



Hochschule Neubrandenburg  
University of Applied Sciences

MICROBI  
MARIS  
BIOTEC

**Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften**

Studiengang Lebensmittel- und Bioprodukttechnologie

SS 2011



# **Isolierung und Charakterisierung einer Kollagenase aus einem marinen Bakterium für biotechnologische und ökologische Fragestellungen**

**Master-Arbeit**

eingereicht von

B. Sc. Juliane Glockzin

durchgeführt im: Kieler Wirkstoff-Zentrum  
Am Kiel-Kanal 44  
24106 Kiel

Erstprüfer: Prof. Dr. Karl Steffens  
Zweitprüfer: Dr. Antje Labes

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis 2011-0062-8

Kiel, 15.09.2011

---

## Abstract

A marine *Alteromonas sp.* strain isolated from the sponge *Tethya aurantium*, was shown to produce collagenases when grown in collagen containing medium. For characterization and analyzing interactions between the sponge and associated bacteria on compound and enzyme level, the enzyme was isolated. The collagenase was purified by ammonium sulfate precipitation and multiple gel filtration steps. For characterization, a quantitative colorimetric assay system was established based on the ninhydrin reaction. The maximal catalytic activity of the  $\text{Ca}^{2+}$  depending collagenase (198.8 U/mg) was obtained at 58 °C and pH 5. The molecular weight was determined with appr. 40 kDa by SDS-PAGE. The native collagenase seems to consist of two subunits. The activity of the collagenase was strongly inhibited by EDTA and DMSO and depended on  $\text{Ca}^{2+}$ -ions. Furthermore, a bioactive substance was isolated from a *Microbacterium* strain from another marine source, but had no inhibitory effect on collagenase. Therefore it is no protective defense of sponges against collagenases.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b> .....	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Stand von Wissenschaft und Technik</b> .....	<b>3</b>
2.1. Marine Bakterien und ihr Sekundärmetabolismus .....	3
2.2. Proteinbiochemie und Nachweis von Proteinen .....	5
2.3. Zielsetzung .....	9
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
3.1. Material .....	10
3.2. Mikrobiologische Methoden.....	12
3.3. Proteinchemische Methoden.....	12
3.4. Chemisch-analytische Methoden .....	18
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
4.1. Isolierung einer Kollagenase eines <i>Alteromonas sp.</i> Stamm .....	21
4.2. Charakterisierung der bakteriellen Kollagenase .....	28
4.3. Isolierung eines antibiotisch-wirksamen Sekundärmetabolits aus einem <i>Microbacterium</i> -Isolat.....	33
4.4. Inhibierende Wirkung des isolierten Sekundärmetaboliten und weiterer Hemmstoffe auf die Kollagenaseaktivität.....	37
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>39</b>
5.1. Abhängigkeit der Kollagenaseproduktion von den Kultivierungsbedingungen .....	39
5.2. Enzymassay zum quantitativen Nachweis der spezifischen Aktivität einer mikrobiellen Kollagenase .....	41
5.3. Aufreinigung der Kollagenase .....	42
5.4. Charakteristische Eigenschaften einer Kollagenase eines <i>Alteromonas sp.</i> Stamm..	43
5.5. Biologische Aktivität der Substanz P6 aus dem <i>Microbacterium</i> -Isolat sowie ihre Wirkung und weiterer potenzieller Inhibitoren auf die spezifische Aktivität einer mikrobiellen Kollagenase .....	47
5.6. Biotechnologisches und ökologisches Betrachtung .....	49
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>52</b>
<b>7. Literatur</b> .....	<b>V</b>

**8. Abbildungen..... XII**

**9. Tabellen..... XIII**

**Danksagung..... XIV**

**Erklärung über die selbständige Anfertigung der Arbeit..... XV**

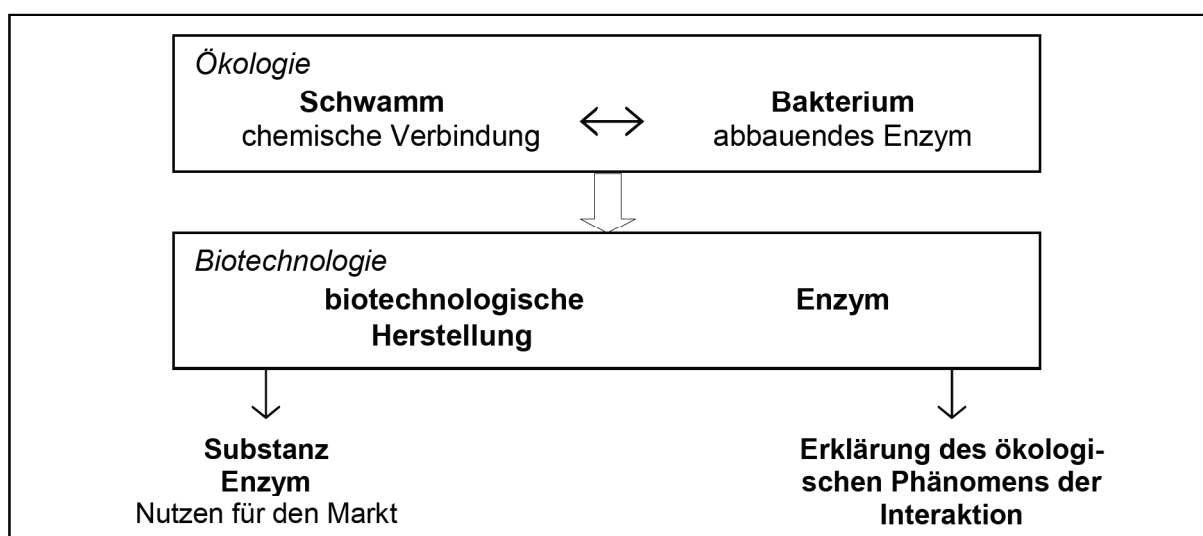
---

## Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis

ACN	Acetonitril
C	Cytosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EC	engl. <i>Enzyme Commission numbers</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
H	Hill-Konstante
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
kDa	Atomare Masseneinheit
$K_m$	Michaelis-Konstante
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte in nm
PHPLC	Präparative HPLC
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Unit
$v_{max}$	Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes
w/v	Masse pro Volumen

## 1. Einleitung

Das Meer ist die größte durch Mikroorganismen besiedelte natürliche Umgebung. Zu diesen Mikroorganismen zählen Bakterien, Protozoen, Algen, Pilze und Hefen, deren Einfluss und Stellenwert die marine Mikrobiologie behandelt. Insbesondere Bakterien, die in Gemeinschaft mit Schwämmen und anderen marinen Invertebraten leben, sind sehr interessant, da sie als „reiche Quelle neuer bioaktiver Verbindungen“ gelten (LI *et al.*, 1994; MIYAOKA *et al.*, 1998; CONSTANTINO *et al.*, 2000; FAULKNER, 2001, 2000). Aufgrund des knappen Nährstoffangebots im Meer, assoziieren vielen Mikroorganismen mit nährstoffreichen Pflanzen und Tieren. Unter den untersuchten Invertebraten dominieren Schwämme (KELECOM, 2002). Als sessile Organismen können sie große Wassermengen filtrieren und so unzählige Mikroorganismen und somit Bakterien in ihrem Inneren anreichern (BIABANI & LAATSCH, 1998, WILKINSON, 1978). Viele solcher Assoziation sind nur von sehr kurzer Zeitdauer und die Art der Verbindung und die ökologische Funktion der Bakterien sind weitgehend unklar. In einigen Fällen können sich hoch spezialisierte Beziehungen zwischen dem Symbiont und dem Wirt entwickeln (JENSEN & FENICAL 1996). Doch nicht immer nutzen beide von der Beziehung, da ebenso parasitäre Bakterien eine Interaktion mit dem Schwamm eingehen. Diese sind beispielsweise in der Lage sich von dem polymeren Stützgerüst des Schwamms zu ernähren, indem sie die Kollagenfibrillen abbauen, die sie dann aufnehmen können. Dafür müssen sie ein spezifisch degradierendes Enzym synthetisieren: die Kollagenase. Da der Schwamm durch diese Bakterien zerstört werden würde, wird vermutet, dass weitere Organismen existieren, die ebenfalls in Symbiose mit dem Schwamm leben, sich aber evolutionär so entwickelt haben, den Schwamm mit Hilfe von produzierten Kollagenaseinhibitoren zu schützen. Sie sind daher in den Abwehrmechanismus des Schwamms integriert.



**Abb. 1:** Schematischer Überblick über die Aufgabenstellung der Arbeit und die Verknüpfung mit der weiteren Bearbeitung im Kieler Wirkstoff-Zentrum am IFM-GEOMAR.

---

Aufgabe des Kieler Wirkstoff-Zentrums ist die Erforschung und Entwicklung von Wirkstoffen aus marinen Mikroorganismen zur Anwendung in diversen Bereichen. MicrobiMaris Biotec führt und verwertet diese Wirkstoffe zu Marktprodukten für die Human- und Tiermedizin, den Pflanzenschutz, der Kosmetik und Nahrungsergänzungsmittel. Neben der Isolierung, Identifizierung und Fermentation von marinen Bakterien und Pilzen sowie der Extraktion, Strukturklärung und Bestimmung der biologischen Aktivität von mikrobiellen Wirkstoffen sind Interaktionen zwischen marinen Mikroorganismen bzw. Makroorganismen und assoziierten Mikroorganismen wesentliche Aspekte der Forschungsarbeiten. Wie in Abb. 1 dargestellt, können derartige Analysen der isolierten Biostoffe dazu dienen, das ökologische Phänomen der Schwamm-Bakterien-Interaktion zu untersuchen und das biotechnologische Potenzial in Form von Verfahrensschritten zur Gewinnung bakterieller Wirkstoffe und Kollagenase zu nutzen. Vor allem letztere haben ein weites Einsatzspektrum, beispielsweise in der Human- und Tiermedizin sowie der Molekularbiologie und Biochemie.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist daher die Isolierung und Reinigung einer Kollagenase aus einem schwamm-assoziierten Bakterium. Für die anschließende Charakterisierung und Bewertung der spezifischen enzymatischen Aktivität soll ein Assaysystem speziell für den Nachweis von Kollagenasen etabliert werden. Dieser basiert auf dem kolorimetrischen Aminosäurenachweis mittels Ninhydrin-Reaktion von MOORE & STEIN (1948). Ferner soll eine Substanz aus einem weiteren ebenfalls marinen Bakterium über chromatografische Trennmethode und Bioaktivitätstests isoliert und seine Wirkung spezifiziert werden. Abschließend kann deren potenziell inhibierende Wirkung auf die mikrobielle Kollagenase bewertet werden. Folglich können Hinweise auf die Beziehungen zwischen den Bakterien und dem Schwamm erhalten werden.

---

## 2. Stand von Wissenschaft und Technik

In dieser Arbeit steht die Isolierung und Reinigung von Sekundärmetaboliten und Enzymen mariner Bakterien im Vordergrund. Charakteristische Merkmale der Bakteriengattungen sowie Verfahren zur Enzymanalytik werden nachfolgend dargestellt.

### 2.1. Marine Bakterien und ihr Sekundärmetabolismus

Marine Bakterien wirken enorm am Leben im Meer und den Energiezyklen mit und bilden so einen wichtigen Bestandteil der marinen Mikrobiologie. Auch die Untersuchung mariner Bakterien als Quelle für bioaktive Naturstoffe hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen (IMHOFF *et al.* 2011), da sie eine große metabolische Vielfalt, kurze Generationszeiten und somit eine schnelle Anpassungsfähigkeit an veränderte Umweltbedingungen, die meist mit der Bildung von Sekundärmetaboliten einhergeht, aufweisen.

In dieser Arbeit werden marinen Bakterienstämme zweier Gattungen verwendet: Dabei handelt es sich zum einen um die Gattung *Alteromonas* sowie zum anderen um die Gattung *Microbacterium*.

#### 2.1.1. Die Gattung *Alteromonas* und bakterielle Kollagenase

Die Gattung der *Alteromonas*-Bakterien gehört zur Familie der *Alteromonaceae*. Wie auch die Gattungen *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina* und andere sind sie der  $\gamma$ -Subklasse des Stammes *Proteobacteria* zuzuordnen (STACKEBRANDT & TEUBER, 1988). *Alteromonas*-Arten kommen im Meerwasser, in der Tiefsee wie auch in Küstengebieten vor. Beschrieben wurde die Gattung erstmalig 1972 von BAUMANN *et al.* als gram-negatives, heterotrophes Bakterium, welches durch ein einzelnes polares Flagellum beweglich ist. 1995 erfolgte eine Reklassifizierung einiger Spezies als *Pseudomonas* (GAUTHIER *et al.*, 1995), sodass nach heutigem Stand acht Spezies der Gattung zuzuordnen sind. Sie bilden gekrümmte Stäbchen, die einen Durchmesser von 0,7 bis 1,5  $\mu\text{m}$  und eine Länge von 1,8 bis 3,0  $\mu\text{m}$  besitzen. Sie weisen einen oxidativen Stoffwechsel und einen G+C-Anteil von 38 bis 50 mol% der DNA auf. Des Weiteren benötigen sie zum Wachstum  $\text{Na}^+$ -Ionen oder eine Salzwassergrundlage. Die gebildeten Kolonien sind nicht pigmentiert. Alle Arten der Gattung *Alteromonas* wachsen bei 20 °C, einige auch bei 4 °C, jedoch keine über 35 °C. Sie sind in der Lage antibiotisch und cytotoxisch-wirksame Substanzen, Proteinase-Inhibitoren sowie weitere Substanzen zu produzieren. Weiterhin wurde die Produktion von Enzymen wie beispielsweise Lipasen, Chitinase und Kollagenase (auch Gelatinase) beschrieben (IVANOVA und MIKHAILOV, 2001). Kollagenasen gehören zu den Proteasen und sind als solche fähig die Peptidbindung zwischen Aminosäuren zu spalten. Im Vergleich zu Säugern ist die bakterielle Kollagenase in der Lage, die Tripelhelix der Kollagentypen I-V aufzubrechen und in kleinste Peptide zu zer-



legen. Das Enzym ist extrazellulär lokalisiert und besitzt in der Regel ein pH-Optimum von 6,5 bis 8,3 und ein Temperaturoptimum von 35 bis 40 °C. Das Molekulargewicht kann in Abhängigkeit vom Bakterium zwischen 11,5 und 147 kDa variieren. Die am umfangreichsten untersuchten bakteriellen Kollagenasen werden von *Clostridium hystolyticum* gebildet. Sechs Formen mit unterschiedlichen Sequenzen und spezifischer Wirkung wurden bereits isoliert. Andere Varianten konnten von *Bacillus cereus*, *Empedobacter collagenolyticum*, *Pseudomonas marinoglutinosus* und weiteren Gattungen von *Vibrio* und *Streptomyces* (EC 3.4.24.3) gefunden werden (EBI, 2011).

### 2.1.2. Die Gattung *Microbacterium*

Die Gattung *Microbacterium* gehört zur Familie der *Microbacteriaceae*, die den *Actinobacteria*, einem der artenreichsten Bakterienstämme, zuzuordnen ist. Zum ersten Mal beschrieben wurde die Gattung 1919 von ORLA-JENSEN. Nach mehrfachen Neuordnungen, Vereinigungen und Neuentdeckungen gehören ihr nach heutigem Stand (2009) 96 Spezies an. Diese gram-positiven (ORLA-JENSEN, 1919) Bakterien sind 0,2 bis 0,5 mal 0,6 bis 2,0 µm klein (TAKEUCHI & HATANO, 1998). Weiterhin sind die Vertreter dieser Gattung charakteristischerweise aerob, katalase-positiv, können demnach für die Zellen giftiges Wasserstoffperoxid spalten, nicht sporenbildend, aber Säureproduzenten und ungewöhnlich hitzeresistent (ORLA-JENSEN, 1919). Ein weiteres Merkmal bildet die G+C-reiche DNA und ihr stäbchenförmiges Äußeres. Dieses kann jedoch je nach Alter und Zusammensetzung des Nährmediums variieren – von schlank bis kurz und kokkoid, wobei letzteres bei älteren Bakterien zu beobachten ist. Des Weiteren können sie sich zu V-Formen zusammenlagern, verzweigen und Ketten bilden (SCHLEIFER, 1970). Auf festen Kulturmedien bilden Vertreter der Gattung *Microbacterium* charakteristisch runde, gering konvexe, opake, feuchte Kolonien. In der Pigmentierung der Kolonien variieren sie von orange, hellgelb, gelblich-weiß bis zu gelb. Einige wenige können freibeweglich sein (TAKEUCHI & HATANO, 1998).

Aufgrund der genannten Hitzestabilität, die Stämme der Gattung *Microbacterium* aufweisen, bilden sie einen hohen Anteil der Flora in pasteurisierter Milch (DYETT & SHELLEY, 1962) und kommen in Käse und in Milchprodukten vor. Allgemein sind diese Bakterien in den verschiedensten Umgebungen weitverbreitet. So leben sie unter anderem in Böden (YOKOTA *et al.*, 1993, COLLINS *et al.*, 1983), Abwässern (COLLINS *et al.*, 1983), Meerwasser bzw. in Assoziation mit Schwämmen (WICKE *et al.*, 2000).

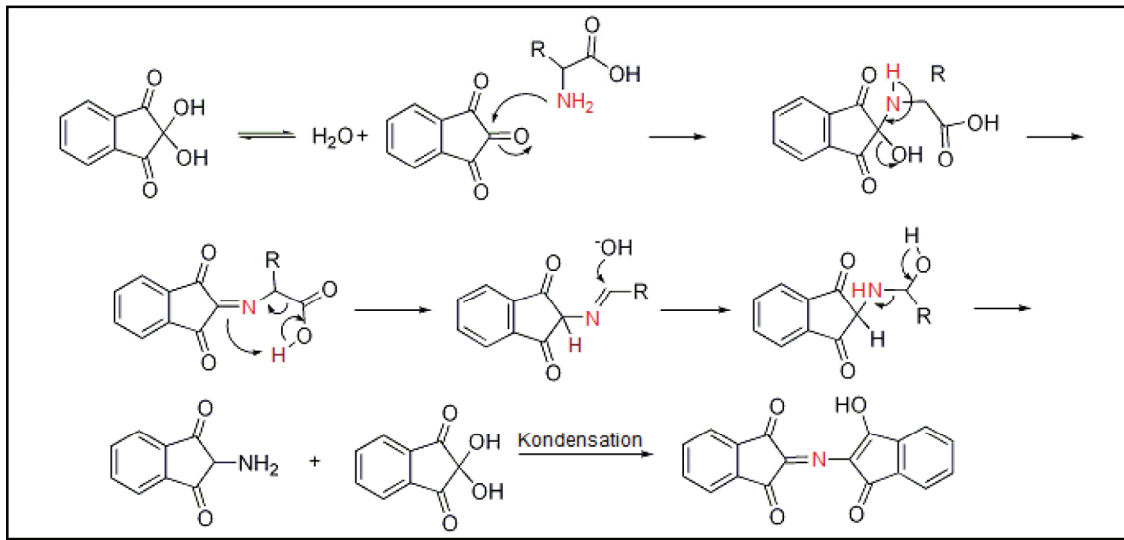
Der Stoffwechsel von Bakterien besteht generell aus zwei Bereichen: dem Primärmetabolismus und dem Sekundärmetabolismus (MADIGAN *et al.*, 2000). Ersterer umfasst alle Biosynthesewege zur Bildung von Produkten, die für grundlegende Prozesse, wie Wachstum und Reproduktion notwendig sind. Dagegen werden im Sekundärmetabolismus Metabolite produziert, die im „normalen“ Lebenszyklus nicht vorkommen (DEMAIN & FANG, 2000). Ihre Bil-

dung erfolgt häufig erst in der stationären Wachstumsphase aus den weniger komplexen Primärmetaboliten. Ihre Funktion ist jedoch im Gegensatz zu den Primärmetaboliten häufig nicht eindeutig geklärt. Sekundärmetabolite können sowohl der Verteidigung gegen konkurrierende Organismen, als Signalstoff als auch als Pigment dienen. Chemisch betrachtet, bieten Sekundärmetabolite eine große Vielfalt und sind häufig biologisch wirksam, wie beispielsweise als Antibiotika, Toxine oder Insektizide und daher auch wirtschaftlich von Interesse (DEMAIN & FANG, 2000). Auch Vertreter der Gattung *Microbacterium* können spezifische Sekundärmetaboliten bilden, die eventuell bioaktive bzw. antibiotische Eigenschaften aufweisen. Untersuchungen konnten bereits belegen, dass Arten der Gattung *Microbacterium* ungewöhnliche Stoffwechselprodukte bei Wachstum auf verschiedenen Kulturmedien produzieren (WICKE *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte bei Bakterien eines *Microbacterium*-Stammes einer Bodenprobe eines Industriegeländes eines Gelatineherstellers eine neuartige Protease isoliert werden (KANAYAMA & SAKAI, 2005). Inwieweit Vertreter dieser Gattung in Lage sind, wachstumshemmende Verbindungen zu produzieren, ist jedoch noch unklar.

## 2.2. Proteinbiochemie und Nachweis von Proteinen

Eine schnelle und sensitive Methode zur Quantifizierung von Proteinen ist der sogenannte Bradford-Test. Dieses photometrische Verfahren ist nach seiner Erfinderin Marion M. Bradford benannt und basiert auf der Bindung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteinen (BRADFORD, 1976). Dabei wird der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt. Dieses führt zu Änderungen der Absorptionsmaxima, die über weite Bereiche proportional zur Proteinkonzentration ist und bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden kann. Diese Linearität wurde durch ZOR & SELINGER (1996) genauer untersucht und durch den Quotienten der Absorptionen bei 590 und 450 nm definiert. Eine weitere Methode bei der Coomassie Brilliant Blue zum Anfärben von Proteinen genutzt wird, ist die von LÄMMLI verfeinerte Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, kurz SDS-PAGE (LÄMMLI, 1970). Hierbei werden die Proteine ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt. Es wird die Eigenschaft des anionischen Detergenz SDS ausgenutzt, die Eigenladung von Proteinen zu überdecken, sodass Micellen mit konstant negativer Ladung entstehen. Nach erfolgter Auftrennung im elektrischen Feld werden die Proteine durch Coomassie Brilliant Blue unspezifisch angefärbt, indem sich der Farbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert. Diese Methode ermöglicht eine schnelle Trennung auch sehr hydrophober und denaturierter Proteine, da alle nach einem Parameter, der molaren Masse, getrennt werden. So erhält man eine Bande für ein Enzym. Der größte Nachteil ist jedoch das Denaturieren der Proteine, sodass sie für biologische Untersuchungen nicht mehr geeignet sind. (LOTTSPREICH & ENGELS, 2006; DANIELS & FRUCHI, 2009)

Die klassische Methode zum Nachweis von Aminosäuren und Proteinen ist der Ninhydrin-Test, bei dessen Reaktion Ninhydrin mit allen primären Aminosäuren einen bei  $\lambda=570$  nm absorbierenden, blauvioletten Farbstoff bildet. Erstmals wurde dieses 1910 von Siegfried Ruhemann beschrieben, weshalb resultierender Farbstoff auch als Ruhemann'sches Purpur bezeichnet wird. Als qualitative und quantitative Nachweismethode von Aminoverbindungen in Organhydrolysaten wurde die Reaktion 1913 von ABDERHALDEN & SCHMIDT eingesetzt, wobei das eigentliche Reagenz 1,2,3-Triketohydrindan-2-Hydrat zum ersten Mal als Ninhydrin bezeichnet und geprägt wurde.



