

**Freisetzung primärer aromatischer Amine aus Azofarbstoffen
durch mikrobielle Spaltung, quantitative, parametrische und kinetische Aspekte**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Herrn Frank Balszuweit

aus Halle/Saale

April 2005

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Peter Surmann

2. Gutachter: Frau Privatdozent Dr. Christine Lang

Disputation am 04.07.2005

Danksagung

Meinem Doktorvater, **Herrn Professor Dr. Peter Surmann**, Freie Universität Berlin, gilt mein erster und ganz besonderer Dank für die Annahme dieses Themas als Gegenstand einer Promotionsarbeit, seine Betreuung, fachliche Unterstützung, Ratschläge und konstruktive Kritik bei der Erstellung der Dissertation,

Frau Privatdozent Dr. Christine Lang, Technische Universität Berlin, gilt mein großer, persönlicher und tief empfundener Dank, für ihre große Unterstützung und Betreuung, die Einführung in die Praxis der Mikrobiologie und die Möglichkeit, am Institut für Mikrobiologie und Genetik arbeiten zu können. Ihren Mitarbeitern, ganz besonders **Frau Birgit Baumann**, danke ich für die großen Mühen und die Unterstützung bei den mikrobiologischen Arbeiten,

Herrn Professor Dr. Thomas Platzek, Bundesinstitut für Risikobewertung, danke ich für die Themenstellung und Einführung in die Thematik, für seine Betreuung, Ratschläge und Kritik und das Vertrauen, mir die Bearbeitung des Themas der Arbeit zu übertragen,

ich danke **Frau Dr. Dagmar Fieblinger**, Bundesinstitut für Risikobewertung für ihre Ratschläge, Kritiken und Unterstützung,

Herrn Generalapotheker a.D. Dr. Michael Krohn und **Herrn Flottenapotheker a.D. Wolfgang v. Heyer** danke ich für ihre Unterstützung und die Möglichkeit, diese Thematik am Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Berlin bearbeiten zu können.

meinen Kollegen und Mitarbeitern am früheren Zentralen Institut des Sanitätsdienstes in Berlin, für ihre Unterstützung, Ermutigung, Zusammenarbeit und Freundschaft,

ein besonderer Dank an **Frau Hannelore Augustin** für ihre unermüdliche und sorgfältige Arbeit bei der Vorbereitung der Experimente und der Aufarbeitung der Proben.

Herrn Privatdozent Dr. Girgenson, Sanitätsamt der Bundeswehr, danke ich für Rat und Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Validierungsdaten.

Der sicherlich tiefstempfundene Dank gilt meinen Eltern, **Brunhild** und **Dr. Arno Balszuweit**. Ihr habt mich immer unterstützt und ermutigt und in mir die Freude an der Wissenschaft geweckt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Technische und wirtschaftliche Bedeutung der Azofarbstoffe.....	8
1.2	Grundlegende chemische Struktur	8
1.3	Reduktive Spaltung	8
1.4	Potentielle toxikologische Risiken primärer aromatischer Amine	9
1.5	Exposition des Verbrauchers gegenüber Azofarbstoffen	10
1.6	Rechtliche Situation.....	11
1.7	Möglichkeit der mikrobiellen Spaltung und Bedeutung für das von bestimmten Azofarbstoffen ausgehende Gesundheitsrisiko	12
1.7.1	Spaltung von Azofarbstoffen durch Azoreduktasen	12
1.8	Überblick über die Vorarbeiten und die darin dokumentierten Ergebnisse	13
2	Zielstellungen der vorliegenden Arbeit	15
2.1	Nachweis der Azospaltung mit zusätzlichen Farbstoffen	15
2.2	Entwicklung und Validierung eines quantitativen Analyse-Verfahrens... 	15
2.3	Untersuchung quantitativer, parametrischer und kinetischer Aspekte.... 	16
3	Materialien und Methoden	17
3.1	Materialien	17
3.1.1	Mikroorganismen	17
3.1.2	Verwendete Farbstoffe	18
3.1.3	Verwendete Amine	19
3.1.4	Medien zur Anzucht der Mikroorganismen	20
3.1.5	Sonstige Chemikalien	21
3.1.6	Verwendete Geräte	21
3.2	Anzucht der Mikroorganismen	21
3.3	Bereitung der Assays und Inkubation	22
3.3.1	Optimiertes Verfahren	22
3.3.2	Weitere hier erprobte Vorgehensweisen	23
3.4	Inkubation	24

