

Bakterielle Produktion von geschneiderten Wachsestern

-

Verwendung von Pflanzenöl und Einzelkomponenten als Kohlenstoffquelle und Wachsester-Precursor

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

angenommene Dissertation

von

Constanze Jenschke

geboren am 28.03.1974 in Sande

Erstgutachterin: PD Dr. Luise Berthe-Corti
Zweitgutachter: Prof. Dr. Jürgen Rullkötter

Tag der Disputation: 15.12.2010

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Luise Berthe-Corti für die Bereitstellung des Themas, ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre sehr gute Betreuung und Unterstützung. Weiterhin für ihre interessanten Anregungen und sehr große Hilfe im Verlaufe dieser Arbeit.

Prof. Dr. Jürgen Rullkötter danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Dr. Barbara Scholz-Böttcher möchte ich für ihre Betreuung der chemischen Analytik, für ihre geduldige Diskussions- und Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit danken. Sie war mir während der gesamten Arbeit eine sehr große Hilfe.

Meinen Kollegen des Arbeitskreises Mikrobiologie/Biotechnologie, Charlotte Versteegen, Barbara Brunies, Reiner Hulsch, Uwe Maschmann, Dr. Simone Geyer, Dr. Marcus Nachtkamp und K. Amelie Gutsche danke ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit. Ebenso danke ich Maike Focken für gute Zusammenarbeit und ihre ständige Hilfsbereitschaft vor und während dieser Arbeit.

PD Dr. Rhiel und Frau Kort danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der TEM-Aufnahmen.

Anke Müllenmeister danke ich für die große Hilfe bei der Durchführung der gaschromatographischen Messungen.

Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt von der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V., Berlin und B&F Elektro, Filsum.

Helmuth Focken (Ing. Büro Biotechnik) danke ich für seine Hilfe.

Hermann Jansen-Olliges, Heidi und Leo Jenschke – Danke für Alles!

Abstract

The bacterial production of tailored wax esters (WE) from plant oil and other organic compounds was demonstrated using the bacterium *Alcanivorax jadensis* T9. Previous screening of more than 50 marine bacteria had shown that many of them produced WE on incubation with different plant oils. WE produced on rapeseed oil (RP) resembled WE in human sebum. Selected *n*-fatty acid, *n*-alcohol, *n*-alkane or triacylglyceride substrates led to the formation of WE with their acid and alcohol moieties mainly directly derived from the substrates. Additional WE of different chain lengths and degrees of unsaturation showed that the bacterium shortened, elongated or desaturated the substrate's carbon chains before WE synthesis. *n*-Alcohols were most suitable considering the amounts of WE produced. Two-component mixtures revealed selective WE metabolism. *n*-Alcohols plus RP led to variable amounts of WE and an extended WE spectrum compared to *n*-alcohols alone. Tripalmitate, RP or *n*-hexadecene with C₁₆ substrates reduced WE production compared to the C₁₆ compounds alone. Research in this field should aim at an industrial use of specifically tailored WE e. g. in skin care or medicine.

Kurzfassung

Die bakterielle Produktion geschneiderter Wachsester (WE) durch das Bakterium *Alcanivorax jadensis* T9 auf Pflanzenöl und anderen organischen Substanzen wurde nachgewiesen. Ein Screening von mehr als 50 Bakterien zeigte, dass viele davon WE auf verschiedenen Pflanzenölen produzierten. Auf Rapsöl (RP) erzeugte WE ähnelten den WE des menschlichen Sebums. *n*-Fettsäuren, *n*-Alkohole, *n*-Alkane oder Triacylglyceride führten überwiegend zu WE mit direkt vom Substrat abgeleiteten Säure- und Alkoholanteilen. WE unterschiedlicher Kettenlängen und Sättigungsgrade zeigten, dass *A. jadensis* die Substrate vor der WE-Synthese zum Teil desaturierte und ihre Kettenlänge veränderte. Die höchste WE-Ausbeute lieferten *n*-Alkohole. Zweikomponenten-Gemische führten zu selektivem WE-Stoffwechsel. *n*-Alkohole mit RP bewirkten eine Veränderung von WE-Menge und -Spektrum gegenüber den einzelnen *n*-Alkoholen. Tripalmitat, RP oder *n*-Hexadecen mit C₁₆-Substraten reduzierten die WE-Produktion gegenüber den einzelnen C₁₆-Substraten. Weitere Forschung mit dem Ziel der industriellen Anwendung geschneiderter WE im Bereich Hautpflege oder Medizin wäre sinnvoll.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Ziel der Arbeit	2
2 Stand des Wissens	4
2.1 Wachsester (Eigenschaften)	4
2.2 <i>Alcanivorax jadensis</i> T9	7
2.3 Wachsester (Schneidern)	8
2.4 Pflanzenöle	9
2.5 Menschliches Sebum	10
3 Material	13
3.1 Chemikalien	13
3.2 Geräte	16
3.2.1 Kultivierung	16
3.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	16
3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	17
3.2.4 Extraktion (organischer Extrakt)	17
3.2.5 Dünnschichtchromatographie (DC)	17
3.2.6 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)	17

	Seite
3.3 Lösungen und Medien	18
3.3.1 Ammoniumchloridlösung	18
3.3.2 Natriumhydrogencarbonatlösung	18
3.3.3 <i>di</i> -Natriumhydrogenphosphatlösung	19
3.3.4 Natriumhydroxidlösung	19
3.3.5 Natriumnitratlösung	19
3.3.6 Vitaminlösung nach Schlegel (1992), modifiziert	19
3.3.7 Spurenelementlösung nach DSMZ-Katalog (Nr. 124), modifiziert	20
3.3.8 Artifizielles Seewasser nach Levring (1946), 4-fach konzentriert	20
3.3.9 Seewasserbouillon X (SWB X)	21
3.3.10 Fermentermedium (FM)	21
3.3.11 Tris-Acetat (TAE)-Puffer 50-fach	22
3.4 Größenstandards für die Elektrophorese	22
3.5 Bakterienstämme	23
3.6 Computersoftware, Internetanwendungen und Datenbanken	24
4 Methoden	25
4.1 Inkubations- und Kulturbedingungen	25
4.1.1 Auswahl von Pflanzenöl und Produktionsstamm	25
4.1.2 Schneiden von Wachsestern mit <i>Alcanivorax jadensis</i> T9 auf Einzelsubstraten und Substratgemischen	26
4.2 Taxonomische Einordnung von Isolaten	28
4.2.1 DNA-Isolierung	28
4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
4.2.3 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente	29
4.2.4 Reinigung von PCR-Produkten	29
4.2.5 DNA-Sequenzanalyse	30
4.3 Bioverfügbarkeit der Substrate (Transmissionselektronenmikroskopie)	30

	Seite
4.4 Gewinnung und chemische Analytik der Wachsester-Fraktion	31
4.4.1 Isolierung der Lipidfraktion/Extraktion	31
4.4.2 Gewinnung des menschlichen Sebums	31
4.4.3 Dünnschichtchromatographie (DC)	32
4.4.3.1 Bestimmung eines geeigneten Laufmittels	33
4.4.3.2 Gewinnung der Wachsester-Fractionen aus organischem <i>Extrakt und Sebum</i>	34
4.4.4 Gaschromatographie (GC)	34
4.4.4.1 Qualitative Analyse	35
4.4.4.2 Quantitative Analyse	35
4.4.5 Gaschromatographisch/Massenspektrometrische Analytik (GC/MS)	36
5 Massenspektrometrische Analysen	37
5.1 Massenspektrometrie (MS)	37
5.1.1 Interpretation von Massenspektren gesättigter Wachsester	41
5.1.2 Interpretation der Spektren eines Wachsester-Gemisches	43
5.1.3 Interpretation der Spektren einfach ungesättigter Wachsester	44
5.1.4 Interpretation der Spektren zweifach ungesättigter Wachsester	46
5.1.5 Weichmacher als Hauptverunreinigung in den Versuchsansätzen	49
6 Ergebnisse und Diskussion	50
6.1 Screening bakterieller Isolate hinsichtlich ihrer Wachsester-Produktion mit Pflanzenöl als Kohlenstoff (C)- und Energie (E)-Quelle	50
6.1.1 Einzelöle als C- und E-Quelle	50
6.1.2 Ölgemisch aus Pflanzenölen als C- und E-Quelle	54
6.1.3 Auswahl eines geeigneten Pflanzenöles als Substrat	55
6.1.3.1 Qualität und Stabilität des Rapsöles	56
6.1.4 Bestimmung eines geeigneten Produktionsstammes	58
6.1.5 Reproduzierbarkeit der Wachsester-Produktion von <i>A. jadenis</i> T9	58
6.1.6 Anlagerungsmechanismen der Isolate an Pflanzenöl	61
6.1.7 Fazit (Screening)	66

	Seite
6.2 Wachsester aus menschlichem Sebum	67
6.2.1 Qualitative Bestimmung der Wachsester des menschlichen Sebums	67
6.2.2 Bestimmung der Zusammensetzung der Wachsester des menschlichen Sebums	71
6.2.3 Fazit (menschliches Sebum)	72
6.3 Darstellung von artifiziellem Sebum und Schneiden von Wachsestern	74
6.3.1 Charakterisierung von Bienenwachs	74
6.3.2 Schneiden von Wachsestern	75
6.3.2.1 <i>Einzelstoffklassen als Wachsester-Vorläufer</i>	76
6.3.2.2 <i>(Zwei-)Komponentengemische als Wachsester-Vorläufer</i>	97
6.3.2.3 <i>Mehrkomponentengemische als Wachsester-Vorläufer</i>	108
6.3.3 Fazit (artifizielles Sebum)	109
7 Zusammenfassung und Ausblick	116
7.1 Zusammenfassung/Summary	116/119
7.2 Ausblick	122
8 Literatur	125
9 Anhang	132

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. jadensis</i> T9	<i>Alcanivorax jadensis</i> T9
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AiF	Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V., Berlin
Bp	Base-Peak
CP	Cetylpalmitat
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DB	Doppelbindung
DC	Dünnschichtchromatographie
rDNA	ribosomale DNA
DS	Distelöl
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
E-Quelle	Energiequelle
FM	Fermentermedium
FS	Fettsäure(n)
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
H	Wasserstoff
HK	Hauptkultur(en)
MK	Maiskeimöl
MS	Massenspektrometrie
OL	Olivenöl
PHA	Polyhydroxyalkanoat(e)
RP	Rapsöl
rpm	rotation per minute
SB	Sonnenblumenöl
TAG	Triacylglycerid(e)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TL	Trilaurin
TP	Tripalmitat
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
WE	Wachsester
WS/DGAT	Wachsester Synthase/Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1.1: Darstellung der Zusammenhänge der für die vorliegende Arbeit wichtigen Teilbereiche	3
Abb. 1.2: Anabolismus von Wachsestern	5
Abb. 1.3: Vergleich der Fettsäure-Anteile verschiedener Pflanzenöle (in Prozent) mit der Unterteilung in gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren	9
Abb. 4.1: Dünnschichtchromatogramm des organischen Extraktes einer Kultivierung des Isolates S1 in Fermentermedium (FM) mit 1% (m/v) Rapsöl (RP)	32
Abb. 4.2: Gaschromatogramm der Wachsester-Fractionen einer Kultur von <i>Alcanivorax jadensis</i> T9 in Fermentermedium (FM) mit <i>n</i> -Hexadecansäure und <i>n</i> -Hexadecanol im Gemisch (1% m/v)	35
Abb. 5.1: Verschiedene Wege der Fragmentierung von WE über McLafferty-Umlagerung mit α -Spaltung des Moleküls	38
Abb. 5.2: Verschiedene Wege der Fragmentierung von Wachsestern über H-Umlagerungen mit Spaltung des Moleküls	39
Abb. 5.3: Zusätzliche Möglichkeiten der H-Umlagerung in der Fettsäure-Kette der Wachsester	40
Abb. 5.4: Fragmentierung eines Wachsesters über die α -Spaltung rechts oder links der Carbonylgruppe	40
Abb. 5.5: Massenspektrum und Struktur des Wachsesters Octadecanyl Hexadecanoat, gewonnen aus einer Kultur von <i>A. jadensis</i> T9 mit <i>n</i> -Octadecanol als einziger C- und E-Quelle	41
Abb. 5.6: Massenspektrum eines Wachsester-Gemisches gleicher Kettenlänge, aber mit unterschiedlicher Zusammensetzung	43
Abb. 5.7: Massenspektrum und Struktur des Wachsesters Octadecanyl Hexadecenoat, gewonnen aus einer Kultur von <i>A. jadensis</i> T9 mit <i>n</i> -Hexadecanol und Rapsöl (Gemisch) als einziger C- und E-Quelle	45
Abb. 5.8: Massenspektrum und Struktur des Wachsesters Octadecenyl Hexadecenoat, gewonnen aus einer Kultur von <i>A. jadensis</i> T9 mit <i>n</i> -Hexadecen und Rapsöl (Gemisch) als einziger C- und E-Quelle	47
Abb. 5.9: Massenspektrum und Struktur des Wachsesters Octadecenyl Octadecenoat, gewonnen aus einer Kultur von <i>A. jadensis</i> T9 mit <i>n</i> -Hexadecen und Rapsöl (Gemisch) als einziger C- und E-Quelle	48
Abb. 5.10: GC/MS Totalionenchromatogramm (Ausschnitt) einer Wachsester-Fraktion mit Ionenchromatogramm (m/z 149) und Struktur des Schlüsselfragmentes der Phthalate	49

	Seite
Abb. 6.1: Dünnschichtchromatogramm von Lipidfraktionen aus Kulturen von <i>A. jadenisis</i> T9, Isolat S7 und Isolat Q4 gewachsen in Fermentermedium mit Rapsöl (1% m/v), entnommen zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten	53
Abb. 6.2: Einordnung von 42 Isolaten hinsichtlich ihrer Wachsester-Produktion in Prozent	55
Abb. 6.3: Gaschromatogramme der Esterfraktionen aus einem abiotischem Ansatz von Fermentermedium (FM) mit Rapsöl (1% m/v), entnommen nach 2, 4 und 7 d Kultivierung	56
Abb. 6.4: Dünnschichtchromatogramm des organischen Extraktes aus Fermentermedium (FM) mit jeweils (1% m/v) verschiedener Chargen Rapsöl (RP)	57
Abb. 6.5: Gaschromatogramme der Wachsester-Fractionen aus drei unabhängigen Kulturen von <i>A. jadenisis</i> T9 auf Fermentermedium mit Rapsöl (1% m/v), entnommen nach 4 d Kultivierung	59
Abb. 6.6: TEM-Aufnahmen von Zellen der Isolate S7 und S1 angelagert an Öltröpfen	61
Abb. 6.7: TEM-Aufnahme einer Kultur von <i>A. jadenisis</i> T9 in Fermentermedium (FM) mit Rapsöl (1% m/v) nach 4 d Kulturzeit	62
Abb. 6.8: TEM-Aufnahme der Zellen von <i>A. jadenisis</i> T9 gewachsen auf Rapsöl (1% m/v) mit Zelleinschlüssen unterschiedlicher Elektronendichte	63
Abb. 6.9: Vergleich der bei den Probanden nachgewiesenen Wachsester (WE); Angaben in Prozent der insgesamt nachgewiesenen WE-Mengen	70
Abb. 6.10: Gaschromatogramme der Wachsester-Fractionen des Sebums einer 60 Jahre alten Probandin und von Bienenwachs [100 µg absolut]	74
Abb. 6.11: Gaschromatogramme der Wachsester-Fractionen des Sebums einer 60 Jahre alten Probandin und der Wachsester-Fraktion einer Kultur von <i>A. jadenisis</i> T9 in Fermentermedium mit Rapsöl (1% m/v), entnommen nach 4 d Kultivierung	75
Abb. 6.12: Schematische Darstellung zur Verdeutlichung des Wachstums von <i>A. jadenisis</i> T9 und der produzierten Wachsester-Mengen auf <i>n</i> -Fettsäuren mit unterschiedlichen Kettenlängen als Substrat	79
Abb. 6.13: Schematische Darstellung zur Verdeutlichung des Wachstums von <i>A. jadenisis</i> T9 und der produzierten Wachsester-Mengen auf Triacylglyceriden und Rapsöl (RP) mit unterschiedlichen Kettenlängen als Substrat	81
Abb. 6.14: Schematische Darstellung zur Verdeutlichung des Wachstums und der von <i>A. jadenisis</i> T9 produzierten Wachsester-Mengen auf <i>n</i> -Alkoholen mit unterschiedlichen Kettenlängen als Substrat	88
Abb. 6.15: Schematische Darstellung von angenommenen Wachsester-Synthesewegen in der Bakterienzelle, die anhand der vorliegenden Ergebnisse postuliert werden können	91
Abb. 6.16: Schematische Darstellung zur Verdeutlichung des Wachstums und der von <i>A. jadenisis</i> T9 produzierten Wachsester-Mengen beim Einsatz eines <i>n</i> -Alkans/Alkens als Substrat	95
Abb. 6.17: Schematische Darstellung zur Verdeutlichung des Wachstums und den von <i>A. jadenisis</i> T9 produzierten Wachsester-Mengen auf <i>n</i> -Alkoholen im Gemisch mit Rapsöl (RP)	101

	Seite
Abb. 6.18: Schematische Darstellung zur Verdeutlichung des Wachstums und der von <i>A. jadensis</i> T9 produzierten Wachsester-Mengen auf Gemischen von Einzelsubstraten, die als Gemeinsamkeit Kettenlängen mit 16 C-Atomen aufweisen	105
Abb. 6.19: Vergleich der von <i>A. jadensis</i> T9 produzierten Konzentrationen an Hauptwachsestern (C ₃₂) auf Einzelsubstraten (je 1% m/v) und Zweikomponentengemischen (1% m/v gesamt) mit Kettenlängen von 16 C-Atomen	106
Abb. 6.20: Schematische Darstellung zur Übersicht aller eingesetzten Einzelsubstrate und Substratgemische, die von <i>A. jadensis</i> T9 für die Produktion von Wachsestern genutzt werden	109
Abb. 9.1: Massenspektren der von <i>A. jadensis</i> T9 produzierten gesättigten reinen Wachsester	135
Abb. 9.2: Massenspektren der von <i>A. jadensis</i> T9 produzierten einfach ungesättigten reinen Wachsester	139

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 3.1: Chemikalien und Substanzen	13
Tab. 3.2: Eingesetzte Standards und Wachsester-Vorläufer	15
Tab. 3.3: Oligonukleotide für die PCR	16
Tab. 3.4: Einordnung der gescreenten Isolate nach Bruns & Berthe-Corti (unveröffentlicht)	23
Tab. 3.5: Computersoftware, Internetanwendungen und Datenbanken	24
Tab. 4.1: Übersicht der durchgeführten Ansätze, geordnet nach Versuchszielen	27
Tab. 4.2: Zusammensetzung der PCR-Ansätze	28
Tab. 4.3: Struktur des PCR-Programmes zur Amplifizierung der 16S rDNA	29
Tab. 4.4: TEM-Präparationsschritte	30
Tab. 4.5: Getestete Laufmittelkonzentrationen (DC)	33
Tab. 4.6: Bedingungen der GC/FID-Analyse	34
Tab. 4.7: Bedingungen der GC/MS-Analyse	36
Tab. 5.1: Mögliche Fragmentierungswege mit charakteristischen Fragmenten für die Fragmentierung gesättigter Wachsester	42
Tab. 5.2: Mögliche Fragmentierungswege mit charakteristischen Fragmenten für die Fragmentierung einfach ungesättigter Wachsester	46
Tab. 6.1: Fettsäurezusammensetzungen der untersuchten Pflanzenöle Rapsöl (RP), Maiskeimöl (MK), Olivenöl (OL), Sonnenblumenöl (SB) und Distelöl (DS)	51
Tab. 6.2: Wachsester-Produktion ausgewählter Isolate bei 30°C und 100 rpm in Fermentermedium mit den Einzelölen Rapsöl (RP), Maiskeimöl (MK), Olivenöl (OL), Sonnenblumenöl (SB) oder Distelöl (DS, je 1% m/v) als C- und E-Quelle über 7 d kultiviert	52
Tab. 6.3: Wachsester-Produktion von <i>A. jadenensis</i> T9 in einer Kultur mit Rapsöl (1% m/v) als C- und E-Quelle, mit Angaben zu produzierten Wachsestern	60
Tab. 6.4: Untersuchte Probanden mit Angaben einiger, im Hinblick auf die Sebum-Zusammensetzung wichtiger Eigenschaften wie Alter, Geschlecht und Dusch- bzw. Essgewohnheiten	68
Tab. 6.5: Anteil gesättigter und ungesättigter Wachsester (WE; in Prozent der insgesamt nachgewiesenen WE-Menge) im kürzerkettigen (C ₃₀ -C ₃₄) und längerkettigen Bereich (C ₃₅ -C ₄₀), zweier unterschiedlicher Probenahmen	69
Tab. 6.6: In der GC/MS Analyse erfasste Molekülonen (M ⁺) und nachgewiesene Fettsäure- und Alkoholanteile der bei einer Probandin (60 Jahre, 2. Messreihe) nachgewiesenen Wachsester	72
Tab. 6.7: Wachstum und Wachsester-Produktion von <i>A. jadenensis</i> T9 in Kulturen mit <i>n</i> -Fettsäuren als C- und E-Quelle (je 1% m/v), mit Angaben zu produzierten Wachsestern	77

	Seite
Tab. 6.8: Wachstum und Wachsester-Produktion von <i>A. jadenis</i> T9 in Kulturen mit Triacylglyceriden und Rapsöl als C- und E-Quelle (je 1% m/v), mit Angaben zu produzierten Wachsestern	83
Tab. 6.9: Wachstum und Wachsester-Produktion von <i>A. jadenis</i> T9 in Kulturen mit <i>n</i> -Alkoholen als C- und E-Quelle (je 1% m/v), mit Angaben zu produzierten Wachsestern	86
Tab. 6.10: Wachstum und Wachsester-Produktion von <i>A. jadenis</i> T9 in Kulturen mit <i>n</i> -Alkanen/Alkenen als C- und E-Quelle (je 1% m/v) mit Angaben zu produzierten Wachsestern	93
Tab. 6.11: Wachstum und Wachsester-Produktion von <i>A. jadenis</i> T9 in Kulturen mit Zweikomponentengemischen aus <i>n</i> -Alkohol + Rapsöl als C- und E-Quelle (je 1% m/v gesamt) mit Angaben zu produzierten Wachsestern	98
Tab. 6.12: Wachstum und Wachsester-Produktion von <i>A. jadenis</i> T9 in Kulturen mit definierten Zweikomponentengemischen mit 16er Kettenlänge oder Rapsöl (RP) als C- und E-Quelle (je 1% m/v gesamt) mit Angaben zu produzierten Wachsestern	103
Tab. 6.13: Vergleich der prozentualen Anteile der von <i>A. jadenis</i> T9 auf bestimmten Einzelsubstraten und deren Gemischen gesamt produzierten Wachsester, sowie der Fettsäure- bzw. Alkoholanteile dieser Wachsester	113
Tab. 9.1: Tabellarische Aufstellung aller anhand der Gaschromatographie nachgewiesenen linearen gesättigten Wachsester, die von <i>A. jadenis</i> T9 produziert wurden mit ihren per GC/MS nachgewiesenen Zusammensetzungen	132
Tab. 9.2: Tabellarische Aufstellung aller anhand der Gaschromatographie nachgewiesenen linearen einfach ungesättigten Wachsester, die von <i>A. jadenis</i> T9 produziert wurden mit ihren per GC/MS nachgewiesenen Zusammensetzungen	133
Tab. 9.3: Tabellarische Aufstellung aller anhand der Gaschromatographie nachgewiesenen linearen zweifach ungesättigten Wachsester, die von <i>A. jadenis</i> T9 produziert wurden mit ihren per GC/MS nachgewiesenen Zusammensetzungen	133
Tab. 9.4: Tabellarische Aufstellung aller Wachsester, die anhand der Gaschromatographie aus dem menschlichen Sebum nachgewiesen wurden	134

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Definitionsgemäß sind Wachsester (WE) Monoester langkettiger Fettsäuren und langkettiger Alkohole. Wachsester sind in der Natur weit verbreitet. Natürlich vorkommende Wachsester übernehmen verschiedene Funktionen in der Natur. Solche mit fester Konsistenz, die eine hohe Beständigkeit aufweisen, bieten als Bestandteile der pflanzen- und insekteneigenen Cuticulen Schutz vor Wasserverlust durch Verdunstung. Wachsester mit flüssiger Konsistenz, die einen niedrigeren Schmelzpunkt und eine geringere Dichte aufweisen, regulieren z. B. den Auftrieb von Fischen. Bei Fischen sind solche Wachsester in deren Schwimmblasen und anderen Geweben zu finden (Patel *et al.*, 2001). Weitere Wachsester findet man in Kopfhöhlen von Pottwalen (Walrat), in den Gerüstsubstanzen von Insekten (Bienenwachs) oder marinen Bakterien. In tierischen Ausscheidungsprodukten wie Wollfett (Lanolin) und menschlichem Sebum (Hautfett) erfüllen Wachsester Schutzfunktionen für die Haut. Wachsester spielen deshalb eine zunehmend wichtige Rolle für die Verwendung in medizinischen und kosmetischen Hautpflegeprodukten. Die Schutzfunktionen gewinnen immer mehr an Bedeutung, da der Mensch (insbesondere die menschliche Haut) durch steigende Umweltbelastungen wie z. B. intensive UV-Strahlung größeren Risiken ausgesetzt ist.

Neben Schutz- und Regulationsfunktionen erfüllen Wachsester in eukaryotischen wie in prokaryotischen Mikroorganismen eine wichtige Aufgabe als Speicherstoffe (Patel *et al.*, 2001). Polymere Lipide, die als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen, sind als Speicherstoffe in Prokaryoten schon länger bekannt. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Polyhydroxyalkanoate (PHA; Alvarez *et al.*, 1997) und Triacylglyceride (TAG; Athenstaedt & Daum, 2006).

Die Beschaffenheit der von Bakterien gebildeten Lipideinschlüsse ist abhängig von den gegebenen Wachstumsbedingungen (z. B. Stickstoff- oder Phosphatlimitierung) und vom Substratangebot (Ishige *et al.*, 2003). In der letzten Zeit werden immer mehr Beispiele für WE speichernde Bakterien beschrieben (Stöveken & Steinbüchel, 2008).

Die WE-Produktion ist unter den Bakterien weit verbreitet. Von der Klasse der *Actinobacteria* ist die WE-Produktion bei Stämmen der Gattungen *Micrococcus* (Gram-positiv; Fixter *et al.*, 1986), *Mycobacterium* und *Rhodococcus* (Gram-positiv; Holtzapfle & Schmidt-Dannert, 2007) bekannt. In der Klasse der γ -*Proteobacteria* sind WE bei Stämmen der Gattungen *Acinetobacter* und *Moraxella* (Gram-negativ; Stöveken *et al.*, 2005), *Marinobacter* (Gram negativ; Holtzapfle & Schmidt-Dannert, 2007) sowie *Thalassolituus* und *Alcanivorax* (Gram-negativ; Bredemeier *et al.*, 2003b; Stöveken & Steinbüchel, 2008) bekannt.

Für Gram-negative Bakterien ist beschrieben, dass sie hauptsächlich Wachsester als Speicherlipide produzieren und akkumulieren (Alvarez, 2010). Der potentielle Einsatz bakteriell produzierter Wachsester in verschiedensten Produkten wie Schmiermitteln, Farben, Plastik, Oberflächenversiegelungen oder Kosmetika wird bereits diskutiert (Alvarez, 2010).

1.2 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist, da sie sich mit der Produktion und Analyse von bakteriellen Wachsestern beschäftigt, sowohl in den Bereich der Mikrobiologie als auch den Bereich der Naturstoffchemie einzuordnen. Sie erfolgte in Verbindung mit einem von der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF) geförderten Forschungsprojekt, das die Anreicherung von Pflanzenöl mit bakteriell produzierten Wachsestern für den eventuellen Einsatz in Hautpflegeprodukten vorsieht. Ziel der vorliegenden Arbeit war, zunächst einen geeigneten Produktionsstamm aus einer Sammlung von Kohlenwasserstoff-abbauenden marinen Bakterien zu finden. Der Produktionsstamm sollte im Vergleich zu anderen marinen Isolaten unter den gewählten Kulturbedingungen mit Pflanzenöl als Kohlenstoff- und Energie-Quelle (C- und E-Quelle) Wachsestermengen von mindestens 1 $\mu\text{g}/10$ ml Kultur (methodisch bedingte Nachweisgrenze) produzieren und akkumulieren. Anhand der Verwendung dieses Produktionsstammes sollte der Einfluss von *n*-Fettsäuren, *n*-Alkoholen, *n*-Alkanen/Alkenen und Triacylglyceriden als mögliche Wachsester-Vorläufer auf die bakterielle Wachsester-Produktion und die Wachsesterzusammensetzung untersucht werden.

Letzteres stellt den wesentlichen Teil dieser Arbeit dar, da über das Substratangebot das Schneiden von bakteriell produzierten Wachsestern mit gezielter Kettenlänge und Zusammensetzung angestrebt wurde.

Im Rahmen des o. g. AiF-Projektes ist eine Anreicherung von Pflanzenöl mit diesen Wachsestern geplant, um das angereicherte Öl eventuell in Hautpflegemitteln einzusetzen. Ziel ist es, Wachsester zu schneiden, deren Kettenlängen denen des menschlichen Sebums ähneln. Hierzu sollen die Wachsester-Vorläufer zum einen als jeweiliges Einzelsubstrat und zum anderen als Komponentengemische dieser Einzelsubstrate angeboten werden. Das hierdurch entstehende Produktspektrum verschiedener Wachsester soll in Abhängigkeit von den eingesetzten Wachsester-Vorläufern sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht werden.

Die Zusammenhänge der in dieser Arbeit ineinander übergreifenden Schwerpunkte sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

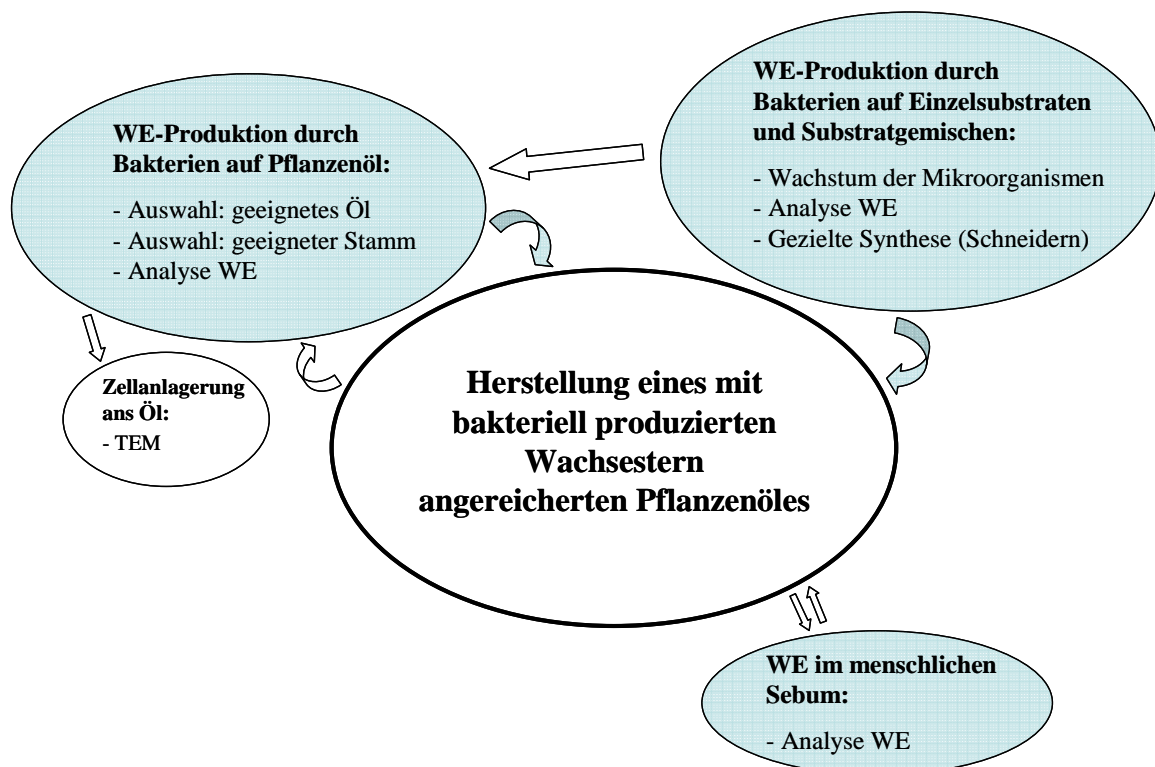


Abb.1.1:

Darstellung der Zusammenhänge der für die vorliegende Arbeit wichtigen Teilbereiche; das mit dieser Arbeit in Verbindung stehende Projektziel ist in der Mitte dargestellt in Verbindung mit den dafür untersuchten Schwerpunkten dieser Arbeit (blau) sowie weiteren Analysen

2 Stand des Wissens

2.1 Wachsester (Eigenschaften)

Wachsester sind Kondensationsprodukte von langkettigen Alkoholen mit langkettigen Fettsäuren. Immer mehr Bakterien werden beschrieben, die in der Lage sind, Wachsester zu produzieren (Bryn & Jantzen, 1977; Kaneshiro *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 2002). Wachsester erfüllen unterschiedliche Funktionen, für die die Schmelztemperaturen der verschiedenen Wachsester eine wichtige Rolle spielen. Die Schmelztemperaturen (T_m) von Wachsestern mit unterschiedlichen Kohlenstoffkettenlängen variieren deutlich (Patel *et al.*, 2001). Je länger die Kohlenstoffkette des Wachsesters, desto höher liegt sein Schmelzpunkt, wobei pro Kohlenstoffatom die Schmelztemperatur um 1-2°C steigt. Wachsester, deren Fettsäurekomponente und Alkoholkomponente unterschiedliche Kohlenstoffkettenlängen besitzen, haben einen um 1-5°C niedrigeren Schmelzpunkt als Wachsester mit gleicher Kettenlänge von Fettsäure und Alkohol. Eine Doppelbindung (d. h. eine einfache Unsatigung des Wachsesters) führt wiederum zur Abnahme des Schmelzpunktes. Dieser Effekt tritt stärker hervor, wenn sich die Doppelbindung in der Alkoholkomponente befindet (Patel *et al.*, 2001).

Die Schmelzpunkte der Wachsester sind von biologischer Bedeutung, da viele Funktionen der Wachsester temperaturabhängig sind. In pflanzen- und insekteneigenen Cuticulen bieten Wachsester Schutz vor Verdunstung. Die Schmelztemperaturen dieser Wachsester sollten deshalb so wärmebeständig sein, dass ihre Schutzfunktion auch bei höheren Außentemperaturen bestehen bleibt. Auf der menschlichen Haut übernehmen Wachsester mit Schmelztemperaturen im Bereich der Temperatur des menschlichen Körpers ebenfalls eine Schutzfunktion. Wachsester, die den Auftrieb von Fischen oder Bakterien im Meer regulieren, sollten Schmelzpunkte in unterschiedlichen Temperaturbereichen aufweisen, da die Temperaturen im Meer starken Schwankungen unterliegen wie z. B. durch die Sonneneinstrahlung, Gezeiten, Jahreszeiten oder Strömungen (Bauermeister & Sargent, 1979). Bei Wachsestern des Bakteriums *Micrococcus cryophilus* (jetzt *Psychrobacter urativorans*, Bowman *et al.*, 1996) wird z. B. bei einer Temperaturabnahme der Umgebung eine Abnahme der durchschnittlichen Kettenlänge sowie eine gleichzeitige Zunahme der einfach und zweifach ungesättigten WE beschrieben, was in Zusammenhang mit der Regulation der Membran-Fluidität stehen könnte (Russell & Volkman, 1980).

Prokaryoten, die Wachsester als Speicherstoff intrazellulär akkumulieren, lagern diese in Lipideinschlüssen innerhalb der Zelle ein. Die Akkumulation von Wachsestern wird u. a. bei den Gattungen *Micrococcus* (Fixter *et al.*, 1986), *Acinetobacter* (Stöveken *et al.*, 2005) und *Fundibacter* (Bredemeier *et al.*, 2003b; reklassifiziert als *Alcanivorax*, Fernández-Martínez *et al.*, 2003) beschrieben. Unter dem Elektronenmikroskop erscheinen Wachsestereinschlüsse in Abhängigkeit vom jeweiligen Bakterienstamm sowie vom verwendeten Substrat kugelig, rechteckig oder scheibenförmig (Wältermann & Steinbüchel, 2005).

Acinetobacter calcoaceticus ADP1 (jetzt *Acinetobacter* sp. ADP 1, Uthoff *et al.*, 2005) und *Acinetobacter calcoaceticus* HO1-N (jetzt *Acinetobacter baumannii* HO1-N, Bouvet & Grimont, 1986) produzieren mit Kohlenhydraten bzw. *n*-Hexadecan als Substrat kugelige Wachsestereinschlüsse, die umgeben sind von Phospholipiden (Wältermann *et al.*, 2005b; Wältermann & Steinbüchel, 2005). Wächst *Acinetobacter calcoaceticus* HO1-N dagegen auf *n*-Hexadecanol, produziert er rechteckige Wachsestereinschlüsse mit doppelschichtiger Oberflächenstruktur (Singer *et al.*, 1985; Ishige *et al.*, 2002). Auf *n*-Hexadecan gewachsene Zellen von *Acinetobacter* sp. M1 bilden scheibenförmige Wachsestereinschlüsse ohne Membranstruktur. Die Entstehung dieser scheibenförmigen Einschlüsse ist aufeinander folgend, was bedeutet, dass die Vollendung einer Scheibe in der Bildung der nächsten Scheibe resultiert (Ishige *et al.*, 2002). Ein möglicher Weg für die bakterielle Wachsester-Synthese ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

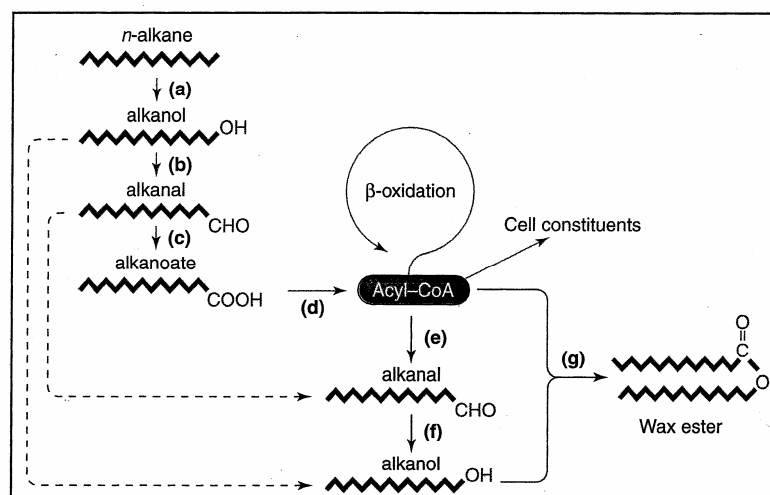


Abb. 1.2:

Anabolismus von Wachsestern; (a) Alkanmonooxygenase, (b) Alkoholdehydrogenase, (c) Aldehyddehydrogenase, (d) Acyl-CoA-Synthetase, (e) Acyl-CoA-Reduktase, (f) Aldehydreduktase, (g) Acyl-CoA:Alkohol-Transferase; Quelle: (Ishige *et al.*, 2003)

Die in Abbildung 1.2 beschriebene WE-Synthese aus *n*-Alkanen umfasst mehrere Reaktionsschritte. Der letzte Schritt bei der Wachsester-Synthese wird durch eine Acyl-CoA:Alkohol-Transferase, die in *Acinetobacter* sp. als bifunktionelle Wachsester Synthase/Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase (WS/DGAT) charakterisiert wurde, synthetisiert (Ishige *et al.*, 2003). Für die Bildung von Wachsestereinschlüssen dockt die WS/DGAT an die Cytoplasmamembran an und katalysiert u. a. die Bildung der Wachsester, wodurch kleine Lipidtröpfchen entstehen (Wältermann *et al.*, 2005b). Viele dieser kleinen Tröpfchen bilden eine ölige Schicht an der Membran und häufen sich zu membrangebundenen Lipid-Vorkörpern (Prebodies) an. Die Autoren beschreiben, dass diese Prebodies eine bestimmte Größe erreichen, sich von der Membran lösen, ins Cytoplasma freigegeben werden und dazu führen, dass Wachsestereinschlüsse entstehen.

In *Acinetobacter* sp. ADP1 liegt die WS/DGAT assoziiert mit den Lipideinschlüssen bzw. der Membran vor (Wältermann & Steinbüchel, 2005). Die WS/DGAT ist ein unspezifisches Enzym, das eine weite Bandbreite gesättigter und ungesättigter Acyl-CoA's und Fettalkohole mit variierenden Kettenlängen (C₁₂-C₂₀) als Substrat akzeptiert (Uthoff *et al.*, 2005). Die höchste Aktivität der WS/DGAT liegt bei Alkoholen mit Kettenlängen zwischen C₁₄-C₁₈ vor (Stöveken *et al.*, 2005).

Acinetobacter sp. HO1-N produziert auf *n*-Alkanen sowohl gesättigte als auch ein- und zweifach ungesättigte Wachsester (DeWitt *et al.*, 1982). Die WE-Produktion durch marine Bakterien unterschiedlicher Gattungen (*Acinetobacter*, *Marinobacter* und *Pseudomonas*) auf Phytol oder Squalen als Substrat wird von Rontani *et al.* (1999, 2003) beschrieben. Holtzapfle & Schmidt-Dannert (2007) beschreiben bei dem Bakterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* die Bildung von Isoprenoid-Wachsestern auf dem Substrat Phytol. Für die Synthese der Isoprenoid-Wachsester sind von den Autoren eine Isoprenoid-spezifische Acyl-CoA-Synthetase und zwei Isoprenoid-Wachsester-Synthasen nachgewiesen, die Ähnlichkeiten zur WS/DGAT aufweisen.

In Abhängigkeit vom Acyl-CoA katalysiert die WS/DGAT die Acylierung von Diacylglyceriden zu Triacylglyceriden und Fettalkoholen zu Wachsestern, wobei Kalscheuer *et al.* (2007) die Existenz eines zusätzlichen WS/DGAT-unabhängigen TAG-Syntheseweges beschreiben.

Neben ihrer Funktion als Speicherstoffe werden für Wachsester auch andere Funktionen angenommen wie die Sicherung einer Wassergrundversorgung in Bakterien, da die Oxidation von Kohlenwasserstoffketten u. a. Wasser freisetzt (Wältermann & Steinbüchel, 2005), und die Lagerung von überschüssigen Fettsäuren in der Zelle, die in freier Form potentiell Membran-schädigend wirken (Wältermann *et al.*, 2007).

Acinetobacter sp. und *Alcanivorax jadensis* (von Bruns & Berthe-Corti 1999 beschrieben als *Fundibacter jadensis*) produzieren neben den Wachsestereinschlüssen in der Zelle extrazelluläre Wachsester. Die Funktion dieser WE ist allerdings noch unbekannt (Bredemeier *et al.*, 2003b).

2.2 *Alcanivorax jadensis* T9

Die Gattung *Alcanivorax* gehört zu den marinen γ -*Proteobakterien*, die bevorzugt lineare und verzweigte Alkane mit Kettenlängen von 9-32 Kohlenstoffatomen als Substrat nutzen (Capello & Yakimov, 2010). In nicht belasteten Gewässern treten diese Bakterien in geringer Anzahl auf, während sie in Kohlenwasserstoff-belasteten bzw. nährstoffreichen Gewässern stark vertreten sind und hier 80-90% der Mineralöl-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaft ausmachen können (Schneiker *et al.*, 2006). Verschiedene Arten der Gattung *Alcanivorax*, wie z. B. *Alcanivorax borkumensis* oder *Alcanivorax jadensis*, gehören zu den obligat Kohlenwasserstoff-abbauenden Bakterien (Yakimov *et al.*, 2007). Sie spielen eine große Rolle bei der natürlichen Reinigung von Öl-verschmutzten marinen Systemen.

Alcanivorax jadensis T9 wurde aus Sediment der deutschen Nordseeküste isoliert. Es ist ein nicht bewegliches Gram-negatives und stäbchenförmiges γ -*Proteobakterium*, das sensitiv gegenüber Chloramphenicol, Gentamycin und Tobramycin ist (Bruns & Berthe-Corti, 1999). Die Autoren beschreiben *Alcanivorax jadensis* T9 als schwach halophiles Bakterium mit optimalen Wachstumsbedingungen bei 30°C und einem pH-Wert von 7,0. Der Stamm ist fakultativ anaerob und wächst in Abwesenheit von Sauerstoff, benötigt dafür aber Nitrat als Elektronenakzeptor. Sein begrenztes Substratspektrum umfasst neben Acetat und Pyruvat Kohlenwasserstoffe wie Tetradecan und Hexadecan. Der Stamm ist in der Lage, auf Pflanzenölen wie z. B. Olivenöl zu wachsen und Wachsester zu produzieren (Bredemeier *et al.*, 2003a).

2.3 Wachsester (Schneidern)

Es ist bekannt, dass Polyhydroxyalkanoate (PHA) von Bakterien als Speicherstoffe produziert werden. Steinbüchel & Valentin (1995) beschreiben, dass in Bakterien eine große Vielfalt von Hydroxyalkanoaten in Abhängigkeit von Precursor-Substraten entstehen, die als Bestandteile von biosynthetischen Polyhydroxyalkanoaten fungieren.

Das bakterielle Schneidern von neuen industriell nutzbaren PHA scheint von der Verfügbarkeit und den Kosten der Chemikalien abhängig zu sein, die sich als Precursor-Substrate eignen könnten. Die Substratspezifität der PHA-Synthase, die die Produktion dieser Speicherstoffe katalysiert, ist sehr gering und somit kein limitierender Faktor. Die Strukturen der Precursor-Substrate sollten allerdings den Monomeren der angestrebten PHA ähneln (Steinbüchel & Valentin, 1995).

Beim Schneidern von Wachsestern werden durch den gezielten Einsatz von unterschiedlichen Precursor-Substraten definierte Wachsester bakteriell produziert. Neben der bakteriellen Produktion von PHA bietet das Schneidern von Wachsestern und deren Akkumulation neue Möglichkeiten für die industrielle Nutzung von Wachsestern. Bis heute werden Wachsester für die Verwendung als Weichmacher, Nahrungszusätze oder Kosmetikzusätze chemisch bzw. mit Hilfe von Lipasen produziert (Stöveken & Steinbüchel, 2008). Die Herstellung durch den Einsatz von Lipasen benötigt zusätzlich die chemische Produktion von Fettalkoholen als Substrat. Als Alternative dazu ermöglicht der Einsatz der WS/DGAT vielleicht die Wachsester-Synthese aus günstigen erneuerbaren Ressourcen. Neben der Bildung von Wachs-Monoestern katalysiert die WS/DGAT auch die Bildung von Wachs-Diestern und acyliert zusätzlich zu den linearen Alkoholsubstraten auch cyclische, aliphatische oder sogar aromatische Alkohole (Stöveken & Steinbüchel, 2008). Diese geringe Substratspezifität, die auch bei der PHA-Synthase vorhanden ist, lässt den Schluss zu, dass es möglich ist, nicht nur verschiedene PHA, sondern auch eine Vielzahl von unterschiedlichen Wachsestern über die Substratzugabe gezielt bakteriell zu schneiden. Kalscheuer *et al.* (2006) beschreiben den möglichen Einsatz der WS/DGAT bei der Herstellung eines Kraftstoffes („Microdiesel“). Die bakterielle Produktion soll hierbei allerdings über einen rekombinanten *Escherichia coli* Stamm erfolgen und nicht über einen genetisch unveränderten Bakterienstamm.

2.4 Pflanzenöle

Pflanzliche Öle und Fette sowie Rohstoffe für deren Gewinnung werden überwiegend importiert. Rizinusöl z. B. stammt aus Osteuropa, Brasilien und Indien. Rohstoffe in Form von Ölfrüchten (Leinsaat, Sojabohnen) werden aus den USA, China, Brasilien und Argentinien eingeführt (Baumann *et al.*, 1988). Pflanzenöle werden in verschiedenen Bereichen als Rohmaterialien eingesetzt. Sie dienen der Herstellung von Produkten wie z. B. Kosmetika, Pharmazeutika, Schmierstoffen, Tinte und Biodiesel.

Im Gegensatz zu fossilen Ölen sind sie regenerativ und haben den ökologischen Vorteil, CO₂-neutral zu sein (Spitzer, 1999). Hauptbestandteile der Pflanzenöle sind Fettsäuren, die als Bestandteile von Triacylglyceriden vorliegen. Andere Inhaltsstoffe wie Glycerin, Vitamine, Sterolester oder Wasser machen weniger als 10% des Öles aus. Die Verteilung von Fettsäuren mit unterschiedlichem Sättigungsgrad in verschiedenen Pflanzenölen ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

Qualität und Stabilität von Pflanzenölen werden durch die Nebenbestandteile des Öles beeinflusst (Martini & Añón, 2005). Enthaltene Vitamin E dient als Antioxidans und schützt die Öle vor der Oxidation durch Sauerstoff.

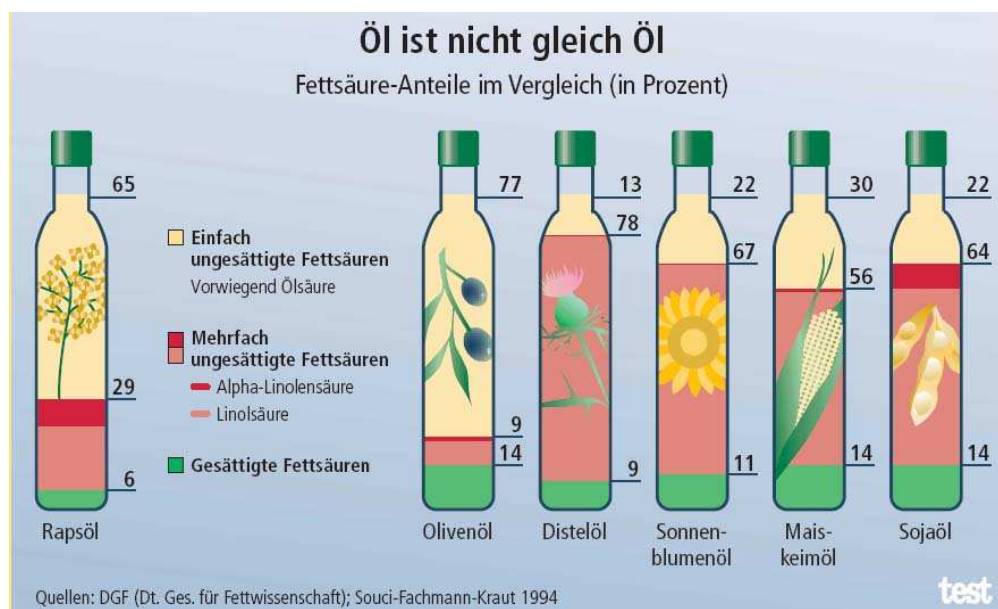


Abb. 1.3:

Vergleich der Fettsäure-Anteile verschiedener Pflanzenöle (in Prozent) mit der Unterteilung in gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren; Quelle: www.test.de; (Stiftung Warentest, 2010)

Freie Fettsäuren und Wachsester z. B. senken die Qualität von Pflanzenölen als Lebensmittel. Die Qualität eines Speiseöles verringert sich hierbei mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge der Wachsester. Sie verursachen bei niedrigeren Temperaturen eine Trübung des Öles, da sie einen höheren Schmelzpunkt besitzen und ausfallen. Dem wird entgegengewirkt über den Prozess der Winterisierung, bei dem die Wachsester entfernt werden (Martini & Añón, 2005).

Baumann *et al.* (1988) beschreiben, dass Rapsöl sich im Gegensatz zu anderen Pflanzenölen durch einen hohen Gehalt an Octadecensäure (Ölsäure), einen moderaten Gehalt an Octadecadiensäure (Linolsäure) und einen geringen Gehalt an gesättigten Fettsäuren auszeichnet (Abb. 1.3). Ursprüngliches Rapsöl bestand aus einem überwiegenden Anteil Erucasäure (C_{22:1}). Das natürliche Fettsäuremuster des Rapsöles wurde züchterisch so verändert, dass die Erucasäure weniger als 3% des Öles ausmacht und die Octadecensäure den Hauptbestandteil des Rapsöles darstellt. Die Verfügbarkeit zweier Arten von Raps (Sommer- und Winterraps) ermöglicht es, Raps in verschiedenen klimatischen Regionen der Welt als Ölpflanze anzubauen, was seine Verfügbarkeit deutlich erhöht (Biermann *et al.*, 2000).

2.5 Menschliches Sebum

Auch beim Menschen kommen Wachsester als Bestandteile des Haut-Talgs (lateinisch: Sebum) vor. Das Sebum wird in den Talgdrüsen produziert, die durch Hormone stimuliert werden (Wertz & Michniak, 2000). Das in den Talgdrüsen gebildete Sebum besteht hauptsächlich aus Wachsestern, Triacylglyceriden und Squalen, während Cholesterinester und Cholesterin kaum enthalten sind. Die Wachsester-Fraktion des Sebums enthält ca. 60% einfach ungesättigte und ca. 40% gesättigte Fettsäuren (C₁₂-C₁₈). Die Autoren beschreiben weiter, dass die Triacylglyceridfraktion dagegen 70% gesättigte und 30% einfach ungesättigte Fettsäuren enthält. Die einfach ungesättigten Fettsäuren der Triacylglyceridfraktion leiten sich durch Verlängerung bzw. Verkürzung der Kohlenstoffketten um C₂-Einheiten hauptsächlich von der Hexadecensäure (C_{16:1} Δ 6) ab. Die Hexadecensäure wird von Wille & Kydonieus (2003) als Fettsäure mit hoher antimikrobieller Wirkung beschrieben.