**Abb. 2:** Ninhydrin-Reaktion. Umwandlung eines Molekül Ninhydrin über Decarboxylierung und hydrolytischer Spaltung mit anschließender Dimerisierung zum Ruhemann'schen Purpur.  
Quelle: nach ECOMPOUND.

Bei der Reaktion eines Moleküls Ninhydrin mit der  $\alpha$ -Aminogruppe einer Aminosäure entsteht zunächst eine Schiff'sche Base. Nach der Decarboxylierung der Carboxylgruppe der Aminosäure und der folgenden hydrolytischen Abspaltung des Amino-Restes resultiert Amino-Ninhydrin. Durch Erhitzen kann dieser Vorgang zeitlich beschleunigt werden. Das Aminoketon dimerisiert anschließend mit einem weiteren Molekül Ninhydrin zu farbigen Imin (Ruhemann'sches Purpur). Die charakteristische intensive blauviolette Farbe und dessen hohe Absorption kommen durch das Elektronen-Durchschwingen zwischen den beiden tautomeren Zuständen zustande, wobei eine Wasserstoffbrückenbindung innerhalb des Systems konjugierter Doppelbindungen beteiligt ist (JAENICKE, 2007). Bei der Betrachtung der Reaktion ist erkennbar, dass lediglich das N-Atom der Aminogruppe in das Farbstoffmolekül eingebunden und an der Reaktion teilnimmt (Abb. 2). Aufgrund der Komplexität wurden die Bedingungen standardisiert, um eine quantitative Beziehung zwischen Farbausbeute und Ninhydrin-aktivem Stickstoff zu ermöglichen (STEGEMANN, 1960). Als erstes wurde dieses von STEIN und MOORE 1948 bzw. 1954 in einem modifizierten photometrischen Nachweisverfahren realisiert, wobei vor allem die pH-Konstanz des Milieus und die partielle reversible Reduktion des Ninhydrins durch Luftsauerstoff im Vordergrund stand. Seit dem wurde dieser sensitive Aminosäurenachweis weiterentwickelt und für verschiedenste Methoden einge-

setzt. So dient Ninhydrin als Sprühreagenz beispielsweise zur Visualisierung von Proteinen nach einer Dünnschichtchromatographie. Des Weiteren wird es auf vergleichbare Art zum Sichtbarmachen von Fingerabdrücken eingesetzt (ODÉN & VON HOFSTEN, 1954). Auch im medizinischen Sektor findet die Ninhydrin-Reaktion Verwendung im so genannten Moberg-Test, einem Schweißsekretionstest zur Objektivierung peripherer Nervenverletzungen (MOBERG, 1958). In dieser Arbeit wurde die Ninhydrin-Reaktion als Basis für ein Assay-system eingesetzt, welches den Nachweis von Kollagenaseaktivität ermöglichen sollte.

Bei der Reinigung eines Enzyms spielen mehrere Faktoren eine entscheidende Rolle. Zum einen steigt beispielsweise der Aufwand der Proteinreinigung mit abnehmender Menge an verfügbarem Enzym. Eigenschaften wie der pH-Wert und die Stabilität außerhalb ihres biologischen Milieus sind ebenfalls wichtige zu beachtende Kriterien für die Auswahl der geeigneten Verfahren. Vordergründig ist immer der Erhalt der biologischen Aktivität, was die Reinigung um ein weites erschwert. Daher sind Umgebungsfaktoren wie Pufferkonzentration, Temperatur oder Vorhandensein des entsprechenden Cofaktors zu beachten.

Die Reinigung eines Enzyms ist von entscheidender Bedeutung für die Bestimmung seiner enzymatischen Aktivität. Ziele der Enzymaktivitätsbestimmung sind neben der Ermittlung der Enzymausbeute vor allem die Charakterisierung hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften, ihrer Reinheit und ihrer funktionellen Stabilität. Angegeben wird die Enzymaktivität in verschiedenen Einheiten. Eine häufig genutzte ist die spezifische Aktivität, die meist in Units pro Milligramm Gesamtprotein (U/mg) angegeben wird. Diese Enzymaktivität gibt die Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit des Substrates an, „die von einer bestimmten Enzymmenge im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion bewirkt wird“ (LOTTSPREICH & ENGELS, 2006). Gemessen werden kann die Umsatzgeschwindigkeit über diverse Methoden. Die geläufigsten sind über Photometrie, Fluorimetrie oder auch HPLC. Am häufigsten werden photometrische Messtechniken eingesetzt, bei denen zur Quantifizierung der Substratzusammensetzung die Änderung der Lichtabsorption im sichtbaren oder UV-Bereich gemessen wird. Die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration des absorbierenden Substrates wird durch das Lambert-Beersche-Gesetz ausgedrückt:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

mit

- $A$ : Absorption (Extinktion)
- $I_0$ : Intensität des eintretenden Lichtstroms
- $I$ : Intensität des austretenden Lichtstroms nach dem Probendurchgang
- $c$ : molare Konzentration der absorbierenden Substanz in mol/L
- $d$ : Schichtdicke in mm
- $\varepsilon$ : molarer Absorptionskoeffizient in L/mol·mm.

Es handelt sich um eine Vereinigung des Beerschen-Gesetzes, dass die Proportionalität der Lichtadsorption einer farbigen Lösung zur Konzentration der absorbierten Substanz beschreibt, und dem Bouguer-Lambertschen Gesetz über die Proportionalität der Lichtabsorption zur Länge des Weges, den das Licht durch die Probe zurücklegt bei konstanter Substratkonzentration.

Zur Auswertung von photometrischen Enzymtests wird die Gleichung wie folgt verwendet:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot t}$$

Dabei wird mit  $V$  das Gesamtvolumen in der Testküvette bzw. Mikrotiterplatte und mit  $v$  das Probevolumen bezeichnet.

Um eine möglichst hohe Genauigkeit und Empfindlichkeit der Messung gewährleisten zu können, werden die Messungen bevorzugt bei der Wellenlänge des entsprechenden Absorptionsmaximums durchgeführt. Weiterhin sollte für die Präzision der Messung der Bereich der gemessenen Absorptionswerte zwischen  $A = 0,01$  und  $1,0$  liegen.

Als erster grober Reinigungsschritt eines Proteins bzw. zur Aufkonzentration nach der Fermentation einer Bakterien- oder Pilzkultur wird die fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung eingesetzt.

Die Menge des einzusetzenden Ammoniumsulfates ist neben dem gewünschten prozentualen Sättigungsgrad abhängig vom Volumen und Temperatur der Proteinlösung und lässt sich aus folgender Formel nach SCOPES (1987) berechnen:

$$xg = \frac{533 \cdot (S\%_{soll} - S\%_{ist})}{100 - 0,3 \cdot S\%_{soll}}$$

Die Angabe bezieht sich auf 1 L Lösung bei 20 °C. S % gibt den jeweiligen Sättigungsgrad an.

Da die nun vorliegende Ionenstärke bedingt durch das Salz häufig für weitere Reinigungs- bzw. Analyseschritte ungeeignet ist, gibt es eine Reihe an Möglichkeiten die Probe zu ent- bzw. umzusalzen, falls die Pufferzusammensetzung geändert werden soll.

Die am längsten bekannte Methode ist die Dialyse, bei der über eine Dialysemembran kleine Moleküle frei diffundieren können, während größere zurückgehalten werden.

Eine weitere Methode zum Umsalzen und Entsalzen einer Proteinprobe ist die Gelfiltration (oder auch Gelchromatografie). Hierbei werden die Proteine nach ihrer Größe getrennt basierend auf den unterschiedlichen Permeationen der Analytproteine in das poröse Trägermaterial mit definierter Porengröße. So können Moleküle ab einer bestimmten Größe nicht in die Poren eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront. Kleinere Moleküle, wie Salze, können sich so ungehindert zwischen den Teilchen der stationären Phase bewegen und dringen in die Poren ein, wodurch sie eine Verzögerung erfahren. Die kleinsten Komponenten haben somit die längste Elutionszeit, sodass beispielsweise Salze nach etwa einem Säulenvolumen eluiert werden. Die mobile Phase dient als Lösungsmittel und sollte als sol-

---

ches eine Ionenstärke von 50 bis 100 mM aufweisen, um ionische Wechselwirkungen zwischen Analyt und der stationären Phase zu unterdrücken und um keine hydrophoben Wechselwirkungen zu initiieren. Der Vorteil dieser chromatografischen Trennung liegt in ihrer geringen Störanfälligkeit. Als beeinflussende Parameter liegen lediglich das Trenngel, das Lösungsmittel, der pH-Wert und das Probenvolumen vor. Dadurch wird die Selektivität vorgegeben. Negativ ist das begrenzte Auftragsvolumen, da sonst die Auflösung der Trennung negativ beeinflusst und es zu Bandenverbreiterung und schlechter Peakauflösung kommt (LOTTSPREICH & ENGELS, 2006). Weiterhin lassen sich Proteine nach ihrer unterschiedlichen Ladung reinigen beispielsweise mit Hilfe eines Ionentauschers. Dazu benötigt man jedoch genaue Kenntnisse über das zu reinigende Protein bei der Auswahl der Säule.

### 2.3. Zielsetzung

Vor dem geschilderten Hintergrund ergab sich die Frage, ob es von marinen Bakterien gebildete natürliche Inhibitoren von Kollagenasen schwamm-assoziiierter parasitärer Bakterien gibt. Daher gliederte sich die Aufgabenstellung dieser Arbeit in zwei Teile: Zunächst sollte eine mikrobielle Kollagenase eines marinen Bakteriums isoliert werden. Dafür stand ein Schwamm-assoziiierter Bakterienstamm der Gattung *Alteromonas sp.* zur Verfügung. Nach Kultivierungsversuchen und Nachweis der Existenz eines Kollagen-abbauenden Enzyms erfolgte mit Hilfe von chromatografischen Trennmethoden die Isolierung und Reinigung der Kollagenase. Eigens für den Nachweis und die folgende Charakterisierung der Kollagenase wurde ein Assaysystem basierend auf der Ninhydrin-Reaktion etabliert.

Die zweite Aufgabe umfasste die Isolierung eines inhibierend wirksamen Sekundärmetaboliten aus einem marinen Bakterium. Unter dem Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen wurde der Sekundärmetabolismus von Bakterien der Gattung *Microbacterium* untersucht und über präparative Trennverfahren interessante Substanzen gereinigt. Die wachstums- und funktionshemmenden Fähigkeiten der Substanzen wurden durch Bioaktivitätstests analysiert. Schließlich wurde die dabei isolierte biologisch aktive Substanz auf ihre inhibierende Wirkung gegen die mikrobielle Kollagenase getestet. Dadurch konnten Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen der Bakterien und des Schwamms gezogen werden.

---

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Bakterienstämme, Mikroorganismen und biologische Materialien

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind der Stammsammlung des Kieler Wirkstoff-Zentrums entnommen.

*Alteromonas* sp. Stamm, isoliert von *Tethya aurantium*, 2006 Rovinj, Kroatien (von Kerstin Nagel)

*Microbacterium* Stämme 1 bis 7, isoliert von Wurzelbereich Schilf/Gras Ostsee (von Marco Krämer)

Für die in Kapitel 3.3.1.3 beschriebenen Bioaktivitätstests wurden unterschiedliche Mikroorganismen und biologische Materialien verwendet.

Bakterien: *Bacillus subtilis* (DSM 347), *Escherichia coli* K12 (DSM 498), *Staphylococcus lentus* (DSM 6672), *Xanthomonas campestris* (DSM 2405) und *Propionibacterium acnes* (DSM 1879)

Hefen: *Saccharomyces cerevisiae* (DSM 70449) und *Candida albicans* (DSM 1386)

Pilze: *Septoria tritici* (BASF), *Phytophthora infestans* (BASF) und *Trichophyton rubrum* (Stammsammlung KiWiZ)

Enzyme: Glykogen Synthase Kinase (Millipore, Schwalbach), Acetylcholinesterase (Sigma), Protein Tyrosin Phosphatase 1B (Enzo Life Sciences, Lörrach) und Phosphodiesterase 4 (Biacat, Heidelberg)

Zelllinien: humane Hautfibroblasten (Kieler Institut für Experimentelle Tumorforschung, Sektion für Molekulare Onkologie) und humane Leberkarzinomzellen HepG2 (DSM ACC180).

##### 3.1.2. Kulturmedien und Puffer

Gelatine-Medium (GM)

10 g Gelatine (RUF)

30 g Meersalz (Tropic Marin)

2 g NaNO<sub>3</sub> (Roth)

1 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (Roth)

0,2 g KCl (Roth)

0,2 g Hefeextrakt (BD)

---

**Marine Broth (MB)-Agarplatten**

- 37,5 g Marine Broth (BD Difco)
- 1 min aufkochen

**Glucose-Yeast-Maltextract (GYM+Ca)**

- 10 g Malzextrakt (BD)
- 4 g Glukose (Merck)
- 4 g Hefeextrakt
- 1 g CaCO<sub>3</sub> (Roth)

**Stärke-Pepton-Medium (SPS)**

- 10 g Stärke (Merck)
- 5 g Sojapepton (Merck)
- 10 g Meersalz

**Hafer-Medium (HM)**

- 20 g Haferkleie (Bio Greno)
- 5 g Meersalz

**Corynebakterium-Medium**

- 10 g Caseinpepton, tryptisch (Fluka)
- 5 g Glukose
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl (Roth)

Die Angaben beziehen sich auf je 1 L Flüssigmedium und wurden mit vollentsalzten Wasser aufgefüllt. Für die Herstellung entsprechender Agarplatten wurde dem Medium 15 g Bacto Agar Difco (BD) zugesetzt.

Alle Puffer wurden mit hochreinem deionisierten Wasser hergestellt, der pH-Wert durch die Zugabe von 2 M HCl bzw. 1 M NaOH eingestellt und anschließend autoklaviert bzw. sterilfiltriert (0,2 µm).

**Standardpuffer**

- 50 mM Natriumacetat (VWR)
- 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Roth)
- pH 5



### **3.1.3. Chemikalien und Agenzien**

Die Lösungsmittel Ethanol und Isopropanol wurden von Roth (Karlsruhe) bezogen, ebenso wie HCl, NaOH, NaCl und Tris-HCl. Methanol und Essigsäure stammten von Merck (Darmstadt) und Acetonitril von VWR Scientific (Darmstadt). Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 3.4) wurde Rotiphorese Gel 30, HEPES und TEMED (99 %) von Roth verwendet. Ammoniumpersulfat war von plusone.

## **3.2. Mikrobiologische Methoden**

Für die Anzucht, längere Haltung und zur Überprüfung der Reinheit der Kulturen wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen. Dabei wurde unter sterilen Bedingungen mit einer ausgeglühten Impföse Bakterienmaterial mittels 3-Ösen-Ausstrichtechnik auf der Platte ausgestrichen. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 28 °C unter aeroben Bedingungen.

Zur weiteren Selektion und Bestimmung unterschiedlicher Stoffwechseleigenschaften sowie um Rückschlüsse auf das Wachstum ziehen zu können, wurde von der Platte auf 100 mL Schüttelkultur in 300-mL-Schikanekolben überimpft. Diese dienten des Weiteren als Vorkultur.

Weiterhin wurden Großansätze von 5 bis 10 L aufgeteilt auf je 1 L in 2 L Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen durchgeführt. Hierbei erfolgte das Animpfen mit 0,5 % der Vorkultur. Für optimale Wachstums- und Stoffwechselproduktionsergebnisse erwies es sich als vorteilhaft, mit der ersten Vorkultur eine weitere 100-mL-Schüttelkultur anzuimpfen und ausgehend von dieser den Großansatz zu beimpfen.

Unabhängig vom Volumen wurden die Bakterien unter aeroben Wachstumsbedingungen bei 28 °C und bei 120 rpm auf dem Schüttelinkubator fermentiert.

Das Zellmassewachstum wurde durch Extinktionsmessung bei 600 nm verfolgt sowie die Konzentration freier Aminosäuren mit Hilfe eines Enzymassays (Kap. 3.3.1.1) ermittelt um Rückschlüsse auf die biologische Aktivität zu ziehen.

## **3.3. Proteinchemische Methoden**

### **3.3.1. Proteinnachweis**

Mit Hilfe verschiedener photometrischer Analysemethoden konnten Proteine aufgrund ihrer biologischer Aktivität bzw. spezifischer Bindungseigenschaften nachgewiesen werden.

### 3.3.1.1. Enzymassay Etablierung und Anwendung

#### Nachweis des Umsatzes von Kollagen

Um die Aktivität der Kollagenase bestimmen zu können, wurde ein Assaysystem basierend auf der kolorimetrischen Bestimmung von freien Aminosäuren mit der Verwendung von Ninhydrin nach LEE und TAKAHASHI (1966) eingesetzt. Es wurden zwei Varianten unterschieden: Zum einen der Enzymnachweis im Wachstum und zum anderen der Nachweis von Proteinen. Bei ersteren ging es darum, einen Anstieg der Konzentration an freien Aminosäuren im Verlauf des Wachstums im Kulturmedium nachzuweisen, der auf das Vorhandensein von Kollagenasen schließen ließ. Der Nachweis der spezifischen Aktivität erfolgte dagegen mit der isolierten aufgereinigten Kollagenase.

#### Quantifizierung des umgesetzten Kollagens

Um eine konkrete Aussagen über die Spaltung von Proteinen in freie Aminosäuren durch die Kollagenase treffen zu können, sollte eine Quantifizierung über das Maß an umgesetzter Gelatine erfolgen. Dafür wurde eine Standardgerade einer Gelatinelösung (10 g/L) erstellt. Diese wurde 1:1 mit 6 M HCl versetzt und über Nacht auf 60 °C temperiert. Anschließend folgte die Neutralisation mit 6 M NaOH, da die Ninhydrin-Reaktion nicht im sauren Milieu abläuft. Nach der beschriebenen Methode wurden Gelatinekonzentrationen von 0,03 bis 2,6 g/L mit Ninhydrin-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 10 g/L in Ethanol) versetzt und analysiert.

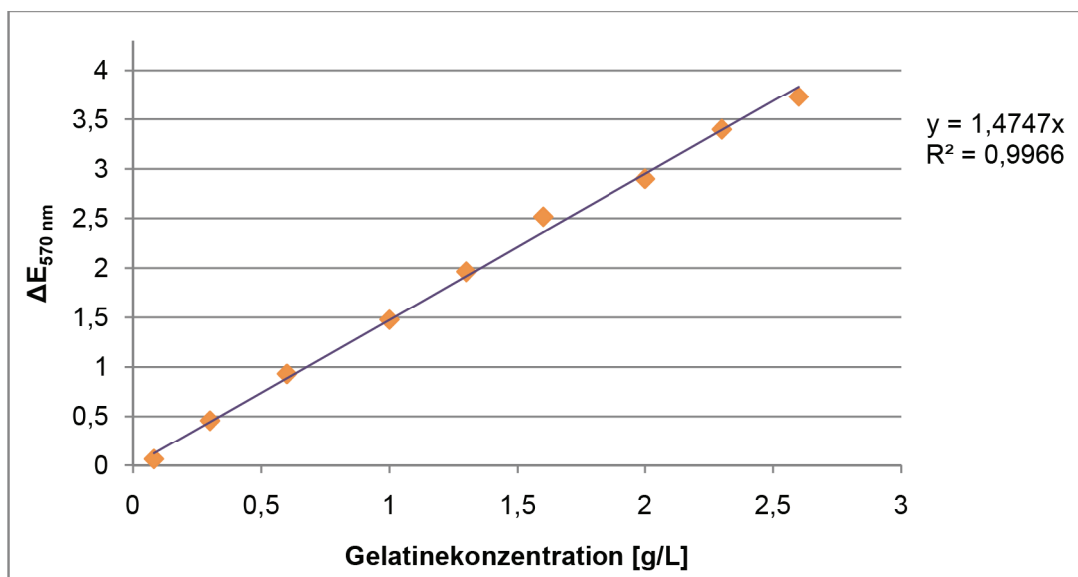


Abb. 3: Standardreihe der Abhängigkeit der Extinktionsdifferenzen von der Gelatinekonzentration.

Wie in Abb. 3 ersichtlich, erbrachte die Abhängigkeit des Extinktionsdifferenzen von der Gelatinekonzentration einen Korrelationskoeffizienten von 0,9966, sodass von einer sehr starken linearen Abhängigkeit auszugehen ist. Demnach kann die Extinktionsdifferenz gemessen bei

570 nm der einzelnen Proben in die umgestellte Formel  $x = y/1,4747$  eingesetzt werden um die umgesetzte Gelatinekonzentration ( $x$ ) berechnen zu können.

Weiterhin kann mit Hilfe der erzielten Ergebnisse der durchschnittliche Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  berechnet werden, der zur Bestimmung der Proteinkonzentration von zentraler Bedeutung ist. Die Berechnung erfolgt mit der vom Lambert-Beersche-Gesetz abgeleiteten Formel:

$$\varepsilon = \frac{E}{c \cdot d}$$

Dabei ist  $E$  die Extinktion,  $c$  die Kollagenkonzentration und  $d$  die Schichtdicke der Mikrotiterplatte, die in diesem Fall 0,5 cm beträgt. Für jeden Wert wird  $\varepsilon$  bestimmt und schließlich der Mittelwert gebildet. Demnach ist  $\varepsilon = 1,422 \text{ E/g/L*cm}$ .

### Enzymnachweis von Protein

Als Nährmedium wurde handelsübliche Gelatine (RUF Lebensmittelwerk KG, Quakenbrück) zu einer Konzentration von 10 g/L gelöst. In einer Mikrotiterplatte wurden 48  $\mu\text{L}$  dieser Gelatinelösung (entspricht 4,8 g/L) mit der Probe (0,1-3,7  $\mu\text{g}$  Protein je Assay) vermischt und mit Standardpuffer (Kap. 3.1.2) auf 100  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 30-60 min bei RT (unter optimierten Bedingungen 60 min bei 58 °C) wurden 100  $\mu\text{L}$  Ninhydrin dazugegeben und eine weitere Inkubation bei 60 °C für 15 min folgte. Nach einer Abkühlphase von 7:30 min wurde die Absorption bei 570 nm mit dem Multimode Microplate reader Tecan Infinite M200 mit Tecan i-control (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH) bestimmt.

Dabei gilt für dieses Testsystem: 1 U ist definiert als 1 g umgesetzte Gelatine (gemessen als freie Aminosäuren) pro Minute in einem Liter Kultur.

### Enzymnachweis im Wachstum

Für den einfachen quantitativen Nachweis freier Aminosäuren, wodurch Rückschlüsse auf die Kollagenaseproduktion einer Kultur möglich waren, wurden 100  $\mu\text{L}$  von dieser mit 100  $\mu\text{L}$  Ninhydrin-Lösung vermischt, 15 min bei 60 °C inkubiert und nach der anschließenden 7:30 minütigen Abkühlphase die Absorption bei 570 nm gemessen.

