2.6. Abernten**

Nach einer Kultivierungsdauer von ca. 50 Tagen wurde vor dem Abernten der Batchkultur noch einmal eine 10 ml-Probe gezogen und anschließend über eine Durchlaufzentrifuge (Contifuge 17 S, Fa. Heraeus Sepatech, Osterode) die Biomasse vom Kulturmedium abgetrennt (12.000 U/min, 20 min). Das in der Zentrifuge verbliebene Restvolumen wurde in einer konventionellen Zentrifuge abgetrennt und die jeweiligen Produkte vereinigt.

Das Kulturmedium wurde auf ca. 1 l am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die erhaltene Biomasse wurde lyophilisiert und ausgewogen.

### **3.3. Isolierung der Exopolysaccharide**

Das eingeeengte Kulturmedium erhitzte man in 100 ml-Portionen für 15 min auf 86°C (Heizplatte: RET basic; Fühler: IKATRON ETS D3; beides Fa. IKA Labortechnik, Staufen), um evtl. vorhandene Proteine auszufällen. Die Flüssigkeit wurde im Eisbad rasch abgekühlt und die Proteine anschließend über Zentrifugierung (5.000 U/min, 4°C) abgetrennt, gefriergetrocknet und gravimetrisch bestimmt.

Anschließend fällte man die Polysaccharide aus dem Überstand der Proteinfällung mit Ethanol (Endkonzentration 80%) und ließ sie über Nacht bei 4°C stehen. Es folgte ein erneuter Zentrifugierungsschritt mit 5.000 U/min. Der Überstand wurde abdekantiert und der Rückstand mit gekühltem Ethanol 80% gewaschen. Anschließend wurden die Polysaccharide in Aqua dem. gelöst, 5 Tage dialysiert und lyophilisiert.

### 3.4. Polysaccharid-Analytik

#### 3.4.1. Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung

Die Neutralzuckerzusammensetzung wurde nach der Vorschrift von Blakeney et al. (1983) durchgeführt. Dazu wurden ca. 2–5 mg Polysaccharid mit 1 ml 2 M Trifluoressigsäure (TFA) und 500 µg Inositol-Standard (50 µl, 1 g m-Inositol in 100 ml Aqua bidest.) in ein Wheaton V-Vial gegeben und 1 h bei 121°C im Bioblock zu Monomeren hydrolysiert. Anschließend überführte man die gesamte Probe in einen Spitzkolben. Nach dreimaligem Abrotieren mit Aqua bidest. zur Entfernung der TFA und Zugabe von 200 µl 1 M NH<sub>3</sub> erfolgte eine 90-minütige Reduktion der Monomere zu Alditolen bei 40°C mit 1 ml Natriumborhydrid-Lösung (1 g NaBH<sub>4</sub> in 50 ml DMSO). Diese wurde durch Zugabe von 100 µl Essigsäure gestoppt. Die anschließende Acetylierung erfolgte durch Zugabe von 2 ml Acetanhydrid und 200 µl des Katalysators 1-Methylimidazol. Die Probe wurde bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Aqua bidest. für die weitere Aufreinigung hinzugefügt. Die Alditolacetate wurden mit 1 ml 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert und anschließend mit 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Dichlormethan-Phase wurde abpipettiert und gaschromatographisch vermessen.

Gaschromatograph	HP 5890 Series, Fa. Hewlett Packard, Palo Alto, Kalifornien, USA mit Flammenionisation-Detektor (FID)
Säule	Fused-Silica Kapillarsäule, Optima-225-0.25 µm; 25 m x 0.25 mm ID, Fa. Macherey & Nagel, Düren
Temperaturprogramm	230°C isotherm, Injektor und Detektor 240°C

Zur qualitativen Analyse dienten die Retentionszeiten der Referenz-Alditolacetate. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Integration der Peaks. Wichtig hierbei war ein Korrekturfaktor für alle Monosaccharide (Tabelle 2), da diese vom FID unterschiedlich stark erkannt wurden.

Referenzsubstanzen:

- L-(+)-Arabinose (>99%, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)
- L-(-)-Fucose (>99%, Fa. NeoLab Migge GmbH, Heidelberg)
- D-(+)-Galactose (97%, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)
- D-(+)-Glucose (>99,5%, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)
- D-(+)-Mannose (>99%, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)
- L-(+)-Rhamnose Monohydrat (>99%, Fa. Merck, Darmstadt)
- D-(+)-Xylose (>99%, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim)

Zuckermonomer	Korrekturfaktor
<b>Rhamnose</b>	1,50
<b>Fucose</b>	1,32
<b>Arabinose</b>	1,16
<b>Xylose</b>	1,36
<b>Mannose</b>	1,23
<b>Galactose</b>	1,19
<b>Glucose</b>	1,28

Tabelle 2: Korrekturfaktoren der Zucker in der gaschromatographischen Analyse der Acetylierung

Als weiterer Identifizierungsschritt wurden die acetylierten EPS auch per GC-MS untersucht.

Gaschromatograph HP 5890 Series II, Fa. Hewlett Packard, Palo Alto, Kalifornien, USA

Säule Fused-Silica Kapillarsäule, Optima-225-0.25 µm; 25 m x 0.25 mm ID, Fa Macherey & Nagel, Düren

Injektor 280°C

Detektor 250°C

Temperaturprogramm zu Beginn 160°C, mit 2°C/min auf 200°C, mit 1°C/min auf 225°C, mit 70°C/min auf 260°C, 4,5 min ausheizen

Massenspektrometer 5989A Mass spectrometer, Fa. Hewlett Packard, Palo Alto, Kalifornien, USA

Ionisation EI (70 eV), positive ion mode

m/z scan 50-540 Th, 1,3 Scans/s

### 3.4.2. Quantitative Bestimmung von Uronsäuren

Die Uronsäurebestimmung erfolgte nach der Methode von Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973). Hierbei wurde eine Gesamturonsäurebestimmung durchgeführt; die unterschiedlichen Uronsäuren ließen sich nicht kolorimetrisch unterscheiden.

Es wurde ca. 1 mg Polysaccharid in 1 ml 4%  $H_2SO_4$  gelöst und anschließend 1 h bei 121°C im Heizblock hydrolysiert. Vom Hydrolysat wurden für die Blindwert- und für die Probenwertbestimmung je 200  $\mu$ l in Pyrexgläser gegeben und diese dann für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1,2 ml Borax/ $H_2SO_4$  (290 mg Di-Natriumtetraborat-Decahydrat auf 100 ml  $H_2SO_4$  conc.) schüttelte man und es wurde erneut für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation im 100°C heißen Wasserbad. Nun stellte man die Pyrexgläser wieder für 10 min auf Eis. Bei den Blindwerten erfolgte eine Zugabe von 20  $\mu$ l 0,5% NaOH, bei der Probe von 20  $\mu$ l 3-Hydroxydiphenyl-Reagenz (15 mg 3-Hydroxydiphenyl auf 10 ml 0,5% NaOH). Nach 10 min wurde die Probe gegen ihren entsprechenden Blindwert im Photometer bei 520 nm vermessen. Zur Kalibrierung diente eine 1:1-Mischung von Glucuron- und Galacturonsäure.

Zusätzlich zur oben beschriebenen Methode wurde ein modifizierter Versuchsaufbau in Anlehnung an Filisetti-Cozzi & Carpita (1991) durchgeführt. Hier sollte die zugegebene Sulfaminsäure eine störende Braunfärbung der begleitenden Neutralzucker unterdrücken. Dazu wurde die Hydrolyse der Proben wie oben beschrieben durchgeführt. Zu Probe und Blindwert (je 200  $\mu$ l) wurden je 20  $\mu$ l Sulfaminsäure-Reagenz pipettiert, kurz gevortext und anschließend 1,2 ml Borax-Reagenz (1,51 g Di-Natriumtetraborat-Decahydrat in 100 ml  $H_2SO_4$  conc.) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min im Wasserbad bei 100°C stellte man die Pyrexgläser 10 min auf Eis. Zu den Blindwerten wurden 20  $\mu$ l 0,5% NaOH und zur Probe 20  $\mu$ l 3-Hydroxydiphenyl-Reagenz hinzugefügt. Nach 3-maligem Vortexen und einer Wartezeit von 15 min wurde spektrophotometrisch bei 525 nm vermessen.

### 3.4.3. Sulfatgehalt

Zur quantitativen Bestimmung des Sulfatgehalts wurden 2 Methoden angewendet: eine konduktometrische Bestimmung und die Elementaranalyse.

#### 3.4.3.1. Konduktometrische Bestimmung

Eine Möglichkeit der quantitativen Sulfatbestimmung in Polysacchariden ist die konduktometrische Titration (Casu & Gennaro, 1975). Hierzu wurde zunächst im Batch-Verfahren Ionenaustauscherharz (Amberlite IR-120, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim) mit 2 M HCl 30 min unter leichtem Schwenken konditioniert. Nun spülte man das Harz ca. 10-mal mit 500 ml Aqua dem., bis der Leitfähigkeitswert konstant blieb (Konduktometer: Seven easy,

Elektrode: Inlab 730, beides Fa. Mettler Toledo, Gießen). Anschließend wurde das Harz in eine Säule gegeben und nochmal mit ca. 100 ml Aqua bidest. gespült. Es wurden ca. 5-8 mg Polysaccharid in kaltem Aqua bidest. gelöst (1 mg/ml), über Nacht quellen gelassen und diese Lösung zur Protonierung der Polysaccharide auf die Säule gegeben. Die Lösung wurde in einem 50 ml-Messkolben aufgefangen und die Säule bis zum Erreichen der 50 ml-Marke mit Aqua bidest. gespült. Die Probenlösung titrierte man nun unter ständigem Rühren mit 0,1 M NaOH-Lösung in 10 µl-Schritten und vermaß konduktometrisch. Der 1. Wendepunkt entspricht den  $\text{SO}_4^{2-}$ -Äquivalenten, der 2. Wendepunkt den  $\text{COOH}$ -Äquivalenten.

Durch Einberechnung des Molekulargewichtsdurchschnitts aus der Neutralzucker- und Uronsäurebestimmung konnte ein Sulfatierungsgrad (DS, Degree of Sulfation) berechnet werden (Casu & Gennaro, 1975).

### 3.4.3.2. Elementaranalyse

Die Elementaranalyse auf die Atome Schwefel, Wasserstoff, Kohlenstoff und Stickstoff wurde im Institut für Anorganische Chemie der CAU Kiel durchgeführt. Dazu wurden 2 mg Probe genau eingewogen und mithilfe einer Zinnkapsel in einen Ofen mit einem Überschuss an Sauerstoff gegeben. Bei 990°C verbrannte die Probe mithilfe von Wolframtrioxid katalytisch. Die dabei entstandenen gasförmigen Produkte wurden über eine 500°C heiße Kupferkolonne geführt, an welcher der Restsauerstoff gebunden und evtl. vorhandene Stickoxide zu  $\text{N}_2$  reduziert wurden. Das Produktgas wurde mit hochreinem Helium als Trägergas gaschromatographisch getrennt und mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor analysiert (Gerät: HEKAtech CHNS Analysator; Fa. HEKAtech GmbH, Wegberg). Als Kalibrierungssubstanz diente Sulfanilamid. Die qualitative und quantitative Bestimmung der Atome erfolgte über die Retentionszeiten und Integrale der Peaks.

Um den Sulfatgehalt aus dem Schwefelgehalt zu berechnen, wurde folgende Formel zugrunde gelegt:

$$\text{Gehalt}(\text{SO}_3^-) \% = (\text{Gehalt}(\text{S}) \% / 40,4 \%)*100 \%$$

$$\text{MW}(\text{S}) 32,6 \text{ g/mol} \triangleq 40,4\%$$

$$\text{MW}(\text{SO}_3^-) 80,6 \text{ g/mol} \triangleq 100\%$$

### 3.4.4. Acetatgehalt

Eine mögliche Acylierung von Polysacchariden konnte mithilfe der Methode von McComb & McCready (1957) bestimmt werden. Dazu löste man die Polysaccharidprobe in Aqua dem. (1 mg/ml). Zu 200 µl dieser Lösung wurden 80 µl einer 1:1-Mischung von NaOH (9,4 g/100 ml) und Hydroxylammoniumchlorid (3,75 g/100 ml) direkt in eine Küvette gegeben. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur, während welcher es zur Verseifung der Acylgruppen mit gleichzeitiger Bildung von Hydroxamsäuren kam, wurde die Reaktion mit 200 µl

einer Perchlorsäure-Lösung (17,6 ml  $\text{HClO}_4$  70% ad 250 ml MeOH) abgestoppt. Nach weiteren 5 min gab man 520  $\mu\text{l}$   $\text{FeCl}_3$ -Lösung zur Farbvertiefung hinzu und mischte gut. Die  $\text{FeCl}_3$ -Lösung wurde hergestellt, indem man 1,93 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in 5 ml HCl conc. löste. Nach Zugabe von 5 ml  $\text{HClO}_4$  70% wurde fast zur Trockne einrotiert und anschließend mit 100 ml Aqua bidest. aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 12 ml mit 1,66 ml  $\text{HClO}_4$  70% gemischt und mit MeOH auf 100 ml aufgefüllt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 5 min vermaß man bei 520 nm gegen den Blindwert. Zur Kalibrierung diente eine Standardreihe von Glucosepentacetat.

Diese Methode wurde noch einmal in einer Modifizierung durchgeführt. Vor der oben beschriebenen Durchführung wurden sowohl die Standardreihe als auch die Probenlösungen für 10 min bei 80°C mit 2 N Trifluoressigsäure hydrolysiert und anschließend mit 2 N NaOH neutralisiert.

### 3.4.5. Pyruvatgehalt

Die Bestimmung des Pyruvatgehalts wurde nach der Messmethode von Sloneker & Orentas (1962) durchgeführt. Hierzu wurden ca. 5 mg Polysaccharid in 5 ml 1 N HCl gelöst und 3 h bei 100°C hydrolysiert. 1 ml jeder Probe wurde in ein Pyrex-Gefäß überführt und 0,5 ml frisch hergestelltes DNPH-Reagenz (0,125 g Dinitrophenylhydrazin/25 ml 2 N HCl) hinzugegeben. Nach Vortexen und 5 min Inkubationszeit setzte man 2,5 ml Ethylacetat hinzu und vortexte erneut. Die Wasserphase wurde verworfen und 2,5 ml 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung zur organischen Phase hinzugefügt und geschüttelt. Die wässrige Phase überführte man in ein Reagenzglas mit Messkala und wiederholte den Vorgang noch zweimal. Anschließend wurde auf 12,5 ml mit der  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung aufgefüllt und die Proben bei 375 nm in Quarzküvetten (Halbmikroküvette 104 QS 10 mm, Fa. Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim) vermessen. Die Kalibrierung erfolgte mit einer Standardreihe von Brenztraubensäure 98%.

### 3.4.6. Oxalsäurehydrolyse

Diese partialhydrolytische Methode wurde nach der Vorschrift von Gleeson & Clarke (1979) durchgeführt. Oxalsäure sorgt für eine schwache Hydrolyse und damit für eine Spaltung von glycosidischen Verbindungen zwischen hydrolyselabileren Pentosen wie Arabinose und Xylose. Hierzu wurde ca. 20 mg EPS in 2-3 ml 12,5 mM Oxalsäure unter Zuhilfenahme des Ultraschallbades gelöst. Die Lösung hydrolysierte man bei 100°C über 5 h. Nach dem Erkalten wurden die unlöslichen Reste durch Zentrifugierung (6.000 U, 5 min) entfernt und der Überstand in kaltem Ethanol (Endkonzentration 80%) gegeben, um hochmolekulare Anteile auszufällen. Diese wurden abzentrifugiert (20.000 g, 10 min, 6°C), der Überstand abdekantiert und der Fällungsrückstand mit kaltem Ethanol gewaschen. Dieses wiederholte man noch zweimal. Die vereinigten Überstände wurden einrotiert und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde nach Verdampfen des Restalkohols ebenfalls gefriergetrocknet. Von alle Produkten

(unlöslicher Rückstand, Überstand, Rückstand nach Ausfällen) wurde die Ausbeute gravimetrisch bestimmt und die Neutralzuckerzusammensetzung (3.4.1) untersucht. Außerdem wurden die erhaltenen Fraktionen per Gelpermeationschromatographie (3.5.1) analysiert.

### **3.4.7. Desulfatierung**

Die Desulfatierung der EPS wurde durchgeführt, um die Proben für die anschließende Uronsäurereduktion (3.4.8) und die Bindungstypanalyse (3.4.9) vorzubereiten. Sie erfolgte nach der Methode von Nagasawa et al. (1977). Dazu wurde zunächst das Ionenaustauscherharz Amberlite IR-120 konditioniert, wie in 3.4.3.1 beschrieben. Die Protonierung der EPS (ca. 40 mg EPS, 1 mg/ml) erfolgte im Batchverfahren. Es wurde 15 min geschwenkt und die Lösung anschließend auf eine Pyridin-Vorlage (1 ml/10 mg EPS) gegeben und mit Pyridin auf pH 7 eingestellt. Das Pyridinium-Salz/Wasser-Gemisch wurde einrotiert und gefriergetrocknet. Für den eigentlichen Desulfatierungsschritt nahm man den Rückstand mit 1 ml DMSO auf. Dieses wurde nach Zugabe von 1800 µl DMSO/10 mg und 200 µl Methanol/10 mg Pyridinium-Salz 7 h bei 100°C gehalten. Anschließend verdünnte man mit Aqua dem. und dialysierte 3 Tage; danach erfolgte die Gefrierdrying der desulfatierten EPS.

### **3.4.8. Uronsäurereduktion**

Die Reduktion der Uronsäuren erfolgte nach der Methode von Taylor & Conrad (1972). Dazu wurden ca. 20 mg desulfatiertes Polysaccharid in 20 ml Aqua dem. gelöst. Nach einer langsamen Zugabe von 216 mg N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat wurde per Autotitrator (719 S Titrino, Fa. Metrohm, Filderstadt) der pH-Wert mittels 0,01 M HCl 4 h auf 4,75 gehalten. Hierbei reagiert die Carbonsäurefunktion der Uronsäuren mit dem Carbodiimid zu einem Acylisoharnstoff, welcher eine erhöhte Aktivität gegenüber der unbehandelten Uronsäure zeigt. Der eigentliche Reduktionsschritt erfolgte unter Rühren durch vorsichtige Zugabe von 4 ml 1 molarer, 5 ml 2 molarer und 5 ml 4 molarer wässriger NaBD<sub>4</sub>-Lösung. Während dieser Zeit wurde der pH-Wert mittels 2 M HCl insgesamt 4 h auf 7,0 gehalten. Anschließend wurde Eisessig bis pH 6,5 hinzugegeben und 3 Tage gegen Aqua dem. dialysiert und gefriergetrocknet.

### **3.4.9. Analyse der Bindungstypen**

Die Bindungstypanalyse der glycosidischen Bindungen beruht auf einer unterschiedlichen chemischen Reaktion von Bindungs- und Nichtbindungsfunktionen. Außerdem lässt sich erkennen, ob pyranosidische oder furanosidische Monomere vorlagen. Das allgemeine Prinzip der sogenannten „Methylierungsanalyse“ ist eine Methylierung der freien Alkoholgruppen durch Methyljodid in Anwesenheit von starken Basen im ersten Schritt, anschließend erfolgt eine Hydrolyse, eine Reduktion der entstandenen freien Carbonylfunktion und eine Acetylierung aller

dann frei vorliegenden Alkoholgruppen. Die so erhaltenen partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) sind leicht flüchtig und lassen sich gaschromatographisch analysieren. Um die genaue Identität der PMAA zu bestimmen, werden sie außerdem massenspektrometrisch vermessen.

**GC-FID:**

Gaschromatograph	HP 5890 Series, Fa. Hewlett Packard, Palo Alto, Kalifornien, USA mit FID-Detektor
Säule	Fused-Silica Kapillarsäule, Optima-225-0.25 µm; 25 m x 0.25 mm ID, Fa Macherey & Nagel, Düren
Trägergas	Helium
Flussrate	1,2 ml/min
Splitverhältnis	1:50
Injektor	250°C
Temperaturprogramm	zu Beginn 2 min 170°C, mit 1°C/min auf 210°C, 10 min bei 210°C
Detektor	240°C

**GC-MS:**

Gaschromatograph	HP 5890 Series II, Fa. Hewlett Packard, Palo Alto, Kalifornien, USA
Säule	Fused-Silica Kapillarsäule, Optima-1701-0.25 µm; 25 m x 0.25 mm ID, Fa Macherey & Nagel, Düren
Trägergas	Helium
Flussrate	1,0 ml/min
Splitverhältnis	1:12 – 1:35
Injektor/Detektor	260°C
Temperaturprogramm	Start 120°C, mit 8°C/min auf 170°C, mit 0,5°C/min auf 185°C, mit 20°C/min auf 250°C, dann 19,5 min isotherm bei 250°C
Massenspektrometer	5989A Mass spectrometer, Fa. Hewlett Packard, Palo Alto, Kalifornien, USA
Ionisation	EI (70 eV), positive ion mode

m/z scan	50-540 Th, 0,94 Scans/s
Temperatur	Ion source: 250°C, Quadrupol: 120°C

Die Peaks wurden mithilfe der relativen Retentionszeiten und durch Auswertung der dazugehörigen Massenspektren im Vergleich mit einer im Arbeitskreis erstellten Spektrenbibliothek identifiziert. Zur quantitativen Auswertung wurden die Peakflächen der FID-Signale herangezogen. Hierbei galt es zu beachten, dass die Molekülgrößen der verschiedenen Monomere in die Auswertung mit einbezogen werden mussten, da z.B. eine bestimmte Anzahl von Hexosen einen größeren Peak erzeugt als die gleiche Anzahl von Pentosen. Aus diesem Grunde erfolgte die Auswertung mithilfe der Korrekturfaktoren nach Sweet et al. (1975).

#### **3.4.9.1. Methylierung nach Harris**

Die Methylierung nach Harris et al. (1984) erfolgte mithilfe eines Dimethylsulphanyl-Carbanions, im Folgenden als Dimsyl-Lösung bezeichnet. Diese stellte man her, indem in Paraffinöl gelagertes Kaliumhydrid mit n-Hexan unter Argon-Begasung gewaschen und dann getrocknet wurde. Anschließend fügte man vorsichtig DMSO hinzu und, um ein starkes Schäumen zu verhindern, kühlte man mit Eis, bis eine klare Lösung entstand. Diese wurde nach folgendem Schema zu der in DMSO gelösten EPS-Probe (desulfatiert und uronsäurereduziert, ca. 5 mg/460 µl) im Wechsel mit eisgekühltem Methyljodid gegeben:

+ 40 µl Dimsyl-Lösung	10 min reagieren lassen
+ 10 µl Methyljodid	5 min reagieren lassen
+ 120 µl Dimsyl-Lösung	10 min reagieren lassen
+ 30 µl Methyljodid	5 min reagieren lassen
+ 400 µl Dimsyl-Lösung	30 min reagieren lassen
+ 300 µl Methyljodid	10 min reagieren lassen

Dieser Methylierungsvorgang wurde anschließend noch einmal wiederholt, um eine Untermethylierung zu verhindern.

Nun wurde die methylierte Probe zu 3 ml einer 2:1-Mischung von Chloroform und Methanol gegeben, mit 2 ml Aqua dem. gevortext und anschließend zentrifugiert (2.500 g, 5 min), um überschüssiges Methyljodid zu entfernen. Die wässrige Phase wurde, ohne die Interphase zu verletzen, abpipettiert und dieser Waschvorgang noch viermal wiederholt. Um Restwasser zu entfernen, gab man zur Unterphase 2,2 ml Dimethoxypropan und 20 µl Eisessig und erhitze die Mischung im Bioblock (90°C) vorsichtig. Zwischendurch wurde immer wieder gevortext, bis keine Phasentrennung mehr zu sehen war. Die Lösung trocknete anschließend unter Argon-Begasung. Dann wurden die Proben mit 1 ml 2 M TFA versetzt und 1 h bei 121°C im Bioblock hydrolysiert. Nach einer Überführung in Spitzkolben wurde unter Stickstoffbegasung getrocknet.

Zur Reduktion gab man zu jeder Probe 2 ml NaBH<sub>4</sub>-Lösung (37,84 mg in 2 ml 2 M Ammoniak) und inkubierte anschließend 1 h bei 60°C im Trockenschrank. Dann wurde die Reaktion mit 0,5 ml Aceton abgestoppt und das Lösungsmittel im Wasserbad (40°C, Heizplatte: RET basic; Fühler: IKATRON ETS D3, beides Fa. IKA Labortechnik, Staufen) durch Stickstoffbegasung entfernt. Man acetylierte, indem die Probe mit 200 µl Eisessig aufgenommen und mit 1 ml Ethylacetat und 3 ml Acetanhydrid versetzt wurde. 100 µl Perchlorsäure wurden als Katalysator hinzugefügt. Nach 5 min erfolgte eine Eiskühlung und die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Aqua dem. abgestoppt. Abschließend fügte man noch 200 µl 1-Methylimidazol hinzu. Mit 2 ml Dichlormethan wurde ausgeschüttelt und diese Phase unter Stickstoffbegasung eingengt.

#### **3.4.9.2. Methylierung mit NaOH-Brei**

Bei der Methylierung mit NaOH-Brei wurde auf die Herstellung des Dimsylys verzichtet und stattdessen NaOH als starke Base zur Deprotonierung der Hydroxylfunktionen verwendet (Ciucanu & Kerek, 1984). Nach einer Modifikation nach Flamm (2012) wurde ca. 1 mg gefriergetrocknetes Polysaccharid (desulfatiert und uronsäurereduziert) in 500 µl DMSO gelöst und auf einem Orbitalschüttler mit Reagenzglasaufsatz (IKA-Vibrax VXR, Fa. IKA Labortechnik, Staufen) 20 min geschüttelt. War die Solvation noch nicht komplett eingetreten, wurde die Lösung für einige Minuten ins Ultraschallbad gegeben. Zur Aktivierung des Polysaccharids fügte man im Glasmörser frisch hergestellten NaOH-Brei (3 Plätzchen NaOH verrieben mit 500 µl DMSO) hinzu und schüttelte 20 min. Die Methylierung erfolgte dann nach folgendem Schema:

+ 50 µl Methyljodid	20 min schütteln
+ frischer NaOH-Brei	20 min schütteln
+200 µl Methyljodid	20 min schütteln

Anschließend wurden 4 ml Aqua bidest. hinzugefügt und gevortext; bei noch vorhandener Phasentrennung wurde noch 1 ml Aqua bidest. hinzugegeben. Um überschüssiges Methyljodid zu entfernen, wurde Stickstoff für ca. 15 min direkt in die Probe geleitet. Anschließend dialysierte man die Lösung 24 h gegen Aqua dem. und gefriergetrocknete sie (Stevenson & Furneaux, 1991). Dieser gesamte Methylierungsvorgang wurde insgesamt zweimal durchgeführt, um eine Untermethylierung zu vermeiden. Die restlichen Schritte zum PMAA entsprechen der Vorschrift nach Harris et al. (1984) und sind bereits oben beschrieben (3.4.9.1).

### **3.5. Chromatographische Methoden**

Verschiedene chromatographische Verfahren werden zur Strukturaufklärung von Polysacchariden angewendet. Da die Systemreinheit einen großen Einfluss auf die Verteilungsvorgänge hat, wurden alle Fließmittel vor Verwendung filtriert (Sartorius Vakuumfiltriergerät, Fa. Sartorius AG, Göttingen mit Omnipore Membranfilter 0,1 µm, Fa. Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) und im Ultraschallbad entgast. Auch die Proben wurden nach dem Lösen filtriert (Spritzenvorsatzfilter Perfect-Flow<sup>®</sup> RC 0,45 µm, Fa. Wicom, Heppenheim) und entgast.

#### **3.5.1. Gelpermeationschromatographie**

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) ist eine Größenausschlusschromatographie, d.h. Moleküle werden nach Größe aufgetrennt und eluiert. Kleine Moleküle dringen leichter in die Poren des Säulenmaterials ein und verbleiben somit länger auf der stationären Phase. Große Moleküle werden schneller eluiert. Die Molekülgröße wurde über einen internen RI-Detektor durch Vergleich der Brechungsindices des austretenden Fließmittels und des reinen Fließmittels [relative Molekülgröße oder hydrodynamisches Volumen (hV)] und über einen externen MALLS-Detektor (Multiangle-Laser-Light-Scattering-Detektor) bestimmt. Dieser misst die Laserlichtstreuung des Polysaccharids in 3 verschiedenen Winkeln und kann so das absolute Molekulargewicht bestimmen. Hierbei ist zu beachten, dass der RI-Detektor besser kleine Moleküle erkennt, der MALLS-Detektor hingegen besser auf große Moleküle anspricht. Außerdem gilt es zu beachten, dass auch die Form der Moleküle einen Einfluss auf die Trennung und auf das Verhältnis von RI- zu MALLS-Ergebnis hat; es lassen sich also auch Rückschlüsse ziehen, ob es sich eher um ein lineares oder ein globuläres Molekül handelt. Die Proben wurden in Fließmittel (0,1 M NaNO<sub>3</sub>, pH 8) gegeben (1-2 mg/ml), über Nacht quellen gelassen und kurz vor Verwendung filtriert und entgast. Die aufgegebene Probemenge war jeweils 100 µl, die Flussrate betrug 0,7 ml/min. Die Kalibrierung erfolgte mit Pullulan-Standards über den Bereich von 5.900 bis 788.000 Da.

GPC-Anlage	PL-GPC 50 Plus PL Data Stream beides Fa. Polymer Laboratories, Varian Inc. Germany
MALLS-Detektor	Mini Dawn, Fa. Wyatt Technology Corporation Germany
Säulen	PL-aquagel-OH Guard 8 µm, 50 x 7,5 mm PL-aquagel-OH mixed, 300 x 7,5 mm PL-aquagel-OH 20 5 µm, 300 x 7,5 mm PL-aquagel-OH 40 8 µm, 300 x 7,5 mm alle Fa. Polymer Laboratories, Varian Inc. Germany
Auswertungssoftware	Astra, Version 4.73.04, Fa. Wyatt Technology Corporation Germany

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Retentionsvolumina der Pullulan-Standards und mithilfe der von der Software errechneten absoluten Molekulargewichte.

### 3.5.2. Ionenaustauschchromatographie

Die EPS wurden über eine Kationenaustauschersäule durch Elution mit verschiedenen konzentrierten NaCl-Lösungen fraktioniert. Hierbei wurden die Polysaccharide primär nach Ladung aufgetrennt.

Pumpe	LKB Pump P1
Ventil	Valve V-7, Schleife 5 ml
Säule	High Load XK 16/10, Q Sepharose High Performance
Fraktionensammler	Super Frac

Alles von Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.

Die Säule konditionierte man zunächst mit 100 ml 2 molarer NaCl und anschließend spülte man mit 100 ml Aqua bidest.. Die Proben wurden in Aqua bidest. gelöst (1,5 mg/ml), entgast, filtriert und auf die Säule gegeben. Es wurde zunächst mit 50 ml Aqua bidest., anschließend mit je 50 ml 0,5, 1, 1,5 und 2 molarer NaCl-Lösung eluiert. Es wurden jeweils 10 ml-Fraktionen aufgefangen. Diese wurden anschließend auf ihren Kohlenhydratgehalt hin untersucht (3.2.5). Dieser gesamte Vorgang wurde mehrmals wiederholt, um die Fraktionenmassen zu erhöhen. Anschließend vereinigte man die zusammengehörigen Fraktionen, engte diese ein, dialysierte und gefriergetrocknete sie. Von dem lyophilisierten Material wurde jeweils die Neutralzuckerzusammensetzung (3.4.1), das Molekulargewicht (3.5.1) und das

hydrodynamische Volumen (3.5.1) bestimmt, außerdem wurde eine elementaranalytische Untersuchung durchgeführt (3.4.3.2; 3.6.1.1).

## **3.6. Proteinanalytik**

### **3.6.1. Proteinquantifizierung**

#### **3.6.1.1. Elementaranalyse**

Anhand der Ergebnisse der Elementaranalyse (3.4.3.2) kann ein möglicher Proteinanteil erkannt werden. Dieser wurde nach Kjeldahl (1883) berechnet, indem man den Stickstoffgehalt aus der Elementaranalyse mit dem Faktor 6,25 multiplizierte.

#### **3.6.1.2. Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) erfolgte in der Modifizierung nach Zor & Selinger (1996). Die Bestimmung beruht auf einer Komplexbildung von Coomassie-Blau mit Proteinen und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Das Coomassie-Reagenz wurde hergestellt, indem man 100 mg Coomassie G-250 in 50 ml Ethanol löste, 100 ml Phosphorsäure 85% dazugab und mit Aqua dem. auf 1 l auffüllte. Zu 50 µl EPS-Probe (1 mg/ml) wurden 1000 µl Coomassie-Reagenz gegeben und gevortext. Nach 10 min vermaß man die Proben jeweils bei 595 nm und 465 nm photometrisch. Kalibriert wurde mit einer BSA-Standardreihe.

#### **3.6.1.3. Proteinbestimmung mit Ninhydrin**

Die Proteinbestimmung mit Ninhydrin wurde nach der Veröffentlichung von Starcher (2001) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Ninhydrinbestimmung erstmals in Mikrotiterplatten. Ninhydrin reagiert in Anwesenheit von primären Aminen zum reduzierten Hydantoin und anschließend zu Diketohydrindyliden-diketohydrinamin, dessen rote Farbe photometrisch vermessen wird.

Das Ninhydrin-Reagenz wurde hergestellt, indem 800 mg Ninhydrin in 30 ml Ethylenglycol und 5 ml 4 M Natriumacetat-Puffer (54,4 g Natriumacetat in 10 ml Eisessig, aufgefüllt mit Aqua dem. zu 50 ml) gelöst wurden. Abschließend wurden noch 1 ml Zinnchlorid-Lösung (100 mg SnCl<sub>2</sub> in 1000 µl Ethylenglycol) hinzugefügt.

Zur Probenvorbereitung wurden zunächst 10 mg EPS in 500 µl 6 N HCl gegeben und für 24 h bei 100°C im Trockenschrank hydrolysiert, um frei vorliegende Aminosäuren zu erhalten. Anschließend verdünnte man die Proben auf 10 ml. Von dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe bis 1:100 hergestellt. Es wurden jeweils 100 µl Probe mit der gleichen Menge Ninhydrin-Reagenz in die Kavitäten der MTP gegeben und, abweichend von der Originalvorschrift, 20 min bei 100°C im Trockenschrank inkubiert. Da das Absorptionsmaximum des farbigen Endprodukts zwischen 560 nm und 580 nm liegt, konnte bei 570 nm vermessen werden. Kalibriert wurde mit einer Standardreihe von BSA.

Zur Auswertung wurde der lineare Bereich der Absorptionen der Verdünnungen gewählt; höher oder niedriger liegende Proteinkonzentrationen zeigten deutlich abweichende Werte.

### 3.6.2. Proteinzusammensetzung

Ca. 20 mg Probe wurde mit 2,0 ml 6 N HCl 22 h bei 110°C hydrolysiert. Der verkohlte Polysaccharidanteil wurde abzentrifugiert (10.000 *g*, 20 min) und mehrmals mit Aqua dem. gewaschen, um die Aminosäureausbeute zu erhöhen. Der wässrige Überstand wurde eingeeengt und gefriergetrocknet. Die Qualifizierung und Quantifizierung der Aminosäuren wurde im Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der CAU Kiel per HPLC durchgeführt.

Aminosäureanalysator	Biochrom 30
Säule	PEEK-Trennsäule HP, physiologisch
Fließmittel	physiologisch, Lithium-Puffer mit verschiedenen pH-Werten
Injektionsvolumen	20 µl
Detektion	photometrisch, Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin 440 nm für Hydroxyprolin und Prolin, sonst 570 nm

### 3.7. Testung der biologischen Aktivität

#### 3.7.1. Testung der Zytotoxizität

Die Zytotoxizitätsbestimmung wurde von Frau PD Dr. Mundt vom Pharmazeutischen Institut, Abteilung Pharmazeutische Biologie, der Universität Greifswald durchgeführt. Mithilfe eines Neutralrot-Assays (96 Well Platten, 6 Parallelen pro Platte) untersuchte man in Doppelbestimmung die Wirkung der EPS auf humane Harnblasenkarzinomzellen (Zelllinie 5637). Als Positivkontrolle diente 0,5 µM Etoposid. Die EPS-Proben wurden in sterilem Aqua bidest. zu Konzentrationen von 1,95 µg/ml bis 125 µg/ml gelöst. Die Auswertung der Zellvitalität erfolgte in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle.