3.5	Gewinnung der Probenlösung	24
3.6	Lagerung und Aufbereitung der Probenlösung.....	25
3.7	Festphasen-Extraktion	25
3.7.1	Standard-Verfahren	25
3.7.2	Ergänzender Schritt: Saure Aufreinigung	27
3.7.3	Alternative Probenaufbereitung am Kationenaustauscher	28
3.8	Chromatographische Methoden.....	29
3.9	Auswertung: Berechnung der Menge des freigesetzten Amins.....	32
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Untersuchungen zur Validierung.....	33
4.1.1	Validierung des Festphasen-Extraktionsverfahrens	33
4.1.2	Prüfung der Farbstoffe auf Reinheit	41
4.1.3	Gehaltsbestimmung durch chemisch-reduktive Spaltung.....	45
4.2	Möglichkeit der mikrobiellen Azospaltung unter aeroben und anaeroben Bedingungen	49
4.2.1	Ziel der Untersuchung / Theoretische Überlegungen	49
4.2.2	Durchführung der Experimente.....	50
4.2.3	Ergebnisse.....	51
4.2.4	Diskussion.....	54
4.3	Untersuchungen zur Stabilität der Amine im Assay	60
4.3.1	Theoretische Überlegungen	60
4.3.2	Durchführung	61
4.3.3	Ergebnisse.....	62
4.4	Reproduzierbarkeit des Experimentes	65
4.4.1	Theoretische Überlegungen	65
4.4.2	Durchführung	65
4.4.3	Ergebnisse.....	65
4.4.4	Diskussion.....	66
4.5	Korrelation zwischen der Substratkonzentration und der Menge des freigesetzten Amins	68

4.5.1	Theoretische Überlegungen	68
4.5.2	Durchführung	68
4.5.3	Ergebnisse.....	70
4.5.4	Diskussion.....	76
4.6	Korrelation der Azospaltung mit der Keimzahl.....	77
4.6.1	Theoretische Überlegungen	77
4.6.2	Durchführung	78
4.6.3	Ergebnisse.....	79
4.6.4	Diskussion.....	81
4.7	Kinetische Untersuchungen	84
4.7.1	Theoretische Überlegungen	84
4.7.2	Durchführung	86
4.7.3	Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen	87
4.7.4	Diskussion.....	102
5	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	107
5.1	Vergleich der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgänge.....	107
5.2	Beziehungen zwischen der Struktur der Farbstoffe und dem Verlauf der Azospaltung.....	110
5.3	Ursachen für die Beschleunigung der Azospaltung.....	111
5.4	Strukturaufklärung der Metaboliten.....	111
5.5	Bilanzierung der reduktiven Azospaltung	113
5.5.1	Bilanzierung nach vollständiger Umsetzung.....	114
5.5.2	Möglichkeiten der Bilanzierung bei unvollständiger Umsetzung	115
5.6	Lokalisierung der Azoreduktasen.....	116
5.6.1	Allgemeine Überlegungen	116
5.6.2	Mögliche experimentelle Überprüfung.....	116
5.6.3	Kinetik des Abbaus der Amine als Anhaltspunkt für eine intrazelluläre Umsetzung.....	117
5.6.4	Verknüpfung der Enzyme mit der Zellmembran.....	118
5.7	Physiologische Bedeutung der Azoreduktase(n).....	118

5.8	Azoreduktase(n) – ein oder mehrere Enzyme?	118
5.9	Isolierung des Enzyms.....	119
5.9.1	Mögliche Vorgehensweise bei der Isolierung.....	119
5.9.2	Experimente mit dem isolierten Enzym	120
6	Zusammenfassung	122
Summary	124
Anhang A:	Strukturformeln der Farbstoffe und Amine	126
Anhang B	zu Ziffer 4.1.1.3: Validierungsdaten ..	132
Anhang C:	Freisetzung von Aminen bei Standard-Experimenten gemäß Ziffer 4.1.1.1	134
Anhang D:	Diagramme und Messdaten zu Ziffer 4.5, Korrelation zwischen Substratmenge und Amin-Freisetzung	138
Anhang E:	Diagramme und Messdaten zur Kinetik, Beispiele einer sich beschleunigenden Freisetzung	147
Literaturverzeichnis	154