Von der Octadecensäure ($C_{18:1} \Delta 9$) leiten sich dagegen nur wenige der ungesättigten Fettsäuren der Triacylglyceridfraktion des Sebums ab. Einige der Triacylglyceride werden nach der Sekretion durch Lipasen gespalten, was erklärt, warum das Sebum auf der Hautoberfläche weniger Triacylglyceride und dafür mehr freie Fettsäuren aufweist als das noch in den Talgdrüsen befindliche Sebum (Wertz & Michniak, 2000).

Das Sebum übernimmt beim Menschen eine Schutzfunktion für die Haut. Diese Schutzfunktion gewinnt immer mehr an Bedeutung, da der Mensch und somit auch die menschliche Haut aufgrund steigender Umweltbelastungen (z. B. zunehmende UV-Strahlung) immer höheren Risiken ausgesetzt ist. Hohe UV-Strahlungen, denen der Mensch täglich ausgesetzt ist, wirken sich insbesondere auf die menschliche Haut aus.

Das Sonnenlicht besteht aus Strahlung verschiedener Wellenlängen. Schädigend ist die längerwellige UV-A Strahlung, die zu vermehrter Faltenbildung, frühzeitiger Hautalterung und DNA-Schäden führen kann sowie die kurzwelligere UV-B Strahlung, die Sonnenbrand und Hautkrebs hervorruft (Schauder, 2006). Der Einsatz von Hautpflege Mitteln wird also hinsichtlich der Unterstützung der Hautfunktion und der Regeneration der Haut immer wichtiger.

Die menschliche Haut ist mehrschichtig und setzt sich aus der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis) und der Unterhaut (Subcutis) zusammen. Für die Geschmeidigkeit der Epidermis ist das Sebum zuständig (Wertz & Michniak, 2000). Es bietet Schutz vor Hautrissen, Krankheitserregern und chemischen Umwelteinflüssen.

Auf dem Markt befindliche Hautpflege Mittel enthalten 20-70% mineralische oder pflanzliche bzw. tierische Öle und Wachse (abhängig davon, ob es sich um Creme oder Salbe handelt) sowie Fettsäureester und Fettalkohole. Problematisch sind hierbei sowohl die pflanzlichen Öle als auch die tierischen Produkte. Pflanzliche Öle weisen einen sehr geringen Wachsesteranteil auf (2.4), was dazu führt, dass sich ihre Eigenschaften von denen des Sebums deutlich unterscheiden. Tierische Produkte, wie z. B. das Bienenwachs, sind sehr fest in ihrer Konsistenz und müssen weicher gemacht werden. Lanolin als tierisches Produkt kann durch sein allergenes Potential (Erdmann & Merk, 2003) zu unerwünschten Hautreaktionen führen.

Erdöl-bürtige Substanzen wie z. B. Paraffin als Bestandteil von Hautcremes werden unterschiedlich eingestuft. Cremes mit einem Paraffinanteil von >10% begünstigen die Faltenbildung und Austrocknung der Haut. Paraffin kann außerdem natürliche Regulationsmechanismen behindern und sich in Leber, Nieren und Lymphknoten anreichern (www.oekotest.de). Mit bakteriellen Wachsesteren angereicherte Pflanzenöle wären im Vergleich dazu ein unschädlicher Ersatzstoff für die bisher im kosmetischen Bereich eingesetzten Substanzen. Die Wachsester sollten hierbei den Wachsesteren des menschlichen Sebums stark ähneln, damit sie eine gute Hautverträglichkeit aufweisen.

3 Material

3.1 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Substanzen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: Chemikalien und Substanzen; - = keine Angaben

Substanz	Reinheitsgrad	Lieferant
Agarose	NEEO Ultra-Qualität	Roth
<i>p</i> -Aminobenzoësäure	≥99%	Merck
Ammoniumchlorid	≥99,5%, p.a., ACS	Roth
Biotin	-	Biomol
Bleicitrat-Lösung	-	Laurylab
Borsäure	-	Janssen Chimica
Bovine Serum Albumine [20mg/ml]	-	Omnilab
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Analytical Reagent	Riedel-de-Haën
Casaminoacids (vitaminfrei)	-	Difco
Cyanocobalamin	96,0-100,5%	Merck
Dichlormethan	-	VWR
Didesoxynukleotide (dNTP's)	-	Fermentas
Eisenchlorid x 4 H ₂ O	-	Fluka
Enhancer-Lösung für PCR	-	Molzym GmbH
Epoxy Resin	-	Ted Pella Inc.
Essigsäure (Eisessig)	≥99,7%	Merck
Ethanol	Gradient Grade	Jürgens
Ethidiumbromid	1%	Roth
Ethylacetat	-	Bedarflager Universität Oldenburg
Ethylacetat	HPLC grade	Scharlau
Ethylendiamintetraessigsäure	≥99%, p.a., ACS	Roth
Tetranatriumsalz (EDTA)		
<i>n</i> -Hexan	-	Bedarflager Universität Oldenburg
Kaliumchlorid	≥99,5%	Merck
Kobaltchlorid x 6 H ₂ O	99%	Merck
Kupferchlorid x 2 H ₂ O	≥97%	Merck
Loading-Dye-Lösung	6-fach	Fermentas
Magnesiumchlorid	-	OMNI Life Science
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	≥99%, p.a., ACS	Roth
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	-	Riedel-de-Haën
Manganchlorid x 4 H ₂ O	≥99%	Merck

Substanz	Reinheitsgrad	Lieferant
Methanol	-	Bedarfslager Universität Oldenburg
Na-Acetat	≥99%, p.a., wasserfrei	Roth
Na-Chlorid	99,8% wasserfrei	Riedel-de-Haën
Na-Nitrat	-	J.T. Baker
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	≥99,5%	Merck
Na-Pyruvat	≥99%	Fluka
Na-Sulfat	≥99%, p.a.	Roth
Nickelchlorid x 6 H ₂ O	≥98%	Merck
Nikotinsäure	99,5%	Merck
Panthotensäure	≥98%	Aldrich
Petrolether	100/140	Bedarfslager Universität Oldenburg
Pyridoxamin	≥99%	Merck
Salzsäure	-	Riedel-de-Haën
Schwefelsäure	96-98% rein	Bedarfslager Universität Oldenburg
Thiamin	≥98%	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Base)	≥99,9%, p.a.	Roth
Uranyl-Acetat	-	Merck
Zinkchlorid	98%	Merck

Substanzen, die als Standards für die DC, GC und GC/MS eingesetzt wurden oder als Wachsester-Vorläufer dienen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt und wurden mit dem höchstmöglichen Reinheitsgrad verwendet.

Tab. 3.2: Eingesetzte Standards und Wachsester-Vorläufer; - = keine Angaben

Substanz	Reinheitsgrad	Lieferant
β -Carotin	Type I, synthetic, $\geq 93\%$ (UV), powder	Sigma-Aldrich
Cetylpalmitat	98%	Sigma-Aldrich
Cholesterin	$\geq 99\%$	Aldrich
Distelöl	-	Intern. Collection
<i>n</i> -Docosanol	98%	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Dodecanol	puriss., $\geq 98,5\%$ (GC)	Fluka
<i>n</i> -Dodecansäure	puriss. p.a., standard for GC $\geq 99,5\%$	EGA Chemie
<i>n</i> -Eicosanol	98%	Sigma-Aldrich
(Eusolex OS)	-	Merck
<i>n</i> -Heptadecansäure	puriss., $\geq 99\%$ (GC)	Fluka
<i>n</i> -Hexadecan	puriss. p.a., standard for GC $\geq 99,8\%$	Fluka
<i>n</i> -Hexadecanol	99%	Baker
<i>n</i> -Hexadecansäure	$\geq 97\%$	Merck
<i>n</i> -Hexadecen	puriss., $\geq 99\%$ (GC)	Fluka
<i>n</i> -Hexadecensäure	puriss. p.a., standard for GC $\geq 98,5\%$	Fluka
IR3535 [®] (Insect repellent 3535)	-	Merck
(N-Lauroylsarcosin)	purum p.a., $\geq 98\%$ (GC)	Fluka
Maiskeimöl	-	Mazola
Myristyl Dodekanoat	$\sim 99\%$	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Nonadecanol	purum, $\geq 97\%$ (GC)	Fluka
<i>n</i> -Nonadecansäure	puriss. p.a., standard for GC $\geq 99,5\%$	Fluka
<i>n</i> -Nonadecensäure	$\geq 99\%$, liquid	Sigma
<i>n</i> -Octacosan	purum, $\geq 98\%$ (GC)	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Octadecanol	$\geq 96\%$	Merck-Schuchardt
<i>n</i> -Octadecansäure	$\geq 97\%$	Merck-Schuchardt
<i>n</i> -Octadecensäure	puriss. p.a., standard for GC, natural, $\geq 99\%$ (GC)	Fluka
Olivenöl	-	Bertolli
(Paraffinöl)	puriss., meets analytical specification of Ph. Eur., BP, viscous liquid	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Pentadecansäure	puriss., $\geq 98,5\%$ (GC)	Fluka
Rapsöl	-	Rapso
Retinol	synthetic, $\geq 95\%$ (HPLC), crystalline	Sigma-Aldrich
(Silikonöl)	-	Sigma-Aldrich
Sonnenblumenöl	-	Butella

Substanz	Reinheitsgrad	Lieferant
Squalen	purum, $\geq 97\%$ (GC)	Fluka
Stearinsäuremethylester	$\geq 99\%$	Merck
<i>n</i> -Tetradecanol	$\geq 98\%$	Merck-Schuchardt
<i>n</i> -Tridecansäure	purum, $\geq 98\%$ (GC)	Fluka
Trilaurin	purum, $\geq 97\%$ (GC)	Sigma-Aldrich
Tripalmitat	technical, $\sim 95\%$ C ₁₆ basis (GC)	Fluka
<i>n</i> -Undecanol	puriss., $\geq 99,5\%$ (GC)	Fluka
<i>n</i> -Undecansäure	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich

3.2 Geräte

3.2.1 Kultivierung

Analysenwaage :	Sartorius	A 200 S
Zentrifugen :	Eppendorf	5417R
	Sigma	3-K1
Mikroskop :	Zeiss	Axiostar plus
Ultraschallbad :	Branson	5210

3.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Elektrophoresekammer :	Amersham	
Thermocycler :	Biometra	TGradient
UV-Transilluminator :	Biostep GmbH	

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für die PCR sind in Tabelle 3.3 angegeben und wurden von der Firma MWG bezogen.

Tab. 3.3: Oligonukleotide für die PCR

Name	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]	Target [rRNA]	rRNA- Position
1492r	TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T	47,9	16S	1492
27f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	44,6	16S	27

3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zentrifugen	:	Beckmann	(Rotor JA 2550)
		Eppendorf	5417R
		Hettich Universal 2S	(Schwenkbecher-Rotor)
befilmte Netzen	:	Plano	Pioloform-Film
			200 mesh, 3,05 mm
Transmissionselektronen-			
Mikroskop	:	Zeiss	EM 902A

3.2.4 Extraktion (organischer Extrakt)

Rotilabo-Faltenfilter	:	Roth	CA 18.1
pH-Indikatorstäbchen	:	Macherey-Nagel	pH-Fix 1,7-3,8
		Macherey-Nagel	pH-Fix 4,5-10,0
Rotations-Vakuum-Konzentrator	:	Christ	RVC 2-18

3.2.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

DC-Alufolien	:	Merck	Kieselgel 60 F ₂₅₄
Mikroliter-Spritze	:	Hamilton	701 N
Aufnahmeeinheit	:	DESAGA	Cab UVIS
DC-Kammer			

3.2.6 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)

Safe Lock Tubes	:	Eppendorf	2,0 ml
Gewindefläschchen	:	SCP GmbH	SB 200250
Ultraschallbad	:	Branson	5210
Zentrifuge	:	Eppendorf	5417 R

Bördelfläschchen	:	CS Chromatographie- service GmbH	R1
Bördel-Kappen	:	IVA Analystechnik	
Federn	:	CS Chromatographie- service GmbH	S20
Mikroeinsatz	:	CS Chromatographie- service GmbH	G30 Is/6
Microliter-Spritze	:	Hamilton	701 N
		Hamilton	750 RN
Gaschromatograph	:	Hewlett-Packard	6890
Massenspektrometer	:	Finnigan MAT	MAT 95Q

3.3 Lösungen und Medien

Glasgeräte wurden bei 180 °C über 4 h sterilisiert. Getrennt zu sterilisierende Komponenten wurden nach dem Abkühlen steril vereint.

3.3.1 Ammoniumchloridlösung

NH ₄ Cl	6,19 g	[1,16 M]
Aqua dest.	100,00 ml	

3.3.2 Natriumhydrogencarbonatlösung

NaHCO ₃	3,84 g	[0,34 M]
Aqua dest.	100,00 ml	

3.3.3 *di*-Natriumhydrogenphosphatlösung

Na ₂ HPO ₄	1,72 g	[0,12 M]
Aqua dest.	100,00 ml	

3.3.4 Natriumhydroxidlösung

NaOH	0,40 g	[0,1 M]
Aqua dest.	100,00 ml	

3.3.5 Natriumnitratlösung

NaNO ₃	18,22 g	[2,14 M]
Aqua dest.	100,00 ml	

Alle Lösungen wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3.3.6 Vitaminlösung nach Schlegel (1992), modifiziert

Biotin	0,50 mg	[2,05 µmol/l]
Nikotinsäure	5,00 mg	[40,61 µmol/l]
Thiamin	2,50 mg	[7,41 µmol/l]
4-Aminobezoësäure	2,50 mg	[36,46 µmol/l]
Pantothensäure	1,25 mg	[5,70 µmol/l]
Pyridoxamin	12,50 mg	[74,32 µmol/l]
Cyanocobalamin	5,00 mg	[15,00 µmol/l]
Aqua dest.	250,00 ml	

Die Substanzen wurden in den jeweils angegebenen Mengen Aqua dest. gelöst, sterilfiltriert und in Aliquoten von 20 ml bei -20 °C gelagert.

3.3.7 Spurenelementlösung nach DSMZ-Katalog (Medium Nr. 124), modifiziert

FeCl ₂	1,50 g	[7,54 µmol/l]
ZnCl ₂	68,00 mg	[0,50 µmol/l]
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100,00 mg	[0,51 µmol/l]
H ₃ BO ₃	62,00 mg	[1,00 µmol/l]
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	120,00 mg	[0,50 µmol/l]
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	17,00 mg	[99,71 µmol/l]
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24,00 mg	[0,10 µmol/l]
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	24,00 mg	[99,19 µmol/l]
Aqua dest.	1,00 l	

Die Substanzen wurden in den jeweils angegebenen Mengen Aqua dest. gelöst, autoklaviert und bei -20 °C gelagert.

3.3.8 Artifizielles Seewasser nach Levring (1946), 4-fach konzentriert

Lösung 1:

NaCl	94,40 g	[1,62 µmol/l]
KCl	2,56 g	[34,34 µmol/l]
MgCl ₂ x 2 H ₂ O	18,12 g	[89,13 µmol/l]
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	23,76 g	[96,41 µmol/l]
Aqua dest.	800,00 ml	

Die Festsubstanzen wurden in 800 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

Lösung 2:

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5,20 g	[46,76 µmol/l]
Aqua dest.	100,00 ml	

Das Calciumchlorid wurde in Aqua dest. gelöst, autoklaviert und nach dem Abkühlen zu den 800 ml Lösung 1 gegeben. Das Seewasser wurde mit sterilem Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

3.3.9 Seewasserbouillon X (SWB X)

Na-Pyruvat	1,00 g	[4,50 mmol/l]
Na-Acetat	4,16 g	[25,00 mmol/l]
Casaminoacids	1,00 g	[0,50 g/l]
Aqua dest.	779,00 ml	

Die Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden 190 ml 4-fach konzentriertes Seewasser nach Levring (3.3.8), 3 ml Vitaminlösung (3.3.6), 1 ml Spurenelementlösung (3.3.7), 8 ml Natriumnitratlösung (3.3.5), 8 ml *di*-Natriumhydrogenphosphatlösung (3.3.3), 3 ml Natriumhydroxidlösung (3.3.4) sowie 8 ml Ammoniumchloridlösung (3.3.1) steril zugefügt. Der pH-Wert wurde auf 7,2-7,4 eingestellt.

3.3.10 Fermentermedium (FM)

Aqua dest.	736,86 ml
4fach konzentriertes Seewasser (3.3.8)	250,45 ml
Vitamin-Lösung (3.3.6)	3,17 ml
Spurenelement- Lösung (3.3.7)	1,06 ml
NH ₄ Cl-Lösung (3.3.1)	2,75 ml
NaHCO ₃ -Lösung (3.3.2)	2,96 ml
Na ₂ HPO ₄ -Lösung (3.3.3)	2,75 ml

Die Lösungen wurden dem Aqua dest. nacheinander, unter Rühren steril zugegeben. Anschließend erfolgte eine pH-Wert-Einstellung mit NaHCO₃ auf pH 7,2-7,4. Wurde Öl als C-Quelle eingesetzt, wurde das benötigte Volumen vorher vom Volumen des Aqua dest. abgezogen.

3.3.11 Tris-Acetat (TAE)-Puffer 50-fach

Tris (Base)	242,2 g
EDTA	18,6 g

Die Lösung wird mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt. Der pH-Wert mit Eisessig auf 7,4 eingestellt.

3.4 Größenstandards für die Elektrophorese

Für die Bestimmung von Größe und Konzentration der DNA-Fragmente in Agarosegelen wurden folgende DNA-Größenstandards verwendet:

MassRuler™ DNA Ladder, Low Range, ready-to-use (Fermentas GmbH):

1031 bp/200 ng 20 µl⁻¹, 900 bp/180 ng 20 µl⁻¹, 800 bp/160 ng 20 µl⁻¹, 700 bp/140 ng 20 µl⁻¹, 600 bp/120 ng 20 µl⁻¹, 500 bp/200 ng 20 µl⁻¹, 400 bp/80 ng 20 µl⁻¹, 300 bp/60 ng 20 µl⁻¹, 200 bp/40 ng 20 µl⁻¹, 100 bp/20 ng 20 µl⁻¹, 80 bp/16 ng 20 µl⁻¹

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas GmbH):

10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3,5 kb, 3 kb, 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp

3.5 Bakterienstämme

Tab. 3.4: Einordnung der gescreenten Isolate nach Bruns & Berthe-Corti (unveröffentlicht)

Bezeichnung	Phylum
<i>Alcanivorax jadensis</i> T9 ^T (DSMZ Nr. 12178)	γ -Proteobacteria
<i>Alcanivorax borkumensis</i> (DSMZ Nr. 11573)	γ -Proteobacteria
Isolat A1/10	unbekannt
Isolat B9/10	Gram-positive mit hohem GC-Gehalt
Isolat G4	Gram-positive mit hohem GC-Gehalt
Isolat J1	γ -Proteobacteria
Isolat J3	γ -Proteobacteria
Isolat K12	Gram-positive
Isolat L11	Gram-positive mit hohem GC-Gehalt
Isolat Q4	γ -Proteobacteria
Isolat Q5	γ -Proteobacteria
Isolat Q8	γ -Proteobacteria
Isolat Q9	γ -Proteobacteria
Isolat Q10	γ -Proteobacteria
Isolat Q12	γ -Proteobacteria
Isolat Q13	γ -Proteobacteria
Isolat R3	γ -Proteobacteria
Isolat R4	γ -Proteobacteria
Isolat R7	α -Proteobacteria
Isolat S1	Gram-positive mit hohem GC-Gehalt
Isolat S2	γ -Proteobacteria
Isolat S3	γ -Proteobacteria
Isolat S7	γ -Proteobacteria
Isolat T1	γ -Proteobacteria
Isolat T2	γ -Proteobacteria
Isolat T3	γ -Proteobacteria
Isolat T4	γ -Proteobacteria
Isolat T5	γ -Proteobacteria
Isolat T6	γ -Proteobacteria
Isolat T7	γ -Proteobacteria
Isolat T8	γ -Proteobacteria
Isolat T10	γ -Proteobacteria
Isolat U2	unbekannt
Isolat U/N6	Gram-positive
Isolat W4	Gram-positive mit hohem GC-Gehalt
Isolat W7	Gram-positive mit hohem GC-Gehalt

Bezeichnung	Phylum
Isolat W9	Gram-positive mit hohem GC-Gehalt
Isolat W13	γ -Proteobacteria
Isolat W15	γ -Proteobacteria
Isolat W16	γ -Proteobacteria
Isolat W17	γ -Proteobacteria
Isolat W18	γ -Proteobacteria
Isolat W24	γ -Proteobacteria
Isolat W27	γ -Proteobacteria
Isolat W29	γ -Proteobacteria
Isolat W30	γ -Proteobacteria
Isolat W33	α -Proteobacteria
Isolat W37	α -Proteobacteria
Isolat W44	α -Proteobacteria
Isolat W67	γ -Proteobacteria
Isolat 12.15.4	α -Proteobacteria
Isolat 12.15.9	α -Proteobacteria
Isolat 12.15.17	α -Proteobacteria
Isolat 12.15.26	α -Proteobacteria
Isolat 12.15.35gr	Cytophaga/Flavobacteria

3.6 Computersoftware, Internetanwendungen und Datenbanken

Tab. 3.5: Computersoftware, Internetanwendungen und Datenbanken

Programm	Anwendung	Referenz
Bioedit Version 5.0.9	Bearbeitung von Nukleotidsequenzen	http://www.molbiol.bbsrc.ac.uk/reviews/bioedit_review.html
EBI-EMBL	Nukleotidsequenz Datenbankvergleiche	http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html
Xcalibur 2.0.7	Auswertung GC/MS	Thermo Fischer Scientific Inc.
Excel	Tabellenkalkulation	Microsoft Corporation
ChemStation	Auswertung GC	Agilent Technologies
Lipid Library	Einordnung von Massenspektren	http://www.lipidlibrary.co.uk
NCBI Genbank	Sequenzdatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery
Photoshop Version 7.0	Bildbearbeitung	Adobe
Word	Textverarbeitung	Microsoft Corporation

4 Methoden

4.1 Inkubations- und Kulturbedingungen

Ansätze für die Bestimmung geeigneter Kulturvolumina und die Reproduzierbarkeit erfolgten in Erlenmeyerkolben mit 10-250 ml Kulturvolumen. Bei Kulturen von 10 ml Volumen bestand eine Probe aus je einem Kulturansatz (Kolben), der an den jeweiligen Probetagen eingefroren wurde.

4.1.1 Auswahl von Pflanzenöl und Produktionsstamm

Zur Untersuchung, ob Rapsöl als Substrat geeignet ist, wurden abiotische Ansätze in Erlenmeyerkolben mit 10 ml Fermentermedium (FM) und Rapsöl (1% m/v) durchgeführt. Untersucht wurde, ob die Kultivierungsbedingungen Einfluss auf die chemische Zusammensetzung und auf die Fähigkeit zur Emulsionsbildung von Rapsöl haben. Es wurden 4 x 10 ml FM mit Rapsöl (1% m/v) bei 30°C und 100 rpm inkubiert, um festzustellen, ob die Kultivierungsbedingungen Einfluss auf das Rapsöl haben. Direkt nach dem Ansetzen (Tag 0) und an den Tagen 2, 4 und 7 wurde je ein Kolben zur weiteren Analyse eingefroren.

Für den Nachweis gleichbleibender Qualität des eingesetzten Öles wurden von vier unterschiedlichen Chargen Rapsöl des gleichen Herstellers je 3 Parallelen à 10 ml FM mit Rapsöl (1% m/v) zur weiteren Analyse über die DC und GC eingefroren.

Die Durchführung sämtlicher Screeningversuche erfolgte in Erlenmeyerkolben mit Ansätzen von 100 ml Kulturvolumen. Die Vorkultivierung wurde in FM mit 1% C-Quelle (Öl bzw. Ölgemisch) über 3 d bei 30°C und 100 rpm durchgeführt. Das durch Zentrifugation (3634 x g) gewonnene Zellpellet wurde anschließend zweimal in 10 ml FM gewaschen und dann in 10 ml FM resuspendiert. Eine Überführung von Substratresten und extrazellulären Wachsestern in die Hauptkulturen (HK) wurde hierdurch vermieden. Die Hauptkulturen wurden mit einheitlicher Biomasse gestartet.

Die HK enthielten entweder Raps-, Distel-, Sonnenblumen-, Maiskeim- oder Olivenöl als Einzelsubstrat (je 1% m/v) oder ein Gemisch der genannten Öle (insgesamt 1% m/v) als Substrat. Die Hauptkulturen wurden 7 d bei 30°C und 100 rpm geschüttelt. Direkt nach dem Beimpfen (Tag 0) und an den Tagen 2, 4 und 7 wurden aus den Kulturen jeweils 10 ml Probe entnommen und bei -20°C eingefroren. Parallel zu jedem Kulturansatz wurde eine Referenz von Einzelöl bzw. Ölgemisch in FM 7 d bei 30°C und 100 rpm inkubiert. Waren hierbei keine Kontaminationen festzustellen, wurden die Referenzen bei -20°C eingefroren.

4.1.2 Schneidern von Wachsestern mit *Alcanivorax jadensis* T9 auf Einzelsubstraten und Substratgemischen

Sämtliche Kulturansätze erfolgten in Erlenmeyerkolben mit Volumina zwischen 50-100 ml. Die Vorkultivierung, d. h. die Aktivierung der bei -80°C gelagerten Stämme, wurde in Seewasserbouillon X über 3 d bei 30°C und 100 rpm durchgeführt. Das durch Zentrifugation (3634 x g) gewonnene Zellpellet wurde zweimal in FM gewaschen und resuspendiert (4.1.1), so dass eine Überführung von Substratresten und extrazellulären Wachsestern in die HK vermieden wurde. Das Starten der HK erfolgte mit einheitlicher Biomasse. Die HK enthielten unterschiedliche Einzelsubstrate (je 1% m/v) bzw. ein Substratgemisch (1% m/v gesamt) als Wachsester-Vorstufen. Die HK wurden 9-11 d bei 30°C und 100 rpm inkubiert. An den Tagen 4, 7 und 9-11 wurden jeweils 10 ml Probe entnommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren. Wie unter 4.1.1 beschrieben, wurde eine sterile Referenz von FM und Substrat parallel zu den Kulturen inkubiert und zur Analyse eingefroren.

Eine Übersicht der durchgeführten Ansätze, geordnet nach den jeweiligen Versuchszielen, ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tab. 4.1:

Übersicht der durchgeführten Ansätze, geordnet nach Versuchszielen; abiotische Ansätze sind blau unterlegt, Zellkultivierungen gelb

Ansätze	Kohlenstoffquelle	Ziel
<i>Kultivierung - Auswahl Produktionsstamm und Pflanzenöl</i>		
Screening von Isolaten auf Einzelölen	Einzelöle (je 1% m/v)	Bestimmung eines geeigneten Öles als Substrat für die Wachsester-Produktion
Screening von verschiedenen Isolaten auf Ölgemisch	Ölgemisch (1% m/v)	Bestimmung geeigneter Wachsesterproduzenten
<i>Inkubation - Ölstandard</i>		
Fermentermedium mit Rapsöl (7 d)	Rapsöl (1% m/v)	Bestimmung eines Einflusses der Inkubationsbedingungen auf das ausgewählte Öl
Vergleich unterschiedlicher Chargen des ausgewählten Öles mit Fermentermedium	Rapsöl (1% m/v)	Standardisierung des Öles
<i>Kultivierung - Standardisierung</i>		
Kultivierung des Produktionsstammes <i>A. jadenis</i> T9 auf dem ausgewählten Öl in mehreren Parallelen	Rapsöl (1% m/v)	Standardisierung der Reproduzierbarkeit von Wachstum und Wachsester-Produktion
Kultivierung des Produktionsstammes <i>A. jadenis</i> T9 auf dem ausgewählten Öl in unterschiedlichen Kulturvolumina	Rapsöl (1% m/v)	Standardisierung der Kulturansätze
<i>Kultivierung - Schneiden von Wachsestern</i>		
Kultivierung von <i>A. jadenis</i> T9 auf verschiedenen Einzelsubstraten	Einzelsubstrate (je 1% m/v)	Gezieltes Schneiden von Wachsestern bestimmter Kohlenstoffkettenlänge
Kultivierung von <i>A. jadenis</i> T9 auf verschiedenen Einzelsubstratgemischen	Substratgemische (1% m/v insgesamt)	Gezieltes Schneiden von Wachsestern bestimmter Kohlenstoffkettenlänge

4.2 Taxonomische Einordnung von Isolaten

4.2.1 DNA-Isolierung

Für die Extraktion der DNA aus den Zellen der Isolate wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit der Firma Roche verwendet. Die Durchführung ist den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

Isolierte DNA wurde mittels Agaroseplatten (1% m/v) nachgewiesen, die mit Ethidiumbromid ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) versetzt wurden. Fünf μl Probe wurden auf die Platten gegeben, mindestens 30 min im Dunkeln inkubiert und auf dem UV-Transilluminator ausgewertet.

4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR wurde eine Teilsequenz der 16S rDNA-Gene der Isolate amplifiziert. Als Template diente gereinigte chromosomale DNA der Isolate. In Tabelle 4.2 ist die Zusammensetzung der PCR-Ansätze aufgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.3 aufgeführt (3.2.2).

Tab. 4.2: Zusammensetzung der PCR-Ansätze

Substanz	Konzentration im Ansatz [50 μl]
Polymerase (Moltag)	$0,05 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$
10-fach Puffer	1-fach
MgCl_2	$1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
dNTP's	je $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
Oligonukleotide (Primer)	je $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Template	$1 \mu\text{l}$
BSA	$200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Enhancer	$1 \mu\text{l}$
-----	-----
auffüllen mit ddH ₂ O	auf $50 \mu\text{l}$

Tabelle 4.3 fasst das verwendete Temperaturprogramm des Thermocyclers zusammen. Die Reaktion wurde nach der Amplifikation mit Loading Dye beendet und über ein Agarosegel auf die Präsenz von Amplifikat getestet.

Tab. 4.3: Struktur des PCR-Programmes zur Amplifizierung der 16S rDNA

Programmteil	Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	1x	95°C	4 min
Denaturierung	10x	94°C	30 s
Annealing		62°C	45 s
Extension		72°C	60 s
Denaturierung	25x	94°C	30 s
Annealing		55°C	60 s
Extension		72°C	60 s
Finale Extension	1x	72°C	10 min
Programmende	1x	4°C	-

4.2.3 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

Zur Kontrolle der Qualität der PCR wurde die Länge der produzierten DNA-Fragmente gelelektrophoretisch bestimmt. Das PCR-Produkt wurde mit Loading Dye (Fermentas: 10 mM Tris-HCl, 0,03% Bromphenol Blau, 0,03% Xylen-Cyanol FF, 60% Glycerin, 60 mM EDTA) versetzt und im Agarosegel (1-fach TAE-Puffer mit 1% Agarose) in 1-fach TAE-Puffer bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Vergleichsstandard, um die Größe der Fragmente zu ermitteln, diente die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder der Firma Fermentas. Die Agarosegele wurden 30 min mit Ethidiumbromid [10 mg·ml⁻¹] gefärbt, mit ddH₂O gewaschen und auf dem UV-Transilluminator ausgewertet.

4.2.4 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Abtrennung von Primern, Nukleotiden, Enzymen, Salzen und DNA-Bruchstücken von den DNA-Amplifikaten wurde das E.Z.N.A. Cycle pure Kit der Firma Peqlab Biotechnologie verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.2.5 DNA-Sequenzanalyse

Für die Bestimmung der Teilsequenz der 16S rDNA-Sequenz wurden 20 ng gereinigte (4.2.4) und getrocknete DNA pro 100 bp an die Firma MWG-Biotech AG geschickt. Über die Datenbanken NCBI und FASTA/EBI (European Bioinformatics Institute) wurden Sequenzhomologien ermittelt.

4.3 Bioverfügbarkeit der Substrate (Transmissionselektronenmikroskopie - TEM)

Mit Hilfe transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde die Bioverfügbarkeit des Öles für die Zellen (Anlagerung der Zellen an das Substrat) und die Lokalisation der Wachsester (WE) innerhalb der Zellen untersucht. Die Aufnahmen erfolgten von Kulturen des Stammes *A. jadensis* T9, Isolat S7 und S1 mit Pflanzenöl (1% m/v) als Substrat. Die Aufnahmen der Isolate S7 und S1 wurden in Zusammenarbeit mit A. Gutsche durchgeführt (Jenschke *et al.*, 2008). Kultiviert wurden die Zellen hierzu in 100 ml FM das 1% Pflanzenöl enthielt (4.1.1). An den Tagen vier und neun wurde ein Teil der Kulturen bei 1089 x g abzentrifugiert bis ausreichend Zellpellet vorhanden war. Das Zellpellet wurde in Eppendorf Gefäße überführt und für die TEM aufgearbeitet. Tabelle 4.4 zeigt die Schritte zur Aufarbeitung der Proben für die TEM.

Tab. 4.4: TEM-Präparationsschritte

Arbeitsschritt	Substanz	Anzahl der Arbeitsschritte	Zeit [min]
Fixierung	Glutaraldehydlösung (4%)	1x	90
Waschung	Natrium-Kalium-Phosphat Puffer (0,1 M; pH 7)	6x	10
Fixierung	Osmiumtetroxid-Lösung (1%)	1x	60
Waschung	Natrium-Kalium-Phosphat Puffer (0,1 M; pH 7)	4x	15
Entwässerung	Ethanol (30%)	je 1x	30
	Ethanol (50%)		30
	Ethanol (70%)		30
	Ethanol (70%)		über Nacht
	Ethanol (80%)		60
	Ethanol (90%)		60
	Ethanol absolut		30
Einbettung	Ethanol absolut	je 1x	60
	Epon nach Spurr (25 %)		60
	Epon nach Spurr (50%)		60
	Epon nach Spurr (75%)		60
	Epon nach Spurr		120
	Epon nach Spurr		über Nacht

Die Zellen wurden in der Eppendorffzentrifuge bei 3500 rpm 3 min pelletiert und in Beem-Kapseln überführt, die mit reinem Epon nach Spurr aufgefüllt wurden. Die Konzentration der Zellen in der Kapselspitze erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 2700 rpm. Die bei 40°C für 5 h ausgehärteten Kunststoffblöckchen wurden mit dem Ultramikrotom zugespitzt und die Anschnittfläche begradigt. Die Probenschnitte von 75 nm wurden auf Grids aufgetragen und über 1 h in Uranyl-Acetat und anschließend 20 min in Bleicitrat kontrastiert. Die so aufgearbeiteten Proben wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 A (Fa. Zeiss) analysiert.

4.4 Gewinnung und chemische Analytik der Wachsester-Fraktion

4.4.1 Isolierung der Lipidfraktion/Extraktion

10 ml tiefgefrorene Probe wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut und mit 1% HCl auf einen pH-Wert <4 eingestellt. Die eingestellte Probe wurde anschließend 2x mit je 10 ml Extraktionsmittel (Ethylacetat/Methanol 20:1 v/v) ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereint, zur Trocknung mit Na₂SO₄ versetzt und filtriert (Faltenfilter). Die filtrierte Probe wurde im Rotations-Vakuum-Konzentrator bei 1500 rpm und ca. 40°C im Vakuum zur Trockene eingeeengt und der Rückstand bei 4°C dunkel gelagert. Zur weiteren Analyse wurde der Rückstand in 200-400 µl Ethylacetat aufgenommen und 5 min im Ultraschallbad geschallt.

4.4.2 Gewinnung des menschlichen Sebums

Das Sebum wurde mit Hilfe eines in Ethylacetat getränkten Wattebausches entnommen. Die Watte wurde in Ethylacetat entfettet und getränkt. Die entsprechende Hautpartie des Rückens wurde mit der getränkten Watte mehrfach abgewischt und die Watte zwischendurch 1-2 mal in Ethylacetat extrahiert. Die gewonnene Probe wurde mit der Watte im Ultraschallbad 5 min geschallt und anschließend getrocknet. Zur weiteren Analyse mittels DC-Analyse (4.4.3), GC-Analyse (4.4.4) und GC/MS-Analyse (4.4.5) wurden die getrockneten Proben in Ethylacetat aufgenommen.

4.4.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Mit Hilfe der DC wurde (1) überprüft, ob eine Probe Wachsester enthält (Kontroll-Dünnschichtchromatogramm) und (2) die Isolierung der Wachsester-Fractionen aus den Proben durchgeführt. Dazu wurden abhängig von der jeweiligen Menge Ethylacetat, die zur Aufnahme der Proben eingesetzt wurde, bestimmte Mengen (4.4.3.1) extrahierte Proben (4.4.1) auf DC-Platten (MERCK, DC-Alufolien 20x20 cm, Kieselgel 60 F₂₅₄) aufgetragen und in einer DC-Kammer über das Laufmittel getrennt (4.4.3.1). Bei den Kontroll-Dünnschichtchromatogrammen wurden die getrockneten DC-Platten in 2 M H₂SO₄ getaucht und danach bei 140°C entwickelt. Von den DC-Platten, die der Isolierung der Wachsester-Fractionen dienen, wurde das Kieselgel in Höhe der Wachsester-Fraktion für die GC-Analyse abgekratzt (siehe unten). Als Wachsester-Vergleichsstandard wurde Cetylpalmitat (10-20 µg pro Platte) aufgetragen (Abb. 4.1).

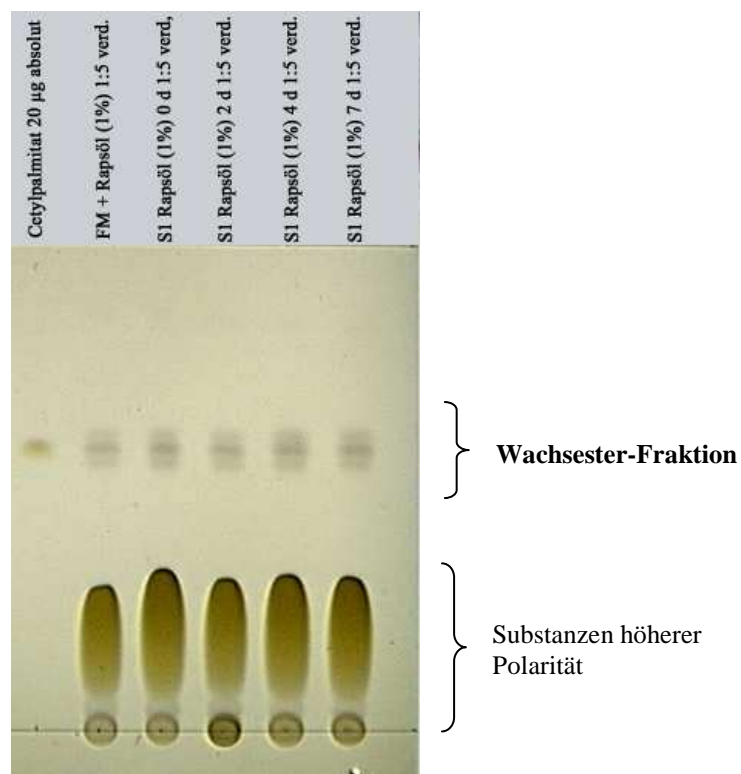


Abb. 4.1: Dünnschichtchromatogramm des organischen Extraktes einer Kultivierung des Isolates S1 in Fermentermedium (FM) mit 1% (m/v) Rapsöl (RP); von links: Cetylpalmitatstandard (20 µg absolut), FM mit 1% RP (1:5 mit Ethylacetat verdünnt), sofort nach Beimpfen (1:5 mit Ethylacetat verdünnt), Tag 2, 4 und 7 (jeweils 1:5 mit Ethylacetat verdünnt)

4.4.3.1 Bestimmung eines geeigneten Laufmittels

Zur Bestimmung des idealen Laufmittels für den Nachweis von Wachsestern in den Proben und eine semiquantitative Bestimmung der Wachsestermenge auf der DC-Platte wurden unterschiedliche Laufmittel getestet (Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Getestete Laufmittelkonzentrationen (DC)

Laufmittel	Konzentration [v/v]
Petrolether/Diethylether	95:5
Hexan/Diethylether/Essigsäure	80:20:1
Hexan/Dichlormethan	10:90
	20:80
	30:70
	40:60
	50:50
	60:40
	70:30
	80:20
	90:10

Dabei erwies sich eine Mischung aus Hexan/Dichlormethan 60:40 (v/v) als ideal. Um in den Proben vorhandene Wachsester nachzuweisen, wurden definierte Mengen der organischen Extrakte auf die DC-Platten aufgetragen und wie oben beschrieben, entwickelt. Um vergleichbare Konzentrationen der gewonnenen Extrakte (4.4.1) auftragen zu können, war das Probevolumen hierbei abhängig von der Menge Ethylacetat, in der der jeweilige

organische Extrakt aufgenommen wurde (4.4.1). 10 µl der Proben wurden auf die DC-Platten aufgetragen, wenn die Extrakte vorher in 200 µl Ethylacetat aufgenommen wurden. Erfolgte die Aufnahme der Extrakte in 400 µl Ethylacetat, wurden 20 µl der Proben aufgetragen. Problematisch erwies sich die Auswertung der DC, wenn die zu analysierenden Proben Pflanzenöl enthielten. Die Analyse wurde durch im Pflanzenöl befindliche Ester gestört, da diese Ester mit den bakteriell produzierten Wachsestern interferierten (Abb. 4.1; FM + Rapsöl 1%). Die Methode konnte dennoch genutzt werden, da es anhand steigender Spotintensitäten und Spotgrößen trotzdem möglich war, bakteriell produzierte WE nachzuweisen. Die Ergebnisse der Kontroll-Dünnschichtchromatogramme dienten allerdings nur einer ersten Einschätzung der WE-Produktion.

4.4.3.2 Gewinnung der Wachsester-Fractionen aus organischem Extrakt und Sebum

Zur Abtrennung und Gewinnung der Wachsester-Fractionen aus dem organischen Extrakt (4.4.1) wurde ebenfalls ein Gemisch aus Hexan/Dichlormethan in einem Verhältnis von 60:40 (v/v) eingesetzt. Zur Isolierung der Wachsester-Fraktion über die DC wurden mehrmals 10-20 µl einer Probe nebeneinander aufgetragen. Die aufgetragene Probenmenge war abhängig von der über die Kontroll-Dünnschichtchromatogramme visuell semiquantitativ bestimmten Wachsesterkonzentration. Ein Referenzfleck (Referenz: Cetylpalmitat) diente zur Bestimmung der Laufstrecke der im Extrakt befindlichen WE-Fraktion und wurde, wie unter 4.4.3 beschrieben, entwickelt. Alle weiteren aufgetragenen Substanzflecken wurden in der Chromatographie getrennt und zusammen mit dem Kieselgel, in Höhe der Wachsester-Fraktion, für weitere Analysen abgekratzt.

4.4.4 Gaschromatographie (GC)

Die mit dem Kieselgel in Höhe der Wachsester-Fraktion abgekratzen Proben wurden in 1 ml Octacosanstandard (10 µg/ml Ethylacetat, Injektionsstandard) aufgenommen, im Ultraschallbad 1-2 min geschallt und das Kieselgel in der Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde in Gewindefläschchen überführt, bei Raumtemperatur abgedampft und trocken im Kühlschrank gelagert. Die chemische Analyse der so gewonnenen WE-Fractionen (4.4.3) erfolgte über die GC. Gerät und verwendete Temperaturprogramme werden in Tabelle 4.6 aufgeführt. Glasgeräte, die zur Vorbereitung von Proben für die GC und die GC/MS (4.4.5) genutzt wurden, sind vorher mit Ethylacetat gespült worden. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software Chem Station Rev. A.09.01 [1206].

Tab. 4.6: Bedingungen der GC/FID-Analyse

Gaschromatograph	HP 6890 Serie
Injektor	Gerstel KAS 3 [®]
Temperaturprogramm	60°C (5 s) → 8°C/s auf >350°C Haltezeit 120 s, splitless 60 s
Injektionsvolumen	1 µl (Autosampler)
Trärgas	Helium, 1 ml/min constant flow
Trennsäule	30 m x 0,25 mm ID Quarzkapillare (J & W Scientific) DB-5 HT; 0,1 µm Filmdicke
Temperaturprogramm	60°C (2 min) → 15°C/min auf 170°C → 4°C/min auf 350°C (15 min isotherm)
Detektor	FID (Flammenionisationsdetektor) (300°C, H ₂ 40 ml/min, syn. Luft 280 ml/min, N ₂ (make up) 30 ml/min)

4.4.4.1 Qualitative Analyse

Die qualitative Bestimmung der C-Kettenlänge der WE erfolgte anhand der relativen Retentionszeiten in den Gaschromatogrammen. Die Berechnung der relativen Retention ergab sich hierbei aus dem Quotienten der Retentionszeit des zu bestimmenden Wachsesters und der Retentionszeit des internen Standards (Myristyl Dodecanoat). Zur Identifizierung der in den Gaschromatogrammen erhaltenen Peaks wurde eine Tabelle der für die WE spezifischen relativen Retentionszeiten erstellt (Tabellen 9.1-9.4).

4.4.4.2 Quantitative Analyse

Die quantitative Auswertung der nachgewiesenen WE bestimmter Kettenlängen erfolgte über den internen WE-Standard Myristyl Dodecanoat (Abb. 4.2). Pro untersuchtem Extrakt betrug die eingesetzte Konzentration des internen Standards auf der DC-Platte 10 µg absolut. Der Standard wurde mit der jeweiligen Probe auf DC-Platte aufgetragen (4.4.3.2) und für die GC mit aufgearbeitet. Die Peakflächen des internen Standards und der jeweils betrachteten WE wurden ins Verhältnis gesetzt und die Konzentration der WE per Dreisatz über die bekannte Konzentration des internen Standards bestimmt. Versuche, die Genauigkeit der Aufarbeitung zu bestimmen, ergaben eine Wiederfindung von ca. 84%.

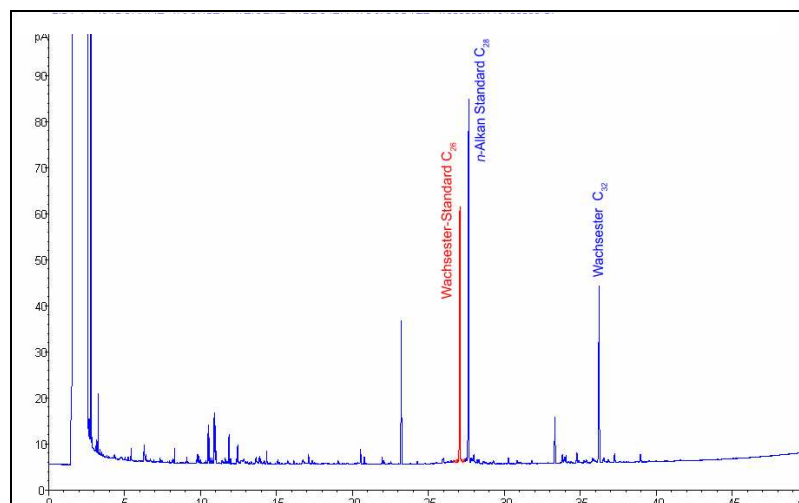


Abb. 4.2:

Gaschromatogramm der Wachsester-Fractionen einer Kultur von *Alcanivorax jadensis* T9 in Fermentermedium (FM) mit *n*-Hexadecansäure und *n*-Hexadecanol im Gemisch (1% m/v); die Probe wurde entnommen nach 7 d Kultivierung; als interner Standard diente Myristyl Dodecanoat (C_{26:0}; rot markiert)

4.4.5 Gaschromatographisch/Massenspektrometrische Analytik (GC/MS)

Die Zusammensetzung der in der GC (4.4.4) nachgewiesenen bakteriell produzierten WE wurde über die GC/MS bestimmt. Die angewandten Einstellungen der GC/MS sind in Tabelle 4.7 aufgeführt. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific Inc., 1998-2007). Die genaue Beschreibung der durchgeführten GC/MS erfolgt in Kapitel fünf (Massenspektrometrische Analysen). Die Massenspektren der von *A. jadensis* T9 produzierten gesättigten und einfach ungesättigten Wachsester sind im Anhang in den Abbildungen 9.1 und 9.2 aufgeführt.

Tab. 4.7: Bedingungen der GC/MS-Analyse

Gaschromatograph	HP 5890 Serie II
Injektor	Gerstel KAS 3 [®]
Temperaturprogramm	60°C (5 s) → 10°C/s auf 350°C (3 min), splitless
Injektionsvolumen	1 µl (Autosampler)
Trägergas	Helium 12 psi
Trennsäule	30 m x 0,25 mm ID Quarzkapillare (J & W Scientific) DB-5 HT; 0,1 µm Filmdicke
Temperaturprogramm	60°C (2 min) → 15°C/min auf 250°C → 3°C/min auf 380°C
Massenspektrometer	Finnigan MAT 95 Q
Ionisierungsenergie	70 eV
Scangeschwindigkeit	1 scan/1,411 s
Scanbereich	50-750 amu
Scanrate	1,2 s/d
Interscanzeit	0,1 s
Delay	9 min

5 Massenspektrometrische Analysen

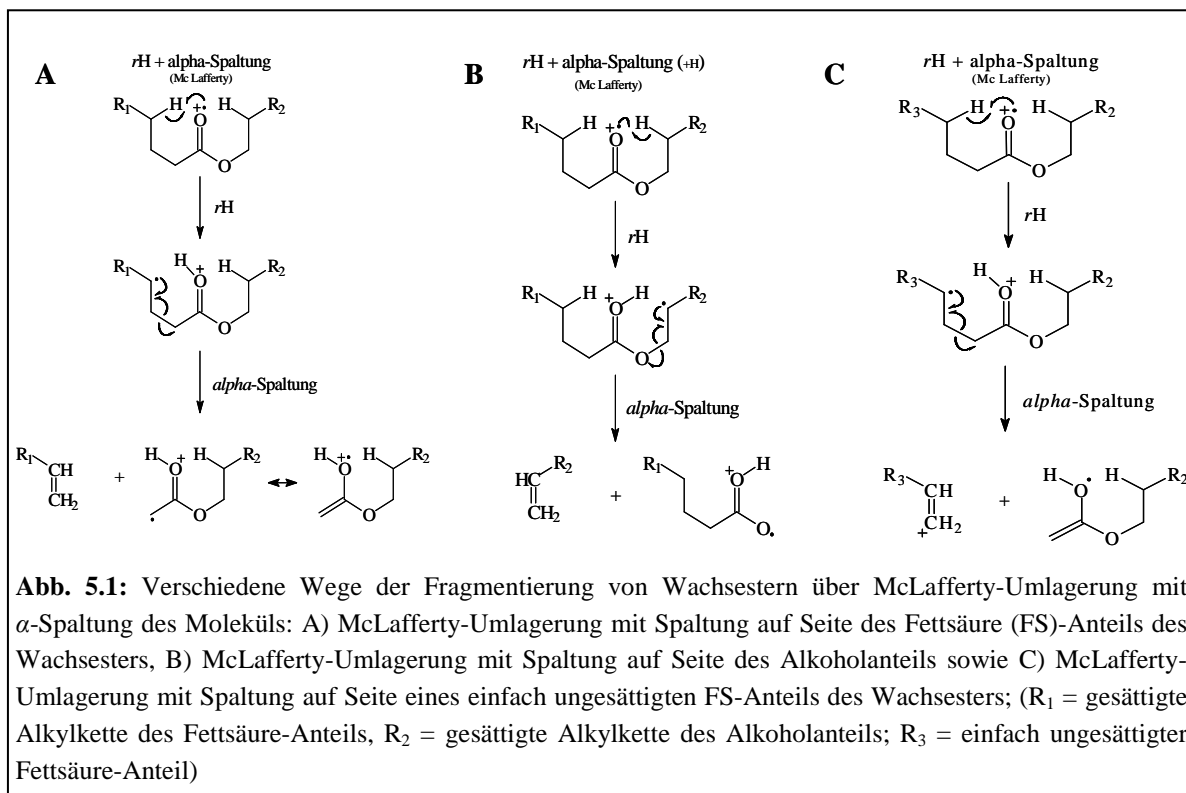
5.1 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, das es ermöglicht, Ionen in einem Magnetfeld oder elektrischen Feld nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) zu trennen. Die gängigste Ionisierungsform der Analyten ist die Elektronenstoßionisierung (EI), die in der Gasphase verläuft. Die Ionisierung findet mit einer kinetischen Energie von 70 eV statt. Dies hat den Vorteil, dass sich die erhaltenen Massenspektren für den Vergleich mit bestehenden Spektrenbibliotheken eignen. Bei der Ionisierung werden Molekülradikalkationen und Fragmentionen erzeugt. Die Fragmentierung findet zum Abbau und zur Stabilisierung der Überschussenergie der Ionen statt und steht u. a. in engem Zusammenhang mit der Molekülstruktur.

Die Trennung der Ionen erfolgt aufgrund ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses im magnetischen Feld. Die Aufnahme des Massenspektrums (scan) erfolgt hierbei z. B. durch die Änderung der Magnetfeldstärke. Die Interpretation des Massenspektrums ermöglicht Aussagen über Art und Struktur einer Verbindung. Das Massenspektrum beinhaltet unterschiedliche Peaks. Der Molekülionen-Peak ist das Signal, das die molekulare Masse einer Verbindung anzeigt. Der Base-Peak (Bp) ist das intensivste Ion im Massenspektrum und wird üblicherweise mit 100% Intensität abgebildet. Alle weiteren Fragmentionen werden in Prozent hiervon angegeben.