### Methoden zur Charakterisierung der Kollagenase

Um den optimalen pH-Wert für die aus *Alteromonas sp.* isolierte Kollagenase bestimmen zu können, wurden Puffer mit verschiedenen pH-Werten hergestellt. Für pH 4,5, 5 und 6 wurden 200 mM Natriumacetat und für pH 3 200 mM Natriumcitrat (Roth) verwendet, die mit 1 M HCl auf die entsprechenden pH-Werte eingestellt wurden. Anschließend wurden die Puffer mit 10 g/L Gelatine versetzt.

Um die optimale Temperatur für die Kollagenase bestimmen zu können, wurden mehrfach Proben der aufgereinigten Kollagenase mittels Enzymassay (siehe oben) analysiert. Nachdem die Proben (0,39-0,9  $\mu\text{g}$  Protein je Assay) mit Gelatinelösung (10 g/L) und ggf. Puffer

versetzt wurden, wurden sie bei unterschiedlichen Temperatur von 10 bis 75 °C für 60 min inkubiert. Anschließend konnte Ninhydrin-Lösung hinzugefügt, die Proben nochmals für 15 min temperiert (60 °C) und die Extinktion bei 570 nm bestimmt werden. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die spezifischen Aktivitäten berechnet und prozentual in relativen Aktivitäten dargestellt.

Um zu überprüfen, ob es durch wiederholtes Einfrieren der Kollagenase bei -20 °C zu Verlusten in der Aktivität kommt, wurde eine Probe nach dem Entsalzen mit der Desalting Säule (Kap. 3.3.2) auf ihre Aktivität hin untersucht. Anschließend wurde die Probe bei -20 °C eingefroren. Nach einem Tag erfolgte unter den gleichen Bedingungen eine erneute Aktivitätsbestimmung mit Hilfe des Enzymassays.

Um weiterhin Inhibitoren der Kollagenase zu testen, wurde das aus *Streptomyces*-Arten isolierte Antibiotikum Doxorubicin Hydrochlorid 98 % (Sigma) verwendet. Es wurden Konzentrationen von 100 nM bis 0,2 mM unter Standardbedingungen in den Enzymassay eingesetzt. Daneben wurde ebenfalls die hemmende Wirkung der antibiotisch wirksamen Substanz P6 aus dem *Microbacterium* Stamm 7, vom Lösungsmittel DMSO (das auch zum Lösen der Substanz P6 diente), des Komplexbildners EDTA (Roth), der Aminosäure Cystein sowie als Referenz 1,2 M Ethanol untersucht. Dabei wurden Konzentrationen von 10 µM bis 10 mM in den Enzymassay unter optimierten Bedingungen eingesetzt.

### 3.3.1.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Quantifizierung des Proteingehalts verschiedener Proben wurde eine modifizierte Methode nach Bradford verwendet (BRADFORD *et al.*, 1976) mit der Bradford-Reagenz Roti-Qant 5 x Konzentrat von Roth. Die Messung der Absorption erfolgte nach ZOR & SELINGER (1996) bei 450 und 590 nm sowie nach BRADFORD *et al.* (1976) bei 595 nm. Die Kalibrierung wurde mit einem Standard aus Rinderserum-Albumin (100 µg/mL, Sigma, Deisenhofen) durchgeführt.

### 3.3.1.3. Bioaktivitätstest

Nach der Isolierung durch die PHPLC (Kap. 3.3.4) diente ein Bioassay zur Untersuchung möglicher antimikrobieller Effekte der reinen Substanzen von *Microbacterium*-Sekundärmetabolite. Dabei wurden die in ca. 50 µL der in Methanol gelösten, unter Stickstoff getrockneten und in DMSO wieder aufgenommenen Proben (10 µM) mit einer Methode nach SCHNEEMANN *et al.* (2010) auf ihre Wirkung gegen verschiedene in Kapitel 3.1.1 aufgeführte Bakterien, Hefen, Pilze und biologische Materialien untersucht. Über die Zugabe von Resazurin (Sigma-Aldrich) und der folgenden Absorptionsmessung bei 600 nm und 690 nm erfolgte der Nachweis. Als Kontrollen für eine hemmende Wirkung wurden verschiedene Konzentrationen Chloramphenicol (Sigma) und Cycloheximid (Sigma) verwendet. Um spezi-

fisch die Hemmung gegen Enzyme zu untersuchen, wurden die Substanzen P1 bis P9 in unterschiedliche enzymatische Tests eingesetzt. Die hemmende Wirkung gegen Glykogen Synthase Kinase wurde mit einem Lumineszenzassay nach BAKI *et al.* (2007) nachgewiesen. Die Aktivität der Acetylcholinesterase wurde nach dem kolorimetrischen Assay von ELLMAN *et al.* (1961) gemessen. Eine mögliche Aktivität gegen die Protein Tyrosin Phosphatase 1B wurde mithilfe des Biomol Green™ PTP1B tyrosin phosphatase drug discovery Kits (Enzy Life Science GmbH, Lörrach) nach Angaben des Herstellers überprüft. Die Aktivität der Phosphodiesterase 4 wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers mithilfe des PDE Light HTS cAMP Phosphodiesterase Kits (Lonza, Rockland, USA) ermittelt. Die Auswertung der hemmenden Wirkung erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$$\text{Hemmung} = 100\% - \frac{(\text{Probe} - \text{Blank}) \cdot 100}{\text{Negativkontrolle} - \text{Blank}}$$

Bei der Negativkontrolle handelte es um Kulturmedium mit entsprechendem Organismus, der ohne Hemmung wachsen konnte. Das Ergebnis wurde in % hemmende Wirkung im Vergleich zu den entsprechenden Konzentrationen jeweiliger Positivkontrolle (Chloramphenicol, Nystatin, Cycloheximid, Clotrimazol, Tamoxifen, TDZD-8, Huperzine A, Suramin, Rolipram in Konzentrationen von 0,1 bis 50 µM) angegeben.

### 3.3.2. Proteinextraktion und -aufreinigung

#### Ammoniumsulfat-Fällung

Die Extraktion des Großansatzes des *Alteromonas sp.* Stammes erfolgte durch einen ersten Zentrifugationsschritt bei 8000 x g und 4 °C für 15 min mit der Induction Drive Centrifuge von Beckmann (Model J2-21M mit JA-10 Rotor). Der Kulturüberstand wurde aufgefangen und im Wasserbad gekühlt. Der erste Fällungsschritt erfolgte bei 40 % Sättigung mit Ammoniumsulfat (Roth). Die entsprechende Menge Ammoniumsulfat wurden portionsweise in den Überstand eingerührt und anschließend 30 min weitergerührt bis sich das Salz gelöst hatte. Nach der Präzipitation der Proteine konnten diese bei 8000 x g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde nun dekantiert und das Volumen bestimmt. Anschließend konnte die entsprechende Menge an Ammoniumsulfat für die nächsten Fällungsschritte untergerührt werden bis eine Sättigung von zunächst 60 % und letztendlich 80 % mit Ammoniumsulfat erreicht war. Die resultierenden Proteinpellets der einzelnen Ammoniumsulfat-Fractionen wurden gesammelt und in 1-2 mL Standardpuffer wieder aufgenommen. Bis zu weiteren Untersuchungen wurden sie bei -20 °C gelagert.

#### Gelfiltration

Zur Entfernung des Restsalzes resultierend aus der Ammoniumsulfat-Fällung erfolgte im Anschluss eine Gelfiltration mit der HiTrap Desalting Säule 5 x 5 mL (GE Healthcare Bio-

Sciences AB, New York, NY). Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. Der eingesetzte Puffer bestand aus dem Standardpuffer (Kap. 3.1.3) mit zusätzlichen 25 mM NaCl.

Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Gelfiltration mit der HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule (CV: 120 mL) von GE Healthcare eingesetzt. Sie wurde mit Hilfe des ÄKTApurifier-Systems UPC 10 mit der Software UNICORN (GE Healthcare) durchgeführt. Nach dem Äquilibration mit zwei Volumina Standardpuffer (Kap. 3.1.3) mit 150 mM NaCl folgte ein manueller Probenauftrag von ca. 2 mL. Mit einer Flussrate von 1 mL/min wurde mit dem gleichen Puffer eluiert. Das Eluat wurde in Fraktion von 1 mL Größe gesammelt. Die Elution der Proteine von der Säule wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt.

Nach erfolgter Gelchromatografie wurden die aktiven Fraktionen mit Hilfe des Enzymassays (Kap. 3.3.1.1) und die Proteinkonzentration mittels Bradford (Kap. 3.3.1.2) ermittelt.

### Fällung mit Trichloressigsäure

Zur Aufkonzentrierung der Proteinmenge für den Einsatz in die SDS-PAGE (Kap. 3.3.3) wurden die Proben mit 30 % TCA (Roth) versetzt, wobei eine Endkonzentration von 10 % erreicht wurde (BENNETT, 1967). Nach einem Zentrifugationsschritt und dem Verwerfen des Überstandes wurde das Proteinpellet in 5 µL 1 M Tris (pH 9), 5 µL Milli-Q und Auftragspuffer (siehe 3.3.3) aufgenommen.

### 3.3.3. Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) diente, neben der Reinheitskontrolle während der Proteinreinigung, der Bestimmung der apparenten molekularen Masse der gereinigten Enzyme. Die Elektrophorese erfolgte nach LÄMMLI (1970) in 14%-igen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0,1 cm) in einer Mini Protean 3 Elektrophorese-Zelle (Biorad, München). Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung (LÄMMLI, 1970):

	Trenngel (14 %)	Sammelgel (6 %)
37,5 % Acrylamid 1 % Bisacrylamid	1,867 mL	0,32 mL
10 % SDS	0,105 mL	0,04 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,05 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,254 mL
Milli-Q	1,978 mL	1,386 mL
20 % Ammoniumpersulfat	21,43 µL	10,7 µL
TEMED	2,14 µL	1,01 µL

Die Proben wurden 1:1 mit Auftragspuffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 25 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau, 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol von Biorad) versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und in die Geltaschen pipettiert.

Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1 x SDS-Laufpuffer bestehend aus 25 mM Tris mit 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS (pH 8,3) von Biorad verwendet. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 70 V für 10 min. Die Trennung der Proteine über das Trenngel lief bei 210 V für 50 min ab. Als Molekulargewichtsmarker diente der Standard PageRuler Plus Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific (Bremen). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine für mindestens 10 min in 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure im Gel fixiert und anschließend mit 0,03 % Coomassie Brilliant Blau R250 (Serva, Heidelberg) in 10 % Essigsäure gefärbt. Die Entfernung von nicht-proteingebundenem Farbstoff erfolgte mit 10 % Essigsäure.

### **3.4. Chemisch-analytische Methoden**

#### **Extraktion mittels Ethylacetat**

Für die Extraktion der 100-mL-Kulturen wurden ca. 5 mL Probe der Bakterienkultur steril in ein 15-mL-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Die Extraktion erfolgte bei einem pH-Wert von etwa 4, der mittels 1 M HCl eingestellt wurde. Anschließend wurden 5 mL Ethylacetat (Fluka, Steinheim) in das Röhrchen gegeben und dieses kräftig geschüttelt, wodurch es zu einer Mischung der Phasen kam. Durch die Protonen der Säure wurden die Ladungen der Substanzen ausgeglichen und gingen wie generell apolaren Teilchen in die organische Phase des Ethylacetats über. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4300 x g für ca. 60 s in der Heraeus Biofuge fresco von Kendro, um die gemischten Phasen wieder voneinander zu trennen. Die lipophilen Sekundärmetabolite lagen weiterhin in der organischen Phase vor, die mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in einen 10-mL-Spitzkolben pipettiert wurden. Die Interphase und die wässrige Phase konnten ebenso wie das Zellpellet verworfen werden. Die organische Phase wurde mit dem Rotationsverdampfer bei einem Druck von 175 mbar und einer Temperierung der Probe auf 40 °C aufkonzentriert. Nach vollständigem Verdampfen des Ethylacetats wurde die Probe in 500  $\mu$ L Methanol resuspendiert. Dieses wurde mit einer 2-mL-Sterilspritze aufgenommen und über einen Filter (0,2  $\mu$ m) in ein HPLC-Vial geben. Die Proben wurden im Anschluss mittels HPLC analysiert oder bis dahin bei 4 °C gelagert.

Die Extraktion des Großansatzes verlief vergleichbar zum Aufschluss von weniger Probenvolumen. Um den optimalen Zeitpunkt für die Ernte zu gewährleisten, wurde zunächst eine Probe nach beschriebener Methode extrahiert und mittels HPLC analysiert. Im Anschluss wurden von den 10 L Bakterienkultur je 500 mL in ein Becherglas gegeben und ein pH-Wert von ca. 4 mittels HCl-Zugabe eingestellt. Die angesäuerte Probe wurde in einen Scheide-

trichter umgefüllt und mit ca. 1 L Ethylacetat vermengt. Nach der erfolgten Phasentrennung konnten die Phasen über ein Ventil separat abgelassen werden. Die organische Phase wurde in einen Kolben gefüllt und mit dem Rotationsverdampfer einrotiert.

### Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Zum Nachweis und zur Charakterisierung der Sekundärmetabolite wurden die Extrakte mit einem gekoppelten Verfahren aus der Hochleistungsflüssigchromatographie und der Massenspektrometrie analysiert (HPLC-MS).

Die analytischen HPLC-Messungen erfolgten mit dem LaChrom Elite-System mit Diode Array Detector der Firma VWR-Hitachi. Die Extrakte wurden standardmäßig über eine monolithische C18-Säule (Phenomenex Onyx monolithic C18, 100 x 3,0 mm) aufgetrennt, die konstant auf 40 °C erwärmt wurde. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL je Extrakt. Weiterhin wurde für die Läufe ein binärer Elutionsmittelgradient aus Milli-Q und Acetonitril, jeweils versetzt mit 0,1 % Ameisensäure, eingesetzt, der nachfolgend aufgeführt ist.

Dauer:	0 min	4 min	7 min
ACN:	10 %	60 %	100 %

Die Massenspektren wurden mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer esquire4000 (Bruker) aufgenommen.

Die Auswertung der Massenspektren gekoppelt an die UV/VIS-Chromatogramme der analytischen HPLC erfolgte mit dem Programm Data Analysis (Bruker).

### Präparative HPLC

Zur Isolierung einzelner Proteinfractionen der *Microbacterium*-Sekundärmetabolite wurde nach der HPLC-Untersuchung das gewonnene Extrakt in 6 mL Ethanol gelöst und auf eine Säule (L: 100 cm, d: 3 cm) aus LH-20 Material (GE Healthcare) gegeben und nach Größe aufgetrennt. Bei einer Flussrate von 3 mL/min wurden die Fraktionen separiert aufgefangen, erneut mittels HPLC analysiert und darauf basierend gepoolt oder verworfen.

Um die Substanzen möglichst rein gewinnen zu können, folgte nach der Gelfiltration die Isolierung mittels präparativer HPLC (PHPLC). Die unter Stickstoff getrockneten Fraktionen wurden in 5 mL Methanol resuspendiert und mit einem lösungsmittelbeständigen Filter (0,45 µm) filtriert. Anschließend wurden sie über die Phenomenex Gemini 5u C18 (110 Å, Axia, 100 x 21,20 mm, 5 micron) mit der präparativen Anlage LaChrom Elite-System der Firma Merck-Hitachi gespült und aufgetrennt. Dazu wurde ein Eluentensystem basierend auf Wasser und Acetonitril verwendet, dem 0,1 % Ameisensäure zugesetzt wurde. Die Gradienten wurden anhand der Retentionszeiten der zu isolierenden Substanzen aus analytischen HPLC-MS-Läufen gewählt und sind nachfolgend aufgeführt.



---

Säule:	Gemini-NX von Phenomenex (Partikelgröße 5 $\mu\text{m}$ , Porengröße 110 $\text{\AA}$ , Länge 100 mm, innerer Durchmesser 21,2 mm)	
Stationäre Phase:	C18, vollporöse Organo-Silica mit Ethan-Vernetzungen, Organosilane	
Flussrate:	15 mL/min	
mobile Phase:	Gradient	Detektionswellenlänge
	I. 10-50 % ACN	280 nm
	II. 33-40 % ACN	260 nm
	III. 30-45 % ACN	310 nm
	IIII. 15-40 % ACN	250 nm

---

Die isolierten Fraktionen wurden mit Hilfe einer Vakuumentrifuge eingetrocknet und bei 4 °C gelagert.

### **Kernspinresonanzspektroskopie**

Um die Struktur der mittels PHPLC gereinigten Proben aufzuklären, wurde die NMR-Spektroskopie (engl.: *nuclear magnetic resonance*) eingesetzt. Alle NMR-Spektren wurden extern in der spektroskopischen Abteilung des Otto-Diels-Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel aufgenommen.

Die Proben wurden hierfür im deuteriertem Lösungsmittel Methanol gelöst und in ein NMR-Röhrchen gefüllt. Die Messungen erfolgten an den NMR-Spektrometern Bruker DRX500 sowie Bruker Avance 600 mit einem Cryo-Probenkopf. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der MestRe-C-Software (Mestrelab Research) für NMR-Spektren.

## 4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen zusammenfassend dargestellt. Zunächst wurde eine marine Kollagenase aus einem *Alteromonas sp.* Stamm isoliert und aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Entwicklung eines robusten Enzymassays zum Nachweis dieser und darauf basierend die Charakterisierung des Enzyms. Schließlich konnte eine aus einem *Microbacterium*-Stamm isolierte Substanz und weitere Inhibitoren auf ihre Wirkung gegenüber der spezifischen Aktivität der Kollagenase analysiert werden.

### 4.1. Isolierung einer Kollagenase eines *Alteromonas sp.* Stamm

#### 4.1.1. Kultivierung

Ein Stamm des marinen Bakteriums *Alteromonas sp.* wurde auf zwei unterschiedlichen Medien auf Agarplatten kultiviert. Zum einen auf Komplexmedium (MB-Agar mit vor allem Peptiden und Aminosäuren als C-Quelle) und zum anderen auf gelatinehaltigen GM-Agar (Minimalmedium mit Gelatine als Hauptenergiequelle). Nach 24 h war auf beiden Platten Wachstum zu verzeichnen. Im Gegensatz zu dem MB-Agarplatten, auf denen das Bakterium wenige große runde Kolonien bildete, konnte auf dem GM-Agar ein breites Wachstum kleiner Kolonien beobachtet werden, sodass sich die Kulturen mit der Zeit über die gesamte Platte erstreckten. In beiden Fällen waren die Kolonien beige, klar und schleimig (Abb. 4). Eine Präferenz hinsichtlich des Wachstums konnte nicht festgestellt werden.



Abb. 4: Vergleich des Wachstums von *Alteromonas sp.* auf MB-Agar (links) und GM-Agar (rechts).

Die mikroskopische Betrachtung zeigte folgendes Bild der *Alteromonas sp.*:

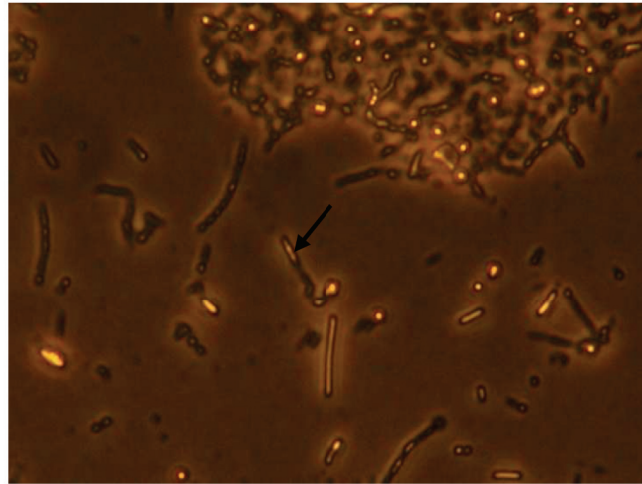


Abb. 5: *Alteromonas sp.* unter Lichtmikroskop mit 100 x Vergrößerung.

Deutlich zu erkennen ist, dass die Bakterien stäbchenförmig und zum Teil leicht gekrümmt sind. Sie lagern sich zu Ketten zusammen und bilden so die sichtbaren Kolonien. Weiterhin sind sie mobil.

Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die Ernte mit höchstmöglicher Kollagenasekonzentration bei gleichzeitig hoher Wachstumsrate wurden Vorkultivierungen vorgenommen. Es wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben 100 mL gelatinehaltiges Flüssigmedium angeimpft, inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen und photometrisch untersucht. Zum einen wurde die optische Dichte bei 600 nm sowie zum anderen mittels Enzymassays (Kap. 3.3.1.1) der Gehalt an freien Aminosäuren bestimmt. Daraus konnten die in Abb. 6 grafisch dargestellten Ergebnisse gewonnen werden.

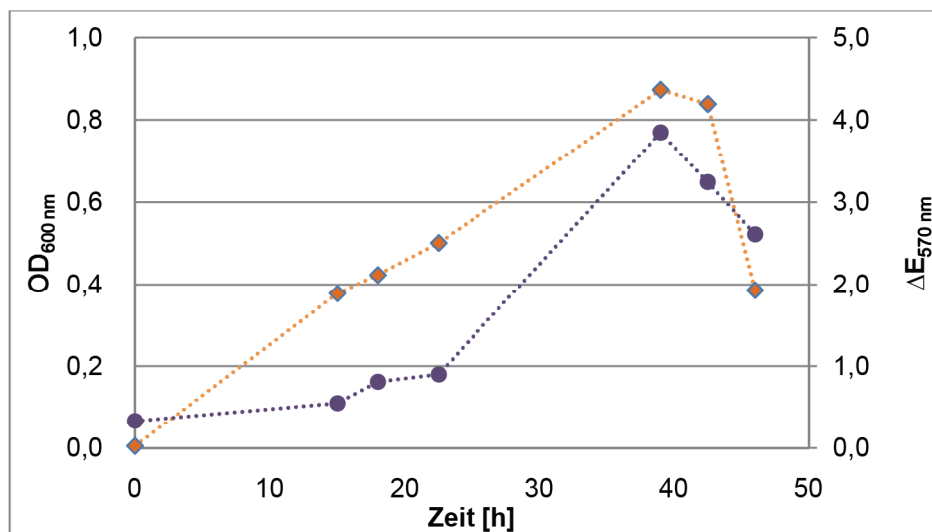


Abb. 6: Wachstumskurve (optische Dichte bei 600 nm) und Bestimmung der freigesetzten Aminosäuren (Absorption bei 570 nm) von *Alteromonas sp.* in 100 mL GM, 28 °C, 120 rpm. ♦ OD<sub>600 nm</sub>, ● ΔE<sub>570 nm</sub>

Aus dem Diagramm geht hervor, dass die Zelldichte stetig ansteigt. Zwischen 30 und 37 h ist dann die maximale Zellmasse erreicht und die Kurve beginnt zu sinken. Ähnlich dazu verhält

sich der Gehalt an freien Aminosäuren. Zu Beginn steigt dieser nicht bzw. nur leicht. Ab einer Inkubationsdauer von 22 h nimmt die Konzentration sprunghaft zu und sinkt schließlich mit abnehmender Zellmasse. Die höchste Kollagenaseproduktion wird zum Zeitpunkt der maximalen Konzentration an freien Aminosäuren und vor dem maximalen Wachstum vermutet, in diesem Fall zwischen 30 und 35 h. Das theoretisch mögliche exponentielle Wachstum der Bakterien wurde durch die mangelnde Nährstoffversorgung des gelatinehaltigen Minimalmediums limitiert, wodurch die Zunahme der Zellmasse nur linear erfolgte. Durch Probenahmen und andere Verfahrensschritte war zudem eine ideale Sauerstoffversorgung nicht gewährleistet.