#### 3.7.2. Testung auf antimikrobielle Aktivität

Die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität wurde von Frau PD Dr. Mundt vom Pharmazeutischen Institut, Abteilung Pharmazeutische Biologie, der Universität Greifswald durchgeführt. Hierzu diente ein Agarplattendiffusionstest mit der Plättchenmethode. Die zu testenden Substanzen bzw. Proben wurden in sterilem Aqua bidest. gelöst und auf 6 mm-Filterplättchen aufgetropft und trocknen gelassen (100 µg und 200 µg pro Filterplatte). Nun legte man diese auf die mit dem entsprechenden Mikroorganismus beimpften Nähragarplatten und bewahrte sie zunächst 3 h bei 4°C zur Vordiffusion auf. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C für die Testung der Wirkung auf Bakterien. Für die Testung der Wirkung auf die Hefe wurde 24 h bei 26°C inkubiert. Es erfolgte eine Doppelbestimmung. Als Negativkontrolle diente ein mit Aqua bidest. beladenes Filterplättchen. Eine Übersicht über die Testorganismen und Positivkontrollen findet sich in Tabelle 3.

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

Tabelle 3: Testorganismen und Positivkontrollen der antimikrobiellen Testung

### 3.7.3. Testung der Wirkung auf das humane Komplementsystem

Um Wirkungen auf das Komplementsystem zu untersuchen, werden häufig hämolytische Testsysteme (CH50) angewendet. In dieser Arbeit wurden allerdings 3 verschiedene diagnostische ELISA-Testkits verwendet, bei welchen die Vorgehensweise für eine in-vitro Substanz-Aktivitäts-Testung leicht abgewandelt wurde (Flamm, 2012). Hiermit konnten eventuelle Einflüsse der EPS auf den klassischen Weg (COMPL CP310, Fa. Euro Diagnostica, Malmö, Schweden), auf den alternativen Weg (COMPL AP330, Fa. Euro Diagnostica, Malmö, Schweden) und den Lektin-Weg (COMPL MP320, Fa. Euro Diagnostica, Malmö, Schweden) erkannt werden (Seelen et al., 2005).

Wichtig für die Untersuchung war, dass man pyrogen- bzw. endotoxinfreie Glasgeräte (60 min bei 250°C), Lösungen (Wasser steril, pyrogenfrei, hypoton, Fa. Roth, Karlsruhe) und Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen (3 Mµl multi universal; 20 Mµl multi universal; beides Fa. Roth, Karlsruhe) und Reagiergefäße (Eppendorf-Reaktionsgefäße pyrogenfrei, Fa. Roth, Karlsruhe) verwendete.

Zunächst musste aber sichergestellt werden, dass die Exopolysaccharide endotoxinfrei waren, um Einflüsse der Lipopolysaccharide (LPS) auszuschließen. Hierfür wurden die Proben über Endotrap<sup>®</sup>-Säulen (Endotrap<sup>®</sup> blue 5/1, Fa. Hyglos, Bernried) aufgereinigt. Dies erfolgte, indem die Proben zu 1 mg/ml in 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gelöst und anschließend auf die regenerierte Säule gegeben wurden. Die Calcium-Lösung diente auch als Elutionspuffer. Da ein Aufreinigungsschritt eine LPS-Reduktion um 2 log-Stufen bedeutet, wurden die Proben anschließend noch ein zweites Mal auf die Endotrap<sup>®</sup>-Säule gegeben. Anschließend wurden sie gefriergetrocknet und ausgewogen.

Die Testkits basieren auf Mikrotiterplatten (MTP), die für jeden Aktivierungsweg mit einem speziellen Aktivator beschichtet sind; für den klassischen Weg mit humanem Immunglobulin M (IgM), für den alternativen Weg mit LPS und für den Lektin-Weg mit Mannan. Jedes Testkit enthält zusätzlich einen speziellen Puffer, welcher die Aktivierung der jeweils anderen beiden Wege ausschließt. Als Positivkontrolle diente, von der Firma auf Aktivität geprüfetes, gepooltes humanes Serum, als Negativkontrolle komplement-inaktiviertes Serum. Als Testserum bei den hämolytischen Test wurde in der Regel selbst hergestelltes, gepooltes Serum von mind. 5 Personen verwendet. Bei diesen Testkits wurde die mitgelieferte Positivprobe verdünnt und als Testserum eingesetzt. Hierbei war darauf zu achten, dass die Verdünnung der Seren der doppelten gewünschten Endkonzentration entsprach, da man in den Kavitäten der MTP noch einmal 1:2 mit der gelösten EPS-Probe, welche ebenfalls in doppelter Konzentration vorlag, verdünnte.

Die zu untersuchenden Proben wurden in Reihe verdünnt, auf die MTP gegeben und mit dem Testserum versetzt. Nach 60 min Aktivierungszeit bei 37°C im Brutschrank (Fa. Memmert, Schwabach) wusch man alle ungebundenen Stoffe von der MTP und versetzte diese mit einem, mit alkalischer Phosphatase gekoppelten, gegen den Membran-Angriffs-Komplex (MAK) gerichteten Antikörper. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde anschließend noch das Enzymsubstrat hinzugegeben. Nach weiteren 30 min bei RT konnte die Extinktion des gebildeten Farbstoffs bei 405 nm vermessen werden (infinite F50, Fa. Tecan, Männedorf, Schweiz).

Zur Auswertung wurde die Aktivität gegen die Konzentration logarithmisch aufgetragen. Als 100%-Wert wurde die Aktivität der Positivkontrolle eingesetzt.

## 4. Ergebnisse *Arthrospira platensis*

### 4.1. Kultivierung und Ernte

Das Wachstum von *A. plat.* wurde anhand der zunehmenden Chlorophyllabsorption bestimmt (3.2.5). Abbildung 3 zeigt den Wachstumsverlauf und beinhaltet bereits den Korrekturfaktor. Es zeigte sich eine lag-Phase von ca. 15 Tagen, dann begann die exponentielle Phase. Es wurde nach ca. 55 Tagen, zu Beginn der stationären Phase, abgeerntet. In diesem Stadium zeigte sich eine gleichbleibende Zelldichte.

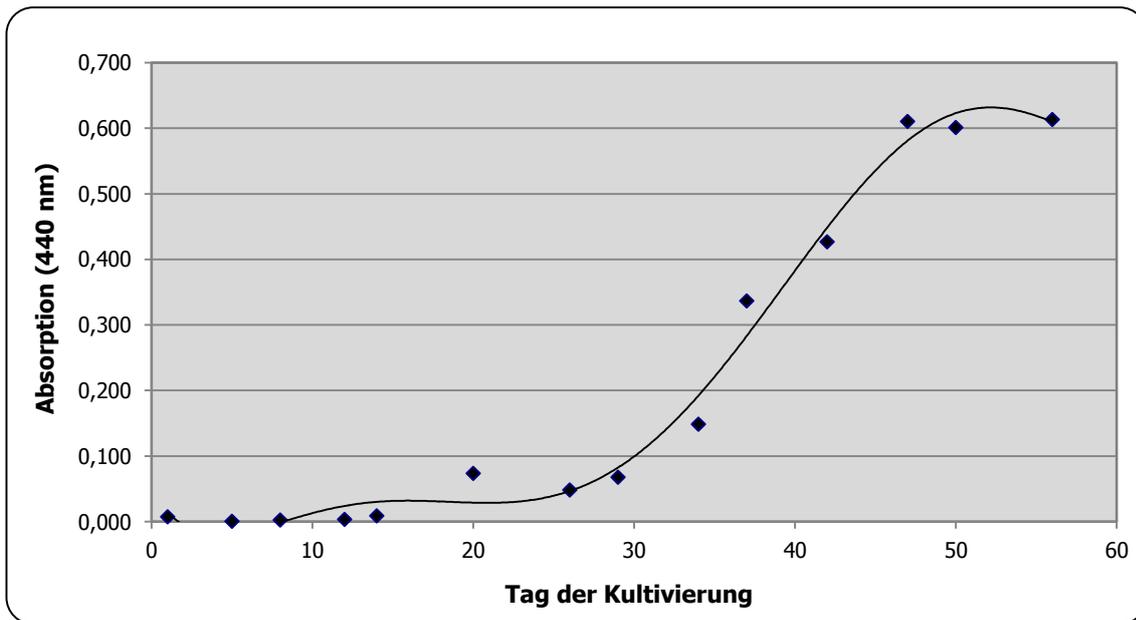


Abbildung 3: Chlorophyllabsorptionsbestimmung während der Kultivierung von *Arthrospira platensis*

Als zweiter Indikator für das Wachstum diente die Überprüfung des Kulturmediums auf Kohlenhydrate nach Dubois et al. (3.2.5; Abbildung 4). Hier zeigte sich ein ähnlicher Kurvenverlauf wie bei der Biomassebestimmung mittels Chlorophyllabsorption (Abbildung 3).

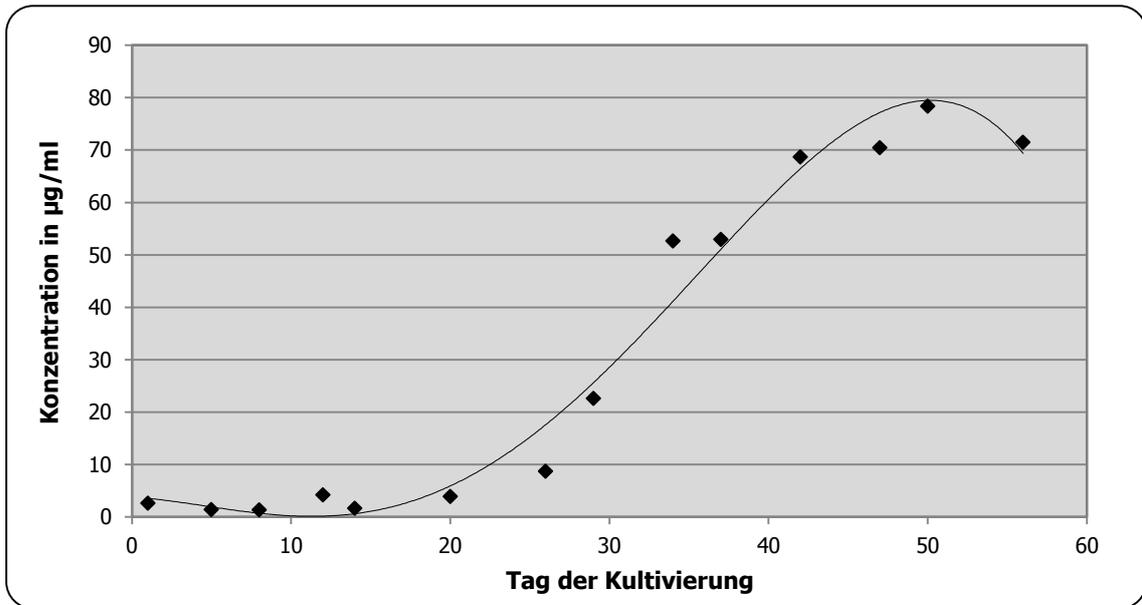


Abbildung 4: Bestimmung des Kohlenhydratanteils nach Dubois während der Kultivierung von *Arthrospira platensis*

Zum Zeitpunkt des Aberntens waren durchschnittlich 5,5 l Kulturmedium von Biomasse zu befreien. Es ergab sich eine durchschnittliche Biomasse von 2,08 g/l, wobei einer der beiden parallelen Kultivierungsansatz mit 2,95 g/l deutlich darüber lag. Beim durch Hitzedenaturierung abgetrennten Proteinanteil schwankten die Werte mit 85,7 mg/l und 73,6 mg/l nicht ganz so stark. Auch die EPS-Ausbeuten waren mit 103,04 mg/l und 86,47 mg/l vergleichbar (Tabelle 4).

Kultivierungsansatz	Biomasse (g/l)	Protein (mg/l)	EPS-Ausbeute (mg/l)
<b>1</b>	2,95	85,7	103,4
<b>2</b>	1,21	73,6	86,5

Tabelle 4: Ausbeuten der Kultivierung von *Arthrospira platensis*

Es ließ sich während der Kultivierung eine pH-Wert-Änderung feststellen. Der pH-Wert stieg ausgehend von pH 7,1 (pH des Mediums) an und pendelte sich nach ca. 30 Tagen bei pH 9,6 ein.

## 4.2. Polysaccharidanalytik

### 4.2.1. Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung

Die Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung erfolgte durch Acetylierung mit anschließender gaschromatographischer und massenspektrometrischer Untersuchung (3.4.1). Die Analyse ergab das GC-Chromatogramm in Abbildung 5. Es zeigte sich, dass die Hexosen Glucose und Galactose den größten Anteil mit insgesamt über 60% (Glc: 45,6%, Gal: 17,8%) am EPS ausmachten (Abbildung 6). Rhamnose, Xylose und Fucose waren zu je ca. 10% (8,2%, 12,7% und 9,9%) zu finden. Mannose war mit einem Anteil von 4,6% enthalten. Arabinose bildete den kleinsten Anteil am EPS mit 1,2%. Die gefundenen Monosaccharide konnten mittels MS-Analyse bestätigt werden.

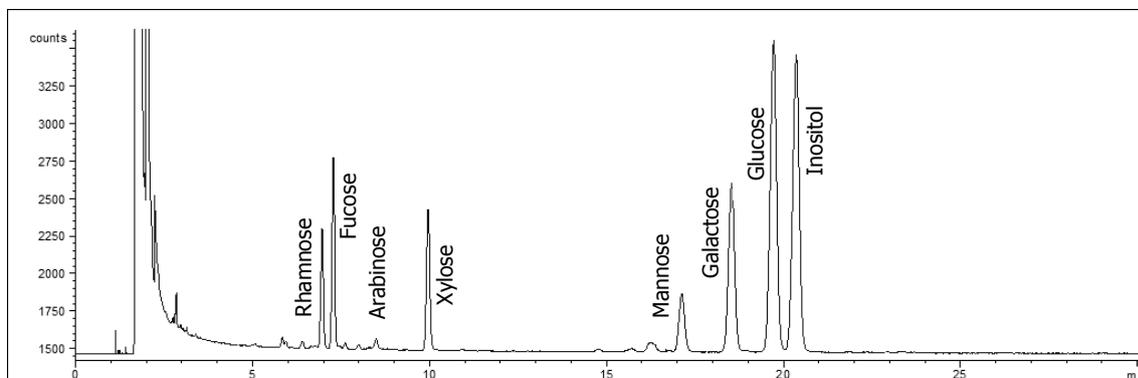


Abbildung 5: GC-Chromatogramm der acetylierten EPS von *Arthrospira platensis*

Wie in Abbildung 5 zu sehen, waren auch noch weitere kleine Peaks zu erkennen. Diese machten aber von der Gesamtmasse nur einen sehr kleinen Anteil aus und wurden alle als unter 1% bestimmt. Deshalb erfolgte dahingehend keine weitere Untersuchung.

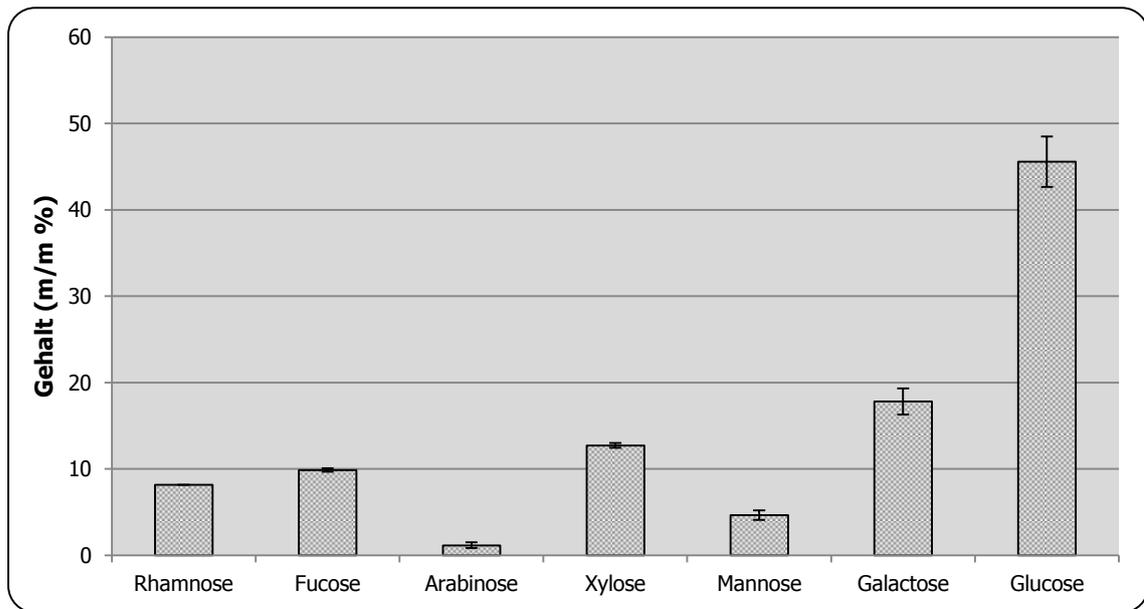


Abbildung 6: Neutralzuckerzusammensetzung der EPS von *Arthrospira platensis*

Die Ausbeute der Acetylierungsanalysen, ermittelt mithilfe des internen Standards Inositol, betrug im Durchschnitt  $55,3\% \pm 2,9\%$ .

#### 4.2.2. Quantitative Bestimmung von Uronsäuren

Die Bestimmung des Uronsäuregehalts (3.4.2) in den EPS wurde nach Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) durchgeführt. Hierbei ergab sich ein Gehalt von  $25,0\% \pm 4,1\%$ . Die modifizierte Durchführung durch Zugabe von Sulfaminsäure zur Unterdrückung der Braunfärbung der Neutralzucker zeigte ein vergleichbares Ergebnis von  $23,2\% \pm 0,8\%$  Uronsäuren. Eine Störung durch die Braunfärbung der zu ca. 55% enthaltenen Neutralzucker war in diesem Fall also nicht zu erkennen.

#### 4.2.3. Sulfatgehalt

Die Testung auf Sulfat erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden (3.4.3). Bei der Elementaranalyse wurde der Schwefelgehalt der EPS bestimmt. Die konduktometrische Titration erfasste alle sauren funktionellen Gruppen, welche sich theoretisch durch unterschiedliche Wendepunkte unterscheiden ließen.

Der anhand der Ergebnisse der Elementaranalyse berechnete Sulfatgehalt betrug 1,1%. Die konduktometrische Bestimmung hingegen ergab einen Sulfatgehalt von  $12,2\% \pm 2,4\%$ . Durch Einberechnung des Molekulargewichtsdurchschnitts aus der Neutralzucker- und Uronsäurebestimmung konnte für den Gehalt von 12,2% ein Sulfatierungsgrad (DS, Degree of Sulphation) von 0,33 ermittelt werden (Casu & Gennaro, 1975). Legte man den aus der Elementaranalyse ermittelten Wert zugrunde, ergab sich ein DS von 0,02.

#### 4.2.4. Acetatgehalt

Die Bestimmung des Acetatgehalts (3.4.4) erfolgte zunächst ohne Hydrolyse der EPS. Auf diese Weise war kein Acetat nachzuweisen. Nach vorheriger Hydrolyse mit 2 N TFA ergab sich ein Gehalt von 3,9% Acetat.

#### 4.2.5. Pyruvatgehalt

Die Bestimmung von Pyruvat (3.4.5) ergab einen Gehalt von 3,0% ± 0,5%.

#### 4.2.6. Oxalsäurehydrolyse

Die erhaltenen Fraktionen nach Oxalsäurebehandlung wurden hinsichtlich der Ausbeuten und der Neutralzuckerzusammensetzung untersucht (3.4.6.). Außerdem wurde das hydrodynamische Volumen per GPC bestimmt (3.5.1).

Die Ausbeuten sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Gesamtausbeute bezogen auf die Einwaage betrug 71,4%. Der Anteil an ungelösten Bestandteilen lag bei 10,9%. Bei einer Bestimmung machte der Rückstand nach dem Ausfällen mit 46,8% den größten Anteil aus; bei der anderen war es der Überstand mit 56,2%. Bei der Neutralzuckerbestimmung ließ sich aber kein Unterschied bei den jeweiligen Fraktionen der beiden Bestimmungen erkennen (Abbildung 7).

	<b>Ungelöste Bestandteile*</b>	<b>Überstand*</b>	<b>Rückstand nach Ausfällen*</b>	<b>Gesamtausbeute**</b>
<b>1</b>	10,3	42,8	46,8	81,3
<b>2</b>	11,4	56,2	32,4	61,5
$\bar{x}$	10,9	49,5	39,6	71,4

Tabelle 5: Ausbeuten der Fraktionen der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *Arthrospira platensis* ,  
Angaben in m/m %

\*= Ausbeuten bezogen auf die Gesamtausbeute

\*\*= Gesamtausbeute bezogen auf die Einwaage

Die Neutralzuckerzusammensetzungen des Überstands und der ungelösten Bestandteile ähnelten sich und entsprachen auch der Neutralzuckerzusammensetzung der totalen EPS von *A. plat.* (Abbildung 6). Die Fraktion des hochmolekularen Rückstands hingegen bestand zu 78,7% aus Glc. Gal war zu 7,4% enthalten, alle anderen Monosaccharide je zu weniger als 5%.

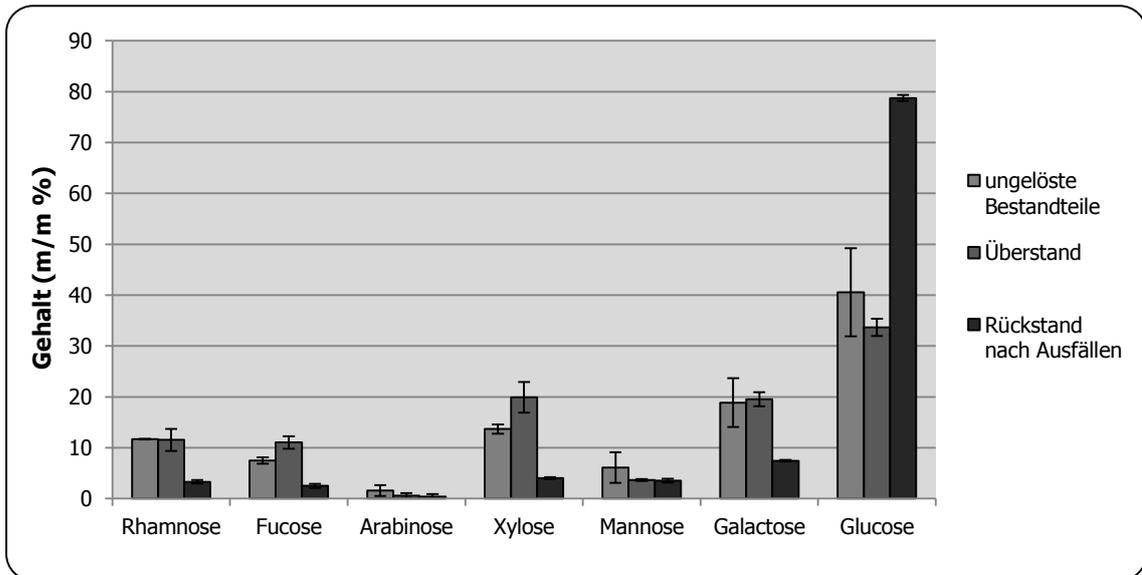


Abbildung 7: Neutralzuckerzusammensetzung der Fraktionen der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *Arthrospira platensis* (n=2)

Der Überstand nach der Ethanol-fällung wurde auch auf die Neutralzuckerzusammensetzung hin untersucht, jedoch ohne den Hydrolyseschritt. Auf diese Weise konnten frei vorliegende Monosaccharide und die Zusammensetzung des gesamten Überstandes differenziert betrachtet werden (Abbildung 8). Es zeigte sich, dass hauptsächlich Pentosen, wie Xylose, Arabinose und Fucose vorlagen. Diese machten knapp 80% aller frei vorliegenden Monosaccharide aus.

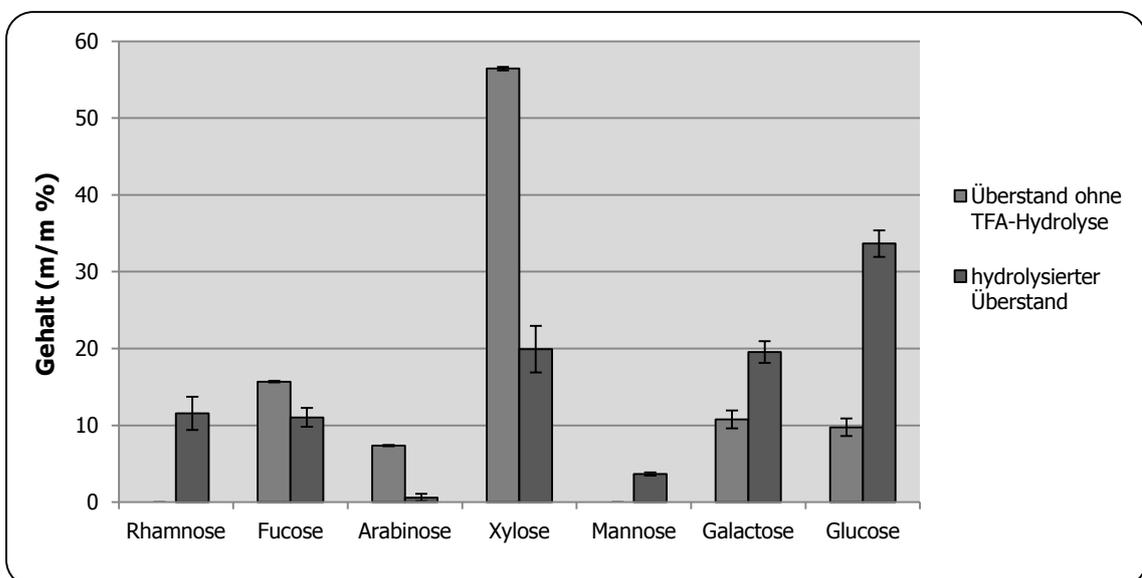


Abbildung 8: Neutralzuckerzusammensetzung des nicht-hydrolysierten und des hydrolysierten Überstandes der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *Arthrospira platensis* (n=2)

Die Acetylierungsausbeuten betragen für die unlöslichen Bestandteile  $57,6\% \pm 7,1\%$ , für den Überstand  $80,1\% \pm 2,6\%$  und für den Rückstand nach Ausfällen  $79,2\% \pm 10,6\%$ .

Die gelpermeationschromatographische Untersuchung ergab für die wieder in Lösung gebrachte Fraktion der ungelösten Bestandteile 4 Peaks. Diese hatten hydrodynamische Volumina von 1.671 kDa, 16,2 kDa, 3,8 kDa und 2,5 kDa. Der Überstand zeigte 2 Peaks mit 7,4 kDa und 3,3 kDa. Die Fraktion des Rückstands nach Ausfällen resultierte in 4 Peaks mit den hydrodynamischen Volumina von 580 kDa, 7,7 kDa, 4,0 kDa und 1,3 kDa (jeweils n=1). Die absoluten Molekulargewichte konnten nicht mit der erforderlichen Genauigkeit bestimmt werden.

#### 4.2.7. Uronsäurereduktion

Die zuvor desulfatierten EPS (3.4.7) wurden mit NaBD<sub>4</sub> uronsäurereduziert (3.4.8) und anschließend auf ihre Neutralzuckerzusammensetzung (3.4.1) hin untersucht. Es zeigte sich ein leichter Anstieg der Hexosen Mannose, Galactose und Glucose (Abbildung 9). Der Anteil von Rhamnose und Fucose nahm leicht ab.

Die Ausbeute der Acetylierungsanalyse lag bei 65,7%.

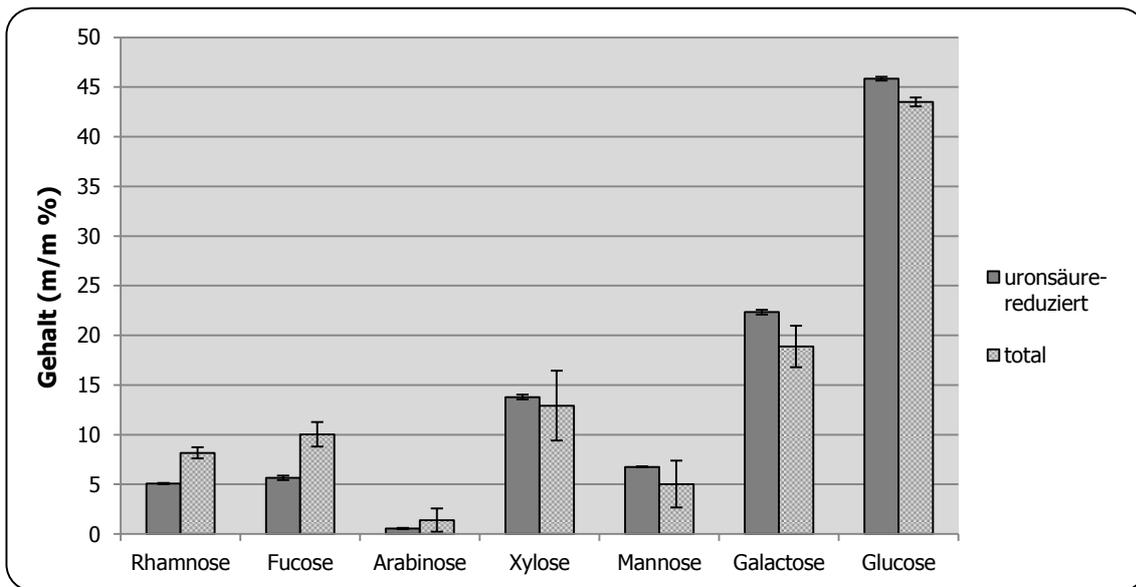


Abbildung 9: Neutralzuckerzusammensetzung der uronsäurereduzierten EPS im Vergleich mit den totalen EPS von *Arthrospira platensis* (n=2)

#### 4.2.8. Analyse der Bindungstypen

Die Bindungstypenanalyse wurde mit 2 leicht unterschiedlichen Methoden durchgeführt: zum einen mit Dimsyl-Lösung (3.4.9.1) und zum anderen mit NaOH (3.4.9.2) als starke Base zur Aktivierung der Alkoholfunktionen der Zucker.

Abbildung 10 zeigt die erhaltenen Chromatogramme der anschließenden gaschromatographischen Untersuchung. Beide Chromatogramme ergaben ein ähnliches Bild.

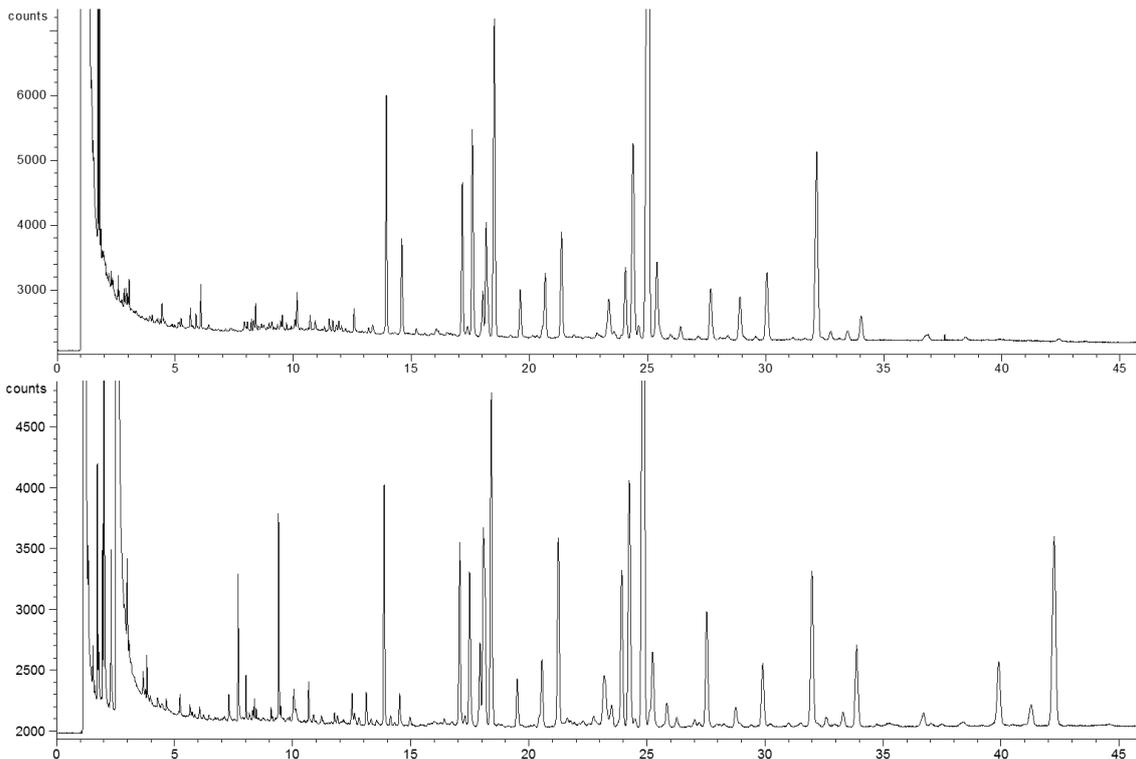


Abbildung 10: GC-FID-Chromatogramme der methylierten EPS von *Arthrospira platensis*  
oben: nach Dimethyl-Methode, unten: nach NaOH-Methode

Nach der qualitativen und quantitativen Auswertung ergab sich die in Tabelle 6 dargestellte Zusammensetzung der EPS. Es konnten insgesamt 19 verschiedene Zucker bzw. Bindungstypen bestimmt werden; die Zusammensetzung bei den zwei verschiedenen Methylierungsmethoden ähnelte sich stark. Den größten Anteil machte jeweils 1,4-verknüpfte Glucose mit 40,3% bei der Dimethyl-Methode und 30,5% bei der NaOH-Methode aus. Aufgrund der Vielzahl waren die Anteile der anderen Bindungstypen recht gering. Dabei kamen 1,4,6-Glucose, terminale Glucose und 1,4-Galactose zu 8,2%, 8,2% und 7,2% (Dimethyl) bzw. zu 5,7%, 7,4% und 7,5% (NaOH) vor. Die übrigen Monomere hatten Anteile von 5% und weniger. Alle Monosaccharide lagen in pyranosidischer Form vor.

Die laut Bestimmung nach Blumenkrantz (3.4.2) zu ca. 25% enthaltenen Uronsäuren (4.2.2) ließen sich nur in Spuren nachweisen. Sie wurden in der Probenvorbereitung deuteriert und zu den entsprechenden Zuckern reduziert. Die TIC-Spektren (total ion chromatogram) von 1-Glucose, 1-Galactose und 1,4-Galactose zeigten kleine Anteile an deuterierten Peaks. Das TIC-Spektrum von 1,3-Galactose zeigte deutlich deuterierte Massen. Eine quantitative Bestimmung war hieraus aber nicht möglich.

Bei der Aktivierung mit NaOH ließ sich ein Anteil von untermethylierten Zuckern nachweisen.

Insgesamt zeigte sich, dass das Polysaccharid überwiegend aus linearen Zuckern mit einer Vielzahl von Bindungstypen und einem geringen Anteil an dreifach-verknüpften Zuckern aufgebaut war.

<b>Bindungstyp (<math>\rho</math>)</b>	<b>Dim syl- Methode</b>	<b>NaOH- Methode</b>
<b>1-Ara</b>	3,4	3,0
<b>1-Fuc</b>	1,8	0,5
<b>1-Gal</b>	1,2	1,1
<b>1-Glc</b>	8,2	7,4
<b>1,2-Rha</b>	3,5	3,6
<b>1,3-Fuc</b>	5,2	3,4
<b>1,3-Gal</b>	1,8	2,3
<b>1,4-Gal</b>	7,2	7,5
<b>1,4-Glc</b>	40,3	30,5
<b>1,4-Man</b>	2,5	4,4
<b>1,4-Rha</b>	0,3	0,1
<b>1,6-Gal</b>	1,9	3,6
<b>1,6-Man</b>	3,0	2,8
<b>1,2,3-Fuc</b>	3,4	5,1
<b>1,2,6-Gal</b>	2,8	2,3
<b>1,3,4-Fuc</b>	2,3	2,0
<b>1,3,4-Man</b>	1,8	0,6
<b>1,3,6-Gal</b>	1,2	3,2
<b>1,4,6-Glc</b>	8,2	5,7
<b>Hexa-Ac-Gal</b>	0,0	0,9
<b>Hexa-Ac-Glc</b>	0,0	7,7
<b>Hexa-Ac-Man</b>	0,0	2,4
<b><math>\Sigma</math> terminal</b>	14,6	11,9
<b><math>\Sigma</math> zweifach-verknüpft</b>	65,7	58,3
<b><math>\Sigma</math> dreifach-verknüpft</b>	19,8	18,8

Tabelle 6: Vergleich der Methylierungsergebnisse der EPS von *Arthrospira platensis*,  
Angaben in m/m %

Addierte man jeweils alle Bindungstypen eines Monomers einer Methylierungsmethode (Tabelle 7), so zeigten sich teilweise deutliche Abweichungen im Vergleich zur Neutralzuckerzusammensetzung der unbehandelten EPS (4.2.1).

