

5 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

5.1 Vergleich der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgänge

Bereits unter Ziffer 4.4 war deutlich geworden, dass die Freisetzung der Amine, die innerhalb eines Arbeitsganges in der Regel gut reproduzierbar war, von Woche zu Woche deutlichen Schwankungen unterlag.

Als erste Ursache wurde die unterschiedliche Konzentration der Keimsuspensionen in Erwägung gezogen. Es wurde untersucht, ob eine lineare Korrelation zwischen der Konzentration der Keimsuspension und der Menge der freigesetzten Amine besteht. Die Konzentration der Keimsuspension wird dabei anhand der Absorption bei 610 nm, auch bezeichnet als Optische Dichte (OD_{610}), gemessen. Beispielhaft sei hier die Gegenüberstellung zwischen der Dichte der Keimsuspension und dem Stoffumsatz bei der Inkubation von 4 mg Direkt Blau 1 aus 3 verschiedenen Wochen aufgeführt:

Tab. 52 Gegenüberstellung von Optischer Dichte der Keimsuspension und Freisetzung von o-Dianisidin aus 4 mg Direkt Blau 1

Arbeitsgang (Woche)	KW 14/03	KW 18/03	KW 19/03
OD_{610} der Keimsuspension	35,2	50,6	41,2
Freigesetztes o-Dianisidin	677,2	653,2	278,8
Verhältnis Masse Amin zur OD_{610}	19,2	12,9	6,8

Bereits diese Gegenüberstellung verdeutlicht, dass eine Korrelation zwischen der optischen Dichte der Keimsuspension und der Freisetzung des Amins nicht gegeben ist. Die in den unterschiedlichen Arbeitsgängen hergestellten und verwendeten Keimsuspensionen repräsentieren 3 unterschiedliche Populationen des Testkeims, die sich in verschiedenen Phasen ihres Wachstums befinden.

Platzek und Lang hatten beobachtet, dass eine Ernte der Zellen in der späten Wachstumsphase der Zellkultur (anstelle der stationären Phase) zu höheren Freisetzungen an Amin führt, da die Zellen sich in einem Zustand gesteigerter Stoffwechselaktivität befinden und damit auch größere Mengen reduzierender Coenzyme produzieren. So ist es auch hier möglich, dass eine Kultur geringer Zelldichte sich noch in der späten Wachstumsphase befindet und somit trotz geringerer Zelldichte größere Mengen an Farbstoff zu Aminen umsetzt.

Weiterhin wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, um zu klären, ob es durch Anzucht von 2 Zellpopulationen zum gleichen Zeitpunkt und unter identischen Bedingungen zu vergleichbar dichten Zellpopulationen und einem ähnlichen Verhalten bezüglich der Freisetzung von Aminen kommt – bzw. falls das nicht der Fall ist, ob es eine Korrelation zwischen den Umsetzungen der verschiedenen Farbstoffe gibt.

Es wurden 2 Vorkulturen angezchtet und jeweils 6 Hauptkulturen mit einer Vorkultur angeimpft. Die Zellen wurden geerntet und die Keimsuspensionen bereitet wie unter Ziffer 3.3 beschrieben. Die Dichte der beiden Keimsuspensionen wurde mit 79,4 und 75,2 bestimmt. Es wurde eine Sechsfach-Bestimmung der Umsetzung von 1 mg Congorot sowie eine Inkubation von 6 Ansätzen von Bismarck Braun mit steigenden Einwaagen von 2,5 mg bis 15 mg durchgeführt.

Tab. 53 Freisetzung von Benzidin aus 1 mg Congorot durch 2 parallel angezchtete Zellpopulationen:

	Benzidin aus den Assays, Mittelwert und Standardabweichung, jeweils in µg							
OD ₆₁₀	#1	#2	#3	#4	#5	#6	MW	SD
79,4	82,80	76,43	69,22	81,84	84,50	82,47	79,54	5,75
75,2	86,95	83,88	93,90	79,54	84,35	89,43	86,34	4,97

Die Differenz beider Mittelwerte ist dabei nur geringfügig größer als eine Standardabweichung. Man kann also davon ausgehen, dass das Verhalten beider Zellpopulationen vergleichbar ist.

Anders das Verhalten bei der Umsetzung von Bismarck Braun zu 2,4-Diaminotoluol:

Tab. 54 Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus variablen Mengen von Bismarck Braun, Vergleich zweier Vorkulturen, anaerobe Inkubation, KW 33/03

Freigesetztes Amin [µg]	Eingesetztes Bismarck Braun [mg]						
	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5
Vorkultur 1	97,1	243,2	360,1	467,0	474,0	541,5	602,1
Vorkultur 2	168,9	343,7	525,3	594,5	639,3	597,6	-

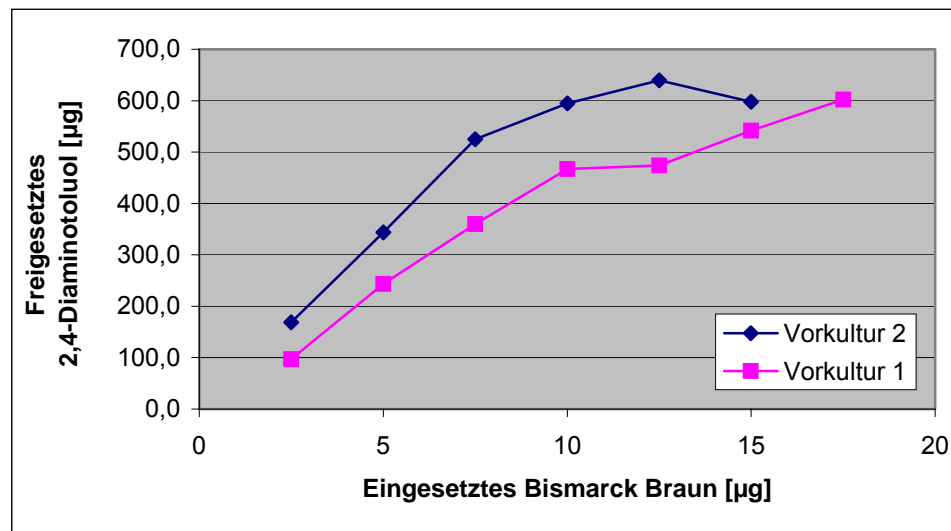


Abb. 40 Freisetzung von 2,4-Diaminotoluol aus Bismarck Braun durch *Micrococcus luteus*, anaerobe Inkubation, Vergleich zweier Zellpopulationen

Deutlich wird sichtbar, dass sich das Verhalten der beiden Vorkulturen unterscheidet. Im Bereich der niedrigeren Dotierungen mit Farbstoff, wo eine klare lineare Korrelation zwischen der eingesetzten Farbstoff-Menge und der Menge des freigesetzten Amins besteht, setzt die aus Vorkultur 2 angezüchtete Zellpopulation ungefähr die 1,6fache Menge an Amin frei wie die unter gleichen Bedingungen aus Vorkultur 1 angezüchtete Zellpopulation.

Obwohl beide Zellpopulationen eine zumindest vergleichbare Dichte hatten und bei der Umsetzung eines Farbstoffes (Congorot) ein durchaus vergleichbares Verhalten zeigten, treten bei der Umsetzung eines anderen Farbstoffes deutliche Unterschiede zu Tage.

Zusammenfassend muss die Aussage getroffen werden, dass bei den Arbeiten mit intakten Zellen eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Arbeitsgängen, d.h. mit unterschiedlichen Populationen des gleichen Testkeims, nicht erreicht wurde. Einfluss auf das quantitative Ergebnis nehmen

- Die Anzahl der beteiligten Zellen, d.h. die Dichte der Zellsuspension,
- die Aktivität der Zellen, abhängig von der Wachstumsphase der Zellkulturen
- evtl. unterschiedliche Enzym-Systeme, vgl. Ziffer 5.8
- die unterschiedliche Empfindlichkeit von Farbstoffen und Aminen gegenüber einem enzymatischen Abbau

Um für den Abbau der einzelnen Farbstoffe reproduzierbare Geschwindigkeitskonstanten zu ermitteln, müssten Experimente mit dem isolierten Enzym bei definiertem Angebot reduzierender Coenzyme durchgeführt werden, vgl. hierzu Ziffer 5.9.

5.2 Beziehungen zwischen der Struktur der Farbstoffe und dem Verlauf der Azospaltung

Betrachtet man die große strukturelle Ähnlichkeit der Farbstoffe Scharlach R und Oil Red EGN, so überraschen die großen Unterschiede hinsichtlich der reduktiven Spaltung. Während aus Scharlach R bereits im aeroben Milieu deutliche Mengen an o-Toluidin freigesetzt werden, waren selbst bei der anaeroben Inkubation von Oil Red EGN nur Spuren des Spaltprodukts feststellbar (um hier von einem Nachweis der Freisetzung zu sprechen, sollte eine Untersuchung mittels LC-MSD erfolgen, vgl. hierzu Ziffer 5.4) Beide Stoffe sind „wasserunlöslich“ – und es erscheint unwahrscheinlich, dass die Einführung einer weiteren Methylgruppe die Löslichkeit des Farbstoffs so weit verschlechtert, dass es nun zu keiner Umsetzung mehr kommen kann. Auch ist nicht zu erwarten, dass durch diese Methylgruppe die Verteilung der Elektronen im konjugierten System grundlegend geändert wurde und der Farbstoff aus diesem Grund einer reduktiven Spaltung nicht mehr zugänglich würde. Plausibel ist dagegen die Vermutung, dass die Methylgruppe für eine sterische Blockade verantwortlich ist, dass eine unpolare Gruppe in dieser Position die Bindung des Farbstoffs an das Enzym deutlich erschwert. Genaue Struktur-Wirkungs-Beziehungen können jedoch erst abgeleitet werden, wenn das (oder die) Enzym(e) isoliert und hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt wurden.

Auch zwischen Crocein Scharlach MOO und Sudan III gibt es gewisse strukturelle Ähnlichkeiten. Der entscheidende Unterschied zwischen beiden ist jedoch das Fehlen der Sulfonsäure-Gruppen im Sudan III. In Folge dessen ist Sudan III ein extrem lipophiler, wasserunlöslicher Stoff. Nun ist, wie die Beispiele Sudanrot und Scharlach R zeigen, die Spaltung „wasserunlöslicher“ Farbstoffe grundsätzlich möglich. Dennoch wird dieser Vorgang immer langsamer ablaufen als das rasche Anfluten wasserlöslicher Farbstoffe. Während aber die von den eben genannten Farbstoffen freigesetzten Amine (o-Anisidin aus Sudanrot G, o-Toluidin aus Scharlach R) anschließend relativ stabil sind (vgl. Ziffer 4.3), wird 4-Aminoazobenzol selbst durch Azoreduktasen abgebaut (siehe auch Ziffer 4.7.3, Abb. 64 zur Kinetik der Freisetzung von 4-Aminoazobenzol aus Crocein Scharlach). Im Fall des Crocein Scharlach flutet der wasserlösliche Farbstoff mit hoher Geschwindigkeit an und scheint zunächst das bevorzugte Substrat zu sein: erst wenn die Farbstoff-Konzentration

deutlich erniedrigt wurde, beginnt die Konzentration des Amins zu fallen, da in einem Zeitabschnitt nun mehr 4-Aminoazobenzen gespalten als neu gebildet wird. Im Gegensatz dazu liegt das wasserunlösliche Sudan III immer nur in niedrigen Konzentrationen an den Enzymen vor, kommt es tatsächlich zu einer geringfügigen Freisetzung von 4-Aminoazobenzen, so wird dieses rasch wieder gespalten und kann sich daher nicht im Assay anreichern.

5.3 Ursachen für die Beschleunigung der Azospaltung

Die kinetischen Untersuchungen hatten gezeigt, dass insbesondere bei einer Inkubation unter anaeroben Bedingungen und Einsatz einer hohen Konzentration von Farbstoff im Assay die Geschwindigkeit der Azospaltung in aller Regel zunahm. Als mögliche Ursachen dafür kommen in Frage:

- ein verzögertes Anfluten des Farbstoffs aus der Lösung in die Zellen zum Enzym
- eine verzögerte Freisetzung des intrazellulär gebildeten Amins in die Lösung
- anfangs noch intrazellulär vorhandener Sauerstoff, nach dessen Verbrauch die Geschwindigkeit der Azospaltung zunimmt
- eine Zunahme der Membranpermeabilität durch mechanischen oder chemischen Stress (Einwirkung des Azofarbstoffs oder des gebildeten Amins), damit ein schnellerer Stofftransport und eine beschleunigte Umsetzung
- teilweise Lyse der Bakterienzellen, damit Freisetzung des Enzyms und direkte Einwirkung auf den extrazellulär vorhandenen Farbstoff

Die experimentelle Überprüfung dieser Annahmen geht über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus. Allerdings ist es möglich, bestimmte Bedingungen wie die Dauer der Inkubation unter Sauerstoff-Ausschluss, der mechanischen Belastung, des Einwirkens des Azofarbstoffs usw. gezielt zu variieren und ihren Einfluss auf die Menge des freigesetzten Amins zu untersuchen.

5.4 Strukturaufklärung der Metaboliten

Mögliche weitere Abbaureaktionen, denen die freigesetzten Amine ausgesetzt sein könnten wurden schon in den theoretischen Überlegungen unter Ziffer 4.3.1 beschrieben.

Obwohl eine Suche nach den Metaboliten weiterer Amine nicht Bestandteil dieser Arbeit war, soll an dieser Stelle ein Experiment skizziert werden, mit dessen Hilfe solche Verbindungen identifiziert und nachgewiesen werden können:

- Inkubation eines Farbstoffs oder Amins mit Mikroorganismen
- Aufarbeitung des Assays wie unter Ziffer 3.5 beschrieben
- Aufteilung der Probenlösung in mehrere Aliquote
- Einstellung jeweils auf einen sauren, neutralen bzw. wie gewohnt basischen pH-Wert
- Festphasenextraktion, Extraktion mit Methanol
- Untersuchung der Lösung am LC-MS

Während die primären aromatischen Amine typische organische Basen darstellen und daher folgerichtig aus basischen Medium (pH 10,0) extrahiert wurden, weisen die Oxidationsprodukte andere Eigenschaften auf:

Im Fall des Verlustes aller Amino- und der Einführung von Hydroxy-Gruppen liegt nunmehr ein Phenol, eine organische Säure vor. Zur Extraktion von Phenolen muss ein saurer pH-Wert gewählt werden, um die Verbindungen in ihre protonierte, d.h. ihre Neutralform zu überführen. Nur in ihrer Neutralform haben die Moleküle eine Affinität zu den unpolaren Kohlenstoff-Ketten der Festphase.

Die möglicherweise problematischsten Analyten sind solche Verbindungen, die sowohl basische Amino-Gruppen als auch saure phenolische Gruppen aufweisen. Bei sauren oder basischen pH-Werten wird jeweils eine Gruppe in ihre ionische Form überführt, was die Affinität zur Festphase deutlich mindert. Am ehesten lassen sich solche Verbindungen an Ionenaustauscher-Säulen extrahieren.

Bereits die Amine stellen eher halbflüchtige Komponenten dar, deren Bestimmung mittels Gaschromatographie gerade in Anwesenheit von Matrix-Komponenten dadurch erschwert wird, dass ein Teil der Analyten nicht in den Dampfraum übergeht, sondern im Liner thermisch zersetzt wird. Dies war einer der Gründe, warum innerhalb dieser Arbeit die Bestimmung der Amine mittels HPLC erfolgte, auch wenn aufgrund der Nichtverfügbarkeit eines LC-MS keine Massenspektren aufgenommen werden konnten. Die Aussage bezüglich der begrenzten Flüchtigkeit gilt noch im verstärkten Maß für Oxidationsprodukte, insbesondere solche mit phenolischen Gruppen. Die Bestimmung von Phenolen im GC erfolgt, wenn überhaupt, in der Regel nach einem Derivatisierungsschritt. Eine Derivatisierung ist jedoch für Analysen mit dem Ziel der Strukturaufklärung nicht praktikabel, da von der Struktur des Derivats nicht zwingend auf die des ursprünglichen Moleküls geschlossen und eine Bildung von Artefakten nicht ausgeschlossen werden kann. Kommt es zur Bildung von Kopplungsprodukten, so sind die selbst auf dem Weg der

Derivatisierung nicht mehr in flüchtige, mittels Gaschromatographie zu erfassende Produkte überführbar.

Eine Lösung bietet hier die Anwendung von Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie, gekoppelt mit massenspektroskopischer Detektion, kurz LC-MS. Mit Hilfe des Ionisationsverfahrens der APCI ist es möglich, Methoden aus dem Bereich der konventionellen HPLC zu übernehmen. Bei der APCI erfolgt in der Regel keine Fragmentierung, so dass die Verbindung zunächst anhand ihres Mol-Peaks nachgewiesen werden kann. In einer zweiten Stufe der Massenspektroskopie wird das bereits ionisierte Molekül auf dem Weg der bekannten Elektronen-Induktion (EI) fragmentiert und das Molekül kann, sofern es nicht durch eine Spektrenbibliothek identifiziert wird, anhand seiner Fragmente rekonstruiert werden.

5.5 Bilanzierung der reduktiven Azospaltung

Unter Bilanzierung versteht man die Gegenüberstellung, welche Menge eines Farbstoffs durch die Mikroorganismen umgesetzt wurde und welche Menge an Amin man bei 100%iger Ausbeute der Umsetzung erwarten könnte mit den Mengen des Amins, die bei der analytischen Bestimmung tatsächlich nachgewiesen wurden. Eine Bilanzierung des Umsatzes kann z.B. Aufschluss darüber geben, welcher Anteil des durch die Mikroorganismen freigesetzten Amins einem weiteren Abbau unterlag. Dieser Wert kann verglichen werden mit dem Abbau der von außen zugesetzten Amine (vgl. Ziffer 4.3).

Eine Bilanzierung nach unvollständiger Umsetzung wäre geeignet, um die Geschwindigkeit der Azospaltung unabhängig von Folgereaktionen, bei denen das freigesetzte Amin abgebaut wird zu betrachten.

Untersuchungen zur Bilanzierung wurden bislang erheblich dadurch eingeschränkt, dass der Farbstoff, nachdem er einmal mit den Bakterien in Berührung gekommen war, mit den hier verfügbaren Methoden nicht mehr vollständig desorbiert werden konnte. Möglich war aber eine Bilanzierung nach vollständiger Umsetzung des Farbstoffs. In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Ergebnisse einer solchen Bilanzierung beschrieben und diskutiert, anschließend sollen mögliche Vorgehensweisen für eine Bilanzierung auch nach unvollständiger Umsetzung beschrieben werden.

5.5.1 Bilanzierung nach vollständiger Umsetzung

Im Fall einer vollständigen Umsetzung des Azofarbstoffs kann jedoch eine Bilanzierung durchgeführt werden, in dem die wiedergefundene Menge des Amins bei der mikrobiellen Umsetzung mit der Menge Amin verglichen wird, die bei einer rein chemischen Spaltung frei wird (vgl. Ziffer 4.1.3). In die Berechnung muss außerdem die analytische Wiederfindung mit einfließen, da es auch bei der Festphasen-Extraktion zu gewissen matrixbedingten Verlusten kommt. Diese Wiederfindungsraten wurden im Zuge der Validierung ermittelt, vgl. Ziffer 4.1.1.3, Tabelle 8)

Tab. 55 Bilanzierung der Azospaltung bei vollständigem Abbau des Farbstoffs

Amin	$m_{\text{Amin-chem}}$ [μg]	Gefundene m_{Amin} [μg]	Korrigierte m_{Amin} [μg]	Bilanz [%]	Verlust [%]
Benzidin aus Congorot	249,0	96,8	106,6	42,8	57,2
o-Dianisidin aus Direkt Blau 1	206,9	95,9	165,4	79,9	20,1

Deutlich fallen die Unterschiede zwischen beiden Aminen auf: während 79,9% der zu erwartenden Menge an o-Dianisidin tatsächlich gefunden wurden, also nur etwa 20,1% durch weitere Metabolisierung verloren ging, werden im Fall des Benzidins weniger als die Hälfte der zur erwartenden Menge gefunden, 57,2% unterliegen einer weiteren Metabolisierung.

Dieses Verhalten ist dadurch erklärbar, dass die Methoxy-Gruppen des o-Dianisidins den Angriff weiterer Enzyme durch sterische Blockade abschirmen, während Benzidin solche Gruppen nicht aufweist und daher verstärkt dem Abbau unterliegt.

Vergleicht man die Metabolisierung der Amine, die durch reduktive Spaltung der Farbstoffe erzeugt wurden mit dem Abbau der gleichen Stoffe, wenn sie dem Assay durch Dotierung zugesetzt wurden, so fällt auf, dass der Abbau ungleich höher ist, wenn das Amin erst durch Spaltung erzeugt wurde. Eine mögliche Erklärung dafür wird unter Ziffer 5.6 diskutiert.

5.5.2 Möglichkeiten der Bilanzierung bei unvollständiger Umsetzung

Das eben beschriebene Verfahren ist jedoch z.B. auf kinetische Untersuchungen nicht anwendbar, da hier ja der Fortgang der Reaktion, während noch Farbstoff vorhanden ist, beobachtet werden soll.

Es kann weiterhin nicht angewandt werden, wenn die gesamte Inkubation unter Substratsättigung verlaufen soll. Substratsättigung kann ja nur vorliegen, wenn eine bestimmte Menge nicht umgesetzten Farbstoffs im Assay verbleibt.

Grundsätzlich bestehen 2 Möglichkeiten, um die Restmenge des im Assay verbliebenen Farbstoffs zu bestimmen:

- Extraktion mit organischen Lösungsmitteln unter erhöhtem Druck und Temperatur durch beschleunigte Lösemittelextraktion (Accelerated Solvent Extraction – ACE) oder
- reduktive Spaltung des adsorbierten Farbstoffs mittels Natriumdithionit und anschließende Bestimmung des freigesetzten Amins gemäß der beschriebenen Verfahren.

Zur Quantifizierung des in der überstehenden Flüssigkeit gelösten Farbstoffs bieten sich an:

- Entweder die direkte Injektion der ggf. verdünnten Lösung zur chromatographischen Bestimmung des Farbstoffs oder
- Aufteilung der Lösung in 2 gleich große Aliquote, aus einem Anteil wird wie bekannt das durch mikrobielle Spaltung freigesetzte Amin bestimmt, der zweite Anteil wird einer chemisch-reduktiven Spaltung mit Natriumdithionit unterworfen und auf der Differenz der Amin-Mengen die Menge des zuvor noch vorhandenen Farbstoffs berechnet.

5.6 Lokalisierung der Azoreduktasen

5.6.1 Allgemeine Überlegungen

Um die Kinetik der Freisetzung von Aminen aus Farbstoffen besser zu verstehen, aber auch mit dem praktischen Ziel, die Azoreduktasen für weitere Untersuchungen zu isolieren, wäre es wünschenswert, den Ort dieser Enzyme zu kennen. Mehrere Autoren benannten bislang das Cytoplasma als den Ort der enzymatischen Azospaltung^{32, 33, 34}. Im Fall der hier untersuchten Hautbakterien lassen die bislang vorliegenden Ergebnisse noch keinen endgültigen Schluss zu, liefern aber Anhaltspunkte für die folgenden Überlegungen:

Die hier untersuchten Bakterien haben als Prokaryonten einen relativ einfachen Zellaufbau ohne ausdifferenzierte Zellorganelle. Grundsätzlich können bezüglich der Lokalisierung der Azoreduktasen folgende Annahmen aufgestellt werden:

- a) Azoreduktasen werden aus der Zelle an den extrazellulären Raum abgegeben und kommen dort zur Wirkung
- b) Azoreduktasen sind mit der Zellmembran assoziiert, befinden sich dabei aber auf der dem extrazellulären Raum zugewandten Seite
- c) Azoreduktasen sind mit der Zellmembran assoziiert und befinden sich dabei aber auf der dem Cytosol zugewandten Seite
- d) Azoreduktasen befinden sich frei im Cytosol.

5.6.2 Mögliche experimentelle Überprüfung

Die Annahme, dass die Azoreduktasen im extrazellulären Raum wirken, a) und b) ließe sich dadurch überprüfen, dass einem Assay mit intakten Zellen sowohl ein Azofarbstoff als auch reduzierende Coenzyme zugesetzt werden. Falls sich die Azoreduktasen zumindest teilweise im extrazellulären Raum aufhalten, müsste ihre Aktivität durch den Zusatz der reduzierenden Coenzyme deutlich gesteigert werden. Bei bislang unveröffentlichten Arbeiten an der TU Berlin verliefen solche Versuche aber negativ³⁵, daher erscheinen die Annahme a) und b) wenig wahrscheinlich. Weitere Versuche zur Absicherung sind jedoch erforderlich. Im Fall einer nachgewiesenen Freisetzung des Enzyms an die Umgebung wäre die Frage zu diskutieren, ob diese unter physiologischen Bedingungen zustande kommt oder vielmehr Folge von mechanischem (z.B. Schüttelbewegung) oder chemischem Stress (Einwirkung des Azofarbstoffs oder des gebildeten Amins) zustande kommt.

5.6.3 Kinetik des Abbaus der Amine als Anhaltspunkt für eine intrazelluläre Umsetzung

Es gibt weitere Beobachtungen, die darauf hinweisen, dass sich der Wirkungsort der Azoreduktasen im intrazellulären Raum befindet: so zeigten die unter Ziffer 5.5.1 geschilderten Bilanzierungen, dass (speziell im Fall des Farbstoffs Congorot) ein Großteil des durch Spaltung erzeugten Benzidins wiederum metabolisiert wurde. Setzt man dem Assay das freie Amin zu, ist der Abbau weitaus geringer. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich die Azoreduktasen im Zellinnenraum befinden. Wird das Amin dort durch reduktive Spaltung gebildet, ist es weiteren Enzymen der Zellen unmittelbar ausgesetzt und wird in stärkerem Maße abgebaut. Befänden sich die Enzyme dagegen außerhalb der Zellmembran, so würde auch das freie Amin dort gebildet werden und müsste sich hinsichtlich seines Abbaus so verhalten, als wäre es dem Assay von außen zugesetzt worden.

Auf ähnliche Weise erklärt sich auch eine Beobachtung, die bereits unter Ziffer 4.6 diskutiert wurde. Bei der anaeroben Inkubation von Congorot wird offenbar ein Teil freigesetzten Benzidins metabolisiert, da auch bei vollständiger Umsetzung des Farbstoffs, d.h. Entfärbung des Assays nur 80 bis 100 µg Benzidin (statt der zu erwartenden 250 µg) vorliegen. Die Ansätze mit der höchsten Keimzahl (dotiert mit 8 bis 10 ml der konzentrierten Zellsuspension) waren deutlich bzw. sogar vollständig entfärbt. Es ist davon auszugehen, dass mit der Konzentration des Farbstoffs auch die Geschwindigkeit der Freisetzung des Amins zurückging. Wäre dabei die Geschwindigkeit der Abbaureaktion konstant geblieben, so hätte sich kein Fließgewicht eingestellt, vielmehr wäre die Konzentration von Benzidin ab einem gewissen Punkt rückläufig gewesen. Die in Abb. 29 und 30 wiedergegebenen Versuche haben jedoch gezeigt, dass die Konzentration des Benzidins konstant bleibt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Teil des freigesetzten Benzidins, der in den extrazellulären Raum abwandert, kaum noch einer Abbaureaktion unterliegt und die Metabolisierung des freigesetzten Amins nur innerhalb der Zelle stattfindet (Ausnahmen von dieser Regel sind das oxidationsempfindliche 2,4-Diaminotoluol sowie das relativ unpolare 4-Aminoazobenzen, das erneut in die Zelle aufgenommen werden kann und dort einer Azospaltung unterliegt.) In diesem Sinne stützen diese Überlegungen die Vermutung, dass die enzymatische Umsetzung der Farbstoffe (und im wesentlichen auch der Amine) innerhalb der Bakterienzellen stattfindet.

5.6.4 Verknüpfung der Enzyme mit der Zellmembran

Weiterhin stellt sich die Frage, ob die Azoreduktasen frei im Cytosol vorhanden oder mit der Zellmembran assoziiert sind. Diese Frage ist auch von praktischem Interesse, da für weiterführende Arbeiten die Enzyme isoliert werden sollen. Im Anschluss an eine Zerstörung der Zellen mittels Ultraschall sollte daher eine Zentrifugation bei 10000 g für 60 min durchgeführt werden. Unter diesen Bedingungen ist davon auszugehen, dass Fragmente der Membran und evtl. damit assoziierte Enzyme sich im Zentrifugat befinden. Sowohl Überstand als auch Zentrifugat (nach erneuter Suspendierung) können durch Zusatz eines Azofarbstoffs sowie reduzierender Coenzyme auf die Anwesenheit von Azoreduktasen geprüft werden.

In den Arbeiten von Sugiura¹⁷ et al. waren die Azoreduktasen nach Zentrifugation bei 10000 g für 60 min im Überstand vorhanden. Damit ergibt sich ein Hinweis darauf, dass die Enzyme nicht membran-assoziiert, sondern frei im Cytosol vorhanden waren. Dagegen waren Kudlich et al.³⁶ zu dem Ergebnis gelangt, dass sowohl der Rohextrakt als auch die Membranfraktion von *Sphingomonas* sp. strain BN6 eine azospaltende Aktivität aufwiesen und unterschiedliche Enzymsysteme daran beteiligt waren. Eine Übertragung dieser Ergebnisse von den dort untersuchten, aus Umweltproben isolierten Bakterien auf die Mikroflora der menschlichen Haut ist jedoch ohne zusätzliche Experimente nicht möglich.

5.7 Physiologische Bedeutung der Azoreduktase(n)

Azofarbstoffe sind Artefakte, wurden erst im Lauf der letzten 150 Jahre vom Menschen synthetisiert. Mit hoher Wahrscheinlichkeit haben daher die Enzyme, die innerhalb dieser Arbeit als Azoreduktasen bezeichnet wurden, eine andere physiologische Funktion. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass Enzyme der Atmungskette, besonders falls der natürliche Akzeptor Sauerstoff fehlt, die durch sie gebundenen Elektronen auf ein anderes Substrat übertragen. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Enzyme der Abwehr von oxidativem Stress auf die Bakterienzelle dienen. Eine Klärung dieser Frage ist letztendlich aber nur durch Isolation des oder der beteiligten Enzyme zu erwarten.

5.8 Azoreduktase(n) – ein oder mehrere Enzyme?

Da die Fähigkeit zur Azospaltung mit hoher Wahrscheinlichkeit nur eine zufällige Aktivität von Oxidoreduktasen ist, die ansonsten andere Substrate umsetzen, liegt die Vermutung nahe, dass diese Fähigkeit bei mehr als einem Enzym vorhanden ist. Auch Kudlich et al.³⁶ kamen zu

der Annahme, in den einzelnen Fraktionen des von ihnen untersuchten *Sphingomonas* seien unterschiedliche Enzymsysteme an der Azospaltung beteiligt.

Die Vermutung, dass mehr als ein Enzym in der Lage ist, Azofarbstoffe umzusetzen, wird durch folgende experimentelle Beobachtung gestärkt:

In der Woche 33/03 wurden 2 Populationen von *Micrococcus luteus* zur gleichen Zeit und unter gleichen Bedingungen angezchtet:

Bei der Spaltung des Farbstoffes Congorot zu Benzidin wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der freigesetzten Menge des Amins beobachtet. Dagegen traten bei der Umsetzung von Bismarckbraun zu 2,4-Diaminotoluol drastische Unterschiede auf. Damit liegt kein Beweis, aber ein deutlicher Hinweis darauf vor, dass die Farbstoffe von unterschiedlichen Enzymen umgesetzt wurden.

Eine abschließende Antwort auf die Frage, welche und wie viele Enzyme an der Spaltung von Azofarbstoffen beteiligt sind, kann jedoch auch hier nur durch eine Isolierung des Enzyms bzw. der Enzyme gewonnen werden.

5.9 Isolierung des Enzyms

Wie bereits im letzten Abschnitt angedeutet, könnte eine Isolierung des für die Azospaltung verantwortlichen Enzyms (bzw. der Enzyme) entscheidend dazu beitragen, Ablauf, Ursache-Wirkungs-Beziehungen und Auswirkungen der mikrobiellen Azospaltung zu verstehen. Dieser Abschnitt soll ein Verfahren zur Isolierung des Enzyms vorschlagen und Möglichkeiten weiterer Experimente mit dem isolierten Enzym skizzieren.

5.9.1 Mögliche Vorgehensweise bei der Isolierung

Mehrere der unter Ziffer 1.7.1 genannten Autoren hatten die Azoreduktasen der in ihren Versuchen verwendeten Zellen jeweils im Cytoplasma lokalisiert. Ausgehend von der Annahme, dass dies auch auf die Azoreduktasen der Hautbakterien zutrifft, kann ein Verfahren zur Isolierung der bakteriellen Azoreduktase(n) in groben Zügen wie folgt aussehen:

- Anzucht eines Bakterienstammes mit hoher Aktivität der Azoreduktasen, ggf. nach Induktion
- Ernte der Zellen durch Zentrifugation

- Aufschluss der Bakterienzellen mittels Ultraschall analog des von Suguira¹⁷ beschriebenen Verfahrens
- Zentrifugation zur Abtrennung von Nukleoiden und Trümmern der Zellwand
- Nachweis des Enzyms im Überstand
- Aufreinigung des Enzyms mittels geeigneter Verfahren

Eine Freisetzung der Azoreduktasen in den extrazellulären Raum würde die Vorgehensweise erheblich vereinfachen, da lediglich die unzerstörten Zellen durch Zentrifugation abgetrennt werden müssten und das Enzym im Überstand verbliebe. Dagegen würde eine mögliche Assoziation des Enzyms mit der Zellmembran, die wiederum mit Trümmern der Zellwand verknüpft sein könnte, die Isolierung des Enzyms erschweren.

5.9.2 Experimente mit dem isolierten Enzym

Wie unter Ziffer 5.1 beschrieben, konnte bislang keine befriedigende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Arbeitsgang zu Arbeitsgang (inter-day-reproducibility) erreicht werden. Auch 2 Bakterienpopulationen, die parallel und unter identischen Bedingungen angezchtet wurden, verhielten sich hinsichtlich der Umsetzung zumindest eines Farbstoffs deutlich unterschiedlich. Wahrscheinliche Ursache dafür ist, dass die Azospaltung zum einen von der Enzym-Ausstattung der Bakterien abhängt (d.h. in welchem Umfang die Enzyme von den Bakterien gebildet wurden), zum anderen vom Angebot an reduzierenden Coenzymen und damit von der sonstigen Stoffwechsel-Aktivität der Zellen. Auf diese Weise kann es dazu kommen, dass eine weniger konzentrierte Zell-Suspension eine höhere Aktivität aufweist – weil sich die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte u.U. noch in der Wachstumsphase befanden und daher einen aktiveren Stoffwechsel haben, der auch die reduzierende Coenzyme in größerer Menge bereitstellt.

Bereits Experimente mit einem durch Lyse der Zellen gewonnenen Extrakt bieten die Möglichkeit, die Aktivität der darin enthaltenen Enzyme unter definierten Bedingungen durch Zusatz bestimmter Mengen reduzierender Coenzyme beobachten zu können. So lange es sich dabei aber um ein Gemisch verschiedener Enzyme handelt, kann es zu einer Konkurrenz der einzelnen Enzyme um die Coenzyme kommen. Erst durch Arbeiten mit dem isolierten Enzym könnten solche Wechselwirkungen ausgeschaltet werden.

Bei den bisherigen kinetischen Untersuchungen mit intakten Zellen wurde die Freisetzung des Amins, genauer gesagt die zeitliche Entwicklung der Konzentration des Amins im Assay nicht nur durch die Umsetzung selbst beeinflusst sondern auch durch Vorgänge wie:

- Den (vermutlich passiven) Transport des Farbstoffs zum Enzym („Anfluten“),
- die Freisetzung des Amins aus den Zellen,
- die evtl. veränderliche Permeabilität der Membran während des Versuchs,
- die gleichzeitig einsetzende weitere Metabolisierung der Amine.

Als Konsequenz des Zusammenwirkens dieser Faktoren ist das Geschehen relativ komplex und eine gleichmäßige Freisetzung des Amins (entsprechend einer Kinetik 0. Ordnung) wird nur in seltenen Ausnahmefällen beobachtet. Bereits durch Arbeiten mit einer Mischung von Enzymen aus lysierten Zellen könnten die transport- und membran-bedingten Effekte weitgehend ausgeschaltet werden, bei Arbeiten mit den isolierten Azoreduktasen könnte die Metabolisierung der Amine weitgehend vermieden werden. Im Ergebnis würden kinetische Experimente wesentlich vereinfacht und es könnten (bei Sättigung des Enzyms sowohl mit Farbstoff als auch reduzierenden Coenzymen) evtl. reproduzierbare Geschwindigkeitskonstanten für die Umsetzung jedes Farbstoffs ermittelt werden.

Ein isoliertes Enzym könnte einer Strukturaufklärung unterworfen und - sobald die Proteinsequenz des Enzyms bekannt ist, das codierende Gen ermittelt werden. Durch gezielte Überexprimierung dieses Gens besteht die Möglichkeit, größere Mengen des Enzyms zu gewinnen. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, einen gegen das Enzym gerichteten Antikörper zu entwickeln, um damit die Enzymwirkung gezielt ausschalten zu können. Dabei auftretende Ausfall-Erscheinungen im bakteriellen Stoffwechsel könnten entscheidende Hinweise auf die physiologische Funktion der hier als „Azoreduktasen“ bezeichneten Enzyme liefern.