Die Fragmentierung ist abhängig von der Molekülstruktur. Hierbei spielen unterschiedliche Fragmentierungswege eine Rolle. Bei der in dieser Arbeit im Vordergrund stehenden Verbindungsklasse, den langkettigen Wachsestern, haben Fragmentierungswege wie die α -Spaltung und verschiedene Wasserstoff (H)-Umlagerungen wie z. B. die McLafferty-Umlagerung eine herausragende Bedeutung. Die McLafferty-Umlagerung (Abb. 5.1; A, B und C) findet bevorzugt bei Carbonylverbindungen statt, die ein H-Atom aufweisen, das mit dem Sauerstoff der Carbonylgruppe einen sechsgliedrigen Übergangszustand bilden kann. Voraussetzung ist eine DB (in diesem Falle C=O), eine Kette von drei verbundenen Atomen mit einem H-Atom in γ -Stellung sowie dessen sterische Möglichkeit, mit dem Sauerstoff-Atom eine Bindung eingehen zu können (Budzikiewicz & Schäfer, 2005).

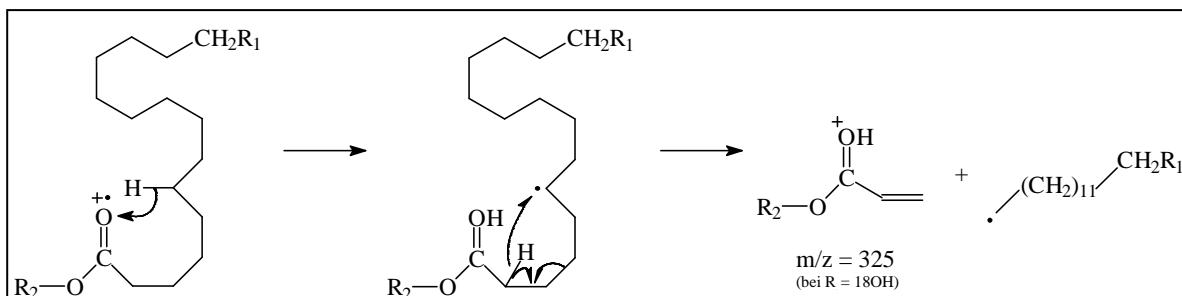
Eine neue Bindung von der Position des Radikals zu einem angrenzenden Atom wird gebildet, parallel hierzu findet eine Bindungsspaltung in α -Stellung zum Radikal statt (Mc Lafferty & Tureček, 1993), was zum Verlust eines Neutralteilchens führt. Diese Reaktion kann sowohl auf Seite des Fettsäureanteils des Esters (Abb. 5.1; A) als auch auf Seite des Alkoholanteils stattfinden (Abb. 5.1; B), wobei in beiden Fällen ein Fragmention mit geradem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) entsteht.



Enthält die Alkylkette des Säureanteils eine DB, kann dies dazu führen, dass die Ladung auf Seite des FS-Anteils bleibt (Abb. 5.1; C) und somit dieses Fragment des Wachsesters detektiert wird. Bleibt die positive Ladung auf Seite des Alkoholanteils, wird nur das Fragment mit gesättigtem Alkoholanteil detektiert (Abb. 5.1; A).

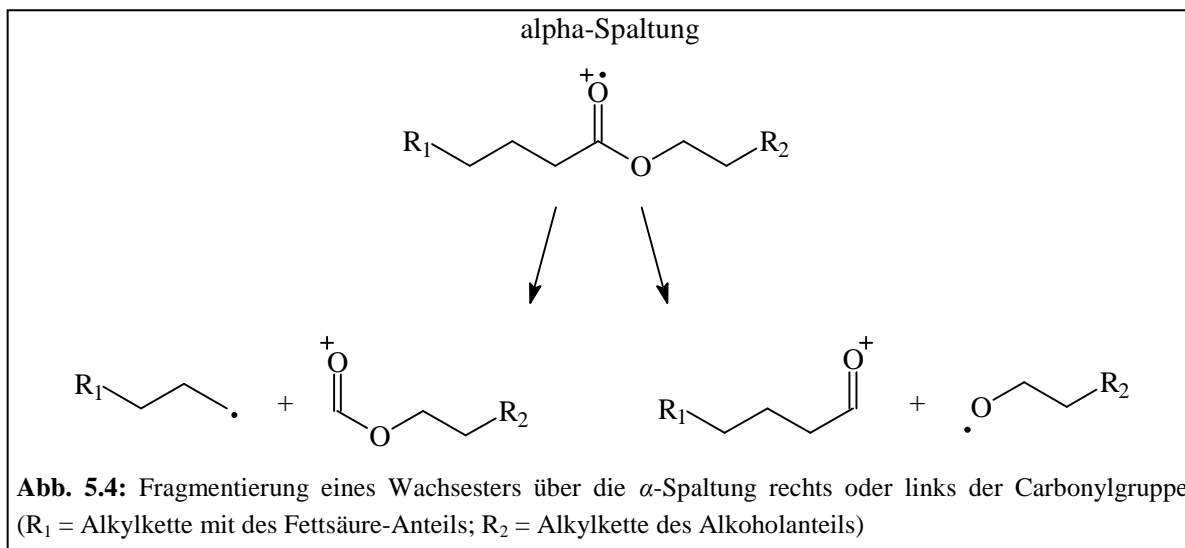
Anders als die eben beschriebene H-Umlagerung mit anschließender α -Spaltung führt eine zweite H-Umlagerung mit anschließender Spaltung zu einem ungeraden Fragmention (Abb. 5.2; B). Radikal und Ladung werden hierbei getrennt.

Die Spaltung des Moleküls kann aber auch über einen induktiven Effekt (i), eine induktive Spaltung, erfolgen (Abb. 5.2; A). Die Initiierung durch die positive Ladung beinhaltet die Anziehung eines Elektronenpaares. Die Stabilisierung der Ladung ist normalerweise wichtiger als die des Radikals für die Bestimmung von Reaktionsprodukten.

**Abb. 5.3:**

Zusätzliche Möglichkeiten der H-Umlagerung in der Fettsäure-Kette der Wachsester (R_1 = Alkylkette des Fettsäure-Anteils; R_2 = Alkylkette des Alkoholanteils)

Neben den H-Umlagerungsreaktionen können α -Spaltungen an verschiedenen Stellen im Molekül stattfinden (Abb. 5.4). Hierbei ist in der Regel die Carbonylgruppe beteiligt. Dies bewirkt zunächst eine Wanderung des radikalischen Zentrums, was zu weiteren Spaltungen im Molekül führen kann. Die α -Spaltungen führen grundsätzlich zur Trennung von Radikal und Ladung (Abb. 5.4).

**Abb. 5.4:** Fragmentierung eines Wachsesters über die α -Spaltung rechts oder links der Carbonylgruppe (R_1 = Alkylkette mit des Fettsäure-Anteils; R_2 = Alkylkette des Alkoholanteils)

Einige charakteristische Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse von Wachsestern, die innerhalb der verschiedenen Fragmentierungswege entstehen können, werden in den folgenden Kapiteln gezeigt. Sie ermöglichen Rückschlüsse über die Kettenlängen der beteiligten Alkohole und Säuren im Molekül.

5.1.1 Interpretation von Massenspektren gesättigter Wachsester

Bei den Massenspektren der gesättigten WE entsteht der Base-Peak unter Beteiligung des FS-Anteils und ist daher für diese indikativ. Abbildung 5.5 zeigt beispielhaft das Massenspektrum von Octadecanyl-Hexadecanoat (Molekülradikalkation m/z 508).

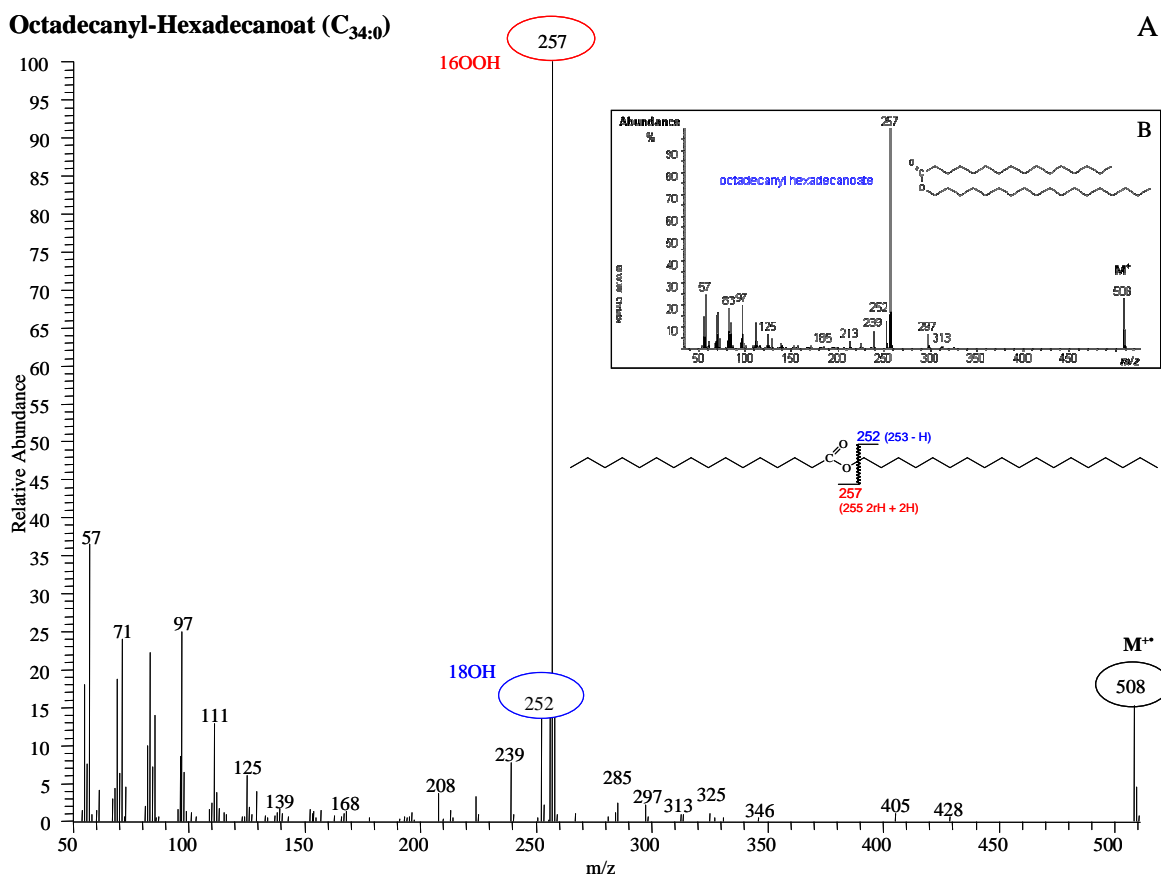


Abb. 5.5: Massenspektrum und Struktur des Wachsesters Octadecanyl-Hexadecanoat (A), gewonnen aus einer Kultur von *A. jadensis* T9 mit *n*-Octadecanol als einziger C- und E-Quelle; markiert ist das Signal des Säureanteils (m/z 257) mit rot, das des Alkoholanteils (m/z 252) mit blau und das Molekülion ($M^{+\bullet}$; m/z 508) mit schwarz; (B) Vergleichsspektrum mit Struktur des WE Octadecanyl-Hexadecanoat (www.lipidlibrary.co.uk)

Der Base-Peak entspricht mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 257 einer Abspaltung des C₁₆-Fettsäureanteils des Esters. Dieses bevorzugte Fragment kann über eine zweifache H-Umlagerung (2 x *rH*) und anschließende Spaltung des Moleküls (Abb. 5.2; B) entstehen. Auch das aus dem C₁₈-Alkoholanteil resultierende Fragment mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 252 ist gut zu erkennen, jedoch mit einer deutlich geringeren Intensität als das FS-Fragment. Dieses Fragment wird über eine H-Umlagerung (*rH*) mit induktiver Spaltung (*i*) gebildet (Abb. 5.2; A).

Fragmentationen mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen von m/z 239 und m/z 297 entstehen durch α -Spaltungen neben der Carbonylgruppe. Anhand ihrer relativ kleinen Peaks ist zu erkennen, dass diese Spaltung im Vergleich zur zweifachen H-Umlagerung mit Spaltung weniger bevorzugt ist, aber charakteristische Fragmente hervorbringt. Ein Fragmentation mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 325 deutet darauf hin, dass auch Fragmente über eine Reihe von zusätzlichen H-Umlagerungen entstehen. Ein möglicher Weg solcher Umlagerungen, die zur Bildung dieses Fragmentes führen, ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Anhand ihrer Häufigkeit (Peakintensität) ist aber zu schließen, dass diese Reaktion eine eher untergeordnete Rolle spielt.

Es wird davon ausgegangen, dass das Massenspektrum des aus einer Kulturmessung stammenden Octadecanyl-Hexadecanoats (Abb. 5.5; A) eine hohe Reinheit aufweist, da es hohe Übereinstimmungen mit dem Vergleichsspektrum des reinen Wachsesters (Abb. 5.5; B; www.lipidlibrary.co.uk) aufweist. Durch das Angebot von Pflanzenöl (TAG-Gemisch) als Substrat und Substratgemischen in einigen Versuchen der hier vorliegenden Arbeit ist anzunehmen, dass nicht nur reine WE bakteriell produziert werden. Auch WE gleicher Kettenlänge mit unterschiedlicher Zusammensetzung von Alkohol- und Säureanteil kommen vor. Sie lassen sich gaschromatographisch zum Teil nicht trennen, so dass mit gemischten Massenspektren zu rechnen ist. Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse, die für die Fragmentierung gesättigter WE charakteristisch sind, sind in Tabelle 5.1 für die in den Estern enthaltenen Säure- bzw. Alkoholanteile zusammengefasst. Sie sind in den folgenden Abschnitten Basis für die Zuordnung und Interpretation der bei im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erhaltenen WE-Massenspektren.

Tabelle 5.1: Mögliche Fragmentierungswege mit charakteristischen Fragmenten (Base-Peak bildende Fragmente fett dargestellt) für die Fragmentierung gesättigter Wachsester; unterschiedliche Fragmentierungsmöglichkeiten von gesättigten Wachsestern über die McLafferty-Umlagerung sind in Abb. 5.1; A und B dargestellt; rH = H-Umlagerung; $rH + i$ = H-Umlagerung + induktiver Effekt; FS = Fettsäure

FS-Anteil	rH (McLafferty) (Abb. 5.1; A)	$rH + rH$ (Bp)	α -Spaltung	Alkohol- anteil	rH (McLafferty) (Abb. 5.1; B)	$rH + i$ (ca. 15-20%)	α -Spaltung	weitere rH
12OOH	200	201	183	12OH	228	168	213	241
13OOH	214	215	197	13OH	242	182	227	255
14OOH	228	229	211	14OH	256	196	241	269
15OOH	242	243	225	15OH	270	210	255	283
16OOH	256	257	239	16OH	284	224	269	297
17OOH	270	271	253	17OH	298	238	283	311
18OOH	284	285	267	18OH	312	252	297	325
19OOH	298	299	281	19OH	326	266	311	339
20OOH	312	313	295	20OH	340	280	325	353
21OOH	326	327	309	21OH	354	294	339	367
22OOH	340	341	323	22OH	368	308	353	381

5.1.2 Interpretation der Spektren eines Wachsester-Gemisches

Ein Spektrum eines WE-Gemisches mit gesättigten Wachsestern gleicher Kettenlänge, aber eindeutig unterschiedlicher Zusammensetzung, ist in Abbildung 5.6 zu sehen. Diese Gemische sind bei der Untersuchung von natürlichen Proben nicht ungewöhnlich. Die Variationen der Kettenlängen der beteiligten Alkohole und Säuren am WE wirken sich nicht zwingend auf die Gesamtkettenlänge und entsprechend auch nicht auf den bei der gaschromatographischen Trennung ausschlaggebenden Dampfdruck aus.

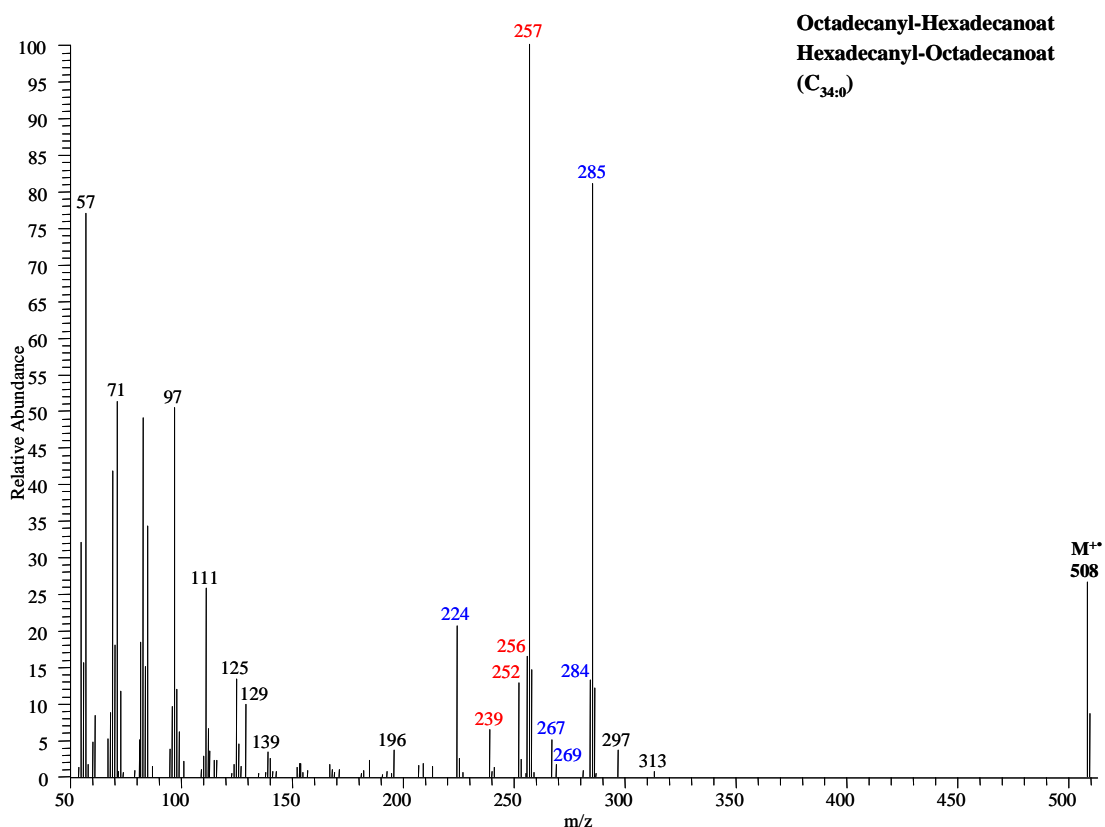


Abb. 5.6: Massenspektrum eines Wachsester-Gemisches gleicher Kettenlänge, aber mit unterschiedlicher Zusammensetzung; Fragmente, die aus dem Wachsester Octadecanyl-Hexadecanoat entstanden, sind rot markiert und die aus Hexadecanyl-Octadecanoat blau; das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z 508) des Molekülions (M^{+}) wurde fett gedruckt

Das abgebildete Massenspektrum des $C_{34:0}$ -WE enthält mindestens zwei unterschiedliche Ester, die sich als Octadecanyl-Hexadecanoat und Hexadecanyl-Octadecanoat identifizieren lassen. Aus dem WE Octadecanyl-Hexadecanoat stammt der Base-Peak, also das häufigste Fragment, es leitet sich von der 16er FS-Komponente ab mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z 257. Wie in Abschnitt 5.1.1 bereits erwähnt, entsteht dieses Fragment während der Ionisierung durch $2 \times rH$ mit Spaltung des Moleküls.

Der zugehörige 18er Alkohol wird durch das Fragment mit m/z 252 nachgewiesen, welches durch $rH + i$ entsteht. Weitere Fragmente, die durch die Fragmentierung aus diesem WE entstanden sein können, sind Fragmente mit m/z 256 und m/z 239, die durch $rH + \alpha$ -Spaltung und α -Spaltung entstehen können.

Der WE Hexadecanyl-Octadecanoat mit einer 18er FS-Komponente zeichnet sich durch die Fragmente mit m/z 285 für den FS-Anteil und m/z 224 für den 16er Alkoholanteil aus. Die Fragmente können durch $2 \times rH$ und $rH + i$ entstehen. Auch diesem Wachsester können weitere Peaks zugeordnet werden. Fragmente mit m/z 284 entstehen durch $rH + \alpha$ -Spaltung, während m/z 267 und m/z 269 durch α -Spaltung entstehen können.

Da aus Wachsestern unterschiedlicher Zusammensetzung Fragmente gleichen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses entstehen können, sind bei einem WE-Gemisch die charakteristischen Fragmente nicht immer eindeutig zuzuordnen. Eine genauere Zuordnung kann in diesem Fall nur im Vergleich mit dem Massenspektrum eines reinen Wachsesters stattfinden.

5.1.3 Interpretation der Spektren einfach ungesättigter Wachsester

Im Vergleich zu den gesättigten (5.1.1) weisen die einfach ungesättigten WE aufgrund ihrer Doppelbindung Unterschiede in der Fragmentierung und somit den charakteristischen Fragmenten auf. Abbildung 5.7 zeigt ein Spektrum des einfach ungesättigten Wachsesters Octadecanyl-Hexadecenoat.

Das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 506 des Molekülion-Peaks zeigt die einfache Unsättigung des Wachsesters an. Wie bei den gesättigten Wachsestern wird der Base-Peak von Fragmenten der FS-Komponente gebildet. Neben dem Base-Peak entstehen zusätzliche intensive Signale, die Fragmente der FS-Komponente darstellen.

Der Base-Peak in Abbildung 5.7 mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 236 entsteht wahrscheinlich durch α -Spaltung neben der Carbonylgruppe auf Seite der Alkoholkette. Fragmente mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 255 entstehen durch die zweifache H-Umlagerung mit anschließender Spaltung des Moleküls (Abb. 5.4).

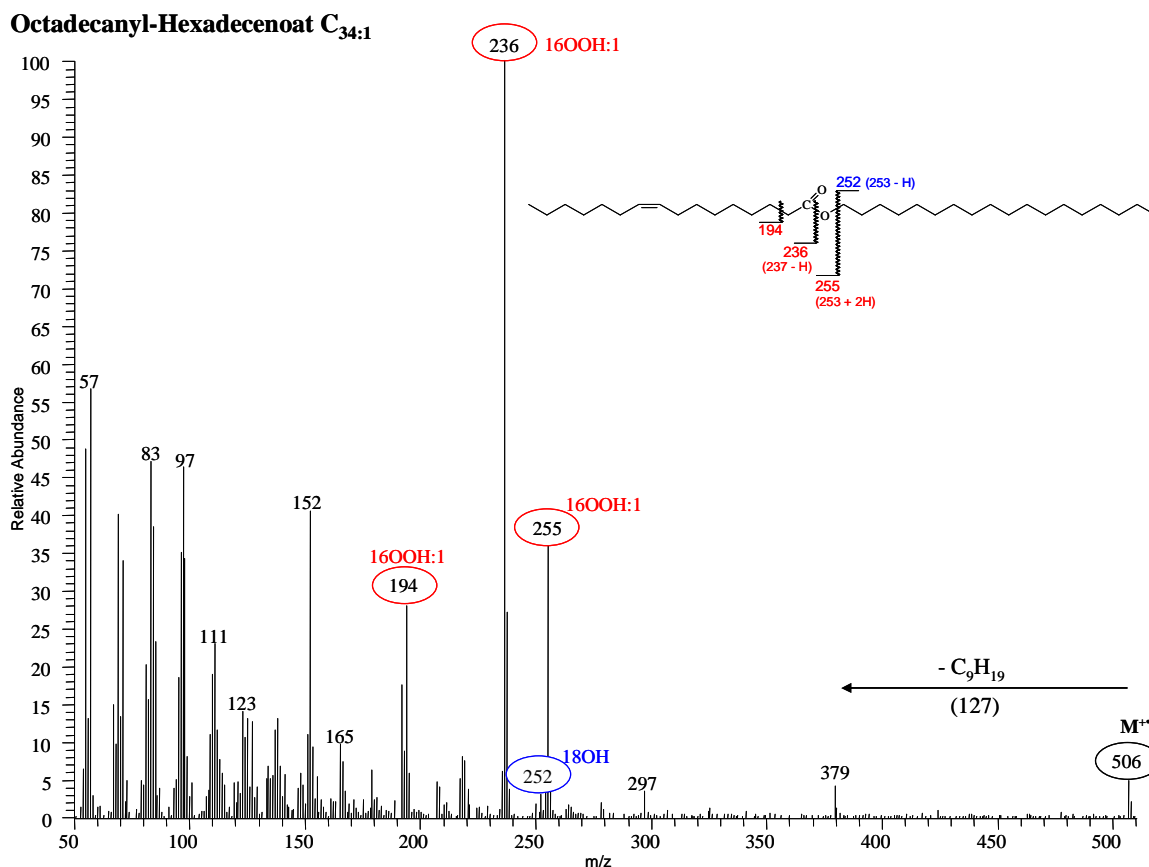


Abb. 5.7: Massenspektrum und Struktur des Wachsesters Octadecanyl-Hexadecenoat, gewonnen aus einer Kultur von *A. jadenis* T9 mit *n*-Hexadecanol und Rapsöl (Gemisch) als einziger C- und E-Quelle; markiert sind Signale des Säureanteils (m/z 236, 255, 194) mit rot, Signale des Alkoholanteils (m/z 252) mit blau und das Molekülion (M^+ ; m/z 506) mit schwarz; der Pfeil weist auf ein Primärfragment hin, entstanden durch Abspaltung eines Alkylradikals

Die Differenz von m/z 257 der gesättigten 16er Fettsäure und m/z 255 der einfach ungesättigten 16er Fettsäure ergibt sich durch die DB, durch die 2 H-Atome weniger im einfach ungesättigten Molekül vorkommen. Auch das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 194 gehört zu einem Fragment der FS-Komponente. Es entsteht über die McLafferty-Umlagerung auf der Seite des einfach ungesättigten FS-Anteils (Abb. 5.1; C). Da auch bei m/z 254 ein Signal geringerer Intensität zu erkennen ist, zeigt sich hier, dass sich die Ladung bei ungesättigtem FS-Anteil sowohl auf dem Fragment des Alkoholanteils (Abb. 5.1; A) als auch auf dem Fragment des FS-Anteils befinden kann. Fragmente mit geladenem FS-Anteil scheinen hierbei stabiler zu sein, da das Signal in wesentlich höherer Intensität vorkommt. Das Signal mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 297 entsteht durch α -Spaltung neben der Carbonylgruppe auf Seite der FS-Kette (Abb. 5.4).

Das Signal mit m/z 379 kann durch Abspaltung einer Alkylkette mit neun C-Atomen entstehen.

Die Spektren der gesättigten und einfach ungesättigten WE zeigten hohe Übereinstimmung mit verglichenen Bibliotheksspektren, was eine genauere Interpretation möglich macht.

Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse, die für die Fragmentierung einfach ungesättigter WE über bestimmte Fragmentierungswege charakteristisch sind, werden in Tabelle 5.2 zusammengestellt. Fragmentationen, die Rückschlüsse auf den Alkoholanteil im WE zulassen, sind vergleichsweise wenig vorhanden, lassen sich jedoch aus der Differenz berechnen.

Tab. 5.2: Mögliche Fragmentierungswege mit charakteristischen Fragmenten für die Fragmentierung einfach ungesättigter Wachsester; mögliche Fragmente bei Wachsestern mit einfach ungesättigtem Säureanteil über die McLafferty-Umlagerung sind in Abb. 5.1; C dargestellt; die Tabelle zeigt die charakteristischen Fragmente für den jeweils ungesättigten Anteil des einfach ungesättigten Wachsesters; die Fragmente der gesättigten Anteile des Wachsesters sind Tab. 5.1 zu entnehmen; rH = H-Umlagerung; $rh + i$ = H-Umlagerung + induktiver Effekt; FS = Fettsäure

FS-Anteil (gesättigter Alkohol-Anteil, Tab. 5.1)	rH (McLafferty) (Abb. 5.1; A)/ (Abb. 5.1; C)	$rh + rH$	α -Spaltung/ - H	Alkohol- anteil (gesättigter FS-Anteil, Tab. 5.1)	rH (McLafferty)	$rh + i$	α - Spaltung	weitere rH
12OOH:1	198 / 138	199	180 / 181	12OH:1	226	166	211	239
13OOH:1	212 / 152	213	194 / 195	13OH:1	240	180	225	253
14OOH:1	226 / 166	227	208 / 209	14OH:1	254	194	239	267
15OOH:1	240 / 180	241	222 / 223	15OH:1	268	208	253	281
16OOH:1	254 / 194	255	236 / 237	16OH:1	282	222	267	295
17OOH:1	268 / 208	269	250 / 251	17OH:1	296	236	281	309
18OOH:1	282 / 222	283	264 / 265	18OH:1	310	250	295	323
19OOH:1	296 / 236	297	278 / 279	19OH:1	324	264	309	337
20OOH:1	310 / 250	311	292 / 293	20OH:1	338	278	323	351
21OOH:1	324 / 264	325	306 / 307	21OH:1	352	292	337	365
22OOH:1	338 / 278	339	320 / 321	22OH:1	366	306	351	379

5.1.4 Interpretation der Spektren zweifach ungesättigter Wachsester

Wie in Abschnitt 6.3.2 zu ersehen, waren zweifach ungesättigte WE in den mikrobiellen WE-Fractionen kaum vertreten. Aufgrund dieser Tatsache und einem Mangel an Vergleichsspektren werden daher hier nur einige Möglichkeiten der Interpretation gegeben. Es werden nur Spektren interpretiert, in denen das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis des Moleküls eine zweifache Unsatigung bestätigt (Abb. 5.8 und 5.9).

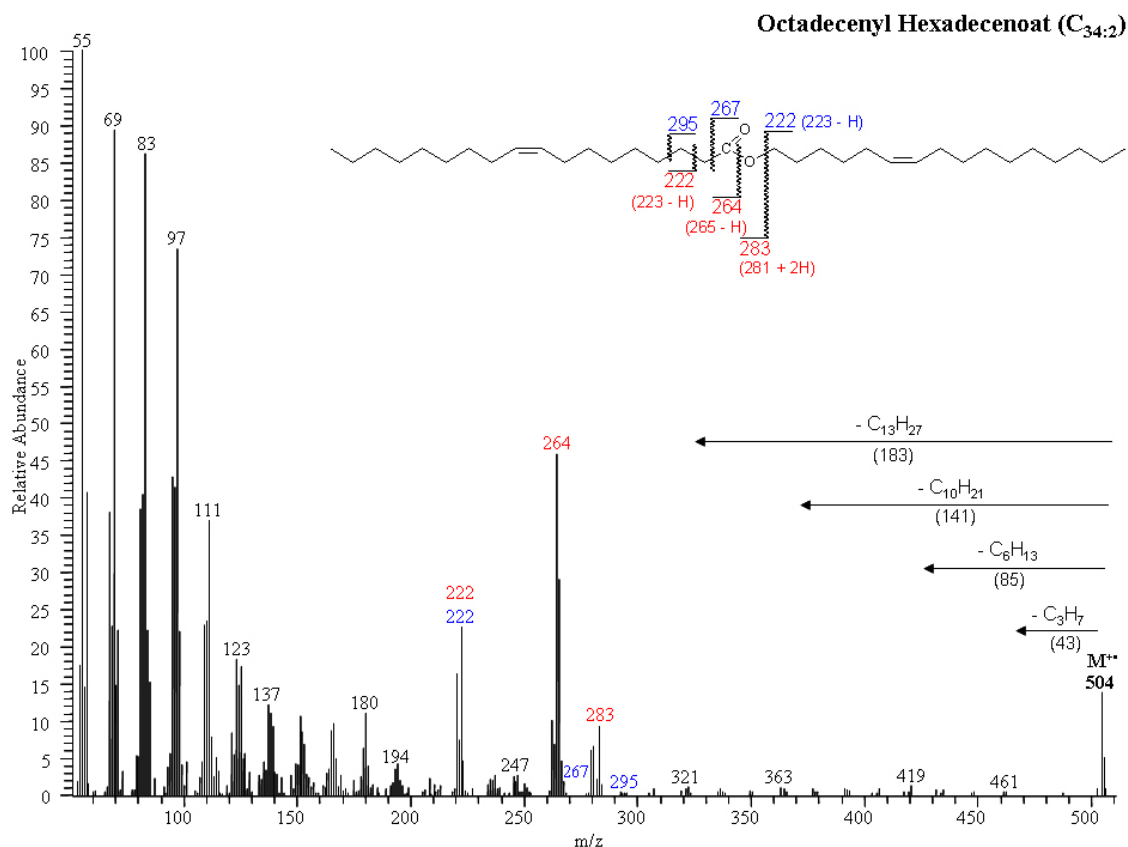


Abb. 5.8: Massenspektrum und Struktur des Wachsesters Octadecenyl-Hexadecenoat, gewonnen aus einer Kultur von *A. jadenis* T9 mit *n*-Hexadecen und Rapsöl (Gemisch) als einziger C- und E-Quelle; markiert sind Signale des Säureanteils (m/z 264, 222, 283) mit rot, Signale des Alkoholanteils (m/z 222, 267, 295) mit blau und das Molekülion (M^{••}; m/z 504) ist fett gedruckt; die Pfeile weisen auf Primärfragmente hin, entstanden durch Abspaltung von Alkylradikalen

Die Annahme, dass es sich um einen zweifach ungesättigten WE handelt, wird durch das Molekülion [M]^{••} mit m/z 504 und durch das Retentionsverhalten in der GC-Analyse bestätigt. Die Signale der Fragmentationen bei den zweifach ungesättigten Wachsestern haben eine deutlich geringere Intensität als bei den einfach ungesättigten. Die intensivsten Signale werden im Bereich der niedermolekularen Fragmentationen angetroffen.

Dem FS-Anteil des Wachsesters Octadecenyl-Hexadecenoat konnten m/z 264, welches durch α -Spaltung (- H) entstehen kann und m/z 283, das durch 2 x rH gebildet wird zugeordnet werden. Das Fragmentation mit m/z 222 kann sowohl aus dem FS-Anteil des Wachsesters durch eine McLafferty-Umlagerung (Abb. 5.1; C) entstehen, als auch aus dem Alkoholanteil des Wachsesters durch eine H-Umlagerung mit induktivem Effekt. Fragmentationen mit m/z 267 und 295 aus dem Alkoholanteil können durch α -Spaltung sowie weitere H-Umlagerungen entstehen.

Weitere Abspaltungen von C-Ketten verschiedener Länge, denen kein Fragmentierungsweg zugeordnet werden kann, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Intensität der Signale ist hierbei sehr gering.

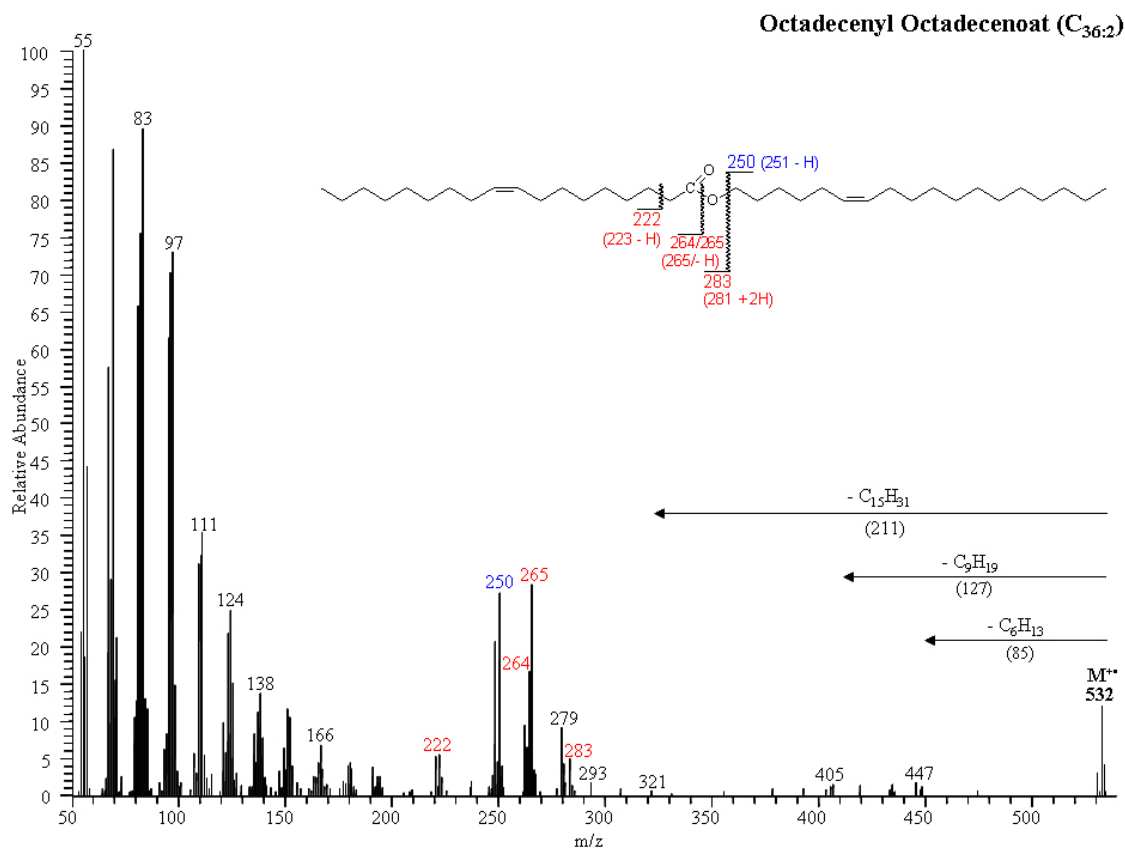


Abb. 5.9: Massenspektrum und Struktur des Wachsesters Octadecenyl-Octadecenoat, gewonnen aus einer Kultur von *A. jadenis* T9 mit *n*-Hexadecen und Rapsöl (Gemisch) als einziger C- und E-Quelle; markiert sind Signale des Säureanteils (m/z 265, 264, 222, 283) mit rot, die des Alkoholanteils (m/z 250) mit blau und das Molekülion ($M^{+\bullet}$; m/z 532) ist fett gedruckt; die Pfeile weisen auf Primärfragmente hin, entstanden durch Abspaltung von Alkylradikalen

Auch im Spektrum des Wachsesters Octadecenyl-Octadecenoat (Abb. 5.9) lassen sich bestimmte Fragmentationen zuordnen. Signale mit m/z 265 und 264 stammen aus dem FS-Anteil und entstehen durch α -Spaltung und α -Spaltung (- H).

Das Fragmentation mit m/z 222 bildet sich bei dieser WE-Zusammensetzung über eine McLafferty-Umlagerung nur aus dem FS-Anteil, genau wie m/z 283, das wieder über $2 \times rH$ entsteht. Das Signal m/z 250 des Alkoholanteils zeigt eine recht hohe Intensität und entsteht über eine H-Umlagerung mit induktivem Effekt. Zusätzliche Abspaltungen von C-Ketten unterschiedlicher Länge wurden mit Pfeilen markiert.

Innerhalb der Spektren von zweifach ungesättigten WE dominieren die niedermolekularen Fragmentationen sehr stark (s. o.), was dazu führt, dass uncharakteristische Alkylfragmente den Base-Peak bilden. Da die WE aus natürlichen Proben isoliert wurden, ist es möglich, dass die Kettenverknüpfung nicht mehr den Base-Peak bestimmt. Trotzdem sind für die WE charakteristische Fragmente vorhanden, die die Auswertung der Spektren ermöglichen. Beide Spektren der zweifach ungesättigten WE wurden in Analogie zu den in der Lipid Library (www.lipidlibrary.co.uk) enthaltenen Spektren interpretiert.

5.1.5 Weichmacher als Hauptverunreinigung in den Versuchsansätzen

In der GC immer wieder stark auftretende Verunreinigungen konnten mit Hilfe der GC/MS als Phthalate identifiziert werden. Das für Phthalate charakteristische Schlüsselfragment mit m/z 149 ist in Abbildung 5.10 dargestellt.

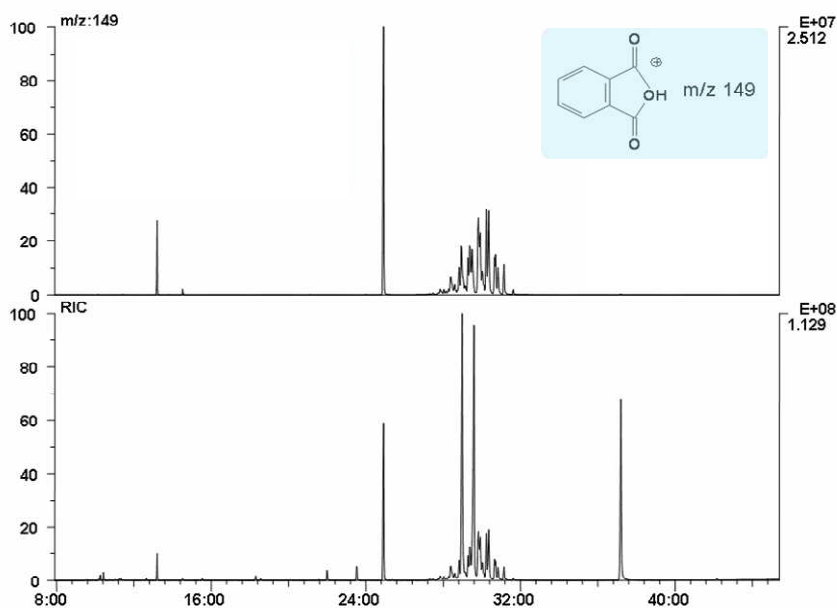


Abb. 5.10:

GC/MS Totalionenchromatogramm (Ausschnitt) einer Wachsester-Fraktion mit Ionenchromatogramm (m/z 149) und Struktur des Schlüsselfragmentes der Phthalate

Weichmacher, wie höhere Phthalsäureester, werden häufig über Lösungsmittel aus Plastikflaschen, Plastikschräuchen usw. in die Substanzproben eingeschleppt. Ein intensives Ion bei m/z 149 deutet deshalb fast immer auf Phthalsäureester hin (Budzikiewicz & Schäfer, 2005).

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Screening bakterieller Isolate hinsichtlich ihrer Wachsester-Produktion mit Pflanzenöl als Kohlenstoff (C)- und Energie (E)-Quelle

In enger Zusammenarbeit mit einem Drittmittelprojekt (AiF), bei dem die Anreicherung eines Pflanzenöles mit bakteriell produzierten Wachsestern im Vordergrund stand, wurden erste Versuche hinsichtlich der bakteriellen Wachsester-Produktion durchgeführt. Pflanzenöl wurde hierbei als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt, um einen Stamm zu finden, der WE auf Pflanzenölbasis produziert und im Weiteren das Öl zu bestimmen, das in Bezug auf bakterielles Wachstum und WE-Produktion am besten als Substrat geeignet ist. Für die Bestimmung eines geeigneten Produktionsstammes sowie eines geeigneten Pflanzenöles wurden unterschiedliche Screeningversuche durchgeführt. Bei der späteren Verwendung anderer Substrate (wie z. B. *n*-Fettsäuren oder *n*-Alkohole) anstelle des Pflanzenöles ist anzunehmen, dass verschiedene Substrate den Metabolismus eines Bakterienstammes unterschiedlich beeinflussen. Da die Reaktionen der Bakterien auf diese Substrate nicht bekannt ist, muss mit Abweichungen und Variationen bei Wachstum, WE-Produktion und WE-Zusammensetzung gerechnet werden.

6.1.1 Einzelöle als C- und E-Quelle

Zur Untersuchung von bakteriellem Wachstum und WE-Produktion standen Rapsöl (RP), Maiskeimöl (MK), Sonnenblumenöl (SB), Olivenöl (OL) und Distelöl (DS) zur Auswahl. Hauptbestandteile der Pflanzenöle sind Fettsäuren (Tab. 6.1) als Bestandteil von Triacylglyceriden. Die Fettsäurezusammensetzungen der genannten Öle sind in der Literatur angegeben (Tab. 6.1). Nebenbestandteile, die in vergleichsweise geringen Mengen im Öl vorkommen, sind mit <10% Glycerin, Lipoide, Vitamine, Sterolester und Wasser. Qualität und Stabilität von Pflanzenölen werden durch die Nebenbestandteile des Öles beeinflusst.

Tab. 6.1:

Fettsäurezusammensetzungen der untersuchten Pflanzenöle Rapsöl (RP), Maiskeimöl (MK), Olivenöl (OL), Sonnenblumenöl (SB) und Distelöl (DS), angegeben in g Fettsäuren/100 g Öl; - = keine Angaben; FS = Fettsäuren; Quelle: www.sfk-online.net; 2008

Fettsäure	Zusammensetzung der Pflanzenöle (g FS/100 g)				
	RP	MK	OL	SB	DS
Hexadecansäure (C _{16:0})	4,64	10,90	10,80	6,15	6,35
Hexadecansäure (C _{16:1})	0,60	0,50	1,23	0,50	-
Octadecansäure (C _{18:0})	1,53	1,80	2,76	4,40	2,36
Octadecansäure (C _{18:1})	52,20	25,50	69,40	19,90	10,30
Octadecadiensäure (C _{18:2})	22,40	55,50	8,30	63,10	75,10
Octadecatriensäure (C _{18:3})	9,60	0,96	0,86	0,50	0,47
Eicosansäure (C _{20:0})	0,48	0,50	0,41	0,40	0,47
Eicosensäure (C _{20:1})	4,45	-	-	-	0,47
Cetoleinsäure (C _{22:1})	0,57	-	-	-	-
Tetracosansäure (C _{24:0})	0,60	-	-	-	-

Das Vorkommen von freien Fettsäuren und Wachsestern senkt die Qualität eines Öles als Lebensmittel. Olivenöl z. B. wird als minderwertig bezeichnet, wenn es eine hohe Konzentration an geradkettigen Wachsestern aufweist (Biedermann *et al.*, 2008). WE mit längeren Kohlenstoffketten verursachen bei niedrigeren Temperaturen eine Trübung des Öles, da sie einen höheren Schmelzpunkt besitzen und daher ausfallen (Martini & Añón, 2005).

Im Rahmen des Screenings wurden das Wachstum und die WE-Produktion von 20 Isolaten aus dem marinen Wattsediment bei Einsatz eines oder mehrerer Pflanzenöle als Substrat untersucht. Als Referenzstamm der eingesetzten Isolate diente *A. jadensis* T9^T, da er von Bredemeier *et al.* (2003b) als WE-Produzent beschrieben wurde. Der Stamm *A. borkumensis* produzierte unter den im Rahmen dieser Arbeit getesteten Bedingungen keine WE und wurde deshalb als „Negativkontrolle“ eingesetzt. Eine bei *A. borkumensis* nachgewiesene Produktion von extrazellulärer polymerer Matrix konnte bei *A. jadensis* T9 nicht eindeutig nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten).

Ansätze zur WE-Produktion mit Einzelöl als C- und E-Quelle stellten erste Richtungweisende Versuche dar. Produzierten die Isolate auf Rapsöl keine bzw. nur wenig WE, wurden sie, bis auf wenige Ausnahmen, nicht auf anderen Einzelölen oder Ölgemischen getestet. Fast alle Isolate, die mit RP als C-Quelle eindeutig WE produzierten (Tab. 6.2), wurden mit weiteren Ölen auf WE-Produktion getestet. Ausnahmen waren die Isolate Q9 und Q12, für die aus Zeitgründen diese Tests nicht durchgeführt wurden. Die meisten der untersuchten Isolate wuchsen auf Rapsöl und produzierten hierbei Wachsester.

Bei sieben der zwanzig Isolate (35%) wurde eine eindeutige Wachsester-Produktion nachgewiesen, während fünf weitere Isolate (25%) evtl. WE auf Rapsöl produzieren (Tab. 6.2). Maiskeim-, Sonnenblumen- und Olivenöl spielten als Substrat für die WE-Produktion eine untergeordnete Rolle, da die bakterielle WE-Produktion auf diesen Substraten zu gering war. Distelöl hat auf die WE-Produktion häufig eine eher hemmende Wirkung und wurde daher nicht weiter getestet (Gutsche, mündliche Mitteilung). Von den getesteten Isolaten stellten sich drei für weitere Versuche als besonders geeignet heraus. Es wurde gezeigt, dass der Referenzstamm *A. jadensis* T9^T und die Isolate S7 und Q4 auf mindestens vier der fünf eingesetzten Öle eindeutig WE produzierten (Tab. 6.2).

Tab. 6.2: Wachsester-Produktion ausgewählter Isolate bei 30°C und 100 rpm in Fermentermedium mit den Einzelölen Rapsöl (RP), Maiskeimöl (MK), Olivenöl (OL), Sonnenblumenöl (SB) oder Distelöl (DS, je 1% m/v) als C- und E-Quelle über 7 d kultiviert; ■ = eindeutige Wachsester-Produktion, □ = mögliche Wachsester-Produktion, - = keine Wachsester-Produktion, / = nicht getestet

Isolat	Einzelöle				
	RP	MK	OL	SB	DS
<i>A. jadensis</i> T9	■	■	■	■	■
<i>A. borkumensis</i>	-	-	-	-	-
K12	-	/	/	/	/
Q4	■	■	■	-	■
Q5	■	□	■	■	-
Q9	■	/	/	/	/
Q12	■	/	/	/	/
Q13	■	■	■	□	-
S7	■	■	■	■	□
T1	□	/	/	/	/
U2	□	/	/	/	/
W9	-	/	/	/	/
W13	-	□	-	/	/
W16	-	/	/	/	/
W17	□	-	-	/	/
W29	-	□	-	/	/
W33	□	/	/	/	/
W67	-	/	/	/	/
12.15.17	□	/	/	/	/
12.15.35 gr	-	/	/	/	/

A. jadensis T9, Isolat S7 und Isolat Q4 produzierten WE auf Rapsöl, Maiskeimöl, Olivenöl und Distelöl. *A. jadensis* T9 und Isolat S7 nutzten zusätzlich auch Sonnenblumenöl zur WE-Produktion (Tab. 6.2). Diese Drei konnten also die meisten der angebotenen Einzelöle als C- und E-Quelle nutzen. Darüber hinaus erzielten *A. jadensis* T9, Isolat S7 und Isolat Q4 auch die größten WE-Ausbeuten im Vergleich zu den anderen untersuchten Isolaten. Eine erste Kontrolle der WE-Produktion von *A. jadensis* T9 und den Isolaten S7 und Q4, kultiviert auf Rapsöl, erfolgte semiquantitativ über die DC-Analyse (Abb. 6.1).

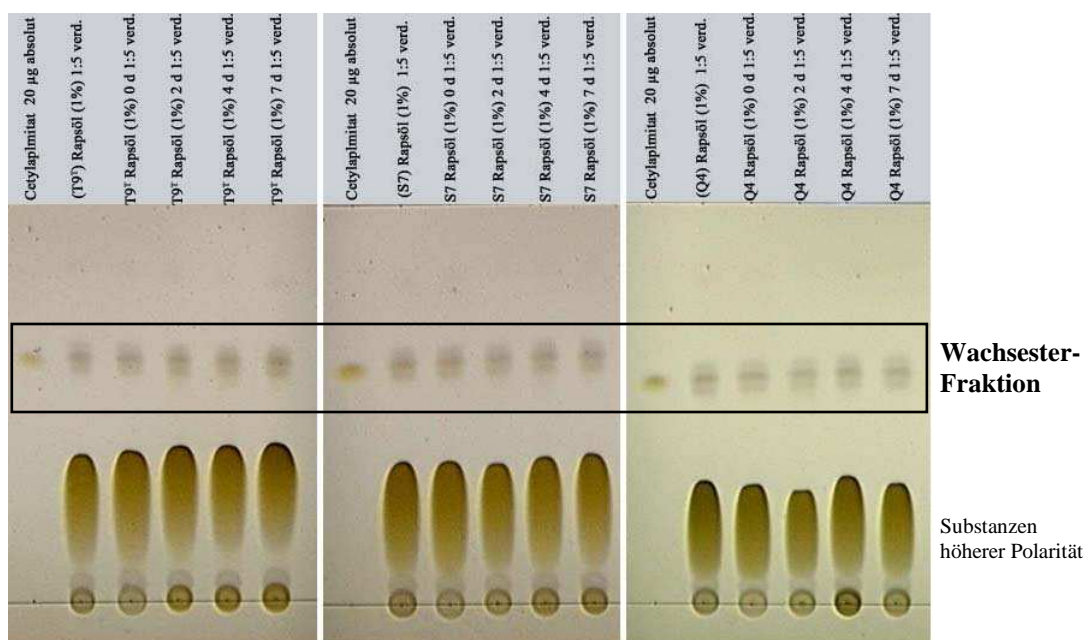


Abb. 6.1: Dünnschichtchromatogramm von Lipidfraktionen aus Kulturen von *A. jadenis* T9, Isolat S7 und Isolat Q4 gewachsen in Fermentermedium mit Rapsöl (1% m/v), entnommen zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten; jeweils von links: Cetylpalmitat-Standard [20 µg absolut]; kurz vor dem Beimpfen; Tag 0 direkt nach dem Beimpfen; Tag 2, 4 und 7 der Kultivierung; die Proben wurden 1:5 in Ethylacetat verdünnt aufgetragen

Die Spotintensität in Höhe der Wachsester wurde allerdings durch Substanzen im Öl, wie z. B. Sterolester, beeinflusst (4.4.3.1). Die enthaltenen Sterolester fördern zusätzlich die Qualität des Rapsöles als Kosmetikzusatz, da das menschliche Sebum von sich her bereits Sterolester enthält (6.2). Die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme war trotz der Interferenzen zwischen Estern aus dem Öl und bakteriell produzierten Wachsestern möglich. Für den Nachweis bakteriell produzierter Wachsester wurden in Höhe der Wachsester-Fractionen Spots von abiotischen Ansätzen mit Rapsöl (ohne bakteriell produzierte Wachsester = Blindwerte) und Proben mit bakteriell produzierten Wachsestern verglichen. Zunehmende Spotgrößen und steigende Spotintensitäten ermöglichten den eindeutigen Nachweis bakteriell produzierter WE.