	<b>Dimsyl- Methode</b>	<b>NaOH- Methode</b>	<b>Neutralzucker</b>
<b>Rhamnose</b>	3,8	3,8	8,2
<b>Fucose</b>	12,7	10,9	9,9
<b>Arabinose</b>	3,4	3,0	1,2
<b>Xylose</b>	0,0	0,0	12,7
<b>Mannose</b>	7,3	10,2	4,6
<b>Galactose</b>	16,1	20,8	17,8
<b>Glucose</b>	56,7	51,3	45,6

Tabelle 7: Vergleich der Gesamtzuckerzusammensetzungen der EPS von *Arthrospira platensis* nach verschiedenen Methylierungsmethoden mit der Neutralzuckerzusammensetzung

Am Auffälligsten hierbei war, dass bei keiner einzigen Analyse Xylose nachgewiesen werden konnte. Auch Rhamnose konnte nicht in entsprechenden Mengen detektiert werden. Außerdem zeigte sich jeweils ein leicht erhöhter Gehalt an Fucose, Arabinose, Mannose und Glucose im Vergleich zur Neutralzuckerzusammensetzung. Dies schien aber durch die fehlende Xylose rechnerisch bedingt.

### 4.3. Chromatographische Methoden

#### 4.3.1. Gelpermeationschromatographie

Die Bestimmung des Molekulargewichts wurde mithilfe der GPC durchgeführt (3.5.1). Es ergab sich folgendes Chromatogramm (Abbildung 11):

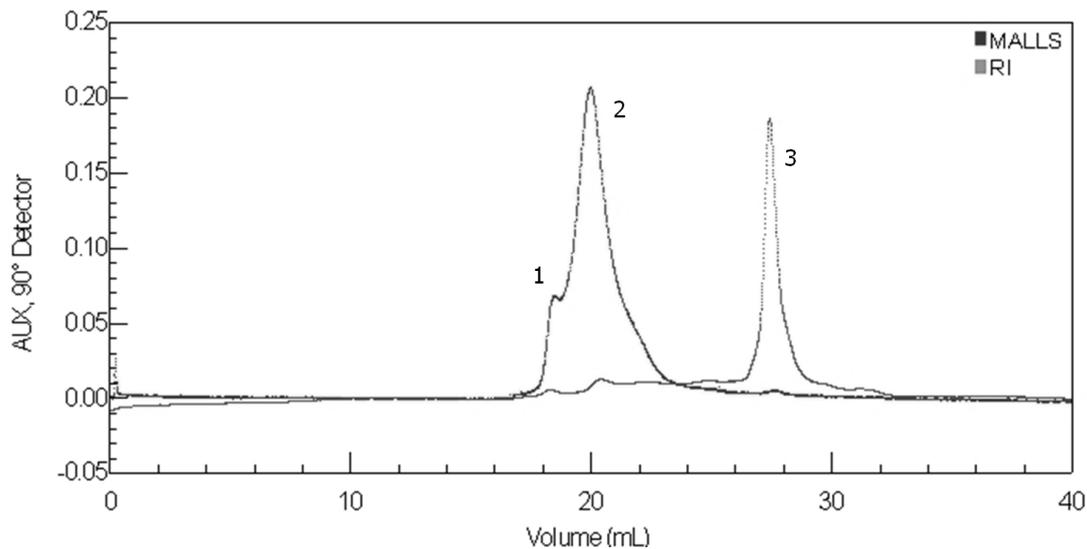


Abbildung 11: GPC-Chromatogramm der EPS von *Arthrospira platensis*

Es zeigte sich eine Auftrennung in 3 Peaks (Tabelle 8). Die zwei Peaks, die zuerst eluiert wurden, zeigten hohe durchschnittliche absolute Molekulargewichte von 2.562 kDa und 2.839 kDa. Zuletzt eluierte eine Fraktion mit einem Molekulargewicht von 10,5 kDa. Die über das Retentionsvolumen errechneten hydrodynamischen Volumina waren deutlich kleiner mit 1.421 kDa, 435,5 kDa und 6,5 kDa. Der erste Wert lag allerdings außerhalb der Kalibrierung und wurde durch Extrapolation bestimmt.

	Molekulargewicht (kDa)		Hydrodyn. Volumen (kDa)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
<b>Peak 1</b>	2.562	610,2	1.421	124,5
<b>Peak 2</b>	2.839	902,5	435	71,4
<b>Peak 3</b>	10,5	0,5	6,3	0,001

Tabelle 8: Ergebnisse der GPC-Messungen der EPS von *Arthrospira platensis*

#### 4.3.2. Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie (IEC) wurden die EPS durch Elution mit verschiedenen konzentrierten NaCl-Lösungen nach Ladung fraktioniert und diese anschließend auf ihren Kohlenhydratgehalt hin untersucht (3.5.2.). Es kristallisierten sich 2 Hauptfraktionen heraus; die

erste wurde mit Aqua bidest. eluiert, die zweite folgte bei der Elution mit 0,5 M NaCl (Abbildung 12).

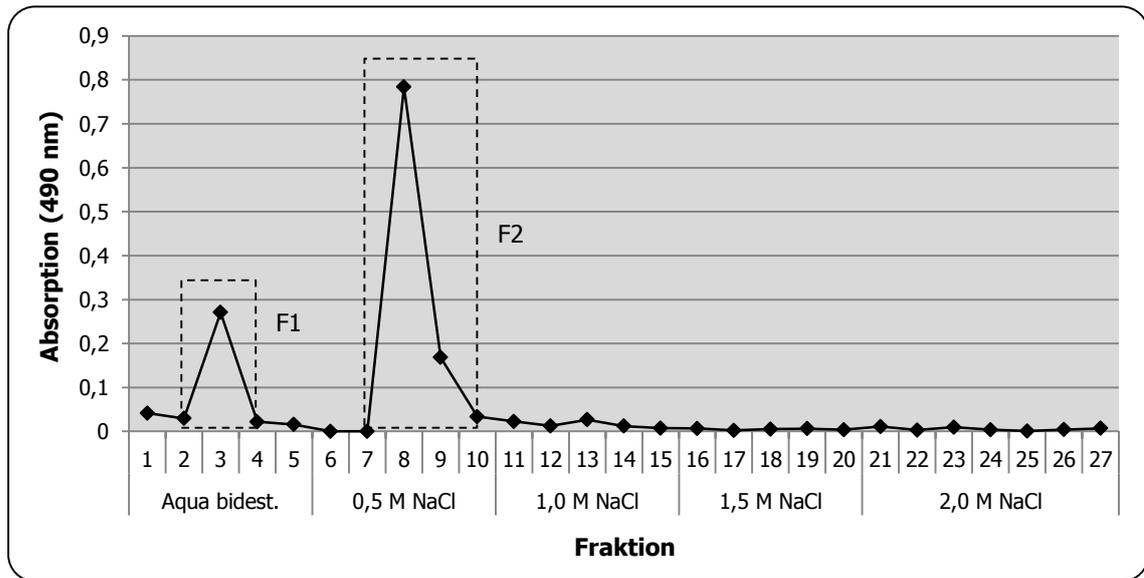


Abbildung 12: Kohlenhydratgehalt im Verlauf der IEC-Fraktionierung der EPS von *Arthrospira platensis*

Die Gesamtausbeute der vereinigten Fraktionen nach Dialyse und Lyophilisation von 10 Fraktionierungsläufen betrug 45,2% der eingesetzten EPS-Menge. Die Fraktion 1 (F1) machte davon 6,7%, die Fraktion 2 (F2) 93,3% aus.

Betrachtet man die Neutralzuckerzusammensetzungen der Fraktionen (Abbildung 13), fällt auf, dass F1 fast ausschließlich (93,4%) aus Glc bestand. F2 entsprach der Neutralzuckerzusammensetzung der totalen EPS (Abbildung 6).

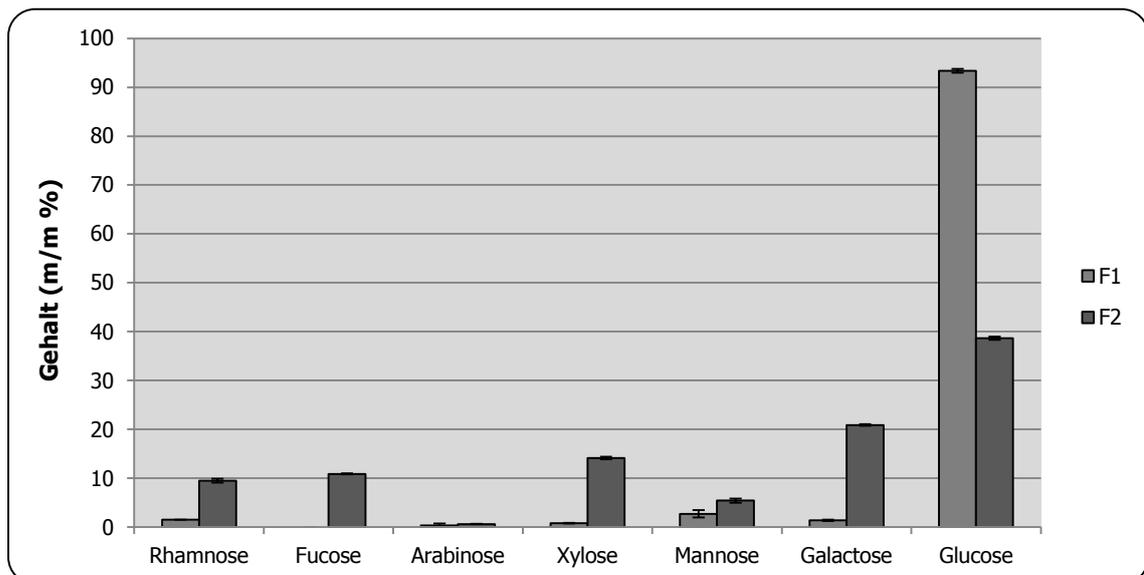


Abbildung 13: Neutralzuckerzusammensetzung der IEC-Fractionen der EPS von *Arthrospira platensis*

Die elementaranalytische Untersuchung der F2 ergab einen Sulfatgehalt von 2,7% und einen Proteinanteil von 3,8%. F1 zeigte eine zu geringe Ausbeute und konnte nicht untersucht werden.

Bei der gelpermeationschromatographischen Auftrennung der Fraktionen zeigte F1 4 Peaks. Diese hatten hydrodynamische Volumina von  $603,7 \text{ kDa} \pm 33,5 \text{ kDa}$ ,  $7,4 \text{ kDa} \pm 0,7 \text{ kDa}$ ,  $3,0 \text{ kDa} \pm 1,0 \text{ kDa}$  und  $1,2 \text{ kDa} \pm 0,03 \text{ kDa}$ . F2 zeigte 3 Peaks mit den hydrodynamischen Volumina von  $1.454 \text{ kDa} \pm 93,2 \text{ kDa}$ ,  $387,6 \text{ kDa} \pm 8,7 \text{ kDa}$  und  $9,4 \text{ kDa} \pm 0,3 \text{ kDa}$  (jeweils  $n=2$ ). Die absoluten Molekulargewichte konnten nicht mit der erforderlichen Genauigkeit bestimmt werden.

## 4.4. Proteinanalytik

### 4.4.1. Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte nach drei verschiedenen Methoden: nach Bradford mit Coomassie-Reagenz (3.6.1.2), nach Starcher mit Ninhydrin (3.6.1.3) und anhand der Ergebnisse der Elementaranalyse (3.6.1.1). Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse. Die Bestimmung mit Coomassie-Reagenz ergab den kleinsten Proteinanteil mit 1,93%. Die Elementaranalyse und die Bestimmung mittels Ninhydrin zeigten deutlich höhere, aber weitgehend übereinstimmende Werte.

Bestimmung mittels:	Coomassie	Ninhydrin	Elementaranalyse
Proteingehalt (m/m %)	1,93	9,05	9,7

Tabelle 9: Proteinanteil in den EPS von *Arthrospira platensis*

### 4.4.2. Proteinzusammensetzung

Die Zusammensetzung der Aminosäuren des Proteinteils der EPS wurde mittels HPLC und vorhergehender saurer Hydrolyse bestimmt (3.6.2). Diese saure Hydrolyse sorgte dafür, dass nicht zwischen Asparagin und Asparaginsäure bzw. Glutamin und Glutaminsäure unterschieden werden konnte. Sie wurden unter Asx bzw. Glx zusammengefasst.

Es konnten 17 verschiedene Aminosäuren detektiert werden (Abbildung 14). Dominierend waren Asx, Glycin, und Glx mit je deutlich über 10% Anteil. Zwischen 5% und 10% Anteil hatten Leucin, Isoleucin, Alanin, Threonin, Phenylalanin und Valin. Mit unter 5% Anteil waren Serin, Prolin, Arginin, Methionin, GABA, Histidin und Hydroxyprolin zu finden.

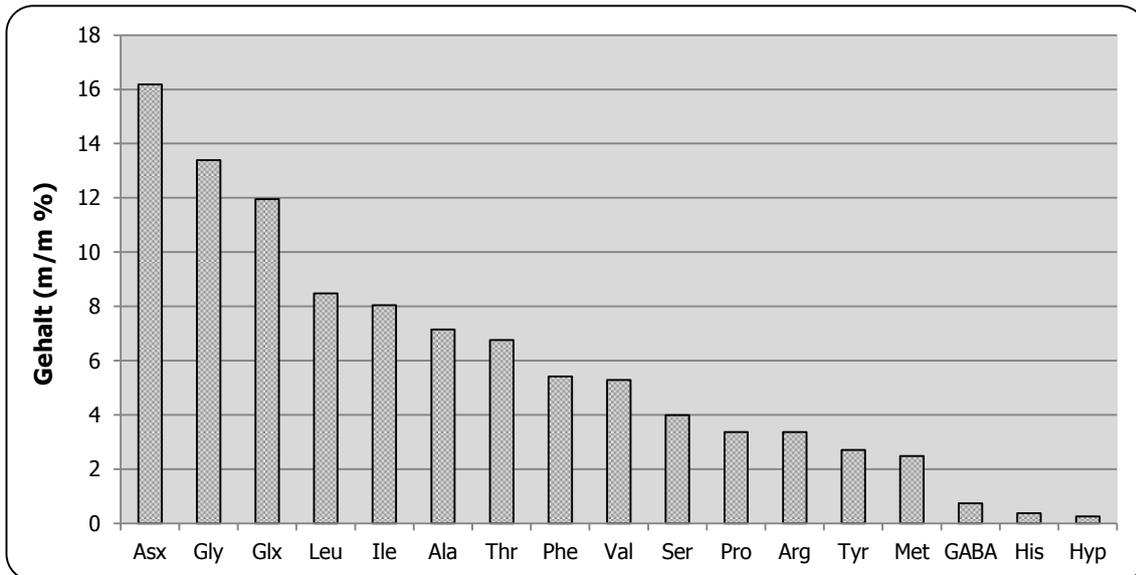


Abbildung 14: Aminosäurezusammensetzung des Proteinteils der EPS von *Arthrospira platensis*

Anhand der Ergebnisse konnten Rückschlüsse auf den Proteingehalt der totalen EPS gezogen werden. Es ließen sich 1,86% Protein nachweisen.

## 4.5. Testung der biologischen Aktivität

### 4.5.1. Testung auf Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der EPS von *A. plat.* wurde mittels eines Neutralrot-Assays mit Harnblasenkarzinomzellen bestimmt (3.7.1). Die EPS erwiesen sich als nicht toxisch.

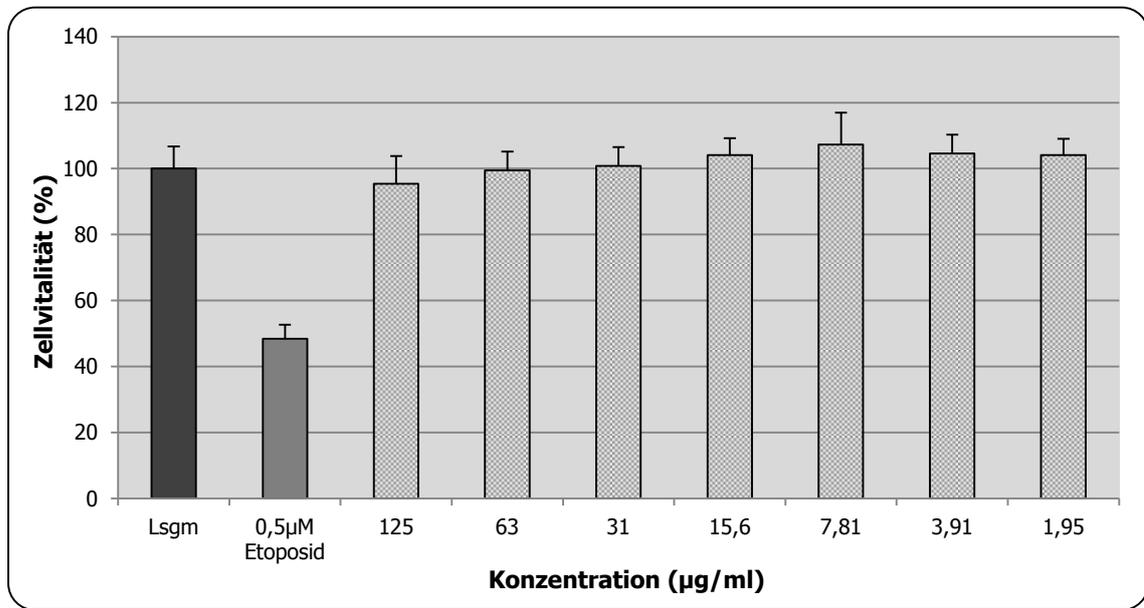


Abbildung 15: Einfluss der EPS von *Arthrospira platensis* auf die Vitalität von humanen Harnblasenkarzinomzellen

### 4.5.2. Testung auf antimikrobielle Wirkung

Die antimikrobielle Wirkung der EPS von *A. plat.* auf verschiedene Mikroorganismen wurde mithilfe des Agarplattendiffusionstests bestimmt (3.7.2). Es zeigte sich bei der Testung keinerlei antibakterielle oder antifungale Aktivität der EPS.

### 4.5.3. Testung der Wirkung auf das humane Komplementsystem

Der Einfluss der EPS auf das humane Komplementsystem wurde mit ELISA-Testkits durchgeführt (3.7.3). Es konnte bei keinem der drei möglichen Aktivierungswege mit den getesteten Konzentrationen bis 500 µg/ml ein signifikanter Einfluss festgestellt werden (Abbildung 16).

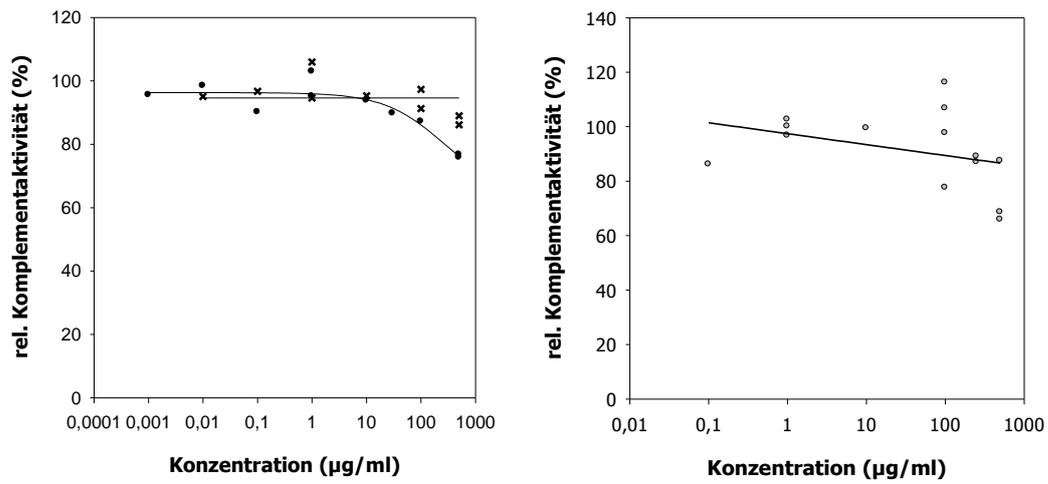


Abbildung 16: Einfluss der EPS von *Arthrospira platensis* auf das Komplementsystem

links: ● klassischer und x alternativer Weg, rechts: ○ Lektinweg

## 5. Ergebnisse *Gloeothece membranacea*

### 5.1. Kultivierung und Ernte

Das Wachstum wurde anhand der zunehmenden Chlorophyllabsorption bestimmt (3.2.5). Abbildung 17 zeigt den Wachstumsverlauf und beinhaltet bereits den Korrekturfaktor. Es zeigte sich eine lag-Phase von ca. 20 Tagen, dann begann die exponentielle Phase. Es wurde nach ca. 55 Tagen abgeerntet, obwohl der Chlorophyllgehalt noch im zunehmenden Bereich war. Allerdings zeigte die Kohlenhydratbestimmung nach Dubois et al. (3.2.5; Abbildung 18) eine Abnahme der EPS-Konzentration ab dem 40. Tag. Um die EPS-Verluste gering zu halten, wurde daher schon während der exponentiellen Phase die Kultivierung abgebrochen.

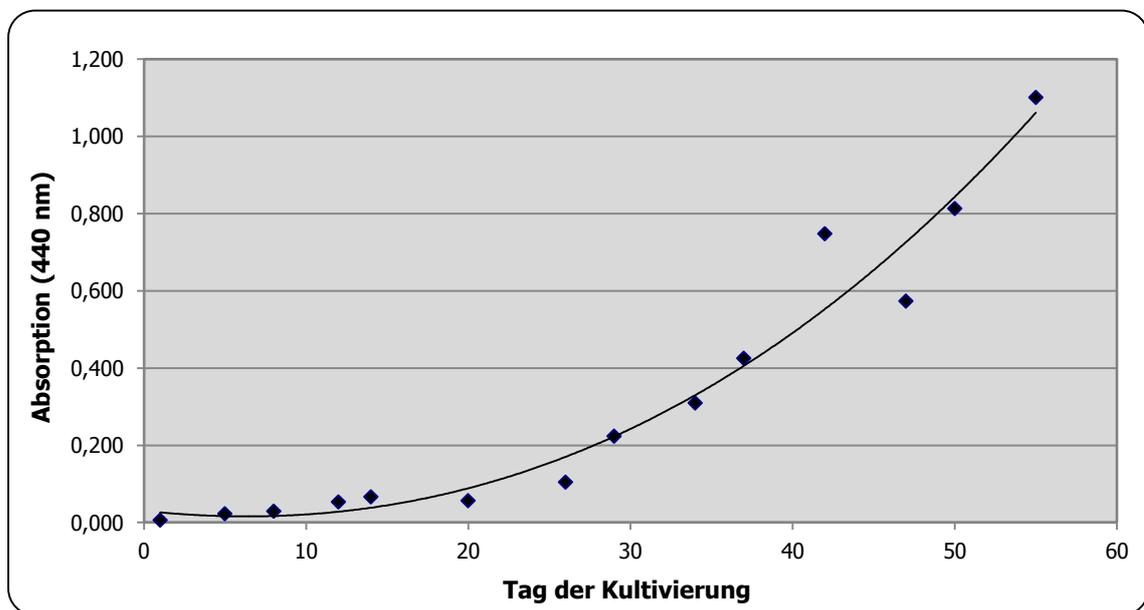


Abbildung 17: Chlorophyllabsorptionsbestimmung während der Kultivierung von *Gloeothece membranacea*

Zum Zeitpunkt des Aberntens waren noch ca. 6,1 l Kultivierungsmedium vorhanden. Wie auch bei *A. plat.* (Tabelle 4) unterschieden sich die beiden Kultivierungsansätze in der Zelldichte stark. Der eine Ansatz zeigte eine Biomasse von 2,37 g/l, der andere von 1,03 g/l. Auch der Anteil des nach Hitzedenaturierung abgetrennten Proteins differierte stark (19,1 mg/l und 76,2 mg/l). Für die EPS zeigte sich beim ersten Kultivierungsansatz eine anderthalbfache Ausbeute im Vergleich zum zweiten Kultivierungsansatz (Tabelle 10).

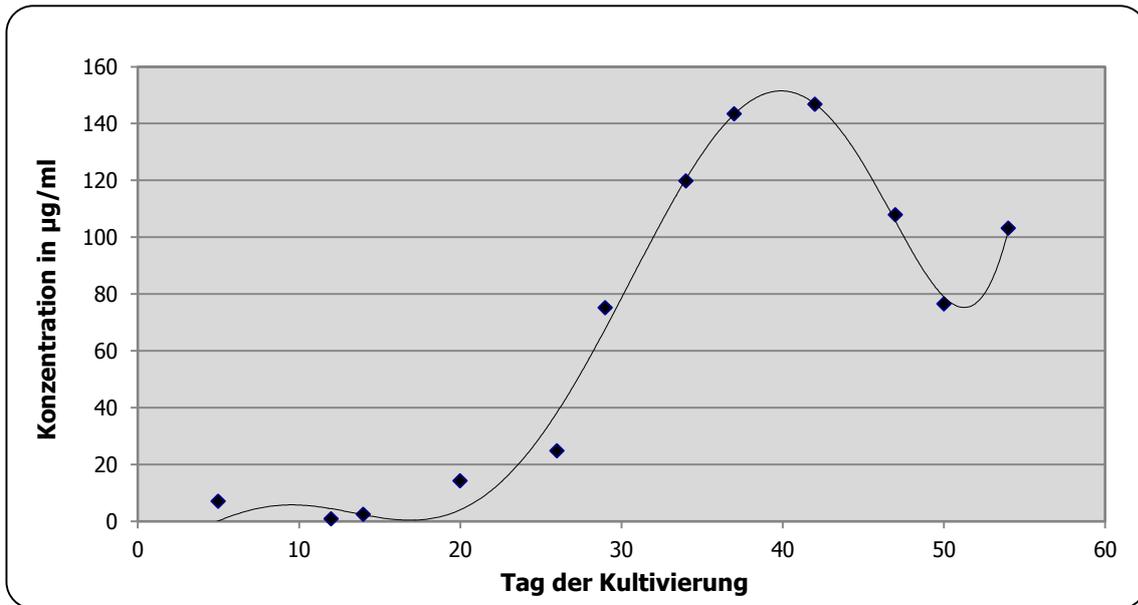


Abbildung 18: Bestimmung des Kohlenhydratanteils nach Dubois während der Kultivierung von *Gloeotheca membranacea*

Kultivierungsansatz	Biomasse (g/l)	Protein (mg/l)	EPS-Ausbeute (mg/l)
1	2,37	19,1	125,9
2	1,03	76,2	80,3

Tabelle 10: Ausbeuten der Kultivierung von *Gloeotheca membranacea*

Es ließ sich während der Kultivierung eine pH-Wert-Änderung feststellen. Der pH-Wert stieg ausgehend von pH 7,1 (pH des Mediums) an und pendelte sich nach ca. 40 Tagen bei pH 9,6 ein.

## 5.2. Polysaccharidanalytik

### 5.2.1. Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung

Die Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung erfolgte durch Acetylierung mit anschließender gaschromatographischer und massenspektrometrischer Untersuchung (3.4.1). Die Analyse ergab das in Abbildung 19 dargestellte GC-Chromatogramm. Den größten Anteil im Polysaccharid stellten die Hexosen Galactose mit 31,4%, gefolgt von Glucose mit 22,7% und Mannose mit 17,5%. Der restliche Anteil bestand aus den Monosacchariden Rhamnose (9,7%), Xylose (6,3%), Fucose (3,2%) und Arabinose (0,9%) (Abbildung 20). Die massenspektrometrische Untersuchung bestätigte alle über die Retentionszeit des FID bestimmten Identitäten. Das Chromatogramm (Abbildung 19) zeigte auch einen zunächst unbekanntem Peak mit einem Massenanteil von 8,4%. Per MS-Analyse konnte dieses Monosaccharid als 2-O-Methyl-Xylose identifiziert werden, wie bereits von Weckesser et al. (1987) beschrieben. Da 2-O-Methyl-Xylose nicht im Handel zu erwerben war, um den Korrekturfaktor zu bestimmen, wurde mit einem angenommenen Faktor von 1,3 gerechnet.

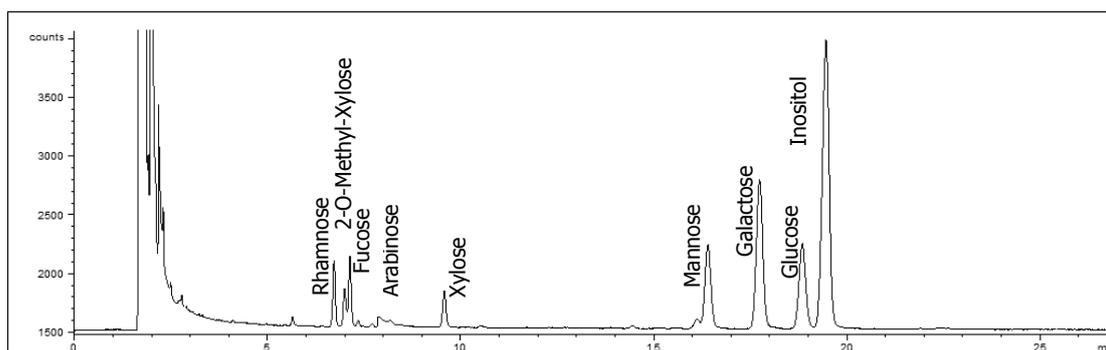


Abbildung 19: GC-Chromatogramm der acetylierten EPS von *Gloeotheca membranacea*

Wie in Abbildung 19 zu sehen, waren noch weitere kleine Peaks im Chromatogramm zu erkennen. Diese wurden jeweils als unter 1% bestimmt und machten von der Gesamtmasse nur einen sehr kleinen Teil aus. Daher wurden sie nicht weiter untersucht.

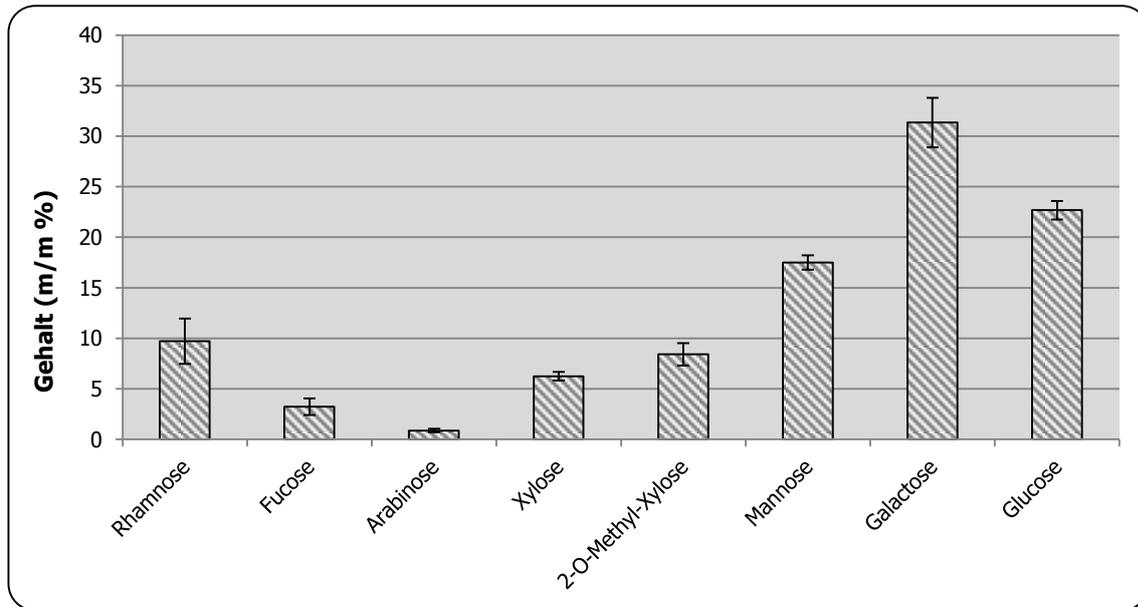


Abbildung 20: Neutralzuckerzusammensetzung der EPS von *Gleotheca membranacea*

Die Ausbeute der Acetylierungsanalysen, ermittelt mithilfe des internen Standards Inositol, betrug im Durchschnitt  $44,5\% \pm 4,7\%$ .

### 5.2.2. Quantitative Bestimmung von Uronsäuren

Die Bestimmung des Uronsäuregehalts (3.4.2) in den EPS wurde nach Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) durchgeführt. Hierbei ergab sich ein Gehalt von  $13,3\% \pm 1,7\%$ . Die modifizierte Durchführung durch Zugabe von Sulfaminsäure zur Unterdrückung der Braunfärbung der Neutralzucker zeigte ein deutlich niedrigeres Ergebnis von  $6,0\% \pm 1,4\%$ . Es ließ sich also bei dieser Probe ein Farbeinfluss durch die Neutralzucker erkennen.

### 5.2.3. Sulfatgehalt

Die Testung auf Sulfat erfolgte nach 2 verschiedenen Methoden (3.4.3). Bei der Elementaranalyse wurde der Schwefelgehalt der EPS bestimmt. Die konduktometrische Titration erfasste alle sauren funktionellen Gruppen, welche sich theoretisch durch unterschiedliche Wendepunkte unterscheiden ließen.

Der anhand der Ergebnisse der Elementaranalyse berechnete Sulfatgehalt lag bei 13,9%. Die konduktometrische Bestimmung hingegen ergab einen Sulfatgehalt von  $19,0\% \pm 3,3\%$ . Durch Einberechnung des Molekulargewichtsdurchschnitts aus der Neutralzucker- und Uronsäurebestimmung konnte für den Gehalt von 19,0% ein Sulfatierungsgrad (DS, Degree of Sulphation) von  $0,56 \pm 0,13$  ermittelt werden (Casu & Gennaro, 1975). Legte man den aus der Elementaranalyse ermittelten Wert zugrunde, ergab sich ein DS von 0,34.

#### 5.2.4. Acetatgehalt

Die Bestimmung des Acetatgehalts (2.4.4.) erfolgte zunächst ohne Hydrolyse der EPS. Auf diese Weise war kein Acetat nachzuweisen. Nach vorheriger Hydrolyse mit 2 N TFA ergab sich ein Gehalt von 3,7% Acetat.

#### 5.2.5. Pyruvatgehalt

Die Bestimmung von Pyruvat (3.4.5.) ergab einen Gehalt von 1,2%  $\pm$  0,3%.

#### 5.2.6. Oxalsäurehydrolyse

Die erhaltenen Fraktionen nach Oxalsäurebehandlung wurden hinsichtlich der Ausbeuten und der Neutralzuckerzusammensetzung untersucht (3.4.6.). Außerdem wurde das hydrodynamische Volumen per GPC bestimmt (3.5.1).

Die Ausbeuten sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Gesamtausbeute bezogen auf die Einwaage betrug 81,2%. Der Anteil an ungelösten Bestandteilen lag bei 11,2%. Der Überstand nach dem Ausfällen machte immer den größten Anteil mit durchschnittlich 71,1% aus.

	<b>Ungelöste Bestandteile*</b>	<b>Überstand*</b>	<b>Rückstand nach Ausfällen*</b>	<b>Gesamtausbeute**</b>
<b>1</b>	10,7	61,3	28,0	84,7
<b>2</b>	11,6	80,9	7,5	77,7
$\bar{x}$	11,2	71,1	17,8	81,2

Tabelle 11: Ausbeuten der Fraktionen der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *Gloeotheca membranacea* ,  
Angaben in m/m %

\*= Ausbeuten bezogen auf die Gesamtausbeute

\*\*= Gesamtausbeute bezogen auf die Einwaage

Bei der Neutralzuckerbestimmung zeigte sich, dass der hochmolekulare Rückstand hauptsächlich aus den Hexosen Glucose, Mannose und Galactose bestand. Diese machten insgesamt fast 84% der Zuckerbestandteile aus (Abbildung 21). Die Neutralzuckerzusammensetzung der ungelösten Bestandteile und des Überstandes ähnelten sich und entsprachen der Neutralzuckerzusammensetzung des totalen EPS von *G. memb.* (Abbildung 20).