Weiterhin wurde untersucht, ob es einen Unterschied im Wachstum und dem Gehalt an freien Aminosäuren gibt, wenn die 100 mL GM-Medien von GM-Agarplatten oder flüssigem GM-Vorkulturen mit *Alteromonas sp.* angeimpft werden. Dabei wurde deutlich, dass es anscheinend keine Abhängigkeit von der Vorkultur gibt. Sowohl die Probe, die von der flüssigen Vorkultur angeimpft wurde, als auch die, die direkt von der gelatinehaltigen Agarplatte beimpft wurde, zeigten ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten. Nach einer 22 h Inkubation, wobei die Zellmasse stetig anstieg, konnte bei beiden Proben eine optische Dichte von 0,39 bzw. 0,375 festgestellt werden. Die Betrachtung der Konzentration an freien Aminosäuren hingegen ist nicht dementsprechend eindeutig. Beide Proben wiesen zum Anfang ähnliche hohe Konzentrationen auf, die langsam stiegen. Bei der durch Flüssigkultur angeimpften Probe kommt es nach 18,5 h zu einer stärkeren Abnahme der freien Aminosäuren als bei der anderen Probe, die jedoch in der Konzentration ebenfalls stagniert. Im Anschluss erfahren beide Proben einen etwa gleich starken Anstieg, sodass die von der Agarplatte beimpfte Probe zwar einen höheren Endgehalt an freien Aminosäuren aufweist, insgesamt die Verlaufsformen aber sehr ähnlich sind.

Um den Gewinn an Kollagenase zu erhöhen, wurden Großversuche durchgeführt. Diese wurden zu je 1 L Kollagenmedium in 2-L-Schikanekolben angesetzt. Dabei wurden Auswirkungen der Vorkultivierung und des Animpfen auf das Wachstum und die Freisetzung der Aminosäuren des *Alteromonas sp.* untersucht. Dadurch sollte die Konzentration an Kollagenase optimiert und weiterhin der Zeitpunkt für die Ernte überprüft werden.

In beiden Ansätzen wurde das Gelatinemedium ausgehend von einer 100 mL Vorkultur angeimpft. Diese Vorkulturen unterschieden sich in ihrer Beimpfung: Zum einen wurde direkt von der GM-Agarplatte in das flüssige Medium überimpft und zum anderen erfolgte eine weitere Anzucht des *Alteromonas sp.* in einer 100 mL Vorkultur. Beim Betrachten des Wachstums fiel im Vergleich auf, dass die Kultur, bei der das marine Bakterium in zwei gelatinehaltigen Flüssigmedien vorkultiviert wurde, ein um ca. 5 % höheres Wachstum nach 29 h aufweist. Die maximale Konzentration der freien Aminosäuren war jedoch bei dieser 1 L Kultur deutlich geringer (ca. 15 %). Ebenfalls auffällig war, dass diese Konzentration bereits nach

27 h messbar war und dann stetig abnahm. Bei der 1 L Gelatinekultur, deren Vorkultur von der Agarplatte mit *Altermonas sp.* beimpft wurde, stieg der Gehalt an Aminosäuren bis zum Zeitpunkt 30 h, wo die Ernte stattfand. In beiden Fällen war eine lineare Wachstumszunahme bis nach 29 h Inkubation zu erkennen, die dann abnahm bzw. konstant blieb. Der optimale Zeitpunkt für die Ernte war somit für Kultur mit zwei Vorkulturen bei 29 h anzusehen, da hier das Wachstum maximal und die Aminosäuren abnehmend waren. Dagegen lag dieser Zeitpunkt bei der anderen Kultur bei 30 h, da die Konzentration an freien Aminosäuren bis dahin zunahm, obgleich das Wachstum bereits sein Maximum erreicht hatte.

Fazit: Als Vorkultur wurde der *Alteromonas sp.* Stamm in flüssigen Gelatinemedium angezogen und in eine weitere GM-Flüssigkultur überimpft. Erst dann erfolgte das Animpfen des Großansatzes. Die Ernte erfolgte nach 29 bis 30 h Inkubation in Abhängigkeit vom Wachstumsverlauf und der Konzentration freigesetzter Aminosäuren.

#### 4.1.2. Etablierung eines robusten Enzymassays für die Aufreinigung einer Kollagenase

Im Enzymassay war bei allen Proben eine hohe Hintergrund-Absorption messbar. Da dieses mögliche biologische Aktivität überdecken könnte, wurde die Ursache durch verschiedene Analysen versucht zu klären und zu minimieren.

##### TCA-Fällung

Um überschüssiges Protein zu entfernen, sollte eine Fällung mit 10 % TCA Endkonzentration durchgeführt werden. Durch die Zugabe der Säure werden elektrostatische Anziehungen und Wasserstoffbrücken der Proteine aufgebrochen, sodass diese durch Zentrifugieren gefällt werden können. Da dieses für freie Aminosäuren nicht zutrifft, liegen sie getrennt von Proteinen im Überstand vor.

Um die Effizienz dieser Methode zu überprüfen, wurden eine Probe der Gelatinelösung (10 g/L) und eine Aminosäure gefällt. Der nach dem Zentrifugationsschritt resultierende Überstand wurde 1:1 mit Ninhydrin-Lösung versetzt, temperiert (60 °C, 15 min) und die Absorption bei 570 nm gemessen. Vergleichend wurden Proben ohne TCA-Zusatz identisch untersucht. Dabei konnten folgende Extinktionen erzielt werden (Tab. 1):

Tab. 1: Einfluss der TCA-Fällung als Aufarbeitungsschritt auf das Ninhydrin-gekoppelte Assaysystem.

	$\Delta E_{570 \text{ nm}}$	
	Freie Aminosäure	Gelatinelösung
Mit TCA-Fällung	1,62	0,04
Ohne TCA-Fällung	3,51	0,05

Erwartungsgemäß wurde die Gelatinelösung gefällt, sodass sie nicht nachweisbar war. Ebenso zeigte sich, dass die freien Aminosäuren weiterhin nachweisbar waren. Es scheint jedoch durch die TCA-Fällung zu Verlusten zu kommen, da ohne diesen Aufarbeitungsschritt die Extinktion mehr als doppelt so hoch war. Aufgrund der hohen Verluste wurde die TCA-Fällung als möglicher Aufreinigungsschritt vor dem Enzymassay ausgeschlossen.

### **Einfluss des Ammoniumsulfats auf den Enzymassay**

Durch die Proteinfällung mit Ammoniumsulfat war ein gewisser Gehalt des Salzes in den Proben verblieben. Daher wurde ein möglicher Einfluss des Ammoniumsulfates auf die Detektionsreaktion untersucht. Dazu wurden eine gesättigte Salzlösung sowie Verdünnungen dieser hergestellt und durch eine 1:1 Ninhydrin-Zugabe und der entsprechenden Temperierung die resultierende Extinktionsdifferenz bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bereits bei einer Sättigung von 30 % ein starker Hintergrund vorhanden ist (Tab. 2).

Tab. 2: Beeinflussung des Nachweis freier Aminosäuren durch Ammoniumsulfat.

<b>Sättigung mit Ammoniumsulfat [%]</b>	30	60	80	100
$\Delta E_{570 \text{ nm}}$	0,289	0,729	2,15	2,68

Weiterhin nimmt der Hintergrund linear zu, sodass die Beeinträchtigung durch das Salz als sehr stark eingeschätzt wurde und daher abgetrennt werden musste.

### **Entsalzen der Probe über eine Gelfiltration**

Das Entfernen des verbliebenen Ammoniumsulfats erfolgte zum einen gemäß Kapitel 3.3.2 mit der Desalting Säule. Die Proteinpellets der Fällung mit 60 % und 80 % Ammoniumsulfat-Sättigung sowie das Zellpellet wurden für die Untersuchung verwendet. Dabei wurden die Proben verdünnt. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass der Hintergrund der Proben im Enzymassay geringer wurde. Weiterhin konnte die Aktivität des Pellets, das bei der 60 %igen Sättigung erhalten wurde, hervorgehoben und bekräftigt werden. Ein einzelner Reinigungs- und Entsalzungsschritt mit der Superdex 200 erwies sich als wenig vorteilhaft.

Zusammenfassend konnten Proben mit einem Mindestproteingehalt von 0,1 µg/Assay nach dem Entfernen des Ammoniumsulfates mittels Desalting Säule unter Standardbedingungen problemlos nachgewiesen werden.

#### **4.1.3. Aufreinigung der Kollagenase aus *Alteromonas sp.***

Die Ernte und Ammoniumsulfat-Fällung der *Alteromonas sp.* Kultur erfolgte gemäß der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Methodik. Die dabei entstandenen Zell- und Proteinpellets wur-

den zur Lokalisierung der Kollagenase mittels Enzymassay (Kap. 3.3.1.1) auf ihre biologische Aktivität überprüft.

### **Lokalisierung des Enzyms**

Es wurden zwei unterschiedliche Probenvolumen der Zell- und Proteinpellets in den Enzymassay eingesetzt und verschiedene Inkubationszeiten gewählt. Aufgrund der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass sich die Kollagenase im Proteinpellet, das aus der Ammoniumsulfat-Fällung mit 60 % Sättigung stammt, befindet. Beim Zellpellet ist kein Zusammenhang zwischen Probevolumen und Aktivität erkennbar, ebenso wie bei dem Proteinpellet aus der Fällung mit 80 %iger Ammoniumsulfat-Sättigung. Daher scheint die Kollagenase extrazellulär lokalisiert zu sein und bereits bei 60 %-Sättigung auszufallen.

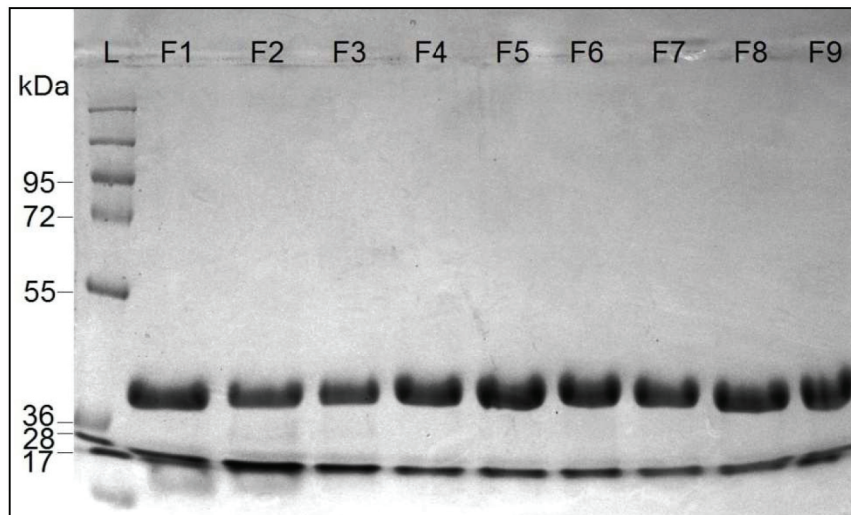
### **Ermittlung der nötigen Ammoniumsulfat-Konzentration**

Im weiteren Vorgehen wurde versucht die Sättigungsrate der Ammoniumsulfat-Fällung zu senken um den Gehalt an unspezifischen Proteinen zu verringern. Dazu wurde der Kulturüberstand vor der 60 %igen mit 40 % Ammoniumsulfat gesättigt. Bei der erneuten Bestimmung der biologischen Aktivität konnte gezeigt werden, dass der Hauptteil der Kollagenase bereits bei der niedrigeren Sättigung gefällt wurde, sodass diese beibehalten wurde.

### **Reinigen über Gelfiltration**

Nach dem Entfernen des Ammoniumsulfates durch die Gelfiltration mit der Superdex 200 wurde basierend auf dem Ergebnis, das immer noch einen hohen Salzgehalt vermuten ließ, eine weitere Entsalzung des Proteinpellets der Ammoniumsulfat-Fällung bei einer Sättigung von 40 % mit der Desalting Säule durchgeführt. Da dieses zwangsläufig zu einer weiteren Verdünnung der Probe führt, wurden die Kollagenase enthaltenden Fraktionen gepoolt und eine erneute Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Die Sättigung mit Salz betrug 56 %. Da nach dem anschließenden Entfernen des Ammoniumsulfates noch ein hoher Gehalt an unspezifischen Proteinen neben der Kollagenase enthalten war, wurde die Proben mit Hilfe der Superdex 200 (Kap. 3.3.2) bei einer Flussrate von 1 mL/min aufgereinigt. Es konnten 5 ml kollagenasehaltiger Probe mit einem Proteingehalt von 0,135 mg/mL gewonnen werden.

Um die Reinheit und Größe der Kollagenase bestimmen zu können, wurde von einzelnen Fraktionen des Peaks eine SDS-PAGE durchgeführt. Das dabei erhaltene Bild ist in Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 7:** SDS-PAGE von *Alteromonas sp.*-Kollagenase nach Reinigung mittels Superdex 200 und Standardpuffer mit 150 mM NaCl, aufgetragene Proteinmenge 20 µg. L: Molekulargewichtsstandard; F1 – F9: Fraktionen der Gelfiltration

Deutlich zu sehen ist bei allen Fraktionen eine Proteinbande in Höhe von ca. 40 kDa. Weiterhin sind keine spezifischen oder unspezifischen Banden aus der Probe zu erkennen, was von einer hohen Reinheit der Kollagenaseprobe ausgehen lässt. Die Doppelbande bei 28 und 17 kDa ist auf das verwendete SDS zurückzuführen und hat keinen Einfluss auf die Probe.

### Ausbeute

Die Kollagenase von *Alteromonas sp.* wurde nach der Kultivierung in 5 L Gelatinemedium nach 30 h geerntet und mittels Ammoniumsulfat-Fällung extrahiert. Dabei konnte die Ausbeute aufgrund der Abtrennung unspezifischer Proteine gesteigert werden. Nach einem ersten Reinigungsschritt durch die Gelfiltration mit der Superdex 200, lag die Ausbeute bei 3,7 %. Der Aktivitätsverlust ist auf das Einfrieren der Probe zurückzuführen. Anschließend erfolgte ein Poolen der Kollagenase-enthaltenden Fraktionen. Zur Aufkonzentration des Proteins wurde eine erneute Ammoniumsulfat-Fällung mit 56 %-Sättigung durchgeführt und die Probe im Anschluss entsalzt. Nach dem letzten Reinigungsschritt mit Hilfe der Superdex 200 wurde die Kollagenase mit einer Gesamtausbeute von 0,98 % und einer spezifischen Aktivität von 6,1 U/mg 7,8-fach angereichert (Tab. 3).



**Tab. 3:** Ausbeute der Isolierung und Aufreinigung der Kollagenase aus *Alteromonas sp.*

Reinigungsschritt	Aktivität [U]	Protein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungsfaktor
GM-Kultur nach 30 h	86,5	111	0,78	100	1
Ammoniumsulfat-Fällung mit 40 % Sättigung	152,3	33,6	4,5	176	5,8
Superdex 200	4,46	3,02	1,47	5,2	1,9
Desalting Säule nach AS-fällung mit 56 % Sättigung	0,98	0,62	1,58	1,1	2
Superdex 200	0,85	0,14	6,1	0,98	7,8

## 4.2. Charakterisierung der bakteriellen Kollagenase

### 4.2.1. Bestimmung des pH-Optimums

In dem Enzymassay wurden die spezifischen Aktivitäten bei verschiedenen pH-Werten ermittelt (Kap. 3.3.1.1).

**Tab. 4:** Spezifische Aktivität der Kollagenase bei verschiedenen pH-Werten.

pH-Wert	3	4,5	5	6
Spezifische Aktivität [U/mg]	0	8,7568	8,8595	7,375

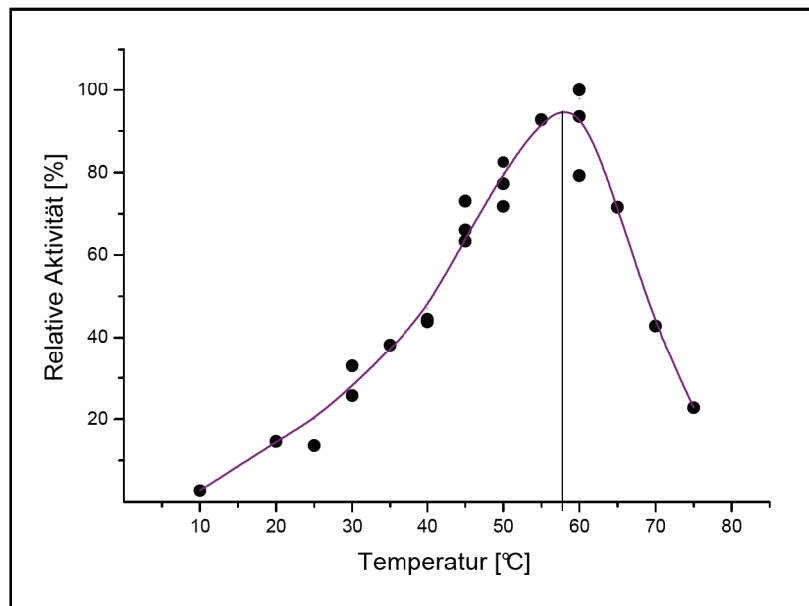
Deutlich zu sehen ist, dass bei stark saurem pH-Wert keinerlei enzymatische Aktivität stattfindet. Am höchsten war die spezifische Aktivität der Kollagenase bei pH 5. Jedoch konnte auch bei pH 4,5 eine ähnlich hohe spezifische Aktivität gemessen werden. Zum neutralen pH-Bereich hin nahm die Aktivität ab. Daher liegt das pH-Optimum zwischen 4,5 und 5. In den folgenden Experimenten wurde mit pH 5 gearbeitet.

### 4.2.2. Temperaturabhängigkeit

Einer der wichtigsten Faktoren in der Enzymkinetik ist die Temperatur. Zum einen wurde festgestellt, wo die optimale Temperaturbereich für die Kollagenase liegt und weiterhin die Temperaturstabilität hinsichtlich der Lagerung untersucht.

#### Optimierung des Temperaturbereichs

Die Analyse zur Optimierung der Temperatur, bei der die Kollagenase aus dem *Alteromonas sp.* Stamm ihre maximale spezifische Aktivität erreicht, erbrachte die in Abb. 8 dargestellte Temperaturkurve.



**Abb. 8:** Temperaturabhängigkeit der Kollagenase aus *Alteromonas sp.* gemessen bei pH 5; 100 % entsprechen 35,6 U/mg

In der Temperaturkurve ist deutlich die Zunahme der Aktivität mit steigender Temperatur zu erkennen. Bis ca. 50 °C steigt die relative Aktivität exponentiell, danach kommt es zu einer Stagnation und schließlich sinkt sie ab 60 °C rapide. Das Temperaturoptimum der Kollagenase aus *Alteromonas sp.* liegt demnach bei ca. 58 °C. Es handelt sich somit um ein relativ thermoaktives Enzym.

### Lagerungsstabilität

Die im Kapitel 3.3.1.1 beschriebene Methode zeigte, dass sich die Aktivität der Kollagenase durch das Einfrieren bei -20 °C nach einem Tag halbiert hatte. Eine weitere Analyse nach 9 d konnte keinen weiteren Aktivitätsverlust beweisen.

Des Weiteren wurden Proben einer Kollagenaseverdünnung für 7 d bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Zum einen wurde eine Probe bei -20 °C eingefroren, eine weitere bei 4 °C und bei RT inkubiert. Eine weitere Probe wurde ebenfalls bei -20 °C eingefroren, aber zwischenzeitlich mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren. Nach 7 d Inkubation konnte bei keiner der Proben ein Einfluss auf die Aktivität durch die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen festgestellt werden. Lediglich die bei RT gelagerte Probe zeigte eine um 50 % erhöhte Konzentration an freien Aminosäuren, die nicht auf Enzymaktivität zurückzuführen war. Den geringsten „Hintergrund“ wies demnach die einmalig eingefrorene Probe bei -20 °C auf. Die anderen beiden Proben waren nur leicht erhöht.

### 4.2.3. Metallabhängigkeit

Es wurde überprüft, wie stark die Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  als aktivierender Cofaktor ist. Dafür erfolgte eine Umpufferung einer Kollagenaseprobe mit Hilfe der Desalting Säule mit dem

Standardpuffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  (Kap. 3.1.2). Anschließend wurden zwei Proben, die umgepufferte sowie die im  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer vorliegende, mittels Enzymassay auf ihre Aktivität untersucht. Dabei konnte für die im  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer vorliegende Kollagenase eine spezifische Aktivität von 1,03 U/mg aufgezeigt werden. Im Vergleich dazu wies die Kollagenase ohne  $\text{Ca}^{2+}$  im Puffer eine spezifische Aktivität von 1,21 U/mg auf. Die Enzyme scheinen unabhängig vom Puffer eine ähnliche Aktivität zu besitzen. In späteren Versuchen konnte eine Hemmung der Kollagenase durch EDTA nachgewiesen werden. Dies ist entgegen dieser Untersuchung ein Hinweis auf eine bestehende Abhängigkeit des Enzyms von divalenten Kationen.

#### 4.2.4. Substratabhängigkeit

Zur Spezifikation der Abhängigkeit zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit der mikrobiellen Kollagenase wurden Enzymassays mit konstant bleibender Enzymmenge und variierender Gelatinekonzentration durchgeführt. Die Gelatinelösung wurde auf pH 5 eingestellt und in verschiedenen Volumina eingesetzt, sodass Endkonzentrationen von 0,5 bis 9,5 g/L vorlagen. Die Inkubation nach der Enzymzugabe betrug 60 min bei optimierter Temperatur von 58 °C. Anschließend erfolgte die Auswertung durch Ninhydrin-Zugabe und Absorptionmessung. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind zur Veranschaulichung der Abhängigkeit von der Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration in Abb. 9 grafisch dargestellt.