Da es nicht möglich war die erlangten WE-Ausbeuten mit ausreichender Genauigkeit über die DC zu bestimmen, wurden ergänzend gaschromatographische Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse der Gaschromatographie zeigten, dass *A. jadenensis* T9 und die Isolate S7 und Q4 Wachsester in gut nachweisbaren Mengen auf Rapsöl produzierten. Die Kettenlängen der WE lagen im Bereich von C₃₂-C₃₈.

Um eine nahe Verwandtschaft von *A. jadenensis* T9 und den geeigneten Isolaten S7 und Q4 auszuschließen, wurde ihre DNA isoliert und sequenziert (ca. 1500 bp) um sie anschließend taxonomisch einzuordnen (4.2). Die Ergebnisse zeigten, dass Isolat S7 (99,7% *A. jadenensis*) und Isolat Q4 (99,8% *A. jadenensis*) nahe verwandt sind mit dem Referenzstamm *A. jadenensis* T9^T.

Da die bakterielle WE-Produktion nicht ausschließlich vom Produktionsstamm und vom Substrat abhängt, wurden erweiternde Untersuchungen gemacht. Es wurde verglichen, ob ein Bezug zwischen bestimmten Kultivierungsbedingungen (Wachstum oder pH-Wert) und der WE-Produktion besteht. Eine Relation zwischen Wachstum oder pH-Wert und WE-Produktion wurde nicht nachgewiesen. Die optische Auswertung des Wachstums zeigte jedoch, dass höhere Konzentrationen an Wachsestern nur bei gutem Wachstum (deutliche Kulturtrübung) nachweisbar sind. Eine Verfolgung des pH-Verlaufes zeigte, dass der pH-Wert von ca. 7,7 zu Kulturbeginn bei allen drei Isolaten während der Kultivierung auf Pflanzenöl auf 4,5-5,0 sank.

6.1.2 Ölgemisch aus Pflanzenölen als C- und E-Quelle

Es wurden 42 Bakterienisolate (Abb. 6.2) auf ihre Fähigkeit hin, WE auf einem standardisierten Ölgemisch zu produzieren, untersucht. Als Substrat diente ein Gemisch der vorher getesteten Öle Rapsöl, Maiskeimöl, Sonnenblumenöl, Olivenöl und Distelöl (6.1.1). Die Kultivierung auf Ölgemisch anstatt der Einzelöle erfolgte, um Arbeitsaufwand und Arbeitszeit zu reduzieren. Von den 42 getesteten Isolaten produzierten neun Isolate (21%) deutliche Mengen Wachsester (Abb. 6.2), was mittels DC anhand der Spotintensität nachweisbar war. Interferenzen durch bereits in den Ölen enthaltene WE konnten hierbei ebenfalls durch den Vergleich mit „Blindwerten“ ausgeschlossen werden (6.1.1).

Bei sieben Isolaten (17%) wurde eine nur schwache WE-Produktion gezeigt, da die Spotintensität in Höhe des WE-Standards nicht eindeutig auswertbar war. Für 26 Isolate (62%) wurde keine WE-Produktion nachgewiesen.

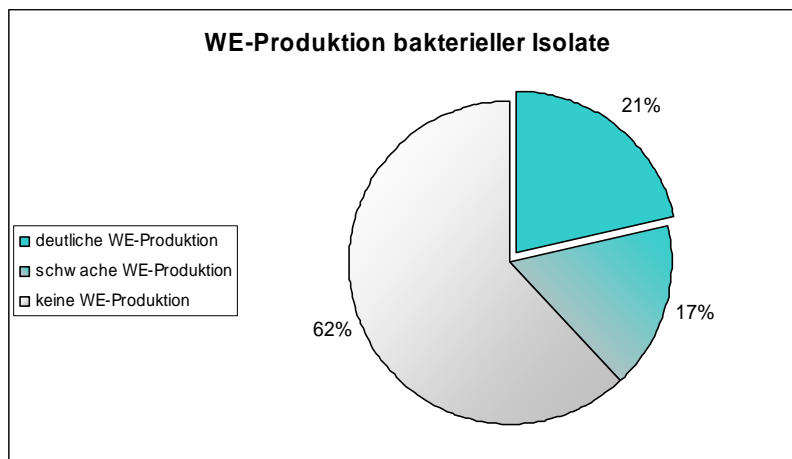


Abb. 6.2: Einordnung von 42 Isolaten hinsichtlich ihrer Wachsester (WE)-Produktion in Prozent; die Isolate wurden kultiviert auf Ölgemisch (1% m/v) in Fermentermedium bei 30°C und 100 rpm über einen Zeitraum von 7 d

6.1.3 Auswahl eines geeigneten Pflanzenöles als Substrat

Aufgrund der regionalen Verfügbarkeit wurde RP als geeignetes Pflanzenöl-Substrat für eine bakterielle Anreicherung mit WE ausgewählt. Da durch den Einsatz von Gentechnik inzwischen Rapsöle bestimmter Fettsäurezusammensetzung und damit zusammenhängend bestimmten Eigenschaften gewonnen werden können (Biermann *et al.*, 2000), besteht potentiell die Möglichkeit, gezielt RP mit festgelegten Eigenschaften einzusetzen. Rapsöl enthält viele einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, was bei einer Verwendung für die WE-Synthese zu niedrigeren Schmelztemperaturen der WE führt. Außerdem bietet das Rapsöl durch sein im Vergleich zu den anderen getesteten Ölen breiteres Spektrum an Fettsäuren (Tab. 6.1) mehr Möglichkeiten für den bakteriellen Metabolismus. Dazu kommt, dass auf dem RP eine Vielzahl der getesteten Isolate WE produzierte (Tab. 6.2).

6.1.3.1 Qualität und Stabilität des Rapsöles

Wichtig für die Nutzung eines Pflanzenöles als Substrat ist eine gleichbleibende Zusammensetzung verschiedener Ölchargen sowie deren Stabilität unter den gewählten Inkubationsbedingungen. Um einheitliche Bedingungen innerhalb der Kultivierungen mit Ölen zu gewährleisten, muss sichergestellt werden, dass die Inkubationsbedingungen im abiotischen Ansatz keine chemischen bzw. physikalischen Veränderungen des Öles hervorrufen. Eine weitere Voraussetzung für die Eignung eines Öles ist, dass der Anteil an Sterolestern konstant und damit abschätzbar ist, da diese in dünnschichtchromatographischen Kontroll-Analysen mit den bakteriell produzierten WE interferieren.

In einem abiotischen Kontrollansatz wurde Fermentermedium mit Rapsöl über 7 d inkubiert (4.1.1), um den Einfluss der Inkubationsbedingungen auf das Öl zu untersuchen. Eine erste Auswertung erfolgte über Dünnschichtchromatographie (4.4.3). Rapsöl enthält natürlicherweise geringe Mengen an Sterolestern. Die Spotintensität in Höhe der WE-Fractionen auf der DC-Platte blieb jedoch an den Tagen 0, 2, 4 und 7 der Inkubation unverändert. Durch die anschließende GC-Analytik dieser WE-Fractionen (4.4.4) wurde dieses Ergebnis bestätigt (Abb. 6.3).

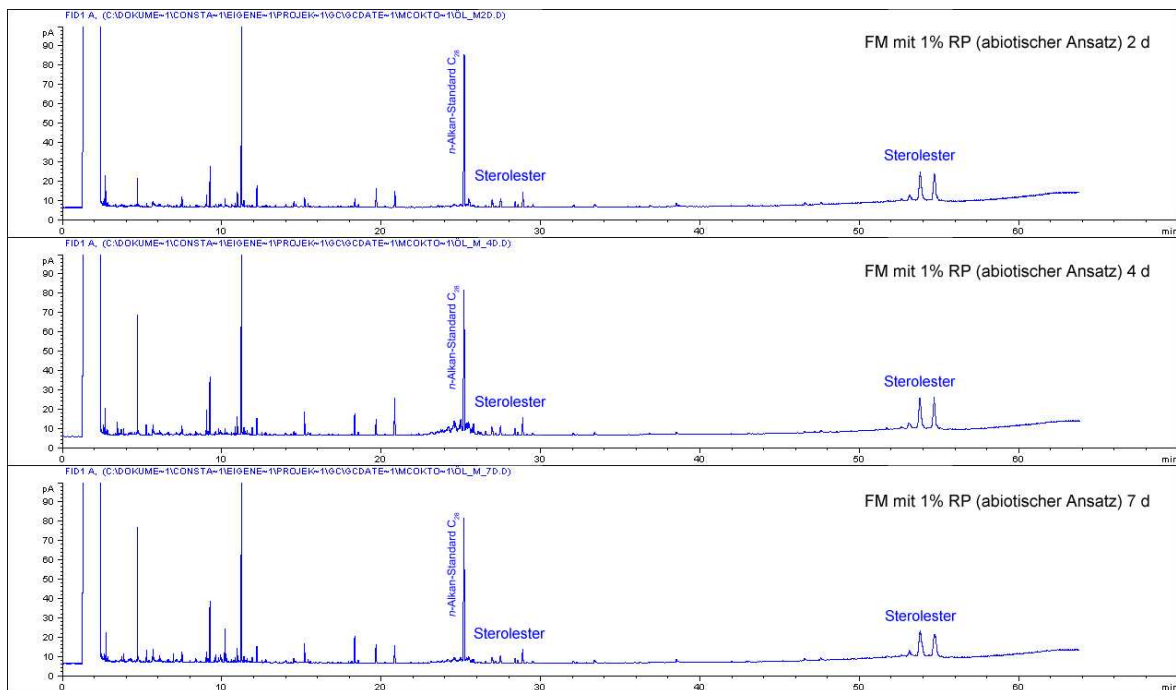


Abb. 6.3: Gaschromatogramme der Esterfraktionen aus einem abiotischem Ansatz von Fermentermedium (FM) mit Rapsöl (1% m/v), entnommen nach 2, 4 und 7 d Kultivierung; als Standard diente das C₂₈ *n*-Alkan [10µg/µl]

Die Inkubation des Öles unter Kulturbedingungen über einen Zeitraum von mehreren Tagen führt somit zu keiner Substratveränderung.

Zur Bestimmung der Zusammensetzung unterschiedlicher Chargen des Rapsöles wurden in je drei Parallelen vier unterschiedliche Chargen Rapsöl (gleicher Hersteller) untersucht. Anhand der DC war zu erkennen, dass die Spotintensitäten sowohl in Höhe der Wachsester-Fractionen als auch bei den polareren Substanzen überwiegend auf ähnliche Konzentrationen in den einzelnen Chargen hinweisen (Abb. 6.4).

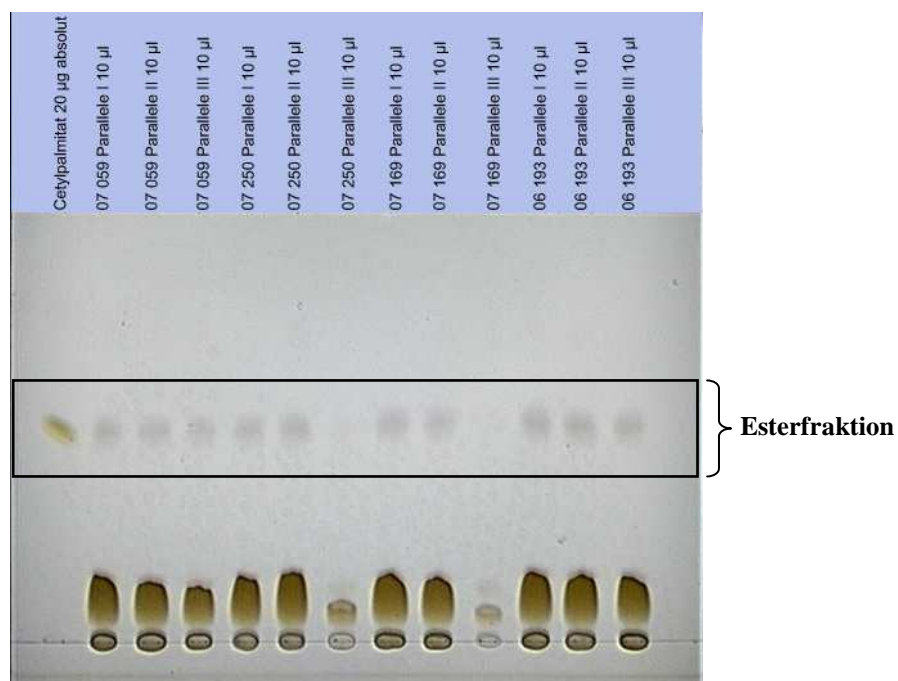


Abb. 6.4: Dünnschichtchromatogramm des organischen Extraktes aus Fermentermedium (FM) mit jeweils (1% m/v) verschiedener Chargen Rapsöl (RP); von links: Cetylpalmitatstandard [20 µg absolut], FM mit 1% RP (Charge 07 059)-Parallele I, II und III, FM mit 1% RP (Charge 07 250)-Parallele I, II und III, FM mit 1% RP (Charge 07 016)-Parallele I, II und III sowie FM mit 1% RP (Charge 06 193)-Parallele I, II und III

Bei den polareren Substanzen handelt es sich um Triacylglyceride, Fettsäuren, Diacylglyceride und Monoacylglyceride, die, wie von Kalscheuer *et al.* (2007) beschrieben, als Spot unterhalb der WE (kürzere Laufstrecke) erkennbar sind. Mittels GC-Analytik wurde gezeigt, dass sich Qualität und Quantität der im Rapsöl vorhandenen Sterolester innerhalb der untersuchten Ölchargen nicht unterscheiden. Lediglich bei zwei Chargen war in je einer Parallele eine Abweichung zu erkennen.

Da in diesen Fällen die Spotintensitäten in Höhe des WE-Standards und in Höhe der polarerer Substanzen geringer waren als bei den vergleichbaren Proben, ist nicht auszuschließen, dass dies auf einen Verlust während der Aufarbeitung zurückzuführen ist. Innerhalb unterschiedlicher Ölchargen des gleichen Herstellers wurden keine Veränderungen der Zusammensetzung festgestellt. Es ist daher davon auszugehen, dass eventuelle Variationen im bakteriellen Wachstum einzelner Kulturansätze und deren Wachsester-Produktion nicht durch Veränderungen des Substrates bedingt sind. Damit ist Rapsöl zum Einsatz als einzige C- und E-Quelle geeignet.

6.1.4 Bestimmung eines geeigneten Produktionsstammes

Neben den drei Isolaten, die auf Einzelölen WE produzieren (6.1.1), wurden bei dem Einsatz des Ölgemisches (6.1.2) neun weitere Isolate gefunden, die für den Einsatz als Produktionsstamm potentiell geeignet wären. Es wurden aber keine weiterführenden Versuche hinsichtlich ihrer WE-Produktion durchgeführt, sondern der Referenzstamm *A. jadensis* T9^T als Produktionsstamm bestimmt. Ausschlaggebend hierfür war, dass der von Bruns & Berthe-Corti (1999) als *Fundibacter jadensis* T9 beschriebene Stamm seit seiner Beschreibung in der Arbeitsgruppe etabliert und gut kultivierbar ist. Des weiteren ist bekannt, dass *Alcanivorax. jadensis* T9 auf *n*-Hexadecan Wachsester produziert (Bredemeier *et al.*, 2003a). Zudem zeigten eigene Untersuchungen (6.1.1), dass der Stamm T9 gut auf Rapsöl wächst und WE produziert (Tab. 6.2).

6.1.5 Reproduzierbarkeit der Wachsester-Produktion von *A. jadensis* T9

Grundlage für Versuche zur bakteriellen Produktion eines Sekundärproduktes (WE) auf Basis eines unkonventionellen Substrates ist sowohl die Reproduzierbarkeit der Kultivierung des Produktionsstammes als auch die der Produktbildung. Da der Referenzstamm *A. jadensis* T9^T für den Einsatz in weiterführenden Versuchen bestimmt wurde, wurde die Reproduzierbarkeit der Kultivierung des Stammes T9 und die damit verbundene WE-Produktion auf einem bereits bekannten Substrat (Rapsöl) untersucht. Hierfür wurden drei unabhängige Kulturansätze des Stammes T9 in Fermentermedium mit RP angesetzt und bei gleichen Kultivierungsbedingungen (4.1.1) über 7 d inkubiert.

Das Wachstum wurde optisch anhand der Trübung verfolgt. Zur Auswertung der WE-Produktion wurden DC- und GC-Analytik verwandt, wobei quantitative Aussagen über die GC-Analyse erfolgten. Der Vergleich der Gaschromatogramme (Abb. 6.5) zeigt, dass eine gute Reproduzierbarkeit der WE-Produktion des Referenzstammes mit Rapsöl als Substrat zu erreichen ist.

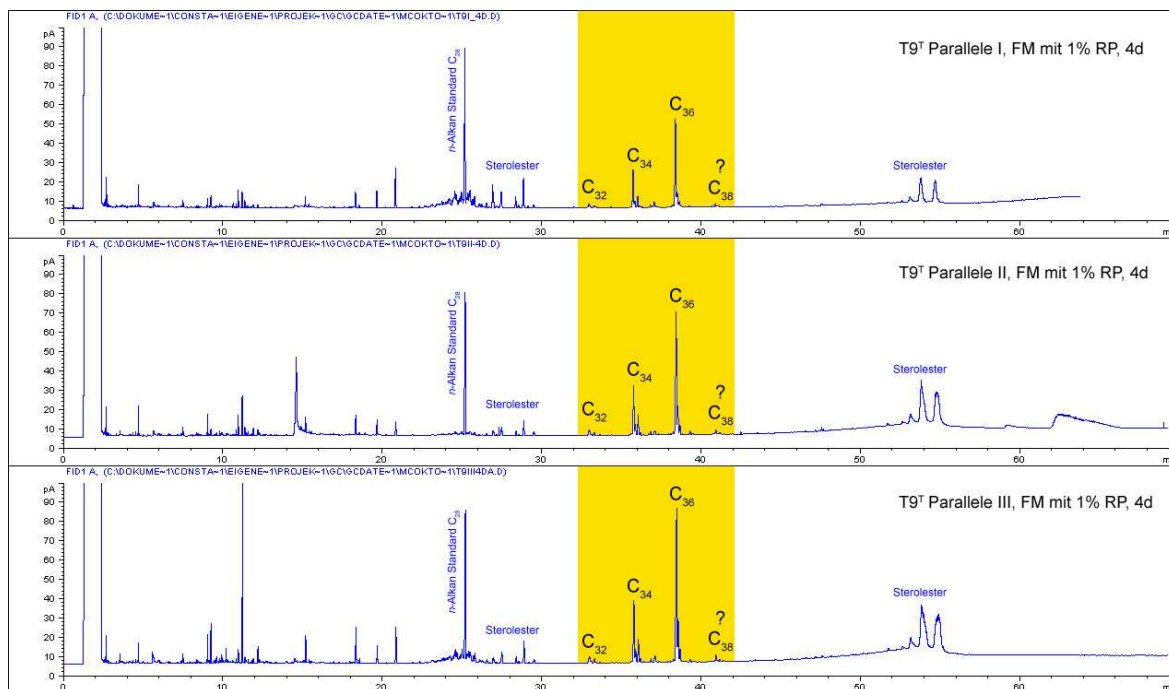


Abb. 6.5:

Gaschromatogramme der Wachsester-Fractionen aus drei unabhängigen Kulturen von *A. jadensis* T9 auf Fermentermedium mit Rapsöl (1% m/v), entnommen nach 4 d Kultivierung; die Peaks innerhalb der markierten Bereiche zeigen die bakteriell produzierten Wachsester mit Kettenlängen von C₃₂-C₃₈; ? = Retentionszeit deutet auf C₃₈ hin, konnte in der GC/MS aber nicht eindeutig anhand eines Moleküls zugeordnet werden; als Standard diente das C₂₈ n-Alkan [10µg/µl]

Alcanivorax jadensis T9 produziert auf Rapsöl hauptsächlich einfach und zweifach ungesättigte WE, deren Kettenlängen zwischen C₃₂ und C₃₈ liegen (Abb. 6.5). Octadecenyl-Octadecenoat macht hierbei ca. 60% der gesamt produzierten WE aus (Tab. 6.3). Die überwiegende Produktion von Octadecenyl-Octadecenoat und die Tatsache, dass das RP zu 52,2% Octadecensäure enthält (Tab. 6.1), lassen darauf schließen, dass der Stamm T9 die Octadecensäure aus dem Öl aufnimmt und zum Teil zum korrespondierenden Alkohol (Octadecenol) reduziert. Im Anschluss werden Fettsäuren und korrespondierende Alkohole direkt in die WE-Synthese eingeschleust. Auch die Tatsache, dass nahezu alle auf RP produzierten WE Octadecensäure als FS-Komponente enthalten (Tab. 6.3), lässt Rückschlüsse zu, dass die im RP hauptsächlich vorkommende Octadecensäure direkt für die WE-Synthese verwendet wird.

Die auf Rapsöl produzierten WE enthalten auch Alkoholkomponenten mit weniger als 18 C-Atomen (Tab. 6.3), deren Kettenlängen kürzer sind als die Kettenlängen aller im Öl enthaltenen Fettsäuren. D. h. in der Zelle finden auch Kettenverkürzungen des Substrates statt, bevor das Substrat für die WE-Synthese verwendet wird.

Tab. 6.3:

Wachsester-Produktion von *A. jadenis* T9 in einer Kultur mit Rapsöl (1% m/v) als C- und E-Quelle, mit Angaben zu produzierten Wachsestern: C-Kettenlänge, Sättigungsgrad und WE-Konzentration (in Prozent der gesamt produzierten WE); n. b. = nicht bestimmbar; * = Zusammensetzung nicht eindeutig bestimmbar

C + E-Quelle (1% m/v)	produzierte Wachsester (WE)		
	C-Zahl	Zusammensetzung	Prozent [%]
Rapsöl (RP)	C _{32:1}	Tetradecanyl-Octadecenoat* (18OOH:1-14OH)	n. b.
	C _{32:2}	Tetradecenyl-Octadecenoat* (18OOH:1-14OH:1)	n. b.
	C _{34:1}	Hexadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-16OH)	10,4
	C _{34:2}	Hexadecenyl-Octadecenoat* (18OOH:1-16OH:1)	29,5
	C _{36:2}	Octadecenyl-Octadecenoat (18OOH:1-18OH:1)	60,1
	C _{38:2}	n. b.	n. b.

Es besteht ebenfalls die Annahme, dass der Stamm T9 WE mit Kettenlängen von 38 C-Atomen auf dem RP produziert (Abb. 6.5), dies kann aber lediglich anhand der Retentionszeit in der Gaschromatographie und kleiner Fragmentbruchstücke in der GC/MS angenommen werden. Dem WE können weder ein Moleküllion noch charakteristische Fragmente für die Bestimmung der Zusammensetzung in der GC/MS zugeordnet werden.

6.1.6 Anlagerungsmechanismen der Isolate an Pflanzenöl

Die Verwendung apolarer Substrate hängt stark davon ab, in welcher Form sie für die Zellen bioverfügbar sind. Daher wurden in Zusammenarbeit mit A. Gutsche TEM-Untersuchungen durchgeführt, um die Verwendung von Pflanzenöl als Substrat für Bakterien und die Anlagerung der Zellen an das Substrat optisch nachzuvollziehen. Getestet wurden Kulturen der Isolate S7 und S1 sowie *A. jadensis* T9. Die TEM-Aufnahmen lassen auf Unterschiede in den Anlagerungsmechanismen der Bakterien an das Pflanzenöl schließen. Zu erkennen ist eine seitliche Anlagerung des Isolates S7 an die Oberfläche des Öltropfens (Abb. 6.6; A) und ein Einlagern in den Öltropfen bei Isolat S1 (Abb. 6.6; B). Die unterschiedlichen Anlagerungsmechanismen deuten auf verschiedene Mechanismen der Isolate hin, sich das Pflanzenöl als Substrat bioverfügbar zu machen.

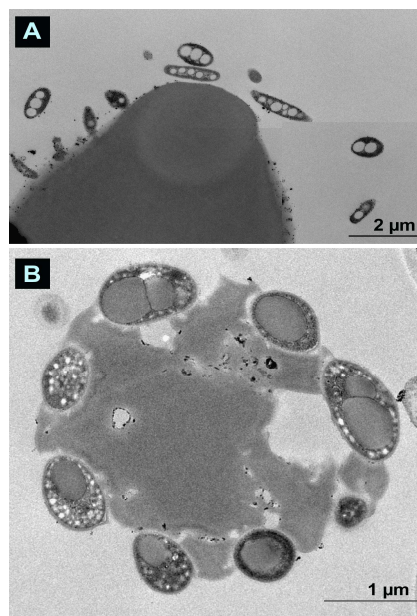


Abb. 6.6:

TEM-Aufnahmen von Zellen der Isolate S7 (A) und S1 (B) angelagert an Öltropfen (Jenschke *et al.*, 2008)

Abbildung 6.7 zeigt im Vergleich die elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kultur des Stammes T9, der über 4 d auf Rapsöl gewachsen ist. Hier ist, wie bei Isolat S7, eine seitliche Anlagerung an die Tropfenoberfläche zu erkennen. Die TEM-Aufnahmen lassen außerdem erkennen, dass Zelleinschlüsse einen großen Anteil der Zelle ausmachen können. Bisher ist nicht genau bekannt, ob die Produktion von Lipideinschlüssen der Speicherung oder der Entsorgung hoher intrazellulärer Konzentrationen des Substrates dient.

Die Möglichkeit, dass *A. jadensis* T9 Wachsester produziert, um überschüssiges Substrat zu beseitigen, wird ebenfalls von Manilla-Pérez *et al.* (2010) beschrieben, die in Abhängigkeit vom Substrat die Produktion von sowohl intrazellulären als auch extrazellulären Wachsester-Einschlüssen bei *A. jadensis* T9 nachwiesen. Der Transportmechanismus der WE-Einschlüsse aus der Zelle heraus ist hierbei noch unbekannt. Anhand der in dieser Arbeit gezeigten TEM-Aufnahmen konnte nicht gezeigt werden, ob der Stamm T9 neben den intrazellulären WE-Einschlüssen (vermutlich Reservestoffspeicherung) zusätzlich extrazelluläre WE-Einschlüsse (angenommene Ausscheidung überschüssigen Substrates) produziert.

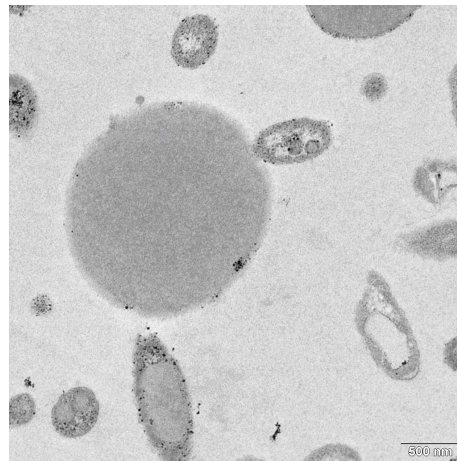


Abb. 6.7:

TEM-Aufnahme einer Kultur von *A. jadensis* T9 in Fermentermedium (FM) mit Rapsöl (1% m/v) nach 4 d Kulturzeit

Inhalte von Zelleinschlüssen lassen sich optisch innerhalb der einzelnen Bakterienzellen differenzieren. Bei Isolat S7 (Abb. 6.6; A) sind große runde helle Einschlüsse zu beobachten, was auf Wachsester (Wältermann & Steinbüchel, 2005) oder aber Polyhydroxyalkanoate (Alvarez *et al.*, 1997) hindeutet, die durchlässiger für Elektronen sind als Triacylglyceride (TAG). Graue Einschlüsse, wie in Zellen von Isolat S1 (Abb. 6.6; B), deuten auf die Einlagerung von Triacylglyceriden (TAG) in den Zellen hin. Bei *A. jadensis* T9 sind Zelleinschlüsse mit unterschiedlicher Elektronendichte zu erkennen (Abb. 6.8). Es lassen sich sowohl Einschlüsse, die auf WE, als auch solche, die auf TAG hindeuten, erkennen, was bedeutet, dass der Stamm T9 innerhalb einer Kultivierung auf Rapsöl Zelleinschlüsse unterschiedlichen Inhaltes (WE oder TAG) produziert.

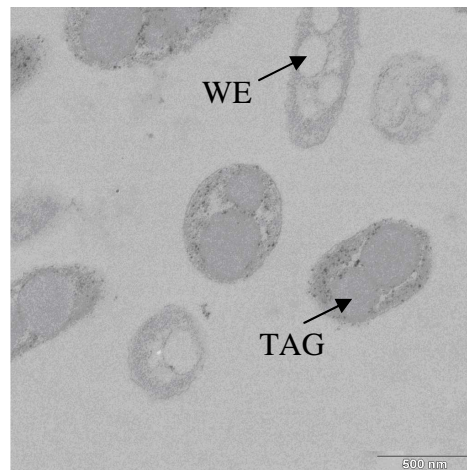


Abb. 6.8:

TEM-Aufnahme der Zellen von *A. jadensis* T9 gewachsen auf Rapsöl (1% m/v) mit Zelleinschlüssen unterschiedlicher Elektronendichte; (WE = Wachsester; TAG = Triacylglyceride)

Die Bildung von Wachsestern und Triacylglyceriden wurde ebenfalls bei der Kultivierung von *Alcanivorax borkumensis* SK 2 und *Alcanivorax jadensis* T9 mit Hexadecan beschrieben (Manilla-Pérez *et al.*, 2010).

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche ist eine der wichtigsten Eigenschaften im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit die Löslichkeit der Substrate im wässrigen Medium. Substrate mit hoher Löslichkeit sind im Medium gut verteilt, was den Zellen durchgängig Kontakt zum Substrat ermöglicht. Apolare Substrate mit geringerer Löslichkeit bilden Bereiche, wie z. B. Tropfen, in denen sie sich akkumulieren, und sind deshalb nur in diesen Bereichen in ausreichender Menge für die Bakterien vorhanden. Ist das Substrat ungleich im Medium verteilt, wäre ein Mechanismus, der es den Zellen ermöglicht auf Konzentrationsunterschiede des Substrates im Medium zu reagieren (Chemotaxis), von Vorteil.

Die Aufnahme der Substrate ist letztendlich davon abhängig, ob das Substrat per Diffusion in die Zelle gelangen kann oder spezifische Aufnahmemechanismen diesen Vorgang regulieren. Der Begriff Bioverfügbarkeit beschreibt also den Ablauf verschiedenster Prozesse, die voneinander abhängig sind, um den Bakterien eine möglichst effektive Substratnutzung zu ermöglichen. Das Wachstum der Zellen hängt davon ab, über welche Mechanismen die Zellen verfügen, das Substrat im Medium zu erreichen, es zu binden und aufnahmefähig zu machen sowie es aufzunehmen.

Die Bioverfügbarkeit apolarer Substrate kann durch die bakterielle Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) bzw. Grenzflächen-aktiven Substanzen (z. B. Biotenside) erhöht werden. Ähnlich wie die bakterielle Produktion von WE (Wältermann & Steinbüchel, 2005) ist die bakterielle Produktion von EPS nicht nur abhängig vom jeweiligen Organismus, sondern auch von den Nährstoffbedingungen (Flemming & Wingender, 2002). Die EPS-Produktion scheint eine Antwort der Zellen auf Stress zu sein, wie z. B. Stickstoff- oder Phosphat-Limitierung. Genau wie die WE-Zusammensetzung (6.3.2.1) ist die Zusammensetzung der EPS abhängig vom Substratangebot (Flemming & Wingender, 2010). Die Autoren beschreiben für die EPS unterschiedliche biologische Funktionen. Sie ermöglichen die Bildung von Flocken und Biofilmen (dienen der Immobilisierung von Zellen und höherer Zelldichte), fungieren als Schutzbarriere (z. B. vor Bioziden), ermöglichen die Rückhaltung von Wasser (Schutz vor Austrocknung) und erleichtern die Adhäsion an Oberflächen (Bildung von Primärbiofilmen und Mikrokolonien).

Die Bioverfügbarkeit wird daher u. a. darüber bestimmt, ob und wie gut die Zellen an das Substrat binden können (z. B. über Adhäsion) oder in der Lage sind, Biotenside zu produzieren und auszuscheiden. Biotenside erleichtern die Anheftung der Zellen an das Substrat, indem sie die Grenzflächenspannung herabsetzen und somit für eine bessere Emulgierbarkeit des Substrates im Medium sorgen. Biotenside können apolare Substanzen wie Kohlenwasserstoffe dispergieren (Martienssen *et al.*, 2003). Die dabei entstehenden Micellen lagern sich an der Bakterienoberfläche an und die in ihnen vorhandenen Kohlenwasserstoffe werden entweder durch Enzyme an der Zelloberfläche oxidiert, oder der Inhalt der Micelle wird von der Bakterienzelle aufgenommen und anschließend metabolisiert.

Man unterteilt Grenzflächen-aktive Substanzen biologischen Ursprungs - zu denen u. a. die Biotenside zählen - in niedermolekulare Substanzen, die die Grenz- und Oberflächenspannung herabsetzen, oder hochmolekulare Substanzen, die an Oberflächen binden (Ron & Rosenberg, 2001). Grenzflächen-aktive Substanzen biologischen Ursprungs sind nicht toxisch und bioabbaubar (Flemming & Wingender, 2010). Neben Funktionen wie dem Herabsetzen der Oberflächenspannung und der Stabilisierung von Emulsionen (Flemming & Wingender, 2010) erfüllen sie weitere Funktionen, wie z. B. die Oberflächenvergrößerung von in Wasser unlöslichen Substraten (Ron & Rosenberg, 2001). Die Phasengrenze zwischen Wasser und Öl beispielsweise stellt potentiell einen limitierenden Faktor für die Wachstumsrate von Bakterien dar.

Limitierend deshalb, weil Bakterien lediglich an der Phasengrenze in der Lage sind, das Substrat als C- und E-Quelle zu nutzen. Die vorher bereits erwähnte Oberflächenvergrößerung an der Phasengrenze führt zur erhöhten Verfügbarkeit des Substrates für die Bakterien.

Die Adsorption hydrophober Substrate an verschiedenste Oberflächen bedingt oftmals eine geringere Substratverfügbarkeit in der Kulturbrühe. Oberflächen-aktive Moleküle erhöhen die Verfügbarkeit der Substrate, indem sie deren Adsorptionsfähigkeit deutlich herabsetzen (Ron & Rosenberg, 2001). Hinzu kommt, dass Bakterien in der Lage sind, über die bakteriell produzierten Oberflächen-aktiven Substanzen die Bindung bzw. Ablösung der Zellen von Substraten zu regulieren. Hierbei wird der Grad der Hydrophobizität von Zelloberflächen erhöht bzw. verringert. Weiterhin wird für die beschriebenen Substanzen eine Rolle bei der Biofilmbildung durch Übertragung auf andere Organismen und Veränderung deren Zelloberflächen diskutiert (Ron & Rosenberg, 2001). Genetische Analysen des Organismus *Alcanivorax borkumensis* SK 2 z. B. zeigten die Fähigkeit des Stammes zur Produktion von Oberflächen-aktiven Substanzen und Biofilmbildung (Schneiker *et al.*, 2006). Der Stamm ist in der Lage, sich an Öl-Wasser-Phasengrenzen von Kohlenwasserstoffen in Salzwasser anzulagern. Dabei bildet der Stamm SK 2 stabile Emulsionen der Kohlenwasserstoffe mit dem Wasser. Die Oberflächen-aktiven Substanzen erleichtern es dem Stamm, Alkane zu emulgieren, und erhöhen deshalb die Bioverfügbarkeit der Alkane. Im Genom von *Alcanivorax borkumensis* SK 2 wurden entscheidende Gensequenzen für Proteine nachgewiesen, welche an Biosynthese, Ausscheidung, Modifikation und Polymerisation von Exopolysacchariden beteiligt sind. Diese Exopolysaccharide sind an der Bildung von Biofilmen beteiligt (Schneiker *et al.*, 2006).

Martins dos Santos *et al.* (2010) beschreiben, dass der Stamm SK 2 Glucose-Lipide als Oberflächen-aktive Substanzen für die Bildung von stabilen Emulsionen von Kohlenwasserstoffen im Wasser produziert, wodurch die Abbaurate dieser hydrophoben organischen Substanzen erhöht wird. Die Autoren beschreiben, dass die Glucose-Lipide in zwei Formen auftreten, (i) als Vorläufer der Grenzflächen-aktiven Substanz, der Glycin enthält und an die Zelloberfläche gebunden ist, wodurch die Hydrophobizität der Zellen und ihre Affinität zu Substrattropfen (die im Wasser verteilt sind) erhöht wird, und (ii) als fertiges Lipid, das von der Zelle ins Medium abgegeben wird und hier die Bildung von Micellen mit wasserunlöslichen Fraktionen und somit eine höhere Verfügbarkeit des Substrates ermöglicht.

6.1.7 Fazit (Screening)

Die Verwendung von Rapsöl bietet gleich zwei Vorteile. Neben der Funktion als Substrat dient es gleichzeitig als Anreicherungsmedium für die bakteriell produzierten WE. Rapsöl ist hierbei das Substrat, auf dem die meisten im Screening getesteten Bakterienstämme in der Lage waren, zu wachsen und WE zu produzieren. Von den insgesamt fünf getesteten Pflanzenölen verfügt das Rapsöl zudem über das breiteste FS-Spektrum, das innerhalb einer Kultivierung gleichzeitig das Substratspektrum ist. Ein breiteres Substratspektrum erweitert die Möglichkeiten der bakteriellen WE-Produktion eines Kulturansatzes. Das Rapsöl enthält Fettsäuren mit Kettenlängen von C₁₆-C₂₄, die als Bestandteile von Triacylglyceriden vorliegen. Die hauptsächlich enthaltenen FS sind einfach bzw. mehrfach ungesättigte FS mit Kettenlängen von 18 C-Atomen.

Aus 55 einem Screening unterworfenen Isolaten wurde *A. jadensis* T9 als optimaler Produktionsstamm ausgewählt. Der Stamm T9 zeigte in der vorliegenden Arbeit gutes Wachstum auf Rapsöl und eine eindeutig nachweisbare WE-Produktion (6.1.1). Zusätzlich liegen umfangreiche Kenntnisse über das Wachstumsverhalten des Stammes vor, und er ist als guter WE-Produzent bekannt. Erweiternd liefern TEM-Aufnahmen Hinweise auf unterschiedliche Anlagerungsmechanismen von Bakterien an Öltröpfen im Medium (6.1.6). In zwei Fällen erfolgte die Anlagerung an das Substrat seitlich (*A. jadensis* T9 und Isolat S7). Im Fall des Isolates S1 dagegen dringen die Zellen in den Substrattropfen ein (Isolat S1), was zu einer größeren Kontaktzone führt.

A. jadensis T9 produziert mit Rapsöl als einziger C- und E-Quelle WE mit Kettenlängen von 32-36 C-Atomen. Sowohl die C-Kettenlänge als auch der Retentionsbereich dieser WE stimmen mit den aus dem menschlichen Sebum isolierten Wachsestern überein (6.3.2). Es ist daher davon auszugehen, dass die bakteriell produzierten WE ähnliche Eigenschaften (z. B. im Schmelzpunkt) wie die WE des menschlichen Sebums besitzen. Es wäre somit von Vorteil, potentielle Rohstoffe (in diesem Fall RP) für den möglichen Einsatz in Kosmetika mit diesen bakteriell produzierten Wachsestern anzureichern, anstatt wie bisher Naturstoffe wie z. B. Bienenwachs zu verwenden, deren WE mit Kettenlängen von C₄₀-C₅₂ (6.3.1) sich deutlich von denen des menschlichen Sebums unterscheiden. Es kann erwartet werden, dass der Einsatz bakterieller WE durch ihre hohe Ähnlichkeit zu den Wachsestern des menschlichen Sebums die Funktion des Hautschutzes von Kosmetika besser unterstützt.

6.2 Wachsester aus menschlichem Sebum

Die Lipidzusammensetzung des menschlichen Sebums (von der Hautoberfläche) umfasst Fettsäuren (47%), Wachsester (17%), Ceramide (13%), Squalen (11%), Cholesterin (7%), Triglyceride (3%) und Cholesterinester (2%) (Wille & Kydonieus, 2003).

Durch die heutige Lebensweise der Menschen wie z. B. den vermehrten Aufenthalt in geschlossenen Räumen oder die häufige Verwendung von Detergenzien (Duschgel oder Seife) ist davon auszugehen, dass der Sebummantel der Haut immer stärker strapaziert wird. Die Entwicklung von Hautpflegeprodukten zur effektiven Unterstützung des Hautschutzes gewinnt hierdurch immer mehr an Bedeutung. Um einen Rohstoff mit gezielter Zusammensetzung (ähnlich der Zusammensetzung des menschlichen Sebums) und bestimmten Eigenschaften (wie z. B. Hautschutz) für die Herstellung von Hautpflegeprodukten (Abb. 1.1) produzieren zu können, ist es wichtig, die Zusammensetzung des Sebums zu kennen, wobei für die vorliegenden Untersuchungen die WE-Fraktion und ihre genaue Zusammensetzung von vorrangigem Interesse sind.

6.2.1 Qualitative Bestimmung der Wachsester des menschlichen Sebums

Fünf Probanden unterschiedlichen Geschlechts und Alters wurde im Bereich der mittleren Rückenpartie Sebum entnommen (4.4.2) und über die GC und GC/MS analysiert. Die Entnahme des Sebums wurde auf der Rückenpartie durchgeführt, da dieser Bereich für die Hautpflege mit Seife, Duschgel etc. schwieriger zu erreichen ist, und somit davon auszugehen ist, dass genügend Hautfett gewonnen werden kann. Untersucht wurde die Zusammensetzung der WE im Sebum, d. h. C-Kettenlängen und Sättigungsgrad. Ziel war die genaue Kenntnis der WE-Zusammensetzung des Sebums der Probanden und darauf basierend eventuelle Unterschiede dieser Zusammensetzung in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Körperpflege- und Essgewohnheiten der Probanden zu erfassen (Tab. 6.4).

Tab. 6.4:

Untersuchte Probanden mit Angaben einiger, im Hinblick auf die Sebum-Zusammensetzung wichtiger Eigenschaften wie Alter, Geschlecht und Dusch- bzw. Essgewohnheiten

Probanden		Duschverhalten			Nahrung			
Alter	Geschlecht	Anwendung	Duschgel	Temperatur	pflanzliche Öle	Butter/Milch	Fisch	Fleisch
75 Jahre	♂	täglich	ja	30-35°C	a	a	b	a
36 Jahre	♂	täglich	ja	25-30°C	a	b	c	a
65 Jahre	♀	jeden 2. Tag	ja	30°C	a	a	b	a
60 Jahre	♀	jeden 2. Tag	nein	35°C	a	-	-	b
34 Jahre	♀	täglich	ja	30-35°C	a	b	c	a

(a = > 1x pro Woche, b = 1x pro Woche, c = < 1x pro Woche, - = gar nicht)

Zur Charakterisierung der WE-Verteilung wurde der jeweilige prozentuale Anteil an der Gesamtsumme der nachgewiesenen Wachsester bestimmt. Die GC-Analyse der WE aus den Sebumproben der Probanden ergab Kettenlängen im Bereich von C₃₀-C₄₀ (Tab. 6.5). Die aus dem Sebum der Probanden gewonnenen WE mit ihren relativen Retentionszeiten sind im Anhang in Tabelle 9.4 aufgeführt. Ein Vergleich der prozentualen Anteile der nachgewiesenen WE zeigt, dass deutlich mehr WE mit geradzahlgiger Kettenlänge (>70%) vorkommen als WE mit ungeradzahlgiger Kettenlänge (Abb. 6.9). Sowohl bei den geradzahlgigen als auch den ungeradzahlgigen WE sind deutlich mehr ungesättigte WE im Sebum enthalten als gesättigte. Die zweifach ungesättigten WE kommen hauptsächlich im langkettigen Bereich (C₃₆-C₄₀) vor und sind im Bereich zwischen C₃₀-C₃₄ selten bzw. gar nicht nachweisbar. Die einfach ungesättigten WE dagegen sind vor allem bei Kettenlängen von C₃₀-C₃₆ vertreten. Die GC/MS Untersuchung der WE-Fraktion zeigt, dass die einfache Unsättigung auf die FS-Anteile der WE beschränkt ist.

Es wurden zwei Beprobungen zu unterschiedlichen Jahreszeiten (1. Sommer, 2. Herbst) durchgeführt. In beiden Fällen ergibt sich eine ähnliche WE-Verteilung (Abb. 6.9). In den WE-Fractionen des Sebums der Probanden überwiegen einfach ungesättigte WE im Bereich von C₃₀-C₄₀ (Tab. 6.5).

Tab. 6.5:

Anteil gesättigter und ungesättigter Wachsester (WE; in Prozent der insgesamt nachgewiesenen WE-Menge) im kürzerkettigen (C₃₀-C₃₄) und längerkettigen Bereich (C₃₅-C₄₀), zweier unterschiedlicher Probenahmen

Proband (1. Probenahme)	WE (C ₃₀ -C ₃₄)			WE (C ₃₅ -C ₄₀)		
	gesättigt [%]	einfach ungesättigt [%]	zweifach ungesättigt [%]	gesättigt [%]	einfach ungesättigt [%]	zweifach ungesättigt [%]
♀ 34 Jahre (A)	15,6	32,9	5,4	1,7	22,6	21,7
♂ 36 Jahre (B)	18,3	33,4	3,2	6,5	20,8	17,8
♀ 60 Jahre (C)	17,2	39,6	0	6,3	23,2	13,7
♂ 75 Jahre (D)	32,1	58,7	0	1,7	4,4	3,1
(2. Probenahme)						
♀ 34 Jahre (A)	12,4	35,5	6,0	2,5	21,2	22,5
♂ 36 Jahre (B)	20,4	28,3	0	12,0	20,8	18,6
♀ 60 Jahre (C)	18,0	30,3	2,6	4,8	26,3	18,0
♂ 75 Jahre (D)	15,3	29,0	4,8	4,9	24,0	22,0

Der Vergleich der Anteile der in beiden Beprobungen nachgewiesenen Wachsester mit gleicher Kettenlänge und gleichem Sättigungsgrad zeigt maximale Abweichungen von ca. 4% (♂, 36 Jahre) und 8% (♀, 34 Jahre und ♀, 60 Jahre). Während die Abweichungen bei diesen drei Probanden die 10% nicht überschreiten, ergeben sich größere Abweichungen von bis zu 18% bei dem männlichen Probanden von 75 Jahren. Obwohl keine Umstände im Umfeld des Probanden vorlagen, die dies hätten bewirken können, unterscheidet sich die WE-Verteilung der ersten Messreihe deutlich von allen anderen Proben (Tab. 6.5). Ein Aufarbeitungsfehler kann in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden. Bei der weiblichen Probandin (65 Jahre) wurden neben einer geringen Menge C_{32:0} keine weiteren WE nachgewiesen (Daten nicht dargestellt). Ursache hierfür ist eine ohnehin nur sehr geringe Menge gewonnenen Hautfetts, was wahrscheinlich auf eine sehr trockene Haut zurückzuführen ist.

Ein Einfluss der aufgeführten Ernährungs- und Körperpflegegewohnheiten auf die produzierten WE der Probanden ist nicht erkennbar, da deren WE-Verteilungen kaum voneinander abweichen (Tabellen 6.4 und 6.5; sowie Abb. 6.9).

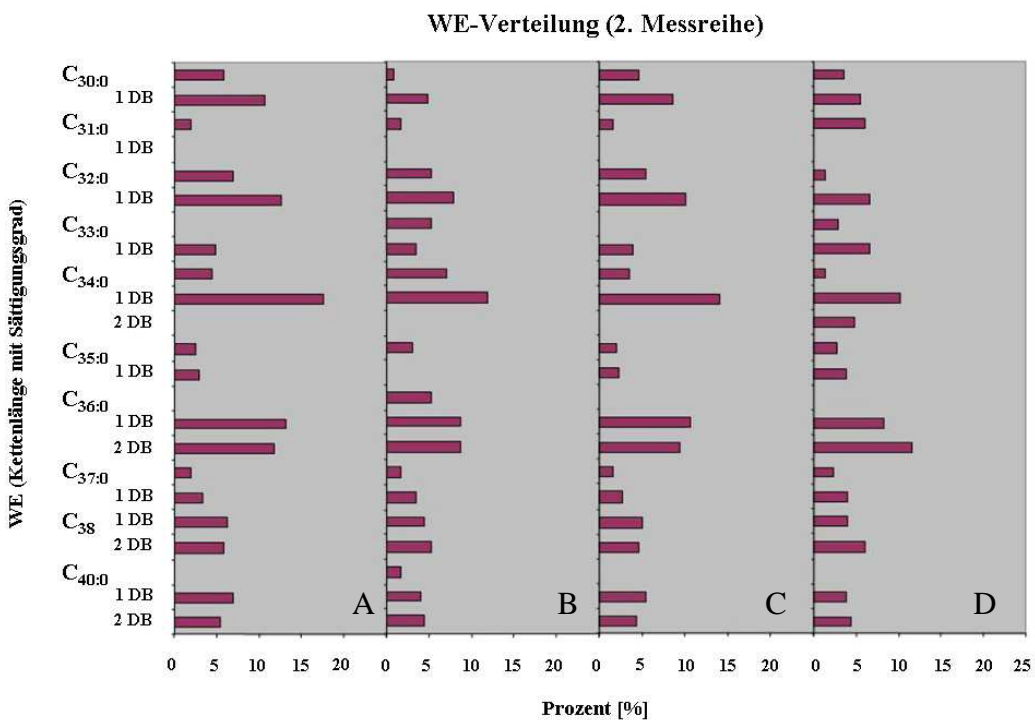
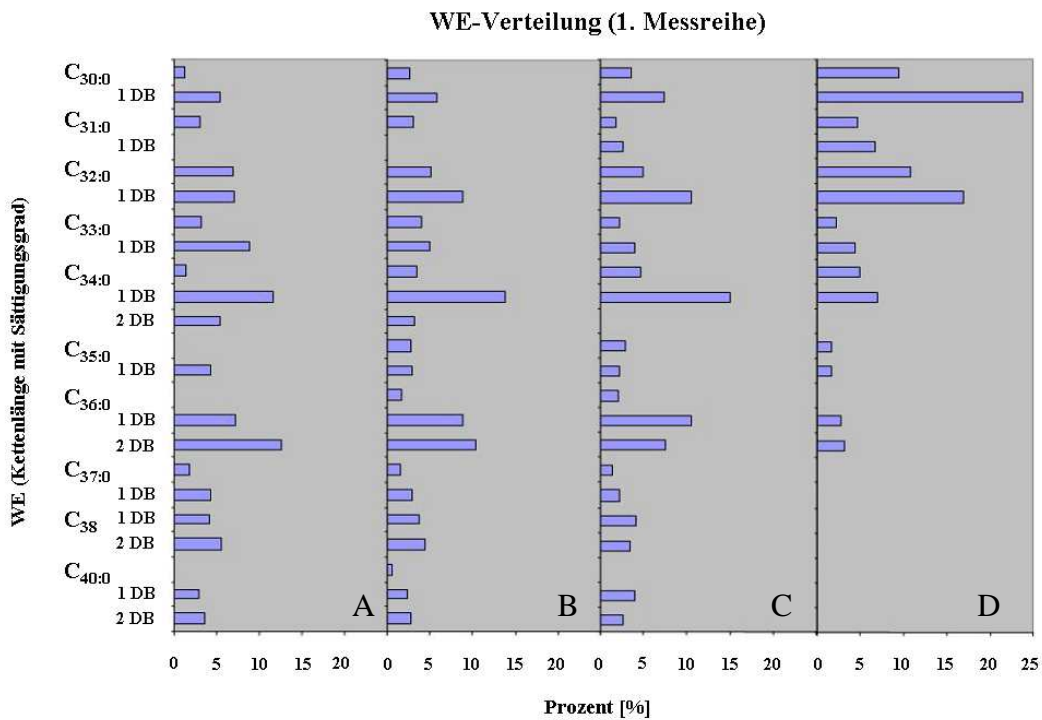


Abb. 6.9:

Vergleich der bei den Probanden nachgewiesenen Wachsester (WE); Angaben in Prozent der insgesamt nachgewiesenen WE-Mengen; aufgeführt sind zwei parallele Messreihen von vier Probanden: ♀ 34 Jahre (A), ♂ 36 Jahre (B), ♀ 60 Jahre (C) und ♂ 75 Jahre (D)

6.2.2 Bestimmung der Zusammensetzung der Wachsester des menschlichen Sebums

Neben Kenntnis von Kettenlänge und Sättigungsgrad ist die genaue Zusammensetzung der WE aus dem menschlichen Sebum von Interesse. Die massenspektrometrische Bestimmung der in den WE enthaltenen Säure- und Alkoholkomponenten gibt weitere Aufschlüsse über Aufbau, Produktion und Funktion der WE auf der Haut.

Die Analyse der Gaschromatogramme und Massenspektren zeigte, dass die einfach ungesättigten WE 50-60% der gesamt nachgewiesenen WE ausmachen (Tab. 6.5), wobei aufgrund der massenspektrometrischen Daten die einfache Unsättigung im vorliegenden Fall im FS-Anteil auftritt. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Wertz & Michniak (2000), die in der Wachsester-Fraktion des menschlichen Sebums ungefähr 60% einfach ungesättigte Fettsäuren nachwiesen, die durch Hydrolyse aus den Wachsestern freigesetzt wurden.