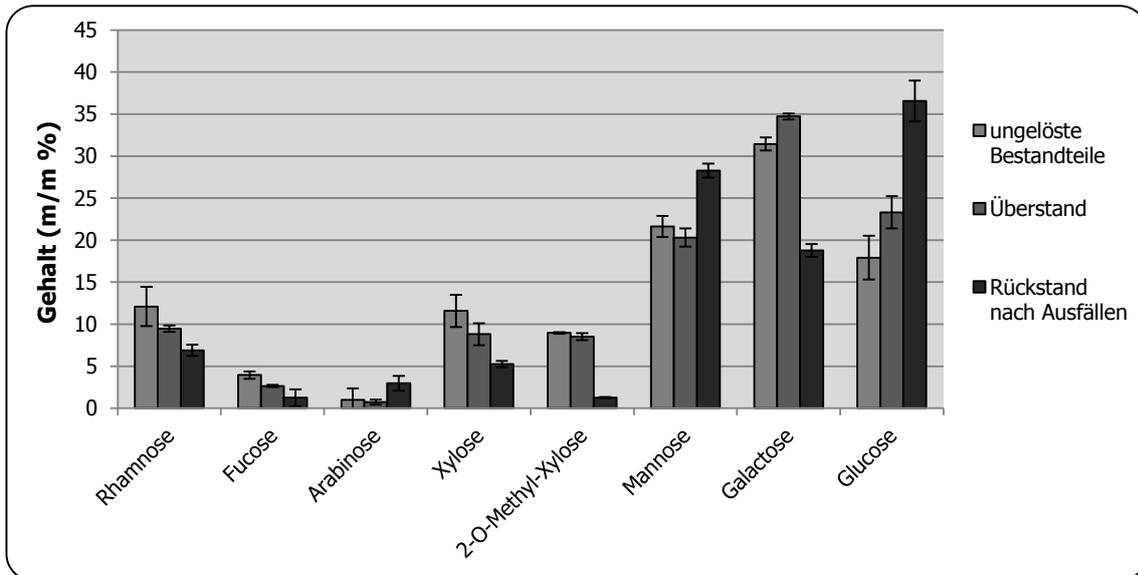


Abbildung 21: Neutralzuckerzusammensetzung der Fraktionen der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *Gloeotheca membranacea* (n=2)

Der Überstand nach der Ethanol-fällung wurde auch auf die Neutralzuckerzusammensetzung hin untersucht, jedoch ohne den Hydrolyseschritt. Auf diese Weise konnten frei vorliegende Monosaccharide und die Zusammensetzung des gesamten Überstandes differenziert betrachtet werden (Abbildung 22). Es zeigte sich, dass im Gegensatz zum gesamten Überstand deutlich mehr Pentosen, wie Arabinose, Xylose und 2-O-Methyl-Xylose, als freie Monosaccharide vorlagen. Im TFA-hydrolysierten Überstand dominierten insgesamt jedoch die Hexosen.

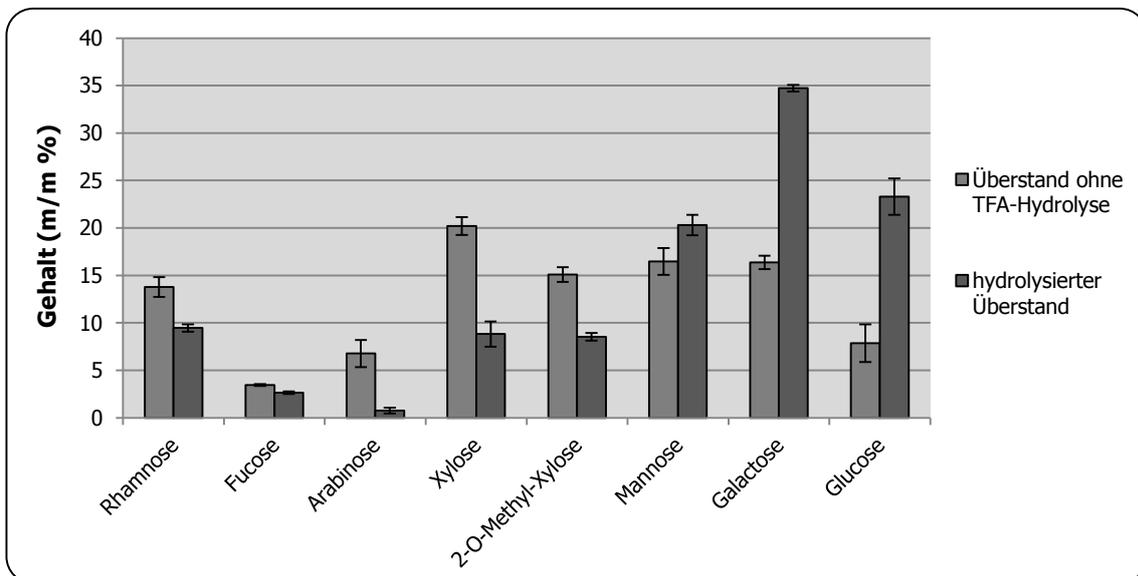


Abbildung 22: Neutralzuckerzusammensetzung des nicht-hydrolysierten und des hydrolysierten Überstandes der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *Gloeotheca membranacea* (n=2)

Die Acetylierungsausbeuten betragen für die unlöslichen Bestandteile 39,4% ± 2,0%, für den Überstand 78,1% ± 9,5% und für den Rückstand nach Ausfällen 25,7% ± 0,1%

Die gelpermeationschromatographische Untersuchung ergab für die wieder in Lösung gebrachte Fraktion der ungelösten Bestandteile 2 Peaks. Diese hatten hydrodynamische Volumina von 4,1 kDa und 2,6 kDa. Der Überstand zeigte 1 Peak mit 4,4 kDa. Die Fraktion des Rückstands nach Ausfällen resultierte in 3 Peaks mit den hydrodynamischen Volumina von 11,4 kDa, 3,9 kDa und 2,6 kDa (jeweils n=1). Die absoluten Molekulargewichte konnten nicht mit der erforderlichen Genauigkeit bestimmt werden.

### 5.2.7. Uronsäurereduktion

Die zuvor desulfatierten EPS (3.4.7) wurden mit NaBD<sub>4</sub> uronsäurereduziert (3.4.8) und anschließend auf ihre Neutralzuckerzusammensetzung (3.4.1) hin untersucht. Es zeigte sich ein Anstieg von Gal, Man, Xyl und 2-O-Me-Xyl (Abbildung 23). Rha und Fuc waren in etwas geringeren Anteilen zu finden. Der Anteil an Glc sank am stärksten um ca. 10%.

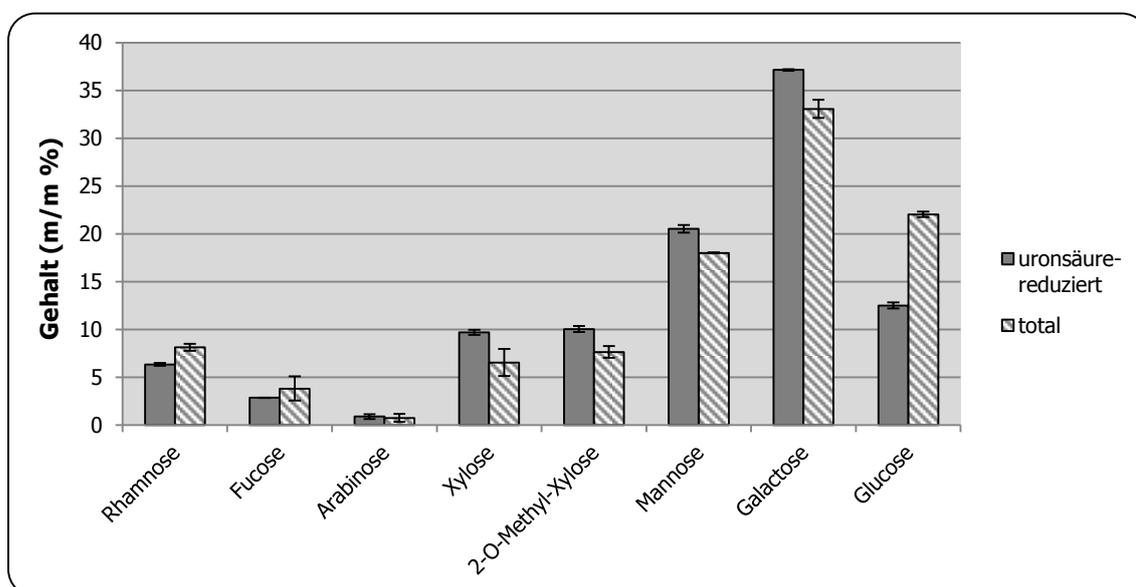


Abbildung 23: Neutralzuckerzusammensetzung der uronsäurereduzierten EPS im Vergleich mit den totalen EPS von *Gloeotheca membranacea* (n=2)

Die Ausbeute der Acetylierungsanalyse betrug 79,8%.

### 5.2.8. Analyse der Bindungstypen

Die Bindungstypenanalyse wurde mit 2 leicht unterschiedlichen Methoden durchgeführt: zum einen mit Dimsyl-Lösung (3.4.9.1) und zum anderen mit NaOH (3.4.9.2) als starke Base zur Aktivierung der Alkoholfunktionen der Zucker.

Abbildung 24 zeigt die erhaltenen Chromatogramme der anschließenden gaschromatographischen Untersuchung. Beide Chromatogramme ergaben ein ähnliches Bild.

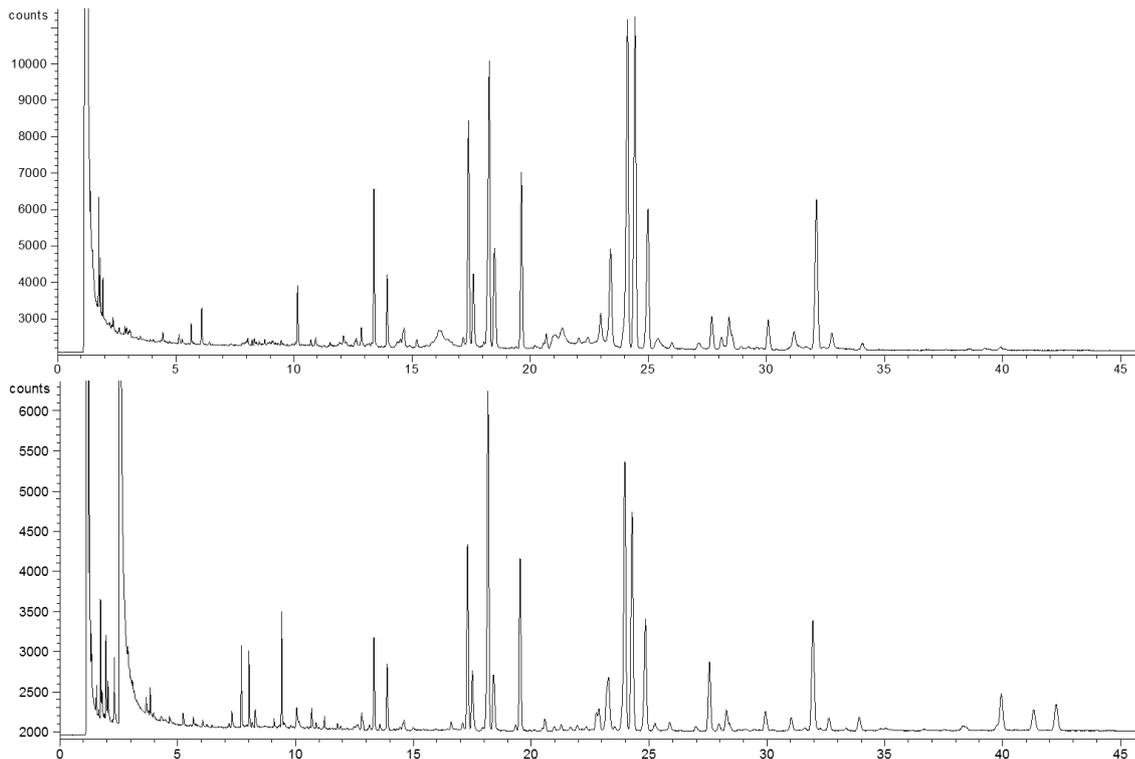


Abbildung 24: GC-FID-Chromatogramme der methylierten EPS von *Gloeotheca membranacea*  
oben: nach Dimsyl-Methode, unten: nach NaOH-Methode

Nach der qualitativen und quantitativen Auswertung ergab sich folgende Zusammensetzung der EPS (Tabelle 12). Es konnten insgesamt 19 verschiedene Zucker bzw. Bindungstypen bestimmt werden; die Zusammensetzung bei den zwei verschiedenen Methylierungsmethoden ähnelte sich stark. Die höchsten Anteile machten sowohl bei der Dimsyl- als auch bei der NaOH-Methode 1,4-Mannose (16,7% und 15,7%), 1,4-Galactose (16,2% und 12,5%) und 1,2-Xylose (10,5% und 13,1%) aus. Die Anteile von 1,4,6-Glucose, 1,4-Rhamnose, 1,4-Glucose und terminale Galactose betrugen 5-10%. Alle anderen Zucker lagen unter 5%. Alle Monosaccharide lagen in pyranosidischer Form vor.

Die laut Bestimmung nach Blumenkrantz (3.4.2) zu durchschnittlich 10% enthaltenen Uronsäuren (5.2.2) ließen sich nur in Spuren nachweisen. Sie wurden in der Probenvorbereitung deuteriert und zu den entsprechenden Zuckern reduziert. Die TIC-Spektren von 1-Glucose, 1-Galactose, 1,3-Galactose und 1,3-Glucose zeigten kleine Anteile an deuterierten Peaks. Eine quantitative Bestimmung war hieraus aber nicht möglich.

Bei der Aktivierung mit NaOH ließ sich ein Anteil von untermethylierten Zuckern nachweisen.

Insgesamt zeigte sich, dass das Polysaccharid überwiegend aus linearen Zuckern mit einer Vielzahl von Bindungstypen und einem geringen Anteil an dreifach-verknüpften Zuckern aufgebaut war.

<b>Bindungstyp (<math>\rho</math>)</b>	<b>Dimethyl- Methode</b>	<b>NaOH- Methode</b>
<b>1-Ara</b>	1,6	1,6
<b>1-Gal</b>	6,0	7,2
<b>1-Glc</b>	4,2	2,7
<b>1-Rha</b>	3,6	2,4
<b>1,2-Xyl</b>	10,5	13,1
<b>1,3-Fuc</b>	3,0	2,7
<b>1,3-Gal</b>	5,6	4,4
<b>1,4-Gal</b>	16,2	12,5
<b>1,4-Glc</b>	7,2	6,7
<b>1,4-Man</b>	16,7	15,7
<b>1,4-Rha</b>	7,8	7,3
<b>1,6-Gal</b>	1,8	4,2
<b>1,6-Man</b>	1,3	0,5
<b>1,3,4-Fuc</b>	0,2	0,6
<b>1,3,4-Gal</b>	2,0	1,5
<b>1,3,4-Man</b>	0,8	0,0
<b>1,3,6-Gal</b>	0,5	1,1
<b>1,3,6-Glc</b>	1,4	1,0
<b>1,4,6-Glc</b>	9,6	8,0
<b>Hexa-Ac-Gal</b>	0,0	1,6
<b>Hexa-Ac-Glc</b>	0,0	2,1
<b>Hexa-Ac-Man</b>	0,0	3,0
<b><math>\Sigma</math> terminal</b>	15,4	13,9
<b><math>\Sigma</math> zweifach-verknüpft</b>	70,0	67,2
<b><math>\Sigma</math> dreifach-verknüpft</b>	14,6	12,2

Tabelle 12: Vergleich der Methylierungsergebnisse der EPS von *Gloeotheca membranacea*,  
Angaben in m/m %

Addierte man jeweils alle Bindungstypen eines Monomers einer Methylierungsmethode, so zeigten sich im Vergleich zur Neutralzuckerzusammensetzung der unbehandelten EPS (5.2.1) übereinstimmende Ergebnisse (Tabelle 13).

	<b>Dimethyl- Methode</b>	<b>NaOH- Methode</b>	<b>Neutralzucker</b>
<b>Rhamnose</b>	11,3	9,7	9,7
<b>Fucose</b>	3,2	3,3	3,2
<b>Arabinose</b>	1,6	1,6	0,9
<b>Xylose</b>	10,5	13,1	14,6*
<b>Mannose</b>	18,8	19,2	17,5
<b>Galactose</b>	32,1	32,6	31,3
<b>Glucose</b>	22,5	20,4	22,7

Tabelle 13: Vergleich der Gesamtzuckerzusammensetzungen der EPS von *Gloeotheca membranacea* nach verschiedenen Methylierungsmethoden mit der Neutralzuckerzusammensetzung

\*Xylose + 2-O-Methyl-Xylose

## 5.3. Chromatographische Methoden

### 5.3.1. Gelpermeationschromatographie

Die Bestimmung des Molekulargewichts wurde mithilfe der GPC durchgeführt (3.5.1). Es ergab sich folgendes Chromatogramm (Abbildung 25):

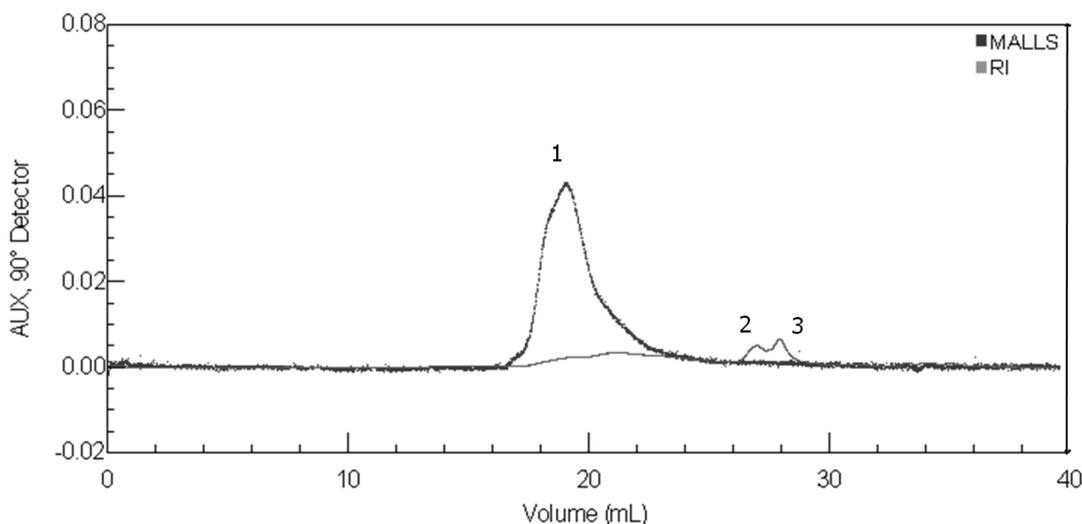


Abbildung 25: GPC-Chromatogramm der EPS von *Gloeotheca membranacea*

Es zeigte sich eine Auftrennung in 3 Peaks (Tabelle 14). Das absolute Molekulargewicht vom ersten Peak wurde mit 733 kDa bestimmt. Von Peak 2 und 3 waren keine absoluten Molekulargewichte bestimmbar; diese wurden nur über das Retentionsvolumen ausgewertet. Das hydrodynamische Volumen des ersten Peaks war im Vergleich zum absoluten MW leicht erhöht (983 kDa) Es lag außerhalb des Kalibrierungsbereichs und wurde durch Extrapolation bestimmt. Peak 2 und 3 ergaben hydrodynamische Volumina von 86,5 kDa und 6,5 kDa.

	Molekulargewicht (kDa)		Hydrodyn. Volumen (kDa)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
<b>Peak 1</b>	733,2	148,6	983,2	227,4
<b>Peak 2</b>			86,3	69,0
<b>Peak 3</b>			6,5	1,6

Tabelle 14: Ergebnisse der GPC-Messungen der EPS von *Gloeotheca membranacea*

### 5.3.2. Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie (IEC) wurden die EPS durch Elution mit verschiedenen konzentrierten NaCl-Lösungen nach Ladung fraktioniert und diese anschließend auf ihren Kohlenhydratgehalt hin untersucht (3.5.2.). Es wurden 3 Hauptfraktionen eluiert (Abbildung 26).

Die erste Fraktion (F1) ließ sich mit 0,5 M NaCl abtrennen, die zweite (F2) folgte bei Elution mit 1,0 M NaCl. Die Fraktion mit dem größten Kohlenhydratgehalt ließ sich mit 1,5 M NaCl eluieren.

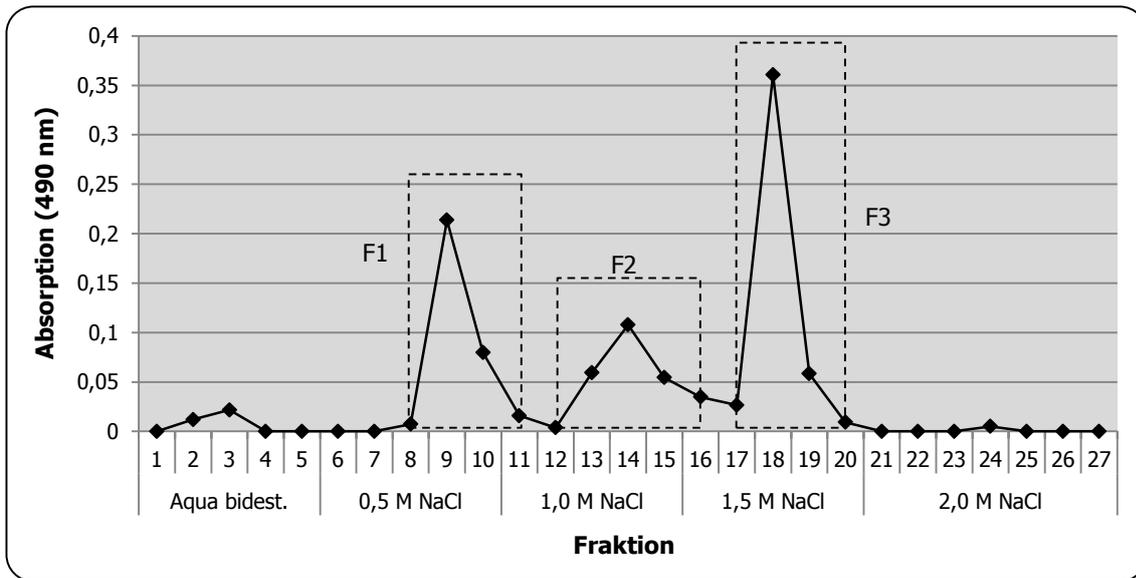


Abbildung 26: Kohlenhydratgehalt im Verlauf der IEC-Fraktionierung der EPS von *Gloeotheca membranacea*

Die Gesamtausbeute der vereinigten Fraktionen nach Dialyse und Lyophilisation von 10 Fraktionierungsläufen betrug 41,8% der eingesetzten EPS-Menge. F1 machte davon 32,7%, F2 26,2% aus. Den größten Anteil hatte F3 mit 41,0%.

Betrachtet man die Neutralzuckerzusammensetzung (Abbildung 27), so zeigte sich, dass die drei Fraktionen recht ähnlich zusammengesetzt waren. Auch entsprachen die Werte der Neutralzuckerzusammensetzung der totalen EPS (Abbildung 20).

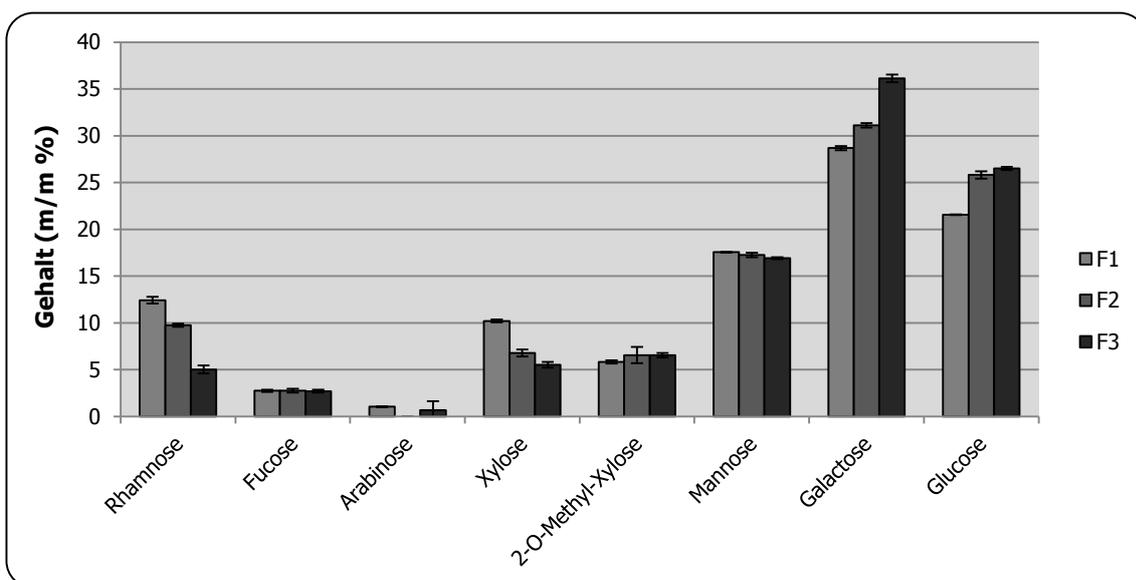


Abbildung 27: Neutralzuckerzusammensetzung der IEC-Fractionen der EPS von *Gloeotheca membranacea*

Die elementaranalytische Untersuchung der Fraktionen ergab folgende Ergebnisse (Tabelle 15):

	<b>Sulfatgehalt</b>	<b>Proteingehalt</b>
<b>F1</b>	10,3	9,3
<b>F2</b>	15,7	4,3
<b>F3</b>	17,2	0,4

Tabelle 15: Ergebnisse der Elementaranalyse der IEC-Fractionen der EPS von *Gloeotheca membranacea*,  
Angaben in m/m %

Bei der gelpermeationschromatographischen Auftrennung der Fraktionen zeigte F1 3 Peaks. Diese hatten hydrodynamische Volumina von 487,4 kDa, 11,8 kDa und 7,8 kDa (n=1). F2 zeigte 3 Peaks mit den hydrodynamischen Volumina von 64,8 kDa  $\pm$  15,6 kDa, 4,3 kDa  $\pm$  0,1 kDa und 2,4 kDa  $\pm$  0,1 kDa (n=2). Auch bei F3 resultierten 3 Peaks mit 227,5 kDa  $\pm$  7,6 kDa, 3,9 kDa  $\pm$  0,2 kDa und 2,4 kDa  $\pm$  0,1 kDa (n=2). Die absoluten Molekulargewichte konnten nicht mit der erforderlichen Genauigkeit bestimmt werden.

## 5.4. Proteinanalytik

### 5.4.1. Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte nach drei verschiedenen Methoden: nach Bradford mit Coomassie-Reagenz (2.6.1.2), nach Starcher mit Ninhydrin (2.6.1.3) und anhand der Ergebnisse der Elementaranalyse (2.6.1.1). Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse. Die Bestimmung mit Coomassie-Reagenz ergab den kleinsten Proteinanteil von nur 0,9%. Die Elementaranalyse und die Bestimmung mittels Ninhydrin zeigten höhere, aber weitgehend übereinstimmende Werte. Die EPS von *G. memb.* zeigten von allen drei untersuchten EPS den niedrigsten Proteingehalt.

Bestimmung mittels:	Coomassie	Ninhydrin	Elementaranalyse
Proteingehalt (m/m %)	0,9	3,3	3,7

Tabelle 16: Proteinanteil in EPS von *Gloeotheca membranacea*

### 5.4.2. Proteinzusammensetzung

Die Zusammensetzung der Aminosäuren des Proteinteils der EPS wurde mittels HPLC und vorhergehender saurer Hydrolyse bestimmt (3.6.2). Diese saure Hydrolyse sorgte dafür, dass nicht zwischen Asparagin und Asparaginsäure bzw. Glutamin und Glutaminsäure unterschieden werden konnte. Sie wurden unter Asx bzw. Glx zusammengefasst.

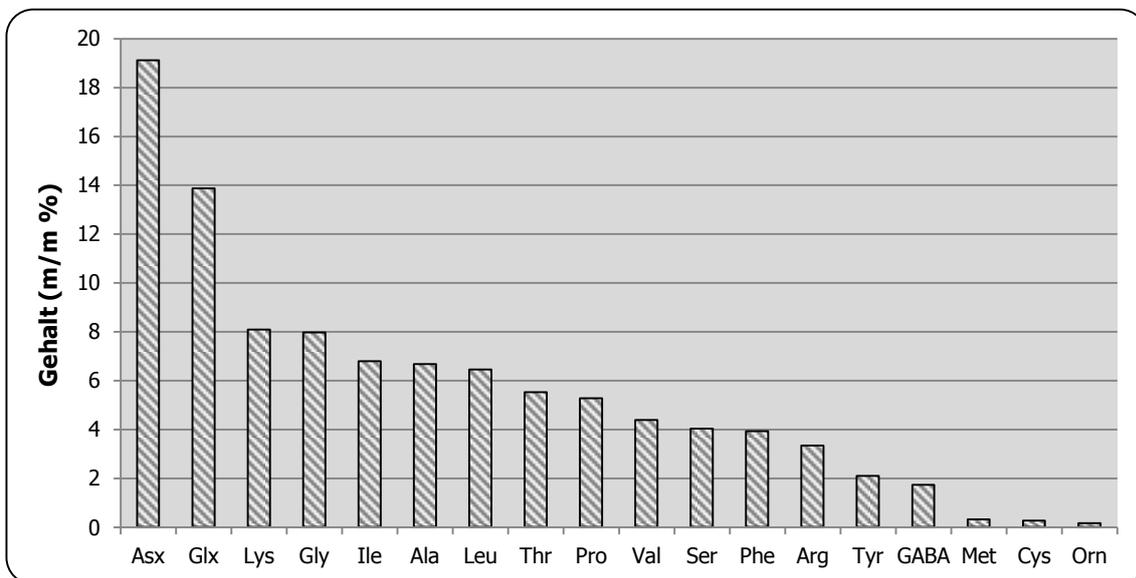


Abbildung 28: Aminosäurezusammensetzung des Proteinteils der EPS von *Gloeotheca membranacea*

Es ließen sich 18 unterschiedliche Aminosäuren nachweisen (Abbildung 28). Hierbei machten Asx und Glx den größten Anteil mit 19,1% und 13,9% aus. Mit einem Anteil von 5% bis 10% konnten Lysin, Glycin, Isoleucin, Alanin, Leucin, Threonin und Prolin detektiert werden. Mit

jeweils unter 5% waren Valin, Serin, Phenylalanin, Arginin, Tyrosin und GABA zu finden. Methionin, Cystein und Ornithin hatten Anteile von jeweils unter 0,5%.

Anhand der Ergebnisse konnten Rückschlüsse auf den Proteingehalt der totalen EPS gezogen werden. Es ließen sich 2,03% Protein nachweisen.

## 5.5. Testung der biologischen Aktivität

### 5.5.1. Testung auf Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der EPS von *G. memb.* wurde mittels eines Neutralrot-Assays mit Harnblasenkarzinomzellen bestimmt (3.7.1). Die EPS erwiesen sich als nicht toxisch.

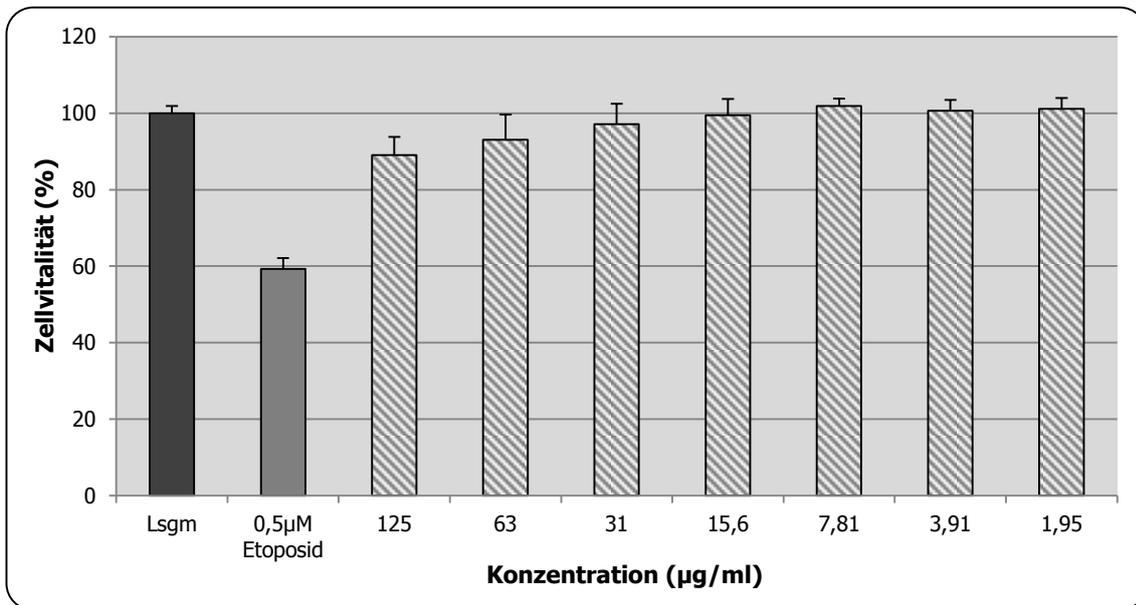


Abbildung 29: Einfluss der EPS von *Gloeotheca membranacea* auf die Vitalität von humanen Harnblasenkarzinomzellen

### 5.5.2. Testung auf antimikrobielle Wirkung

Die antimikrobielle Wirkung der EPS von *G. memb.* auf verschiedene Mikroorganismen wurde mithilfe des Agarplattendiffusionstests bestimmt (3.7.2). Es zeigte sich bei der Testung keinerlei antibakterielle oder antifungale Aktivität der EPS.

### 5.5.3. Testung der Wirkung auf das humane Komplementsystem

Der Einfluss der EPS auf das humane Komplementsystem wurde mit ELISA-Testkits durchgeführt (3.7.3). Die EPS von *G. memb.* zeigten im klassischen Weg eine Hemmung, die  $IC_{50}$  betrug 428,4 µg/ml. Dieser Wert ist aber mit Vorsicht zu betrachten, da die Einwaage zur Herstellung der Verdünnungsreihe unter 1 mg war. Es zeigte sich weder im Lektinweg noch im alternativen Weg ein signifikanter Einfluss bei den getesteten Konzentrationen.

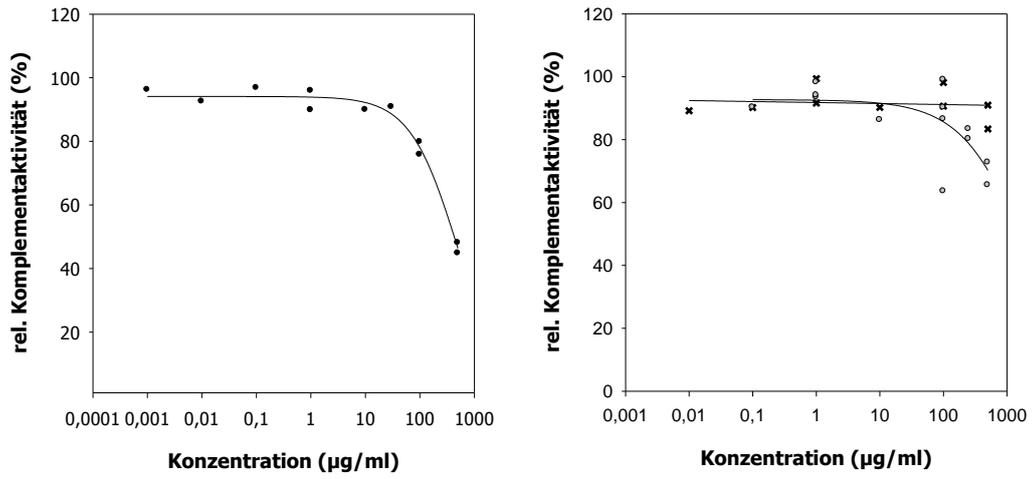


Abbildung 30: Einfluss der EPS von *Gleotheca membranacea* auf das Komplementsystem  
 links: ● klassischer Weg, rechts: ○ Lektinweg und x alternativer Weg

## 6. Ergebnisse *Phormidium spec.*

### 6.1. Kultivierung und Ernte

Das Wachstum wurde anhand der zunehmenden Chlorophyllabsorption bestimmt (3.2.5). Abbildung 31 zeigt den Wachstumsverlauf eines der beiden Kultivierungsansätze von *P. sp.* und beinhaltet bereits den Korrekturfaktor. Es zeigte sich eine lag-Phase von ca. 5 Tagen, dann begann die exponentielle Phase, welche ca. ab dem 33. Tag in die stationäre Phase überging. Ab diesem Zeitpunkt begann die Chlorophyllabsorption und die damit assoziierte Zelldichte leicht zu sinken. Am 52. Tag wurde abgeerntet. Der zweite Kultivierungsansatz zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf, allerdings verfärbte sich nach ca. 30 Tagen das Kulturmedium leicht gelblich-bräunlich, was in den darauffolgenden Tagen immer weiter die grüne Farbe der Cyanobakterien überdeckte. Dieser Kultivierungsansatz wurde deshalb schon nach 34 Tagen abgeerntet.