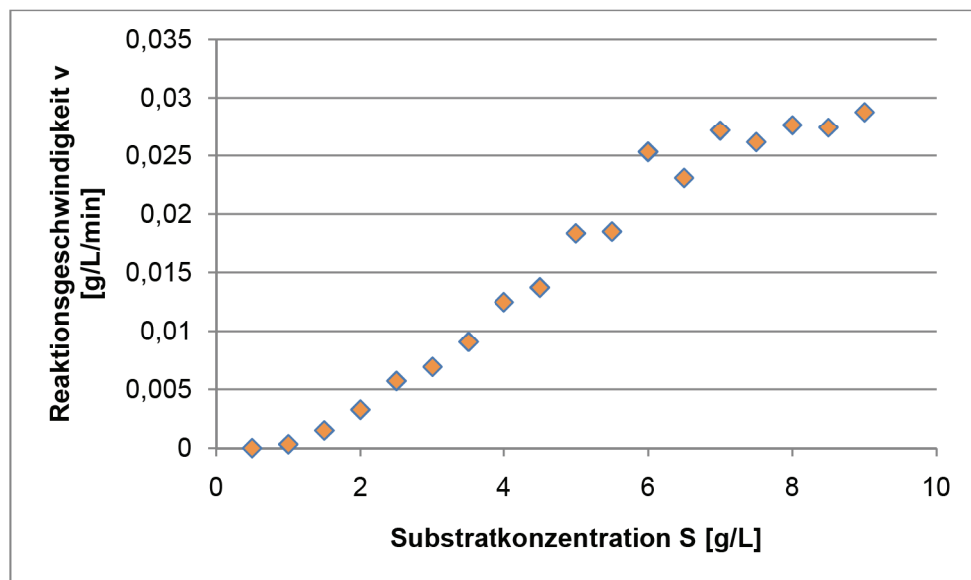


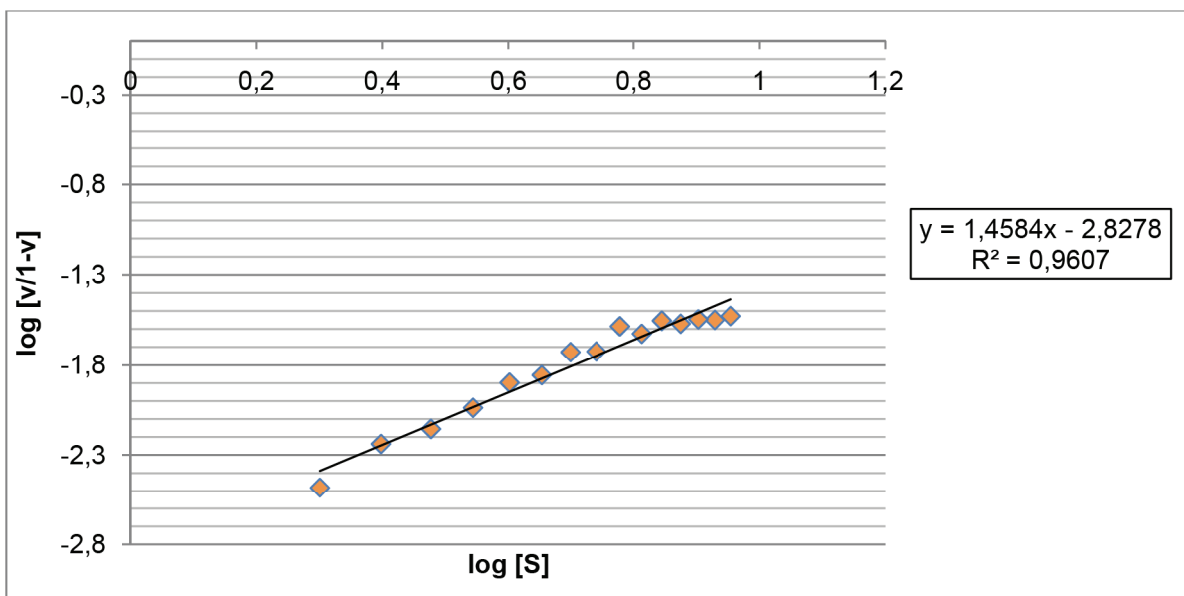
Abb. 9: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Kollagenase aus *Alteromonas sp* von der Gelatinekonzentration bei optimalen Bedingungen von pH 5 und 58 °C.

Erkennbar ist, dass mit steigender Substratkonzentration nicht gleichzeitig die Reaktionsgeschwindigkeit zunimmt. Bei geringem Gelatinegehalt scheint die Abbaureaktion zögernder zu verlaufen. Anschließend liegt ein linearer Zusammenhang zwischen Substratzunahme und Reaktionsgeschwindigkeit vor. Ab einer Gelatinekonzentration von ca. 7 g/L knickt die Gerade ab. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt nun nur noch sehr langsam zu, obgleich die

Substratmenge steigt. Das Enzym kommt in den Bereich, in dem eine weitere Substratzugabe keine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mehr nach sich zieht.

Da kein exponentieller Zusammenhang zwischen den beiden Variablen vorzuliegen scheint, ist das Lineweaver-Burk-Diagramm für die Auswertung ungeeignet. Vielmehr deutet die zu Beginn wenig auf die steigende Substratkonzentration reagierende, aber ab einer bestimmten Konzentration plötzlich rasch ansteigende und bald Nahe dem Maximum befindliche Reaktionsgeschwindigkeit auf eine sigmoide Kurve hin, die eben diesen Verlauf beschreibt. Eine solche Kurve ergibt sich für Enzyme, die aus mehrere Untereinheiten bestehen. Daher liegen während des Bindungsprozesses mögliche Wechselwirkungen zwischen mehreren Liganden-Bindungsstellen vor.

Aussagen über die sogenannte Kooperativität der Kollagenase können über den Hill-Koeffizient ( $H$ ) getroffen werden. Dieser entspricht der Steigung einer Geraden, die entsteht, wenn man  $\log (y/1-y)$  gegen  $\log (S)$  aufträgt. Wenn man dieses für die erzielten Werte anwendet, erhält man das in Abb. 10 dargestellte Diagramm. Durch die erhaltenen Punkte konnte anschließend eine Gerade gelegt werden. Wie aus der Formel deutlich wird, beträgt der Anstieg  $H = 1,46$ . Da somit gilt  $H > 1$ , ist von einer positiven Kooperativität auszugehen, bei der die Bindung eines Moleküls die Bindung eines oder mehrerer weiterer Moleküle erleichtert. Das heißt, dass die Kollagenase nach der Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  oder eines ersten Moleküls Gelatine leichter weitere Gelatine binden und schließlich spalten kann.



**Abb. 10:** Hill-Diagramm der linearisierten Ergebnisse aus der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Kollagenase von der Gelatinekonzentration.

Zur Ermittlung der Michaelis-Konstante  $K_m$  und somit der Substratkonzentration, bei der die Reaktion der Kollagenase mit halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit abläuft, wurde das Hanes-Woolf-Diagramm eingesetzt (HANES, 1932). Dabei werden die Werte linearisiert, indem  $(S)/(v)$  als Funktion der Substratkonzentration dargestellt werden. Nach dem Auflösen dieser ergibt sich die Gleichung:

$$\frac{S}{v} = \frac{1}{v_{max}} \cdot S + \frac{K_m}{v_{max}}$$

Für die erzielten Ergebnisse ergibt sich daher die in Abb. 11 dargestellte Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 95,89.

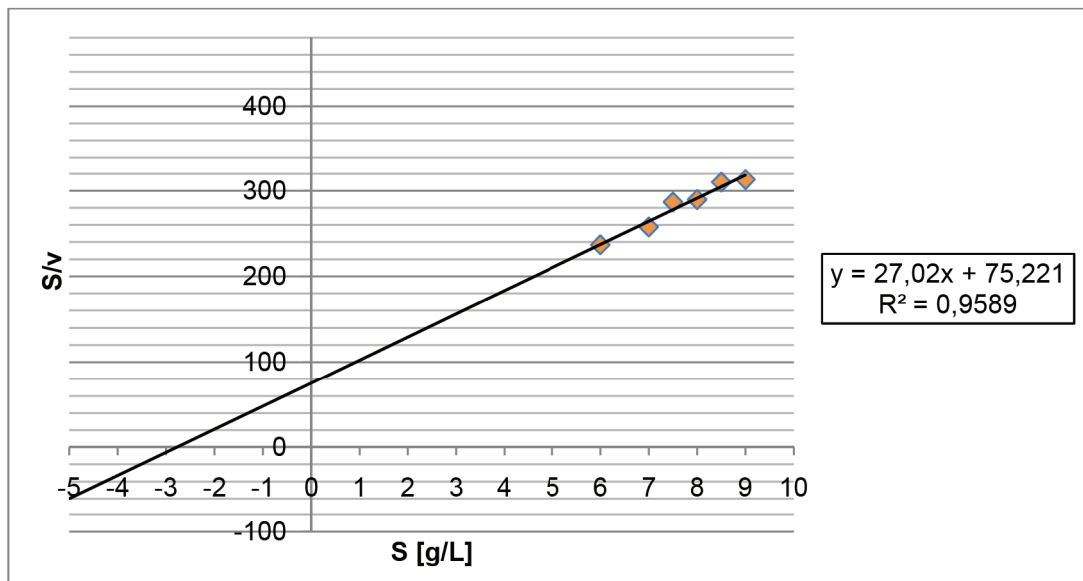


Abb. 11: Hanes-Woolf-Diagramm der linearisierten Ergebnisse aus der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Kollagenase von der Gelatinekonzentration.

Der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse bildet  $-K_m$ , sodass durch einsetzen in die Geradengleichung  $K_m = 2,78$  g/L ist. Durch den Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse lässt sich  $v_{max}$  berechnen, da hier gilt  $K_m/v_{max}$ . Somit ist  $v_{max} = 0,037$  g/L/min, was durch Vergleiche mit Abb. 9 bekräftigt wird.

Zusammenfassend lassen sich die Charakteristika der Kollagenase aus dem *Alteromonas sp.* Stamm wie folgt darstellen:

Tab. 5: Zusammenfassung der Charakteristika der aus einem *Alteromonas sp.* Stamm isolierten Kollagenase.

<b>Enzymstruktur</b>	
Molekulargewicht	ca. 40 kDa
Untereinheiten	mind. 2
<b>Funktionale Parameter</b>	
pH-Optimum	4,5 – 5
Temperaturoptimum	58 °C
$K_m$ -Wert	2,78 g/L
$v_{max}$	0,037 g/L/min
Spezifische Aktivität	35,6 U/mg
<b>Enzym-Ligand-Interaktion</b>	
Divalente Metallionen	Hemmung durch EDTA

### 4.3. Isolierung eines antibiotisch-wirksamen Sekundärmetabolits aus einem *Microbacterium*-Isolat

#### 4.3.1. Morphologie und Wachstum

Es wurden mehrere Isolate der Gattung *Microbacterium* auf ihre Metabolitbildung untersucht. Dazu wurden sie auf unterschiedlichen Kulturmedien bzw. in verschiedenen Nährlösungen gezüchtet.

Im äußeren Erscheinungsbild unterschieden sich die Isolate der Gattung *Microbacterium* nur geringfügig von einander. Einzig der Stamm 7 tendierte in der Farbe seiner Kolonien zu hellgelb bis beige, wohingegen die anderen gelbe Kolonien aufwiesen (Abb. 12). Des Weiteren konnte bei dem Stamm 5 eine ockerfarbende Pigmentierung des gesamten Agars festgestellt werden. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigte sich, dass alle Bakterien unbeweglich und als einzelne Stäbchen vorlagen. Ausgehend von ihrem Alter konnte dabei von kurzen, breiten bis langen, schmalen Stäbchen differenziert werden. In den flüssigen Kulturmedien konnte eine milchige Trübung beim Wachstum der Bakterien festgestellt werden.

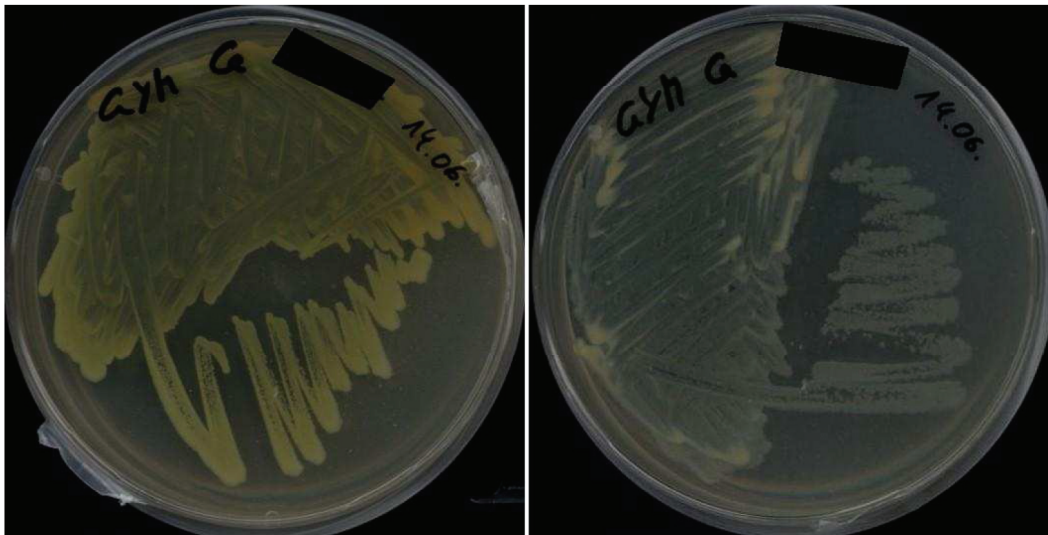


Abb. 12: Vergleich des Stammes 5 (links) und 7 (rechts). Beide auf GYM+Ca-Agar 6 d bei 28 °C.

Durch die Kultivierung der Isolate auf bzw. in diversen Medien waren unterschiedliche Präferenzen im Wachstumsverhalten erkennbar, die auf verschiedene Stoffwechseleigenschaften schließen lassen. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse liefert Tab. 6.

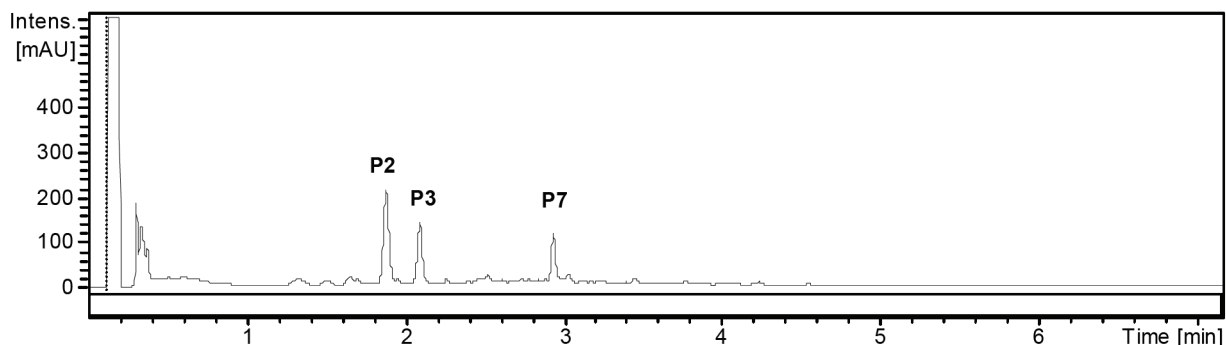
**Tab. 6:** Wachstumsverhalten und Phenotyp der *Microbacterium*-Isolate.  
 +++ starkes Wachstum, ++ gutes Wachstum, + schwaches Wachstum, - kein Wachstum,  
 \* nach 5 d Inkubation, s Schaumbildung, ss starke Schaumbildung

Charakteristika	1	2	3	4	5	6	7
Farbe der Kolonien	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	hellgelb
Motilität	-	-	-	-	-	-	-
Wachstum auf							
GYM+Ca-Agarplatte	++	+++	++	++	+++	++	++
Coryne-Agarplatte	++	++	++	++	+++	++	++
Wachstum in							
GYM+Ca-Medium	+++ ss	+++ ss	++	++	+++ s	++	+++ ss
Stärke-Pepton-Medium	++ s	++ s	++	++	++ s	++	+
HM-Medium	+*	+*	-	+*	+*	-	+*
GM-Medium	+++*	+++*	+++*	+++*	+++*	+++*	+*

Deutlich zu erkennen ist, dass alle Bakterien auf dem nährstoffreichsten Wachstumsmedium, dem zuckerreichen GYM+Ca (sowohl als Agarplatte als auch als Flüssigmedium), am besten wuchsen. Ein ähnlich gutes Wachstum konnte auf den Coryne-Agarplatten erzielt werden, das vergleichbar im Gehalt der C-Quelle aber stickstoffreicher als GYM+Ca ist. In dem Standardmedium aus Stärke-Pepton wuchsen die Bakterien ebenfalls gut, jedoch war hier die Biomasseproduktion bedingt durch geringeren Nährstoffgehalt limitiert. Das HM- sowie das GM-Medium wiesen nach 1-2 d Inkubation kein Wachstum auf. Erst im späteren Verlauf konnte bakterielles Wachstum festgestellt werden, da die Polymere des Hafers bzw. die Gelatine erst aufgeschlossen werden musste bevor sie verstoffwechselt werden konnte. Des Weiteren zeigte sich, dass einige Isolate, speziell Stamm 1, 2 und 7, in flüssigen Kulturmedien zur ausgeprägten Schaumbildung tendieren. Auch der *Microbacterium* Stamm 5 wies leichte Schaumproduktion auf.

#### 4.3.2. Extraktion und HPLC-Auswertung

Zur Untersuchung des Sekundärstoffwechsels wurden die Isolate in dem Wachstumsmedium GYM+Ca, dem Standardmedium SPS und dem Mangelmedium HM fermentiert. Nach 3-5 d Inkubation bei 28 °C erfolgte die Ernte mit anschließender Extraktion. Die daraus gewonnenen Produkte wurden mittels HPLC (Kap. 3.4) auf die gebildeten Metaboliten untersucht. Ausgehend von dem *Microbacterium* Stamm 7 wurden die entsprechenden Peaks näher spezifiziert, da hier die größte Diversität in der Metabolitbildung vorlag. Anschließend konnten die anderen Isolate aufbauend auf diesen Ergebnissen miteinander verglichen werden (Abb. 13).



**Abb. 13:** Chromatogramm (DAD) mit der Übersicht der Peaks der Substanzen P2, P3 und P7 im Ethylaldehyd-Extrakt des Isolates Aa259 nach 7 d Inkubation in 100 mL GYM+Ca-Flüssigmedium.

Die Substanzen P1, P4-P6 sowie P8 und P9 wiesen schwache Absorptionen auf, die im Chromatogramm einen geringen Peak zeigten und in Abb. 13 daher nicht markiert wurden. Von dem Isolat 7 wurde ein Großansatz in 10 L GYM+Ca fermentiert. Nach 5 d Inkubation bei 28 °C konnte dieser geerntet werden (Kap. 3.4). Nach der Extraktion und dem Aufkonzentrieren mit Hilfe des Rotationsverdampfers konnten 2,088 g Extrakt gewonnen werden, die in Methanol aufgenommen und mittels Gelfiltration über LH20-Säule aufgetrennt wurden (Kap. 3.3). Dabei konnten acht Fraktionen gewonnen werden, von denen nach erneuter HPLC-Analyse sechs für weitere Untersuchungen von Interesse waren. Diese wurden mit der präparativen HPLC weiter aufgereinigt (Kap. 3.4). Dabei konnten 12 Substanzen isoliert werden, von denen neun weiter analysiert wurden. Die spezifischen PHPLC-Gradienten und die resultierenden Mengen der isolierten Substanzen sind in der Tab. 7 zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 7:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Aufreinigung der Extrakte des *Microbacterium* Stammes 7.

	<b>Fraktion 1</b>	<b>Fraktion 2</b>	<b>Fraktion 3</b>	<b>Fraktion 4</b>	<b>Fraktion 5</b>	<b>Fraktion 6</b>
	786,6 mg	58,0 mg	21,6 mg	12,8 mg	10,5 mg	1,9 mg
PHPLC-Gradienten	10-50 % ACN	10-50 % ACN	33-40 % ACN	30-45 % ACN	15-40 % ACN	-
Isolierte Peaks mit Menge	P1: 166,4 mg	P2: 9,2 mg P3: 0,4 mg P4: 1,9 mg P5: 0,8 mg	P6: 2,2 mg	P7: 1,8 mg	P8: 1,1 mg	P9: 2,3 mg

Mit Hilfe des Massenspektrometers wurden die Molgewichte der Peaks der Substanzen P1-9 bestimmt (Tab. 8).

**Tab. 8:** Ergebnisse der Molgewichtsbestimmung mittels Massenspektrometrie der Peaks der Substanzen P1-9.

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>P9</b>
Molgewicht [g/mol]	164	205	145	175	219	204	203	429	312



Durch die Analysen der Struktur mittels NMR konnte festgestellt werden, dass die isolierten Substanzen sich von der Benzoesäure oder Indolen ableiten. Die genauen Strukturen wurden bislang noch nicht vollständig ermittelt. Es konnte lediglich festgestellt werden, dass es sich bei der Substanz P1 um ein Benzoesäurederivat handelt. Bei den Substanzen P2, P4, P6 und P7 liegen Indolderivate vor, wobei P3 mit großer Wahrscheinlichkeit Indol-3-Carbaldehyd und P4 Indol-3-Essigsäure ist. Ausgehend von den HPLC-Ergebnissen und der Analyse mittels NMR von Stamm 7 konnte die Bildung dieser Substanzen bei allen *Microbacterium*-Stämmen nachgewiesen werden. Ausschließlich Stamm 3 und 5 produzierten kein Benzolderivat und auch sonst nur wenig Indol-Derivate.

#### 4.3.3. Untersuchung der biologischen Aktivität

Die Fraktionen 1 bis 6 aus dem *Microbacterium* Stamm 7 wurden auf ihre bioaktive Wirkung auf das Wachstum von *E. coli*, *B. subtilis* und *S. cerevisiae* nach dem in Kapitel 3.3.4 beschriebenen Verfahren untersucht.

Die Messungen und Berechnungen der hemmenden Wirkung der Fraktionen gegenüber *B. subtilis* sind in der folgenden Tab. 9 dargestellt. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der in Kapitel 3.3.1.3 aufgeführten Formel.

**Tab. 9:** Ergebnis der biologischen Aktivität der Fraktionen von Stamm 7 gegenüber *B. subtilis*.

	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 5	Fraktion 6
OD <sub>600 nm</sub>	0,2	0,255	0,098	0,243	0,222	0,097
% hemmende Wirkung im Vergleich zu 2 µM Chloramphenicol	-6,94	-44,71	<b>62,33</b>	-37,9	-22,12	<b>62,64</b>

Es wird deutlich, dass sowohl die Fraktion 3 als auch 6 eine hohe hemmende Wirkung auf *B. subtilis* haben. Beide liegen bei 62 % Hemmung im Vergleich zu 2 µM Chloramphenicol. Alle weiteren Fraktionen hatten keinen wachstumshemmenden Einfluss. Die Untersuchungen mit *S. cerevisiae* und *E. coli* konnten keine hemmende Wirkung im Vergleich zu 0,1 µM Cycloheximid bzw. zu 2 µM Chloramphenicol feststellen.

Weiterhin wurden die reinen Substanzen aus den Fraktionen, die mittels PHPLC isoliert werden konnten, auf ihre biologischen Wirkungen untersucht. Dabei zeigte lediglich die Substanz P6 aus der Fraktion 3 Ergebnisse, die von Interesse waren. In Tab. 10 sind die spezifischen Hemmungen in % in Vergleich zu der jeweiligen Positivkontrolle aufgeführt.

**Tab. 10:** Ergebnisse der Untersuchung der biologischen Aktivität der Substanz P6 aus der Fraktion 3 vom *Microbacterium* Stamm 7.