Weiterhin zeigten die GC/MS Untersuchungen, dass die FS-Komponenten der untersuchten WE-Fraktionen Kettenlängen im Bereich zwischen C_{14} und C_{19} aufweisen (Tab. 6.6). Im Bereich der gesättigten WE traten überwiegend FS der Kettenlänge $C_{16:0}$ und $C_{18:0}$ auf, wobei Hexadecansäure ($C_{16:0}$; m/z 257, siehe Massenspektrometrische Analysen Kap. 5) die dominierende FS darstellte. Da im Bereich der gesättigten WE hauptsächlich Kettenlängen von C_{32} und C_{34} vorkommen und Hexadecansäure die dominierende FS-Komponente ist, haben die dominierenden Alkoholkomponenten Kettenlängen von $C_{16:0}$ (m/z 224) und $C_{18:0}$ (m/z 252). Bei den einfach ungesättigten Wachsestern wurden FS der Kettenlängen C_{14} - C_{19} nachgewiesen. Ebenso wie bei den gesättigten Wachsestern ist auch hier neben der dominierenden Hexadecansäure (m/z 236, 194, 255; Abb. 5.7) eine FS mit 18er Kettenlänge (Octadecansäure) eine Hauptfettsäurekomponente. Die dominierenden Alkohole besitzen daher Kettenlängen von $C_{16:0}$ (m/z 224), $C_{18:0}$ (m/z 252) und $C_{20:0}$ (m/z 280), da die ungesättigten WE hauptsächlich mit Kettenlängen von 32, 34 und 36 C-Atomen vertreten sind.

Im menschlichen Sebum wurden hauptsächlich WE nachgewiesen, die eindeutig aus einer Mischung von Isomeren bestehen. So wurde massenspektrometrisch u. a. ein $C_{32:0}$ WE-Gemisch (m/z 480) nachgewiesen, dessen Säure- und Alkoholkomponenten die Kombinationen 16:0/16:0, 14:0/18:0 und 18:0/14:0 enthalten (Massenspektren nicht dargestellt). Die Zusammensetzung der nachgewiesenen WE einer Probandin (60 Jahre, 2. Messreihe) mit charakteristischer WE-Verteilung ist in Tabelle 6.6 ersichtlich.

Tab. 6.6:

In der GC/MS Analyse erfasste Molekülionen (M^+) und nachgewiesene Fettsäure- und Alkoholanteile der bei einer Probandin (60 Jahre, 2. Messreihe) nachgewiesenen Wachsester

WE (Kettenlänge und Sättigungsgrad)	M^+ (m/z)	WE-Zusammensetzung
C _{30:0}	452	16OOH/14OH, 14OOH/16OH
C _{30:1}	450	16OOH:1/14OH
C _{31:0}	466	15OOH/16OH, 16OOH/15OH, 17OOH/14OH
C _{32:0}	480	16OOH/16OH, 14OOH/18OH, 18OOH/14OH
C _{32:1}	478	16OOH:1/16OH, 18OOH:1/14OH
C _{33:0}	494	16OOH/17OH, 15OOH/18OH, 17OOH/16OH
C _{33:1}	492	16OOH:1/17OH
C _{34:0}	508	16OOH/18OH
C _{34:1}	506	16OOH:1/18OH
C _{35:0}	522	15OOH/20OH, 16OOH/19OH, 17OOH/18OH, 14OOH/21OH
C _{35:1}	520	16OOH:1/19OH
C _{36:0}	536	16OOH/20OH, 18OOH/18OH, 14OOH/22OH
C _{36:1}	534	16OOH:1/20OH, 18OOH:1/18OH, 19OOH:1/17OH
C _{36:2}	532	16OOH:1/18OH:1
C _{37:0}	550	16OOH/21OH
C _{37:1}	548	16OOH:1/21OH, 17OOH:1/20OH
C _{38:1}	562	16OOH:1/22OH
C _{38:2}	560	16OOH:1/22OH:1
C _{40:1}	590	16OOH:1/24OH, 19OOH:1/21OH
C _{40:2}	588	16OOH:1/24OH:1

6.2.3 Fazit (menschliches Sebum)

Durchgeführte Untersuchungen (6.2.1) ergaben, dass die WE-Fractionen aus dem Sebum der Probanden hauptsächlich gesättigte und einfach ungesättigte WE im Bereich von C₃₀-C₄₀ enthalten (Abb. 6.9). Diese Ergebnisse gehen konform mit Analysen von Fitzgerald & Murphy (2007), die bei Probanden überwiegend gesättigte und einfach ungesättigte WE im Bereich C₂₈-C₄₀ nachwiesen. Wachsester mit einer geraden Anzahl an C-Atomen enthielten dabei überwiegend auch Säure- bzw. Alkoholkomponenten mit einer geraden Anzahl an C-Atomen. Grundlage der von Fitzgerald & Murphy (2007) durchgeführten Analysen waren allerdings WE, die aus menschlichem Haar isoliert wurden und nicht wie in der vorliegenden Arbeit aus dem menschlichen Hautfett.

In der vorliegenden Arbeit wird, im Gegensatz zu vielen bisherigen Arbeiten die ihren Schwerpunkt in der Analyse der einzelnen FS-Komponenten der Esterfraktionen des menschlichen Sebums haben (z. B. Wertz & Michniak, 2000), die WE-Verteilung im menschlichen Sebum beschrieben (6.2.1).

Während Tachi & Iwamori (2007) unterschiedliche Kettenlängen epidermaler WE von Erwachsenen und Kindern nachwiesen (wobei die WE von Erwachsenen Kettenlängen von C₂₇-C₄₂ aufwiesen), war die WE-Verteilung bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Probanden unterschiedlichen Alters (34-75 Jahre) relativ stabil (Tab. 6.5). Die differenzierte Untersuchung der WE-Verteilung ergab, dass die gesättigten WE, die im Sebum im Vergleich zu den einfach ungesättigten Wachsestern einen geringeren Anteil ausmachen, hauptsächlich im Bereich zwischen C₃₀ und C₃₄ auftreten. Einfach ungesättigte WE treten im Bereich C₃₀-C₃₆ auf (6.2.1). Ihr Sättigungsgrad wird, genau wie bei Wachsestern isoliert aus menschlichen Haaren (Fitzgerald & Murphy, 2007), durch die jeweilige FS-Komponente bestimmt. Zweifach ungesättigte WE des Sebums kommen hauptsächlich im Bereich C₃₆-C₄₀ vor. Genau wie die von Fitzgerald & Murphy (2007) untersuchten WE aus menschlichem Haar, die im Gegensatz zu synthetischen Vergleichs-Wachsestern eindeutig aus isomeren Gemischen bestehen, sind auch die in der vorliegenden Arbeit analysierten Wachsester des menschlichen Sebums überwiegend aus einer Mischung von Isomeren zusammengesetzt (Tab. 6.6).

Der Nachweis der Hexadecan- bzw. Hexadecensäure als dominierende FS (6.2.2) ist konsistent mit Untersuchungen von Yamamoto *et al.* (1987) und Wertz & Michniak (2000). Yamamoto *et al.* (1987) wiesen Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C₁₆ als Hauptkomponenten in gesättigten und einfach ungesättigten Wachsestern des menschlichen Sebums bei einer Gruppe von Probanden im Alter zwischen 3 Monaten und 86 Jahren nach. Wertz & Michniak (2000) zeigten, dass Palmitinsäure (Hexadecensäure) als häufigste FS der Esterfraktionen des menschlichen Sebums auftritt. Außerdem beschreiben die Autoren u. a. eine mögliche antimikrobielle Wirkung des Sebums auf der Haut. Eine entscheidende Rolle bei dieser antimikrobiellen Wirkung übernehmen die im Sebum enthaltenen Fettsäuren, wobei Säuren mit 16 C-Atomen, gewonnen aus Lipidfraktionen des menschlichen Sebums, besonders hohe antimikrobielle Aktivität zeigen (Wille & Kydonieus, 2003).

Letzteres legt den Schluss nahe, dass dies der Grund dafür ist, dass Hexadecan- bzw. Hexadecensäure die dominierenden FS im Sebum sind (6.2.2) und dass die WE des Sebums, ähnlich wie die enthaltenen Triacylglyceride, auf der Hautoberfläche hydrolysiert werden. Die hierdurch bedingte Freisetzung von FS (überwiegend mit 16er Kettenlänge) bewirkt einen antimikrobiellen Effekt des Sebums.

6.3 Darstellung von artifiziellm Sebum und Schneiden von Wachsestern

6.3.1 Charakterisierung von Bienenwachs

Bienenwachs (BW) wird in der Kosmetik für vielfältige Zwecke eingesetzt. Es dient z. B. als Grundlage für die Herstellung von Hautcremes. Bienenwachs enthält jedoch im Gegensatz zum Sebum WE mit Kettenlängen von C₄₀-C₅₂, die dem Wachs eine relativ feste Konsistenz geben (Abb. 6.10).

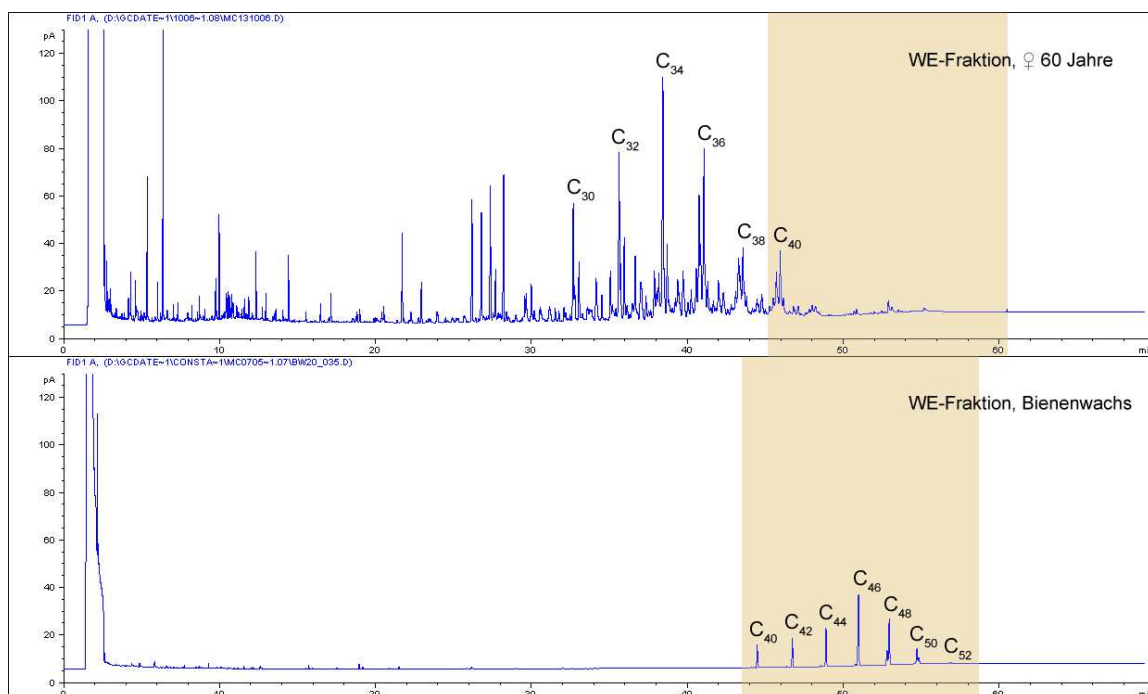


Abb. 6.10:

Gaschromatogramme der Wachsester-Fractionen des Sebums einer 60 Jahre alten Probandin und von Bienenwachs [100 µg absolut]

WE des menschlichen Sebums weisen deutlich kürzere Kettenlängen auf als das Bienenwachs (Abb. 6.10), was dem Sebum eine erheblich geschmeidigere Konsistenz verleiht. Die erhöhten Kettenlängen der WE im BW führen zu deutlich höheren Schmelzpunkten im Vergleich zu denen des Sebums und somit einem ganz anderen Schmelz- und Verteilungsverhalten auf der Haut. Die Verwendung von BW in Kosmetika ist also nur bedingt optimal.

6.3.2 Schneidern von Wachsestern

Die WE des menschlichen Sebums dominieren im Bereich zwischen Kettenlängen von C_{30} - C_{40} . Langkettige WE ($\geq C_{40}$) kommen nur in geringen Anteilen vor (Abb. 6.10). Ziel für ein bakterielles Schneidern ist daher ein möglichst hoher Anteil an WE mit Kettenlängen zwischen C_{30} - C_{40} , die denen entsprechen, die überwiegend im menschlichen Sebum auftreten.

Wird *A. jadensis* T9 auf Rapsöl kultiviert, produziert der Stamm WE deren Kettenlängen hauptsächlich zwischen C_{32} - C_{38} liegen (Abb. 6.11). Dies entspricht dem Großteil der WE des menschlichen Sebums.

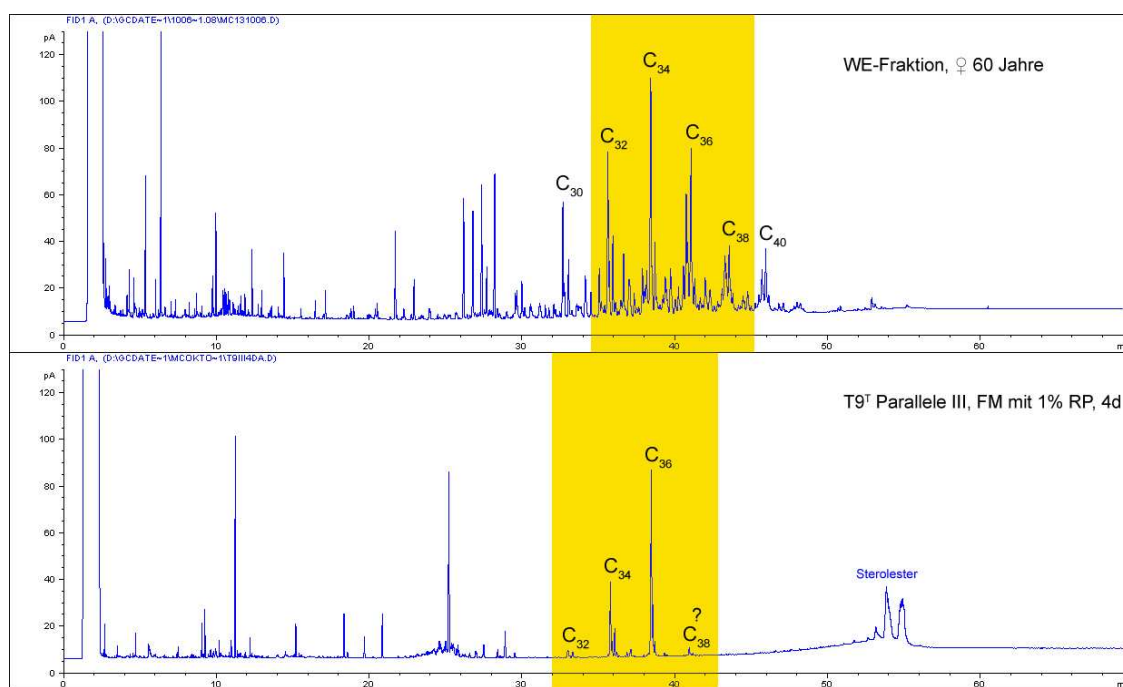


Abb. 6.11: Gaschromatogramme der Wachsester-Fractionen des Sebums einer 60 Jahre alten Probandin und der Wachsester-Fraktion einer Kultur von *A. jadensis* T9 in Fermentermedium mit Rapsöl (1% m/v), entnommen nach 4 d Kultivierung

Der Vergleich der von *A. jadensis* T9 auf Rapsöl produzierten WE mit den Wachsestern des Bienenwachses zeigt deutlich, dass die bakteriell produzierten WE hinsichtlich ihrer Kettenlänge und daraus resultierenden Eigenschaften (z. B. Schmelz- und Verteilungsverhalten auf der Haut) den Wachsestern des menschlichen Sebums weitaus ähnlicher sind und teilweise sogar identische Kettenlängen aufweisen. Der mögliche Einsatz von auf diese Weise gewonnenen Rohstoffen in Kosmetika würde daher die natürlichen Funktionen des Sebums besser als bisher in kosmetischen Produkten eingesetzte WE-Produkte, wie z. B. Bienenwachs, unterstützen.

Mit ausgewählten organischen Verbindungen als Substrat soll die gezielte Produktion von WE durch Bakterien untersucht werden. Die bisherigen Ergebnisse zeigen die Fähigkeit von *A. jadensis* T9 bei Wachstum auf Pflanzenöl WE ähnlich denen des menschlichen Sebums zu produzieren (Abb. 6.11). Diese Fähigkeit sowie die Beschreibung der geringen Substratspezifität bakterieller WE-Synthesen (Wältermann *et al.*, 2007) lassen die Annahme zu, dass es möglich ist, WE bestimmter C-Kettenlänge und Zusammensetzung über den Einsatz ausgewählter Einzelsubstrate bakteriell herzustellen.

6.3.2.1 Einzelstoffklassen als Wachsester-Vorläufer

Für das Schneiden bakteriell produzierter Wachsester mit bestimmter C-Kettenlänge und Zusammensetzung wurden Reinstoffe unterschiedlicher Stoffklassen als Substrat eingesetzt. Die Aufnahme von Substraten und das Wachstum der Zellen sind u. a. abhängig von der Bioverfügbarkeit der eingesetzten Substrate. Prozesse wie (i) die Aufnahme des in der wässrigen Phase gelösten Substrates, (ii) die Aufnahme des Substrates durch Bildung von Emulsionen sowie (iii) die Aufnahme des Substrates durch direkten Kontakt zwischen Bakterien und Öltropfen spielen hierbei eine Rolle (Abschnitt 6.1.6; Singer & Finnerty, 1984). Im Folgenden sollen verschiedene Substrate, einzeln und in Kombination (auch mit RP), auf ihr spezifisches WE-Bildungspotential untersucht werden.

n-Fettsäuren, Rapsöl und Triacylglyceride als Wachsester-Vorläufer

Die als WE-Vorläufer eingesetzten *n*-Fettsäuren haben Kettenlängen im Bereich von C₁₁-C₁₉. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Kettenlängen in Anlehnung an das Römpp Chemielexikon wie folgt definiert: kurzkettig (C₁-C₇), mittlere Kettenlänge (C₈-C₁₁) und langkettig (\geq C₁₂). Die in Tabelle 6.7 aufgeführten *n*-Fettsäuren wurden als Einzelsubstrate eingesetzt.

Tab. 6.7:

Wachstum und Wachsester-Produktion von *A. jadensis* T9 in Kulturen mit *n*-Fettsäuren als C- und E-Quelle (je 1% m/v), mit Angaben zu produzierten Wachsestern: Konzentration, C-Kettenlänge, Sättigungsgrad und eindeutig nachweisbare Zusammensetzungen; n. b. = nicht bestimmbar; n. i. = Signal nicht integrierbar; - = kein Wachstum, + = Wachstum; ++ = gutes Wachstum; +++ = sehr gutes Wachstum

C + E-Quelle (1% m/v)	Trübung	produzierte Wachsester		
		C-Zahl	Konz. [µg/10 ml Kultur]	Zusammensetzung
<i>n</i> -Undecansäure (11OOH)	-/+	n. b.	n. b.	n. b.
<i>n</i> -Dodecansäure (12OOH)	++/+++	n. b.	n. b.	n. b.
<i>n</i> -Pentadecansäure (15OOH)	-	n. b.	n. b.	n. b.
<i>n</i> -Hexadecansäure (16OOH)	++/+++	C _{30:0}	5,8	Hexadecanyl-Tetradecanoat (14OOH-16OH) Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH)
		C _{32:0}	36,6	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH)
<i>n</i> -Octadecansäure (18OOH)	+	n. b.	n. b.	n. b.
<i>n</i> -Nonadecansäure (19OOH)	++	C _{32:0}	0,97	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH) Tetradecanyl-Octadecanoat (18OOH-14OH)
		C _{37:0}	n. i.	Octadecanyl-Nonadecanoat (19OOH-18OH)

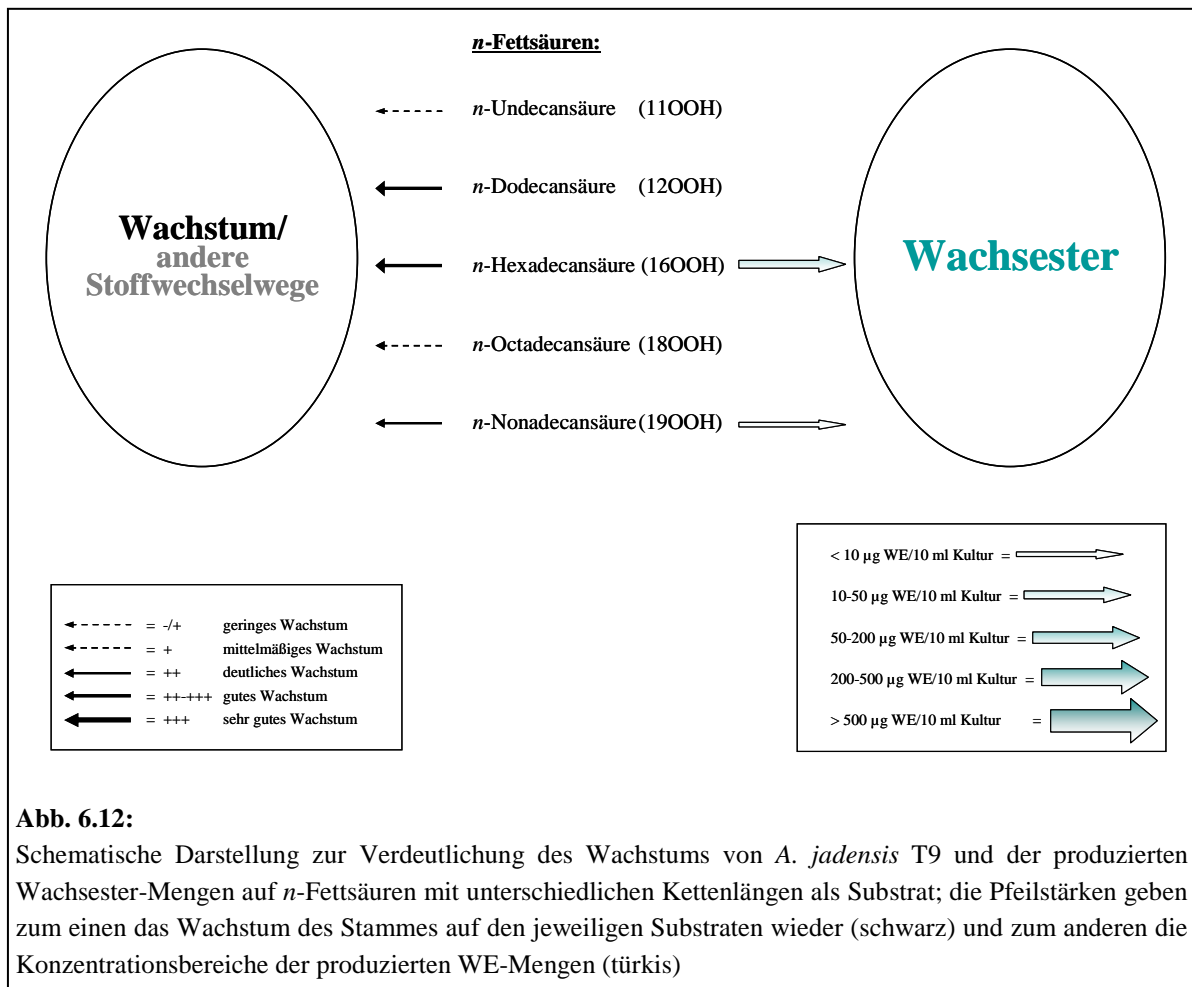
Da *A. jadensis* T9 bei fünf der sechs *n*-Fettsäuren geringes bis sehr gutes Wachstum zeigte (Tab. 6.7), ist davon auszugehen, dass er über ein entsprechendes Aufnahmesystem für *n*-Fettsäuren dieser Kettenlängen verfügt. Ein mögliches Aufnahmesystem für länger-kettige FS (ohne Angaben der genauen Kettenlängen) wurde von Black & DiRusso (2003) bei dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* beschrieben. Das Aufnahmesystem von *E. coli* umfasst ein Transportprotein (Fad L) mit hoher Substratspezifität, das die äußere Membran umspannt. Das Protein besteht aus zwei Domänen, die unterschiedliche Funktionen besitzen. Eine der Domänen befindet sich an der Zelloberfläche und reguliert die Bindung des Substrates, wobei hierbei die Carboxylgruppe der FS essentiell ist. Die zweite Domäne ist in die Membran eingebettet und bildet einen spezifischen Tunnel für langkettige Fettsäuren. Bei der Bindung einer Fettsäure an die erste Domäne bewirkt eine Konformationsänderung der zweiten Domäne die Erweiterung dieses Tunnels, und erleichtert somit den Transport der Fettsäuren durch die Membran.

Ein weiteres Protein (FACS), das mit der inneren Membran assoziiert ist, katalysiert unter ATP-Verbrauch die Aktivierung der Fettsäuren zu Acyl-CoA (Weimar *et al.*, 2002). Da es sich bei *A. jadensis* T9 ebenfalls um ein Gram-negatives Bakterium handelt, ist anzunehmen, dass dieser über ein vergleichbares, möglicherweise auch genau dieses Aufnahmesystem verfügt, um *n*-Fettsäuren als Substrat nutzen zu können.

Das Wachstum von *A. jadensis* T9 auf den in Tabelle 6.7 genannten *n*-Fettsäuren und seine WE-Produktion auf diesen Substraten waren nicht einheitlich. Der Stamm T9 zeigte mit drei der sechs *n*-Fettsäuren kein bzw. nur geringes Wachstum und keine WE-Produktion. Möglicherweise sind diese Ergebnisse auf einen hemmenden Effekt der *n*-Fettsäuren auf das Zellwachstum Gram-negativer Bakterien zurückzuführen, wie er von Fay & Farias (1975) beschrieben wurde. Die Autoren beschreiben, dass diese hemmende Wirkung von unterschiedlichen Bedingungen abhängig ist, wie der Wachstumsphase, Kettenlänge der FS, eventuellen Adaptationsphasen und dem verwendeten Kulturmedium.

Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass Bedingungen wie unterschiedliche Kettenlängen der *n*-Fettsäuren und evtl. Adaptationsphasen eine Rolle im Hinblick auf eine mögliche Hemmung des Zellwachstums durch die eingesetzten *n*-Fettsäuren spielen.

Auf *n*-Hexadecansäure und *n*-Nonadecansäure dagegen wuchs der Stamm T9 gut und produzierte extrahierbare Mengen Wachsester, während mit *n*-Dodecansäure zwar gutes Wachstum, aber keine WE-Produktion nachweisbar war (Tab. 6.7). Ein Nachweis über Wachstum der Zellen auf Substraten ohne nachweisbare WE-Produktion lässt darauf schließen, dass die Organismen die Substrate aufnehmen und über andere Stoffwechselwege (unabhängig von der WE-Produktion) metabolisieren. Dies verdeutlicht, dass nicht zwangsläufig ein Zusammenhang zwischen Wachstum und WE-Produktion besteht (Abb. 6.12). Bei dem Einsatz von *n*-Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge als Substrat zeigte sich nur bei *n*-Dodecansäure und *n*-Hexadecansäure gutes bis sehr gutes Wachstum jedoch mit Ausnahme von *n*-Hexadecansäure eine generell schwache WE-Produktion (Abb. 6.12).



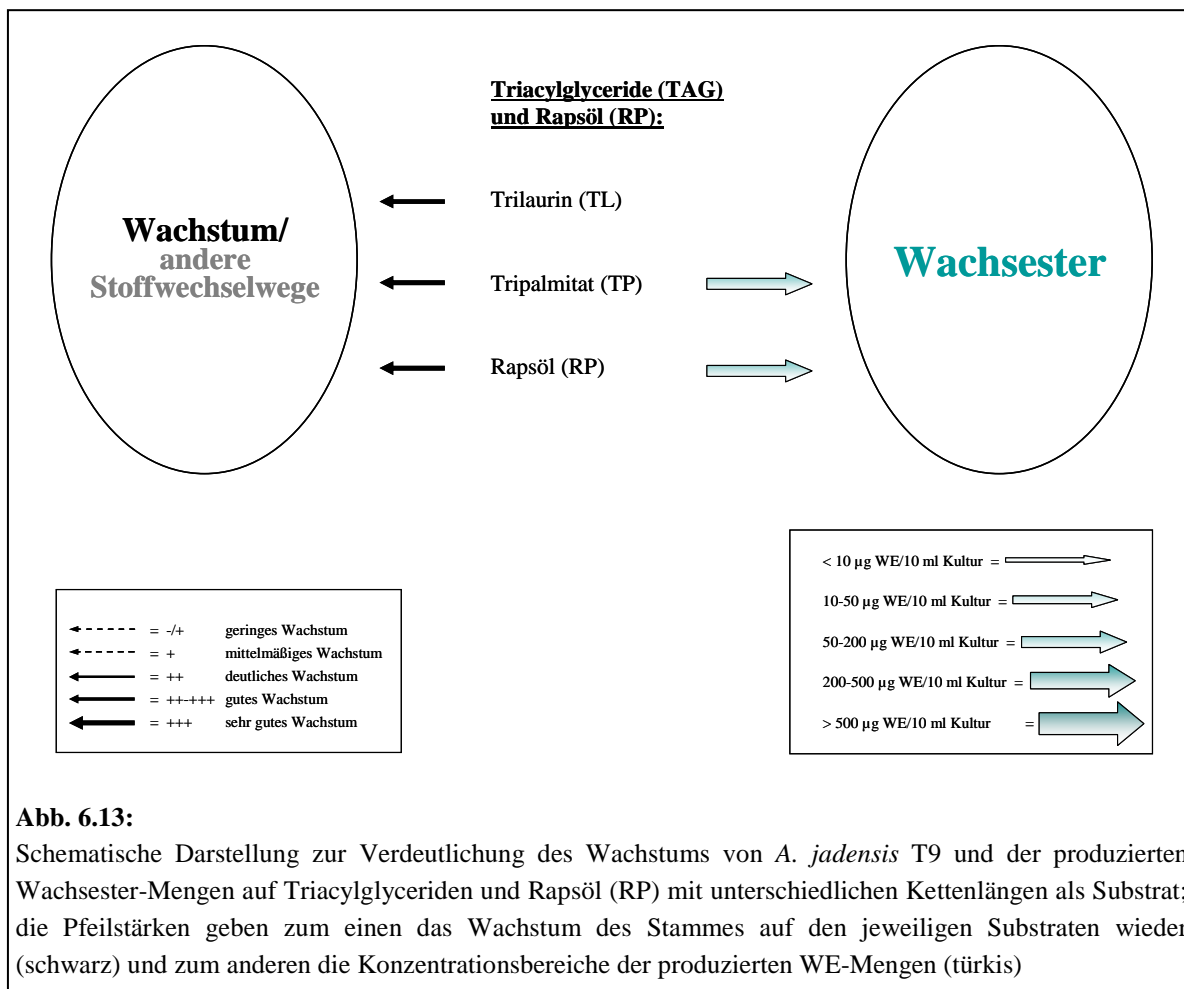
Widersprüchlich hierbei ist, dass die Hexadecansäure genau die Fettsäure ist, für die Wille & Kydonieus (2003) eine besonders hohe antimikrobielle Wirkung nachgewiesen haben (6.2.3). Dies führt zu der Annahme, dass die WE-Produktion dem Schutz der Zelle dient, indem überschüssige und damit möglicherweise schädigende freie *n*-Fettsäuren fixiert werden (6.3.3). Diese Hypothese wird durch Wältermann & Steinbüchel (2005a) unterstützt, die beschreiben, dass die Produktion von Wachsestern als eine Art Entgiftungsmechanismus fungieren könnte, um überschüssige freie Fettsäuren zu deponieren und gleichzeitig eine toxische Wirkung dieser Fettsäuren auf die Zelle zu verhindern. Eine Umwandlung in nicht toxische Bestandteile, wie z. B. WE, könnte somit zum Schutz der Zelle vor einer zu hohen Konzentration an intrazellulären freien Fettsäuren dienen, die auch dadurch entstehen kann, dass die Fettsäuren nicht in die Membran- bzw. Phospholipidbiosynthese eingehen.

Fraglich bleibt hierbei, ob eine hohe WE-Produktion ausschließlich den optimalen Schutz der Zelle vor toxischen Substanzen ermöglicht, oder ob die WE weitere unterschiedliche Funktionen übernehmen wie z. B. die Speicherung von Reservestoffen oder den Ausgleich von Temperaturschwankungen in der Umgebung (2.1).

Ungeachtet dessen entsteht bei der Verwendung von *n*-Hexadecansäure (16OOH) als Einzelsubstrat (Tab. 6.7) der zur Veresterung notwendige Alkohol direkt durch Reduktion des Substrates. Außerdem wird eine WE-Bildung nach Verkürzung der C-Kette und Reduktion des Substrates beobachtet. Die Veresterung zu Wachsestern ohne Kettenverkürzung des Substrates findet jedoch bevorzugt statt, da der WE Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH/16OH) ca. 86% der auf *n*-Hexadecansäure gesamt produzierten WE ausmacht. Die Verkürzung der C-Ketten beträgt eine C₂-Einheit, was folgern lässt, dass sie über die β -Oxidation der *n*-Fettsäuren verläuft.

Im Gegensatz zu den *n*-Fettsäuren handelt es sich beim Rapsöl nicht um ein Einzelsubstrat, das aus einer Komponente besteht. Das Rapsöl besteht aus einem Gemisch verschiedener Fettsäuren, die in Form von Triacylglyceriden enthalten sind (Tab. 6.1). Zusätzlich enthält das Rapsöl weitere Inhaltsstoffe in geringen Mengen (6.1.1), die Einfluss auf die Verfügbarkeit des Rapsöles haben könnten. Dennoch sind innerhalb einer Kultivierung die hauptsächlich im Rapsöl enthaltenen Fettsäuren das Substrat, da *A. jadiansis* T9 nicht in der Lage ist, die außerdem in den Triacylglyceriden des Rapsöles enthaltene Substanz Glycerin als Substrat zu nutzen (Bruns & Berthe-Corti, 1999).

Wie auch bei der Kultivierung des Stammes T9 auf *n*-Fettsäuren (Tab. 6.7) ist gutes Wachstum bei der Kultivierung auf Triacylglyceriden und Rapsöl (Tab. 6.8) nicht immer ein Zeichen für gute WE-Produktion (Abb. 6.13). Obwohl keine direkte Wachstums-kopplung gezeigt werden konnte, war umgekehrt gutes Wachstum in jedem Fall eine notwendige, aber nicht alleinige Voraussetzung für WE-Produktion. Eine extrahierbare Menge an produzierten Wachsestern bei gleichzeitig schlechtem Wachstum trat mit keinem der Substrate auf. Die Tatsache, dass WE nur bei deutlichem Zellwachstum nachgewiesen wurden, kann darauf zurückzuführen sein, dass (i) die Zellen bei geringem Wachstum keine WE produziert haben oder (ii) die Zellen zwar WE produziert haben, die Zellmasse und damit die WE-Menge aber nicht ausreichend für einen Nachweis dieser WE war.



Wächst *A. jadensis* T9 auf Rapsöl, findet genau wie bei den *n*-Fettsäuren eine direkte Veresterung der Substrate mit den durch Substrat-Reduktion entstandenen korrespondierenden Alkoholen statt (Tabellen 6.3 und 6.8). Vorherige Kettenverkürzungen der Substrate wurden ebenfalls nachgewiesen. Wie bei der WE-Produktion auf *n*-Alkoholen bewiesen (S. 89; Abschnitt *n*-Alkohole als WE-Vorläufer), verfügt der Stamm über Desaturasen. Bei der WE-Produktion auf *n*-Fettsäuren erfolgte keine Desaturierung der Substrate und der jeweils korrespondierenden Alkohole (Tab. 6.7), da die auf den *n*-Fettsäuren produzierten WE keine ungesättigten Säure- oder Alkoholanteile enthielten. Deshalb ist davon auszugehen, dass *A. jadensis* T9 die häufig vorkommenden einfach ungesättigten Säureanteile der WE, die er auf RP produziert, direkt aus dem Öl in die WE-Synthese überführt. Diese Hypothese wird bestätigt durch die Tatsache, dass der Stamm T9 auf RP zu 60% den WE Octadecenyl-Octadecenoat produziert (Tab. 6.3), der ausschließlich Octadecensäure und Octadecenol enthält. Die mit 52% im Rapsöl hauptsächlich vorkommende Octadecensäure wird also direkt in die Zelle aufgenommen, teilweise zu ihrem korrespondierenden Alkohol reduziert und zum WE metabolisiert.

Es ist anzunehmen, dass der Stamm T9 die Octadecensäure, ähnlich wie *Escherichia coli*, über das Transportprotein Fad L bzw. ein Transportprotein mit vergleichbarem Aufnahmemechanismus aufnimmt, einen Teil zum korrespondierenden Alkohol reduziert und für die Veresterung zum WE um eine oder mehrere C₂-Einheiten verkürzt (Tab. 6.8). Dies wäre auch mit Hexadecensäure möglich, die aber nur zu 0,6% im Rapsöl enthalten ist, deshalb ist die Aufnahme und Umwandlung der Octadecensäure wahrscheinlicher.

Auch einfach ungesättigte Fettsäuren mit längeren C-Ketten (20OOH:1 und 22OOH:1) kommen im Rapsöl vor. Diese konnten aber nicht als Komponenten der von *A. jadensis* T9 auf Rapsöl produzierten WE nachgewiesen werden. Unklar bleibt die Zusammensetzung des auf Rapsöl produzierten C₃₈-Wachsesters. Der anhand der Retentionszeit in der GC-Analyse vermutete WE (Abb. 6.5) müsste Säure- oder Alkoholanteile besitzen, die Kettenlängen von mehr als 18 C-Atomen aufweisen. Das würde bedeuten, dass vermutlich eine Verlängerung der C-Ketten der Substrate stattgefunden hat, da die Annahme besteht, dass Substratkettenlängen von mehr als 19 C-Atomen die Substrataufnahme oder die WE-Synthese limitieren (6.3.3). Im Rapsöl kommen auch zweifach und dreifach ungesättigte Fettsäuren (18OOH:2 und 18OOH:3) vor. Drei- bzw. vierfach ungesättigte WE, die aus einer direkten Nutzung solcher FS für die WE-Synthese entstehen müssten, wurden allerdings nicht nachgewiesen. Die im Rapsöl enthaltenen Fettsäuren mit mehrfacher Unsättigung weisen Kettenlängen von 18 C-Atomen auf, und es wurde bereits nachgewiesen, dass *A. jadensis* T9 die einfach ungesättigte Fettsäure (Octadecensäure) mit der gleichen Kettenlänge aus dem Rapsöl für die WE-Synthese nutzt (s. o.). Eine mögliche Limitierung durch die Kettenlängen der Substrate kann daher als Grund dafür, dass der Stamm T9 die Fettsäuren Octadecadiensäure und Octadecatriensäure aus dem Rapsöl nicht direkt für die WE-Synthese einsetzt, ausgeschlossen werden. Im Rapsöl treten neben den überwiegend ungesättigten auch gesättigte Fettsäuren auf. Da die FS-Komponenten der auf Rapsöl produzierten WE ausschließlich ungesättigt sind (Tab. 6.8), stellt sich die Frage, ob eine erleichterte Aufnahme für einfach ungesättigte Fettsäuren besteht oder eine Beseitigung von überschüssigem und somit möglicherweise toxischem Substrat in Form von Wachsestern stattfindet.

Weitere WE-Vorläufer, die ausschließlich FS als Substrat liefern sind synthetische Triacylglyceride (TAG). Im Falle der angebotenen TAG stehen *A. jadensis* T9 jeweils Fettsäuren mit nur einer bestimmten Kettenlänge zur Verfügung.

Bei Trilaurin ist der Glycerinanteil des Moleküls ausschließlich mit Fettsäuren der Kettenlänge C₁₂ verestert und beim Tripalmitat mit Fettsäuren der Kettenlänge C₁₆. Die verwendeten Triacylglyceride werden im Gegensatz zum Rapsöl synthetisch hergestellt und haben deshalb keine Zusatzstoffe, die ihre Bioverfügbarkeit für die Bakterien beeinflussen könnten. Wachstum und WE-Produktion von *A. jadensis* T9 auf Rapsöl und Triacylglyceriden sind in Tabelle 6.8 gegenübergestellt.

Tab. 6.8:

Wachstum und Wachsester-Produktion von *A. jadensis* T9 in Kulturen mit Triacylglyceriden und Rapsöl als C- und E-Quelle (je 1% m/v), mit Angaben zu produzierten Wachsestern: Konzentration, C-Kettenlänge, Sättigungsgrad und eindeutig nachweisbare Zusammensetzungen; n. i. = nicht integrierbar; n. b. = nicht bestimmbar; +++ = sehr gutes Wachstum; * = Zusammensetzung nicht eindeutig bestimmbar

C + E-Quelle (1% m/v)	Trübung	produzierte Wachsester		
		C-Zahl	Konz. [µg/10 ml Kultur]	Zusammensetzung
Rapsöl (RP)	+++	C _{32:1}	n. i.	Tetradecanyl-Octadecenoat* (18OOH:1-14OH)
		C _{32:2}	n. i.	Tetradecenyl-Octadecenoat* (18OOH:1-14OH:1)
		C _{34:1}	11,7	Hexadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-16OH)
		C _{34:2}	33,2	Hexadecenyl-Octadecenoat* (18OOH:1-16OH:1)
		C _{36:2}	67,6	Octadecenyl-Octadecenoat (18OOH:1-18OH:1)
		C _{38:2}	n. i.	n. b.
Trilaurin (TL)	+++	n. b.	n. b.	n. b.
Tripalmitat (TP)	+++	C _{30:0}	n. i.	Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH) Hexadecanyl-Tetradecanoat (14OOH-16OH)
		C _{31:0}	n. i.	Pentadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-15OH) Hexadecanyl-Pentadecanoat (15OOH-16OH) Tetradecanyl-Heptadecanoat (17OOH-14OH)
		C _{32:0}	2,11	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH)
		C _{34:0}	n. i.	Hexadecanyl-Octadecanoat (18OOH-16OH) Octadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-18OH)
		C _{36:0}	n. i.	Octadecanyl-Octadecanoat (18OOH-18OH) Eicosanyl-Hexadecanoat (16OOH-20OH)

Mit Trilaurin (TL) war sehr gutes Wachstum, aber keine WE-Produktion nachzuweisen. Trilaurin besteht aus einem Glycerinmolekül verestert mit drei Dodecansäuremolekülen. Wird TL gespalten, bleibt *n*-Dodecansäure als einzige C- und E-Quelle für *A. jadensis* T9. Genau wie beim Einsatz von *n*-Dodecansäure bei den *n*-Fettsäuren (Tab. 6.7) zeigte der Stamm T9 mit TL sehr gutes Wachstum, aber keine WE-Produktion. Der Stamm ist also in der Lage, *n*-Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12 C-Atomen aufzunehmen und zu verstoffwechseln, wobei er diese jedoch nicht für die WE-Synthese nutzt.

Durch die Spaltung von Tripalmitat (TP) liegt *n*-Hexadecansäure als C- und E-Quelle für den Stamm T9 vor. Während der Stamm T9 auf *n*-Hexadecansäure als Einzelsubstrat gutes Wachstum und WE-Produktion zeigte (Tab. 6.7), scheint er auf TP nur gut zu wachsen.

Die Mengen an extrahierbaren Wachsestern mit TP als Substrat dagegen waren minimal (Tab. 6.8). An welcher Stelle im Stoffwechsel (Aufnahme oder Spaltung von TP) diese Limitierung liegt, ist mit den vorliegenden Daten nicht nachvollziehbar.

Auf Tripalmitat, das ausschließlich Fettsäuren mit 16er Kettenlänge als Substrat liefert, sollte der Verlauf der WE-Produktion dem Verlauf bei der *n*-Hexadecansäure entsprechen. Da die WE-Ausbeute aber so gering war, dass einige WE nur in Spuren nachzuweisen waren und die Gesamtmenge an WE kaum 2 µg/10 ml Kultur überschritt, waren die Daten im Hinblick auf einen bevorzugten Stoffwechselweg nicht auswertbar.

Die Bioverfügbarkeit der FS-Anteile der jeweils eingesetzten Triacylglyceride ist abhängig von der Spaltung der Moleküle durch die Bakterien. Triacylglyceride werden durch (Triacylglycerol)-Lipasen gespalten. Lipasen sind Enzyme, die an Phasengrenzen zwischen hydrophoben Lipidsubstraten und hydrophilem wässrigem Medium agieren. Das aktive Zentrum der Lipasen befindet sich innerhalb des Proteins und besteht aus einer katalytischen Triade, die sich aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat (bzw. Glutamat) zusammensetzt (Jaeger *et al.*, 1994). Lipasen spalten die TAG unabhängig von der Natur der Fettsäuren in Glycerin und freie Fettsäuren (Madigan & Martinko, 2006) und sind generell in der Lage, die Bildung von WE zu katalysieren (Tsujiita *et al.*, 1999). Da gezeigt wurde, dass *A. jadensis* T9 nicht auf Glycerin wächst (Bruns & Berthe-Corti, 1999), stellen die Fettsäuren den Substrat-relevanten Teil des TAG-Moleküls dar.

Die Funktion der Lipasen benötigt eine Verbindung zu Öl-Wasser Grenzflächen. Lipasen kommen als Exoenzyme, periplasmatische Enzyme oder gebunden an die Zelloberfläche vor (Lengeler *et al.*, 1999). Die Spaltung der TAG kann also (i) extrazellulär durch Ausscheidung der Lipasen ins Medium (Glycerin- und FS-Komponenten liegen hierbei frei im Medium vor und die FS können von den Bakterienzellen aufgenommen werden), (ii) zellwandassoziiert (Hydrolyse der TAG erfolgt zellwandgebunden, wobei die FS direkt mit der Spaltung in die Zelle aufgenommen werden) oder (iii) intrazellulär (Spaltung der Esterbindung erfolgt erst innerhalb der Zelle) stattfinden.

Für den Stamm T9 wurde zellassoziierte und intrazelluläre Lipase-Aktivität nachgewiesen (Unterreitmeier, 2003).

Die Aufnahme der Fettsäure-Komponenten aus den Triacylglyceriden erfolgt daher entweder direkt über eine zellwandgebundene Spaltungsreaktion oder die Fettsäure-Komponenten gelangen über die Aufnahme der Triacylglycerid-Moleküle in die Zelle, und werden dort durch Spaltung der Esterbindungen freigesetzt. Die Aufnahme von Fettsäuren erfolgt über das Transportprotein (Fad L) mit anschließender Aktivierung der Moleküle.

n-Alkohole als Wachsester-Vorläufer

Die in der Tabelle 6.9 aufgeführten *n*-Alkohole wurden als Einzelsubstrate auf ihre Eignung für Wachstum und WE-Produktion von *A. jadenis* T9 getestet.

Tab. 6.9:

Wachstum und Wachsester-Produktion von *A. jadenis* T9 in Kulturen mit *n*-Alkoholen als C- und E-Quelle (je 1% m/v), mit Angaben zu produzierten Wachsestern: Konzentration, C-Kettenlänge und Sättigungsgrad sowie eindeutig nachweisbare Zusammensetzungen; n. b. = nicht bestimmbar; n. i. = Signal nicht integrierbar; +++ = sehr gutes Wachstum

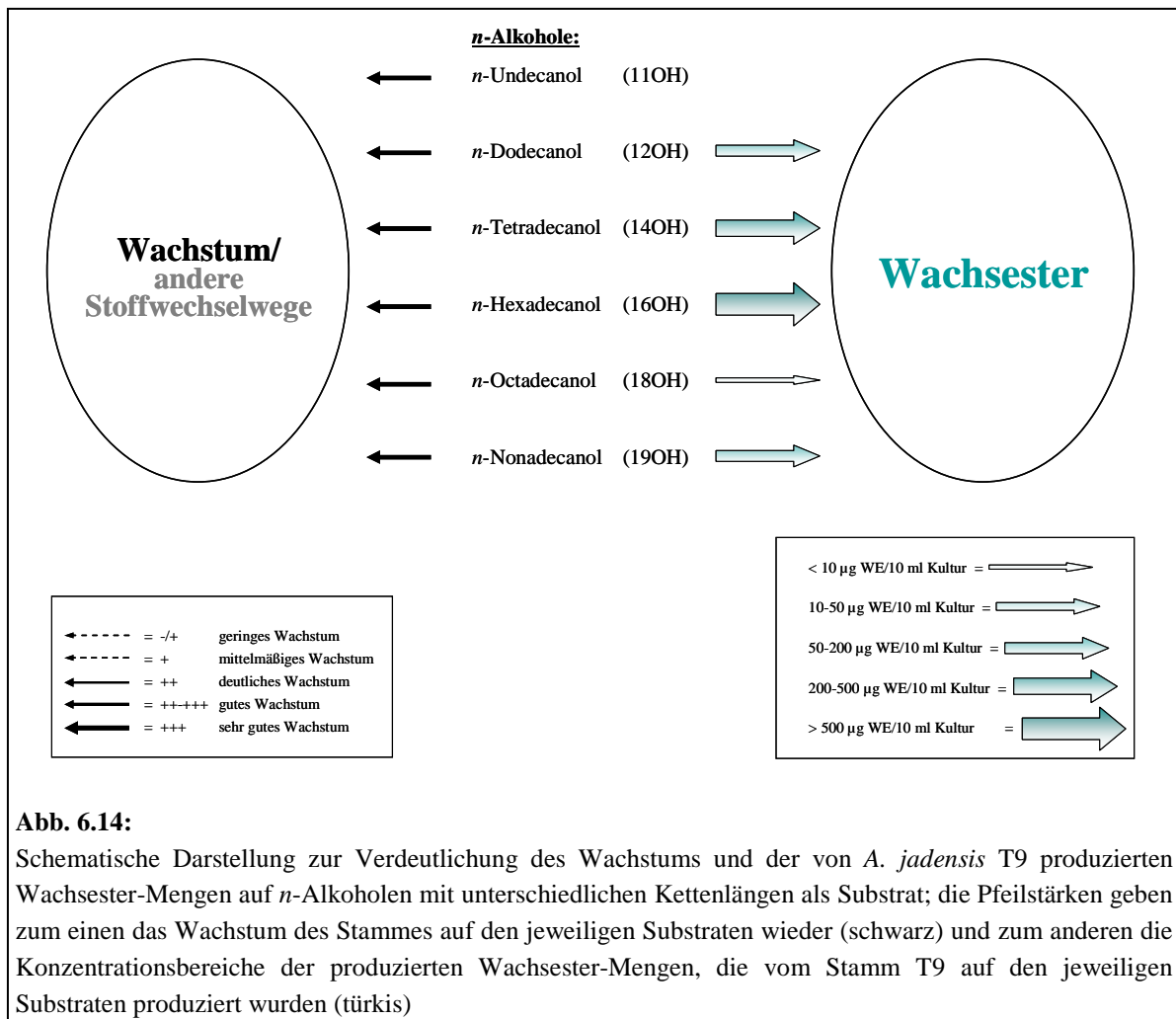
C+E-Quelle (1% m/v)	Trübung	produzierte Wachsester		
		C-Zahl	Konz. [µg/10 ml Kultur]	Zusammensetzung
<i>n</i> -Undecanol (11OH)	+++	n. b.	n. b.	n. b.
<i>n</i> -Dodecanol (12OH)	+++	C _{24:0}	62,4	Dodecanyl-Dodecanoat (12OOH-12OH)
		C _{28:0}	5,3	Dodecanyl-Hexadecanoat (16OOH-12OH)
<i>n</i> -Tetradecanol (14OH)	+++	C _{27:1}	38,8	*
		C _{28:0}	179	Tetradecanyl-Tetradecanoat (14OOH-14OH)
		C _{28:1}	8,97	Tetradecanyl-Tetradecenoat (14OOH:1-14OH)
		C _{29:0}	6,83	Tetradecanyl-Pentadecanoat (15OOH-14OH)
		C _{30:0}	11,8	Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH)
<i>n</i> -Hexadecanol (16OH)	+++	C _{30:0}	65,1	Hexadecanyl-Tetradecanoat (14OOH-16OH) Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH)
		C _{30:1}	4,04	Hexadecanyl-Tetradecenoat (14OOH:1-16OH)
		C _{31:0}	10,2	Pentadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-15OH) Hexadecanyl-Pentadecanoat (15OOH-16OH)
		C _{31:1}	99,5	*
		C _{32:0}	430	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH)
		C _{32:1}	23	*
		C _{32:1}	n. i.	Hexadecanyl-Hexadecenoat (16OOH:1-16OH)
		C _{34:0}	8,8	Octadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-18OH) Hexadecanyl-Octadecanoat (18OOH-16OH)
<i>n</i> -Octadecanol (18OH)	+++	C _{32:0}	n. i.	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH) Octadecanyl-Tetradecanoat (14OOH-18OH)
		C _{34:0}	n. i.	Octadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-18OH)
		C _{36:0}	n. i.	Octadecanyl-Octadecanoat (18OOH-18OH)
<i>n</i> -Nonadecanol (19OH)	+++	C _{34:0}	32,6	Nonadecanyl-Pentadecanoat (15OOH-19OH)
		C _{36:0}	52,9	Nonadecanyl-Heptadecanoat (17OOH-19OH)

* Die Fragmentierung ist mit den normalen Interpretationsmustern nicht vergleichbar; das Molekülion spricht zwar dafür, dass es sich um WE handelt, die aber nicht der normalen Fragmentierung folgen und bei denen es sich ebenfalls um Gemische handeln könnte

Unabhängig von der C-Kettenlänge erweisen sich *n*-Alkohole für *A. jadensis* T9 als geeignete Substrate in Bezug auf Wachstum und WE-Produktion. Der Stamm T9 zeigte auf vier von sechs *n*-Alkoholen sehr gutes Wachstum sowie sehr gute WE-Produktion. Lediglich auf *n*-Undecanol und *n*-Octadecanol wurden wenig bzw. keine WE produziert (Tab. 6.9).