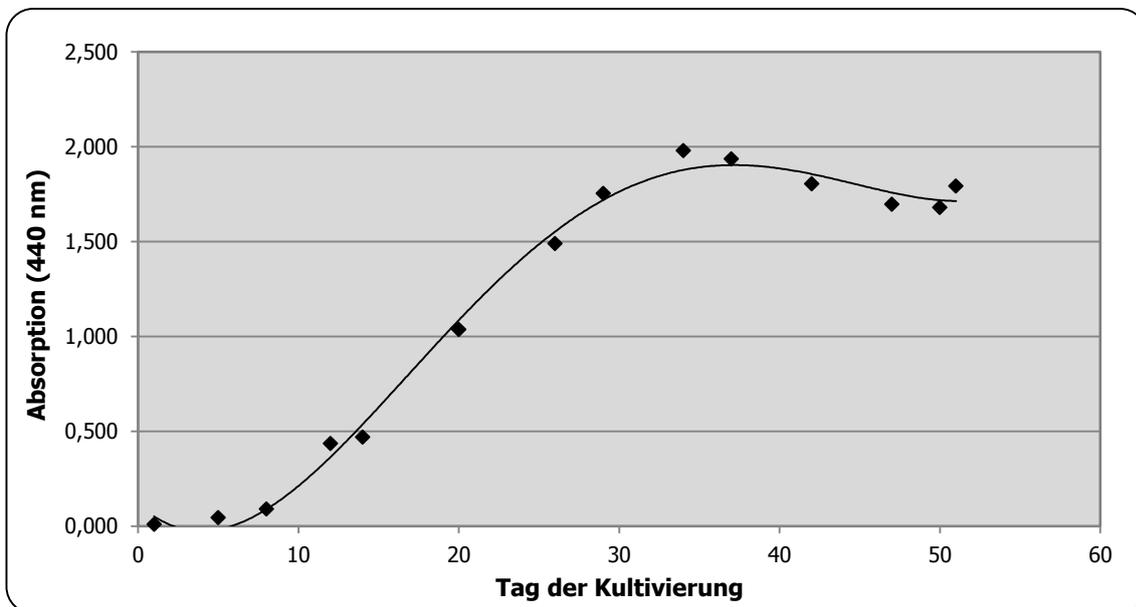


Abbildung 31: Chlorophyllabsorptionsbestimmung während der Kultivierung von *Phormidium spec.*

Als zweiter Indikator für das Wachstum diente die Überprüfung des Kulturmediums auf Kohlenhydrate nach Dubois et al. (3.2.5). Die Kurve der EPS-Konzentration (Abbildung 32) zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die Zelldichtebestimmung.

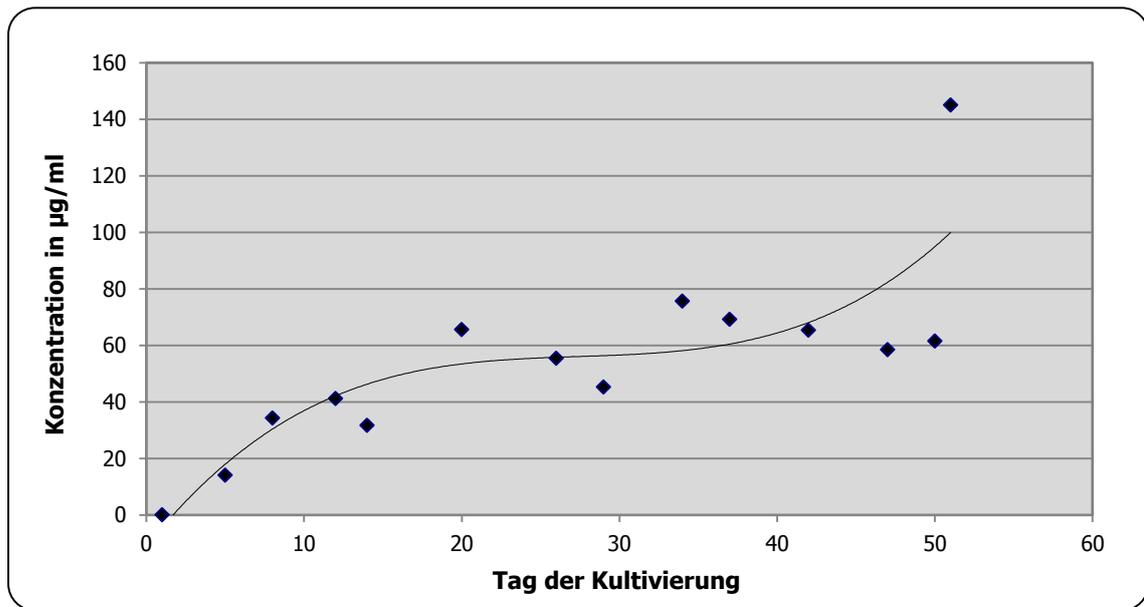


Abbildung 32: Bestimmung des Kohlenhydratanteils nach Dubois während der Kultivierung von *Phormidium spec.*

Aufgrund der starken Agglomerations-tendenz der *P. sp.*-Zellen wurde noch das Sedimentationsvolumen der gezogenen Proben ab dem Tag 8 bestimmt (Abbildung 33). Diese Methode zeigte allerdings keine auswertbaren Kurvenverläufe.

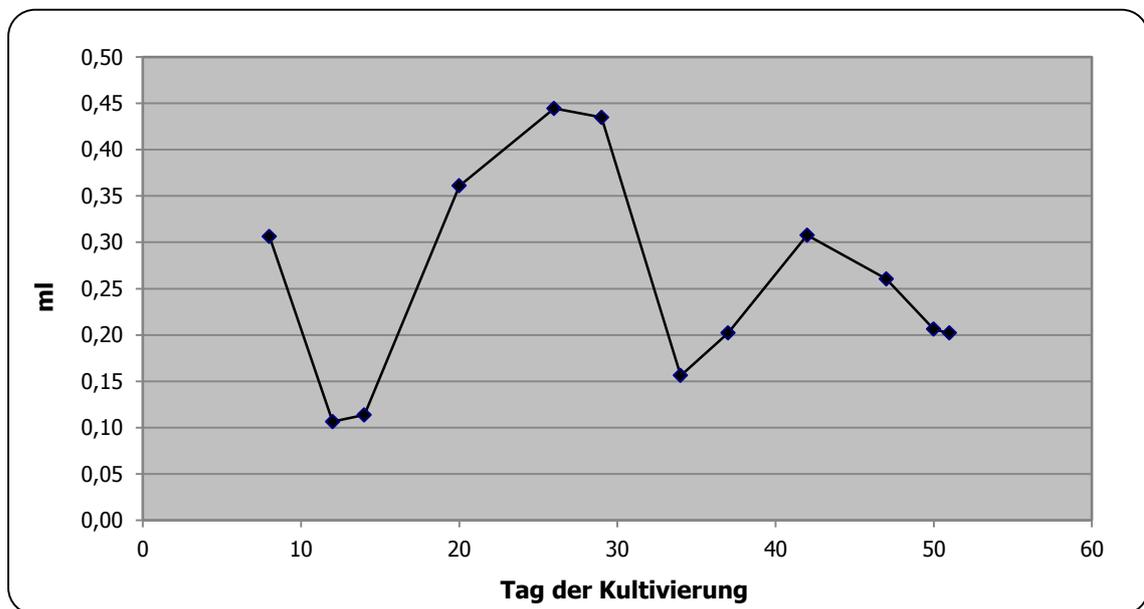


Abbildung 33: Sedimentationsvolumen der 10 ml-Proben

Zum Zeitpunkt des Aberntens waren bei Kultivierungsansatz 1 6,1 l Kulturmedium, bei Kultivierungsansatz 2 noch 6,6 l Medium vorhanden. Die Biomasse bzw. Zelldichte war ähnlich, genau wie die EPS-Ausbeuten. Der Proteingehalt des vorher abgeernteten Ansatzes lag allerdings höher (Tabelle 17).

<b>Kultivierungsansatz</b>	<b>Biomasse (g/l)</b>	<b>Protein (mg/l)</b>	<b>EPS-Ausbeute (mg/l)</b>
<b>1</b> (Kultivierungsdauer 52 Tage)	1,07	130,4	54,8
<b>2</b> (Kultivierungsdauer 34 Tage)	0,98	154,8	55,3

Tabelle 17: Ausbeuten der Kultivierung von *Phormidium spec.*

Es ließ sich während der Kultivierung eine pH-Wert-Änderung feststellen. Der pH-Wert stieg ausgehend von pH 7,1 (pH des Mediums) an und pendelte sich nach ca. 20 Tagen bei pH 10,3 ein.

## 6.2. Polysaccharidanalytik

### 6.2.1. Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung

Die Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung erfolgte durch Acetylierung mit anschließender gaschromatographischer und massenspektrometrischer Untersuchung (3.4.1). Die Analyse ergab das in Abbildung 34 dargestellte GC-Chromatogramm. Den Hauptzucker der EPS von *P. sp.* stellte Glucose mit 39,1%, die zweitgrößte Komponente war der 6-Desoxyzucker Rhamnose mit 19,1%. Darauf folgten Mannose und Galactose mit 17,0% und 15,3%. Die Desoxyhexose Fucose und die Pentosen Arabinose und Xylose waren nur zum kleinen Anteil enthalten (3,1%, 4,5% und 1,9%) (Abbildung 35).

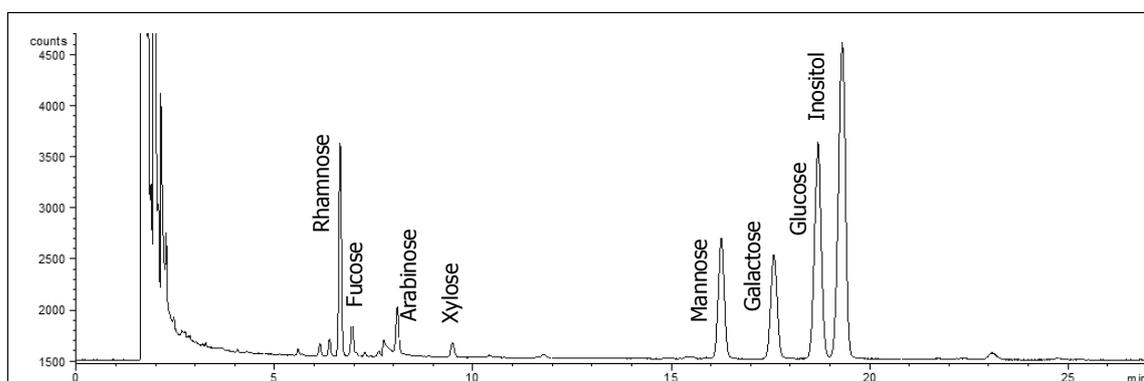


Abbildung 34: GC-Chromatogramm der acetylierten EPS von *Phormidium spec.*

Wie in Abbildung 34 zu sehen, waren noch weitere kleine Peaks im Chromatogramm zu erkennen. Diese wurden jeweils als unter 1% bestimmt und machten von der Gesamtmasse nur einen sehr kleinen Teil aus. Daher wurden sie nicht weiter untersucht.

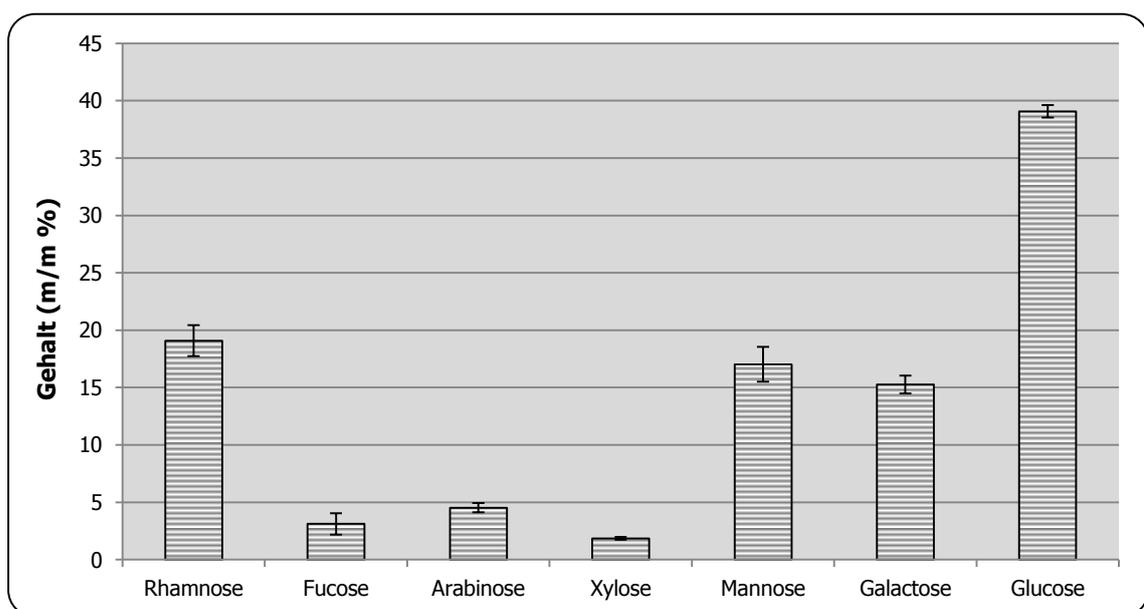


Abbildung 35: Neutralzuckerzusammensetzung der EPS von *Phormidium spec.*

Die Ausbeute der Acetylierungsanalysen, ermittelt mithilfe des internen Standards Inositol, betrug im Durchschnitt  $52,9\% \pm 6,1\%$ .

### **6.2.2. Quantitative Bestimmung von Uronsäuren**

Die Bestimmung des Uronsäuregehalts (3.4.2) in den EPS wurde nach Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) durchgeführt. Hierbei ergab sich ein Gehalt von  $11,2\% \pm 1,9\%$ . Die modifizierte Durchführung durch Zugabe von Sulfaminsäure zur Unterdrückung der Braunfärbung der Neutralzucker zeigte ein etwas niedrigeres Ergebnis von  $7,0\% \pm 2,7\%$ . Ein geringer Einfluss der Neutralzuckerfärbung ließ sich also erkennen.

### **6.2.3. Sulfatgehalt**

Die Testung auf Sulfat erfolgte nach 2 verschiedenen Methoden (3.4.3). Bei der Elementaranalyse wurde der Schwefelgehalt der EPS bestimmt. Die konduktometrische Titration erfasste alle sauren funktionellen Gruppen, welche sich theoretisch durch unterschiedliche Wendepunkte unterscheiden ließen.

Der anhand der Ergebnisse der Elementaranalyse berechnete Sulfatgehalt lag bei 1,5%. Die konduktometrische Bestimmung hingegen ergab einen Sulfatgehalt von  $4,8\% \pm 0,3\%$ . Durch Einberechnung des Molekulargewichtsdurchschnitts aus der Neutralzucker- und Uronsäurebestimmung konnte für den Gehalt von 4,8% ein Sulfatierungsgrad (DS, Degree of Sulphation) von  $0,12 \pm 0,01$  ermittelt werden (Casu & Gennaro, 1975). Legte man den aus der Elementaranalyse ermittelten Wert zugrunde, ergab sich ein DS von 0,03.

### **6.2.4. Acetatgehalt**

Die Bestimmung des Acetatgehalts (2.4.4) erfolgte zunächst ohne Hydrolyse. Auf diese Weise war kein Acetat nachzuweisen. Nach vorheriger Hydrolyse mit 2 N TFA ergab sich ein Gehalt von 9,1% Acetat.

### **6.2.5. Pyruvatgehalt**

Die Bestimmung von Pyruvat (3.4.5) ergab einen Gehalt von  $0,6\% \pm 0,1\%$ .

### **6.2.6. Oxalsäurehydrolyse**

Die erhaltenen Fraktionen nach Oxalsäurebehandlung wurden hinsichtlich der Ausbeuten und der Neutralzuckerzusammensetzung untersucht (3.4.6.). Außerdem wurde das hydrodynamische Volumen per GPC bestimmt (3.5.1).

Die Ausbeuten sind in Tabelle 18 dargestellt. Die Gesamtausbeute bezogen auf die Einwaage betrug 74,6%. Der Anteil an ungelösten Bestandteilen lag bei 20,6%. Der Überstand und die hochmolekulare Fällung lagen zu gleichen Anteilen von ca. 40% vor.

	<b>Ungelöste Bestandteile*</b>	<b>Überstand*</b>	<b>Rückstand nach Ausfällen*</b>	<b>Gesamtausbeute**</b>
<b>1</b>	18,7	34,5	46,8	70,1
<b>2</b>	22,5	45,7	31,9	79,1
$\bar{x}$	20,6	40,1	39,4	74,6

Tabelle 18: Ausbeuten der Fraktionen der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *Phormidium spec.*, Angaben in m/m %

\*= Ausbeuten bezogen auf die Gesamtausbeute

\*\*= Gesamtausbeute bezogen auf die Einwaage

Bei der Neutralzuckerbestimmung zeigte sich, dass der hochmolekulare Rückstand hauptsächlich aus den Hexosen Glucose, Mannose, Galactose und der Desoxyhexose Rhamnose bestand. Diese machten insgesamt 97% der Zuckerbestandteile aus (Abbildung 36). Die Neutralzuckerzusammensetzung der ungelösten Bestandteile entsprach in etwa der Neutralzuckerzusammensetzung der totalen EPS von *P. sp.*. Das Verhältnis von Pentosen zu Hexosen war beim Überstand ähnlich wie bei den ungelösten Bestandteilen, jedoch verschob sich das Hexosen-Muster zugunsten von Galactose und Rhamnose.

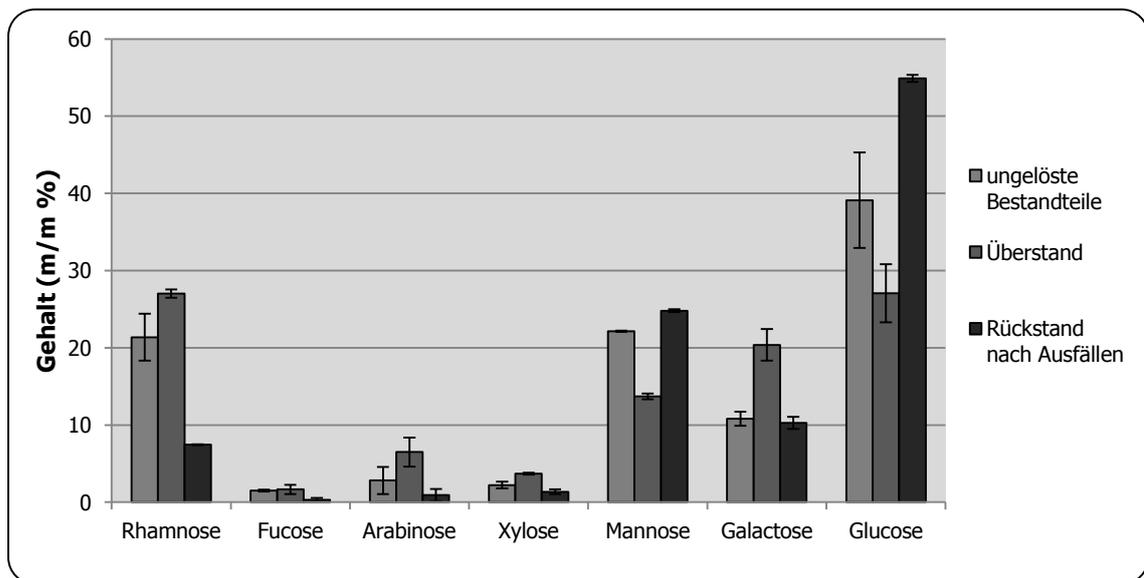


Abbildung 36: Neutralzuckerzusammensetzung der Fraktionen der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *Phormidium spec.* (n=2)

Der Überstand nach der Ethanol-fällung wurde zusätzlich auf die Neutralzuckerzusammensetzung ohne den vorhergehenden Hydrolyseschritt hin untersucht. Auf diese Weise konnten frei

vorliegende Monosaccharide und die Zusammensetzung des gesamten Überstandes differenziert betrachtet werden (Abbildung 37). Es zeigte sich, dass fast sämtliche Arabinosen, die in den totalen EPS enthalten waren, durch die Oxalsäurehydrolyse abgespalten wurden und als freie Monosaccharide im Überstand vorlagen. Im hydrolysierten Überstand dominierten hingegen die Hexosen.

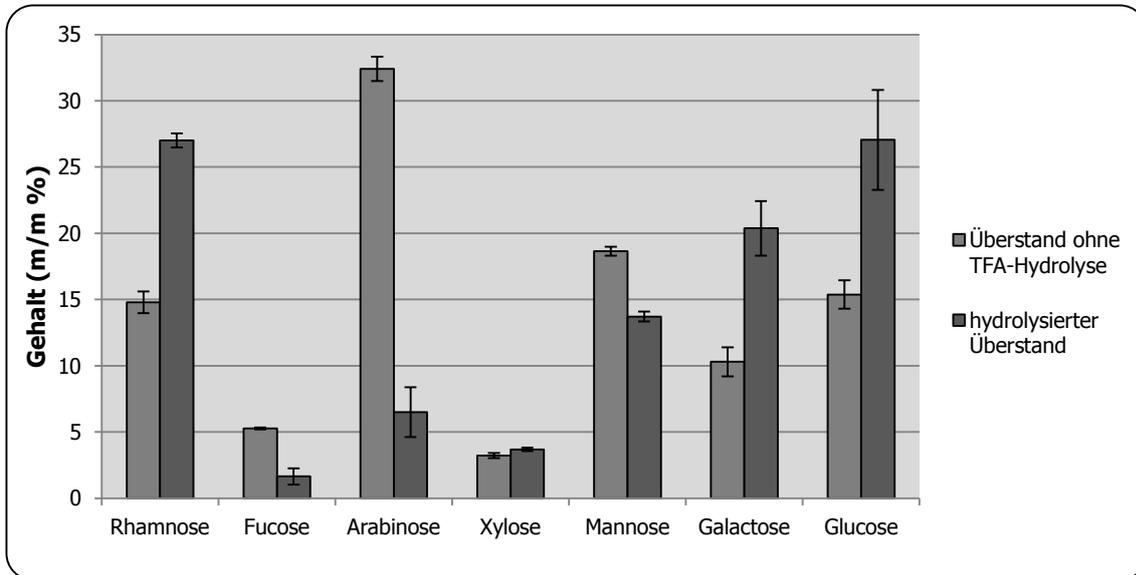


Abbildung 37: Neutralzuckerzusammensetzung des nicht-hydrolysierten und des hydrolysierten Überstandes der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *Phormidium spec.* (n=2)

Die Acetylierungsausbeuten betragen für die unlöslichen Bestandteile  $37,1\% \pm 11,2\%$ , für den Überstand  $81,6\% \pm 15,2\%$  und für den Rückstand nach Ausfällen  $83,3\% \pm 4,7\%$ .

Die gelpermeationschromatographische Untersuchung ergab für die wieder in Lösung gebrachte Fraktion der ungelösten Bestandteile einen Peak mit einem hydrodynamischen Volumen von 2,4 kDa. Der Überstand zeigte 2 Peaks mit 6,8 kDa und 3,8 kDa. Die Fraktion des Rückstands nach Ausfällen resultierte in 2 Peaks mit den hydrodynamischen Volumina von 1,965 kDa und 2,5 kDa (jeweils n=1). Die absoluten Molekulargewichte konnten nicht mit der erforderlichen Genauigkeit bestimmt werden.

### 6.2.7. Uronsäurereduktion

Die zuvor desulfatierten EPS (3.4.7) wurden mit  $\text{NaBD}_4$  uronsäurereduziert (3.4.8) und anschließend auf ihre Neutralzuckerzusammensetzung (3.4.1) hin untersucht. Es zeigte sich ein starker Abfall an Glucose um ca. 13%; der Anteil an Galactose und Xylose stieg deutlich an.

Die Ausbeute der Acetylierungsanalyse betrug 71,3%.

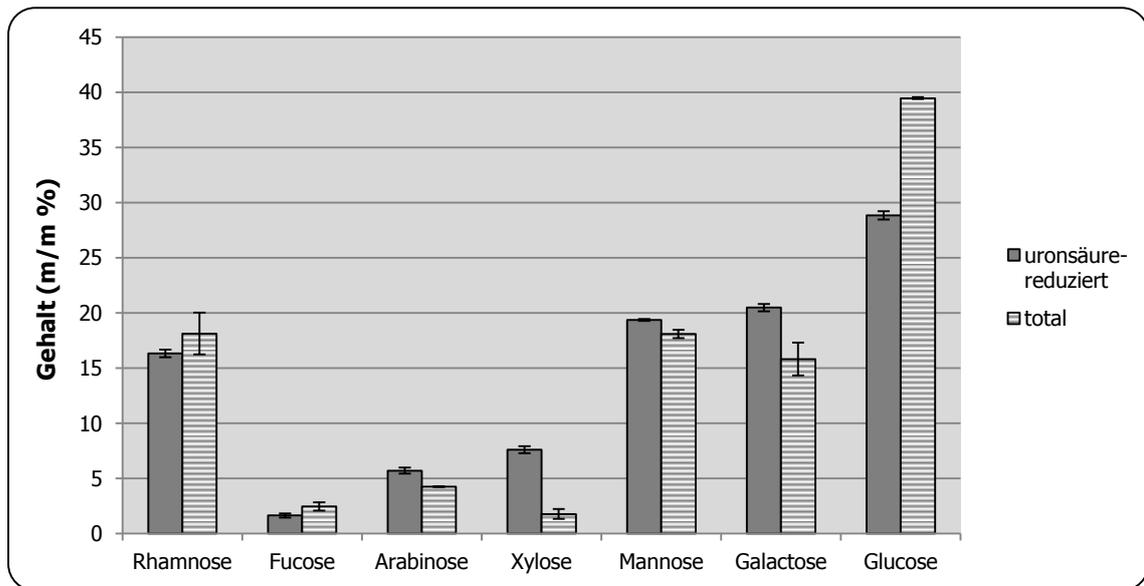


Abbildung 38: Neutralzuckerzusammensetzung der uronsäurereduzierten EPS im Vergleich mit den totalen EPS von *Phormidium spec.*

### 6.2.8. Analyse der Bindungstypen

Die Bindungstypanalyse wurde mit 2 leicht unterschiedlichen Methoden durchgeführt: zum einen mit Dimsyl-Lösung (3.4.9.1) und zum anderen mit NaOH (3.4.9.2) als starke Base zur Aktivierung der Alkoholfunktionen der Zucker.

Abbildung 39 zeigt die erhaltenen Chromatogramme der anschließenden gaschromatographischen Untersuchung. Beide Chromatogramme ergeben ein ähnliches Bild.

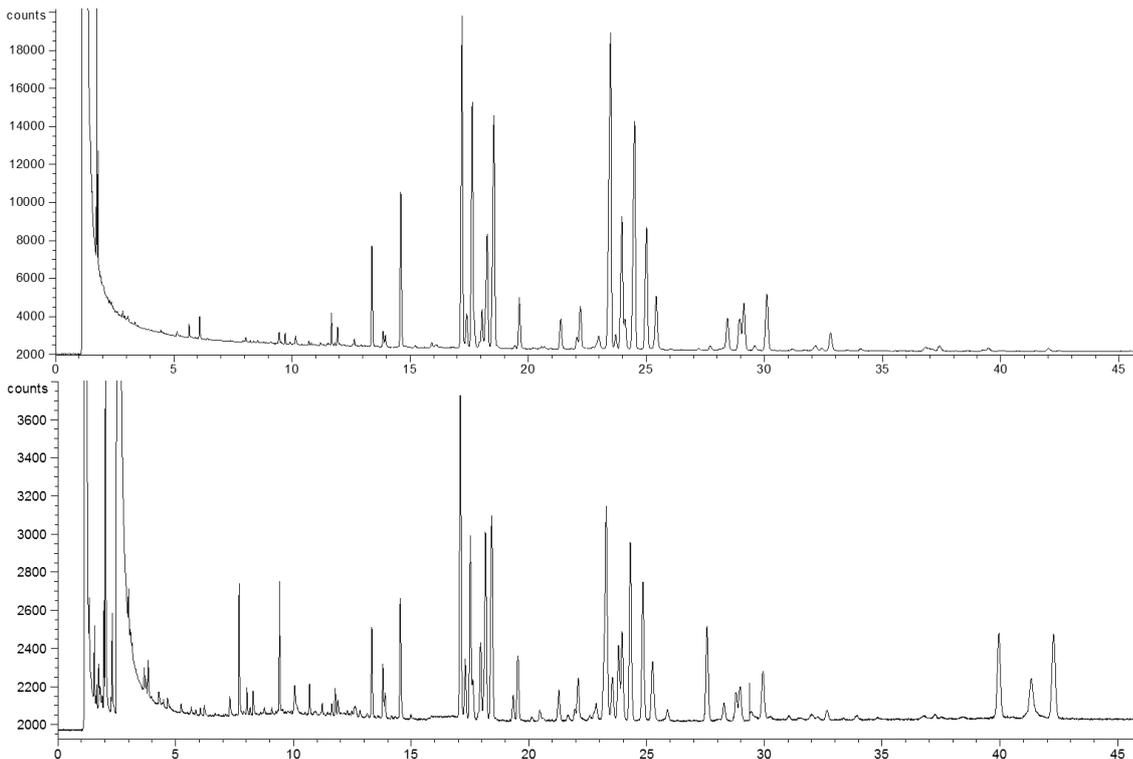


Abbildung 39: GC-FID-Chromatogramme der methylierten EPS von *Phormidium spec.*  
oben: nach Dimsyl-Methode, unten: nach NaOH-Methode

Nach der qualitativen und quantitativen Auswertung ergab sich folgende Zusammensetzung des EPS (Tabelle 19). Es konnten insgesamt 25 verschiedene Zucker bzw. Bindungstypen bestimmt werden; die Zusammensetzung bei den zwei verschiedenen Methylierungsmethoden ähnelte sich. Durch die Vielzahl an Zuckern waren die jeweiligen Anteile gering. Die Hauptzucker bei der Dimsyl-Methode waren 1,4-Galactose (13,3%), 1,3-Fucose (11,1%), 1,2-Rhamnose (13,3%) und terminale Glucose (11,5%). Alle anderen Zucker lagen deutlich unter 10%. Bei der NaOH-Methode ergab sich ein ähnliches Bild. Hier gehörte allerdings auch 1,3-Galactose mit einem Anteil von 10,8% zu den Hauptzuckern. Alle Monosaccharide lagen in pyranosidischer Form vor.

Die laut Bestimmung nach Blumenkrantz (3.4.2) zu durchschnittlich 9% enthaltenen Uronsäuren (6.2.2) ließen sich nur in Spuren nachweisen. Sie wurden in der Probenvorbereitung deuteriert und zu den entsprechenden Zuckern reduziert. Die TIC-Spektren von 1-Glucose, 1-Galactose, 1,3-Galactose, 1,4-Glucose und 1,3,4-Galactose zeigten kleine Anteile an deuterierten Peaks. Eine quantitative Bestimmung war hieraus aber nicht möglich.

Bei der Aktivierung mit NaOH ließ sich ein Anteil von untermethylierten Zuckern nachweisen.

<b>Bindungstyp (<math>\rho</math>)</b>	<b>Dimethyl- Methode</b>	<b>NaOH- Methode</b>
<b>1-Ara</b>	0,4	0,5
<b>1-Fuc</b>	4,8	2,9
<b>1-Gal</b>	2,1	2,1
<b>1-Glc</b>	11,5	8,0
<b>1-Rha</b>	2,7	1,9
<b>1,2-Rha</b>	13,3	10,0
<b>1,2-Xyl</b>	5,3	6,2
<b>1,3-Fuc</b>	11,1	5,9
<b>1,3-Gal</b>	1,8	10,8
<b>1,3-Man</b>	7,1	3,2
<b>1,4-Gal</b>	13,3	7,7
<b>1,4-Glc</b>	7,2	6,2
<b>1,4-Man</b>	1,5	3,7
<b>1,6-Gal</b>	0,3	4,6
<b>1,6-Man</b>	3,3	3,1
<b>1,2,3-Fuc</b>	1,6	1,3
<b>1,2,4-Rha</b>	2,3	1,7
<b>1,2,6-Glc</b>	3,9	2,7
<b>1,3,4-Ara</b>	1,0	0,5
<b>1,3,4-Fuc</b>	0,1	0,3
<b>1,3,4-Gal</b>	2,3	0,9
<b>1,3,4-Man</b>	2,2	1,5
<b>1,3,6-Gal</b>	0,2	0,5
<b>1,3,6-Glc</b>	0,1	0,3
<b>1,4,6-Glc</b>	0,5	0,4
<b>Hexa-Ac-Gal</b>	0,0	2,9
<b>Hexa-Ac-Glc</b>	0,0	5,3
<b>Hexa-Ac-Man</b>	0,0	4,8
<b><math>\Sigma</math> terminal</b>	21,5	15,4
<b><math>\Sigma</math> zweifach-verknüpft</b>	61,1	61,4
<b><math>\Sigma</math> dreifach-verknüpft</b>	14,4	10,1

Tabelle 19: Vergleich der Methylierungsergebnisse der EPS von *Phormidium spec.*,

Angaben in m/m %

Insgesamt zeigte sich, dass das Polysaccharid überwiegend aus linearen Zuckern mit einer Vielzahl von Bindungstypen und einem geringen Anteil an dreifach-verknüpften Zuckern aufgebaut war.

Addierte man jeweils alle Bindungstypen eines Monomers einer Methylierungsmethode, so zeigten sich im Vergleich zur Neutralzuckerzusammensetzung der unbehandelten EPS (6.2.1) teilweise stark abweichende Ergebnisse (Tabelle 20). Es wurde ein zu hoher Anteil an Fucose detektiert, auch der Anteil an Galactose lag bei der NaOH-Methode erhöht. Außerdem konnte Glucose nicht in entsprechenden Mengen detektiert werden.

	<b>Dimethyl- Methode</b>	<b>NaOH- Methode</b>	<b>Neutralzucker</b>
<b>Rhamnose</b>	18,4	14,5	19,1
<b>Fucose</b>	17,7	11,1	3,1
<b>Arabinose</b>	1,4	1,1	4,5
<b>Xylose</b>	5,3	6,6	1,9
<b>Mannose</b>	14,2	15,9	17,0
<b>Galactose</b>	19,9	30,1	15,3
<b>Glucose</b>	23,2	20,8	39,1

Tabelle 20: Vergleich der Gesamtzuckerzusammensetzungen der EPS von *Phormidium spec.* nach verschiedenen Methylierungsmethoden mit der Neutralzuckerzusammensetzung

## 6.3. Chromatographische Methoden

### 6.3.1. Gelpermeationschromatographie

Die Bestimmung des Molekulargewichts wurde mithilfe der GPC durchgeführt (3.5.1). Es ergab sich folgendes Chromatogramm (Abbildung 40):

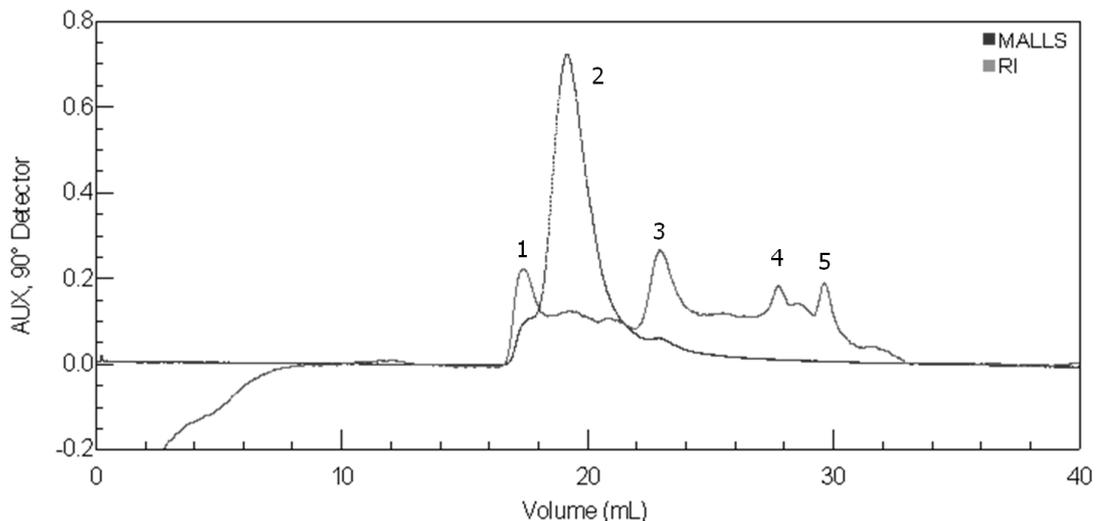


Abbildung 40: GPC-Chromatogramm der EPS von *Phormidium spec.*

Es waren 5 Peaks zu erkennen. Peak 1 zeigte ein absolutes MW von 1.053 kDa und ein hV von 4.785 kDa. Peak 2 hatte ein absolutes MW von 3.018 kDa und ein hV von 774 kDa. Die Werte für das hydrodynamische Volumen lagen allerdings beide außerhalb der Kalibrierung und wurden extrapoliert. Peak 3 wurde mit einem MW von 190 kDa und einem hV von 77 kDa bestimmt. Peak 4 und 5 zeigten absolute Molekulargewichte von 76 kDa und 55 kDa. Die zugehörigen hydrodynamischen Volumina waren 4,3 kDa und 2,2 kDa.