	Konzentration	% hemmende Wirkung	Referenzsubstanz
<i>Bacillus subtilis</i>	100 µM	92	10 µM Chloramphenicol
<i>Staphylococcus lentus</i>	100 µM	59	10 µM Chloramphenicol
<i>Xanthomonas campestris</i>	100 µM	0	10 µM Chloramphenicol
<i>Propionibacterium acnes</i>	100 µM	100	1 µM Chloramphenicol
<i>Candida albicans</i>	100 µM	0	10 µM Nystatin
<i>Septoria tritici</i>	100 µM	0	5 µM Cycloheximid
<i>Phytophthora infestans</i>	50 µM	0	0,5 µM Clotrimazol
<i>Trichophyton rubrum</i>	100 µM	88	0,5 µM Clotrimazol
Humane Fibroblasten	10 µM	23	40 µM Tamoxifen
Humane Fibroblasten	50 µM	99	40 µM Tamoxifen
Hep G2	10 µM	0	40 µM Tamoxifen
Hep G2	50 µM	92	40 µM Tamoxifen
GlykogenSynthaseKinase	10 µM	25	10 µM TDZD-8
Acetylcholinesterase	10 µM	20	1 µM Huperzine A
ProteinTyrosinPhosphatase 1B	10 µM	0	50 µM Suramin
Phosphodiesterase 4	10 µM	76	10 µM Rolipram

Beim Betrachten der Ergebnisse zeigt sich, dass die Substanz P6 insgesamt ein breites Wirkungsspektrum aufweist. Sie scheint sowohl antibakteriell, cytotoxisch als auch antifungal wirksam zu sein. Spezifisch wirkt sie gegen gram-positive, aber nicht gegen gram-negative (*X. campestris*) Bakterien. Gegen Hefen scheint keine hemmende Wirkung vorzuliegen. Bei der Untersuchung der Wirksamkeit gegenüber humanen Fibroblasten und Leberkarzinomzellen liegt die mittlere inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$  zwischen 10 und 50 µM.

#### 4.4. Inhibierende Wirkung des isolierten Sekundärmetaboliten und weiterer Hemmstoffe auf die Kollagenaseaktivität

Der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Kollagenase aus *Alteromonas sp.* wurde getestet. Doxorubicin, Cystein und Substanz P6, die aus dem *Microbacterium*-Stamm 7 isoliert wurde (Kap. 4.3), zeigten keine inhibierende Wirkung.

Parallel dazu wurde ebenfalls der Einfluss von DMSO und von EDTA auf die spezifische Aktivität analysiert. Als Referenz diente Ethanol. In Tab. 11 sind die daraus resultierenden Ergebnisse zusammengefasst.

**Tab. 11:** Ergebnisse der Untersuchung der Inhibition der Kollagenase aus *Alteromonas sp.* durch verschiedene Substanzen.

Substanz	Inhibition [%]
0,1 mM Substanz P6 aus <i>Microbacterium</i>	20
1 mM Cystein	21
0,2 mM Doxorubicin	11
1 mM DMSO	216
10 mM EDTA	194
1,2 M Ethanol (Referenz)	100

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass keine inhibierende Wirkung von der aus dem *Microbacterium*-Stamm 7 isolierten Substanz P6 ausgeht. Dagegen konnte bei DMSO und bei EDTA eine starke Inhibition der enzymatischen Aktivität festgestellt werden. Dabei zeigte sich, dass die Hemmung ausgehend von DMSO im Vergleich am deutlichsten war.

## 5. Diskussion

Im ersten Teil der Arbeit stand die Isolierung und Reinigung einer Kollagenase aus einem marinen Bakterium der Gattung *Alteromonas sp.* im Vordergrund. Dazu wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen für eine optimale Kollagenaseausbeute untersucht. Weiterhin wurden mehrere chromatografische Trennmethode zur Reinigung eingesetzt. Für den Nachweis wurde ein spezifischer Enzymassay basierend auf der Ninhydrin-Reaktion etabliert. Letztendlich erfolgte die Charakterisierung der Kollagenase auf der Grundlage des robusten Enzymassays. Neben Merkmalen wie dem pH- und Temperaturoptimum wurden weiterhin die Substratabhängigkeit und der Einfluss von divalenten Metallionen und Inhibitoren analysiert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die im zweiten Teil der Arbeit isolierte biologisch aktive Substanz P6 aus *Microbacterium*-Stamm 7 keine inhibierende Wirkung gegen die Kollagenase des *Alteromonas sp.* aufweist.

### 5.1. Abhängigkeit der Kollagenaseproduktion von den Kultivierungsbedingungen

Nach MERKEL *et al.* (1975) sind 44 % der marinen Bakterien aus subtropischen Gewässern in der Lage kollagenolytische Enzyme zu produzieren. Viele werden jedoch erst durch Wachstum auf kollagenhaltigen Medien dazu angeregt. Auch bei dem schwamm-assoziierte Bakterienstamm der Gattung *Alteromonas sp.* konnte eine mikrobielle Kollagenase nachgewiesen werden. Laut Literaturangaben ist die Bildung von proteolytisch wirksamen Enzymen bei dieser Gattung bekannt, jedoch wurde eine spezifische Charakterisierung noch nicht vorgenommen (BAUMANN *et al.*, 1972). Die Wachstumsbedingungen für *Alteromonas sp.* sind in Marine broth Medium optimal. Daher wurde dieser in Form von Agarplatten für die längere Hälterung eingesetzt. Das Anbieten von Gelatine als Hauptenergie- und Stickstoffquelle sollte die Bildung von Kollagenasen begünstigen. Daher wurde hierfür gelatinehaltiges Minimal-Medium eingesetzt. Vergleichsweise deckt sich die Zusammensetzung dieses mit einem von MACLENNAN *et al.* (1953) entwickelten Optimalmedium zur Produktion von Kollagenase durch *C. histolyticum*, mit Ausnahme einer Vitaminlösung, die generell als nicht kritische Größe beschrieben wurde. Da die Ergebnisse eine positive Auswirkung auf die Enzymproduktion zeigten, war eine Optimierung in der Hinsicht nicht notwendig. Wie bei allen mikrobiellen Kollagenasen war das Enzym auch bei *Alteromonas sp.* extrazellulär lokalisiert. Die Abtrennung des Enzyms von der Kultur erfolgte durch die Ausfällung der Proteine aus dem Kulturüberstand durch Ammoniumsulfat-Zugabe. Laut Literaturangaben wird Kollagenase bei einer Sättigung von 24 bis 27 % Ammoniumsulfat gefällt (DEBELLIS *et al.*, 1954). Während der Versuche wurde gezeigt, dass 40 % Ammoniumsulfat-Konzentration eine gute Anreicherungsstrategie bei gleichzeitiger Senkung der Konzentration der unspezifischen Proteine

darstellte. Eine weitere Senkung der Sättigung wurde aufgrund der Verluste bei sowieso schon geringer Enzymkonzentration nicht in Betracht gezogen. Viele weitere Arbeiten verwendeten zur Kollagenaseisolierung die Ammoniumsulfat-Fällung mit zumeist wesentlich höheren Sättigungsraten als ersten Reinigungsschritt. WU *et al.* setzte ebenfalls zwei Fällungsschritte (30 und 75 % Ammoniumsulfat-Sättigung) ein, um eine hohe Ausbeute an Kollagenase aus *B. pumilus* zu erzielen. Bei ENDO (1986) wurden Fraktionen mit verschiedenen Sättigungen zwischen 45 und 80 % gesammelt, zuvor wurde jedoch die Kultur filtriert. Auch bei MANDL *et al.* (1953) wurden vor der Fällung der extrazellulären Kollagenase die Bakterien durch Filtration abgetrennt. Diese Methode scheint aufgrund möglicher Verluste für diesen Versuch eher nachteilig. Eine Fällung mit dem organischen Lösungsmittel Methanol wird ebenfalls häufig verwendet (TYTELL & HEWSON, 1950). Nachteilig erscheint hierbei eine mögliche Beeinträchtigung der biologischen Aktivität des Enzyms sowie der gesundheitliche Aspekt beim Arbeiten mit großer Mengen Methanol.

Die Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit des Zellwachstums und der Freisetzung von Aminosäuren einhergehend mit Kollagenasebildung von der Vorkultur konnte keine klaren Ergebnisse liefern. Ein Einfluss, ob die Kultur von einer Agarplatte oder einem flüssigen Medium aus mit den Bakterien angeimpft wurde, konnte nicht festgestellt werden. Durch die Verwendung zweier flüssiger Vorkulturmedien wurde eine erhöhte Kollagenasebildung und somit höheres Wachstum erhofft, da die Bakterien sich an das Milieu gewöhnen. Im Vergleich konnte dieses jedoch nur bedingt bestätigt werden. Das Wachstum nahm nur minimal zu (5 %). Die Konzentration an freien Aminosäuren war jedoch niedriger als in der Vergleichskultur, deren Vorkultur von der gelatinehaltigen Agarplatte mit dem *Alteromonas sp.* Stamm angeimpft wurde, und nahm bis zur Ernte weiter ab. Das könnte die Vermutung zulassen, dass die maximale Konzentration bereits zu einem früheren Zeitpunkt erreicht war, was auf eine schnellere Kollagenaseproduktion hinweist und zu einem besseren Wachstum führte. Aufgrund dessen wurden weitere Kultivierungen der Gattung *Alteromonas sp.* mit flüssigen Vorkulturen beimpft, die ebenfalls zuvor mit flüssigen Vorkulturen angeimpft wurden. In wissenschaftlichen Arbeiten wurden stets mehrere Kultivierungsschritte vor der eigentlichen Anzucht zur Kollagenaseproduktion beschrieben. So wird bei WU *et al.* (2009) das Bakterium *B. pumilis* nach der Isolierung mit mehrfachen Kultivierungsschritten in flüssigem Kollagenmedium vorkultiviert und anschließend in das mit Kälberhaut angereicherte Wachstumsmedium gegeben. Weiterhin ist ebenfalls bekannt, dass die Kultivierung auf Agar der längeren Hälterung, aber nicht der Gewinnung von Stoffwechselprodukten dient. Daher erscheint die Vorkultivierung in flüssigen Medien als folgerichtig, auch in Bezug auf die Kollagenaseproduktion.

Der Zeitpunkt für die Ernte, bei dem das Wachstum in die stationäre Phase übergeht und auch die freien Aminosäuren nicht weiter ansteigen, konnte auf 29 h bis 30 h eingegrenzt

werden. Auch Bakterien der Gattung *Streptomyces* können nach 30 h geerntet werden (ENDO, 1986). Andere schnellwachsende Stämme wie *C. histolyticum* produzieren bereits nach 17 bis 18 h Inkubation ihre maximale Kollagenasekonzentration (MACLENNAN *et al.*, 1953), andere Bakterien benötigten dagegen bis zu 48 h (WU *et al.*, 2009). In dem vorliegenden Fall sollten bereits nach 27 h Proben der *Alteromonas sp.* Kultur auf ihr Wachstum und den Gehalt an freigesetzten Aminosäuren untersucht und mit den entsprechenden Werten zum Zeitpunkt  $t = 0$  verglichen werden, da sich das Wachstum und der Zeitpunkt der maximalen Kollagenasekonzentration schwankend verhalten.

## **5.2. Enzymassay zum quantitativen Nachweis der spezifischen Aktivität einer mikrobiellen Kollagenase**

Der auf der Ninhydrin-Reaktion basierende Assay erwies sich als einfache, schnelle Methode zum Nachweis mikrobieller Kollagenase und zur Quantifizierung ihrer spezifischen Aktivität. Dazu wurde die Probe in Konzentrationen von minimal 0,1 µg Protein je Assay eingesetzt. Als Substrat wurde Gelatinelösung mit einer Konzentration von bis zu 4,8 g/L eingesetzt. Eine höhere Konzentration würde einen zu hohen Hintergrund für die photometrische Messung verursachen. Der Reaktionsansatz wurde mit Standardpuffer (pH 5) auf ein Gesamtvolumen von 100 µL aufgefüllt. Für die Inkubationsdauer wurden verschiedene Zeiten gewählt. Um ein möglichst genaues Ergebnis erzielen zu können, eignete sich eine Dauer von 60 min, in der die Kollagenase ausreichend Zeit hatte das Substrat abzubauen. Es ist nicht zu erwarten, dass das Enzym nach dieser Zeit bereits die gesamte Gelatine umgewandelt hat, da die Enzymmenge sehr niedrig gewählt ist, um eine Extinktionsmessung unter 1,0 und somit die Genauigkeit gewährleisten zu können. Der Nachweis mittels Zusatz von Ninhydrin-Lösung (10 g/L) 1:1 zu dem Enzym-Substrat-Puffer-Gemisch mit anschließender Erhitzung auf 60 °C für 15 min konnte problemlos durchgeführt werden. Zu beachten ist dabei, dass für vergleichbare Ergebnisse eine genaue Einhaltung der Temperatur sowie der Inkubationszeiten notwendig ist. Auch die folgende Abkühlphase von 7:30 min ist exakt einzuhalten, da bei längerer Abkühlung das Enzym weiter aktiv ist und Substrat abbaut. Unter Berücksichtigung dieser Merkmale ist durch die Messung der Extinktion bei 570 nm eine robuste, wiederholbare und genaue Bestimmung an umgesetzten Substrat, die Rückschlüsse auf die spezifische Aktivität der Kollagenase liefert, möglich.

Nachteilig ist die Störanfälligkeit des Assays, wodurch die zu untersuchenden Proben für aussagekräftige Quantifizierungen einen bestimmten Reinheitsgrad aufweisen müssen. Sowohl ein hoher Gehalt an Salzen als auch an Proteinen führt zu einem starken Hintergrund, der bei der photometrischen Messung die Enzymaktivität überdeckt. Weiterhin läuft die Ninhydrin-Reaktion nicht im sauren Milieu ab, was beim Einsatz von Säurefällungen (beispielsweise mit TCA) zur Vorreinigung von Proben oder ähnlichen säurebeinhaltenden Methoden

bedacht werden muss, da eine Neutralisation notwendig wird. Der Einsatz stark saurer Proben ist generell nicht möglich, da die verwendete Gelatinelösung bei zusätzlicher Wärmezufuhr in Aminosäuren zerlegt wird und ein Nachweis unmöglich macht.

Im Vergleich mit ähnlichen Nachweismethoden für die Aktivität einer Kollagenase ist das hier beschriebene Assaysystem wesentlich einfacher in seiner Handhabung und der zeitliche Aufwand durch Einsatz eines Platereaders geringer. Beispielsweise hat ENDO (1986) eine ebenfalls auf der Ninhydrin-Reaktion beruhende Methode zum Nachweis der Aktivität der Kollagenase „Discolysin“ entwickelt. Als Substrat setzte er ebenfalls 4,2 g/L Kollagen ein. Insgesamt musste der Reaktionsansatz jedoch 18 h inkubieren und hatte ein Gesamtvolumen von 6 mL. Vor der Zugabe des Ninhydrin folgte ein Filtrationsschritt und bis zum endgültigen Ergebnis, welches durch Absorptionsmessung bei 600 nm bestimmt wurde, vergingen mindestens weitere 35 min. Ein weiteres Verfahren wurde von MERKEL *et al.* (1975) beschrieben. Dabei handelt es sich ausschließlich um den Nachweis der Kollagenase. Nach der Ammoniumsulfat-Fällung erfolgt ein Agardiffusionstest mit kollagenhaltigen Agarplatten, die für 26 h inkubiert werden. Dieses Verfahren ist qualitativ ebenso exakt wie der hier verwendete Enzymnachweis im Wachstum. In beiden Fällen kann direkt auf das Vorhandensein eines Kollagen abbauenden Enzyms geschlossen werden. Bei der Ninhydrin-basierten Methode liegt der Vorteil darin, dass man ein zeitnahes und vor allem quantitatives Ergebnis erhält.

### 5.3. Aufreinigung der Kollagenase

Da durch die Ammoniumsulfat-Fällung ein hoher Salzanteil in der Probe zurückblieb, der nachweislich den Enzymassay behindert, wurde das Salz mittels Gelfiltration entfernt. Der Vergleich zweier Säulen, der Desalting sowie der Superdex 200 Säule, bewies, dass ein Reinigungsschritt nicht ausreichend war um das Salz und weiterhin die Proteinverunreinigungen zu entfernen. Beide Säulen konnten einzeln zu keiner ausreichenden Reinheit führen. Als optimale Aufreinigung erwies sich der Einsatz der Superdex 200, mit anschließendem Poolen der enzymhaltigen Fraktionen. Anschließend wurde die Probe mit Hilfe einer weiteren Ammoniumsulfat-Fällung aufkonzentriert und mit der Desalting Säule entsalzt. Durch eine abschließende Gelfiltration mit der Superdex 200 konnte eine nahezu reine Kollagenase erhalten werden. Vergleichend ist die Gelfiltration trotz des hohen Verdünnungsfaktors daher besser für die Aufreinigung der Kollagenase geeignet als beispielsweise die Fällung mit TCA, bei der ein zu hoher Verlust an Aktivität bzw. Enzym vorliegt. Dass jedoch eine einzelne Gelfiltration bei der Reinigung einer mikrobiellen Kollagenase nicht ausreichend ist, konnte in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten festgestellt werden. WU *et al.* (2009) setzten ebenfalls zur Entfernung des Salzes die Gelfiltration ein gefolgt von der Aufreinigung der gepoolten Probe mit der Anionenaustauschchromatografie. Eine dreistufige Reinigung

mikrobieller Kollagenase über eine zweifache Ionenaustauschchromatografie gefolgt von einer Molekularsieb-Chromatographie wurde bei LEE-OWN & ANDERSON (1975) verwendet. Auch ENDO berichtet in seinem Patent von 1986, dass die Aufreinigung einer Kollagenase nur über die Kombination verschiedener Methoden, wie Gelfiltration, Ultrafiltration, Dialyse, Chromatofokussierung, erfolgen kann oder indem man einzelne Methoden mehrfach wiederholt. Letztendlich konnte eine Gesamtausbeute von 0,98 % mit einem Anreicherungsfaktor von 7,8 erzielt werden. Andere Aufreinigungen von Kollagenasen konnten um das 4-fache höher angereicherte Ergebnisse und Ausbeuten präsentieren (WU *et al.*, 2009). Zu Erklären ist dies durch unterschiedlich komplexe Reinigungsprozeduren. Nach der Ammoniumsulfat-Fällung folgten bei WU *et al.* (2009) nur zwei Gelfiltrationen im Vergleich zu den hier eingesetzten dreistufigen Verfahren. Da bei jedem Reinigungsschritt Verluste auftreten, kann insgesamt von einem vergleichbaren Ergebnis ausgegangen werden. Die aufgereinigte Kollagenase des *Alteromonas sp.* Stammes zeigte unter nicht optimalen Bedingungen bei RT eine spezifische Aktivität von 6,1 U/mg. Bei einer Temperatur von 58 °C sowie pH 5 konnte dagegen eine um ein Vielfaches höhere spezifische Aktivität von 198,8 U/mg erzielt werden. Da das Molekulargewicht von Gelatine nicht exakt bestimmbar ist, werden häufig synthetisch hergestellte Substrate, wie 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg, verwendet. Über die Freisetzung von L-Leucin kann dann die spezifische Aktivität genauer bestimmt werden. Somit gibt es jedoch keine aussagekräftigen Vergleichsmöglichkeiten für diese Arbeit. Lediglich bei Hautkollagenasen wird ebenfalls die spezifische Aktivität mit dem Substrat Gelatine untersucht. Beispielsweise konnten Aktivitäten von 2300 U/mg bei KNÄUPER *et al.* (1993) nachgewiesen werden. Da ein Unit hier jedoch 1 µg/min bedeutet, ist die Aktivität verschwindend gering im Vergleich mit der bakteriellen Kollagenase aus *Alteromonas sp.* Nach erfolgter Reinigung war mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein Protein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa zu erkennen (Abb. 7), welches der aus dem *Alteromonas sp.* Stamm isolierten Kollagenase zuzuordnen ist. *C. hystolyticum*-Kollagenasen haben charakteristischerweise entweder sehr geringe Massen mit 11 bis 16 kDa oder relativ hohe mit über 112 bis 150 kDa (WILSON *et al.*, 2003; SORU & ZAHARIA, 1972). Andere mikrobielle Kollagenase, die nicht aus *C. hystolyticum* isoliert wurden, weisen Molekulargewichte zwischen 70 und 110 kDa auf (BRENDA, 2011). Demnach handelt es sich bei der *Alteromonas sp.* Stamm Kollagenase um ein relativ kleines Enzym.

#### **5.4. Charakteristische Eigenschaften einer Kollagenase eines *Alteromonas sp.* Stamm**

##### **5.4.1. Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Enzymaktivität**

Die in Kap. 4.3.2 dargestellten Ergebnisse der Untersuchungen des Temperaturoptimums der Kollagenase aus dem *Alteromonas sp.* Stamm zeigten, dass die spezifische Aktivität bei



58 °C am höchsten war. Zum Vergleich liegen die Temperaturoptima der meisten analysierten mikrobiellen Kollagenasen zwischen 35 und 40 °C (BRENDA, 2011). Das Enzym aus *Alteromonas sp.* ist damit nicht nur ungewöhnlich thermoaktiv sondern scheint auch relativ thermostabil zu sein, denn die Denaturierungstemperatur als begrenzender Faktor beträgt um die 60 °C. Für eine exakte Bestimmung der Thermostabilität müssten jedoch noch Versuche folgen, bei denen die Aktivität der Kollagenase bei längerem Erhitzen über definierte Zeiträume gemessen wird. In weiteren wissenschaftlichen Arbeiten konnten mikrobielle Kollagenase mit maximaler spezifischer Aktivität bei 45 °C (*B. pumilus*, WU *et al.*, 2009) und 50 °C (*B. subtilis*, NAGANO & TO, 2000) isoliert werden. Somit ist die Thermoaktivität der Kollagenase aus dem *Alteromonas sp.* Stamm nach jetzigem Stand einzigartig.

Bei Untersuchungen der Lagerstabilität des Enzyms bei unterschiedlichen Konzentrationen konnte festgestellt werden, dass die Kollagenase nach dem ersten Einfrieren bei -20 °C ca. die Hälfte seiner Aktivität einbüßt. Dieses ist bedingt durch das Aufbrechen der dreidimensionalen Struktur des Enzyms. Danach war jedoch kein weiterer Verlust nachweisbar. Selbst bei der Lagerung bei 4 °C bzw. häufigem Einfrieren und Auftauen zeigten keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Laut Literaturangaben bleibt die mikrobielle Kollagenase aus *C. histolyticum* beim Einfrieren in flüssigem Zustand bei -20 °C für mehrere Monate stabil, im lyophilisierten Zustand sogar 5 Jahre (PETERKOFISKY *et al.*, 1982). Eine abnehmende Enzymaktivität ist dabei nicht beschrieben. Die Lagerung bei RT zeigte ein Verlust der spezifischen Aktivität um ca. 15 % innerhalb von 9 d. Dabei war am auffälligsten, dass die Probe einen hohen Hintergrund im Enzymassay aufwies, was auf den Abbau bzw. Zerfall von Proteinen und Enzym durch mögliche enzymatische Verunreinigungen schließen lässt. Nach mehreren wissenschaftlichen Arbeiten kann die Stabilität der Kollagenase bei 4 °C nur für 24 h gewährleistet werden (GIBBONS und MACDONALD, 1961, MERKEL und DREISBACH, 1978). Eine andere Arbeit spricht von einem Erhalt der enzymatischen Aktivität der Kollagenase in diversen Puffern bei 4 °C Lagerung für einen Monat. Ebenfalls soll demnach die Lagerstabilität für 24 h bei RT gewährleistet sein (MANDL *et al.*, 1958). Eine eindeutige Aussage über die Lagerstabilität und dem Erhalt der enzymatischen Aktivität mikrobieller Kollagenasen in Lösungen scheint es demnach nicht zu geben. Dafür hängt diese von zu vielen Faktoren wie Enzymkonzentration, pH-Wert, dem Puffer, Salzgehalt und der Temperatur ab.