Die hier erhaltenen Ergebnisse lassen auf einen Einfluss der unterschiedlichen Kettenlängen der Substrate auf die WE-Produktion schließen. Vergleicht man die WE-Produktion auf *n*-Dodecanol, *n*-Tetradecanol und *n*-Hexadecanol, erhöht sich diese in dieser Reihenfolge um einen Faktor von mindestens 2,5. Mit einer Zunahme der Substrat-Kettenlänge um jeweils eine C₂-Einheit von *n*-Dodecanol, *n*-Tetradecanol zu *n*-Hexadecanol steigt die Apolarität der *n*-Alkohole, was möglicherweise die Fähigkeit der Moleküle sich in den hydrophoben Bereich der Membran einzulagern begünstigt. Letzteres scheint bei Kettenlängen von C₁₂-C₁₆ die Aufnahme in die Zelle zu erleichtern. Neben der zur Bildung von Biomasse nötigen Substratmenge (in allen Versuchen wurde eindeutiges Zellwachstum nachgewiesen) verfügt die Zelle demzufolge über genügend Substrat, um es zusätzlich in Form von z. B. WE-Einschlüssen zu deponieren. Diese Annahme wird durch die nachweisbar parallel zur steigenden Kettenlänge (C₁₂-C₁₆) erhöhte WE-Ausbeute (Tab. 6.9) gestützt.

Ein Optimum an produzierten WE wurde hierbei, wie auch bei den *n*-Fettsäuren, auf einem Substrat mit 16er Kettenlänge erreicht. Polarität und Kettenlänge von *n*-Hexadecanol scheinen im Hinblick auf die WE-Ausbeute optimal die Voraussetzungen zu erfüllen, die nötig sind, um *A. jadensis* T9 gutes Wachstum und die Bildung von Wachsestern zu ermöglichen. Sowohl die Aufnahme als auch die WE-Produktion scheinen für Substrate mit 16 C-Atomen besonders effektiv zu sein. Bei *n*-Fettsäuren und *n*-Alkoholen mit Kettenlängen von mehr als 16 C-Atomen war keine weitere Steigerung der WE-Produktion zu beobachten (Tabellen 6.7 und 6.9). Bei der Verwendung von *n*-Alkoholen mit mehr als 16 C-Atomen sank die Menge an gesamt produzierten WE auf *n*-Octadecanol (Signale nicht integrierbar) und *n*-Nonadecanol (85,41 µg/10 ml Kultur) deutlich im Vergleich zum *n*-Hexadecanol (640,98 µg/10 ml Kultur). Ergänzend zu den Ergebnissen bei Einsatz von *n*-Dodecanol, *n*-Tetradecanol und *n*-Hexadecanol bestätigt dies ebenfalls die Vermutung, dass die Kettenlänge der Substrate (neben der Polarität) einen maßgeblichen Einfluss auf die Effektivität der Substratnutzung hat (6.3.3). Abbildung 6.14 fasst die dargestellten Ergebnisse noch einmal grafisch zusammen.



Eine wachstumsgekoppelte WE-Produktion wurde ähnlich wie bei den *n*-Fettsäuren nicht festgestellt, da *n*-Undecanol und *n*-Octadecanol im Gegensatz zu den anderen eingesetzten *n*-Alkoholen zwar zu sehr gutem Wachstum führten, aber zu keiner bzw. sehr geringer WE-Produktion (Abb. 6.14). Ein Nachweis über Wachstum der Zellen auf Substraten ohne nachweisbare WE-Produktion lässt darauf schließen, dass die Bakterienzellen die Substrate aufnehmen und überwiegend in den Bau- und Energiestoffwechsel einschleusen. Die Funktion der Substrate als jeweils einzige C- und E-Quelle für Wachstum lässt ebenfalls Rückschlüsse auf eine bakterielle Metabolisierung über den Bau- und Energiestoffwechsel zu.

Beim Wachstum von *A. jadensis* T9 auf *n*-Alkoholen als Einzelsubstrat wurden Produkte gebildet, aus denen sich schließen lässt, dass die Substrate weitere Reaktionsmechanismen vor ihrer Nutzung für die WE-Synthese aktivieren. Bei den *n*-Fettsäuren und beim Rapsöl wurden bereits direkte Veresterung (ohne Veränderung der C-Kettenlänge) von Substrat und dessen korrespondierendem Alkohol sowie Kettenverkürzungen vor der Veresterung nachgewiesen (S. 82; Abschnitt *n*-Fettsäuren, Rapsöl und Triacylglyceride als WE-Vorläufer). Die direkte Veresterung von Substrat und korrespondierender Fettsäure ist bei den *n*-Alkoholen, analog zu den *n*-Fettsäuren, der bevorzugte Reaktionsmechanismus. Auf *n*-Tetradecanol z. B. macht der aus der direkten Veresterung von Substrat und korrespondierender Fettsäure entstehende Wachsester Tetradecanyl-Tetradecanoat (14OOH/14OH) 73% der gesamt produzierten Wachsester aus. Bei den *n*-Alkoholen wurden zusätzlich Kettenverlängerungen und die Bildung einer DB in der C-Kette durch Desaturase-Aktivität nachgewiesen (Tab. 6.9). Kettenverlängerungen, wie auch Kettenverkürzungen, wurden sowohl bei den FS- als auch den Alkoholanteilen der produzierten WE nachgewiesen, während die durch Desaturase-Aktivität entstandene einfache Unsatigung sich nicht in der Alkoholkomponente des WE, sondern in der korrespondierenden FS-Komponente befindet. Der Sättigungsgrad der einfach ungesättigten WE, die von *A. jadensis* T9 auf *n*-Alkoholen produziert wurden (Tab. 6.9) wird durch die Fettsäure-Anteile vorgegeben. Obwohl in der FS-Zusammensetzung von *A. jadensis* T9 die einfach ungesättigten FS Hexadecensäure (13,5%) und Octadecensäure (20,7%) nachweisbar sind (Bruns & Berthe-Corti, 1999), deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der Hauptanteil der Fettsäuren durch Oxidation der Alkoholsubstrate gewonnen wird (s. o.). Der Stamm T9 produziert auf *n*-Fettsäuren keine einfach ungesättigten WE (Tab. 6.7), daher ist erkennbar, dass weder ungesättigte Fettsäuren aus dem Zellstoffwechsel direkt in die WE-Synthese eingehen noch *n*-Fettsäuren als Substrat vor der WE-Synthese desaturiert werden. Auf *n*-Alkoholen dagegen produziert der Stamm T9 einfach ungesättigte WE, deren FS-Anteile eine Doppelbindung enthalten und somit den Sättigungsgrad bestimmen (Tab. 6.9). Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass die *n*-Alkohole die Desaturase in der Zelle aktivieren, zur Fettsäuren oxidiert werden und anschließend evtl. durch die β -Oxidation verkürzt werden. Die aerobe Synthese von einfach ungesättigten Fettsäuren erfordert die Entfernung von zwei H-Atomen aus der Acyl-Kette (Zajic & Mahomedy, 1984).

Diese Reaktion benötigt molekularen Sauerstoff und NADPH bzw. NADH. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, ist eine Desaturase, die bei Tieren, Pilzen und Bakterien spezifisch für CoA-Derivate der Fettsäuren ist.

Beim Einsatz von Substraten mit geradzahlicher Kettenlänge entstehen Säure- bzw. Alkoholkomponenten mit ungeradzahlicher Kettenlänge zu deutlich geringeren Anteilen als solche mit geradzahlicher Kettenlänge. Bei Substraten mit ungeradzahlicher Kettenlänge, wie z. B. 19OH, werden vor allem Fettsäuren mit ungerader Anzahl C-Atomen, wie 15OOH oder 17OOH, infolge der oben bereits erwähnten Abspaltung von C₂-Einheiten gebildet. Dies lässt, wie bei den einfach ungesättigten Wachsestern, den Schluss zu, dass *A. jadensis* T9 den Hauptanteil der Fettsäuren direkt durch Oxidation des Substrates gewinnt und diese dann über die β -Oxidation um C₂-Einheiten verkürzt werden. Auf *n*-Tetradecanol und *n*-Hexadecanol produzierte der Stamm T9 ebenfalls WE mit ungeradzahlicher Kettenlänge (Tab. 6.9). Die ungeradzahlige Kettenlänge wird hierbei durch die FS-Komponente vorgegeben. FS mit ungeradzahlicher Kettenlänge entstehen bei Bakterien durch die direkte Einführung verschiedener Initiationsmoleküle (z. B. Propionyl-CoA) in die Fettsäurebiosynthese (Madigan & Martinko, 2006). Zellen des Bakteriums *Pseudomonas opacus* z. B. produzieren TAG-Einschlüsse, deren Fettsäure-Komponenten deutlich mehr ungerade C-Ketten aufweisen, wenn die Bakterien auf Propionsäure kultiviert werden (Wältermann & Steinbüchel, 2005a). Bruns & Berthe-Corti (1999) konnten innerhalb der FS-Zusammensetzung von *A. jadensis* T9 keine Fettsäuren mit ungerader Anzahl C-Atome nachweisen. Da die FS-Zusammensetzung aber abhängig ist von den Kultivierungsbedingungen, ist es denkbar, dass die in den durchgeführten Versuchen bakteriell produzierten WE mit ungerader FS-Komponente auch Fettsäuren enthalten (Tabellen 6.7, 6.8 und 6.9), die direkt aus der FS-Biosynthese und nicht aus der Umwandlung des eingesetzten *n*-Alkohols stammen. Die Elongation von Fettsäuren in Bakterien erfolgt durch fortführende Reaktionen der FS-Biosynthese (Verlängerung um C₂-Einheiten), wobei Synthasen unterschiedlicher Spezifität aktiv werden. Über welche Reaktionsabfolge die Verlängerungen der Alkoholanteile der produzierten WE stattfinden ist unbekannt. Wie vielfältig die bakterielle WE-Produktion schon beim Einsatz von Einzelsubstraten sein kann, ist in Abbildung 6.15 dargestellt. Über die Bestimmung der Zusammensetzungen der produzierten WE lassen sich Rückschlüsse auf einige Reaktionswege in der Zelle ziehen.

Dabei ist die WS/DGAT recht unspezifisch, was die C-Kettenlängen und den Sättigungsgrad der Fettalkohole betrifft. Wältermann *et al.* (2007) beschreiben, dass das Enzym WS/DGAT Alkohole mit Kettenlängen zwischen C₂ und C₃₀ als Acyl-Akzeptoren nutzt. Sie bestimmten in *in vitro*-Versuchen die höchste Aktivität der WS/DGAT mit Alkoholen der Kettenlänge C₁₄-C₁₈. Primäre lineare Alkohole werden mit höherer spezifischer Aktivität des Enzyms umgesetzt als sekundäre Alkohole. Ist die Hydroxylgruppe der linearen Alkohole an terminaler Position im Molekül lokalisiert, ist sie für das Enzym besser verfügbar, als wenn sich die Hydroxylgruppe an anderer Stelle im Molekül befindet (Wältermann *et al.*, 2007). *A. jadensis* T9 hat die größten Mengen an Wachsestern auf *n*-Alkoholen mit Kettenlängen zwischen C₁₂ und C₁₆ produziert. Das größte WE-Spektrum produzierte der Stamm T9 auf primären linearen Alkoholsubstraten mit Kettenlängen zwischen C₁₄ und C₁₈ (Tab. 6.9). Diese entsprechen den C-Kettenlängen, bei denen für die WS/DGAT die höchste Aktivität bestimmt wurde, was darauf hindeutet, dass *A. jadensis* T9 ebenfalls ein solches bzw. vergleichbares Enzym für die WE-Synthese besitzt.

Bei dem Einsatz von Einzelsubstraten verschiedener Substanzklassen erwiesen sich *n*-Alkohole (im Bereich zwischen C₁₁-C₁₉) als geeignetere Substrate als *n*-Fettsäuren (im Bereich zwischen C₁₁-C₁₉) im Hinblick auf Wachstum und WE-Produktion von *A. jadensis* T9 (Abbildungen 6.12 und 6.14). Die Menge an bakteriell produzierten Wachsestern war auf den *n*-Alkoholen bis um das 12-fache höher als auf den *n*-Fettsäuren. Daraus lässt sich schließen, dass *n*-Alkohole für den Stamm T9 ein bevorzugtes Substrat zur WE-Produktion sind. Mögliche Ursachen hierfür sind, dass die apolareren *n*-Alkohole wahrscheinlich über passive Transportmechanismen in die Zelle gelangen, während *n*-Fettsäuren ein aktives Transportsystem benötigen, was Energie verbraucht und ihre Aufnahmemöglichkeiten limitiert. Der Energieaufwand der Aufnahme von *n*-Fettsäuren und *n*-Alkoholen sowie die initiale Oxidation von *n*-Alkoholen und *n*-Fettsäuren, könnten einen weiteren Grund für die bevorzugte Aufnahme der *n*-Alkohole beinhalten. Aufnahme und Aktivierung der *n*-Fettsäuren für den Stoffwechsel verbrauchen Energie, während die Oxidation des Alkohols Energie generiert.

Alkohole (C₁-C₁₀) beeinflussen direkt die Membran-Fluidität durch mögliche Interaktionen mit der Membran, wobei sich Toxizität und Änderungen der FS-Zusammensetzung in der Zelle entgegengesetzt zur Kettenlänge des Alkohols verhalten (Ingram, 1976).

Die häufig beschriebene Toxizität von Alkoholen (C_1 - C_{10}) für Bakterien ist abhängig von der Konzentration des eingesetzten Alkohols (Ingram & Buttke, 1984). Die Autoren beschreiben, dass Alkohole mit Kettenlängen von mehr als 10 C-Atomen als Inhibitoren nicht effektiv sind. Das bedeutet, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen an *n*-Alkoholen als Substrat (1% m/v) aufgrund des nachgewiesenen Zellwachstums unter einer potentiell toxischen Konzentration liegen oder die *n*-Alkohole aufgrund ihrer längeren C-Ketten nur in sehr hohen Konzentrationen toxisch für die Zellen sind.

Weitere toxische Auswirkungen von Alkoholen auf Bakterienzellen können neben einer veränderten Membran-Fluidität auch Veränderungen der Membran-Proteine oder der Membran-Hydrophobizität sein (Sikkema *et al.*, 1995).

n-Alkane/Alkene als WE-Vorläufer

Die in dieser Arbeit als Substrat eingesetzten *n*-Alkane/Alkene sind in Tabelle 6.10 aufgeführt.

Tab. 6.10:

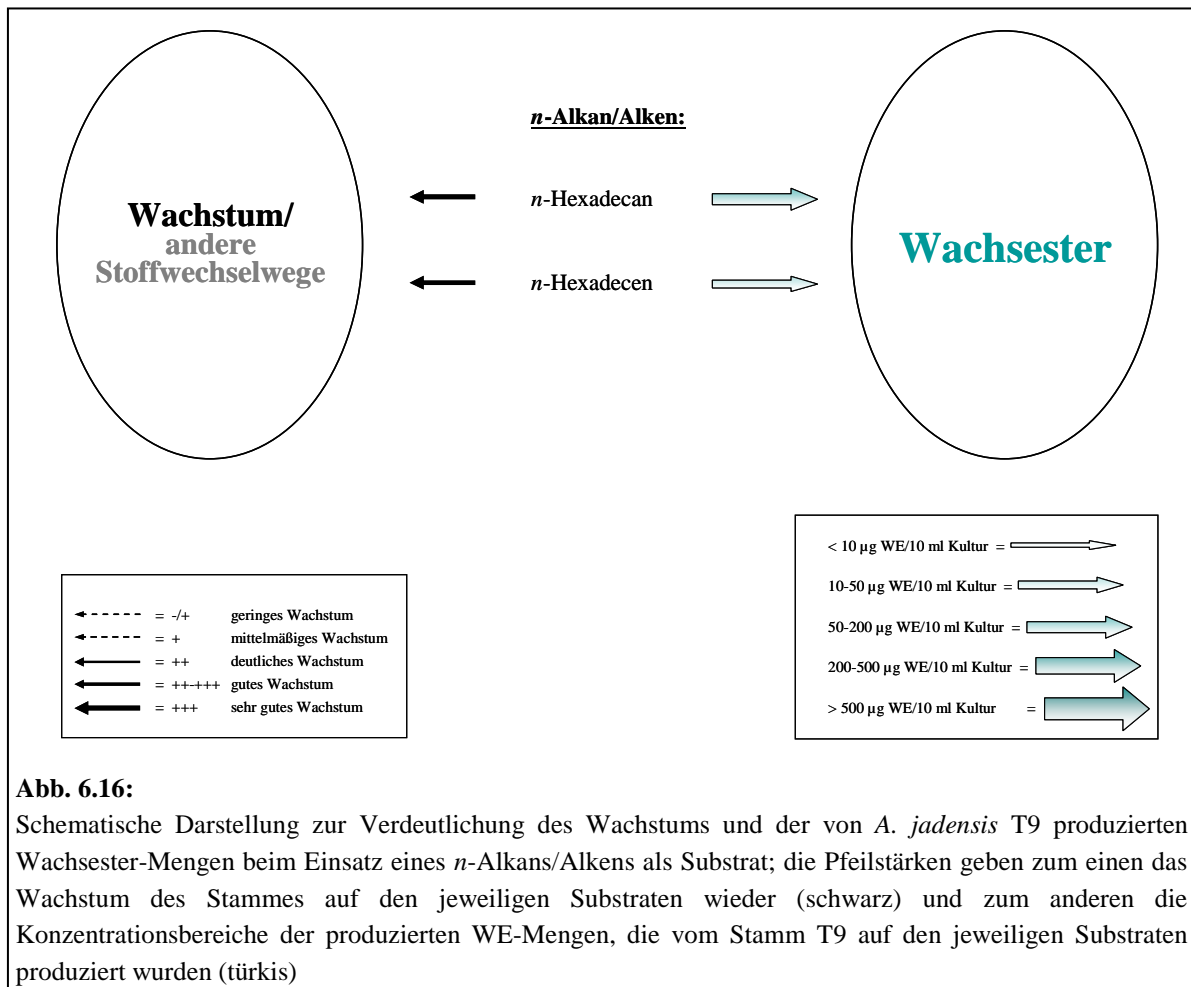
Wachstum und Wachsester-Produktion von *A. jadensis* T9 in Kulturen mit *n*-Alkanen/Alkenen als C- und E-Quelle (je 1% m/v) mit Angaben zu produzierten Wachsestern: Konzentration, C-Kettenlänge und Sättigungsgrad sowie eindeutig nachweisbare Zusammensetzungen; n. b. = nicht bestimmbar; n. i. = Signal nicht integrierbar; +++ = sehr gutes Wachstum

C+E-Quelle (1% m/v)	Trübung	produzierte Wachsester		
		C-Zahl	Konz. [µg/10 ml Kultur]	Zusammensetzung
Hexadecan (16:0)	+++	C _{30:0}	1,58	Hexadecanyl-Tetradecanoat (14OOH-16OH) Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH)
		C _{32:0}	38,5	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH)
		C _{32:1}	14,0	Hexadecanyl-Hexadecenoat (16OOH:1-16OH)
		C _{33:0}	15,8	Heptadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-17OH) Hexadecanyl-Heptadecanoat (17OOH-16OH)
		C _{34:0}	n. i.	Hexadecanyl-Octadecanoat (18OOH-16OH) Octadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-18OH)
Hexadecen (16:1)	+++	C _{32:0}	n. i.	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH)
		C _{32:2}	11,3	Hexadecenyl-Hexadecenoat (16OOH:1-16OH:1)

n-Hexadecan und *n*-Hexadecen sind gute Substrate für das Wachstum von *A. jadensis* T9. Die WE-Produktion auf diesen Substraten war jedoch, genau wie die Produktion auf *n*-Fettsäuren, im Vergleich zur WE-Produktion auf *n*-Alkoholen eher gering. Eine Konzentration von ca. 70 µg/10 ml Kultur wurde hierbei nicht überschritten (Tab. 6.10), während auf *n*-Alkoholen bis zu 640 µg/10 ml Kultur erreicht wurden (Tab. 6.9). Da es sich beim eingesetzten *n*-Alkan um ein Substrat mit 16 C-Atomen handelt und für Substrate mit 16er Kettenlänge optimale Aufnahme und WE-Produktion vermutet werden (6.3.3), spielt die WE-Produktion bei der Verstoffwechslung von *n*-Hexadecan unter den gegebenen Kulturbedingungen eine eher untergeordnete Rolle.

Unabhängig von der geringen WE-Konzentration geben die produzierten Wachsester Aufschluss über den Metabolismus der Substrate vor ihrer Nutzung zur WE-Synthese. Bei *n*-Hexadecan als Substrat finden direkte Veresterung der aus dem *n*-Alkan entstandenen Fettsäuren und Alkohole sowie vorherige Kettenverlängerung, Kettenverkürzung und Desaturierung statt. Kettenverkürzung und Kettenverlängerung betreffen hierbei sowohl den FS-Anteil der WE als auch den Alkoholanteil. Die direkte Veresterung von den durch Oxidation aus dem *n*-Alkan/Alken entstandenen FS- und Alkoholkomponenten ist, wie für die *n*-Fettsäuren und den *n*-Alkoholen ebenfalls nachgewiesen (6.3.3), der bevorzugte Reaktionsmechanismus. Auf *n*-Hexadecan produziert *A. jadensis* T9 zu gut 55% Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH/16OH) und auf *n*-Hexadecen fast ausschließlich Hexadecenyl-Hexadecenoat (Tab. 6.10). Hierbei wurde gezeigt, dass die *n*-Alkane im Wachsester-Stoffwechsel den gleichen Reaktionsmechanismen unterliegen wie die als Einzelsubstrate aufgenommenen *n*-Alkohole, was höchstwahrscheinlich in der initialen Oxidation der *n*-Alkane zum *n*-Alkohol begründet liegt. Ishige *et al.* (2003) beschreiben den bakteriellen Syntheseweg von WE bei Wachstum auf *n*-Alkanen (Abb. 1.2).

Auch für diese Substrate wird eine vergleichende Darstellung von Wachstum und WE-Produktion des Stammes T9 in Abbildung 6.16 gegeben.



In marinen Habitaten ist der Abbau von u. a. *n*-Alkanen abhängig von unterschiedlichen Bedingungen, wie z. B. Temperatur, Nährstoffgehalt, Vorkommen von Mikroorganismen oder Sauerstoffgehalt (Atlas, 1981; Berthe-Corti & Höpner, 2005). Die *n*-Alkane zeigen im Vergleich zu vielen anderen Kohlenwasserstoffen die höchste Anfälligkeit für den bakteriellen Abbau. Aufnahme und Abbau von *n*-Alkanen durch Bakterien sind ebenfalls stark abhängig von ihrer Substratoberfläche im umgebenden Medium und ihrer Bioverfügbarkeit (Leahy & Colwell, 1990). Die schlechte Löslichkeit der bei den gegebenen Kultivierungsbedingungen (Methoden 4.1.2) flüssigen *n*-Alkane (*n*-Hexadecan und *n*-Hexadecen) im wässrigen Medium stellt ein Problem im Hinblick auf den Kontakt der Zellen zur einzigen C- und E-Quelle und somit für das bakterielle Wachstum dar. Aufgrund der niedrigen Wasserlöslichkeit ist daher bei gutem Wachstum die alleinige Nutzung des im wässrigen Medium tatsächlich gelösten Substrates auszuschließen. Ein wichtiger Mechanismus ist die Bildung einer Emulsion mit kleinen Substrattropfen (Macroemulsion) bis hin zu annähernder „Lösung“ des Substrates im Medium (Microemulsion).

Substrathaltige Mizellen, die als Substrat-Reservoirs für die Zellen dienen, werden über bakteriell produzierte Biotenside gebildet. Dies erleichtert den Kontakt der Zellen zum Substrat und dessen Aufnahme (Singer & Finnerty, 1984). Die Anheftung des Gram-negativen Bakteriums *Acinetobacter* sp. H01-N z. B. an Kohlenwasserstoffe, die für dieses Bakterium nicht verwertbar sind, deutet auf relativ unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Bakterien- und Substratoberfläche hin. Zusätzlich produziert der Stamm auf Hexadecan mehr extrazelluläre Phospholipide, die die Emulgierung des Alkans fördern (Singer & Finnerty, 1984). Für die Aufnahme des Substrates nutzt *Acinetobacter* sp. H01-N außerdem Vesikel mit gelöstem Hexadecan, deren Inhalt durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle gelangt und als Kohlenwasserstoffeinschluss gelagert wird. In Abbildung 6.7 ist deutlich zu erkennen, dass auch die Zellen von *A. jadensis* T9 direkten Kontakt zu dem als Tropfen vorliegenden apolaren Öl herstellen, um dieses als Substrat zu nutzen.

Die *n*-Alkane sind unabhängig von ihrer Kettenlänge sehr apolar, was eine Einlagerung in die apolare Membran der Zellen erleichtert. Der bakterielle Abbau von *n*-Alkanen ist nicht einheitlich. Verschiedene Enzyme, die die Oxidation von Alkanen katalysieren, werden beschrieben. Die Oxidation der *n*-Alkane kann z. B. durch eine Monooxygenase erfolgen, die mit Elektronen-Überträgern wie dem Cytochrom P 450-System oder dem Rubredoxin-System verbunden ist (Singer & Finnerty, 1984). Hierbei entsteht der zum *n*-Alkan korrespondierende *n*-Alkohol. Auch die Oxidation über eine Dioxygenase, wodurch das *n*-Alkan eine Umwandlung zum Hydroperoxyd mit anschließender Reduktion zum Alkohol durchläuft, ist beschrieben (Berthe-Corti & Fetzner, 2002). Die subterminale Oxidation des *n*-Alkans am C2 durch eine Monooxygenase ergibt sekundäre Alkohole. Van Beilen *et al.* (1992) beschreiben den Alkan-Hydroxylase-Komplex bei dem Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas oleovorans*. Dieser setzt sich zusammen aus einer Alkan-Hydroxylase, die die Oxidation von Alkanen katalysiert und dem Rubredoxin, das Elektronen von der NADH-abhängigen Rubredoxin-Reduktase auf die Alkan-Hydroxylase überträgt. Ishige *et al.* (2003) beschreiben bei dem Bakterium *Acinetobacter* sp. M-1 unterschiedliche Alkan-Hydroxylasen, die abhängig von der Kettenlänge der Substrate (sehr langkettige Alkane $>C_{22}$; langkettige Alkane $<C_{22}$) induktiv exprimiert werden. Die Rubredoxin- und Rubredoxin-Reduktase-Komplexe dagegen sind unabhängig von den Kettenlängen, da sie konstitutiv exprimiert werden.

6.3.2.2 (Zwei-)Komponentengemische als Wachsester-Vorläufer

n-Alkohole + Rapsöl als Wachsester-Vorläufer

Als Erweiterung von Einzelkomponenten als WE-Vorläufer in der Kultivierung wurden Gemische als Vorläuferkombinationen eingesetzt. Da sich *n*-Alkohole als Einzelsubstrate für Wachstum und WE-Produktion am besten eigneten, wurden sie nun jeweils im Gemisch mit Rapsöl verwendet. Auf die Zusammensetzung von Rapsöl wurde bereits unter 6.3.2.1 eingegangen (Tab. 6.1), es entspricht hauptsächlich einem Gemisch aus Triacylglyceriden. Rapsöl hat sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit als geeignetes Substrat für die WE-Produktion von *A. jadenensis* T9 erwiesen (6.1.3), das als „Rohstoff“ mit bakteriell produzierten WE angereichert werden sollte (6.1). Im Vordergrund für den Einsatz im Gemisch stand, ob hierbei eine Steigerung der WE-Produktion oder eine Veränderung des WE-Spektrums erreicht werden kann.

Die Kombination von gut metabolisierbaren *n*-Alkoholen mit Rapsöl war daher sowohl im Hinblick auf die Durchführung des Projektes als auch auf ein gezieltes Schneiden von bakteriell produzierten WE interessant. Hierfür wurden *n*-Alkohole mit C-Ketten im Bereich von C₁₂-C₁₉ im Gemisch mit RP eingesetzt. Die *n*-Alkohole *n*-Dodecanol (12OH), *n*-Tetradecanol (14OH), *n*-Hexadecanol (16OH) und *n*-Nonadecanol (19OH) wurden jeweils mit gleichem Anteil Rapsöl eingesetzt (Tab. 6.11). Von den Ansätzen 12OH + RP, 14OH + RP und 16OH + RP wurden je drei Parallelen angesetzt. In Bezug auf Wachstum, DC- und GC-Analysen (Daten nicht dargestellt) stimmten die Ergebnisse der jeweiligen Parallelen sehr gut überein, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der Bedingungen und Ergebnisse hinweist.

Tab. 6.11: Wachstum und Wachsester-Produktion von *A. jadensis* T9 in Kulturen mit Zweikomponenten-gemischen aus *n*-Alkohol + Rapsöl als C- und E-Quelle (je 1% m/v gesamt) mit Angaben zu produzierten Wachsestern: Konzentration, C-Kettenlänge und Sättigungsgrad sowie eindeutig nachweisbare Zusammen-setzungen; RP = Rapsöl; n. b. = nicht bestimmbar; ++ = gutes Wachstum; +++ = sehr gutes Wachstum

C+E-Quelle (1% m/v gesamt)	Trübung	produzierte Wachsester		
		C-Zahl	Konz. [µg/10 ml Kultur]	Zusammensetzung
12OH + RP	+++	C _{24:0}	236	Dodecanyl-Dodecanoat (12OOH-12OH)
		C _{28:0}	20,6	Dodecanyl-Hexadecanoat (16OOH-12OH)
14OH + RP	+++	C _{27:0}	37,1	Tetradecanyl-Tridecanoat (13OOH-14OH) Tridecanyl-Tetradecanoat (14OOH-13OH)
		C _{28:0}	771	Tetradecanyl-Tetradecanoat (14OOH-14OH)
		C _{28:1}	26	Tetradecanyl-Tetradecenoat (14OOH:1-14OH)
		C _{30:0}	47,2	Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH)
		C _{32:1}	51,2	Tetradecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-14OH)
16OH + RP	+++	C _{28:0}	2,96	Tetradecanyl-Tetradecanoat (14OOH-14OH) Dodecanyl-Hexadecanoat (16OOH-12OH)
		C _{30:0}	25,9	Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH) Hexadecanyl-Tetradecanoat (14OOH-16OH)
		C _{31:0}	7,44	Pentadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-15OH) Hexadecanyl-Pentadecanoat (15OOH-16OH)
		C _{32:0}	144	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH)
		C _{32:1}	19,2	Hexadecanyl-Hexadecenoat (16OOH:1-16OH)
		C _{34:0}	9,19	Hexadecanyl-Octadecanoat (18OOH-16OH) Octadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-18OH)
		C _{34:1}	37,4	Hexadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-16OH)
19OH + RP	++/+++	C _{34:0}	8,9	Nonadecanyl-Pentadecanoat (15OOH-19OH)
		C _{34:1}	5,4	Hexadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-16OH) Nonadecanyl-Pentadecanoat (15OOH-19OH:1)
		C _{34:2}	5,82	n. b.
		C _{35:0}	3,72	Nonadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-19OH)
		C _{35:1}	6,67	Nonadecanyl-Hexadecenoat (16OOH:1-19OH)
		C _{36:0}	16,4	Nonadecanyl-Heptadecanoat (17OOH-19OH)
		C _{36:1}	12,7	Octadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-18OH) Nonadecanyl-Heptadecenoat (17OOH:1-19OH)
		C _{36:2}	14,17	Octadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-18OH:1) Nonadecanyl-Heptadecenoat (17OOH:1-19OH:1)
		C _{37:1}	56,5	Nonadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-19OH)
		C _{37:2}	4,23	n. b.
	C _{38:0}	4,62	Nonadecanyl-Nonadecanoat (19OOH-19OH)	
	C _{38:1}	6,6	n. b.	

Der Einsatz von *n*-Dodecanol bzw. *n*-Tetradecanol mit Rapsöl führte zu einer Steigerung der WE-Produktion. Im Vergleich zum jeweiligen Einzelsubstrat *n*-Dodecanol bzw. *n*-Tetradecanol (Tab. 6.9) stieg die Menge der von *A. jadensis* T9 produzierten Haupt-WE (C₂₄ bzw. C₂₈) um das ca. Vierfache, wobei in allen Ansätzen jeweils sehr gutes Wachstum zu verzeichnen war. Neben den Haupt-WE wurden von Stamm T9 auf den Gemischen 12OH + RP und 14OH + RP auch die WE anderer Kettenlängen in bis zu vierfacher Menge gegenüber den Einzelsubstraten produziert (Tab. 6.11). Es ist anzunehmen, dass das Rapsöl in diesem Fall als eine Art Lösungsvermittler für die Alkohol-Substrate fungiert, da diese Komponenten hohe Octanol-Wasser-Koeffizienten (K_{ow}-Wert) aufweisen und somit in apolaren Medien wie Öl besser löslich sind als im wässrigen Kulturmedium. Für *n*-Dodecanol liegt dieser Wert bei log K_{ow} = 5,13 und für *n*-Tetradecanol bei log K_{ow} = 6,03 (<http://toxnet.nlm.nih.gov> - HSDB; 2010). Der Einfluss des Rapsöles erleichtert wahrscheinlich die Aufnahme der *n*-Alkohole in die Zellen.

Anhand der Ergebnisse kann nicht eindeutig geklärt werden, welches Substrat im Gemisch die Bioverfügbarkeit des anderen stärker beeinflusst. Die Ergebnisse lassen allerdings Rückschlüsse zu, dass *A. jadensis* T9 sowohl die *n*-Alkohole als auch das Rapsöl aus den jeweiligen Gemischen für die WE-Synthese nutzt. Auf den Gemischen 12OH + RP, 14OH + RP und 16OH + RP produziert der Stamm T9 neben den auf den *n*-Alkoholen als Einzelsubstrat bereits nachgewiesenen jeweiligen Haupt-WE Dodecanyl-Dodecanoat (12OOH/12OH), Tetradecanyl-Tetradecanoat (14OOH/14OH) und Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH/16OH; Tab. 6.9) Wachsester als zweites Hauptprodukt, die Octadecensäure als FS-Anteil enthalten (Tab. 6.11). Bei der Kultivierung von *A. jadensis* T9 auf Rapsöl als „Einzelsubstrat“ wurde bereits gezeigt, dass der Stamm T9 die überwiegend im Rapsöl enthaltene Octadecensäure aus dem Öl aufnimmt und für die WE-Synthese nutzt (S. 82; Abschnitt *n*-Fettsäuren, Rapsöl und Triacylglyceride als WE-Vorläufer). Weiterhin ergaben Versuche mit *n*-Alkoholen (12OH, 14OH und 16OH) als Einzelsubstrat ausschließlich WE, die keine Octadecensäure enthielten (Tab. 6.9), was bedeutet, dass der Stamm T9 die Octadecensäure bei der Verwendung der oben genannten Gemische aus dem Rapsöl aufnimmt und für die WE-Synthese nutzt. Vergleicht man dagegen die Konzentrationen der jeweils produzierten Haupt-WE und der zweiten WE-Hauptprodukte (s. o.), spricht vieles dafür, dass das Rapsöl, wie oben beschrieben die Bioverfügbarkeit der *n*-Alkohole beeinflusst und nicht umgekehrt.

Dies führt zu einer höheren Produktion der Haupt-WE und ist bei den Substraten *n*-Dodecanol und *n*-Tetradecanol im jeweiligen Gemisch mit Rapsöl anhand der dominierenden Syntheseprodukte C_{24:0} und C_{28:0} belegt. Die *n*-Alkohole werden im Gemisch mit Rapsöl bezogen auf die WE-Synthese bevorzugt verwendet und gleichzeitig deponiert.

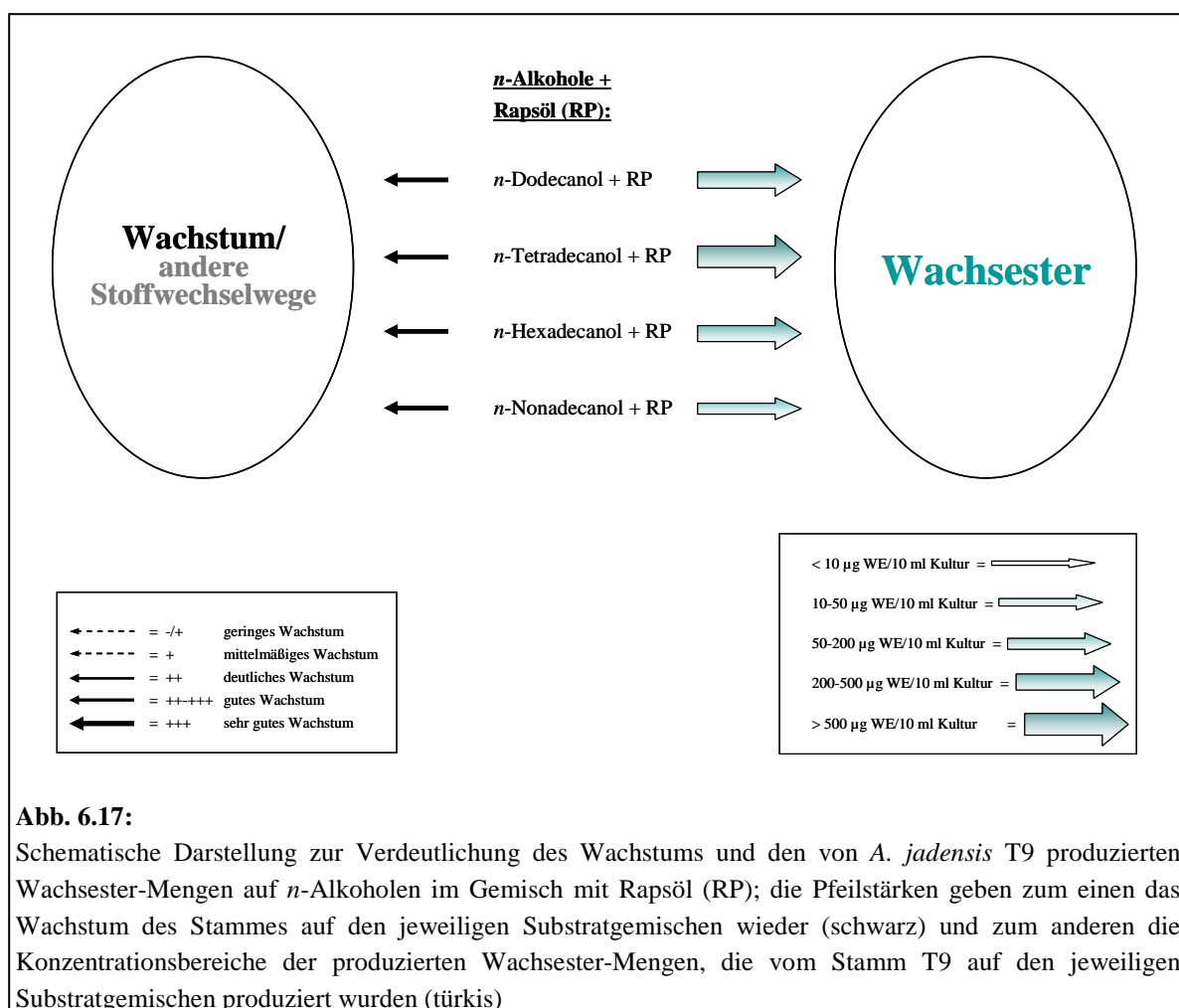
Interessant ist, dass *A. jadensis* T9 im Vergleich zum Einzelsubstrat *n*-Dodecanol auf einem Gemisch aus *n*-Dodecanol + RP deutlich höhere Konzentrationen an Wachsesteren im gleichen Mengenverhältnis produziert, wobei die Zusammensetzungen dieser WE aber identisch sind (Tabellen 6.9 und 6.11). Es werden jeweils nur die Wachsester Dodecanyl-Dodecanoat (12OOH/12OH) und um ein 12faches weniger Dodecanyl-Hexadecanoat (12OOH/16OH) gebildet. Daraus lässt sich schließen, dass der Stamm T9 auf diesem Gemisch ausschließlich den *n*-Alkohol (12OH) für die WE-Synthese verwendet, wobei dessen Bioverfügbarkeit für die WE-Synthese durch das Rapsöl deutlich gesteigert wird. Bei 14OH und 16OH im jeweiligen Gemisch mit Rapsöl unterscheiden sich die Zusammensetzungen der produzierten Wachsester von den Zusammensetzungen der auf dem jeweiligen Einzelsubstrat (14OH oder 16OH) produzierten WE. Im Gemisch mit Rapsöl wurden z. B. WE produziert, die als FS-Anteil Octadecensäure enthalten, was auf keinem der eingesetzten *n*-Alkohole als Einzelsubstrat der Fall war. Dies unterstützt wiederum die Aussage, dass der Stamm T9 sowohl auf dem „Einzelsubstrat“ Rapsöl (S. 82; Abschnitt *n*-Fettsäuren, Rapsöl und Triacylglyceride als WE-Vorläufer) als auch auf 14OH und 16OH im jeweiligen Gemisch mit Rapsöl (S. 99; Abschnitt *n*-Alkohole + Rapsöl als WE-Vorläufer) Octadecensäure aus dem Rapsöl aufnimmt und diese in die WE-Synthese einschleust.

Auf *n*-Nonadecanol mit Rapsöl produzierte *A. jadensis* T9 geringere Mengen der vergleichbaren WE, aber ein wesentlich größeres Spektrum an WE als auf dem Einzelsubstrat *n*-Nonadecanol. Die Menge der insgesamt produzierten WE nahm so leicht zu, und es entstanden mehr WE unterschiedlicher Kettenlänge (Tabellen 6.9 und 6.11). Sogar der beim Einzelsubstrat 19OH fehlende Haupt-WE C_{38:0} ist auf dem Gemisch 19OH + RP deutlich nachweisbar.

Auch hier könnte, wie vorher bereits vermutet (S. 99; Abschnitt *n*-Alkohole + Rapsöl als WE-Vorläufer), eine Änderung des Lösungsverhaltens des *n*-Alkohols durch das Rapsöl den Ausschlag gegeben haben, wodurch die Aufnahme des *n*-Nonadecanols und die daraus resultierende Bildung von Sekundärprodukten (WE) erleichtert wurden.

Abbildung 6.17 stellt die in den Kulturansätzen gebildeten Sekundärmetaboliten (WE) von *A. jadenis* T9 auf Gemischen aus Rapsöl + *n*-Alkoholen unterschiedlich langer C-Ketten schematisch gegenüber.

Bei Einsatz von einem Substratgemisch von *n*-Hexadecanol + Rapsöl (Tab. 6.11) war, ähnlich wie dies bei dem Einsatz von *n*-Alkoholen oder Rapsöl als Einzelsubstrat nachgewiesen wurde, sehr gutes Wachstum zu verzeichnen (Tabellen 6.8 und 6.9).



In diesen Versuchsansätzen führte der Einsatz des Substratgemisches zu einer Abnahme des Haupt-Wachsesters ($C_{32:0}$) wie auch der gesamt produzierten WE um das ca. 2,5-fache im Vergleich zum Einzelsubstrat *n*-Hexadecanol (Tab. 6.9). Die vorher beschriebene Funktion des Rapsöles als eine Art Lösungsvermittler scheint in diesem Versuchsansatz vermindert.

Bei der Verwendung als Einzelsubstrat konnte gezeigt werden, dass *A. jadensis* T9 auf *n*-Hexadecanol vergleichsweise große Mengen an Wachsestern produziert (Tab. 6.9), weshalb *n*-Hexadecanol als *n*-Alkohol mit 16 C-Atomen (S. 107; Abschnitt Substrate mit Kettenlängen von 16 C-Atomen als WE-Vorläufer und 6.3.3) für den Stamm T9 im Hinblick auf WE-Produktion und Ausbeute ein optimales Substrat zu sein scheint.

Auf einem Gemisch von *n*-Hexadecanol und Rapsöl (TAG) nehmen die Bakterienzellen möglicherweise beide Substrate parallel auf, was bedeutet, dass die Substrate um die Aufnahme in die Zelle konkurrieren. Infolge dessen erfolgt eine verminderte Aufnahme des *n*-Hexadecanols im Vergleich zum Angebot von *n*-Hexadecanol als alleinige C- und E-Quelle was eine ebenfalls verminderte WE-Produktion zur Folge hat. Somit gelangen zusätzlich zum *n*-Hexadecanol auch andere Substanzen in die Zelle. Gehen Bestandteile des Rapsöles in Stoffwechselwege der Zelle ein, die nicht mit der WE-Synthese korreliert sind, führt dies im Zusammenhang mit einer geringeren Aufnahmemenge an *n*-Hexadecanol trotzdem zu einer Verringerung der WE-Produktion. Jegliches im Gemisch mit dem optimalen Substrat *n*-Hexadecanol eingesetzte Substrat behinderte die optimale Nutzung des *n*-Alkohols. Wichtige Prozesse wie Substrataufnahme, Verlauf der Substratmetabolisierung und Synthese von Sekundärmetaboliten (wie z. B. WE) werden, bezogen auf die WE-Produktion, negativ beeinflusst.

Substrate mit Kettenlängen von 16 C-Atomen als WE-Vorläufer

Bei der Kultivierung auf verschiedenen Einzelsubstraten, die als Gemeinsamkeit Kettenlängen mit 16 C-Atomen aufweisen, zeigte *A. jadensis* T9 sehr gutes Wachstum mit deutlicher WE-Produktion (*n*-Hexadecansäure und *n*-Hexadecan), sehr gutes Wachstum mit sehr guter WE-Produktion (*n*-Hexadecanol) und sehr gutes Wachstum mit eher geringer WE-Produktion (*n*-Hexadecan und TP). Der Stamm T9 wächst folglich problemlos auf C_{16} -Substraten (Tab. 6.12).

Tab. 6.12:

Wachstum und Wachsester-Produktion von *A. jadenis* T9 in Kulturen mit definierten Zweikomponentengemischen mit 16er Kettenlänge oder Rapsöl (RP) als C- und E-Quelle (je 1% m/v gesamt) mit Angaben zu produzierten Wachsestern: Konzentration, C-Kettenlänge und Sättigungsgrad sowie eindeutig nachweisbare Zusammensetzungen; n. b. = nicht bestimmbar; n. i. = Signal nicht integrierbar; ++ = gutes Wachstum; +++ = sehr gutes Wachstum

C+E-Quelle (1% m/v gesamt)	Trübung	produzierte Wachsester		
		C-Zahl	Konz. [µg/10 ml Kultur]	Zusammensetzung
16OOH + TP	++	C _{30:0}	1,8	Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH) Hexadecanyl-Tetradecanoat (14OOH-16OH)
		C _{32:0}	12,7	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH)
16OH + TP	+++	C _{30:0}	16,9	Hexadecanyl-Tetradecanoat (14OOH-16OH) Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH)
		C _{31:0}	n. i.	Hexadecanyl-Pentadecanoat (15OOH-16OH) Pentadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-15OH)
		C _{31:1}	19,3	*
		C _{32:0}	143	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH)
		C _{32:1}	n. i.	Hexadecanyl-Hexadecenoat (16OOH:1-16OH)
16OH + RP	+++	C _{28:0}	2,96	Tetradecanyl-Tetradecanoat (14OOH-14OH) Dodecanyl-Hexadecanoat (16OOH-12OH)
		C _{30:0}	25,9	Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH) Hexadecanyl-Tetradecanoat (14OOH-16OH)
		C _{31:0}	7,44	Pentadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-15OH) Hexadecanyl-Pentadecanoat (15OOH-16OH)
		C _{32:0}	144	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH)
		C _{32:1}	19,2	Hexadecanyl-Hexadecenoat (16OOH:1-16OH)
		C _{34:0}	9,19	Hexadecanyl-Octadecanoat (18OOH-16OH) Octadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-18OH)
		C _{34:1}	37,4	Hexadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-16OH)
16OH + <i>n</i> -Hexadecen	+++	C _{28:0}	n. i.	Dodecanyl-Hexadecanoat (16OOH-12OH) Tetradecanyl-Tetradecanoat (14OOH-14OH) Hexadecanyl-Dodecanoat (12OOH-16OH)
		C _{30:0}	37,1	Hexadecanyl-Tetradecanoat (14OOH-16OH) Tetradecanyl-Hexadecanoat (16OOH-14OH)
		C _{31:0}	n. i.	Hexadecanyl-Pentadecanoat (15OOH-16OH) Pentadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-15OH)
		C _{32:0}	215	Hexadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-16OH)
		C _{32:1}	8,95	Hexadecanyl-Hexadecenoat (16OOH:1-16OH)
		C _{34:0}	n. i.	Hexadecanyl-Octadecanoat (18OOH-16OH) Octadecanyl-Hexadecanoat (16OOH-18OH)

* Die Fragmentierung ist mit den normalen Interpretationsmustern nicht vergleichbar; das Molekülion spricht zwar dafür, dass es sich um WE handelt, die aber nicht der normalen Fragmentierung folgen und bei denen es sich ebenfalls um Gemische handeln könnte

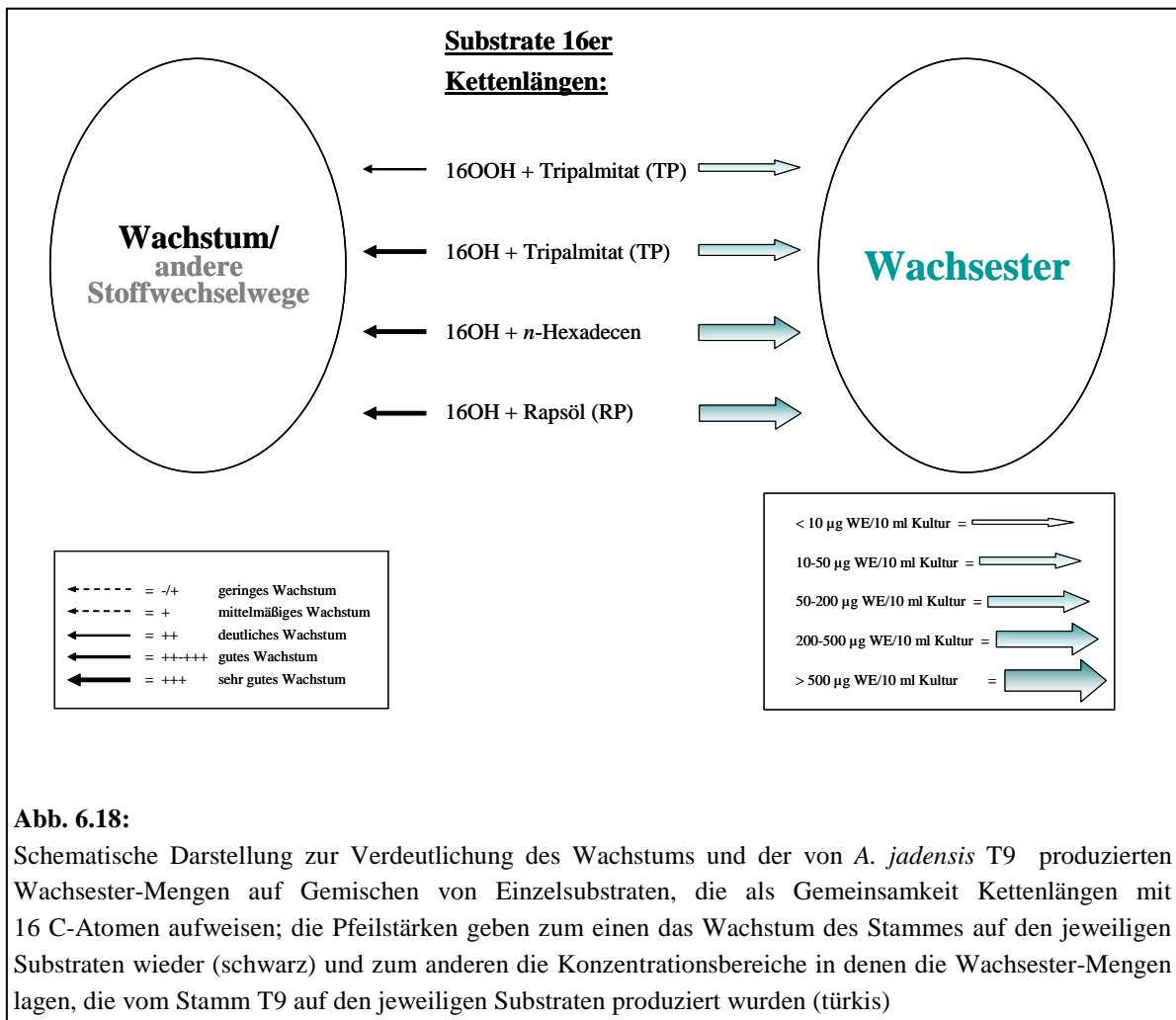
Die bevorzugte Verwendung dieser Substrate für die Bildung von Sekundärmetaboliten, wie z. B. Wachsester, variiert in Abhängigkeit von der jeweiligen Substanzklasse. Für eingehendere Untersuchungen hierzu wurden zusätzlich Zweikomponentengemische mit Substraten aus unterschiedlichen Substanzklassen, aber gleicher Kettenlänge (C_{16}) eingesetzt, um eventuelle Einflüsse der verschiedenen Substanzklassen auf die WE-Produktion zu bestimmen (Tab. 6.12).

Wie aus Tabelle 6.12 ersichtlich wird bei Einsatz einer Mischung aus *n*-Hexadecansäure + Tripalmitat, die im Endeffekt nur FS 16er Kettenlänge als Substrat liefert, eindeutig bestätigt, dass auf *n*-Hexadecansäure als Einzelsubstrat die Kettenlänge bei der WE-Produktion meist unverändert bleibt und eine vorherige Kettenverkürzung eher selten stattfindet. Desaturase-Aktivität und Kettenverlängerungen, wie bei den *n*-Alkoholen, wurden nicht nachgewiesen. Genau wie beim Einsatz von *n*-Dodecanol und *n*-Dodecanol + Rapsöl (S. 100; Abschnitt *n*-Alkohole + Rapsöl als Wachsester-Vorläufer), ändert sich die mengenmäßige Verteilung der auf *n*-Hexadecansäure und *n*-Hexadecansäure + TP produzierten WE nicht, wodurch die vorangegangenen Ergebnisse bestätigt werden (Tab. 6.13). Auf dem Substratgemisch *n*-Hexadecanol + Tripalmitat (Tab. 6.12) erfolgt die direkte Veresterung der aus den Substraten gewonnen Säure- und Alkoholkomponenten sowie vorherige Kettenverkürzung und Desaturase-Aktivität wie bei *n*-Alkoholen als Einzelsubstrat auch. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann allerdings nicht nachgewiesen werden, ob hierbei nur das *n*-Hexadecanol oder beide Komponenten des Gemisches metabolisiert werden. Beim Einsatz von *n*-Hexadecanol + RP als Substratgemisch finden sich Wachsester-Synthese aus den gewonnenen Säure- und Alkoholkomponenten ohne Veränderung der Kettenlänge, vorherige Kettenverkürzung und Kettenverlängerung sowie mögliche Desaturase-Aktivität wieder. Obwohl Desaturase-Aktivität bei *A. jadensis* T9 während der WE-Synthese auf *n*-Alkoholen nachgewiesen wurde (Tab. 6.9), kann bei einem Gemisch aus *n*-Hexadecanol + RP nicht festgestellt werden, ob die einfache Unsättigung bei einigen der produzierten WE durch Desaturase-Aktivität oder durch die Aufnahme einer ungesättigten Komponente aus dem Rapsöl entsteht.

Auf *n*-Hexadecanol + *n*-Hexadecen produziert *A. jadensis* T9 ein ähnliches WE-Spektrum wie auf dem Einzelsubstrat *n*-Hexadecanol (Tabellen 6.9 und 6.12). Die Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass auf dem Substratgemisch die gleichen Reaktionsmechanismen bei der WE-Synthese ablaufen wie beim Einzelsubstrat.

Ob einfach ungesättigte Anteile der WE über Desaturase-Aktivität des Stammes T9 oder über die Aufnahme des *n*-Hexadecens entstehen, ist dabei nicht erkennbar. Der Einsatz von *n*-Hexadecen im Substratgemisch mit *n*-Hexadecanol führte zu keiner Erhöhung an einfach ungesättigten Wachsester im Vergleich zum Einzelsubstrat *n*-Hexadecanol (Tab. 6.9). Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, dass möglicherweise nur der *n*-Alkohol zu Wachsestern metabolisiert wird und das *n*-Hexadecen nicht in die WE-Synthese eingeht.

Auch die Tatsache, dass der auf dem Einzelsubstrat *n*-Hexadecen überwiegend produzierte WE Hexadecenyl-Hexadecenoat (C_{32:2}) auf diesem Gemisch nicht produziert wird (Tab. 6.10), unterstützt diese Hypothese. Abbildung 6.18 fasst die Ergebnisse von Tabelle 6.12 schematisch zusammen.



In allen Fällen entstanden WE mit 32 C-Atomen als Hauptprodukt ($\geq 67\%$ der produzierten WE). Ausnahmen hiervon waren *n*-Hexadecan mit 33% C_{32} -Wachsester und TP, das ohnehin zu nur schwer nachweisbarer WE-Produktion führte (max. 2 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$ Kultur) und damit keine genaue Analyse der WE-Zusammensetzung erlaubte (Tabellen 6.8 und 6.10).

Unabhängig vom jeweiligen Haupt-WE unterschieden sich die jeweilige Gesamtmenge der produzierten WE und das jeweilige WE-Spektrum. Die Kettenlängen der überwiegend produzierten WE Hexadecanyl-Hexadecanoat ($C_{32:0}$), im Fall von *n*-Hexadecen Hexadecenyl-Hexadecenoat ($C_{32:2}$), leiten sich allerdings auch hier direkt von den Kettenlängen der eingesetzten Substrate bzw. Substratgemische ab. Die WE bestehen aus einer C_{16} -Säure und einem C_{16} -Alkohol. Hinweise auf eine direkte Veresterung der Säure- bzw. Alkoholkomponenten (abgeleitet von den eingesetzten Substraten) wurden hierdurch bestätigt. Die produzierten Mengen an C_{32} -Wachsester auf Einzelsubstraten, Substratgemischen mit 16er Kettenlänge und einem Gemisch aus *n*-Hexadecanol und Rapsöl werden in Abbildung 6.19 verglichen.

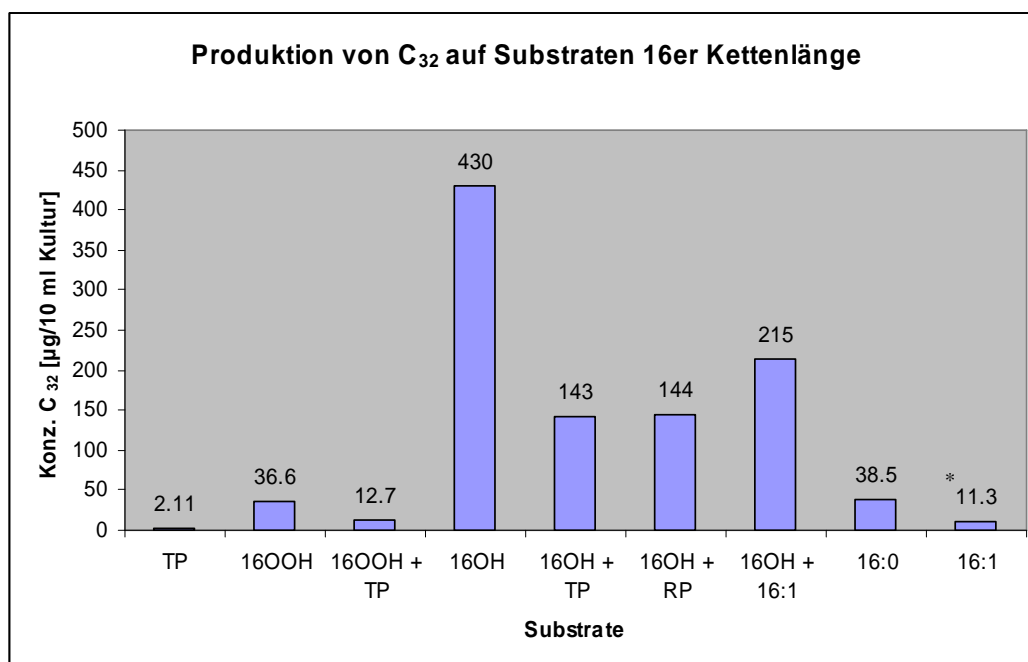


Abb. 6.19:

Vergleich der von *A. jadensis* T9 produzierten Konzentrationen an Haupt-Wachsester (C_{32}) auf Einzelsubstraten (je 1% m/v) und Zweikomponentengemischen (1% m/v gesamt) mit Kettenlängen von 16 C-Atomen (Ausnahme Rapsöl); Tripalmitat (TP), *n*-Hexadecansäure (16OOH), *n*-Hexadecanol (16OH), *n*-Hexadecen (16:1), Rapsöl (RP), *n*-Hexadecan (16:0); * = $C_{32:2}$

Aus Abbildung 6.19 ist zu erkennen, dass die Kombinationen von *n*-Hexadecanol mit TP, Rapsöl oder *n*-Hexadecen zu einer Abnahme der produzierten WE im Vergleich zum Einzelsubstrat *n*-Hexadecanol führten. Die Konzentration des Hauptwachses C_{32:0} reduzierte sich in allen Fällen um mindestens die Hälfte. Bemerkenswert ist, dass die Ansätze von *n*-Hexadecanol + Tripalmitat und *n*-Hexadecanol + Rapsöl (TAG-Gemisch) zu gleichen Ausbeuten an C₃₂-Wachsestern führten.

Die Kettenlängen der in den Triacylglyceriden gebundenen Fettsäuren haben dennoch keinen Einfluss auf die WE-Produktion. Beide Substrate mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen (TP und RP) führen jeweils im Gemisch mit *n*-Hexadecanol zu einer deutlichen Verringerung der Konzentration an produziertem Hauptwachs (C_{32:0}) gegenüber der Ausbeute mit *n*-Hexadecanol als Einzelsubstrat (Abb. 6.19). Es wurde bereits die Möglichkeit diskutiert, dass Komponenten des Rapsöles (TAG) mit dem *n*-Hexadecanol um die Aufnahme in die Zelle konkurrieren (S. 102; Abschnitt *n*-Alkohole + Rapsöl als WE-Vorläufer). Aufnahme und Spaltung der TAG bedeuten zusätzlich einen energetischen Aufwand für die Zelle. Weiterhin gibt es Grund zu der Annahme, dass durch das Rapsöl die Physiologie der Zelle so beeinflusst wird, dass *n*-Hexadecanol bevorzugt in andere Stoffwechselwege und nicht in die WE-Synthese eingeschleust wird. Für die gezielte Produktion geschneiderter WE ähnlich denen des menschlichen Sebums und eine optimale Anreicherung von Rapsöl mit diesen Wachsestern (1.2) ist eine Kultivierung von *A. jadensis* T9 auf einem Gemisch aus *n*-Alkoholen + RP nicht geeignet.

Auch bei einem Substratgemisch aus *n*-Hexadecansäure + TP sank die Menge an Wachsestern mit 32er Kettenlänge erheblich verglichen mit der WE-Produktion mit *n*-Hexadecansäure als Einzelsubstrat (Abb. 6.19).

Die Kombination von *n*-Hexadecanol mit Substraten wie *n*-Hexadecen oder TP, die auch als Einzelsubstrat zu wenig WE-Produktion führten, verringern eher die WE-Produktion, selbst mit einem für die WE-Produktion optimalen Substrat wie dem *n*-Hexadecanol.

6.3.2.3 Mehrkomponentengemische als Wachsester-Vorläufer

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es möglich ist, mit *A. jadensis* T9 Wachsester bestimmter Kettenlängen zu schneiden. Die Kettenlängen der WE sind dabei abhängig von den Kettenlängen der angebotenen Substrate, da der Stamm zur Verfügung stehendes Substrat überwiegend ohne Veränderung der Kettenlänge direkt für die WE-Synthese einsetzt, vorausgesetzt er nutzt die Substrate zur WE-Produktion. Aufgrund dessen wurde dem Stamm T9 ein Gemisch aus einer *n*-Fettsäure und verschiedenen *n*-Alkoholen angeboten. Ziel war, hierdurch ein WE-Spektrum voraussagbarer Kettenlängen zu generieren, um so z. B. die WE des menschlichen Sebums zu imitieren.

Die Gemische wurden so gewählt, dass der Stamm nur die Energie für eventuelle Aufnahmemechanismen und die Veresterung der Substrate aufwenden müsste, nicht für die Verlängerung bzw. Verkürzung der C-Ketten der Substrate. Auch Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen für die Umwandlung von Substrat zu *n*-Fettsäuren bzw. *n*-Alkoholen, die für die Bildung von Wachsestern essentiell sind, entfallen, da dem Stamm sowohl Säurekomponente als auch Alkoholkomponenten zur Verfügung gestellt werden.

In weiteren Versuchen wurde einem Mehrkomponentengemisch Rapsöl in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt, um dessen Einfluss zu untersuchen und hiermit bereits vorliegende Ergebnisse dieser Arbeit, die unterschiedliche Effekte von RP auf angebotene Substrate zeigen (S. 99; Abschnitt *n*-Alkohole + RP als Wachsester-Vorläufer), zu untermauern. Es ist davon auszugehen, dass die Relation der eingesetzten Substratmengen im Gemisch einen Einfluss auf die bakterielle WE-Produktion und die WE-Ausbeute hat. Für die Bestimmung eines optimalen Substratangebotes bei diesen Versuchsansätzen im Hinblick auf die WE-Produktion wurde dem Stamm T9 (i) ein äquimolares Gemisch aus *n*-Hexadecan- bzw. *n*-Hexadecensäure mit *n*-Alkoholen unterschiedlicher Kettenlänge, (ii) ein Gemisch aus *n*-Hexadecensäure im Überschuss und *n*-Alkoholen unterschiedlicher Kettenlänge und (iii) ein Gemisch aus *n*-Hexadecensäure im Überschuss, *n*-Alkoholen unterschiedlicher Kettenlängen und 0,1% bzw. 0,5% RP angeboten.

Bei allen eingesetzten Mehrkomponentengemischen zeigte sich in Kontrollansätzen, dass sich die Substrate bei den verwendeten Inkubationsbedingungen (4.1.2) auch ohne bakterielle Einwirkung abiotisch verestern. Aussagen über die bakterielle WE-Produktion auf Mehrkomponentengemischen waren daher nicht möglich.

6.3.3 Fazit (artifizielles Sebum)

Eine Übersicht über die verschiedenen eingesetzten Substrate und Substratgemische, die *A. jadensis* T9 für die WE-Produktion nutzt, sowie deren Effektivität hinsichtlich der bakteriellen WE-Produktion, ist schematisch in Abbildung 6.20 dargestellt.

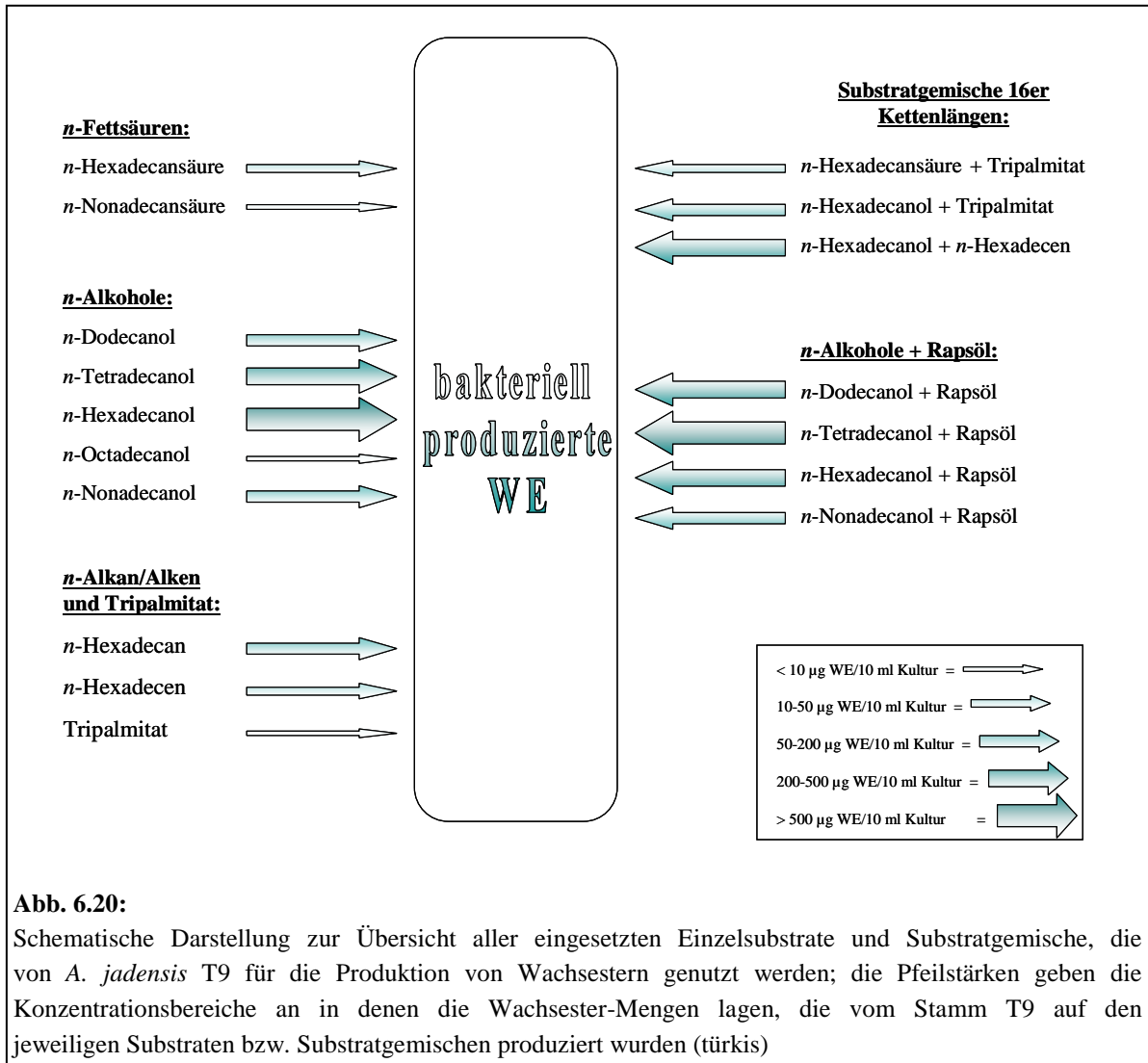


Abbildung 6.20 zeigt deutlich, dass Ansätze mit *n*-Hexadecanol als Einzelsubstrat und *n*-Tetradecanol im Gemisch mit Rapsöl die höchsten WE-Ausbeuten erzielten. Unabhängig von der Substanzklasse zeigt sich, dass *A. jadensis* T9 auf nahezu jedem Substrat, das in den WE-Stoffwechsel eingeht einen WE in größerer Menge produziert.

Es dominiert jeweils ein Wachsester, der der direkten Nutzung der Substrate ohne eine Veränderung der Kettenlänge, wie z. B. durch Elongation oder Kürzung (β -Oxidation), für die WE-Synthese entspricht. Auf *n*-Tetradecanol beispielsweise produziert *A. jadensis* T9 WE mit einer C-Kettenlänge von C_{28:0} in deutlich größerer Menge als WE anderer Kettenlängen. WE anderer Kettenlängen entstehen durch Kettenverlängerungen bzw. Kettenverkürzungen der Substrate vor der WE-Synthese. Dies geschieht hauptsächlich über das Anhängen (Elongation) und Abspalten (β -Oxidation) von C₂-Einheiten. Außerdem wurden Veränderungen der Kettenlängen um C₁-Einheiten beobachtet, was bei geradkettigen Substraten zum Nachweis ungeradkettiger Säure- oder Alkoholanteile in den Wachsestern führt. Da *Alcanivorax jadensis* T9 nur über geringe Konzentrationen an ungeradkettigen Fettsäuren verfügt (Bruns & Berthe-Corti, 1999), ist davon auszugehen, dass im Laufe der Substratmetabolisierung Abspaltungs- bzw. Elongationsreaktionen von C₁-Einheiten in der Zelle stattfinden. Die hierfür zuständigen Mechanismen sind noch nicht bekannt.

Obwohl über den Aufnahmemechanismus von Alkoholen in Bakterien wenig bekannt ist, gibt es Hinweise, dass das eingesetzte *n*-Tetradecanol von *A. jadensis* T9 hauptsächlich als Ganzes in die Zelle aufgenommen und zum Teil zur C₁₄-FS oxidiert wird. Eine Veresterung des *n*-Tetradecanols kann also mit einer C₁₄-FS des Zellstoffwechsels oder direkt mit einer aus der Oxidation des *n*-Tetradecanols entstandenen C₁₄-FS erfolgen. Untersuchungen der WE-Fraktion mit Hilfe der GC/MS ergeben, dass Säure- und Alkoholkomponente in diesem Fall analog zum eingesetzten *n*-Tetradecanol Kettenlängen von jeweils 14 C-Atomen haben. Analog verhält es sich bei anderen Substratalkoholen und einigen weiteren Substraten. Auch wenn zusätzlich zu den produzierten Haupt-Wachsestern in geringerem Maße WE anderer C-Kettenlänge entstehen, ist die Voraussetzung für ein gezieltes Schneiden von bakteriell produzierten Wachsestern über die Substratzugabe gegeben. Die nachgewiesene Produktion von je einem Haupt-Wachsester ermöglicht es, allein über die Zugabe ausgewählter Substrate bestimmte Variationen innerhalb der Wachsester-Eigenschaften, wie z. B. Schmelzpunktverschiebungen, bei den bakteriell produzierten Wachsestern herbeizuführen.

A. jadensis T9 ist in der Lage, auf allen Substraten mit 16er-Kettenlänge zu wachsen, egal ob diese als Einzelsubstrat oder im Zweikomponentengemisch angeboten werden. Vergleichend wird eine variierende WE-Produktion sowohl auf den Einzelkomponenten verschiedener Substanzklassen als auch beim Einsatz von Zweikomponentengemischen dieser Einzelsubstrate beobachtet.

Waren Tripalmitat oder *n*-Hexadecen im Zweikomponentengemisch mit einem Einzelsubstrat (z. B. *n*-Hexadecanol) enthalten, auf dem der Stamm gute WE-Produktion zeigte, sank die Menge der produzierten Haupt-WE (C_{32:0}) um bis zu zwei Drittel. Möglicherweise bestehen Mechanismen, die in Konkurrenz zu der Aufnahme und der Verstoffwechslung des leichter nutzbaren Substrates stehen, wie z. B. die Spaltung von TP durch Lipase oder die aktive Aufnahme von Fettsäuren. Auffällig bleibt, dass der Stamm T9 die größten Mengen WE produziert, wenn *n*-Hexadecanol als Substrat angeboten wird, sei es als Einzelsubstrat oder im Substratgemisch. Insgesamt zeigt der Organismus eine Selektivität für Substrate mit C₁₆-Kettenlängen und produziert auch innerhalb unterschiedlicher Substanzklassen (*n*-Fettsäuren oder *n*-Alkoholen) ein Optimum an Wachsestern auf diesen Substraten.

Die Menge der produzierten Haupt-WE auf *n*-Dodecanol bzw. *n*-Tetradecanol im Gemisch mit Rapsöl steigt um das Vierfache im Vergleich zu den jeweiligen Einzelsubstraten. Das Öl stellt für diese beiden *n*-Alkohole möglicherweise eine Art Lösungsvermittler dar, durch den die Substrataufnahme und somit die WE-Produktion noch gesteigert werden.

Im Gemisch mit *n*-Nonadecanol führt das Rapsöl zu keiner Steigerung der WE-Menge, wohl aber zu einer Erweiterung des WE-Spektrums. Verschiedene WE unterschiedlicher Kettenlänge und Sättigung werden produziert. Ein Gemisch aus *n*-Hexadecanol + RP führt zu einer Verringerung der WE-Produktion. Das Rapsöl hat im Gemisch mit *n*-Alkoholen somit unterschiedliche Effekte auf deren Verstoffwechslung zu Wachsestern.

Neben seiner Funktion als möglicher Lösungsvermittler kann das Rapsöl auch eine Funktion als „Einzelsubstrat“ (TAG-Gemisch) für die gezielte WE-Synthese erfüllen. *A. jadensis* T9 produziert auf dem Rapsöl WE und nutzt dabei die überwiegend im Rapsöl vorkommende Octadecensäure für den direkten Einsatz in der WE-Synthese.

Die Wachsester-Produktion von Stämmen der Gattung *Acinetobacter* mit FS- und Alkoholkomponenten im Bereich C₁₄-C₁₈ (Fixter *et al.*, 1986) und von *Alcanivorax jadensis* T9 mit FS- und Alkoholkomponenten im Bereich C₁₂-C₂₀ lassen den möglichen Rückschluss zu, dass marine Bakterien für den WE-Metabolismus ausschließlich FS- und Alkoholkomponenten bestimmter Kettenlängen verwenden. Mit einer Ausnahme wurden von *A. jadensis* T9 auf den eingesetzten Substraten so gut wie keine WE-Komponenten mit Kettenlängen von mehr als 19 C-Atomen für die WE-Synthese verwendet.

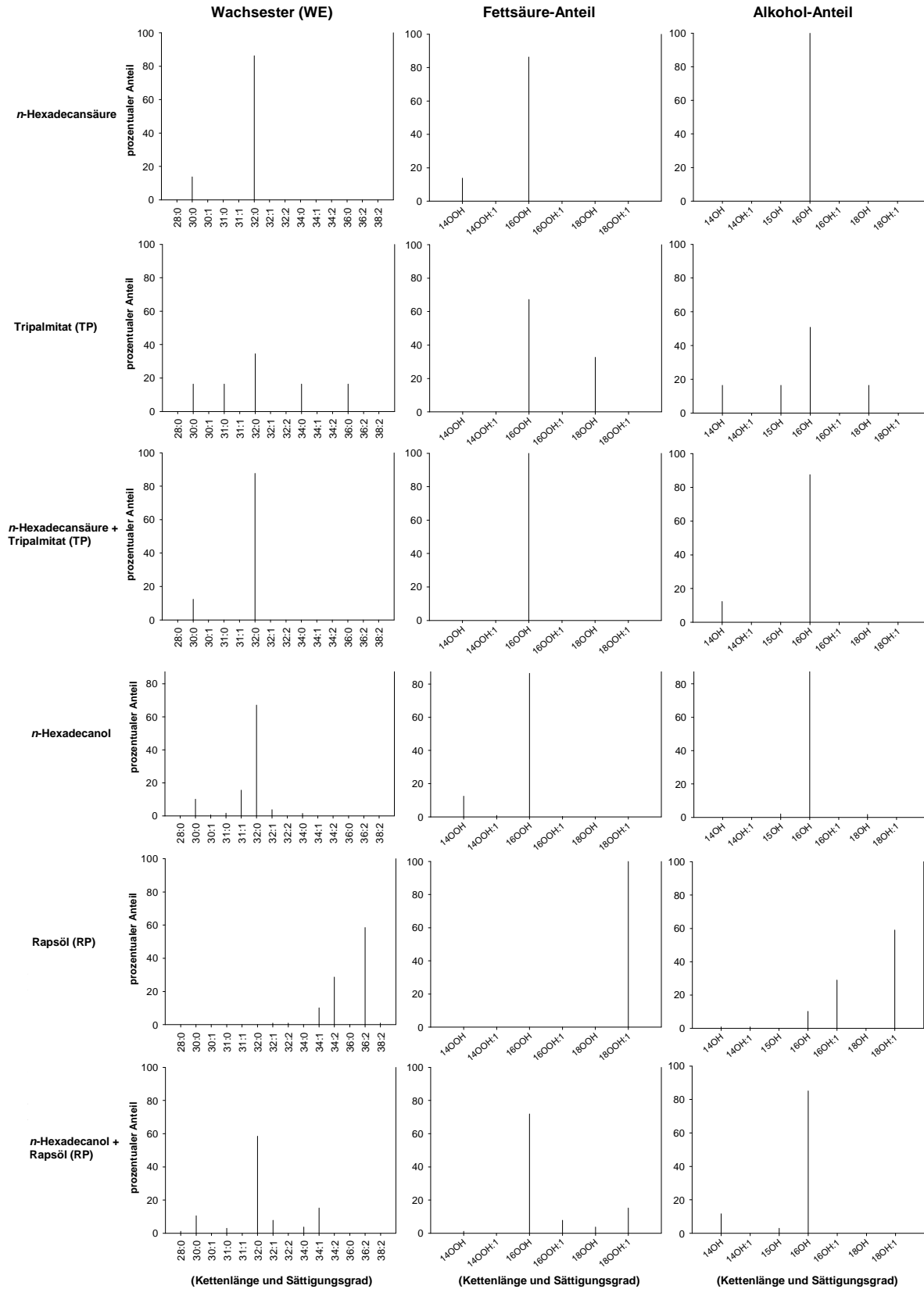
Möglicherweise ist eine aktive Aufnahme über ein Transportprotein, wie z. B. Fad L, auf FS mit Kettenlängen von höchstens 19 C-Atomen begrenzt oder zumindest bei FS mit längeren C-Ketten erschwert. Die Spezifität der WS/DGAT könnte ebenfalls eine Rolle spielen, wenn das Enzym eine Veresterung von FS mit einer Kettenlänge von mehr als 19 C-Atomen nicht mehr oder eingeschränkt katalysiert. Wältermann *et al.* (2007) beschreiben die höchste Aktivität der WS/DGAT mit Alkoholen der Kettenlängen C₁₄-C₁₈. Eine Einschränkung der bei Bakterien für die WE-Synthese einsetzbaren Substrate anhand ihrer Kettenlängen kann also sowohl über den Transportmechanismus in die Zelle als auch durch den WE-Metabolismus innerhalb der Zelle reguliert werden.

Bei dem Versuch weitere WE bakteriell zu schneiden, wurden *A. jadensis* T9 Mehrkomponentengemische aus gezielt ausgewählten Einzelsubstraten als WE-Vorläufer angeboten. Es stellte sich schnell heraus, dass sich die einzelnen Komponenten unter den angewandten Kulturbedingungen zu einem Teil selbst veresterten und somit den Nachweis bakteriell produzierter WE erschweren bzw. unmöglich machten. Dies bedeutet im Hinblick auf die Herstellung eines mit Wachsestern angereicherten Pflanzenöles keinen Nachteil, da der Einsatz von Einzelsubstraten das Schneiden bakteriell produzierter WE ermöglicht, technologisch einfacher zu handhaben und auch kostengünstiger ist.

Versuche Mehrkomponentengemische unter Kulturbedingungen einzusetzen, die eine Selbstveresterung dieser Komponenten verhindern und es den Bakterien somit ermöglichen alle Komponenten des Gemisches als Substrat zu nutzen sind deshalb nicht erforderlich.

Ein Vergleich der Säure- und Alkoholkomponenten in Wachsestern, die von *A. jadensis* T9 auf einigen Einzelsubstraten und deren Substratgemischen produziert wurden (Tab. 6.13), erlaubt zusätzliche Aussagen über die Speicherung bzw. Fixierung dieser Substrate als WE in den Zellen.

Tab. 6.13: Vergleich der prozentualen Anteile der von *A. jadensis* T9 auf bestimmten Einzelsubstraten und deren Gemischen gesamt produzierten Wachsester, sowie der Fettsäure- bzw. Alkoholanteile dieser Wachsester; ersichtlich sind hierbei die direkte Einschleusung der Substrate in die Wachsester-Synthese (ohne Veränderung der Kettenlängen) und vorherige Kettenverkürzungen oder Kettenverlängerungen; in mengenmäßig geringen Anteilen vorhandene Isomere bei Wachsester-Gemischen wurden in der Darstellung vernachlässigt



Verschiedene Aspekte geben Aufschluss darüber, ob (i) *n*-Fettsäuren bzw. *n*-Alkohole bestimmter Kettenlänge bevorzugt für die WE-Synthese genutzt werden, (ii) Verlängerungen bzw. Verkürzungen der C-Ketten der eingesetzten Substrate vor der Veresterung stattfinden (was zusätzliche Hinweise gibt, ob die Substrate direkt in die WE-Synthese eingehen) oder (iii) DB in die C-Ketten der Substrate durch Desaturase-Aktivität eingefügt werden. Werden Substrate überwiegend ohne Veränderungen der Kettenlängen (Tab. 6.13) in die WE-Synthese eingeschleust, wie dies die vorliegenden Ergebnisse zeigen, deutet dies darauf hin, dass die Wachsester-Produktion der Beseitigung hoher intrazellulärer Konzentrationen dieser Substrate dient.

In diesen Fällen kann die WE-Synthese als eine Art Entgiftungsmechanismus der Zellen betrachtet werden. Auch das Wachstum von *A. jadensis* T9 auf einer Fettsäure (*n*-Hexadecansäure) mit antimikrobiellen Eigenschaften (S. 80; Abschnitt *n*-Fettsäuren, Rapsöl und Triacylglyceride als Wachsester-Vorläufer) und einhergehend deutlicher WE-Produktion verstärkt diese Hypothese.

Tabelle 6.13 verdeutlicht gewisse Abläufe der Wachsester-Synthese, wie z. B. dass die vorher beschriebene direkte Substratumsetzung zu Fettsäuren bzw. Alkoholen für die WE-Synthese ohne Veränderung der Substratkettenlängen ein bevorzugter Mechanismus des Stammes T9 bei der WE-Synthese ist. FS- und Alkoholanteil der jeweils hauptsächlich produzierten WE haben die gleiche Kettenlänge wie das eingesetzte Substrat.

Auffällig ist, dass bei der Nutzung von *n*-Hexadecansäure durch *A. jadensis* T9 Kettenverkürzungen vor der WE-Produktion überwiegend die FS-Anteile der WE betreffen. Es findet keine Verkürzung der Substratkettenlänge in Verbindung mit der Reduktion zum korrespondierenden Alkohol statt. Auf Tripalmitat produziert der Stamm T9 ein größeres WE-Spektrum als auf der *n*-Hexadecansäure, bei dem der produzierte Haupt-WE mit <40% einen weniger hohen Anteil ausmacht als bei den anderen in Tabelle 6.13 aufgeführten Substraten bzw. Substratgemischen. Kettenverkürzungen oder Kettenverlängerungen vor der WE-Produktion betreffen hierbei FS- und Alkoholanteil der WE. Der Einsatz von *n*-Hexadecansäure + TP im Gemisch zeigt eine „Mischung“ der auf den jeweiligen Einzelsubstraten nachgewiesenen Reaktionsmechanismen. Der Haupt-WE, der eine direkte Nutzung der Substrate für die WE-Synthese anzeigt, wie bei der *n*-Hexadecansäure, einen hohen Anteil der gesamt produzierten WE aus. Kettenverkürzungen betreffen überwiegend die Alkoholanteile der WE.

Der Stamm T9 produziert auf manchen Gemischen, wie auch auf diesem, WE gleicher Zusammensetzung zu gleichen prozentualen Anteilen wie auf einem der enthaltenen Einzelsubstrate. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Stamm T9 zwar beide Substrate für die WE-Synthese verwendet. Die Metabolisierung von *n*-Hexadecansäure verläuft in diesem Fall aber bevorzugt.

Bei der Wachsester-Produktion von *A. jadensis* T9 auf *n*-Hexadecanol können Kettenverkürzungen bzw. Kettenverlängerungen für die FS- und Alkoholanteile der produzierten WE nachgewiesen werden. Aus der Struktur der produzierten WE folgt, dass zu über 60% eine direkte Einschleusung des Substrates in Form des Alkohols direkt und seiner korrespondierenden Säure erfolgt.

Beim Einsatz von Rapsöl ist anhand der FS-Anteile eine direkte Einschleusung der Fettsäuren aus dem Öl in die WE-Synthese zu beobachten (Tab. 6.13). Dagegen sind im Alkoholanteil der produzierten WE Verkürzungen der Kettenlängen zu erkennen. Auf einem Gemisch von *n*-Hexadecanol + Rapsöl finden sich ebenfalls Hinweise darauf, dass *A. jadensis* T9 beide Substrate zu Wachsestern metabolisiert. Der produzierte Haupt-WE ist Hexadecanyl-Hexadecanoat, was über die Kettenlängen auf die Verwendung des *n*-Hexadecanols schließen lässt, wohingegen die Zunahme an Wachsestern mit Kettenlängen von mehr als 32 C-Atomen und einfacher Unsättigung auf die Metabolisierung des Rapsöles hindeutet. Der Einsatz von definierten Substraten sowohl einzeln als auch im Gemisch bestätigt somit die auf den jeweiligen Einzelsubstraten nachgewiesenen Reaktionsmechanismen (Tab. 6.13).

7 Zusammenfassung und Ausblick

7.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die bakterielle Produktion von geschneiderten Wachsesteren unter Einsatz von Pflanzenöl und diversen Reinsubstanzen (Einzelkomponenten und deren Gemische) als C-Quelle und Wachsester-Vorläufer (Precursor) untersucht. Die Untersuchungen erfolgten in Verbindung mit einem Forschungsprojekt, dessen Ziel die Anreicherung von Pflanzenölen mit bakteriellen Wachsesteren war. Durch die Anreicherung des Pflanzenöles mit gezielt geschneiderten Wachsesteren, die denen des menschlichen Sebums ähneln, sollte das Öl hinsichtlich einer möglichen Verwendung in der Hautpflege zu einem optimalen Rohstoff veredelt werden. In vorangegangenen Untersuchungen sind verschiedene marine Bakterienisolate durch ausgeprägte Wachsester-Produktion aufgefallen. Um sowohl den optimalen Produktionsstamm, als auch das geeignetste Pflanzenöl zu bestimmen wurden marinen Isolate in einem Screening verschiedene Pflanzenöle als Substrat für die WE-Produktion angeboten. Insgesamt 38% von 42 untersuchten Isolaten waren in der Lage, mit einem angebotenen Pflanzenölgemisch zu wachsen und Wachsester zu produzieren. Zellwachstum ist hierbei eine grundsätzliche Voraussetzung für WE-Produktion, obwohl keine direkte Kopplung zwischen Wachstum und WE-Produktion nachgewiesen wurde.

Unter den fünf getesteten Einzelölen wurde Rapsöl als optimales Substrat für die WE-Produktion ermittelt, auf dem 60% der 20 auf dem „Einzelsubstrat“ Rapsöl getesteten Isolate Wachsester produzieren. Von den eingesetzten Stämmen erwies sich *Alcanivorax jadensis* T9 als geeigneter Produktionsstamm, da er auf allen fünf eingesetzten Einzelölen Wachsester produziert. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass der *A. jadensis* T9 über eine Anlagerung Kontakt zu den im Medium befindlichen Rapsöltropfen herstellt. Nach 4 d Kulturzeit des Stammes T9 auf Rapsöl waren Zelleinschlüsse unterschiedlicher Elektronendichte nachweisbar. Wird *Alcanivorax jadensis* T9 mit Rapsöl als einziger C- und E-Quelle kultiviert, produziert er ein- und zweifach ungesättigte WE mit Kettenlängen von C₃₂-C₃₈, was in etwa der WE-Verteilung des Sebums (C₃₀-C₄₀) von speziell untersuchten Probanden entspricht. Bei den Probanden wurden Wachsester mit Kettenlängen von C₃₀-C₄₀ nachgewiesen, von denen die einfach ungesättigten den Hauptanteil ausmachen.

Die Wachsester-Verteilung war unabhängig von Alter und Geschlecht relativ stabil. Bei den gesättigten und einfach ungesättigten Wachsestern des Sebums enthält der Säureanteil hauptsächlich Fettsäuren mit Kettenlängen von 16 C-Atomen. Die Wachsester des menschlichen Sebums bestehen häufig aus einem Gemisch von Isomeren.

Über den Einsatz von Einzelsubstraten (*n*-Fettsäuren, *n*-Alkoholen, *n*-Alkanen/Alkenen und TAG) sowie Gemischen dieser Einzelsubstrate als C- und E-Quelle wurde getestet, ob die bakterielle Produktion von geschneiderten Wachsestern möglich ist. Die erhaltenen Wachsester wurden gaschromatographisch analysiert und quantifiziert, ihre Identifizierung erfolgte mit Hilfe der GC-MS-Kopplung.

Beim Einsatz von *n*-Fettsäuren als Substrat zeigte *Alcanivorax jadensis* T9 mit drei von sechs getesteten *n*-Fettsäuren gutes Wachstum. Nur auf *n*-Hexadecansäure produzierte er ausreichend Wachsester, um GC- und GC/MS-Analysen der Wachsester durchführen zu können.

Mit allen angebotenen *n*-Alkoholen zeigte *A. jadensis* T9 sehr gutes Wachstum und Wachsester-Produktion. Mit vier der sechs *n*-Alkohole produzierte er vergleichsweise hohe Wachsester-Konzentrationen von bis zu 640 µg/10 ml Kultur. Dies lässt den Schluss zu, dass die angebotenen *n*-Alkohole (C₁₁-C₁₉) im Vergleich zu den getesteten *n*-Fettsäuren (C₁₁-C₁₉) die geeigneteren Substrate für die Wachsester-Produktion sind.

Besonders die einzelnen *n*-Alkohole und Rapsöl allein stellten gute Einzelsubstrate für die Wachsester-Produktion von *A. jadensis* T9 dar. Substratgemische aus Rapsöl plus *n*-Dodecanol bzw. *n*-Tetradecanol führen, im Vergleich zu den Einzelsubstraten *n*-Dodecanol und *n*-Tetradecanol, zu einer deutlichen Steigerung der Wachsester-Produktion. Das Gemisch Rapsöl plus *n*-Nonadecanol führte nur zu einer geringen Steigerung der produzierten Wachsester-Menge, jedoch zu einem stark erweiterten Wachsester-Spektrum. In Gemischen aus *n*-Alkoholen mit Rapsöl scheint das Rapsöl daher einen Einfluss auf das Lösungsverhalten der *n*-Alkohole und damit auch deren Bioverfügbarkeit zu haben. Ob umgekehrt die *n*-Alkohole ebenfalls die Bioverfügbarkeit des Rapsöles beeinflussen, war nicht ersichtlich.

Substrate mit einer Kettenlänge von 16 C-Atomen führten bei allen eingesetzten Substanzklassen zu einer Produktion von Wachsestern. Versuche, durch Einsatz von Zweikomponentengemischen von Substraten mit 16er Kettenlänge die Wachsester-Ausbeute zu steigern oder die Wachsester-Zusammensetzung zu erweitern, waren jedoch ohne Erfolg.

Auffällig ist, dass *A. jadensis* T9 auf den meisten der angebotenen Substrate jeweils einen Wachsester bevorzugt synthetisiert. Die Kettenlängen von Säure- und Alkoholkomponente dieser Haupt-Wachsester entsprachen immer der Kettenlänge des angebotenen Substrates. Die Kultivierung des Stammes T9 auf *n*-Dodecanol (12OH) z. B. führte zu Wachsester-Gemischen in denen C_{24:0} 92% der gesamt produzierten Wachsester darstellten.

Der Einsatz von Einzelsubstraten und Gemischen dieser Einzelsubstrate führte mehrfach zu gleichen prozentualen Anteilen von Wachsestern mit identischer Zusammensetzung, wie sie auch auf einem der im Gemisch vorhandenen Einzelsubstrate produziert wurden. Dies deutet darauf hin, dass *A. jadensis* T9 bei Wachstum und Wachsester-Produktion auf Substratgemischen eines dieser Einzelsubstrate aus dem Gemisch bevorzugt metabolisiert.

Die durch Interpretation der nach GC/MS erhaltenen Massenspektren ermittelten Kettenlängen und Sättigungsgrade der verschiedenen WE geben im Vergleich zur Kettenlänge des jeweiligen Ausgangssubstrates Aufschluss über deren Metabolisierung bevor sie in die Wachsester-Synthese eingeschleust werden. Neben Reduktions- bzw. Oxidationsprozessen unter Erhalt der Kettenlänge des Substrates und entsprechend der korrespondierenden *n*-Fettsäuren bzw. *n*-Alkoholen wurden bei *A. jadensis* T9 auf Substraten unterschiedlicher Stoffklassen (1) Kettenverkürzung, (2) Kettenverlängerung und (3) Desaturierung der Substrate vor der WE-Synthese nachgewiesen.

Die korrespondierenden *n*-Fettsäuren und *n*-Alkohole der als Substrat angebotenen *n*-Alkane unterliegen neben der direkten Veresterung den gleichen Mechanismen wie auch die *n*-Alkohole, d. h. (1) der Kettenverkürzung, (2) der Kettenverlängerung und (3) der Desaturierung. Diese Substrate „aktivieren“ also mehr Stoffwechselwege innerhalb der Zelle als die *n*-Fettsäuren. Diese metabolische Diversität wurde über den Einsatz von Gemischen dieser Einzelsubstrate als Wachsester-Vorläufer bestätigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es durch den gezielten Einsatz von Pflanzenöl und Einzelsubstraten (aus unterschiedlichen Substanzklassen) als Wachsester-Vorläufer möglich ist, definiert zugeschnittene bakterielle Wachsester zu produzieren. Das Schneidern der Wachsester kann dabei über das Substratangebot (Einzelsubstrat oder Substratgemisch) beeinflusst werden. Eine Anreicherung von Pflanzenöl mit Wachsestern, die dem menschlichen Sebum entsprechen ist daher möglich. Das eröffnet den Weg zur biotechnologischen Produktion eines entsprechenden Basisproduktes für Hautpflegemittel.

SUMMARY

In the submitted thesis the bacterial production of tailored wax esters by using plant oil and different pure substances (single components and mixtures of these components) as carbon sources and wax ester precursors was tested. The thesis was performed in combination with a research project, which aimed the enrichment of plant oils with bacterial wax esters. Through the enrichment of plant oils with specifically tailored wax esters similar to wax esters of human sebum, the plant oil should be a refined raw material for a possible usage in skin care. In previous experiments different marine isolates were remarkable for distinct wax ester production. To determine an optimal production strain and a suitable plant oil different plant oils were offered to marine isolates as substrates for wax ester production. All in all 38% of 42 tested isolates were able to grow and produce wax esters with an offered plant oil mixture. The results showed that growth of the cells is a fundamental requirement for wax ester production even though it wasn't shown that wax ester production is growth-linked.

Out of the five tested plant oils rapeseed oil was determined as optimal substrate, which is used by 60% of 20 on rapeseed oil tested isolates to produce wax esters. Within the appointed strains *Alcanivorax jadensis* T9 was determined as production strain for further experiments, because it produces wax esters with all five offered plant oils. By using electron microscopy it was shown that cells of *A. jadensis* T9 get in close contact with the oil droplets in the medium. After four days of cultivation on plant oil inclusions with different electron density were visible inside the cells of *A. jadensis* T9. During cultivation of *A. jadensis* T9 on rapeseed oil as only carbon and energy source, the strain produces mono- and diunsaturated wax esters with chain lengths of C₃₂-C₃₈ which is equivalent to the wax ester distribution of sebum (C₃₀-C₄₀) from specifically tested persons. Monounsaturated wax esters were the main part of the analysed human wax esters. Wax ester distribution was independent on age or gender and remained almost steady. Mono- and diunsaturated wax esters of human sebum mainly contain fatty acids with 16 carbon atoms. They often consist of a mixture of isomers.

By the usage of single substrates (*n*-fatty acids, *n*-alcohols, *n*-alkane/alkene and triacylglycerides) and mixtures of these substrates as carbon and energy source it was tested if a bacterial production of tailored wax esters is possible.

Maintained wax esters were analysed and determined quantitatively by gaschromatography. Their identification occurred by gaschromatography-mass spectrometry.

With *n*-fatty acids as substrates *A. jadensis* T9 showed growth on three of six offered *n*-fatty acids. Only *n*-hexadecanoic acid was used by the strain for a sufficient wax ester production, for the analysis by gaschromatography and gaschromatography-mass spectrometry.

With all offered *n*-alcohols *A. jadensis* T9 showed very good growth and wax ester production. The strain produced comparatively high amounts of wax esters (up to 640 µg/10 ml culture broth) on four of six *n*-alcohols. This indicates that in comparison to *n*-fatty acids (C₁₁-C₁₉) *n*-alcohols (C₁₁-C₁₉) are better substrates for wax ester production. Especially *n*-alcohols and rapeseed oil were good single substrates for wax ester production. Substrate mixtures of rapeseed oil and *n*-dodecanol or *n*-tetradecanol lead, in comparison to the single substrates *n*-dodecanol or *n*-tetradecanol, to an obvious increase of wax ester production. A mixture of rapeseed oil with *n*-nonadecanol lead to a low increase of produced wax esters but to an enlarged wax ester spectrum. It seems that rapeseed oil in a mixture with *n*-alcohols influences their solubility properties and with that their bioavailability. It wasn't apparent if the *n*-alcohols in the contrary influence the bioavailability of the rapeseed oil, too.

Substrates with chain lengths of 16 carbon atoms lead in every substance class to a production of wax esters. Experiments to increase the amount of produced wax esters or to enlarge the wax ester spectrum by offering two component mixtures of substrates with chain lengths of 16 carbon atoms weren't successful.

It is conspicuous that on almost every substrate *A. jadensis* T9 preferably produces one principle wax ester. Chain lengths of acid and alcohol components of these principle wax esters correspond to chain lengths of the offered substrates. Cultivation with *n*-dodecanol (12OH) for example lead to wax ester products in which C_{24:0} make up 92% of the entire produced wax esters.

The usage of single substrates and mixtures of these substrates lead repeatedly to a production of wax esters with identically composition in equal percentages like they were produced with one single substrate of this mixture. This leads to the assumption that *A. jadensis* T9 preferably metabolizes one of the single substrates in this mixture.

Via gaschromatography-mass spectrometry detected chain lengths and degrees of saturation, in comparison to chain lengths and degrees of saturation of the initially submitted substrates, give information about the metabolism of substrates before wax ester synthesis. Next to reduction and oxidation with receipt of the substrate chain lengths and its corresponding *n*-fatty acid or *n*-alcohol (1) chain cleavage, (2) chain elongation and (3) desaturation was shown before wax ester synthesis in *A. jadensis* T9 on substrates of different substance classes.

The *n*-fatty acids and *n*-alcohols corresponding to the offered *n*-alkanes pass next to a direct usage for wax ester synthesis the same mechanisms like *n*-alcohols. Therefore these substrates “activate” more reactions of metabolism within the cell than *n*-fatty acids. This metabolic diversity was confirmed by the usage of mixtures of these single substrates as wax ester precursors.

The results of this thesis show, that it is possible to produce specific tailored bacterial wax esters by the aimed usage of plant oil and single substrates (from different substance classes) as wax ester precursors. Tailoring of wax esters can be influenced by substrate supply (single substrate or substrate mixture). This proves that the enrichment of plant oil with wax esters similar to wax esters from human sebum is possible. This facilitates new possibilities for a biotechnological production of a basic product for skin care.

7.2 Ausblick

Die bakterielle Wachsester-Synthese, insbesondere das Schneiden bakteriell produzierter Wachsester, unterliegt sehr vielen Faktoren deren präzise Einstellung Qualität und Quantität der Wachsester-Produkte bestimmt. Der letztendlich entscheidende Faktor für die bakterielle Wachsester-Produktion wurde allerdings noch nicht bestimmt und scheint für Wachsester produzierende Bakterien unterschiedlicher Gattungen nicht einheitlich zu sein.

Im Verlaufe der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass *n*-Alkohole hinsichtlich der Wachsester-Produktion von *A. jadensis* T9 optimale Substrate sind. Die über die GC/MS analysierten auf den *n*-Alkoholen hauptsächlich produzierten Wachsester lassen den Rückschluss zu, dass der bevorzugte Mechanismus der WE-Synthese die direkte Veresterung der *n*-Alkohole mit den daraus abgeleiteten *n*-Fettsäuren ist. Über den Aufnahmeweg von *n*-Alkoholen in Bakterien ist bislang wenig bekannt. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit, ist dieser jedoch wirkungsvoll bei der bakteriellen WE-Synthese und daher von großer Bedeutung für die Option bakterielle Wachsester gezielt zu schneiden. Eine Erhöhung der Aufnahme von *n*-Alkoholen und anderen Substraten kann möglicherweise durch den zusätzlichen Einsatz apolarer Substanzen als mögliche Lösungsvermittler erreicht werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, führen solche Substanzen, führen nicht in jedem Fall zu einer Steigerung der WE-Ausbeute.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das gezielte Schneiden von bakteriellen Wachsestern mit definierten Funktionen und Eigenschaften für den Weg der biotechnologischen Herstellung von WE-Produkten, z. B. für die Hautpflege, ermöglichen. Als Nachteil hierbei könnten sich zum einen Toxizitäten bakterieller Produkte für den Menschen und zum anderen die bisher geringen Ausbeuten an bakteriell geschneiderten Wachsestern herausstellen.

Um die bakterielle Produktion von geschneiderten Wachsestern mit gezielter Zusammensetzung zu optimieren sind verschiedene weitere Untersuchungen denkbar.

Untersuchungen zur Optimierung der Substrataufnahme:

- die Aufklärung der Aufnahmemechanismen, die Festlegung des für Bakterien toxischen Konzentrationsbereiches sowie die Bestimmung der einsetzbaren Kettenlängen von langkettigen n -Alkoholen, um höchstmögliche Substratkonzentrationen, maximale WE-Ausbeuten und Erweiterungen des produzierten WE-Spektrums zu ermöglichen
- der Einsatz von möglichen Lösungsvermittlern (wie z. B. Pflanzenölen oder n -Alkanen), um eine Optimierung der Substrataufnahme und damit der WE-Produktion zu erreichen

Tests zur Optimierung von Produktion und Funktion geschneiderter Wachsester:

- abhängig vom für die Wachsester-Produktion eingesetzten Mikroorganismus ist es wichtig die WE-Produktion bei verschiedensten Kultivierungsbedingungen zu testen, um den für die WE-Produktion ausschlaggebenden Faktor zu bestimmen
- die Bestimmung der WE-Funktionen (ob Speicherstoff oder Entgiftung der Zelle) ist für eine optimale WE-Produktion wichtig, weshalb weitere Untersuchungen durchgeführt werden sollten, um die Funktionen der bakteriellen WE zu ermitteln

Im Bereich der Wachsester-Analytik sind folgende Schwerpunkte notwendig:

- die Verwendung von isotoopenmarkierten Substraten als WE-Precursor, um das Produkt-Spektrum der Wachsester mit weiteren Substraten komplexerer Struktur als WE-Precursor zu erweitern
- die Anfertigung einer Spektrensammlung (MS) bakterieneigener Wachsester, die nicht dem normalen Interpretationsmuster linearer Wachsester folgen, um die Analyse von bakteriell produzierten Wachsestern zu erleichtern

Die Herstellung von bakteriell geschneiderten Wachsestern in ausreichenden Konzentrationen kann eine Alternative zu bisher in der Industrie eingesetzten Wachsestern bieten. Der Einsatz von bakteriell produzierten Wachsestern in Verfahren zur Beschichtung von Papier zum Schutz vor Feuchtigkeit, wie von Steinbüchel (1995) für Polyhydroxyfettsäuren beschrieben, wäre denkbar.