	Molekulargewicht (kDa)		Hydrodyn. Volumen (kDa)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
<b>Peak 1</b>	1.053	156,8	4.785	2.102
<b>Peak 2</b>	3.018	1.883	774,0	59,4
<b>Peak 3</b>	190,9	48,1	76,8	12,5
<b>Peak 4</b>	76,1	20,3	4,3	1,0
<b>Peak 5</b>	55,3	15,7	2,2	0,4

Tabelle 21: Ergebnisse der GPC-Messungen der EPS von *Phormidium spec.*

### 6.3.2. Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie (IEC) wurden die EPS durch Elution mit verschiedenen konzentrierten NaCl-Lösungen nach Ladung fraktioniert und diese anschließend auf ihren Kohlenhydratgehalt hin untersucht (3.5.2.). Es kristallisierten sich 2 Hauptfraktionen heraus (Abbildung 41). Die erste Fraktion (F1) eluierte mit Aqua bidest., die zweite (F2) folgte nach Elution mit 0,5 M NaCl.

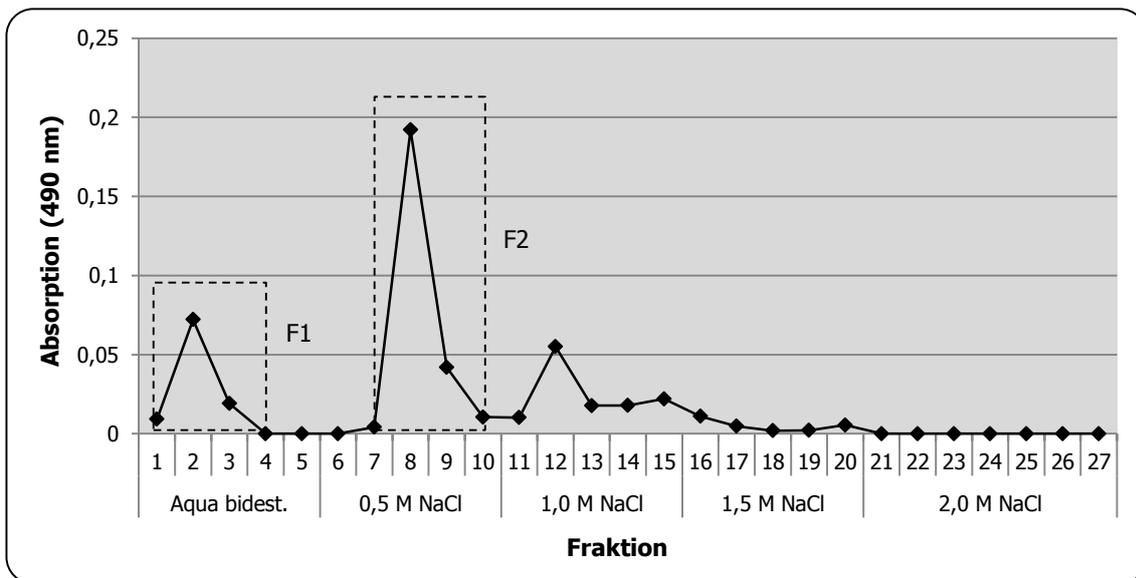


Abbildung 41: Kohlenhydratgehalt im Verlauf der IEC-Fraktionierung der EPS von *Phormidium spec.*

Die Gesamtausbeute der vereinigten Fraktionen nach Dialyse und Lyophilisation von 10 Fraktionierungsläufen betrug 43,4% der eingesetzten EPS-Menge. F1 machte davon 17,5% aus. Den größten Anteil hatte F2 mit 82,5%. Die vermeintlich 3. Fraktion, die sich in Abbildung 41 erkennen ließ, ergab nach der Gefriertrocknung jedoch keinerlei Ausbeute und konnte deswegen nicht weiter untersucht werden.

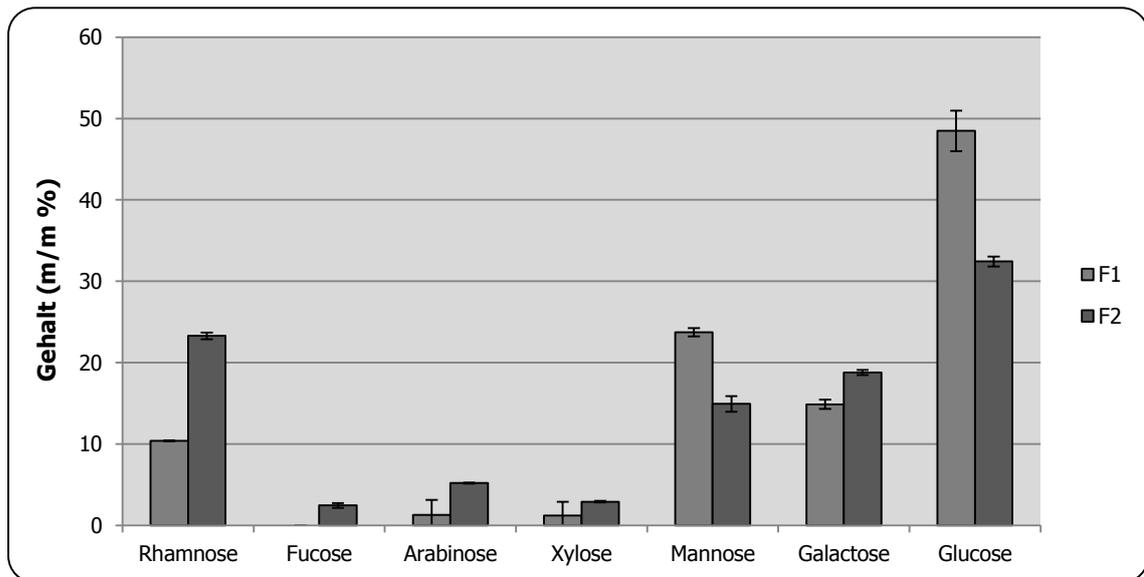


Abbildung 42: Neutralzuckerzusammensetzung der IEC-Fractionen der EPS von *Phormidium spec.*

Bei der Bestimmung der Neutralzucker der beiden Fraktionen zeigte sich eine unterschiedliche Zusammensetzung (Abbildung 42). Bei beiden war der dominierende Zucker Glc, allerdings machte dieser bei F1 fast 50% aus, bei F2 jedoch nur knapp ein Drittel. Besonders im Rha-Anteil unterschieden sich F1 und F2 stark. Insgesamt entsprach F2 der Neutralzuckerzusammensetzung der totalen EPS von *P. sp.* (Abbildung 35).

Die elementaranalytische Untersuchung ergab für F2 einen Sulfatgehalt von 2,4% und einen Proteingehalt von 11,5%. F1 zeigte eine zu geringe Ausbeute und konnte nicht untersucht werden.

Bei der gelpermeationschromatographischen Auftrennung zeigte F1 4 Peaks. Diese hatten hydrodynamische Volumina von  $2.581 \text{ kDa} \pm 1.086 \text{ kDa}$ ,  $61,7 \text{ kDa} \pm 28,8 \text{ kDa}$ ,  $3,2 \text{ kDa} \pm 1,5 \text{ kDa}$  und  $1,7 \text{ kDa} \pm 0,9 \text{ kDa}$ . F2 zeigte 3 Peaks mit den hydrodynamischen Volumina von  $3.725 \text{ kDa} \pm 1.819 \text{ kDa}$ ,  $651,6 \text{ kDa} \pm 244,2 \text{ kDa}$  und  $66,2 \text{ kDa} \pm 30,5 \text{ kDa}$  (jeweils  $n=2$ ). Die absoluten Molekulargewichte konnten nicht mit der erforderlichen Genauigkeit bestimmt werden.

## 6.4. Proteinanalytik

### 6.4.1. Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte nach drei verschiedenen Methoden: nach Bradford mit Coomassie-Reagenz (2.6.1.2), nach Starcher mit Ninhydrin (2.6.1.3) und anhand der Ergebnisse der Elementaranalyse (2.6.1.1). Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse. Die Bestimmung mit Coomassie-Reagenz ergab den kleinsten Proteinanteil von nur 3,4%. Die Elementaranalyse und die Bestimmung mittels Ninhydrin zeigten ca. 3- bis 4-fach höhere, aber weitgehend übereinstimmende Werte, wobei die Elementaranalyse das höchste Ergebnis zeigte.

Bestimmung mittels:	Coomassie	Ninhydrin	Elementaranalyse
Proteingehalt (m/m %)	3,39	10,55	12,9

Tabelle 22: Proteingehalt in EPS von *Phormidium spec.*

### 6.4.2. Proteinzusammensetzung

Die Zusammensetzung der Aminosäuren des Proteinteils der EPS wurde mittels HPLC und vorhergehender saurer Hydrolyse bestimmt (3.6.2). Diese saure Hydrolyse sorgte dafür, dass nicht zwischen Asparagin und Asparaginsäure bzw. Glutamin und Glutaminsäure unterschieden werden konnte. Sie wurden unter Asx bzw. Glx zusammengefasst.

Es ließen sich 19 unterschiedliche Aminosäuren nachweisen. Deutlich dominierend war Tyrosin mit einem Anteil von 16,8%. Histidin und Asx waren zu 11,7% und 10,5% zu finden. Mit einem Anteil zwischen 5% und 10% wurden Glx, Leucin, Phenylalanin, Threonin, Glycin, Serin und Alanin detektiert. Mit jeweils unter 5% waren Valin, Arginin, Isoleucin, Prolin und Lysin zu finden. GABA, Methionin und Cystein hatten Anteile von jeweils unter 0,5%.

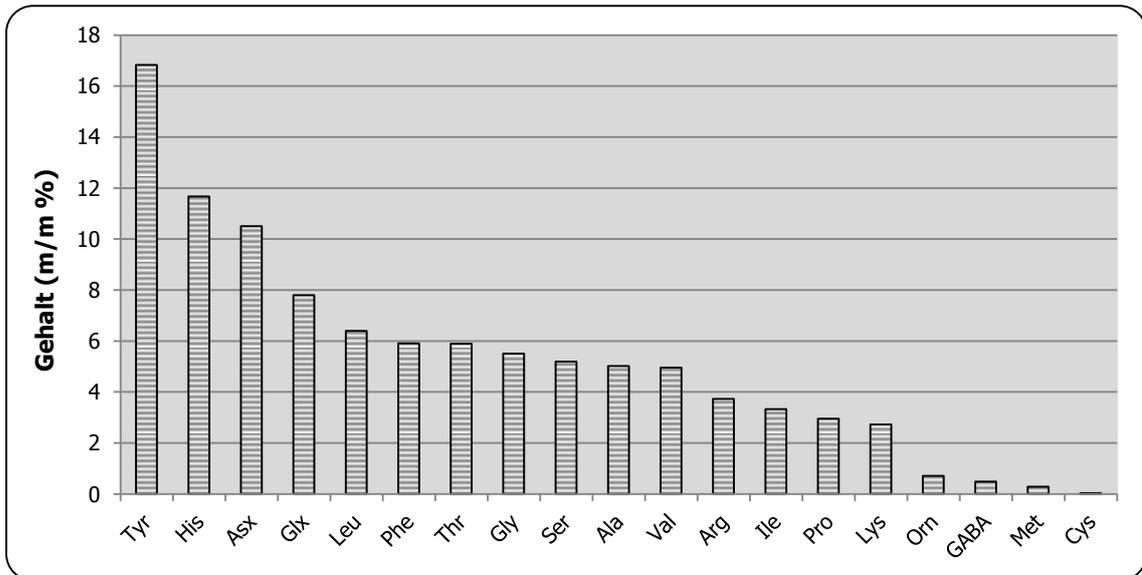


Abbildung 43: Aminosäurezusammensetzung des Proteinteils der EPS von *Phormidium spec.*

Anhand der Ergebnisse konnten Rückschlüsse auf den Proteingehalt der totalen EPS gezogen werden. Es ließen sich 3,29% Protein nachweisen.

## 6.5. Testung der biologischen Aktivität

### 6.5.1. Testung auf Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der EPS von *P. sp.* wurde mittels eines Neutralrot-Assays mit Harnblasenkarzinomzellen bestimmt (3.7.1). Die EPS erwiesen sich in den getesteten Konzentrationen als nicht toxisch, eine Dosis-Wirkung-Beziehung war jedoch zu erkennen.

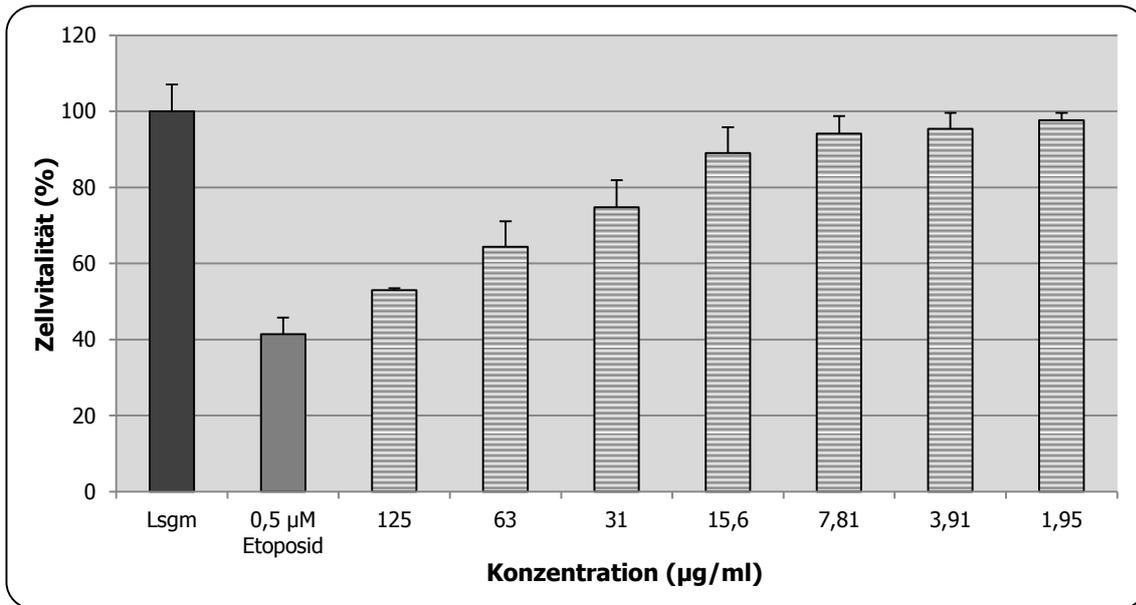


Abbildung 44: Einfluss von EPS von *Phormidium spec.* auf die Vitalität von humanen Harnblasenkarzinomzellen

### 6.5.2. Testung auf antimikrobielle Wirkung

Die antimikrobielle Wirkung der EPS von *P. sp.* auf verschiedene Mikroorganismen wurde mithilfe des Agarplattendiffusionstests bestimmt (3.7.2). Es zeigte sich bei der Testung keinerlei antibakterielle oder antifungale Aktivität der EPS.

### 6.5.3. Testung der Wirkung auf das humane Komplementsystem

Der Einfluss der EPS auf das humane Komplementsystem wurde mit ELISA-Testkits durchgeführt (3.7.3). Es konnte bei keinem der drei möglichen Aktivierungswege mit den getesteten Konzentrationen bis 500 µg/ml ein signifikanter Einfluss festgestellt werden (Abbildung 45).

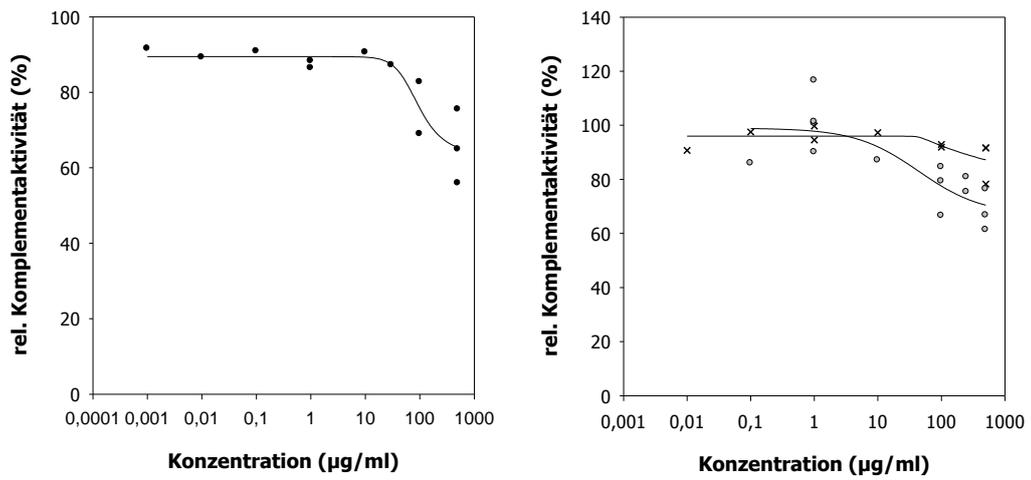


Abbildung 45: Einfluss der EPS von *Phormidium spec.* auf das Komplementsystem

links: ● klassischer Weg, rechts: ○ Lektinweg und x alternativer Weg

## 7. Diskussion

### 7.1. Kultivierung

Die untersuchten Stämme passten sich während der Kultivierung unterschiedlich schnell ans verwendete Kulturmedium an. *Phormidium spec.* zeigte eine lag-Phase von nur 5 Tagen (6.1), *Arthrospira platensis* und *Gloeotheca membranacea* brauchten 15 bzw. 20 Tage, bis ein Wachstum messbar war (4.1; 5.1). Die pH-Wert-Änderung während der Kultivierung geht mit diesen Daten einher. *P. sp.* zeigte einen schnellen Anstieg von pH 7 auf pH 8,5 innerhalb von 4 Tagen; bei *A. plat.* und *G. memb.* war dieser Anstieg erst nach 15 Tagen zu beobachten. Der pH-Wert pendelte sich je nach Stamm nach 20-40 Tagen bei 9,6 bis 10,3 ein. Eine Alkalisierung des Mediums bis pH 9-11 lässt sich auf die Reaktion von Nitrat und Wasser zu Ammoniumhydroxid zurückführen. Das alkalische Medium bietet dabei ungünstige Wachstumsbedingungen für viele andere Organismen (Ducat et al., 2011). Cyanobakterien scheinen also zunächst optimale Bedingungen zu schaffen, bevor das Wachstum exponentiell ansteigt. Bei einem Kultivierungsansatz von *P. sp.* zeigte sich nach ca. 30 Tagen eine leichte Gelb-Braunfärbung. Auch die Erhaltungskulturen von *P. sp.* wiesen diese Verfärbung, allerdings erst nach ca. 5-6 Monaten, auf. Eine weitergehende Beobachtung zeigte nach weiteren 1-2 Monaten eine stetige Aufhellung der Erhaltungskultur, welche sich anschließend nach Umsetzen in frisches Medium nicht mehr regenerierte. Eine mögliche Erklärung findet sich bei Ortega-Calvo & Stal, 1994. Hier ist von einer gelblichen Verfärbungen mit anschließendem Ausbleichen durch Abbau von Phycobiliproteinen aufgrund von Stickstoffmangel die Rede.

Besonders die Zellen von *P. sp.* zeigten eine besonders hohe Agglomerationstendenz. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zur Chlorophyllabsorptionsmessung auch das Sedimentationsvolumen der gezogenen Proben bestimmt. Dieser Kurvenverlauf zeigte jedoch keine auswertbaren Ergebnisse (Abbildung 33). Ein möglicher Grund dafür könnte eine unregelmäßige Agglomeration der Zellen sein. Ein Problem bei der Probenziehung dagegen schien es nicht gegeben zu haben, da die korrespondierende Chlorophyllmessung einen klaren Kurvenverlauf ergab (Abbildung 31).

Die Kultivierung der Stämme in NLDSN-10-Medium zeigte unterschiedliche Ausbeuten an Biomasse und EPS. Auch bei den zwei Parallelansätzen der Kultivierung eines Stammes ergaben sich teilweise deutliche Unterschiede, obwohl Medium, Beimpfungsmenge und Beleuchtung gleich waren. Lediglich bei der Temperatur gab es leichte Unterschiede, da die 2 Kultivierungsflaschen eines Stammes jeweils durch einen Raumteiler getrennt standen. Im Bereich der Kulturflaschen mit den niedrigeren Ausbeuten war es durchschnittlich ca. 1°C kälter. Der eine Kultivierungsansatz von *A. plat.* ergab die höchste durchschnittliche Biomasseproduktion von 53,5 mg/(l\*d), gefolgt von einer Kultur von *G. memb.* mit

43,6 mg/(l\*d). Der jeweils andere Kultivierungsansatz zeigte deutlich schlechtere Biomasseproduktionen mit 21,6 (*A. plat.*) und 18,7 mg/(l\*d) (*G. memb.*). Die beiden Ansätze von *P. sp.* zeigten einander ähnelnde Biomasseproduktionsmengen von 21,0 und 28,7 mg/(l\*d). Die maximale tägliche Produktion von EPS ließ sich bei einer der Kulturen von *G. memb.* mit 2,33 mg/(l\*d) ausmachen. Bei *A. plat.* betrug diese 1,87 mg/(l\*d) und bei *P. sp.* 1,61 mg/(l\*d). Vergleicht man diese Ergebnisse mit Literaturdaten, so zeigen sich teilweise deutliche Unterschiede. So wurden von Trabelsi et al. (2009) für *A. plat.* maximale Produktionsraten von 150 mg/(l\*d) für die Biomasse und von 46,3 mg/(l\*d) für die EPS publiziert. Bei Raoof et al. (2006) ist sogar von 582 mg/(l\*d) für die Biomasseproduktion die Rede. Hierbei gilt es allerdings zu beachten, dass diese Werte durch Kultivierung in Zarrouk-Medium, dem Standard-Medium für *Arthrospira*-Arten (Becker et al., 1994), generiert wurden. In dieser Arbeit wurde zur Kultivierung ein kostengünstigeres, standardisiertes Meerwasser-Medium verwendet, abgewandelt von Pohl et al. (1987). Für *Gloeotheca*-Arten lassen sich nur wenige Daten zur Biomasseproduktion finden. Für *Gloeotheca sp.* PCC 6909 wird zur Biomasseausbeute ein Wert von maximal 0,88 g/l (Ortega-Calvo & Stal, 1994), für *Gloeotheca membranacea* CCAP 1430/3 eine Produktionsrate von maximal 184 mg/(l\*d) angegeben (Mohsenpour & Willoughby, 2013). Die in dieser Arbeit gefundenen Werte von 1,03 bis 2,37 g/l bzw. maximal 43,6 mg/(l\*d) sind deutlich unterschiedlich. Allerdings stammen die Daten vom Ortega-Calvo & Stal aus einer Untersuchung zu sulfat-limitiertem Wachstum des Stammes und die Daten von Mohsenpour & Willoughby aus einer Wachstumsuntersuchung mit optimalen Bedingungen in Blasensäulenphotobioreaktoren unter Rotlicht. Auch wurde jeweils das für *Gloeotheca*-Arten angegebene Standardmedium BG11 verwendet. Daten zum Vergleich der EPS-Produktionsrate ließen sich nicht finden. Die für *Phormidium*-Arten in der Literatur angegebenen Werte für die Biomasseproduktion konnten mit einer Produktion von ca. 1 g/l nicht erreicht werden. Für *Phormidium tenue* wird eine Produktivität von 2,48 g/l (Nagle et al., 2010), für *Phormidium sp.* von 2,0 g/l, allerdings bezogen auf das Feuchtgewicht (Nicolaus et al., 1999), beschrieben. Für die maximale EPS-Produktion lässt sich bei Nicolaus et al. der Wert von 30,0 mg/l finden. Dieser Wert wird in dieser Arbeit mit ca. 55 mg/l deutlich überschritten.

Insgesamt muss man aber sagen, dass Vergleiche mit Literaturdaten schwierig sind, da die jeweiligen Produktionen bzw. Ausbeuten sehr stark von den Kultivierungsbedingungen abhängen. Außerdem sind auch die EPS-Isolierungsverfahren nicht immer die gleichen, so dass es auch allein dadurch zu großen Unterschieden kommen kann. Zahlreiche Veröffentlichungen zeigen jedoch, dass Biomasse- und EPS-Produktionsraten durch eine Veränderung von Medium und/oder Licht stark erhöht werden können. Und auch der in dieser Arbeit beobachtete Temperaturunterschied von 1°C scheint schon große Auswirkungen zu haben. Eine mögliche Verbesserung der Produktionsraten bei den hier untersuchten Stämmen ist also naheliegend.

In dieser Arbeit ließ sich beobachten, dass die Kohlenhydrat-, und damit die EPS-Konzentration, im Medium parallel zur Biomasse anstieg. Der Schluss liegt also nahe, dass die EPS-Produktion zum Primärstoffwechsel der untersuchten Cyanobakterienstämme gehört. Für *Arthrospira platensis* ist dies schon bei Filali-Mouhim et al. (1993) beschrieben. Im Gegensatz dazu gibt es aber auch Stämme, bei denen die EPS eher als Sekundär-Metabolite beschrieben werden. Dazu gehört u.a. *Phormidium* J-1, bei dem die EPS-Konzentration im Medium erst am Ende des exponentiellen Wachstums ansteigt (Fattom & Shilo, 1984). Das gleiche Phänomen ließ sich auch bei *Cyanothece* BH68K beobachten (Reddy et al., 1996). Eine grundsätzliche Aussage, ob die EPS zum Primär- oder Sekundärstoffwechsel gehören, ist somit nicht möglich. Dies scheint teilweise sogar innerhalb einer Art und damit von Spezies zu Spezies unterschiedlich zu sein.

## 7.2. Charakterisierung der EPS

### 7.2.1. Neutralzuckerzusammensetzung

Alle in dieser Arbeit untersuchten EPS gehören zu den Heteropolysacchariden. Sie zeigen 7 oder 8 verschiedene Monomere (Abbildung 46). Bei den zwei Parallelansätzen je Kultur zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Neutralzuckerzusammensetzung der EPS, was sich anhand der recht niedrigen Standardabweichungen nachvollziehen lässt. Auch die unterschiedliche Kultivierungsdauer der beiden Ansätze von *P. sp.* ergab bezüglich der Neutralzuckerzusammensetzung keinen Unterschied. Bei verschiedenen anderen Untersuchungen zeigten sich auch nur kleine Varianzen, so dass die beiden gewonnenen EPS je Kultur als gleich betrachtet werden. Bei *A. plat.* (4.2.1) und *P. sp.* (6.2.1) kristallisiert sich Glucose als Hauptmonomer heraus, was typisch für Cyanobakterien ist (Pereira et al., 2009). Es wurden bei Pereira et al. aber auch EPS beschrieben, die ein anderes Monosaccharid als Hauptzucker aufwiesen. Dieses trifft für *G. memb.* mit Galactose zu (5.2.1).

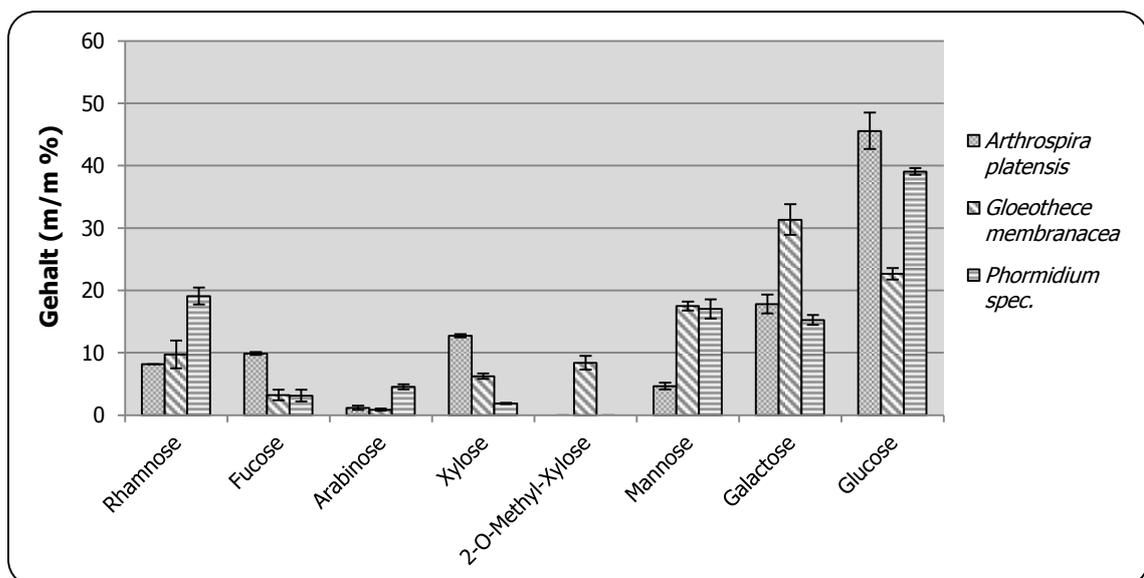


Abbildung 46: Übersicht der Neutralzuckerzusammensetzungen der EPS der untersuchten Stämme

Als Referenzdaten für die Neutralzuckerzusammensetzung der EPS von *Arthrospira platensis* finden sich verschiedene Werte in der Literatur. Hier fällt zunächst auf, dass in der Regel nicht Glucose der Hauptzucker ist, sondern Mannose (Angelis et al., 2012), Galactose (Trabelsi et al., 2009) oder Galactose und Glucose zu gleichen Teilen (Filali-Mouhim et al., 1993). Der größte Unterschied findet sich allerdings für die angegebenen Mannose-Anteile. Bei Trabelsi et al. und Filali-Mouhim et al. wird von 0,3% bzw. Spuren gesprochen, bei Angelis et al. hingegen von 25,3%. Bei den beiden erstgenannten Literaturstellen ist allerdings der Uronsäuregehalt schon in die Berechnung der Monomerenanteile eingeflossen. Bezieht man diesen (4.2.2) in den eigens ermittelten Mannose-Gehalt ein, erhält man einen Anteil von 3,5% Mannose, der eher

den erstgenannten Literaturstellen entspricht. Eine weitere Diskrepanz zeigt sich auf, wenn man die angegebenen Verhältnisse von Galactose und Glucose vergleicht. Bei den Arbeitsgruppen um Trabelsi und Filali-Mouhim wird ein Verhältnis von 1:1 genannt. Bei Angelis et al. findet man ein Verhältnis von 1:1,5; die in dieser Arbeit ermittelten Werte ergeben ein Verhältnis von 1:2,5. Die weiteren gefundenen Werte für die Neutralzuckerzusammensetzung stimmen aber, mit kleineren Varianzen, mit den Literaturdaten überein. Größere Abweichungen finden sich hingegen in den Angaben zum Gesamtkohlenhydratgehalt der EPS. Bei Trabelsi et al. ist dieser mit 13%, bei Angelis et al. mit 22% angegeben. Es muss allerdings beachtet werden, dass der Gesamtkohlenhydratgehalt ohne eine vorherige Ausfällung von gelöstem Protein im Kulturmedium bestimmt wurde. Rechnet man die vorher abgetrennte Proteinmenge (4.1) und den Uronsäuregehalt (3.4.2) in das in dieser Arbeit gefundene Ergebnis mit ein, erhält man einen Kohlenhydratgehalt von 43%. Diese relativ großen Unterschiede basieren vermutlich auf unterschiedlichen Wachstumsbedingungen; außerdem weisen auch die analytischen Methoden sowie die Isolierung der EPS Unterschiede auf.

Die in dieser Arbeit ermittelte Neutralzuckerzusammensetzung der EPS von *G. memb.* stimmt mit den in der Literatur angegebenen Werten größtenteils überein. In den Untersuchungen von Weckesser et al. (1987) wurde ein identischer Stamm zu der hier untersuchten Art verwendet, die Aufarbeitung der Polysaccharide war jedoch grundverschieden. Unterschiede in der Neutralzuckerzusammensetzung finden sich bei Tease et al. (1991), die *Gloeothece sp.* PCC 6909, welches auch als *Gloeothece membranacea* in der Literatur zu finden ist, untersuchten. Hier wird Glucose und nicht Galactose als Hauptzucker beschrieben. Es wird ein Galactose-Gehalt von 27,8% und ein Glucose-Gehalt von 33,2% genannt. In der vorliegenden Arbeit liegen die zwei Monomere im umgekehrten Verhältnis vor. Als markantes Monomer wurde 2-O-Methyl-Xylose für die EPS von *G. memb.* beschrieben. Hierbei ist der gefundene Gehalt leicht erhöht gegenüber der Angabe von Tease et al. mit 5,1% und leicht erniedrigt gegenüber Weckesser et al. mit durchschnittlich 11,5%. Auffallend ist auch, dass in beiden Arbeitsgruppen weder Fucose noch Arabinose gefunden wurden. Für den Gesamtkohlenhydratgehalt, inklusive der Uronsäuren, finden sich Angaben zwischen 34,5% und 61,4% (Weckesser et al., 1987; Tease & Walker, 1987; Tease et al., 1991). Sowohl bei Weckesser et al. als auch bei Tease & Walker stimmten Kulturmedium (BG-11-Medium) und Temperatur überein, jedoch war die Isolierung der Polysaccharide unterschiedlich. Für *G. memb.* wurde ein Gesamtkohlenhydratgehalt, inklusive der Uronsäuren (5.2.2), von 50,5% ermittelt. Dies entspricht den Literaturdaten.

Für den Vergleich der Zusammensetzung der EPS von *P. sp.* ließ sich keine Literatur zu einem identischen Stamm finden. Aus den 652 Arten der Gattung *Phormidium* ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)) wurden exemplarisch einige als Referenz gewählt. Es zeigt sich fast immer Glucose als Hauptzucker (Pengfu et al., 2001; Nicolaus et al., 1999). Ausnahmen sind für *Phormidium tenue*

mit einem Arabinose-Gehalt von 43,9% und einem Glucose-Gehalt von 32,5% (Hu et al., 2003) und für *Phormidium sp.* J-1 beschrieben, bei dem keine Glucose detektiert werden konnte (Bar-Or & Shilo, 1987). Bei letztgenanntem war Galactose das dominierende Monosaccharid. Betrachtet man die restliche Neutralzuckerzusammensetzung, ergeben sich auch hier große Unterschiede (Tabelle 23). Beim Xylose- und Fucose-Gehalt schwanken die Werte je nach Stamm zwischen 1,9 und 25,5% bzw. 2,3 und 15,8%. Mannose wurde bei Nicolaus et al. gar nicht detektiert, in den Untersuchungen zu dieser Arbeit zeigt sich ein Mannose-Gehalt von 17,0%. Insgesamt zeigt diese Gattung also eine sehr heterogene Zusammensetzung der EPS, wobei auch beachtet werden muss, dass die Aufarbeitungsprozesse und Kultivierungsbedingungen unterschiedlich waren.

	<i>Phormidium sp.</i> (Nicolaus et al., 1999)	<i>Phormidium tenue</i> (Hu et al., 2003)	<i>Phormidium spec.</i>
<b>Rhamnose</b>	11,1	10,4	19,1
<b>Fucose</b>	15,8	2,3	3,1
<b>Arabinose</b>	16,3	43,9	4,5
<b>Xylose</b>	25,5	4,7	1,9
<b>Mannose</b>	0,0	2,9	17,0
<b>Galactose</b>	4,7	1,3	15,3
<b>Glucose</b>	26,5	32,5	39,1

Tabelle 23: Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzung verschiedener *Phormidium*-Spezies

Auch beim Gesamtkohlenhydratgehalt zeigen sich große Schwankungen. Bei *P. sp.* sind, inklusive der Uronsäuren (6.2.2), 60% Kohlenhydrate zu finden. Für *Phormidium tenue* und *Phormidium sp.* J-1 sind 36,1% bzw. 22% beschrieben.