Bei weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass der optimale pH-Wert für das Enzym zwischen 4,5 und 5,0 liegt (Kap. 4.3.1). Daher wurden weitere Experimente bei pH 5 durchgeführt. Auch diese Eigenschaft erscheint in der Hinsicht einzigartig, da mikrobielle Kollagenasen ihr pH-Optimum gewöhnlich zwischen 6,3 und 8,0, aber hauptsächlich bei pH 7 haben (BRENDA, 2011). Dagegen besitzt die am besten untersuchte Kollagenase aus *C. histolyticum* unterhalb von pH 5 gar keine messbare Aktivität mehr. Eine Möglichkeit, die dieses Ergebnis relativiert, wäre, dass die hier isolierte Kollagenase zwei pH-Optima aufweist; eines im leicht

sauren Milieu und das andere im neutralen Bereich. Da die Untersuchungen sich nur auf die Aktivität bis zu einem pH-Wert von 6 bezogen, wäre dies eine These, die durch Folgeexperimente belegt bzw. entkräftet werden könnte. Nichts desto trotz ist es denkbar, dass die Kollagenase ihre optimale Aktivität in niedrigen pH-Bereichen hat. Beispielsweise konnte bei einem aus *Candida albicans* isolierten kollagenolytischen Enzym die höchste Aktivität bei einem pH-Wert zwischen 3,5 und 4 festgestellt werden (KAMINISHI *et al.*, 1986).

#### 5.4.2. Auswirkungen eines $\text{Ca}^{2+}$ -Mangels auf die spezifische Aktivität

Viele Enzyme benötigen zur Aktivierung die Anwesenheit von Metallionen, die durch strukturstabilisierende Wirkungen, als Redox-Partner oder als Lewis-Säure die Katalyse unterstützen. So können sie negative Ladungen stabilisieren bzw. abschirmen oder Wassermoleküle aktivieren (DEVLIN, 2005). Bei mikrobiellen Kollagenasen sind folgende Metallionen als Aktivoren bekannt:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  (BRENDA, 2011). Dabei beeinträchtigt  $\text{Ca}^{2+}$  als einziges nicht die Aktivität, selbst bei hohen Konzentrationen (MANDL *et al.*, 1958). Auch weitere Literaturangaben zeigen, dass besonders  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die spezifische Aktivität von Kollagenasen stabilisieren und dadurch deutlich erhöhen (127 %, WU *et al.*, 2009). Daher wurden den in dieser Arbeit verwendeten Puffern 5 mM  $\text{CaCl}_2$  zugegeben. Die Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  als Aktivator konnte zunächst nicht gezeigt werden (Kap. 4.2.3). Nach dem Umpuffern mit Hilfe der Desalting Säule mit einem Standardpuffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$ , konnte keine Beeinträchtigung in der Aktivität der *Alteromonas sp.* Kollagenase festgestellt werden. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Konzentration des Metallions nach dem Umpuffern nur von beispielsweise 5 auf 1 mM gesenkt wurde. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass eine sehr starke Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  an das Enzym vorliegt. Vergleichbare Erfahrungen konnten bei Glycosidasen in Zusammenhang mit divalenten Kationen gewonnen werden (FRIEDBERG *et al.*, 1972).

Bei der Inhibitionsuntersuchung der Kollagenaseaktivität zeigte EDTA als Komplexbildner divalenter Kationen die zweitstärkste Hemmung. Die inhibierende Wirkung EDTAs auf die spezifische Aktivität von Kollagenasen verschiedener Bakterien wurde häufig beschrieben (MAKINEN & MAKINEN, 1987; SASAGAWA *et al.*, 1993; YU & LEE, 1999). Sie basiert auf der Eigenschaft des EDTAs als Chelator, die für die Aktivität notwendigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen koordinativ an die freien Elektronenpaare zu binden und somit dem Enzym zu entziehen (HOOK *et al.*, 1971). Aufgrund des kompletten Aktivitätsverlusts durch EDTA scheinen divalente Kationen, insbesondere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, bei der hier isolierten Kollagenase eine entscheidende Rolle als Aktivator zu spielen. Ein notwendiges Folgeexperiment, um die Ergebnisse zu manifestieren, ist die Wiederherstellung der Aktivität der Kollagenase durch erneute Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  nach der Dialyse.

### 5.4.3. Substratabhängigkeit

Um Hinweise auf die Affinität der Kollagenase aus dem *Alteromonas sp.* Stamm zu der Gela-tinelösung zu erhalten, wurde die Substratabhängigkeit untersucht (Kap. 4.2.4). Die grafische Darstellung der Ergebnisse zeigte einen sigmoiden Kurvenverlauf. Daher gilt der durch die Michaelis-Menten-Kurve beschriebene Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit für Enzym-katalysierte Reaktionen in diesem Fall nicht. Demzufolge konnte die Michaelis-Konstante  $K_m$ , die die Substratkonzentration, bei der das Enzym mit halbmaximaler Geschwindigkeit arbeitet, beschreibt, und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  nicht durch die linearisierte Darstellung der Kehrwerte im Lineweaver-Burk-Diagramm ermittelt werden. Durch eine weitere lineare Auftragsmöglichkeit, dem Hanes-Woolf-Diagramm, konnten sowohl  $K_m$  als auch  $v_{max}$  beurteilt werden. Dabei wurde die Substratkonzentration durch die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion von Substratkonzentration aufgetragen (HANES, 1932). Aus der Geradengleichung der grafischen Darstellung (Abb. 11) konnte ein Wert von  $K_m=2,78$  g/L errechnete werden. Gleichzeitig wurde  $v_{max}$  mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von 0,037 g/L/min ermittelt. Bei dem  $K_m$ -Wert gilt, je kleiner, desto höher ist die Affinität des Enzyms zum Substrat. Da hier bei einem maximalen Substrateinsatz von 10 g/L ein hoher  $K_m$ -Wert vorliegt, scheint die Affinität niedrig zu sein. Dies bedeutet, dass erst bei einer relativ hohen Gelatinekonzentration die maximale Geschwindigkeit erreicht ist. Das würde bedeuten, dass die Kollagenase nicht sehr bindungsfreudig ist. Die meisten  $K_m$ -Werte von mikrobiellen Kollagenasen lassen jedoch auf eine hohe Affinität des Enzyms zum jeweiligen Substrat schließen und liegen zwischen 0,2 und 1,2 mM. Allerdings liegt ein sigmoider Kurvenverlauf vor, was auf eine Kollagenase mit mehreren Untereinheiten hindeutet, wodurch die Bindung des Substrates an einer Untereinheit die Bindung an einer anderen Untereinheit erleichtert. Zur genaueren Untersuchung erfolgte das Eintragen der linearisierten Werte in das Hill-Diagramm (Abb. 10). Der Anstieg der resultierenden Geraden ist die Hill-Konstante  $H$ . Demnach ist  $H < 1$  (genauer  $H = 1,46$ ) und es ist von einer positiven Kooperativität auszugehen. Die isolierte Kollagenase besteht somit aus mindestens zwei Untereinheiten mit jeweils aktivem Zentrum. Aufgrund der geringen molekularen Masse scheinen jedoch nur zwei Untereinheiten am wahrscheinlichsten. Die Ausprägung der positiven Kooperativität ist weiterhin nicht extrem stark, da die Konstante  $H$  nicht größer als 2 ist. Es ist davon auszugehen, dass entweder durch die Bindung von  $Ca^{2+}$  oder Gelatine die Bindung von weiterer Gelatine erleichtert wird. Dieses müsste in weiterführenden Experimenten beispielsweise unter Ausschluss von  $Ca^{2+}$  geklärt werden.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der aus mehreren Untereinheiten bestehenden Kollagenase steigt mit zunehmender Substratmenge im Vergleich zu monomeren Enzymen nur sehr langsam, daher sind die  $K_m$ -Werte nicht vergleichbar. Generell treten mikrobielle Kollagenasen vor allem als Monomer auf (LWEBUGA-MUKASA *et al.*, 1976; CHAKRABORTY & WEISS,

1986; YU & LEE, 1999). Bei vielen anderen ist die Zahl der Untereinheiten noch unklar. Nur selten gibt es tiefgehende Untersuchungen zum genauen Aufbau und Funktion. ENDO (1986) konnte bei Analysen der Gattung *Streptomyces* eine Kollagenase isolieren, die aus zwei unterschiedlich großen enzymatisch aktiven Untereinheiten besteht. KEIL-DLOUHA & KEIL untersuchten 1978 eine *Achromobacter*-Kollagenase und deren Struktur, die ebenfalls zwei Untereinheiten aufweist, und stellten fest, dass es sich um ein Dimer von einer Größe von je 35 kDa handelte. Bei der Kollagenase des *Alteromonas sp.* Stammes, mit einem vergleichbaren Molekulargewicht von 40 kDa, könnte es sich ebenfalls um eine Zusammenlagerung zweier identischer Untereinheiten handeln. Durch Auswertung der SDS-PAGE besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass eine Untereinheit ein geringes Molekulargewicht zwischen 17 und 28 kDa aufweist, da in diesem Bereich spezifische Banden vom verwendeten SDS sind, die Banden der Untereinheit überdecken könnten. Um die genaue Anzahl und das Molekulargewicht der Untereinheiten zu klären, kann die Größe der nativen Proteinstruktur der Kollagenase mit Hilfe der Gelfiltration bestimmt werden. Für vergleichende Berechnungen müsste die Säule (z.B. Superdex 200) mit einem Protein bekannter Größe geeicht werden.

### **5.5. Biologische Aktivität der Substanz P6 aus dem *Microbacterium*-Isolat sowie ihre Wirkung und weiterer potenzieller Inhibitoren auf die spezifische Aktivität einer mikrobiellen Kollagenase**

Bei der Analyse der morphologischen Eigenarten der Stämme der Gattung *Microbacterium* konnten die in der Literatur angegebenen Merkmale bestätigt werden (ORLA-JENSEN, 1919, SCHLEIFER, 1970). Hinsichtlich des Wachstumsverhaltens zeigte sich erwartungsgemäß in dem nährstoffreichsten Medium GYM+Ca bevorzugt Vermehrung. Andere wissenschaftliche Arbeiten nutzten mit Marine-Broth-Medium oder künstlichem Meerwasser versetzt mit Pepton-Hefeextrakt bzw. Glukose ebenfalls Nährmedien mit einem hohen Nährstoffgehalt (WICKE *et al.*, 2000). Da Bakterien unter Stressbedingungen neben dem Primärstoffwechsel und dem Wachstum beginnen können weitere eventuell unspezifische Sekundärmetabolite zu bilden, erfolgte die Kultivierung in Minimal- und Standardmedium. Diese These bestätigte sich nicht und im Wachstumsmedium konnte die größte Diversität in der Metabolitbildung mittels HPLC festgestellt werden. Es waren spezifische Peaks nachweisbar, die auf die Bildung der aromatischen Verbindungen Anthranilsäure und Phenylsäure hindeuten. Diese konnten ebenfalls beim Wachstum in Marine Broth bei WICKE *et al.* (2000) isoliert werden und sind charakteristisch für diese Gattung. Von Interesse waren daher unspezifische Peaks, die sich als Benzolderivate, Indol-3-Carbaldehyd und Indol-3-Essigsäure herausstellten und in allen Isolaten der Gattung *Microbacterium* mehr oder weniger auftraten. Aus dem *Microbacterium* Stamm 7 wurden nach der Gelfiltration sechs Fraktionen isoliert und davon insgesamt neun reine Substanzen P1-P9 durch PHPLC erhalten. Die bereits in der Fraktion

3 gefundene antibiotische Wirkung gegen *B. subtilis* konnte der daraus aufgereinigten Substanz P6 zugeordnet werden. Alle weiteren Substanzen zeigten keine nennenswerten bioaktiven Wirkungen. Die Ergebnisse des Bioaktivitätstests der Substanz P6 sind etwa vergleichbar mit denen, die von Extrakten mariner Schwämme aus dem Mittelmeer bekannt sind (AMADE *et al.*, 1987). Es konnte ausschließlich eine Hemmung von gram-negativen, nicht aber gram-positiven Bakterien festgestellt werden. Laut Studie sind Inhibitionen von gram-positiven Bakterien um ca. 25 % geläufiger als von gram-negativen. Weiterhin zeigte die Substanz P6 schwache antifungale, aber keine Wirkung gegen Hefen, was ebenfalls bei Untersuchungen isolierter Substanzen aus Schwämmen beobachtet wurde. Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang wäre, dass marine Bakterien sehr ähnliche Produkte, wie der Schwamm, mit dem sie assoziiert sind, synthetisieren. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass die Bakterien an der Synthese dieser Substanzen beteiligt sind, welche ursprünglich auf die Schwämme zurückgeführt wurde (LEE *et al.*, 2001). Dieses wird auch von weiteren Beispielen belegt, bei denen Substanzen erst im Schwamm und anschließend vom assoziierten Bakterium isoliert wurden (KOBAYASHI & ISHIBASHI, 1993). Des Weiteren zeigte die bioaktive Substanz P6 aus dem *Microbacterium* Stamm 7 eine Inhibition gegenüber humanen Fibroblasten und Leberkarzinomzellen. Diese Wirksamkeit konnte ebenfalls bei extrahierten Glycerolipiden von Schwamm-assoziierten Vertretern der Gattung *Microbacterium* nachgewiesen werden (LANG *et al.*, 2004). Von weitaus größerem Interesse in dieser Arbeit war die inhibierende Wirkung des Extraktes auf verschiedene Enzyme. Bei einer Reihe in Interaktion mit Schwämmen lebender Bakterien ist die Inhibition von Enzymen wie Phosphatase oder der Topoisomerase II bekannt (LEE *et al.*, 2001). Ebenso konnte bei der Substanz P6 eine deutliche Schwächung der Aktivität der Phosphodiesterase 4 gezeigt werden, die eine hemmende Wirkung auf die Kollagenase vermuten ließ. Die Untersuchung dieser zeigte jedoch, dass anscheinend keine Beeinträchtigung der spezifischen Aktivität der Kollagenase aus dem *Alteromonas sp.* Stamm vorliegt. Bei der Analyse einer hohen Konzentration von 10 µM wurde eine hemmende Wirkung ausgemacht. Parallel dazu wurde dieselbe Konzentration an DMSO im Bioassay untersucht und zeigte zweifelsfrei, dass jegliche inhibierende Wirkung auf das Lösungsmittel zurückzuführen ist, in das die Substanz P6 gelöst war. Als Inhibitor ist das Lösungsmittel DMSO für Kollagenasen aktuell in wissenschaftlichen Berichten nicht aufgeführt. Jedoch sind extrem unterschiedliche Auswirkungen von DMSO auf Proteine und Enzyme bekannt. So kann DMSO als Stabilisator (RAJESHWARA & PRAKASH, 1994), Aktivator (RAMMLER *et al.*, 1971), denaturierend (BETTELHEIM & SENATORE, 1964) oder auch als Inhibitor wirken (PERLMAN & WOLFF, 1968, JOHANNESSON *et al.*, 1997). Die hemmende Wirkung auf die enzymatische Aktivität basiert zum einen auf Veränderungen der Konformation in der Proteinstruktur (RAMMLER, 1967). Demnach werden die Bindungseigenschaften des Enzyms beeinträchtigt, indem es durch DMSO zu Denaturierung, Aggregationen und/oder Degradati-

onen kommen kann (TJERNBERG *et al.*, 2006). Eine andere Untersuchung zeigte, dass DMSO fähig ist, Wasser und auch Metallionen von der Proteinoberfläche abzustreifen (ZHENG & ORNSTEIN, 1996). Demnach könnten auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von der Kollagenase ferngehalten werden, die dadurch in ihrer Aktivität eingeschränkt ist. Da die zuvor beschriebenen Auswirkungen nur bei höherer DMSO-Konzentration auftreten, würde das den letztendlich vollkommene Aktivitätsverlust der Kollagenase bei 10 mM DMSO erklären.

Weiterhin wurde die schwefelhaltige Aminosäure Cystein, die ebenfalls als Kollagenase-inhibitor beschrieben wurde (HOOK *et al.*, 1971; MAKINEN & MAKINEN, 1987), auf ihre hemmende Wirkung auf die enzymatische Aktivität untersucht. Anders als bei einigen mikrobiellen Kollagenasen, zeigten selbst hohe Konzentrationen keine konkrete Beeinflussung der spezifischen Aktivität durch die Aminosäure. Die inhibierende Wirkung von Cystein basiert auf ihrer Thiolgruppe. Zum einen können Metallionen gebunden werden, wodurch Cystein ein starker Chelator für  $\text{Zn}^{2+}$  ist (FRANÇOIS, 1977). Daneben kann es durch Interaktionen mit S-S-Bindungen zur Störung der Raumstruktur des Enzyms kommen. Da jedoch keine Beeinträchtigung der spezifischen Aktivität vorlag, scheinen diese Interaktionen keinen Einfluss zu haben.

Das Antibiotikum Doxorubicin gehört zur Stoffgruppe der Anthracycline, die aus Streptomyces-Arten isoliert werden. Ihre Wirkung beruht zum einen auf der planaren Struktur, wodurch sie in die DNA (oder RNA) interkalieren können und die weitere Transkription verhindern. Als Enzym-Inhibitor wirkt Doxorubicin vor allem gegen die Topoisomerase II, die beide DNA-Stränge aufbrechen, und findet deshalb u.a. Anwendung in der Tumorbehandlung (O'NEIL, 2006). Da Kollagen aus drei schraubenförmigen Polypeptidketten, die miteinander zu einer tripelhelicalen Struktur verdreht sind, ähnlich wie DNA aufgebaut ist, könnte vermutet werden, Doxorubicin könnte in diese Struktur interkalieren und dadurch den Abbau durch die Kollagenase blockieren. Entscheidender ist jedoch, dass Doxorubicin reaktive Sauerstoffradikale freisetzt und dadurch zur schädigenden Proteinoxidation führt (HANDA & SATO, 1976; BACHUR *et al.*, 1977). Diese kann zu Konformationsänderungen und zur Hemmung der enzymatischen Aktivität führen. Die Untersuchung, ob eine inhibierende Wirkung gegen die aus dem *Alteromonas sp.* Stamm isolierte Kollagenase ebenfalls vorliegt, konnte keinen Einfluss auf die spezifische Aktivität des Enzyms aufzeigen. Auch höhere Konzentrationen von 0,2 mM konnten keine Inhibition hervorrufen. Doxorubicin ist daher kein Inhibitor der Kollagenase.

## 5.6. Biotechnologisches und ökologisches Betrachtung

Aus ökologischer Sicht lässt sich aus den Untersuchungen zusammenfassen, dass der *Alteromonas sp.* Stamm in der Lage ist, den ihm als Wirt dienenden Schwamm *Tethya aurantium* zu schädigen, indem er sein aus Kollagen bestehendes Stützgerüst enzymatisch

abbaut. Die isolierte Kollagenase wird jedoch erst vermehrt produziert, wenn das Bakterium über einen längeren Zeitraum kein anderes Substrat als Kollagen angeboten bekommt. Da ebenfalls ein mäßiges Wachstum in Kollagenmedien vorliegt, scheint dies nicht die bevorzugte Nährstoffaufnahme des marinen Bakteriums zu sein. Daher könnte der enzymatische Abbau des Schwamms erst vermehrt mit einem Mangel an Nährstoffen einhergehen. Somit würde der Schwamm insbesondere im nährstoffarmen Mittelmeer in doppelter Hinsicht geschädigt werden.

Für die Charakterisierung der Kollagenase konnte eine stabile Nachweismethode in Form eines kolorimetrischen Enzymassays entwickelt werden. Unter Beachtung der beschriebenen Inkubationszeiten und ausreichender Reinheit des Enzyms, können damit schnell, genau und reproduzierbar quantitative Aussagen über Kollagenasen getroffen werden. Diese Nachweismethode kann somit für weitere biotechnologischer Prozesse genutzt werden, z.B. bei der Isolierung und Bewertung weiterer mariner Kollagenasen und ggf. durch eine Validierung in die Laborroutine integriert werden.

Die hier charakterisierte Kollagenase des *Alteromonas sp.* Stammes weist mehrere Auffälligkeiten im Vergleich mit anderen mikrobiellen Kollagenasen auf. Zum einen ist ihr Molekulargewicht mit um die 40 kDa ungewöhnlich, da dokumentierte Kollagenasen entweder wesentlich geringere oder höhere Molgewichte zeigen. Von größerer Bedeutung ist jedoch das Temperaturoptimum dieses Enzyms, was mit 58 °C weit höher als bei den meisten Enzymen liegt. Weiterhin ist das pH-Optimum zwischen 4,5 und 5 zu beachten, da Kollagenasen für gewöhnlich neutrale Bereiche bevorzugen. Für den Wirt, den Schwamm, sind diese Eigenschaften vorteilhaft, da das natürliche Milieu der Kollagenase keine optimalen Aktivitätsbedingungen bietet. Das schädigende Potenzial ist daher gering einzuschätzen. Bei weiteren Analysen zeigte sich, dass diese mikrobielle Kollagenase aus mindestens zwei Untereinheiten bestehen muss. Demnach handelt es sich um eine aktuell noch nicht beschriebenen Kollagenase mit mehreren Besonderheiten und einer vergleichbar guten spezifischen Aktivität, die von divalenten Kationen, speziell  $\text{Ca}^{2+}$ , als Aktivator abhängt. Einsatz kann die Kollagenase in human- oder veterinärmedizinischen Bereichen finden. So werden mikrobielle Kollagenasen zur Behandlung der Dupuytrenschen Kontraktur, die mit überschüssiger Kollagenbildung in den Fingern einhergeht, eingesetzt (WULKE *et al.*, 2002). Auch für therapeutische Zwecke zur Mobilisation von Gelenken und Muskeldehnungen finden Kollagenasen bereits Verwendung (DÖLKEN, 2009). Ferner werden Kollagenase zur Isolierung von Gewebematerial in der Molekularbiologie und Biochemie eingesetzt. Neben den aufgeführten Verwendungszwecken sind durch die hohe Thermoaktivität der *Alteromonas sp.* Kollagenase auch weitere bis dahin durch die Temperaturempfindlichkeit limitierte Einsatzmöglichkeiten denkbar.

---

Ferner kann die aus *Alteromonas sp.* Stamm isolierte Kollagenase über den Entzug von divalenten Kationen in ihrer spezifischen Aktivität gehemmt werden. Gegen oxidative Reaktionen scheint sie dagegen weitgehend unempfindlich zu sein. Ein potenzieller natürlicher Inhibitor müsste demnach in der Lage sein, als  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator zu fungieren. Bei der aus dem Stamm 7 der Gattung *Microbacterium* isolierten Substanz P6 konnte diese Fähigkeit nicht nachgewiesen werden. Daher ist die Möglichkeit, dass dieser Stamm in den Abwehrmechanismus eines mit ihm assoziierten Wirts gegen Kollagenase-produzierende Bakterien integriert ist, sehr unwahrscheinlich. Die häufige Interaktion zwischen dem Bakterium und Schwämmen basiert daher vermutlich auf den höheren Nährstoffgehalt im Innenraum des Schwamms im Vergleich zum Meerwasser. Dieser bietet Bakterien Nahrung und einen sicheren Lebensraum. Der Vorteil liegt bei einer derartigen Assoziation auf Seiten des Bakteriums, da keine Anzeichen einer Funktion des Bakteriums vorliegen, die für den Schwamm nützlich wäre, beispielsweise als Translokator für Metabolite. Die beiden Bakterien-Gattungen *Alteromonas* und *Microbacterium* weisen demnach keinen ökologischen Zusammenhang auf.