Weitaus größere Bedeutung liegt im Austausch potentiell allergener tierischer oder erdöl-bürtiger synthetischer Produkte durch die bakteriell geschneiderten WE im Bereich Hautpflege. Die von Hames *et al.* (2010) beschriebene anti-allergene Wirkung der von *Alcanivorax jadensis* T9 produzierten Wachsester verstärkt zusätzlich die hautschützende Wirkung von kosmetischen Produkten mit geschneiderten bakteriellen WE, die denen des menschlichen Sebums entsprechen. Das Anwendungsspektrum des von Stöveken & Steinbüchel (2008) diskutierten Einsatzes bakterieller WE im medizinischen Bereich wird hierdurch stark erweitert. Beschichtungen von Allergie-auslösenden medizinischen Geräten und Wundauflagen mit gezielt geschneiderten Wachsestern würden den Einsatz dieser Materialien erleichtern. In Kombination mit bestimmten Wirkstoffen, wie z. B. Chitosan, wären Anwendungen über bestimmte Zeiträume und in geeigneten Konzentrationen möglich. Chitosan wirkt antibakteriell, fungizid und fördert die Wundheilung, weshalb es in medizinischen Nahtmaterialien und Wundverbänden eingesetzt wird (Tsigos *et al.*, 2000). Beschichtungen von z. B. Pflastern und Wundverbänden mit hautschonenden anti-allergenen Wachsestern die einen Wirkstoff, wie z. B. Chitosan, bereits enthalten, würden einen gezielteren Einsatz an betroffenen Hautstellen ermöglichen.

Der Vorschlag zur Anwendung von bakteriellen Wachsestern in Lebensmitteln, was eine innerliche Anwendung beim Menschen vorsieht (Stöveken & Steinbüchel, 2008), spielt auch im medizinischen Bereich eine Rolle. Die Verwendung gezielt geschneiderter Wachsester mit Schmelztemperaturen, die der Temperatur des menschlichen Körpers entsprechen, würde sich zur Herstellung von Zäpfchen, Tabletten (Dragees) oder medizinischen Kaugummis eignen. Eine mögliche Toxizität der bakteriellen Wachsester für den Menschen muss in ausführlichen Testreihen vor einer innerlichen Anwendung ausgeschlossen werden.

Die Verwendung von Lipideinschlüssen als funktionalisierte Nanopartikel, wird von Wältermann *et al.* (2005a) beschrieben. Analog dazu könnte in der Biotechnologie das gezielte Schneiden von Wachsestern Produktionstechniken, wie z. B. Fermentationen, vereinfachen. Die Immobilisierung von Zellen unterschiedlicher Bakterienstämme oder unterschiedlicher Substrate mit Wachsestern unterschiedlicher Schmelzpunkte wäre denkbar. Im Verlauf einer Fermentation könnte dies die zeitversetzte Zugabe von Bakterien (Mischkulturen) oder Substraten über die Temperatur ermöglichen. Die Gefahr von Kontaminationen wäre somit deutlich verringert.

8 Literatur

- Alvarez H. M. (2010).** Biotechnological production and significance of triacylglycerols and wax esters. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* pp. 2996-3002, edited by K. N. Timmis, Berlin: Springer.
- Alvarez H. M., Pucci O. H. & Steinbüchel A. (1997).** Lipid storage compounds in marine bacteria. *Applied microbiology and biotechnology* **47**, 132-139.
- Alvarez H. M., Luftmann H., Silva R. A., Cesari A. C., Viale A., Wältermann M. & Steinbüchel A. (2002).** Identification of phenyldecanoic acid a constituent of triacylglycerols and wax ester produced by *Rhodococcus opacus* PD630. *Microbiology* **148**, 1407-1412.
- Athenstaedt K. & Daum G. (2006).** The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Science* **63**, 1355-1369.
- Atlas R. M. (1981).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews* **45**, 1, 180-209.
- Bauermeister A. & Sargent J. R. (1979).** Wax esters: major metabolites in the marine environment. *Trends in Biochemical Sciences* 209-211.
- Baumann H., Bühler M., Fochem H., Hirsinger F., Zobelein H. & Falbe J. (1988).** Natürliche Fette und Öle – nachwachsende Rohstoffe für die chemische Industrie. *Angewandte Chemie* **100**, 41-62.
- van Beilen J. B., Penninga D. & Witholt B. (1992).** Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 13, 9194-9201.
- Berthe-Corti L. & Fetzner S. (2002).** Bacterial metabolism of *n*-alkanes and ammonia under oxic, suboxic and anoxic conditions. *Acta Biotechnologica* **22**, 3-4, 299-336.
- Berthe-Corti L. & Höpner T. (2005).** Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **219**, 1-2, 171-189.
- Biedermann M., Bongartz A., Mariani C. & Grob K. (2008).** Fatty acid methyl and ethyl esters as well as wax esters for evaluating the quality of olive oils. *European Food Research Technology* **228**, 65-74.
- Biermann U., Friedt W., Lang S., Lühs W., Machmüller G., Metzger J. O., Rüschen Klaas M., Schäfer H. J. & Schneider M. P. (2000).** New syntheses with oils and fats as renewable raw materials for the chemical industry. *Angewandte Chemie International Edition* **39**, 2206-2224.

- Black P. N. & DiRusso C. C. (2003).** Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes and vectorial esterification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 3, 454-472.
- Bouvet J. M. & Grimont A. D. (1986).** Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter jumii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**, 228-240.
- Bowman J. P., Cavanagh J., Austin J. J. & Sanderson K. (1996).** *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 841-848.
- Bredemeier R., Heber C. & Berthe-Corti L. (2003a).** Screening of bacterial isolates from marine sediments for their production of wax esters. II Congreso internacional de ciencia y tecnologia marina. Alicante (Spain). 22-26 April. (ISBN: 84-9758-465-1).
- Bredemeier R., Hulsch R., Metzger J. O. & Berthe-Corti L. (2003b).** Submersed culture production of extracellular wax esters by the marine bacterium *Fundibacter jadensis*. *Marine Biotechnology* **5**, 579-583.
- Bruns A. & Berthe-Corti L. (1999).** *Fundibacter jadensis* gen. nov., sp. nov., a new slightly halophilic bacterium, isolated from intertidal sediment. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**, 441-448.
- Bryn K. & Jantzen E. (1977).** Occurrence and patterns of waxes in Neisseriaceae. *Journal of General Microbiology* 33-43.
- Budzikiewicz H. & Schäfer M. (2005).** *Massenspektrometrie*, 5. überarbeitete Auflage, Weinheim: WILEY-VCH.
- Cappello S. & Yakimov M. M. (2010).** *Alcanivorax*. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* pp. 1738-1748, edited by K. N. Timmis, Berlin: Springer.
- DeWitt S., Ervin J. L., Howes-Orchison D., Dalietos D., Neidleman S. L. & Geigert J. (1982).** Saturated and unsaturated wax esters produced by *Acinetobacter* sp. HO1 grown on C₁₆-C₂₀ n-alkanes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **59**, 2, 69-74.
- Erdmann S. M. & Merk H.-F. (2003).** Kontaktsensibilisierungen auf Externa. *Hautarzt* **54**, 331-337.
- Fay J. P. & Farias R. N. (1975).** The inhibitory action of fatty acids on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **91**, 233-240.

- Fernández-Martínez J., Pujalte M. J., García-Martínez J., Mata M., Garay E. & Rodríguez-Valera F. (2003).** Description of *Alcanivorax venustensis* sp. nov. and reclassification of *Fundibacter jadensis* DSM 12178^T (Bruns and Berthe-Corti, 1999) as *Alcanivorax jadensis* comb. nov., members of the emended genus *Alcanivorax*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 331-338.
- Fitzgerald M. & Murphy C. M. (2007).** Electrospray mass spectrometry of human hair wax esters. *Journal of Lipid Research* **48**, 1231-1246.
- Fixter L. M., Nagi M. N., McCormack J. G. & Fewson C. A. (1986).** Structure, distribution and function of wax esters in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of General Microbiology* **132**, 3147-3157.
- Flemming H.-C. & Wingender J. (2002).** Proteine, Polysaccharide... Was Biofilme zusammenhält. *Chemie in unserer Zeit* **36**, 1, 30-42.
- Flemming H.-C. & Wingender J. (2010).** The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 623-633.
- Hames V., Berthe-Corti L., Focken M., Nachtkamp M., Diel E., Krieg C. & Diel F. (2010).** Effect of bacterial wax esters in sensitized (A) and non-sensitized (NA) human blood cell incubates. *Inflammation Research* **59**, 189-191.
- Holtzapfel E. & Schmidt-Dannert C. (2007).** Biosynthesis of isoprenoid wax ester in *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798: identification and characterization of isoprenoid coenzyme A synthetase and wax ester synthases. *Journal of Bacteriology* **189**, 10, 3804-3812.
- Ingram L. O. (1976).** Adaptation of membrane lipids to alcohols. *Journal of Bacteriology* **125**, 2, 670-678.
- Ingram L. O. & Buttke T. M. (1984).** Effects of alcohols on microorganisms. *Advances in microbial Physiology* **25**, 253-300.
- Ishige T., Tani A., Sakai Y. & Kato N. (2003).** Wax ester production by bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 244-250.
- Ishige T., Tani A., Takabe K., Kawasaki K., Sakai Y. & Kato N. (2002).** Wax ester production from *n*-alkanes by *Acinetobacter* sp. strain M-1: ultrastructure of cellular inclusions and role of acyl coenzyme A reductase. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3, 1192-1195.
- Jaeger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., van Heuvel M. & Misset O. (1994).** Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* **15**, 1, 29-63.

- Jenschke C., Gutsche K. A., Scholz-Böttcher B. & Berthe-Corti L. (2008).** Production of wax ester by marine bacteria growing on a mixture of vegetable oils as a source of triacylglycerides. Tagungsband zur VAAM-/GBM-Jahrestagung, Frankfurt: 9.-11. März, Heidelberg: Spektrum. (ISSN: 0947-0867).
- Kalscheuer R., Luftmann H. & Steinbüchel A. (2004).** Synthesis of novel lipids in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of an unspecific bacterial acyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 12, 7119-7125.
- Kalscheuer R., Stöveken T., Luftmann H., Malkus U., Reichelt R. & Steinbüchel A. (2006).** Neutral lipid biosynthesis in engineered *Escherichia coli*: jojoba oil-like wax esters and fatty acid butyl esters. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 2, 1373-1379.
- Kalscheuer R., Stöveken T., Malkus U., Reichelt R., Golyshin P. N., Sabirova J. S., Ferrer M., Timmis K. N. & Steinbüchel A. (2007).** Analysis of storage lipid accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria. *Journal of Bacteriology* **189**, 3, 918-928.
- Kaneshiro T., Nakamura L. K., Nicholson J. J. & Bagby M. O. (1996).** Oleyl oleate and homologous wax esters synthesized coordinately from oleic acid by *Acinetobacter* and coryneform strains. *Current Microbiology* **32**, 336-342.
- Leahy J. G. & Colwell R. R. (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* **54**, 3, 305-315.
- Lengeler J. W., Drews G. & Schlegel H. G. (1999).** *Biology of the prokaryotes*, Stuttgart: Georg Thieme.
- Madigan M. T. & Martinko J. M. (2006).** *Brock Mikrobiologie*, 11. überarbeitete Auflage, München: Pearson Studium.
- Manilla-Pérez E., Reers C., Baumgart M., Hetzler S., Reichelt R., Malkus U., Kalscheuer R., Wältermann M. & Steinbüchel A. (2010).** Analysis of lipid export in hydrocarbonoclastic bacteria of the genus *Alcanivorax*: identification of lipid export-negative mutants of *Alcanivorax borkumensis* SK2 and *Alcanivorax jadensis* T9. *Journal of bacteriology* **192**, 3, 643-656.
- Martienssen M., Reichel O. & Schirmer M. (2003).** Einsatz oberflächenaktiver Substanzen zur Verbesserung der biologischen Abbaubarkeit von Mineralölkohlenwasserstoffen. *Chemie Ingenieur Technik* **75**, 11, 1749-1755.
- Martini S. & Añón M. C. (2005).** Storage of sunflower-seeds: variation on the wax content of the oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* **107**, 74-79.

Martins dos Santos V., Sabirova J., Timmis K. N., Yakimov M. M. & Golyshin P. N. (2010). *Alcanivorax borkumensis*. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* pp. 1265-1288, edited by K. N. Timmis, Berlin: Springer.

McLafferty F. W. & Tureček F. (1993). *Interpretation of Mass Spectra*, 4. edition, Sausalito, California: University Science Books.

Patel S., Nelson D. R. & Gibbs A. G. (2001). Chemical and physical analyses of wax ester properties. *Journal of insect science*, available online: insectscience.org, 1-7.

Römpp (1995). *CD-Römpp Chemielexikon*, 9. Auflage, Stuttgart – New York: Georg Thieme.

Ron E. Z. & Rosenberg E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* **3**, 4, 229-236.

Rontani J.-F., Bonin P. C. & Volkman J. K. (1999). Production of wax ester during aerobic growth of marine bacteria on isoprenoid compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1, 221-230.

Rontani J.-F., Mouzdahir A., Michotey V., Caumette P. & Bonin P. C. (2003). Production of a polyunsaturated wax ester during aerobic metabolism of squalene by *Marinobacter squalenivorans* sp. nov.. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 7, 4167-4176.

Russell N. J. & Volkman J. K. (1980). The effect of growth temperature on wax ester composition in the psychrophilic bacterium *Micrococcus cryophilus* ATCC 15174. *Journal of General Microbiology* **118**, 131-141.

Schauder S. (2006). UV-Schutz der Haut. *Hautnah Dermatologie* **3**, 118-127.

Schneiker S., Martins dos Santos V. A. P., Bartels D., Bekel T., Brecht M., Buhrmester J., Chernikova T. N., Denaro R., Ferrer M., Gertler C., Goesmann A., Golyshina O. V., Kaminski F., Khachane A. N., Lang S., Linke B., McHardy A. C., Meyer F., Nechitaylo T., Pühler A., Regenhardt D., Rupp O., Sabirova J. S., Selbitschka W., Yakimov M. M., Timmis K. N., Vorhölter F.-J., Weidner S., Kaiser O. & Golyshin P. N. (2006). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature Biotechnology* **24**, 8, 997-1004.

Sikkema J., deBont J. A. M. & Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* **59**, 2, 201-222.

Singer M. E. & Finnerty W. R. (1984). Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In: *Petroleum Microbiology*, pp. 1-59, edited by R. M. Atlas, New York: Macmillan Publishing Company.

- Singer M. E., Tyler S. M. & Finnerty W. R. (1985).** Growth of *Acinetobacter* sp. strain HO1-N on *n*-hexadecanol: physiological and ultrastructural characteristics. *Journal of Bacteriology* **162**, 1, 162-169.
- Spitzer V. (1999).** Screening analysis of unknown seedoils. *Fett/Lipid* **1**, 2-19.
- Steinbüchel A. (1995).** Mikrobielle und chemische Synthese von biologisch abbaubaren Polyestern. *Chemie in unserer Zeit* **5**, 260-271.
- Steinbüchel A. & Valentin H. E. (1995).** Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* **128**, 219-228.
- Stöveken T. & Steinbüchel A. (2008).** Bacterial acyltransferases as an alternative for lipase-catalyzed acylation for the production of oleochemicals and fuels. *Angewandte Chemie International Edition* **47**, 3688-3694.
- Stöveken T., Kalscheuer R., Malkus U., Reichelt R. & Steinbüchel A. (2005).** The wax ester synthases/acyl-coA:diacylglycerol acyltransferase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase. *Journal of Bacteriology* **187**, 4, 1369-1376.
- Tachi M. & Iwamori M. (2007).** Mass spectrometric characterization of cholesterol esters and wax esters in epidermis of fetal, adult and keloidal human skin. *Experimental Dermatology* **17**, 318-323.
- Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D. & Bouriotis V. (2000).** Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology* **18**, 305-311.
- Tsujita T., Sumiyoshi M. & Okuda H. (1999).** Wax ester-synthesizing activity of lipases. *Lipids* **34**, 11, 1159-1166.
- Unterreitmeier S. (2003).** Untersuchungen zur Biosynthese von Wachsestern in *Fundibacter jadensis*. Persönliche Mitteilung und Diplomarbeit.
- Uthoff S., Stöveken T., Weber N., Vosmann K., Klein E., Kalscheuer R. & Steinbüchel A. (2005).** Thio wax ester biosynthesis utilizing the unspecific bifunctional wax ester synthase/acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 2, 790-798.
- Wältermann M. & Steinbüchel A. (2005).** Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation and relationship to eukaryotic lipid depots. *Journal of Bacteriology* **187**, 11, 3607-3619.
- Wältermann M., Pötter M. & Steinbüchel A. (2005a).** Methoden zur Erfassung der Biogenese und Struktur bakterieller Lipideinschlüsse. *Biospektrum* 398-400, Heidelberg: Spektrum.

Wältermann M., Hinz A., Robenek H., Troyer D., Reichelt R., Malkus U., Galla H., Kalscheuer R., Stöveken T., von Landenberg P. & Steinbüchel A. (2005b). Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. *Molecular Microbiology* **55**, 3, 750-763.

Wältermann M., Stöveken T. & Steinbüchel A. (2007). Key enzymes for biosynthesis of neutral lipid storage compounds in prokaryotes: properties, function and occurrence of wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferases. *Biochimie* **89**, 230-242.

Weimar J. D., DiRusso C. C., Delio R. & Black P. N. (2002). Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids. *The Journal of biological Chemistry* **277**, 33, 29369-29376.

Wertz P. W. & Michniak B. B. (2000). Sebum. In: *Cosmeceuticals* pp. 45-56, edited by P. Elsner & H. I. Maibach, New York: Marcel Dekker.

Wille J. J. & Kydonieus A. (2003). Palmitoleic acid isomer (C16:1 Δ 6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* **16**, 176-187.

Yakimov M. M., Timmis K. N. & Golyshin P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current opinion in Biotechnology* **18**, 257-266.

Yamamoto A., Serizawa S., Ito M. & Sato Y. (1987). Effect of aging on sebaceous gland activity and on the fatty acid composition of wax esters. *The journal of investigative dermatology* **89**, 5, 507-512.

Zajic J. E. & Mahomed A. Y. (1984). Biosurfactants: intermediates in the biosynthesis of amphipathic molecules in microbes. In: *Petroleum Microbiology*, pp. 221-297, edited by R. M. Atlas, New York: Macmillan Publishing Company.

9 Anhang

Tab. 9.1:

Tabellarische Aufstellung aller anhand der Gaschromatographie nachgewiesenen linearen gesättigten Wachsester, die von *A. jadenis* T9 produziert wurden mit ihren per GC/MS nachgewiesenen Zusammensetzungen; die Einordnung erfolgte anhand der relativen Retentionszeiten, die mit Hilfe der Retentionszeit eines internen Standards (Myristyl-Dodecanoat) berechnet wurden (4.4.4.1); n. i. = nicht integrierbar

gesättigte Wachsester				
Wachsester	Zusammensetzung		Retention [min]	relative Retention
C _{24:0}	Dodecanyl-Dodecanoat	(12OOH-12OH)	23,42	0,88
*C _{27:0}	Tetradecanyl-Tridecanoat Tridecanyl-Tetradecanoat	(13OOH-14OH) (14OOH-13OH)	28,53	1,06
C _{28:0}	Dodecanyl-Hexadecanoat	(16OOH-12OH)	30,18	1,12
C _{28:0}	Tetradecanyl-Tetradecanoat	(14OOH-14OH)	30,18	1,12
*C _{28:0}	Dodecanyl-Hexadecanoat Tetradecanyl-Tetradecanoat	(16OOH-12OH) (14OOH-14OH)	29,56	1,12
*C _{28:0}	Dodecanyl-Hexadecanoat Tetradecanyl-Tetradecanoat Hexadecanyl-Dodecanoat	(16OOH-12OH) (14OOH-14OH) (12OOH-16OH)	29,56	1,12
C _{29:0}	Tetradecanyl-Pentadecanoat	(15OOH-14OH)	31,65	1,18
C _{30:0}	Tetradecanyl-Hexadecanoat	(16OOH-14OH)	33,16	1,23
*C _{30:0}	Tetradecanyl-Hexadecanoat Hexadecanyl-Tetradecanoat	(16OOH-14OH) (14OOH-16OH)	33,16	1,23
*C _{31:0}	Pentadecanyl-Hexadecanoat Hexadecanyl-Pentadecanoat	(16OOH-15OH) (15OOH-16OH)	34,55	1,29
C _{32:0}	Hexadecanyl-Hexadecanoat	(16OOH-16OH)	36,11	1,34
*C _{32:0}	Hexadecanyl-Hexadecanoat Octadecanyl-Tetradecanoat	(16OOH-16OH) (14OOH-18OH)	36,11	1,34
*C _{33:0}	Heptadecanyl-Hexadecanoat Hexadecanyl-Heptadecanoat	(16OOH-17OH) (17OOH-16OH)	37,43	1,39
C _{34:0}	Octadecanyl-Hexadecanoat	(16OOH-18OH)	38,80	1,44
C _{34:0}	Nonadecanyl-Pentadecanoat	(15OOH-19OH)	38,80	1,44
*C _{34:0}	Octadecanyl-Hexadecanoat Hexadecanyl-Octadecanoat	(16OOH-18OH) (18OOH-16OH)	38,80	1,44
C _{35:0}	Nonadecanyl-Hexadecanoat	(16OOH-19OH)	40,09	1,49
C _{36:0}	Octadecanyl-Octadecanoat	(18OOH-18OH)	41,43	1,54
C _{36:0}	Nonadecanyl-Heptadecanoat	(17OOH-19OH)	41,43	1,54
*C _{36:0}	Octadecanyl-Octadecanoat Eicosanyl-Hexadecanoat	(18OOH-18OH) (16OOH-20OH)	41,43	1,54
C _{37:0}	Octadecanyl-Nonadecanoat	(19OOH-18OH)	n. i.	n. i.
C _{38:0}	Nonadecanyl-Nonadecanoat	(19OOH-19OH)	43,89	1,63

* Hierbei handelt es sich um WE-Gemische, die aus unterschiedlichen Säure- und Alkoholkomponenten zusammengesetzt sind

Tab. 9.2:

Tabellarische Aufstellung aller anhand der Gaschromatographie nachgewiesenen linearen einfach ungesättigten Wachsester, die von *A. jadenis* T9 produziert wurden mit ihren per GC/MS nachgewiesenen Zusammensetzungen; die Einordnung erfolgte anhand der relativen Retentionszeiten, die mit Hilfe der Retentionszeit eines internen Standards (Myristyl-Dodecanoat) berechnet wurden (4.4.4.1); - = nicht eindeutig bestimmbar

einfach ungesättigte Wachsester			
Wachsester	Zusammensetzung	Retention [min]	relative Retention
C _{28:1}	Tetradecanyl-Tetradecenoat (14OOH:1-14OH)	31,29	1,16
C _{30:1}	Hexadecanyl-Tetradecenoat (14OOH:1-16OH)	34,36	1,27
C _{32:1}	Hexadecanyl-Hexadecenoat (16OOH:1-16OH)	37,10	1,38
C _{32:1}	Tetradecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-14OH)	37,10	1,38
C _{34:1}	Hexadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-16OH)	38,54	1,43
*C _{34:1}	Hexadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-16OH) Nonadecanyl-Pentadecanoat (15OOH-19OH:1)	38,54	1,43
C _{35:1}	Nonadecanyl-Hexadecenoat (16OOH:1-19OH)	39,83	1,48
*C _{36:1}	Octadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-18OH) Nonadecanyl-Heptadecenoat (17OOH:1-19OH)	41,15	1,53
C _{37:1}	Nonadecanyl-Octadecenoat (18OOH:1-19OH)	42,44	1,58
C _{38:1}	-	43,66	1,62

* Hierbei handelt es sich um WE-Gemische, die aus unterschiedlichen Säure- und Alkoholkomponenten zusammengesetzt sind

Tab. 9.3:

Tabellarische Aufstellung aller anhand der Gaschromatographie nachgewiesenen linearen zweifach ungesättigten Wachsester, die von *A. jadenis* T9 produziert wurden mit ihren per GC/MS nachgewiesenen Zusammensetzungen; die Einordnung erfolgte anhand der relativen Retentionszeiten, die mit Hilfe der Retentionszeit eines internen Standards (Myristyl-Dodecanoat) berechnet wurden (4.4.4.1); - = nicht eindeutig bestimmbar

zweifach ungesättigte Wachsester			
Wachsester	Zusammensetzung	Retention [min]	relative Retention
C _{34:2}	-	38,21	1,42
*C _{36:2}	Octadecenyl-Octadecenoat (18OOH:1-18OH:1) Nonadecenyl-Heptadecenoat (17OOH:1-19OH:1)	40,80	1,52
C _{37:2}	-	42,40	1,57

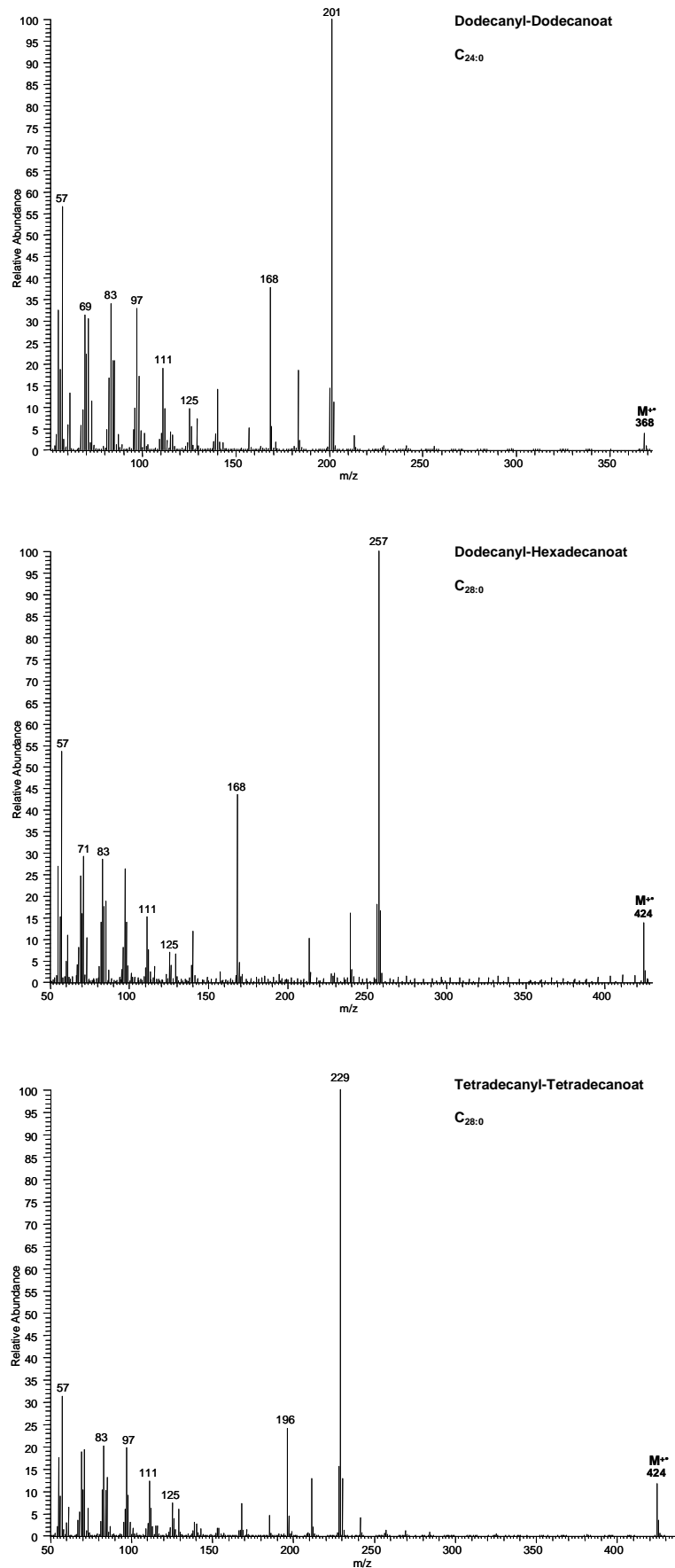
* Hierbei handelt es sich um WE-Gemische, die aus unterschiedlichen Säure- und Alkoholkomponenten zusammengesetzt sind

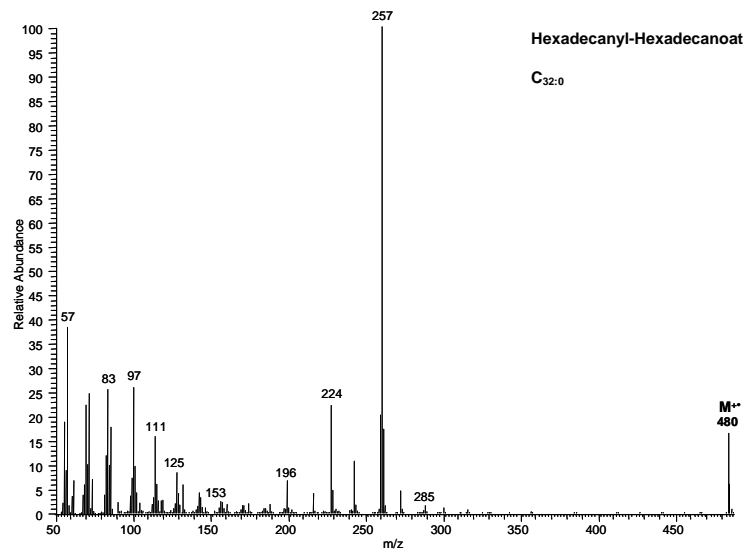
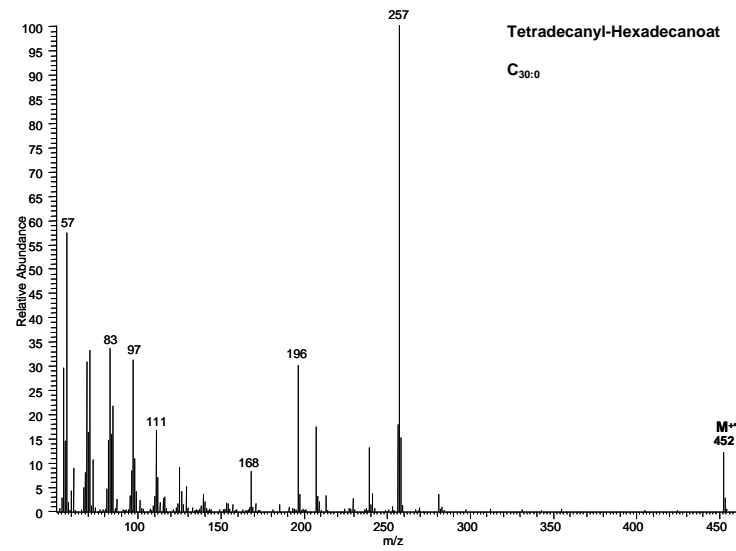
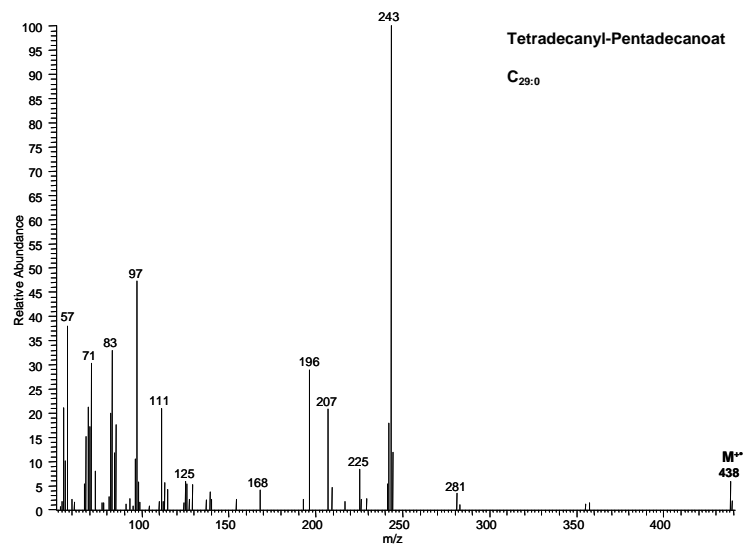
Tab. 9.4:

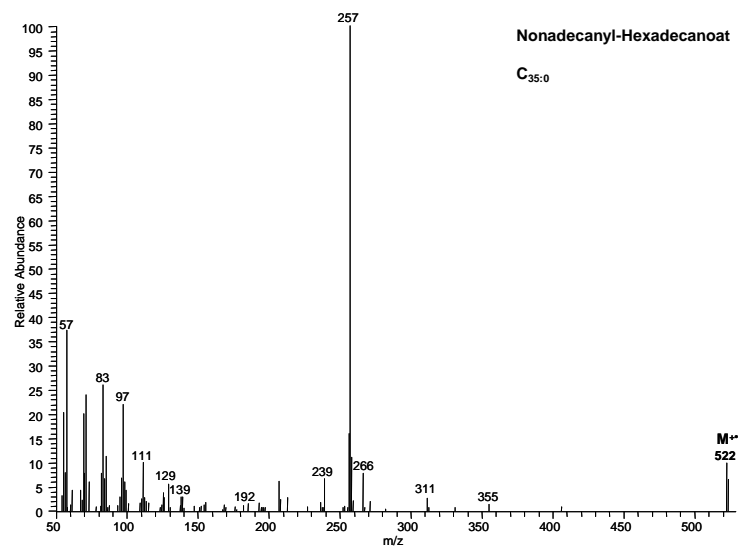
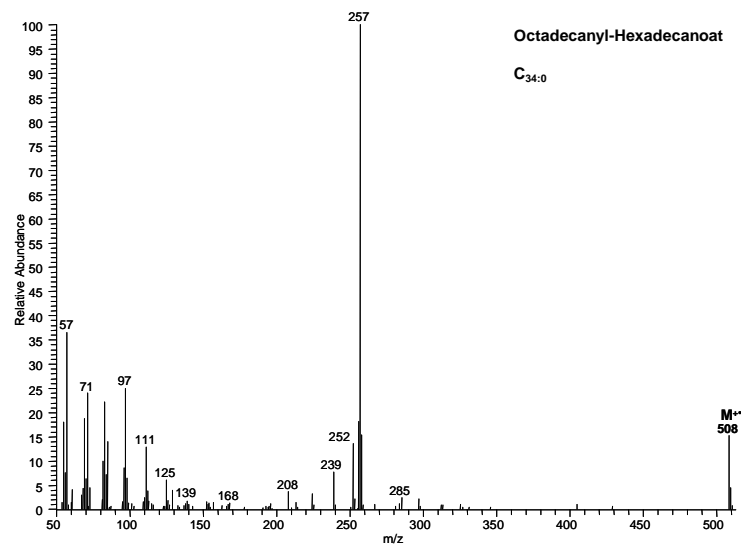
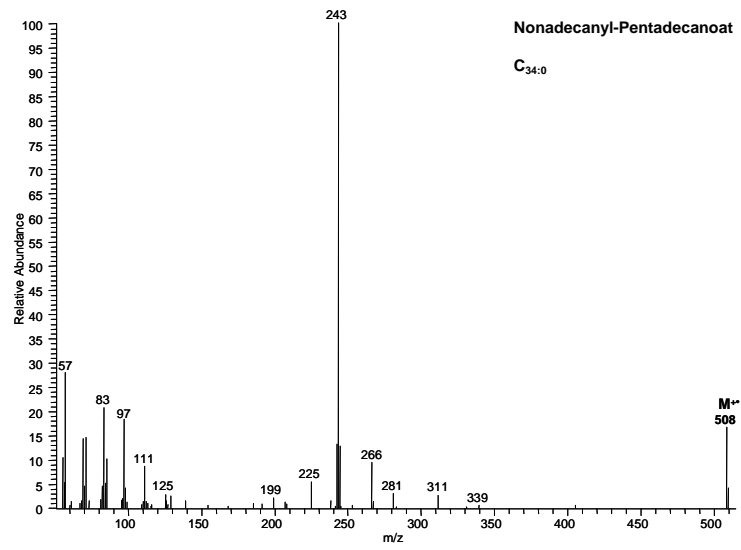
Tabellarische Aufstellung aller Wachsester, die anhand der Gaschromatographie aus dem menschlichen Sebum nachgewiesen wurden; die Einordnung erfolgte anhand der relativen Retentionszeiten, die mit Hilfe der Retentionszeit eines internen Standards (Myristyl-Dodecanoat) berechnet wurden (4.4.4.1)

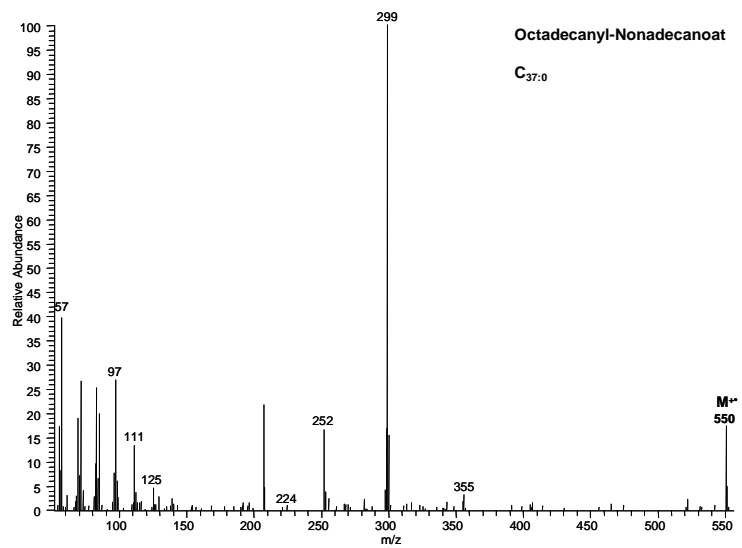
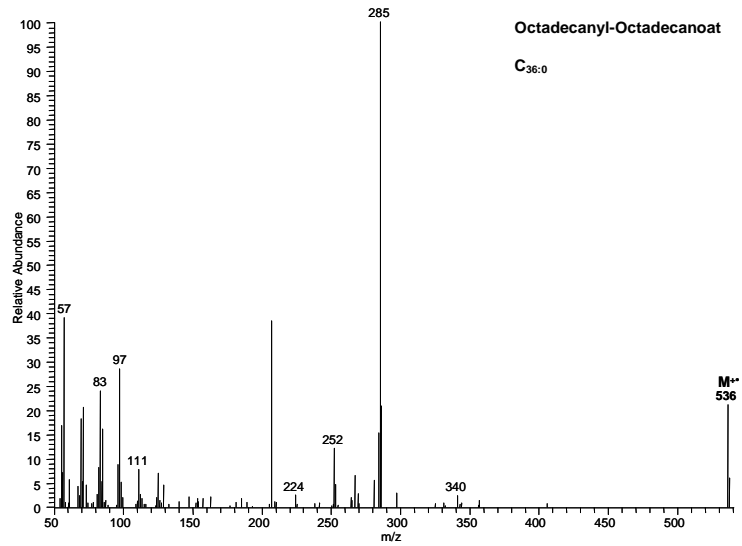
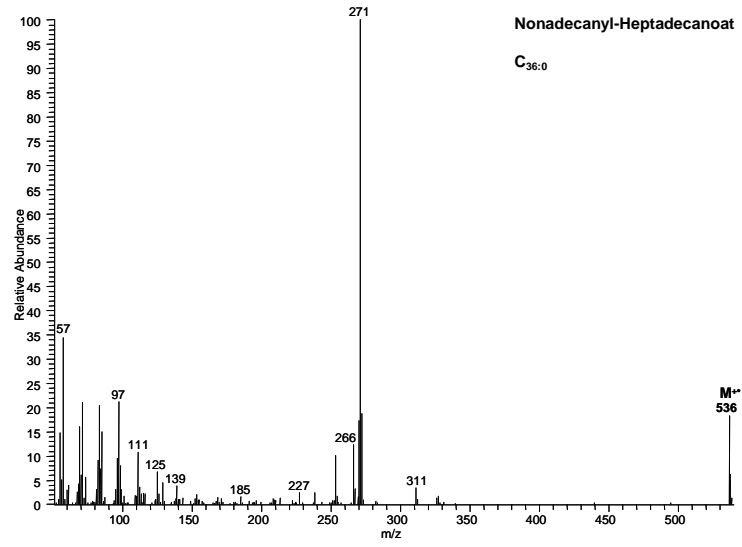
gesättigte Wachsester		einfach ungesättigte Wachsester		zweifach ungesättigte Wachsester	
Wachsester	relative Retention	Wachsester	relative Retention	Wachsester	relative Retention
C _{30:0}	1,23	C _{30:1}	1,22	C _{34:2}	1,42
C _{31:0}	1,29	C _{31:1}	1,28	C _{36:2}	1,52
C _{32:0}	1,34	C _{32:1}	1,33	C _{38:2}	1,62
C _{33:0}	1,38	C _{33:1}	1,37	C _{40:2}	1,71
C _{34:0}	1,44	C _{34:1}	1,43		
C _{35:0}	1,48	C _{35:1}	1,47		
C _{36:0}	1,54	C _{36:1}	1,53		
C _{37:0}	1,58	C _{37:1}	1,57		
C _{40:0}	1,73	C _{38:1}	1,63		
		C _{40:1}	1,72		

Abb. 9.1: Massenspektren der von *A. jadensis* T9 produzierten gesättigten reinen Wachsester; angegeben sind Bezeichnung und Kettenlänge des jeweiligen Wachsesters sowie die aus der Fragmentierung des jeweiligen Wachsesters entstandenen Peaks









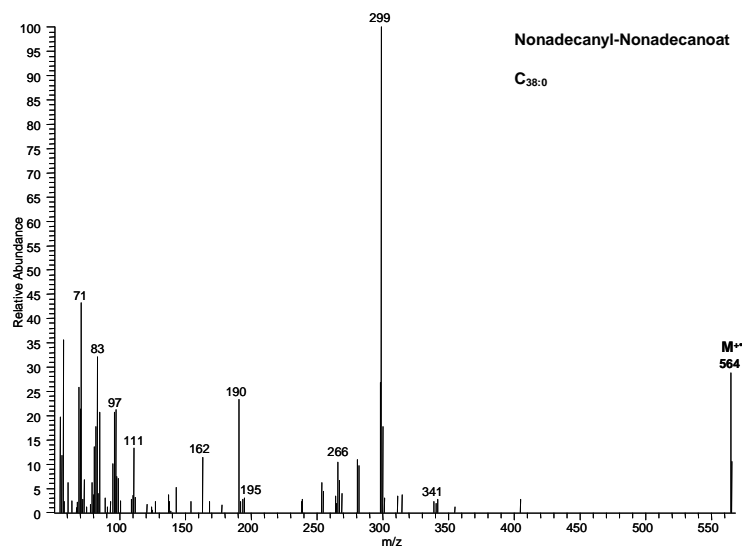
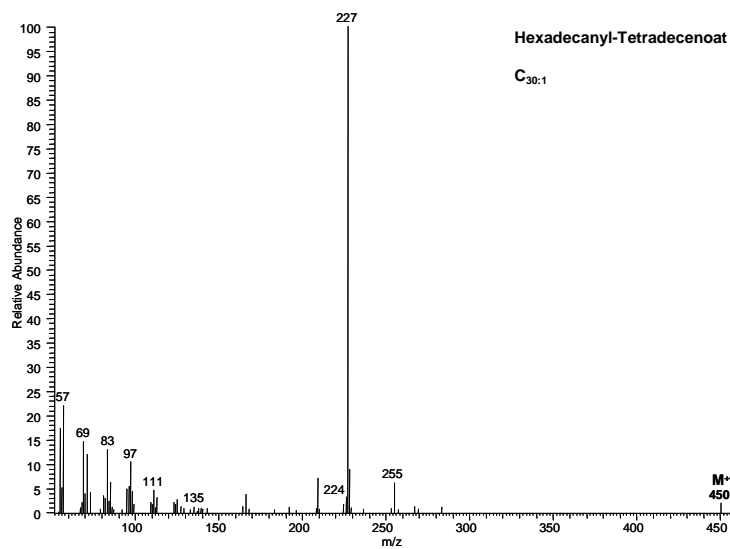
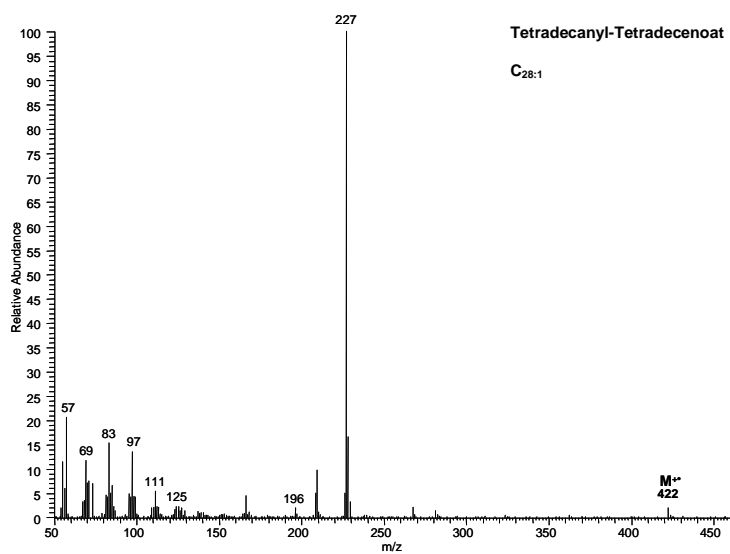
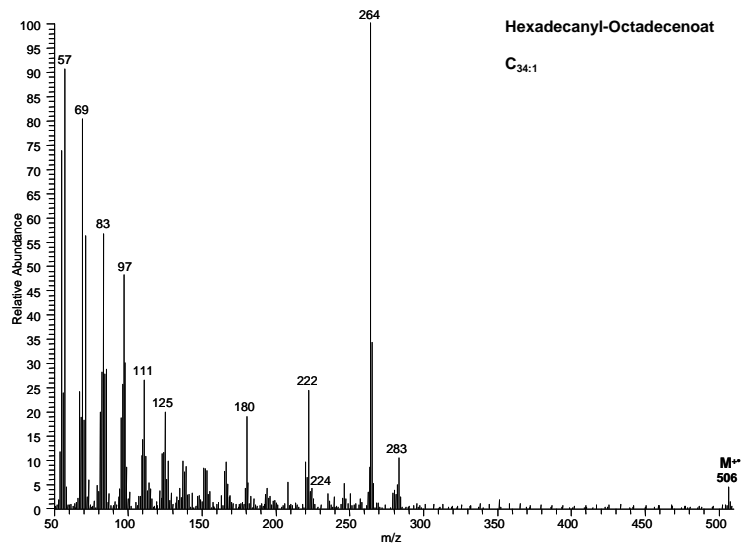
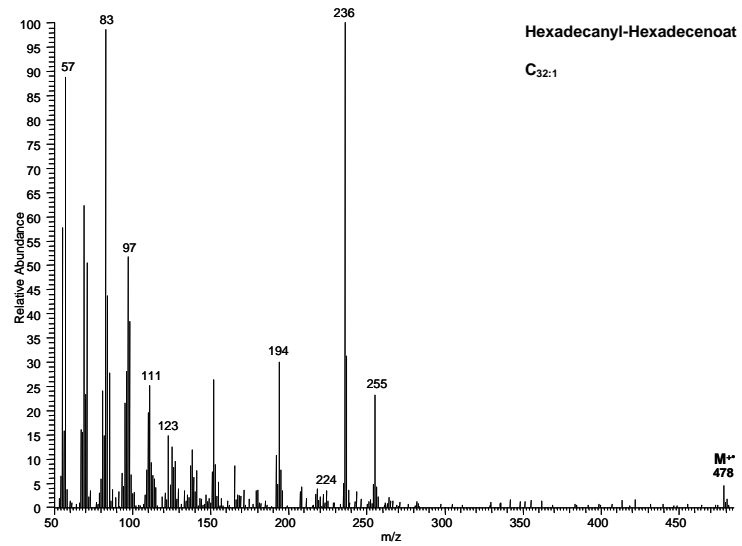
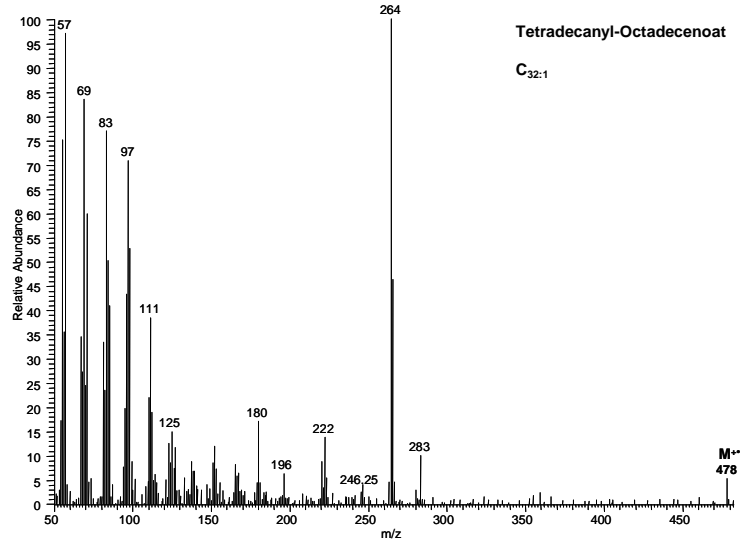
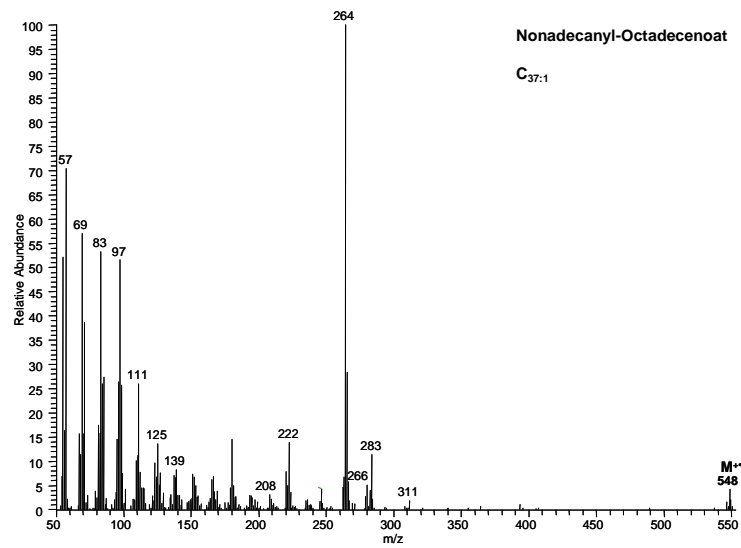
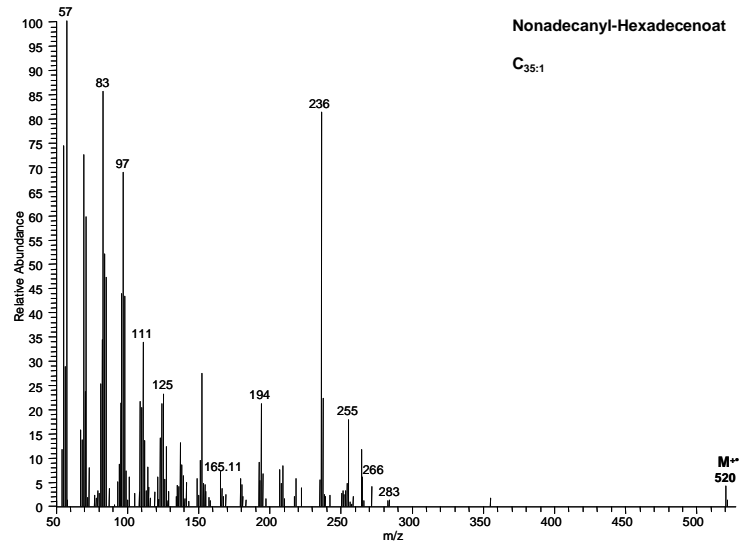


Abb. 9.2: Massenspektren der von *A. jadensis* T9 produzierten einfach ungesättigten reinen Wachsester; angegeben sind Bezeichnung und Kettenlänge des jeweiligen Wachsesters sowie die aus der Fragmentierung des jeweiligen Wachsesters entstandenen Peaks







Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen einer anderen wissenschaftlichen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat.

Gehlenberg, den 23.10.2010

Constanze Jenschke

Lebenslauf

Constanze Jenschke

geboren am 28.03.1974 in Sande

Ausbildung:

1986-1994

Mariengymnasium in Jever (1990-1991 Greenwood Central School NY-USA),

Abschluss Abitur

1995-1997

IFBA (Institut für berufliche Aus- und Weiterbildung GmbH & Co. KG),

Abschluss Biologisch technische Assistentin

1997-2003

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Studium der Biologie,

Abschluss Diplom

Beschäftigung:

2004-2006

Forschungsprojekt (AiF) „Chitosanherstellung aus Tintenfischabfällen“ (H. Focken Ing.

Büro Biotechnik & FH Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven),

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

2006-2008

Forschungsprojekt (AiF) „Biotechnologisches Verfahren zur Herstellung natürlicher

Basisstoffe für Hautpflegemittel“ (H. Focken Ing. Büro Biotechnik & ICBM Universität

Oldenburg), Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Promotion:

ab 2006

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, ICBM