### 7.2.2. Uronsäure- und Sulfatgehalt

Die Fähigkeit zur Sulfatierung von Exopolysacchariden ist einzigartig im Reich der Bakterien und sonst nur bei Archaeen und Eukaryoten zu finden (Pereira et al., 2009). Dabei sind Sulfatgehalte bis zu 19% bei cyanobakteriellen EPS beschrieben. In dieser Arbeit wurde der Sulfatgehalt mittels elementaranalytischer Untersuchung des Schwefelgehalts und durch eine konduktometrische Titration der EPS bestimmt (3.4.3). Hierbei sollte die Aussage der Elementaranalyse immer stärker gewichtet werden als die einer nasschemischen Methode. Die konduktometrische Untersuchung zeigt theoretisch 2 Wendepunkte; der erste spiegelt die Sulfat-Äquivalente, der zweite die Carboxyl-Äquivalente und damit den Uronsäuregehalt wider. Obwohl alle untersuchten EPS sowohl Anteile von Sulfat als auch von Uronsäuren enthalten, war immer nur 1 Wendepunkt zu erkennen. Uronsäuren werden für sehr viele EPS verschiedener Cyanobakterienarten beschrieben. Insgesamt sind dabei Anteile von 0% bis zu 100% des

Gesamtkohlenhydratgehalts möglich (Pereira et al., 2009). In dieser Arbeit wurde der Uronsäuregehalt der EPS mittels der nasschemischen Methode nach Blumenkrantz bestimmt (3.4.2). Durch den modifizierten Versuchsaufbau mit Zugabe von Sulfaminsäure zeigte sich teilweise ein großer Effekt auf den Uronsäuregehalt durch die Unterdrückung der Braunfärbung der Neutralzucker. In der Diskussion werden diese niedrigeren Werte zugrunde gelegt.

Für die EPS von *A. plat.* wurde in der konduktometrischen Bestimmung ein Sulfatgehalt von 12,2%, in der Elementaranalyse (EA) hingegen von 1,1% ermittelt (4.2.3). Die Uronsäurebestimmung mittels Blumenkrantz ergab einen Uronsäuregehalt von knapp 25% (4.2.2). Diese hätten in der konduktometrischen Bestimmung einen zweiten Wendepunkt ergeben müssen. Es liegt also der Schluss nah, dass die 1,1 % Sulfat in der konduktometrischen Titration nicht dargestellt und ein falsch positives Ergebnis durch die große Menge an Uronsäuren erzeugt wurde. Berechnet man allerdings den Uronsäuregehalt aus der verbrauchten Menge an NaOH, würde sich ein Uronsäuregehalt von nur 6,8% ergeben. Insgesamt zeigt sich die konduktometrische Titration mit Standardabweichungen von knapp 20% (n=2) als nicht gut reproduzierbar. Ein Grund dafür könnte eine unvollständige Protonierung der EPS sein. Die Quantität der Uronsäuren konnte durch die Methylierungsanalyse leider nicht bestätigt werden. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Galacturon- als auch Glucuronsäuren vorhanden sind (4.2.8). In der Literatur finden sich übereinstimmende Daten zum Sulfatgehalt von 1,2% (Trabelsi et al., 2009). Der in der gleichen Quelle angegebene Uronsäuregehalt von 2% liegt allerdings deutlich unter dem hier gefundenen Wert. Bei Filali-Mouhim et al. (1993) hingegen wird ein Gehalt von 20-40% für Uronsäuren angegeben. Der ermittelte Wert für den Sulfatgehalt lag bei 5%, was auch, wie die hier untersuchten EPS, eher im unteren Bereich der Sulfatierung liegt. Legt man den aus der EA ermittelten Wert zugrunde, ergibt sich ein recht niedriger DS von 0,02, d.h. dass nur jedes 50. Monosaccharid eine Sulfatgruppe trägt. Da aber jedes 4. Monosaccharid eine Uronsäure ist, präsentieren sich die EPS von *A. plat.* aber dennoch als relativ stark anionisches Molekül.

Für die EPS von *G. memb.* wurde ein Sulfatgehalt von 13,9% aus der Elementaranalyse und von 19% aus der konduktometrischen Titration bestimmt (5.2.3). Der Wert aus der EA wird in der Literatur bestätigt (Tease & Walker, 1987; Tease et al., 1991). Damit gehören die EPS von *G. memb.* zu den hochsulfatierten EPS mit einem DS von 0,34; d.h. dass etwas mehr als jedes 3. Monosaccharid sulfatiert vorliegt. Vermutlich wird der konduktometrisch ermittelte Sulfatgehalt durch die Anwesenheit von Uronsäuren zu hoch dargestellt. Würde man den Uronsäuregehalt aus der verbrauchten Menge NaOH berechnen, beliefe sich dieser auf 10,5% und würde leicht über dem nasschemisch ermittelten Wert von 6,0% liegen (5.2.2). Für den Gehalt an Uronsäuren finden sich in der Literatur Werte von 2,3-7,6% (Weckesser et al., 1987; Tease & Walker, 1987). Dies bestätigt den relativ niedrigen Gehalt. Durch die

Bindungstypanalyse konnte das Vorkommen sowohl von Galacturon- als auch von Glucuronsäure nachgewiesen werden (5.2.8).

Für *Phormidium*-Arten sind in der Literatur Uronsäuregehalte von 0% bis über 40% beschrieben (Hu et al., 2003; Matulewicz et al., 1984; De Philippis & Vincenzini, 1998). Der in dieser Arbeit gefundene Gehalt von 7,0% (6.2.2) liegt also eher im unteren Bereich. Durch die Analyse der Bindungstypen konnten sowohl Glucuron- als auch Galacturonsäuren nachgewiesen werden (6.2.8). Für *Phormidium*-Arten werden Sulfatgehalte von 0-15% beschrieben (De Philippis & Vincenzini, 1998; Pereira et al., 2009). Der in dieser Arbeit anhand der Ergebnisse der Elementaranalyse ermittelte Gehalt an Sulfat von 1,3% liegt eher im unteren Bereich (6.2.3). Es zeigt sich dadurch ein niedriger DS von 0,03; d.h. nur etwa jedes 33. Monosaccharid trägt eine Sulfatgruppe. Mithilfe der konduktometrischen Titration wurde ein etwas höherer Sulfatgehalt von 4,8% ermittelt. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass durch die Uronsäuren ein zu hoher Sulfatgehalt vorgegeben wird. Berechnete man den Uronsäuregehalt aus der eingesetzten Menge an NaOH, ergäbe sich ein Gehalt von 2,7%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten EPS die für Cyanobakterien typische anionische Natur durch die Anwesenheit von Sulfatgruppen und Uronsäuren aufweisen (De Philippis & Vincenzini, 1998).

### 7.2.3. Weitere Substituenten

Als weitere Substituenten wurde der Gehalt an Acetat- und Pyruvatgruppen bestimmt. Pyruvatgruppen sind eine weitere Komponente, die zur anionischen Struktur der EPS beitragen. Acetatgruppen hingegen sind als eher lipophil zu betrachten und haben einen stabilisierenden Effekt auf Polysaccharide (Sutherland, 1994).

Für cyanobakterielle EPS werden Acetat-Gehalte von 0-12,9% beschrieben (Pereira et al., 2009; De Philippis & Vincenzini, 1998), wobei die meisten unter 5% liegen. Die ermittelten Ergebnisse für *A. plat.* (4.2.4) und *G. memb.* (5.2.4) mit ca. 4% entsprechen der Mehrzahl der EPS. Der Acetatgehalt der EPS von *P. sp.* mit 9,1% (6.2.4) liegt etwas höher und kommt deutlich seltener vor.

Bei allen untersuchten EPS sind nur geringe Gehalte an Pyruvat von 0,6% bis 3,0% festgestellt worden (4.2.5, 5.2.5, 6.2.5), welche den beschriebenen Pyruvatanteilen von 0-6,2% entsprechen (Pereira et al., 2009).

### 7.2.4. Analyse der Bindungstypen

Die Bindungstypanalyse durch Methylierung gibt Auskunft über die verschiedenen glycosidischen Bindungen in den EPS. Sie wurde mit 2 verschiedenen Methoden durchgeführt. Zum einen

wurde Dimethyl-Lösung und zum anderen NaOH-Brei zur Aktivierung der Hydroxylgruppen verwendet. Die Methylierung von sulfatierten Polysacchariden ist schwierig (Alban & Franz, 1994). Dies bestätigte sich bei einem ersten Methylierungsversuch der unbehandelten EPS, bei dem nur 8 bis 11 verschiedene Bindungstypen nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). In den folgenden Untersuchungen wurden zuvor desulfatierte EPS eingesetzt, was deutlich bessere Ergebnisse zeigte. Im Vorfeld wurden zusätzlich die Uronsäuren der Proben reduziert und deuteriert und damit für die massenspektrometrische Auswertung sichtbar gemacht. Betrachtet man die Methylierungsergebnisse, so weisen bei der NaOH-Methode alle drei EPS untermethylierte Zucker auf, obwohl der entscheidende Methylierungsschritt sogar zweimal durchgeführt wurde, um eben dies zu vermeiden. Würde man noch weitere Methylierungsschritte einführen, käme es aufgrund der zwischenzeitigen Dialyse und Lyophilisation zu großen Materialverlusten, die aufgrund der vorhergehenden Desulfatierung und Uronsäurereduktion eh schon sehr groß sind. Von 40 mg Ausgangssubstanz blieben für den 2. Methylierungsschritt nur noch ca. 4 mg zurück. Bei der Dimethyl-Methode lassen sich keine untermethylierten Monomere nachweisen. Damit ist die Dimethyl-Methode im Hinblick auf die Vermeidung einer Untermethylierung besser geeignet. Durch die Vielzahl der verschiedenen Monosaccharide und der damit verbundenen großen möglichen Anzahl an Bindungstypen sind die cyanobakteriellen EPS als sehr komplex zu betrachten und eine genaue Darstellung der sich wiederholenden Grundeinheiten innerhalb eines EPS ist meist schwierig (Pereira et al., 2009). Einige wenige Strukturvorschläge sind in der Literatur aber zu finden. Für *Cyanospira capsulata* und *Mastigocladus laminosus* werden Grundeinheiten von 8 bzw. 15 Monosacchariden genannt (Garozzo et al., 1998; Gloaguen et al., 1999). Für beide wird auch der genaue Aufbau der Grundeinheit beschrieben, für *Arthrospira platensis* hingegen wird nur eine Grundeinheit mit mindestens 15 Monomeren angegeben (Filali-Mouhim et al., 1993).

Bei beiden Methoden der Methylierung der EPS von *A. plat.* zeigen sich einander ähnelnde Ergebnisse (4.2.8; Tabelle 6). Bei der NaOH-Methode ist jedoch der 1,4-Glucose-Gehalt im Vergleich zur Dimethyl-Methode um knapp 10% verringert. Dies lässt sich auf den hohen Anteil von untermethylierten Zuckern zurückführen. Rechnet man die zu 7,7% untermethylierte Glucose wieder hinzu, erhält man vergleichbare Ergebnisse. Insgesamt ergibt sich ein Polysaccharid mit einem hohen Anteil an linearen Zuckern von ca. 60% und einem geringen Anteil an Verzweigungspunkten. Die Tatsache, dass die EPS bei der gelpermeationschromatographischen Untersuchung trotz der Ladungen durch Uronsäuren, Sulfat- und Pyruvatgruppen ein im Verhältnis zum absoluten Molekulargewicht kleineres hydrodynamisches Volumen aufweisen (4.3.1), zeigt, dass von einem linearen Rückgrat auszugehen ist, dessen Seitenketten aber auch eher länger sind und evtl. auch wieder verzweigt. Es ergibt sich also ein eher globuläres als ein langgestrecktes Molekül trotz des großen Anteils an linear verknüpften Zuckern. Das Verhältnis von terminalen Gruppen zu

Verzweigungen liegt bei der Dimsyl-Methode bei 0,74 und bei der NaOH-Methode bei 0,63. Eine mögliche Ursache für die zu wenig vorhandenen terminalen Gruppen kann sein, dass im letzten Schritt unter zu hohem Stickstoffdruck eingeeengt wurde und die terminalen Gruppen sich teilweise verflüchtigten. Bei der Gesamtzuckerzusammensetzung der Methylierungen (Tabelle 7) fällt auf, dass bei keiner der beiden Methoden Xylose nachzuweisen ist. Dies kann nicht auf einem methodischen Fehler beruhen, da bei den zwei anderen untersuchten EPS Xylose vorhanden ist. Auch hierfür wäre eine mögliche Erklärung ein zu starkes Abpusten während des Einengens. Xylose liegt nämlich laut den Ergebnissen der Oxalsäurehydrolyse zu einem Großteil gering verknüpft oder endständig vor (4.2.6) und ist dadurch als Monomer leichter flüchtig. Die etwas erhöhten Anteile von Arabinose, Fucose, Mannose und Glucose scheinen durch das Fehlen der Xylose und einem leicht verminderten Anteil an Rhamnose rechnerisch bedingt.

Die Methylierungen der EPS von *G. memb.* ergeben vergleichbare Ergebnisse mit minimalen Varianzen (5.2.8; Tabelle 12). Nur der Anteil von 1,4-Galactose ist bei der NaOH-Methode leicht verringert; dies lässt sich aber durch den Anteil von untermethylierten Zuckern erklären. Bei der Gesamtzuckerzusammensetzung zeigen sich im Vergleich mit der Neutralzuckerzusammensetzung der EPS übereinstimmende Ergebnisse. Auch das Verhältnis von terminalen Zuckern zu Verzweigungen liegt nahe 1, sodass man von einem stimmigen Ergebnis sprechen kann. Die EPS von *G. memb.* präsentieren sich als gering verzweigtes Molekül mit einem Anteil von knapp 15% Dreifach-Verknüpfungen. Auch die gelpermeationschromatographische Untersuchung zeigt für den Hauptpeak ein im Vergleich zum absoluten Molekulargewicht größeres hydrodynamisches Volumen (5.3.1). Dies bestätigt einen eher langgestreckten Aufbau mit kleineren Seitenketten und einer relativ großen Hydrathülle durch die Sulfatgruppen und Uronsäuren (7.2.2).

Die Dimsyl- und die NaOH-Methode zeigen für die EPS von *P. sp.* weitestgehend übereinstimmende Ergebnisse (6.2.8; Tabelle 19). Die meisten Abweichungen lassen sich mit dem Anteil an untermethylierten Zuckern bei der NaOH-Methode erklären. Bei den verschiedenen Bindungstypen der Galactose hingegen treten größere Abweichungen auf. So ist 1,3-Galactose bei der Dimsyl-Methode zu 1,8% nachzuweisen, bei der NaOH-Methode jedoch zu 10,8%. Eine ähnliche Diskrepanz zeigt sich bei 1,6-Galactose; bei der Dimsyl-Methode nur in Spuren vorhanden, werden bei der NaOH-Methode fast 5% detektiert. Auch bei 1,3-Fucose sind Unterschiede zu finden. Bei der Dimsyl-Methode ist das Monomer zu 11,1% enthalten, bei der NaOH-Methode ist nur halb so viel nachweisbar. Das Verhältnis von terminalen zu dreifach-verknüpften Zuckern ist bei beiden Methoden ca. 1,5, d.h. dass zu wenige Verzweigungen detektiert werden konnten. Auch bei der Gesamtzuckerzusammensetzung zeigen sich sowohl zwischen beiden Methoden als auch im Vergleich zur Neutralzuckerzusammensetzung größere Unterschiede (Tabelle 20). Dies alles spricht für eine schlechte Löslichkeit und damit eine unvollständige Methylierung. An der Durchführung kann es nicht liegen, da alle 3 EPS parallel

behandelt und auch gleichzeitig Stärke zur Überprüfung der Methode methyliert wurde. Um besser verwertbare Ergebnisse zu erhalten, müssten die EPS von *P. sp.* vor der Methylierung, z.B. durch Salzbildung, zuverlässig in Lösung gebracht werden. Weitere Versuche sind also vonnöten. Als grobe Richtungsweisung sollen die Ergebnisse trotzdem betrachtet werden. Es zeigt sich mit unter 15% ein geringer Anteil von Dreifach-Verknüpfungen. Wie bei *G. memb.* zeigt sich beim ersten Peak in der GPC ein im Vergleich zum absoluten Molekulargewicht erhöhtes hydrodynamisches Volumen, was auf ein eher langgestrecktes Molekül mit einer großen Hydrathülle hinweist. Die große Hydrathülle kann allerdings durch die Untersuchung auf Substituenten nicht bestätigt werden. Im Vergleich mit den EPS von *G. memb.* sind nur 1,5% anstatt 13,9% Sulfatgruppen enthalten, welche eine starke Ladung tragen. Der Uronsäure- sowie der Pyruvatgehalt sind vergleichbar niedrig. Einzig der mit 12,9% deutlich höhere Proteinanteil könnte eine hohe Ladungsdichte und damit eine entsprechende Hydrathülle erzeugen. Die weiteren Peaks der GPC-Untersuchung korrelieren eher mit den Ergebnissen der Bindungstypen- und Substituentenanalyse. Sie zeigen ein im Vergleich zum absoluten Molekulargewicht vermindertes hydrodynamisches Volumen, was auf eine geringe Verzweigung des Moleküls mit wenigen Ladungen hinweist.

#### **7.2.5. Oxalsäurehydrolyse**

Die milde Säurehydrolyse sorgt für eine Spaltung der labilen Bindungen zu Pentosen und Furanosen. Durch die anschließende Ausfällung mit Ethanol trennt sich eine hochmolekulare Fraktion ab und niedrigmolare Oligo- oder Monosaccharide bleiben im Ethanol gelöst. Die Analyse der erhaltenen Fraktionen kann so auf Teilstrukturen und ausschließlich endständige Monosaccharide hinweisen.

Es ließ sich keine der Fraktionen für die gelpermeationschromatographische Untersuchung vollständig im Fließmittel lösen. Durch das Filtrieren der Untersuchungslösungen repräsentiert das Ergebnis nicht die gesamte Probe.

Betrachtet man die Anteile der erhaltenen Fraktionen der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *A. plat.*, so zeigt sich, dass der Überstand mit den ethanollöslichen Oligo- und Monosacchariden den größten Anteil ausmacht (4.2.6). Dies weist darauf hin, dass die labilen glycosidischen Bindungen nicht auf Seitenketten oder Endgruppen beschränkt sind, sondern über das gesamte Molekül verteilt sind. Wie in 4.2.6 bereits erwähnt, entsprechen die Neutralzuckerzusammensetzungen des Überstandes und der ungelösten Bestandteile ungefähr der Neutralzuckerzusammensetzung der Gesamt-EPS von *A. plat.*. Beim Überstand lässt sich allerdings ein leicht erhöhter Gehalt an Xylose und Fucose finden, was darauf hinweist, dass die Spaltung der labilen Bindungen bevorzugt stattfand. Dies bestätigt auch die Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung des Überstandes ohne vorherige TFA-Hydrolyse. Diese zeigt,

dass fast 80% der frei vorliegenden Monomere Pentosen sind und die Hexosen zumindest zum größten Teil gebunden als Di- oder Oligosaccharide vorliegen. Die oxalsäurehydrolytische Untersuchung lässt erkennen, dass Arabinose ausschließlich als Endgruppe auftritt. Dieses im Gesamt-EPS nur zu 1,2% auftretende Monosaccharid ist zwar im Überstand und im Rückstand nach Ausfällen kaum vorhanden, jedoch zeigt sich, dass dieser kleine Anteil im Überstand ausschließlich als freies Monosaccharid vorliegt. Dieses Ergebnis wird auch in der Bindungstypanalyse bestätigt (4.2.8), welche zeigt, dass Arabinose nur terminal als 1-Arabinose zu finden ist. Rückschlüsse auf weitere Teilgruppen oder wiederkehrende Abschnitte lassen die Ergebnisse der Untersuchung von *A. plat.* nicht zu. Die Bestimmung des hV mittels GPC ergibt für den Hauptpeak des unlöslichen Rückstandes ein hV von 1.671 kDa (4.3.1), welches dem zuerst eluierten Peak der Gesamt-EPS entspricht. Es fällt außerdem auf, dass die hV des Rückstands nach Ausfällen mit den hV der Fraktion 1 der IEC vergleichbar sind (4.3.2). Dieses könnte darauf hinweisen, dass die Fraktion des Rückstands nach Ausfällen von vornherein nur wenige bis keine Pentosen, wenn überhaupt als terminale, enthalten haben darf. Auch müssten sich die Uronsäuren eher im unlöslichen Rückstand wiederfinden lassen. Um dies zu verifizieren, wären aber weitere Charakterisierungen der verschiedenen Fraktionen nötig.

Für die Aubeuten der Oxalsäurehydrolyse der EPS von *G. memb.* (5.2.6) ergibt sich ein recht ähnliches Bild wie bei *A. plat.*. Mit über 70% macht der Überstand den größten Anteil aller gewonnenen Fraktionen aus. Dies zeigt, dass Pentosen über das gesamte Molekül verteilt vorliegen müssen und sich nicht nur als Endgruppe oder in Blöcken gruppieren. Die Neutralzuckerzusammensetzungen der ungelösten Bestandteile und des Überstandes entsprachen in etwa der Neutralzuckerzusammensetzung der Gesamt-EPS von *G. memb.*. Im Rückstand nach Ausfällen haben sich durch die Abtrennung der Pentosen die relativen Anteile der Hexosen Mannose und Glucose erhöht. Galactose hingegen war in dieser Fraktion deutlich reduziert. Fraglich ist, warum sich fast die gesamten Arabinosen im ausfällbaren Rückstand wiederfinden lassen, da die Bindungstypanalyse nur auf terminale Arabinosen hinweist, die sich eigentlich hätten abspalten lassen müssen und sich im Überstand befinden müssten. Die Neutralzuckerzusammensetzung ohne vorherige TFA-Hydrolyse zeigt, dass der Großteil der Pentosen im Überstand, also der ethanollöslichen Fraktion, als freie Monosaccharide vorliegen, die Hexosen hingegen eher als Di- oder Oligosaccharide. Eine Teilstruktur lässt sich aus diesen Ergebnissen aber nicht ableiten. Die gelpermeationschromatographische Untersuchung der Fraktionen zeigt, dass die EPS durch die Oxalsäurehydrolyse in relativ kleine Stücke gespalten wurde. Das größte hV findet sich im ausfällbaren Rückstand mit 11,4 kDa. Die Pentosen liegen also über das gesamte Molekül verteilt vor. Aufgrund des hohen Sulfatgehalts der unterschiedlichen Fraktionen und dem damit verbundenen großen Einfluss auf das hV, lassen sich ohne Daten zum absoluten MW keine weiteren Aussagen treffen.

In den Gesamt-EPS von *P. sp.* sind insgesamt weniger als 10% Pentosen enthalten (6.2.1), statistisch wird also weniger als jedes 10. Monomer von einer Pentose repräsentiert. Dies erklärt den recht hohen mit Ethanol ausfällbaren Anteil von 40% bei der milden sauren Hydrolyse (6.2.6). Fast alle im Gesamt-EPS vorhandenen Pentosen finden sich im Überstand wieder, im Rückschluss finden sich im ausfällbaren Rückstand fast ausschließlich Hexosen. Dies ist ein Indiz, dass ein Großteil der Pentosen terminal oder gering verknüpft vorliegt. Dies wird durch die Analyse der Bindungstypen bestätigt (6.2.8). Auch der hohe Anteil an frei vorliegender Arabinose und Fucose im Überstand spricht dafür. Weitere Rückschlüsse auf Strukturabschnitte lassen sich jedoch nicht finden. Die Bestimmung des hV mittels GPC zeigt keine interpretierbaren Zusammenhänge. Das hV des ersten Peaks im Überstand mit 6,8 kDa erscheint auf den ersten Blick recht hoch, denn im Bereich dieses MWs sind Polysaccharide eigentlich ausfällbar. Der hohe Wert kann aber evtl. vorhandenem Sulfat, Protein oder auch einer möglichen Agglomeration geschuldet sein. Zur Verifizierung dieser Aussage sind weitere Strukturuntersuchungen erforderlich.

## 7.3. Chromatographische Methoden

### 7.3.1. Gelpermeationschromatographie und Ionenaustauschchromatographie

Die EPS wurden in der GPC nach ihrem hydrodynamischen Volumen (hV) aufgetrennt. Hierzu muss zunächst erwähnt werden, dass die Kalibrierung mit linearen ungeladenen Pullulanen erfolgte. Eine Übertragung auf die EPS ist nicht zu 100% möglich, da Struktur und insbesondere auch Ladungen einen Einfluss auf die Solvathülle und damit direkt auf das hydrodynamische Volumen haben. Das absolute Molekulargewicht wurde mithilfe des MALLS-Detektors ermittelt. Dieser spricht allerdings besser auf große Moleküle an und die Aussagekraft bei kleineren Molekülen ist reduziert. Ein weiterer zu beachtender Punkt bei der Interpretation der Ergebnisse ist, dass sich sowohl beim MALLS als auch beim hV teilweise extreme Standardabweichungen von bis zu 50% zeigten. Ein Vergleich mit Literaturdaten gestaltet sich schwierig, da die Aufarbeitung der EPS in der Regel nicht übereinstimmt; auch sind andere Parameter wie z.B. das Fließmittel abweichend. Zumeist sind auch nur Werte für das hydrodynamische Volumen und seltener für das absolute MW zu finden. Dennoch sollen diese Werte zur groben Richtungsweisung herangezogen werden. Bei der IEC wurden die EPS durch Elution mit verschiedenen konzentrierten NaCl-Lösungen nach Ladung fraktioniert.

Rückschlüsse auf die Form der EPS mittels des Vergleichs des absoluten MW und des hVs sind, wie oben bereits erläutert, schwierig. Die Bindungstypanalyse zeigt, dass alle 3 untersuchten EPS ca. 15-20% dreifach-Verknüpfungen aufweisen (4.2.8; 5.2.8; 6.2.8). Dies alleine betrachtet, müsste sich für alle Peaks ein im Vergleich zum absoluten MW vermindertes hV zeigen. Dennoch spielen auch die Ladungsträger eine entscheidende Rolle.

Die Größenbestimmung der EPS von *A. plat.* mittels GPC zeigt 2 Peaks mit einem absoluten MW von je über 2.500 kDa (4.3.1). Die dazu gehörigen hV liegen mit 1.400 kDa und 435 kDa deutlich darunter. Das hV des ersten Peaks liegt außerhalb des Kalibrierungsbereichs von 788 kDa und wurde durch Extrapolation ermittelt. Es ist also unter Vorbehalt zu betrachten. Außerdem eluierte zuletzt ein Peak mit einem absoluten MW von ca. 10 kDa und einem hV von 6 kDa. Vergleicht man diese Werte mit den GPC-Ergebnissen für Fraktion 2 der IEC-Fraktionierung (4.3.2), so zeigen sich übereinstimmende Daten. F2 repräsentiert also das Gesamt-EPS. Dies spiegelt sich auch in der Neutralzuckerzusammensetzung wieder, welche sich nur durch einen kleinen Abfall im Glucose-Gehalt von der Zusammensetzung der Gesamt-EPS unterscheidet. Die fehlende Glucose findet sich in der mit Aqua bidest. eluierbaren un- bis wenig geladenen Fraktion 1 wieder. Der erhöhte Sulfatgehalt von F2 gegenüber den Gesamt-EPS weist darauf hin, dass zumindest der Großteil des Schwefels in F2 enthalten sein muss. Ein direkter Vergleich mit F1 ist leider nicht möglich, da die Ausbeuten für eine elementaranalytische Untersuchung nicht ausreichend waren.

Auch bei *G. memb.* eluierten 3 Peaks (5.3.1). Der Hauptpeak zeigt ein absolutes MW von 733 kDa und ein leicht erhöhtes hV von 983 kDa. Dies kann auf den hohen Sulfatgehalt von 13,9% zurückgeführt werden (5.2.3). Jedoch muss auch hier beachtet werden, dass der Wert für das hV außerhalb der Kalibrierung liegt und mittels Extrapolation berechnet wurde. Für 2 weitere Peaks konnte kein absolutes MW, sondern nur die hV von 86 kDa und 6,5 kDa ermittelt werden, da der MALLS keinerlei Ausschlag bei diesen Peaks zeigte. Betrachtet man die GPC-Ergebnisse im Zusammenhang mit der Bindungstypanalyse, ergibt sich ein eher langgestrecktes Molekül mit kleinen Seitenketten (7.2.4). Bei der IEC der EPS von *G. memb.* zeigen sich 3 Fraktionen (5.3.2). Diese waren alle ähnlich der Neutralzuckerzusammensetzung der Gesamt-EPS. Jedoch ließen sie sich durch Elution mit verschiedenen stark konzentrierten NaCl-Lösungen voneinander trennen. Dies weist auf unterschiedliche Ladungen der einzelnen Fraktionen hin, was durch eine elementaranalytische Untersuchung bestätigt werden konnte. Die Fraktionen zeigen einen zunehmenden Sulfatgehalt von 10,3% über 15,7% bis 17,2%. Von den 3 Fraktionen können, nach der Vermessung mittels GPC, allerdings auch wieder nur die Werte für die hV betrachtet werden, da die Werte des MALLS mit zu hohen Unsicherheitswerten behaftet sind. Der zuerst eluierte Peak der Fraktion 1 zeigt ein hV von 487 kDa. Der Hauptpeak der Gesamt-EPS scheint ein Dimer dieses Peaks zu sein.

Bei der gelpermeationschromatographischen Auftrennung der EPS von *P. sp.* sind 5 Peaks ersichtlich (6.3.1). Peak 1 hat ein absolutes MW von 1.053 kDa und ein deutlich höheres hV von etwa 4.800 kDa. Dieser Wert liegt zwar weit außerhalb der Kalibrierung und ist aufgrund einer sehr großen Standardabweichung auch mit Vorsicht zu betrachten, weist aber auf ein langgestrecktes Molekül mit relativ großer Solvathülle hin. Bei den anderen 4 Peaks zeigt sich jeweils ein niedrigeres hV im Vergleich zum absoluten MW. Bei der gelpermeationschromatographischen Untersuchung der IEC-Fraktionen von *P. sp.* (6.3.2) zeigt die Fraktion 2 übereinstimmende hV mit den Gesamt-EPS. Auch die identische Neutralzuckerzusammensetzung bestätigt, dass F2 den Gesamt-EPS entspricht. Der erhöhte Sulfatgehalt von F2 gegenüber den Gesamt-EPS weist darauf hin, dass zumindest ein Großteil des Schwefels hier enthalten sein muss. Ein direkter Vergleich mit F1 ist leider nicht möglich, da die Ausbeuten für eine elementaranalytische Untersuchung nicht ausreichend waren.

Von anderen Cyanobakterien sind EPS mit vergleichbaren hydrodynamischen Volumina beschrieben (De Philippis & Vincenzini, 1998; Pereira et al., 2009). Nur ein so großes hV wie von *P. sp.* ist in der Literatur nicht zu finden, allerdings muss man die extrem hohe Standardabweichung von fast 45% beachten. So kommt man in den Bereich, der für *Phormidium* 94a mit 2.000 kDa angegeben ist (Vicente-García et al., 2004). Für *Arthrospira* finden sich deutlich niedrigere Vergleichswerte von 81-98 kDa. Diese beziehen sich jedoch nicht auf Exopolysaccharide, sondern auf Polysaccharide eines Heiß-Wasser-Extrakts der Biomasse (Tseng & Zhao, 1994).

## 7.4. Proteinanalytik

Zur Proteinquantifizierung wurden 2 nasschemische Methoden sowie die Bestimmung aus dem Stickstoffgehalt mittels Elementaranalyse (EA) verwendet. Dabei bietet die Bradford-Methode (3.6.1.2) den Vorteil der schnellen und einfachen Durchführung. Nachteilig wirkt sich aus, dass der verwendete Farbstoff Coomassie-Blau in Abhängigkeit vom pH-Wert in verschiedenen Ladungszuständen vorliegen kann und die Farbstoff-Protein-Bindung damit stark von der Probenlösung abhängt. Coomassie-Blau bindet außerdem zumeist an die Aminosäuren Arginin und Lysin; eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung von Probe und Kalibriersubstanz hat also auch einen Einfluss auf das Ergebnis (Kruger, 2002). Eine deutlich genauere Methode ist die Hydrolyse der Proteine und die anschließende quantitative Bestimmung der Aminosäuren (AS) (Waterborg, 2002). Auf diesem Prinzip basiert die Methode nach Starcher (3.6.1.3); damit ist das Ergebnis nicht von der Struktur oder Löslichkeit der Proben abhängig. Ninhydrin bindet dabei an primäre Aminogruppen. Trotz unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzungen sind die Probenwerte, im Gegensatz zur Methode nach Bradford, auf die Kalibriersubstanz übertragbar und es zeigen sich nur geringe Abweichungen. Die Untersuchung nach Starcher ergab Werte, die im Bereich der Ergebnisse der Elementaranalyse liegen. Die EA liefert die genauesten Ergebnisse, indem der Proteingehalt aus dem Stickstoffgehalt der Proben berechnet wird (3.6.1.1). Dieser zeigte bei allen untersuchten EPS das jeweils höchste Ergebnis für den Proteinanteil. Achten muss man hierbei auf andere Strukturen im Molekül, die Aminogruppen, wie Aminosucker, enthalten können und damit das Ergebnis verfälschen könnten. Bei allen drei untersuchten EPS gab es aber keinen Hinweis auf eine Anwesenheit von Aminosuckern. Der Faktor zwischen der Bradford-Methode und der Berechnung aus dem Stickstoffgehalt beträgt, je nach Stamm, 3,8 bis 5. Auch nach der Bestimmung der qualitativen Zusammensetzung des Proteinanteils mittels HPLC lässt sich ein Proteingehalt der Probe berechnen. Dieser lag bei allen Proben im Bereich der Coomassie-Bestimmung. Durch Zentrifugier- und mehrere Waschschriffe, aber auch durch die anschließende Lyophilisation des Probenmaterials kam es vermutlich zu einem recht hohen Verlust an Material, was zu einem zu niedrigen Ergebnis führte. Das jeweilige Ergebnis der Elementaranalyse wird für die Diskussion also als wahrer Wert betrachtet. Für die Betrachtung der Aminosäurezusammensetzung der Proteinanteile der EPS muss beachtet werden, dass nach der sauren Hydrolyse der Probenvorbereitung nicht mehr zwischen Asparagin und Asparaginsäure bzw. zwischen Glutamin und Glutaminsäure unterschieden werden kann. Sie werden unter Asx bzw. Glx zusammengefasst.

Die veröffentlichten Ergebnisse für den Proteingehalt der EPS von *Arthrospira platensis* ähneln sich stark. Es finden sich Werte von ca. 50-55% des Trockengewichts (Angelis et al., 2011; Trabelsi et al., 2009). Diese Angaben stimmen auf den ersten Blick nicht mit dem in dieser Arbeit gefundenen Wert von 9,7% überein (4.4.1), jedoch gilt zu beachten, dass bei der EPS-

Aufarbeitung beider Literaturstellen keine vorhergehende Proteinausfällung stattfand. Rechnet man also zu den ermittelten Werten noch die im Zuge der Isolierung abgetrennte Proteinmenge (4.1) hinzu, kommt man auch auf 53,7%. Die in der Literatur zu findenden Daten für die Aminosäurezusammensetzung beziehen sich immer auf die Biomasse von *Arthrospira platensis* und nicht auf die sekretierten Polysaccharide (Vonshak, 1997; Abdo et al., 2010). Die veröffentlichten Aminosäurezusammensetzungen sind sehr unterschiedlich und nur in dem Punkt in Einklang zu bringen, dass sie einen hohen Anteil an essentiellen AS von ca. 40% besitzen; dabei sind alle 8 essentiellen AS enthalten (Vonshak, 1997). Dies ist einer der Gründe, warum die Biomasse von *Arthrospira platensis* als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet wird (1.3.2). Auch der Proteinanteil der EPS von *A. plat.* zeigt einen Gehalt von 36,9 % an essentiellen AS auf, dennoch sind durch das Fehlen von Lysin und Tryptophan nicht alle vertreten (4.4.2). Aufgrund des geringen Proteinanteils und der aufwendigen Isolierung ist eine Vermarktung der EPS als Nahrungsergänzungsmittel aber undenkbar, sondern die Verwendung der Biomasse effizienter.

Der für die EPS von *G. memb.* von Weckesser et al. (1987) beschriebene Proteingehalt von 3,8% entspricht dem hier gefundenen Wert von 3,7% (5.4.1). Der von Tease et al. (1991) für *Gloeotheca sp.* PCC 6909 angegebene Proteingehalt liegt mit 6,2% auch nur knapp darüber. Bei Tease & Walker (1987) wird die Aminosäurezusammensetzung der Polysaccharid-Hülle von *Gloeotheca* ATCC 27152 (= PCC 6909) beschrieben. Übereinstimmend mit den vorliegenden Daten kommt Asx als häufigste Aminosäure vor (5.4.2). Die Reihenfolgen der Häufigkeit der anderen Aminosäuren sind ansonsten aber unterschiedlich. Bei beiden Stämmen kommen allerdings Methionin und Cystein jeweils nur in Spuren vor. Bis auf Tryptophan sind bei beiden Stämmen alle essentiellen Aminosäuren enthalten.

Wie in 7.2.1 bereits erläutert, präsentiert sich die Gattung *Phormidium* mit sehr heterogenen Zusammensetzungen der EPS. Dies setzt sich auch bei den Angaben zum Proteingehalt fort. Es finden sich Werte zwischen 13% und 21,9% (Matulewicz et al., 1984; Vicente-García et al., 2004; Bar-Or & Shilo, 1987; Hu et al., 2003). Dies sieht zunächst nur nach einer kleinen Abweichung aus. Bei genauerer Betrachtung der Methoden sind die Werte nicht mehr ganz so einheitlich. Der Gehalt von 21,9% für *Phormidium tenue* wurde mit der Methode nach Lowry ohne vorherige Abtrennung der losen Proteine während des Isolierungsvorgangs der EPS bestimmt (Hu et al., 2003). Lowry zeigt vergleichbare Ergebnisse mit der Bradford-Methode (Flamm, 2012), insofern müsste man den wahren Wert durch Multiplikation mit dem Faktor 3,8 mit ca. 83% deutlich höher ansetzen. Rechnet man bei *P. sp.* den vorher abgetrennten Proteinteil wieder dazu (6.1; 6.4.1), erhält man einen vergleichbaren Gesamt-Proteingehalt von ca. 75%. Im Gegensatz dazu wird bei Vicente-García et al. für *Phormidium* 94a ein deutlich geringerer Proteingehalt von 21,9%, bestimmt mittels EA, ohne vorherige Abtrennung der losen Proteine, angegeben. Zur Aminosäurezusammensetzung der EPS von *Phormidium*-Arten lassen

sich keine Literaturdaten finden. *P. sp.* zeigt von allen drei untersuchten Stämmen, den geringsten Gehalt von essentiellen Aminosäuren, jedoch sind auch hier bis auf Tryptophan alle enthalten (6.4.2).

## 7.5. Biologische Aktivität

Die EPS wurden auf eine mögliche Beeinflussung des Komplementsystems getestet. Außerdem wurden sie auf antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften hin untersucht. Alle Untersuchungen erfolgten mit der aufgereinigten EPS-Gesamtfraktion.

Alle drei untersuchten EPS zeigten beim Agarplattendiffusionstest das gleiche Ergebnis. Weder beim Hefepilz *Candida maltosa*, noch bei den grampositiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*, noch bei den gramnegativen Stämmen *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* konnte mit den eingesetzten Konzentrationen von 100 µg und 200 µg ein Hemmhof nachgewiesen werden (4.5.2; 5.5.2; 6.5.2). Potente Stoffe hingegen zeigen schon bei Konzentrationen von 50 µg oder weniger einen Effekt. Bei allen drei untersuchten EPS können damit sowohl antibakterielle als auch antifungale Wirkungen ausgeschlossen werden.

Bei der Testung auf Zytotoxizität mithilfe des Neutralrot-Assays erwiesen sich die EPS von *A. plat.* und *G. memb.* im getesteten Konzentrationsbereich bis 125 µg/ml als nicht toxisch gegenüber Harnblasenkarzinomzellen (4.5.1; 5.5.1). Auch die EPS von *P. sp.* wurden als nicht toxisch in den eingesetzten Konzentrationen bis 125 µg/ml eingestuft, jedoch ließ sich eine Dosis-Wirkung-Beziehung erkennen (6.5.1). Eine IC<sub>50</sub> konnte aber mit den getesteten Konzentrationen nicht ermittelt werden. Der Ausschluss einer zytotoxischen Wirkung ist im Hinblick auf eine Anwendung der EPS als komplementmodulierende Komponente von großer Bedeutung.

Die Untersuchung auf eine mögliche Beeinflussung des humanen Komplementsystems wurde mithilfe von ELISA-Testkits durchgeführt (3.7.3). Cyanobakterien enthalten LPS, welche das Komplementsystem beeinflussen können (Stewart et al., 2006; Sarma & Ward, 2011). Da eine Kontamination der EPS während des Isolierungsvorganges nicht auszuschließen ist, wurden sie zweifach über Endotrap<sup>®</sup>-Säulen gereinigt. Ob durch diese Methode alle LPS entfernt werden konnten, ist fraglich, da das Säulenmaterial mit Heptosen, Ketodeoxyoctanat (KDO) und dem Lipid A-Teil reagiert (Flamm, 2012). KDO ist jedoch zumeist in cyanobakteriellen LPS nicht vorhanden und der Lipid A-Teil weist oft veränderte Strukturen im Vergleich zu bakteriellen LPS auf (Hoiczky & Hansel, 2000; 1.2). Aus diesem Grund ist der häufig zur Endotoxinquantifizierung eingesetzte *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) bei cyanobakteriellen LPS ungeeignet, denn bei diesem interagiert das Amöbozyten-Lysat mit Teilstrukturen des Lipid A-Teils (Gutsmann et al., 2010). Dies führt dazu, dass der Test nicht unbedingt zuverlässig auf die cyanobakteriellen LPS reagiert (Stewart et al., 2006). Andererseits werden die biologische Aktivität und Toxizität der cyanobakteriellen LPS als deutlich geringer eingestuft als die der bakteriellen LPS (Bernadová et al., 2008; Stewart et al., 2006). Die untersuchten EPS scheinen nach der Behandlung aber endotoxinfrei oder zumindest -arm zu sein; eine Modulation des

alternativen Wegs, welcher durch LPS beeinflusst wird, zeigte sich bei keiner der untersuchten Proben.

Der Vorteil der ELISA-Testkits gegenüber den sonst üblichen CH50-Testsystemen ist die leichte Handhabung, Robustheit und die Reproduzierbarkeit (Tudoran & Kirschfink, 2012; Seelen et al., 2005). Auch wird nicht die Lyse von Erythrozyten gemessen, sondern die Menge an entstehendem MAK als Maß für die Aktivität des Komplementsystems quantifiziert.

Als einzige Probe haben die EPS von *G. memb.* einen signifikanten Einfluss auf das Komplementsystem. Es zeigt sich eine Hemmung im klassischen Weg mit einer  $IC_{50}$  (mittlere inhibitorische Konzentration) von 428,4  $\mu\text{g/ml}$  (5.5.3). Dies ist jedoch im Vergleich zu anderen Substanzen, wie unfraktioniertes Heparin mit einer  $IC_{50}$  von 23  $\mu\text{g/ml}$  (Alban et al., 2002), eine schwache Aktivität. Auch für cyanobakterielle EPS sind schon deutlich höhere Aktivitäten beschrieben. Für die EPS von *Synechocystis aquatilis* zeigt sich eine starke Hemmung des klassischen Wegs mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von 0,29  $\mu\text{g/ml}$  (Flamm, 2012). Hier konnte gezeigt werden, dass die Hemmung sowohl von einem hohen Sulfatgehalt als auch vom Polymerisationsgrad der EPS abhängt. Auch in den EPS von *G. memb.* ist Sulfat vorhanden (5.2.3), mit 13,9% jedoch weniger als in den EPS von *Synechocystis aquatilis* (18%). Die durch Ionenaustauschchromatographie gewonnene Fraktion 3 (5.3.2) könnte durch den erhöhten Sulfatgehalt von 17,3% eine höhere Aktivität besitzen. Dies müsste durch weitere Testungen verifiziert werden. Auch für die EPS von *Nostoc commune* wird eine Hemmung des klassischen Weges beschrieben. Diese Aktivität wird bei höheren Konzentrationen durch saure Strukturen wie Uronsäuren noch erhöht (Brüll et al., 2000). Trotz des relativ hohen Gehalts an Uronsäuren von knapp 25% (4.2.2) lässt sich für die EPS von *A. plat.* nur eine marginale Aktivität im getesteten Konzentrationsbereich bis 500  $\mu\text{g/ml}$  feststellen (4.5.3). Die Uronsäuren allein reichen also nicht für eine Komplement-Modulation aus. Dies bestätigt die Aussage von Groth et al. (2009), dass die Aktivität von sulfatierten Polysacchariden nicht auf unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen mit positiv geladenen Proteinen basiert, sondern u.a. von individuellen Faktoren wie der Kettenlänge, der Ladungsdichte und des Sulfatierungsmusters abhängt. Auch für die EPS von *P. sp.* lassen sich in den 3 Aktivierungswegen nur minimale Aktivitäten in den eingesetzten Konzentrationen bis 500  $\mu\text{g/ml}$  nachweisen (6.5.3). Zusammenfassend kann man also sagen, dass ein relativ hoher Sulfatgehalt eine Voraussetzung für komplement-modulierende Effekte ist; negative Ladungen durch Uronsäuren oder Proteinbestandteile sind nicht ausreichend.

Insgesamt zeigen keine der untersuchten EPS eine ausreichende Aktivität, um als Komplement-Inhibitor angewendet zu werden.

## 8. Zusammenfassung/Abstract

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Exopolysaccharide (EPS) von verschiedenen cyanobakteriellen Stämmen isoliert und Untersuchungen zu deren Struktur und biologischer Aktivität durchgeführt.

Bei der Kultivierung von *Arthrospira platensis* SAG 21.99 (*A. plat.*), *Gloeothece membranacea* SAG 26.84 (*G. memb.*) und *Phormidium spec.* SAG 47.90 (*P. sp.*) korrelierte jeweils der Anstieg des Kohlenhydratgehalts im Medium mit dem Wachstum der Biomasse. Dies spricht dafür, dass die EPS dem Primärstoffwechsel zugehörig sind. Es ergaben sich maximale EPS-Ausbeuten von 55,3 mg/l für *P. sp.* und 103,4 mg/l für *A. plat.*. Die höchste EPS-Produktion zeigte *G. memb.* mit 125,9 mg/l.

Die EPS von *A. plat.* zeigten einen Kohlenhydratanteil von 78,6% und einen Proteinanteil von 9,7%. Außerdem lagen Sulfat-, Pyruvat- und Acetatgruppen zu 1,1%, 3,0% und 3,9% vor. Der Kohlenhydratanteil bestand zu 30% aus Uronsäuren und zu 70% aus einem Neutralzuckeranteil, welcher, wie für cyanobakterielle EPS charakteristisch, aus 7 verschiedenen Monomeren mit Glucose als dominierendem Zucker bestand. Durch die Bindungstypanalyse und die gelpermeationschromatographische Untersuchung ergab sich für die EPS ein eher globulärer als langgestreckter Aufbau mit einem geringen Anteil von knapp 20% Verzweigungen und 60% linear-verknüpften Zuckern. Es konnte weder bei den Testungen auf antimikrobielle Eigenschaften und Zytotoxizität noch bei der Untersuchung auf komplement-modulierende Eigenschaften eine biologische Aktivität nachgewiesen werden.

Die von *P. sp.* isolierten EPS hatten einen Proteinanteil von 12,9% und einen Gesamtkohlenhydratgehalt von 59,9%, von dem gut 10% aus Uronsäuren bestanden. Die Neutralzuckerzusammensetzung zeigte, wie bei *A. plat.*, 7 verschiedene Monomere mit Glucose als Hauptzucker. Außerdem waren in den EPS 1,5% Sulfat-, 0,6% Pyruvat- und 9,1% Acetatgruppen enthalten. Zum strukturellen Aufbau der EPS ließ sich keine eindeutige Aussage treffen, da, vermutlich aufgrund von zu schlechter Löslichkeit, die Ergebnisse der Bindungstypanalyse und der Molekulargewichtsbestimmung nicht stimmig waren. Auch eine signifikante biologische Aktivität ließ sich bei keiner der oben genannten Testungen nachweisen.

Für die EPS von *G. memb.* wurde ein Gesamtkohlenhydratgehalt von 50,5% bestimmt; Uronsäuren machten davon knapp 12% aus. Der dominierende Zucker war in diesem Fall Galactose, dennoch ließen sich, cyanobakterientypisch, 8 verschiedene Monomere nachweisen. Hierbei fiel 2-O-Methyl-Xylose als sonst relativ selten vorkommender Zucker auf. Der Proteinanteil betrug 3,7%, Pyruvat- und Acetatgruppen ließen sich zu 1,2% bzw. 3,7% nachweisen. Die Bindungstypanalyse und die gelpermeationschromatographische Untersuchung wiesen auf ein eher langgestrecktes Molekül mit kleinen Seitenketten hin. Auffällig war eine relativ hohe Sulfatierung von 13,9% der EPS von *G. memb.*. Dies scheint der Grund dafür zu

sein, dass sie eine biologische Aktivität im Komplement-Assay aufwiesen. Es zeigte sich eine schwache Hemmung des klassischen Wegs mit einer  $IC_{50}$  von 428,4  $\mu\text{g/ml}$ . Bei den Testungen auf antimikrobielle und zytotoxische Eigenschaften ließ sich jedoch keine Aktivität erkennen.

### Abstract

In this thesis, exopolysaccharides (EPS) were isolated from different cyanobacterial strains and studies on their structure and biological activity were carried out.

During cultivation of *Arthrospira platensis* SAG 21.99 (*A. plat.*); *Gloeotheca membranacea* SAG 26.84 (*G. memb.*) and *Phormidium spec.* SAG 47.90 (*P. sp.*), the increase of the carbohydrate content in the medium correlated with the growth of biomass. *P. sp.* and *A. plat.* showed maximum yields of EPS of 55.3 mg/l and 103.4 mg/l. The highest EPS-production of 125.9 mg/l was obtained with *G. memb.*

The EPS of *A. plat.* had a carbohydrate content of 78.6% and a protein content of 9.7%. Furthermore, sulphate, pyruvate and acetate were detected with about 1.1%, 3.0% and 3.9%. The carbohydrate part contained 30% of uronic acids and 70% of neutral sugars, which consisted, as characteristic for cyanobacteria, of 7 different monomers with glucose as dominant sugar. The methylation analysis and the investigation via gel permeation chromatography revealed EPS with a rather elongated than globular structure with a low amount of branches (barely 20%) and 60% of sugars linked in a linear chain. No biological activity could be detected either in a testing of antimicrobial and cytotoxic properties or in the study of complement-modulating ability.

The isolated EPS of *P. sp.* showed a protein content of 12.9% and a total carbohydrate content of 59.9%, of which over 10% were uronic acids. The neutral sugar composition was made up, as in the EPS of *A. plat.*, of 7 different monomers with glucose as main sugar. In addition, 1.5% sulphate, 0.6% pyruvate and 9.1% acetate were present in the EPS. The structure of the EPS couldn't be clearly characterized by the results of the methylation analysis and the molecular weight determination, due to the poor solubility. Also, no significant biological activity could be ascertained in any of the above-mentioned tests.

In the EPS of *G. memb.*, a total carbohydrate content of 50.5% was determined. Uronic acids made up almost 12 % of it. In these EPS, the dominant monomer was galactose, but, as characteristic for cyanobacterial EPS, a total of 8 different monomers could be detected. Of these, 2-O-methyl-xylose was apparent as a more rare sugar. The protein content was 3.7%, pyruvate and acetate were detected at 1.2% and 3.7%. The methylation analysis and the molecular weight determination via gel permeation chromatography pointed to a rather elongated molecule with small side chains. It is noticeable, that the sulphate content of EPS was

relatively high with 13.9%. This seems to be the reason for the biological activity in the complement assay. The EPS showed a weak inhibition of the classical pathway with an  $IC_{50}$  of 428.4  $\mu\text{g/ml}$ . However, no activity could be recognized in the tests of antimicrobial and cytotoxic properties.

## 9. Literaturverzeichnis

**Abdo, S. M.;** Hetta, M. H.; El Din Salah, R. A.; Ali, G. H. (2010)

Growth evaluation and bioproduct characteristics of certain freshwater algae isolated from river Nile, Egypt.

*Journal of Applied Sciences Research* 6 (6), S. 642–652.

**Abed, R. M. M.;** Dobretsov, S.; Sudesh, K. (2009)

Applications of cyanobacteria in biotechnology.

*Journal of Applied Microbiology* 106 (1), S. 1–12.

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

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

*Planta Medica* 68 (12), S. 1118–1124.

**Alban, S.;** Franz, G. (1994)

Gas-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Anticoagulant Active Curdlan Sulfates.

*Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 20 (02), S. 152-158.

**Angelis, S.;** Novak, A. C.; Sydney, E. B.; Soccol, V. T.; Carvalho, J. C.; Pandey, A.; Nosedá, M. D.; Tholozan, J. L.; Lorquin, J.; Soccol, C. R. (2012)

Co-Culture of Microalgae, Cyanobacteria, and Macromycetes for Exopolysaccharides Production: Process Preliminary Optimization and Partial Characterization.

*Applied Biochemistry and Biotechnology* 167 (5), S. 1092–1106.

**Bar-Or, Y.;** Shilo, M. (1987)

Characterization of Macromolecular Flocculants Produced by *Phormidium sp.* Strain J-1 and by *Anabaenopsis circularis* PCC 6720.

*Applied and Environmental Microbiology* 53 (9), S. 2226–2230.

**Becker, E.W** (Hrsg.) (1994)

Microalgae. Biotechnology and Microbiology.

Band 10

Cambridge University Press.

**Bernardová, K.;** Babica, P.; Maršálek, B.; Bláha, L. (2008)

Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga.

*Journal of Applied Toxicology* 28 (1), S. 72–77.

**Blakeney, A. B.;** Harris, P. J.; Henry, R. J.; Stone, B. A. (1983)

A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis.

*Carbohydrate Research* 113 (2), S. 291–299.

**Blumenkrantz, N.;** Asboe-Hansen, G. (1973)

New method for quantitative determination of uronic acids.

*Analytical Biochemistry* 54 (2), S. 484–489.

**Bradford, M. M. (1976)**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

*Analytical Biochemistry* 72 (1-2), S. 248–254.

**Bresinsky, A.;** Körner C.; Kadereit J.; Neuhaus G.; Sonnewald U. **(2008)**

Strasburger. Lehrbuch der Botanik.

36. Aufl.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

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

Studies of polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: structural characterization and effect on the complement system of polysaccharides from *Nostoc commune*.

*Journal of Phycology* 36 (5), S. 871–881.

**Bryant, D. A.** (Hrsg.) **(1994)**

The Molecular Biology of Cyanobacteria.

Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.

**Burja, A. M.;** Banaigs, B.; Abou-Mansour, E.; Grant, B. J.; Wright, P. C. **(2001)**

Marine cyanobacteria: A prolific source of natural products.

*Tetrahedron* 57 (46), S. 9347–9377.

**Casu, B.;** Gennaro, U. **(1975)**

A conductimetric method for the determination of sulphate and carboxyl groups in heparin and other mucopolysaccharides.

*Carbohydrate Research* 39 (1), S. 168–176.

**Ciucanu, I.;** Kerek, F. **(1984)**

A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates.

*Carbohydrate Research* 131 (2), S. 209–217.

**De Philippis, R.;** Colica, G.; Micheletti, E. **(2011)**

Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process.

*Applied Microbiology and Biotechnology* 92 (4), S. 697–708.

**De Philippis, R.;** Sili, C.; Paperi, R.; Vincenzini, M. **(2001)**

Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review.

*Journal of Applied Phycology* 13 (4), S. 293–299.

**De Philippis, R.;** Vincenzini, M. **(1998)**

Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications.

*FEMS Microbiology Reviews* 22 (3), S. 151–175.

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

Colorimetric method for determination of sugars and related substances.

*Analytical Chemistry*. 28, S. 350–356.

**Ducat, D. C.;** Way, J. C.; Silver, P. A. **(2011)**

Engineering cyanobacteria to generate high-value products.

*Trends in Biotechnology* 29 (2), S. 95–103.

**Ehrnthaller, C.;** Ignatius, A.; Gebhard, F.; Huber-Lang, M. **(2011)**

New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system.

*Molecular Medicine* 17 (3-4), S. 317–329.

**Fattom, A.; Shilo, M. (1984)**

*Phormidium* J-1 bioflocculant: production and activity.  
*Archives of Microbiology* 139 (4), S. 421–426.

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

Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*.  
*Biotechnology Letters* 15 (6), S. 567–572.

**Filisetti-Cozzi, T. M.; Carpita, N. C. (1991)**

Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars.  
*Analytical Biochemistry* 197 (1), S. 157–162.

**Flamm, D. (2012)**

Cyanobakterielle Exopolysaccharide von *Synechocystis aquatilis* und *Synechocystis pevalekii*: Untersuchungen zur Struktur und Inhibition des humanen Komplementsystems.  
Dissertation, Universität Kiel.

**Gantt, E. (2011)**

Oxygenic photosynthesis and the distribution of chloroplasts.  
*Photosynthesis Research* 107 (1), S. 1–6.

**Garbacki, N.; Gloaguen, V.; Damas, J.; Hoffmann, L.; Tits, M.; Angenot, L. (2000)**

Inhibition of croton oil-induced oedema in mice ear skin by capsular polysaccharides from cyanobacteria.  
*Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 361 (4), S. 460–464.

**García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A.; Gómez, E. (2000)**

Xanthan gum: production, recovery, and properties.  
*Biotechnology advances* 18 (7), S. 549–579.

**Garozzo, D.; Impallomeni, G.; Spina, E.; Sturiale, L. (1998)**

The structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulata*.  
*Carbohydrate Research* 307 (1-2), S. 113–124.

**Gleeson, P. A.; Clarke, A. E. (1979)**

Structural studies on the major component of *Gladiolus* style mucilage, an arabinogalactan-protein.  
*The Biochemical journal* 181 (3), S. 607–621.

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

Capsular polysaccharide produced by the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*: structural study of an undecasaccharide obtained by lithium degradation.  
*European Journal of Biochemistry* 266 (3), S. 762–770.

**Groth, I.; Grünewald, N.; Alban, S. (2009)**

Pharmacological profiles of animal- and nonanimal-derived sulfated polysaccharides - comparison of unfractionated heparin, the semisynthetic glucan sulfate PS3, and the sulfated polysaccharide fraction isolated from *Delesseria sanguinea*.  
*Glycobiology* 19 (4), S. 408–417.

**Guerra, D. C. M. P.;** Faustino, A. M. G. C.; Santos, N. D.; Cruz, A. K. M.; Câmara, R. B. G.; Castro, A. J. G.; Alves, L. G.; Nader H. B.; Leite E. L. **(2013)**  
Antiangiogenic activity and direct antitumor effect from a sulfated polysaccharide isolated from seaweed.

*Microvascular Research* 88, S. 12–18.

**Gutsmann, T.;** Howe, J.; Zaehring, U.; Garidel, P.; Schromm, A. B.; Koch, M. H. J.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.; Moriyon, I.; Martínez-de-Tajeda, G.; Brandenburg, K. **(2010)**  
Structural prerequisites for endotoxic activity in the *Limulus* test as compared to cytokine production in mononuclear cells.

*Innate Immunity*. 16 (1), S. 39–47.

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

An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides.

*Carbohydrate Research* 127 (1), S. 59–73.

**Hayashi, T.;** Hayashi, K.; Maeda, M.; Kojima, I. **(1996)**

Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*.

*Journal of Natural Products* 59 (1), S. 83–87.

**Hoiczky, E.;** Hansel, A. **(2000)**

Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope.

*Journal of Bacteriology* 182 (5), S. 1191–1199.

**Hu, C.;** Liu, Y.; Paulsen, B. S.; Petersen, D.; Klaveness, D. **(2003)**

Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain.

*Carbohydrate Polymers* 54 (1), S. 33–42.

**Junge, A. (2008)**

Isolierung und Charakterisierung extrazellulärer Polysaccharide aus Cyanobakterienkulturen.

Diplomarbeit, Universität Greifswald.

**Kjeldahl, J. (1883)**

Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern.

*Zeitschrift für Analytische Chemie* (22), S. 366–382.

**Kruger, N. J. (2002)**

The Bradford method for protein quantitation.

In: Walker, J. M. (ed): *The Protein Protocols Handbook*, S. 15–21.

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

The chemical ecology of cyanobacteria.

*Natural Product Reports* 29 (3), S. 372–391.

**Lee, J. B.;** Srisomporn, P.; Hayashi, K.; Tanaka, T.; Sankawa, U.; Hayashi, T. **(2001)**

Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity.

*Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 49 (1), S. 108–110.

**Machado, I. M. P.;** Atsumi, S. **(2012)**

Cyanobacterial biofuel production.

*Journal of Biotechnology* 162 (1), S. 50–56.

- Majdoub, H.;** Ben, M. M.; Chaubet, F.; Roudesli, M. S.; Maaroufi, R. M. **(2009)**  
Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*.  
*Biochimica et Biophysica Acta* 1790 (10), S. 1377–1381.
- Matulewicz, C. M.;** Percival, E. E.; Weigel, H. **(1984)**  
Water-soluble polysaccharides of Antarctic and cultured *Phormidium* species of the  
Cyanophyceae.  
*Phytochemistry* 23 (1), S. 103–105.
- McComb, E. A.; McCready, R. M. (1957)**  
Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid  
reaction.  
*Analytical Chemistry* 29, S. 819–821.
- Mohsenpour, S. F.; Willoughby, N. (2013)**  
Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment  
production through spectral conversion of light.  
*Bioresource Technology* 142, S. 147–153.
- Montaser, R.; Luesch, H. (2011)**  
Marine natural products: a new wave of drugs?  
*Future Medicinal Chemistry* 3 (12), S. 1475–1489.
- Mutschler, E.;** Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M. **(2001)**  
Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.  
8. Auflage.  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Nagasawa, K.;** Inoue, Y.; Kamata, T. **(1977)**  
Solvolytic desulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing  
water or methanol.  
*Carbohydrate Research* 58 (1), S. 47–55.
- Nagle, V. L.;** Mhalsekar, N. M.; Jagtap, T. G. **(2010)**  
Isolation, optimization and characterization of selected Cyanophycean members.  
*Indian Journal of Marine Sciences* 39 (2), S. 212–218.
- Nicolaus, B.;** Panico, A.; Lama, L.; Romano, I.; Manca, M. C.; De Giulio, A.; Gambacorta, A.  
**(1999)**  
Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of  
heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria.  
*Phytochemistry* 52 (4), S. 639–647.
- Ortega-Calvo, J.-J.; Stal, L. J. (1994)**  
Sulphate-limited growth in the N<sub>2</sub>-fixing unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* (Nägeli) *sp.* PCC  
6909.  
*New Phytologist* 128 (2), S. 273–281.
- Patel, S.;** Keohan, M. L.; Saif, M. W.; Rushing, D.; Baez, L.; Feit, K.; DeJager, R.; Anderson, S.  
**(2006)**  
Phase II study of intravenous TZT-1027 in patients with advanced or metastatic soft-tissue  
sarcomas with prior exposure to anthracycline-based chemotherapy.  
*Cancer* 107 (12), S. 2881–2887.

**Pearson, L.;** Mihali, T.; Moffitt, M.; Kellmann, R.; Neilan, B. **(2010)**

On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin.  
*Marine Drugs* 8, S. 1650–1680.

**Pengfu, L.;** Harding, S. E.; Liu, Z. **(2001)**

Cyanobacterial Exopolysaccharides: Their Nature and Potential Biotechnological Applications.  
*Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (18), S. 375–404.

**Pereira, S.;** Micheletti, E.; Zille, A.; Santos, A.; Moradas-Ferreira, P.; Tamagnini, P.; De Philippis, R. **(2011)**

Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell?

*Microbiology* 157 (2), S. 451–458.

**Pereira, S.;** Zille, A.; Micheletti, E.; Moradas-Ferreira, P.; De Philippis, R.; Tamagnini, P. **(2009)**

Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly.

*FEMS Microbiology Reviews* 33 (5), S. 917–941.

**Pohl, P.;** Kohlhase, M.; Krautwurst, S.; Baasch, K.-H. **(1987)**

An inexpensive inorganic medium for the mass cultivation of freshwater microalgae.

*Phytochemistry* 26 (6), S. 1657–1659.

**Raof, B.;** Kaushik, B. D.; Prasanna, R. **(2006)**

Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*.

*Biomass Bioenergy* 30 (6), S. 537–542.

**Rechter, S.;** König, T.; Auerochs, S.; Thulke, S.; Walter, H.; Dornenburg, H.; Walter, C.; Marschall, M. **(2006)**

Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances.

*Antiviral Research* 72 (3), S. 197–206.

**Reddy, K. J.;** Soper, B. W.; Tang, J.; Bradley, R. L. **(1996)**

Phenotyping variation in exopolysaccharide production in the marine, aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp..

*World Journal of Microbiology and Biotechnology* (12), S. 311–318.

**Ricklin, D.;** Lambris, J. D. **(2007)**

Complement-targeted therapeutics.

*Nature Biotechnology* 25 (11), S. 1265–1275.

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

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

*Journal of General Microbiology* 111 (1), S. 1-61.

**Roessler, P. G.;** Chen, Y.; Liu, B.; Dodge, C. N. **(2013)**

Secretion of fatty acids by photosynthetic microorganisms.

Veröffentlichungsnr.: US20130005003 A1

**Sánchez, M.;** Bernal-Castillo, J.; Roza, C.; Rodríguez, I. **(2003)**

*Spirulina* (*Arthrospira*): An edible microorganism: A review.

*Universitas Scientiarum* 8 (1), S. 7–24.

**Sarma, J. V.; Ward, P. A. (2011)**

The complement system.  
*Cell & Tissue Research* 343 (1), S. 227–235.

**Schlegel, H. G. (1992)**

Allgemeine Mikrobiologie.  
7. Auflage.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

**Seelen, M. A.;** Roos, A.; Wieslander, J.; Mollnes, T. E.; Sjoeholm, A. G.; Wurzner, R.; Loos, M.; Tedesco, F.; Sim, R. B.; Garred, P.; Alexopoulos, E.; Turner, M. W.; Daha, M. R. **(2005)**  
Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA.  
*Journal of Immunological Methods* 296 (1-2), S. 187–198.

**Simmons, T. L.;** Andrianasolo, E.; McPhail, K.; Flatt, P.; Gerwick, W. H. **(2005)**

Marine natural products as anticancer drugs.  
*Molecular Cancer Therapeutics* 4 (2), S. 333–342.

**Sloneker, J. H.; Orentas, D. G. (1962)**

Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide.  
*Nature* 194, S. 478–479.

**Starcher, B. (2001)**

A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples.  
*Analytical Biochemistry* 292 (1), S. 125–129.

**Stengel, D. B.;** Connan, S.; Popper, Z. A. **(2011)**

Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application.  
*Biotechnology advances* 29 (5), S. 483–501.

**Stevenson, T. T.; Furneaux, R. H. (1991)**

Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae.  
*Carbohydrate Research* 210, S. 277–298.

**Stewart, I.;** Schluter, P. J.; Shaw, G. R. **(2006)**

Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - A review.  
*Environmental Health* 5, S. 5:7.

**Sutherland, I. W. (1994)**

Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides.  
*Biotechnology advances* 12 (2), S. 393–448.

**Sutherland, I. W. (2001)**

Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria.  
*International Dairy Journal* 11 (9), S. 663–674.

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

Quantitative analysis by various GLC [gas-liquid chromatography] response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates.  
*Carbohydrate Research* 40 (2), S. 217–225.

**Taylor, R. L.; Conrad, H. E. (1972)**

Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl group.  
*Biochemistry* 12 (8), S. 1383–1388.

**Tease, B. E.; Jürgens, U. J.; Golecki, J. R.; Heinrich, U. R.; Rippka, R.; Weckesser, J. (1991)**

Fine-structural and chemical analyses on inner and outer sheath of the cyanobacterium *Gloeotheca* sp. PCC 6909.  
*Antonie Van Leeuwenhoek* 59 (1), S. 27–34.

**Tease, B. E.; Walker, R. W. (1987)**

Comparative composition of the sheath of the cyanobacterium *Gloeotheca* ATCC 27152 cultured with and without combined nitrogen.  
*Journal of General Microbiology* 133 (12), S. 3331–3339.

**Trabelsi, L.; M'sakni, N. H.; Ben, O. H.; Bacha, H.; Roudesli, S. (2009)**

Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*.  
*Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14 (1), S. 27–31.

**Tseng, C.-T.; Zhao, Y. (1994)**

Extraction, purification and identification of polysaccharides of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanophyceae).  
*Algalological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 75, S. 303–312.

**Tudoran, R.; Kirschfink, M. (2012)**

Moderne Komplementanalytik: Indikationen - Methodik - Perspektiven.  
*Laboratoriumsmedizin* 36 (3), S. 125–134.

**Uzair, B.; Tabassum, S.; Rasheed, M.; Rehman, S. F. (2012)**

Exploring Marine Cyanobacteria for Lead Compounds of Pharmaceutical Importance.  
*The Scientific World Journal* 2012.

**Valério, E.; Chaves, S.; Tenreiro, R. (2010)**

Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: a review.  
*Toxins* 2, S. 2359–2410.

**van den Hoek, C. (1978)**

Algen. Einführung in die Phykologie.  
1. Auflage.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

**Vicente-García, V.; Ríos-Leal, E.; Calderón-Domínguez, G.; Cañizares-Villanueva, R. O.; Olvera-Ramírez, R. (2004)**

Detection, isolation, and characterization of exopolysaccharide produced by a strain of *Phormidium* 94a isolated from an arid zone of Mexico.  
*Biotechnology and Bioengineering* 85 (3), S. 306–310.

**Vichi, S.; Lavorini, P.; Funari, E.; Scardala, S.; Testai, E. (2012)**

Contamination by *Microcystis* and microcystins of blue-green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population.  
*Food and Chemical Toxicology* 50 (12), S. 4493–4499.

**Volk, R. B. (2007)**

Cyanobakterielle Exometabolite - Biotechnologische Gewinnung, Identifizierung, biologische Testung.  
Dissertation, Universität Kiel.

**Vollmar, A.; Dingermann, T. (2005)**

Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe.

1. Auflage.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

**Vonshak, A. (Hrsg.) (1997)**

*Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, Cell-biology and Biotechnology.

Taylor & Francis Ltd., London, England

**Waterborg, J. H. (2002)**

The Lowry Method for Protein Quantitation.

In: Walker, J. M. (ed): The Protein Protocols Handbook, S. 7-9.

**Weckesser, J.; Broll, C.; Adhikary, S. P.; Jürgens, U. J. (1987)**

2-O-Methyl-D-xylose containing sheath in the cyanobacterium *Gloeothoece sp.* PCC 6501.

*Archives of Microbiology* 147 (3), S. 300–303.

**Whitton, B.; Potts, M. (Hrsg.) (2000)**

The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space.

Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.

**Witvrouw, M.; De Clercq, E. (1997)**

Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs.

*General Pharmacology* 29 (4), S. 497–511.

**Zor, T.; Selinger, Z. (1996)**

Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies.

*Analytical Biochemistry* 236 (2), S. 302–308.

## 10. Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Blaschek für die Überlassung des Themas danken. Er hat mir immer die Möglichkeit gegeben, selbstständig zu arbeiten; trotzdem stand seine Tür bei Fragen und Problemen offen. Zusammen mit seiner Frau Heidi schafft er eine familiäre Atmosphäre im Arbeitskreis.

Ich danke allen meinen Mitstreitern und Kollegen für die zahlreichen Frühstücks- und Mittagsrunden mit ihren abwechslungsreichen Gesprächsthemen von politisch bis ganz privat; mit euch ist auch das „After-Work“ nicht zu kurz gekommen. Die gemeinsamen Exkursionen zu Kongressen, nach Oberjoch und Rügen haben den Uni-Alltag abgerundet und immer Spaß gemacht. Besonders möchte ich Dr. Daniela Flamm danken, die mir während der gesamten Promotionszeit hilfsbereit zur Seite gestanden hat und Antworten auf (fast) alle Fragen hatte. Außerdem geht mein Dank an Dr. Esther Marie Göllner als langjährige Büromitbewohnerin für die Lebensberatung 113.

Dr. Ulrich Girreser danke ich für die Durchführung der GC-MS-Messungen, Stephanie thor Straten für die HPLC der Aminosäuren und PD Dr. Sabine Mundt für die Testungen auf antimikrobielle Aktivität und Zytotoxizität.

Zuallerletzt bin ich meiner, seit letztem Jahr noch größer gewordenen, Familie zu Dank verpflichtet. Ihr wart immer für mich da und habt mir geholfen, zu dem Menschen zu werden, der ich heute gerne bin. Ich liebe euch! Besonders meinem Mann Stefan danke ich dabei für seine Liebe, Unterstützung, Motivation und so manche Ablenkungen vom Uni-Alltag, die mir den Kopf frei und diese Arbeit möglich gemacht haben.

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Esther Maria Friedrich, geb. Weigelt
Geburtsdatum	27.12.1983
Geburtsort	Oldenburg i.H.
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Berufliche Tätigkeit

Seit 09/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Blaschek am Pharmazeutischen Institut, Abteilung Pharmazeutische Biologie, der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
--------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### Hochschulausbildung

10/2003-03/2008	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
04/2006	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
06/2008	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
07/2008-06/2009	Pharmaziepraktikum in der West Apotheke, Kiel
08/2009	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08/2009	Approbation zur Apothekerin

### Schulausbildung

08/1995-07/2003	Gymnasium Soltau Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
-----------------	----------------------------------------------------------

## **12. Ehrenwörtliche Erklärung zu §8 Absatz 1 der Promotionsordnung**

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

Kiel,