## 6. Zusammenfassung

Um ökologische Beziehungen zwischen Schwämmen und mit ihnen assoziierten Bakterien bewerten und aus diesen Interaktionen resultierende bakterielle Metabolite gewinnen und das biotechnologische Wissen erwerben zu können, sind umfangreiche Untersuchungen notwendig. Im Mittelpunkt der vorliegenden Master-Arbeit stand die Isolierung und Charakterisierung einer Kollagenase eines Schwamm-assoziierten Bakteriums der Gattung *Alteromonas sp.* Dafür wurde der Bakterienstamm zweifach in gelatinehaltigem Flüssigmedium vorkultiviert und anschließend für ca. 30 h im Großansatz gezüchtet. Die Ernte erfolgte mittels Ammoniumsulfat-Fällung bei einer Sättigung von 40 % Ammoniumsulfat. Das ausgefällte Enzym wurde von überschüssigen Protein und Salz über mehrere Gelfiltration getrennt. Nach einer ersten groben Reinigung mit Hilfe der Superdex 200, wurde das restliche Ammoniumsulfat durch die HiTrap Desalting Säule abgetrennt. Nach einer erneuten Gelfiltration mit der Superdex 200 lag die Kollagenase fast rein vor. Zur weiteren Charakterisierung wurde ein Enzymassay etabliert. Dieses kolorimetrische Nachweisverfahren basiert auf der Ninhydrin-Reaktion. Dabei wurden mindestens 0,1 µg Protein mit 4,8 g/L Gelatinelösung gemischt und mit einem Natriumacetat Puffer (pH 5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) auf 100 µL aufgefüllt und inkubiert. Für die hier isolierte Kollagenase erfolgte dies unter optimierten Bedingungen bei 58 °C und pH 5. Zur Auswertung wurde der Ansatz 1:1 mit Ninhydrin-Lösung (10 g/L) gemischt und für 15 min bei 60 °C inkubiert. Es folgte eine 7:30 min ütige Abkühlphase nach der die Absorption bei 570 nm gemessen werden konnte. Bei Einhaltung der Parameter und ausreichender Reinheit des Enzyms (geringer Salzgehalt, neutraler pH-Wert) liegt mit diesem Assay eine robuste, schnelle und einfache Methode zum quantitativen Nachweis von Kollagenase vor. Durch den Enzymassay konnten folgende Eigenschaften der mikrobiellen Kollagenase aus dem *Alteromonas sp.* Stamm ermittelt werden: Wie bereits erwähnt, liegt die optimale Temperatur bei 58 °C und der pH-Wert zwischen 4,5 und 5. Unter diesen Bedingungen konnte eine spezifische Aktivität von 198,8 U/mg erzielt werden. Die Untersuchung der Substratabhängigkeit zeigte zudem, dass die Kollagenase aus mindestens zwei Untereinheiten besteht. Weiterhin wurde untersucht, ob bei der Interaktion Bakterium-Schwamm ein Stamm der Gattung *Microbacterium* als Kollagenaseinhibitor in den Abwehrmechanismus des Wirts integriert werden könnte. Dazu wurden Kultivierungsversuche verschiedener Stämme durchgeführt, die mittels Ethylacetatextraktion und anschließender HPLC-Analyse ausgewertet wurden. Es konnte über weitere chromatografische Trennverfahren eine Substanz isoliert werden, die diverse biologische Aktivitäten aufwies. Bei der folgenden Untersuchung der hemmenden Wirkung dieser Substanz auf die mikrobielle Kollagenase konnte jedoch kein Einfluss auf deren spezifische Aktivität festgestellt werden. Dagegen zeigten Analysen mit Kollagenaseinhibitoren (EDTA, DMSO, Cystein), dass die *Alteromonas sp.* Kollagenase eine hohe Abhängigkeit von divalenten Kationen, insbesondere Ca<sup>2+</sup>, aufweist, die als Aktivator

---

fungieren. Hemmstoffe mit schädigender oxidativer Wirkung (Doxorubicin) konnten dagegen keine Inhibition herbeiführen.

---

## 7. Literatur

- Abderhalden, E., Schmidt, H.: Einige Beobachtungen und Versuche mit Triketohydrindenhydrat (Ruhemann). Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie 85, 1-2 (1913), 143–147.
- Amade, P., Charroin, C., Baby, C., Vacelet, J.: Antimicrobial activities of marine sponges from the Mediterranean Sea. Mar. Biol. 94, 2 (1987), 271-275.
- Bachur, N.R., Gordon, S.L., Gee, M.V.: Anthracycline Antibiotic Augmentation of Microsomal Electron Transport and Free Radical Formation. Mol. Pharmacol. 13, 5 (1977), 901-910.
- Baki, A., Bielik, A., Molnár, L., Szendrei, G., Keserü, G.M.: A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors. Assay. Drug Dev. Technol. 5 (2007), 75-83.
- Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M., Allen, R.D.: Taxonomy of Aerobic Marine Eubacteria. J. Bacteriol. 110, 1 (1972), 402-429.
- Bennett, T.P.: Membrane Filtration for determining Protein in the Presence of Interfering Substances. Nature 213 (1967), 1131-1132.
- Bettelheim, F.A., Senatore, P.: Hydrophobic bond. Activity and conformation of trypsin in dimethyl sulfoxid-water systems. J. Chem. Phys. 61 (1964), 105-110.
- Biabani, M.A., Laatsch, H.: Advances in chemical studies on low-molecular weight metabolites of marine fungi. J Prakt. Chem. 340, 7 (1998), 589–607.
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254.
- Chakraborty, R., Weiss, K.M.: The frequencies of complex diseases in hybrid populations. Am. J. Phys. Anthropol. 70 (1986), 489-503.
- Collins, M.D., Keddie, R.M., Kroppenstedt, R.M.: Lipid composition of *Arthrobacter simplex*, *Arthrobacter tumescens* and possibly related taxa. Syst. Appl. Microbiol. 4 (1983), 18-26.
- Constantino, V., Fattorusso, E., Mangoni, A., Di Rosa, M., Ianaro, A.: Glycolipids from sponges: Part 8: Plakopolyprenoside from the Marine Sponge *Plakortis simplex*. An Improved Procedure for Isolation of Glycolipids as Peracetyl Derivatives. Tetrahedron 56, 10, (2000), 1393-1395.

- 
- Daniels, M., Fruchi, S.: Isolation der Phospholipase A2 aus dem Gift der *Crotalus d. unicolor*. Kantonsschule Wettingen, Maturaarbeit, Bio Valley College Day 2009.
- DeBellis, R.H., Mandl, I., MacLennan, J.D., Howes, E.L.: Separation of Proteolytic Enzymes of *Clostridium histolyticum*. *Nature* 174 (1954), 1191-1192.
- Demain, A.L., Fang, A.: The Natural Functions of Secondary Metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 69 (2000), 1-39.
- Devlin, T.M.: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. 6. Auflage. New York: Wiley-Liss, 2005.
- Dölken, M.: *Physiotherapie in der Orthopädie*. 2. Auflage. Stuttgart, Thieme, 2009.
- Dyett, E.J., Shelley, D.: *The microbiology of British fresh sausage*. 1st. Int. Cong. Food Sc. and Techn., London, 1962.
- Ecompound: Ninhydrin react with amino acids. 08. September 2011.  
URL: <http://www.ecompound.com/Reaction%20reference/reactions/Ninhydrin%20with%20amino%20acid%20mechanism.gif>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961), 88-95.
- Endo, A.: Novel collagenase "discolysin" and production method thereof. *Biotechnol. Adv.*, 5,1, 158 (1986), US Patent 4 624 924.
- European Bioinformatics Institute (EBI): EC 3.4.24.3 - Microbial collagenase. 28.Juli 2011.  
URL: <http://www.ebi.ac.uk/intenz/query?cmd=SearchEC&ec=3.4.24.3>.
- Faulkner, D.J.: Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 17 (2000), 7-55.
- Faulkner, D.J.: Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 18 (2001), 1R-49R.
- François, J.: The Seventh Frederick H. Verhoeff Lecture. Collagenase and collagenase inhibitors. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 75 (1977), 285-315.
- Friedberg, E., Ganesan, A.K., Minton, K.: N-Glycosidase Activity in Extracts of *Bacillus subtilis* and Its Inhibition After Infection with Bacteriophage PBS2. *J. Virol.* 16, 2 (1975), 315-321.

- 
- Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R.: Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (1995), 755-761.
- Gibbons, R.J., MacDonald, J.B.: Degradation of collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.* 81 (1961), 614-621.
- Handa, K., Sato, S.: Stimulation of microsomal NADPH oxidation by quinone group-containing anticancer chemicals. *Gann.* 67, 4 (1976), 523-528.
- Hanes, C.S.: Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.* 26, 5 (1932), 1406-1421.
- Imhoff, J.F., Labes, A., Wiese, J.: Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnol. Adv.* 29, 5 (2011), 468-482.
- Ivanova, E.P., Mikhailov, V.V.: A New Family, *Alteromonadaceae* fam. nov., Including Marine *Proteobacteria* of the Genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina*, and *Colwellia*. *Microbiol.* 70, 1 (2001), 10-17.
- Jaenicke, L.: Erinnerungsbild: Siegfried Ruhemann und der „Ruhemann'sche Purpur“. *Biospektrum* 4 (2007), 456-458.
- Jensen, P.R., Fenical, W.: Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17, 5-6 (1996), 346-351.
- Johannesson, H., Denisov, V., Halle, B.: Dimethyl sulfoxid binding to globular proteins: A nuclear magnetic relaxation dispersion study. *Prot. Sci.* 6 (1997), 1756-1763.
- Kaminishi, H., Hagihara, Y., Hayashi, S., Cho, T.: Isolation and Characteristics of Collagenolytic Enzyme produced by *Candida albicans*. *Infect. Imm.* 53, 2 (1986), 312-316.
- Kanayama, Y., Sakai, Y.: Purification and Properties of a New Type of Protease Produced by *Microbacterium liquefaciens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 5 (2005), 916-921.
- Keil-Dlouha, V., Keil, B.: Subunit structure of *Achromobacter* collagenase. *Biochim. Biophys.* 522 (1978), 218-228.
- Kelecom, A.: Secondary metabolites from marine microorganisms. *Ann. Brazil Acad. Sci.* 74, 1 (2002), 151-170.

- 
- Kobayashi, J., Ishibashi, M.: Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem. Rev.* 93 (1993), 1753-1769.
- Lämmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970), 680-685.
- Lee, Y.P., Takahashi, T.: An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin. *Anal. Biochem.* 14, 1 (1966), 71-77.
- Lee-Own, V., Anderson, J.C.: The preparation of a bacterial collagenase containing negligible non-specific protease activity. *Prep. Biochem.* 5, 3 (1975), 229-245.
- Li, H.Y., Matsunaga, S., Fusetani, N.: Corticatic Acids A-C, Antifungal Acetylenic Acids from the Marine Sponge, *Petrosia corticata*. *J. Nat. Prod.* 57, 10 (1994), 1464-1467.
- Lottspeich, F., Engels, J.W.: *Bioanalytik*. Auflage 2. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
- Lwebuga-Mukasa, J.S., Harper, E., Taylor, P.: Collagenase enzymes from *Clostridium*: characterization of individual enzymes. *Biochem.* 15, 21 (1976), 4736-4741.
- MacLennan, J.D., Mandl, I., Howes, E.L.: Bacterial Digestion of Collagen. *J. Clin. Invest.* 32, 12 (1953), 1317-1322.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J.: *Brock Mikrobiologie*. 9. Auflage. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2000.
- Makinen, K.K., Makinen, P.L.: Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by the human oral bacterium *Bacillus cereus* (strain Soc 67). *J. Biol. Chem.* 262 (1987), 12488-12495.
- Mandl, I., MacLennan, J.D., Howes, E.L., DeBellis, R.H., Sohler, A.: Isolation and Characterization of Proteinase and Collagenase from *Cl. histolyticum*. *J. Clin. Invest.* 32, 12 (1953), 1323-1329.
- Mandl, I., Zipper, H., Ferguson, L.T.: *Clostridium histolyticum* Collagenase: Its Purification and Properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 74 (1958), 465-475.
- Merkel, J.R., Dreisbach, J.H.: Purification and Characterization of a Marine Bacterial Collagenase. *Biochem.* 17 (1978), 2857-2863.
- Merkel, J.R., Dreisbach, J.H., Ziegler, H.B.: Collagenolytic Activity of Some Marine Bacteria. *Appl. Microbiol.* 29, 2 (1975), 145-151.

- 
- Miyaoka, H., Shimomura, M., Kimura, H., Yamada, Y.: Antimalarial activity of kalihinol A and new relative diterpenoids from the Okinawan sponge, *Acanthella* sp. *Tetrahedron* 54, 44 (1998), 13467-13474.
- Moberg, E.: Objective methods for determining the functional value of sensibility in the hand. *J. Bone Joint Surg.* 40, 3 (1958), 454-476.
- Moore, S., Stein, W.H.: Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176 (1948), 367-388.
- Nagano H., To, K.A.: Purification of Collagenase and Specificity of Its Related Enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1 (2000), 181-183.
- O'Neil, M.J.: The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 14. Auflage. Darmstadt: Merck, 2006.
- Odén, S., von Hofsten, B.: Detection of Fingerprints by the Ninhydrin Reaction. *Nature* 173 (1954), 449-450.
- Orla-Jensen, S.: The Lactic Acid Bacteria. Kopenhagen: A. F. Hest and Son, 1919.
- Perlman, R.L., Wolff, J.: Dimethyl Sulfoxid: An Inhibitor of Liver Alcohol Dehydrogenase. *Science* 160, 3825 (1968), 317-319.
- Peterkofsky, B.: Bacterial collagenase. *Methods in Enzymology* 82 (1982), 453-471.
- Rajeshwara, A.N., Prakash, V.: Structural stability of lipase from wheat germ. *Int. J. Pept. Protein Res.* 45 (1994), 122-128.
- Rammler, D.H.: Enzyme-catalyzed reactions. Use of DMSO in enzyme-catalyzed reactions. In *Dimethyl Sulfoxide* (ed. Jacob, S.W., Rosenbaum, E.E. und Wood, D.C.), pp. 189-206. New York: Marcel Dekker, 1971.
- Rammler, D.H.: The effect of DMSO on several enzyme systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 141 (1967), 291-299.
- Ruhemann, S.: LXXXIV.-Triketohydrindene hydrate. Part III. Its relation to alloxan. *J. Chem. Soc., Trans.* 99 (1911), 792-800.
- Sasagawa, Y., Kamio, Y., Matsubara, Y., Matsubara, Y., Suzuki, K., Kojima, H., Izaki, K.: Purification and properties of collagenase from *Cytophaga* sp. L43-1 strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57 (1993), 1894-1898.

- 
- Schleifer, K.H.: Die Mureintypen in der Gattung *Microbacterium*. Arch. Mikrobiol. 71 (1970), 271-282.
- Schneemann, I., Nagel, K., Kajahn, I., Labes, A., Wiese, J., Imhoff, J.F.: Comprehensive Investigation of Marine *Actinobacteria* Associated with the Sponge *Halichondria panicea*. Appl. Environ. Microbiol. 76, 11 (2010), 3702–3714.
- Scopes, R.K.: Protein Purification, Principles and Practice. 2. Auflage. Berlin: Springer-Verlag, 1987.
- Soru, E., Zaharia, O.: *Clostridium histolyticum* collagenase. II. Partial characterization. Enzymologia 43 (1972), 45-55.
- Stackebrandt, E., Teuber, M.: Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. Biochimie 70, 3 (1988), 317-324.
- Stegemann, H.: Bestimmung von Aminosäuren mit dithionitreduziertem Ninhydrin. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie 319, 1 (1960), 102–109.
- Takeuchi, M., Hatano, K.: Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 3 (1998), 739-747.
- The Comprehensive Enzyme Information System BRENDA: EC 3.4.24.3 - Microbial collagenase 02. September 2011.  
URL: [http://www.brenda-enzymes.org/php/result\\_flat.php4?ecno=3.4.24.3](http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.24.3).
- Tjernberg, A., Markova, N., Griffiths W.J., Hallén, D.: DMSO-Related Effects in Protein Characterization. J. Biomol. Screen. 11, 2 (2006), 131-137.
- Tytell, A.A., Hewson, K.: Production, Purification, and Some Properties of *Clostridium histolyticum* Collagenase. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 74 (1950), 555-558.
- Wicke, C., Hüners, M., Wray, V., Nimtz, M., Bilitewski, U., Lang, S.: Production and Structure Elucidation of Glycoglycerolipids from a Marine Sponge-Associated *Microbacterium* Species. J. Nat. Prod. 63 (2000), 621-626.
- Wilkinson, C.R.: Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. Mar. Biol. 49, 2 (1978), 161-167.
- Wilson, J.J., Matsushita, O., Okabe, A., Sakon, J.: A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation. EMBO J. 22 (2003), 1743-1752.



- 
- Wu, Q., Li, C., Chen, H., Shuliang, L.: Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2009), 129-139.
- Wulke, A.P., Gausepohl, T., Pennig, D.: Presentation of a Simple Method of Preoperative Soft-Tissue Distraction in Dupuytren's Contracture Grade IV. *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir.* 34, 2 (2002), 115-117.
- Yokota, A., Tamura, T., Nishii, T., Hasegawa, T.: *Kineococcus aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic, grampositive, motile coccus with meso-diaminopimelic acid and arabinogalactan in the cell wall. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (1993), 52-57.
- Yu, M.S., Lee, C.Y.: Expression and characterization of the prtV gene encoding a collagenase from *Vibrio parahaemolyticus* in *Escherichia coli*. *Microbiology* 145 (1999), 143-150.
- Zheng, Y.J., Ornstein, R.L.: A Molecular Dynamics and Quantum Mechanics Analysis of the Effect of DMSO on Enzyme Structure and Dynamics: Subtilisin. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 17 (1996), 4175-4180.
- Zor, T., Selinger, Z.: Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Anal. Biochem.* 236 (1996), 302-308.

---

## 8. Abbildungen

Abb. 1: Schematischer Überblick über die Aufgabenstellung der Arbeit und die Verknüpfung mit der weiteren Bearbeitung im Kieler Wirkstoff-Zentrum am IFM-GEOMAR.....	1
Abb. 2: Ninhydrin-Reaktion. Umwandlung eines Molekül Ninhydrin über Decarboxylierung und hydrolytischer Spaltung mit anschließender Dimerisierung zum Ruhemann'schen Purpur. Quelle: nach ECOMPOUND. ....	6
Abb. 3: Standardreihe der Abhängigkeit der Extinktionsdifferenzen von der Gelatinekonzentration. ....	13
Abb. 4: Vergleich des Wachstums von <i>Alteromonas sp.</i> auf MB-Agar (links) und GM-Agar (rechts). ....	21
Abb. 5: <i>Alteromonas sp.</i> unter Lichtmikroskop mit 100 x Vergrößerung.....	22
Abb. 6: Wachstumskurve (optische Dichte bei 600 nm) und Bestimmung der freigesetzten Aminosäuren (Absorption bei 570 nm) von <i>Alteromonas sp.</i> in 100 mL GM, 28 °C, 120 rpm. ....	22
Abb. 7: SDS-PAGE von <i>Alteromonas sp.</i> -Kollagenase nach Reinigung mittels Superdex 200 und Standardpuffer mit 150 mM NaCl, aufgetragene Proteinmenge 20 µg. L: Molekulargewichtsstandard; F1 – F9: Fraktionen der Gelfiltration.....	27
Abb. 8: Temperaturabhängigkeit der Kollagenase aus <i>Alteromonas sp.</i> gemessen bei pH 5; 100 % entsprechen 35,6 U/mg.....	29
Abb. 9: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Kollagenase aus <i>Alteromonas sp.</i> von der Gelatinekonzentration bei optimalen Bedingungen von pH 5 und 58 °C.....	30
Abb. 10: Hill-Diagramm der linearisierten Ergebnisse aus der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Kollagenase von der Gelatinekonzentration.....	31
Abb. 11: Hanes-Woolf-Diagramm der linearisierten Ergebnisse aus der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Kollagenase von der Gelatinekonzentration. ....	32
Abb. 12: Vergleich des Stammes 5 (links) und 7 (rechts). Beide auf GYM+Ca-Agar 6 d bei 28 °C. ....	33
Abb. 13: Chromatogramm (DAD) mit der Übersicht der Peaks der Substanzen P2, P3 und P7 im Ethylaldehyd-Extrakt des Isolates Aa259 nach 7 d Inkubation in 100 mL GYM+Ca-Flüssigmedium. ....	35

---

## 9. Tabellen

Tab. 1: Einfluss der TCA-Fällung als Aufarbeitungsschritt auf das Ninhydrin-gekoppelte Assaysystem. ....	24
Tab. 2: Beeinflussung des Nachweis freier Aminosäuren durch Ammoniumsulfat. ....	25
Tab. 3: Ausbeute der Isolierung und Aufreinigung der Kollagenase aus <i>Alteromonas sp.</i> ....	28
Tab. 4: Spezifische Aktivität der Kollagenase bei verschiedenen pH-Werten. ....	28
Tab. 5: Zusammenfassung der Charakteristika der aus einem <i>Alteromonas sp.</i> Stamm isolierten Kollagenase. ....	32
Tab. 6: Wachstumsverhalten und Phenotyp der <i>Microbacterium</i> -Isolate. ....	34
Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Aufreinigung der Extrakte des <i>Microbacterium</i> Stammes 7. ....	35
Tab. 8: Ergebnisse der Molgewichtsbestimmung mittels Massenspektrometrie der Peaks der Substanzen P1-9. ....	35
Tab. 9: Ergebnis der biologischen Aktivität der Fraktionen von Stamm 7 gegenüber <i>B. subtilis</i> . ....	36
Tab. 10: Ergebnisse der Untersuchung der biologischen Aktivität der Substanz P6 aus der Fraktion 3 vom <i>Microbacterium</i> Stamm 7. ....	37
Tab. 11: Ergebnisse der Untersuchung der Inhibition der Kollagenase aus <i>Alteromonas sp.</i> durch verschiedene Substanzen. ....	38

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl Steffens für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit sowie den wertvolle Hinweise bei der Anfertigung.

Bei Frau Dr. Antje Labes möchte ich mich für die Vergabe des sehr interessanten Themas, die engagierte Unterstützung, das Korrekturlesen und die Chance so viel dazuzulernen bedanken. Die fachlichen Gespräche, hilfreichen Anregungen und konstruktiven Kritiken waren sehr wertvoll bei der Erstellung dieser Arbeit. Dies gilt im gleichen Maße für Dr. Dirk Schulz, dem ich für seine Geduld danken möchte.

Ebenso gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe des KiWiZ für die herzliche Aufnahme und die vielen Hinweise und Hilfen während meiner Tätigkeit im Labor. Besonders möchte ich Arlette für ihre Unterstützung bei den Bioaktivitätstests danken.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums und das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben.

Von ganzem Herzen möchte ich meinem Mann danken; für seine große Geduld und kompromisslose Unterstützung.

---

## **Erklärung über die selbständige Anfertigung der Arbeit**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift