

Entwicklung, Optimierung und Anwendung einer effizienten  
analytischen Methode zur Bestimmung von Carotinoiden  
aus Bakterien und Hefen

# 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

Philipp Kaiser  
aus Lauchhammer

Februar 2009

1. Gutachter: Professor Dr. J. P. Surmann

2. Gutachter: Professor Dr. H. Fuhrmann

Disputation am 29.05.2009

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Herbert Fuhrmann (Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig) und Herrn Professor Dr. Peter Surmann (Fachbereich für Pharmazie, Freie Universität Berlin) am Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Leipzig angefertigt.

Herrn Professor Dr. Herbert Fuhrmann (Universität Leipzig) danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit am Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut, für seine Unterstützung und nicht zuletzt für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Seine Präsenz und seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft waren mir von sehr großem Wert.

Herrn Professor Dr. Johannes Peter Surmann (FU Berlin) danke ich ganz besonders für die Annahme dieses Themas als Gegenstand einer Promotionsarbeit, für seine Betreuung, fachliche Unterstützung sowie für die zahlreichen wissenschaftlichen und praktischen Anregungen und Ratschläge in allen Phasen der Arbeit.

Ganz herzlich danke ich Herrn Dipl.-Ing. Gerald Vallentin (Universität Leipzig) für die technische Hilfe und für die organisatorische Unterstützung der gesamten Laborarbeit.

Herrn Dr. Roland Geyer (Applied Biosystems) gilt mein großer und ganz persönlicher Dank für die Betreuung bei der LC-MS-Analytik und vor allem für die großzügige Gelegenheit der Durchführung einiger Messungen in Rotkreuz (Schweiz).

Professor Dr. Heinz Pertz (FU Berlin), möchte ich für die Möglichkeit der Testaufschlüsse mittels Schwingmühle und für viele konstruktive Ratschläge danken.

Bei Susi Tätzner und Maxi Cöster möchte ich mich besonders für die Hilfe bei der Vorbereitung der Experimente und für die tatkräftige Unterstützung bei den zahlreichen Aufarbeitungen, Extraktionen und Messungen bedanken.

Frau Professor Dr. A. Beck-Sickinger (Institut für Biochemie der Universität Leipzig) danke ich für die Bereitstellung der *French-Press* und ihrem Mitarbeiter Herrn Dr. Ralf David für die technische Einführung in die Apparatur.

Herrn Professor Dr. F. Schweigert (Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam) danke ich für das Überlassen der Carotinoid-Standardsubstanzen und seiner Mitarbeiterin Frau A. Hurtienne danke ich für viele konstruktive Hinweise zur HPLC.

Frau Professor Dr. M. Krüger, Frau Dr. A. Große-Herrenthey und Frau Dr. K. Büsing möchte ich für das Überlassen der Bakterien und Hefen aus der Stammsammlung des Instituts für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig danken.

Herrn Professor Dr. K. Fehlhaber sowie Frau Dr. M. Ludewig (beide Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig) danke ich für das Überlassen von *Brevibacterium linens* sowie für die Bereitstellung von Nährmediengrundstoffen.

Frau Dr. H. Mietke (Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft Leipzig) danke ich für das Überlassen von zahlreichen Hefen und von zwei Pilzstämmen.

Allen Mitarbeitern des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Instituts Leipzig danke ich für das freundliche und überaus angenehme Arbeitsklima.

Der sicherlich tiefstempfundene Dank gilt meinen Eltern. Ihr habt mich immer unterstützt und ermutigt, in mir die Freude an der Wissenschaft geweckt, aber auch liebevoll konstruktive Kritik geübt, was letztlich von unschätzbarem Wert ist.

Und ganz besonders lieb möchte ich mich bei Steffi für ihre grenzenlose Geduld und Liebe bedanken und dass sie immer für mich da war.

## Summary

Carotenoids are unique pigments synthesized in higher photosynthetic plants, photosynthetic microorganisms as well as in non-photosynthetic microorganisms. Due to recent scientific research, the uses of carotenoids have found increasing application in the fields of medicine, biotechnology and food chemistry. However advanced research has only yet begun and a lot still has to be established, especially when it comes to microbiological carotenoids and their applied testing. Consequently there is a need for a robust and highly sensitive measuring technique, as the analysis of microbial carotenoids and their terminal products of substitution sometimes only appear in traces. The aim of this publication is therefore to present the development of an efficient method of analysis for the determination of carotenoids as well as three subsequent applications of the established method on non-photosynthetic bacteria and yeasts.

To breed and harvest the microorganisms, a suitable cultivation technique was developed using agar plates. Resulting from this, the required biomass could be generated for robust analysis. The generation of data for evaluation was uncomplicated and specific parameters influencing control on the growth terms of the examined species was permitted. For the development of the analysis method, emphasis was laid on three main focuses: Firstly, attention was given to the development of a robust and practicable cell-disruption procedure on laboratory scale, which particularly provides a high output of samples. These demands could be met by a combination of enzyme-linked, mechanical and chemical cell disruption techniques. Thus, from the resulting cell detritus, a wide spectrum of carotenoids became available and could be extracted („microbial robustness"). The established cell-disruption procedure used customary laboratory devices only and provided an improvement of many methods used previously.

The second focus lay on the development of robust extraction procedures, by which microbial carotenoids could be extracted exhaustively from the cell pellet after cell-disruption. On the other hand, attention was given to minimize the losses of the extracted carotenoids due to adsorption and degradation. A solvent mixture, containing chloroform and methanol, proved to be agent best suited for efficient extraction. The pro-oxidative properties of chloroform were inhibited by anti-oxidants and adsorptive as well as photo-oxidative losses were minimized by the use of coloured glass vessels. In addition, the losses of hydrophilically substituted carotenoids into the aqueous supernatant (which is discarded finally) were strongly reduced by zincacetate-precipitation prior to the centrifugation and extraction procedure.

The third focus lay on the development and optimization of an efficient and robust chromatographic method, to realize the separation of carotenoid extracts resulting from screening and the subsequent experiments of supplementation. The development and optimization of the chromatographic method was aimed at maximizing the selectivity for screening. At the same time it was aimed to shorten the chromatographic runtime, however sustaining the ability of separating the main carotenoids of selected microorganisms from the supplementation experiments (adequate resolution). This could be achieved by the use of a RP-C<sub>30</sub> stationary phase, the development of sufficient elution gradients, by the optimization of the flow rate and the column temperature, as well as the application of a mobile phase additive. Interpreting the results of the numerous chromatographic tests, it could be assumed that the degradation of carotenoids discovered during the column passage, is due to impurities coming from metal ions and the mechanism of degradation are aggravated by residual silanol groups from the non-encapped RP-C<sub>30</sub> column. The tentative mechanism of the excessive peak-tailing, offered by some xanthophylls, is the hydrophilic interaction between the xanthophyll's oxygen groups and the residual silanol groups of the non-encapped stationary phase. Results demonstrate that certain mobile phase additives may avoid the

negative properties of non-encapped RP-C<sub>30</sub> phases nearly completely and therefore highlight its positive properties. The established chromatographic method shows an acceptable running-time altogether, with a good resolution. Thus a very useful and robust tool for the chromatographic separation of a wide spectrum of microbial carotenoids as well as their substituted derivatives is provided. For the evaluation of this optimized method, parameters for their validation, such as the range of linearity, precision and the recovery rates were determined, as well as the limit of detection and the limit of quantification. The ascertained parameters prove that the established methods provide an exact and efficient analytic procedure for cultivation, harvesting, separation and quantification of carotenoids from bacteria and yeasts.

After the development of the method, it was used for three purposes: The first application was a screening of different bacteria, yeasts and two types of fungi. With this, the amount and the spectrum of several carotenoids could be characterized. Evidently this was a novum for some of the species, who had never had their carotenoid-spectrum characterized before. Using the screening process in combination with the established cell disruption procedure, a good "microbial robustness" for different types of bacteria, yeasts and fungi could be shown. In addition, the method's ability to recognise visually false-positive contents of carotenoids was demonstrated. Moreover, within the screening and the subsequent application of the established method (termed as supplementation experiments), the small amount of lyophilized biomass needed for the determination process and the method's high throughput of samples, were of a big advantage.

With the second application of the method, the effects of more than 20 different nutrients added to a basic-growth medium were examined. The microorganisms (i.e. the selected bacteria and yeasts) were chosen according to the results of the previous screening. Obtained results demonstrate that by supplying certain supplements to the growth medium, a considerable increase in the yield of carotenoids, as well as an effect on the carotenoid biosynthesis is possible. This could be exploited economically. The best effects were achieved by the supplements iron chloride and xylose on *Phaffia rhodozyma* and on *Rhodotorula spp.* With the help of these yeasts the economically important carotenoids Astaxanthin and  $\beta$ -Carotin can be produced biotechnologically. Therefore the preserved results deliver useful data for the optimization of these biotechnological procedures.

With the third and last application, the established method served as a starting point for an improved development of the LC-MS method, which was developed for the identification of isoprenoid biomarkers. Apart from examining the molar mass and fragmentation-patterns of known carotenoids, the method was modified to cater for the decoding of yet unknown carotenoids. If for no other reason, the method developed herewith is especially suited for the identification of biomarkers. Using this technique, ensures that carotenoids and hydrophilically substituted carotenoids are not denatured and their structures altered, which increases the specificity for biomarkers originating from different microorganisms.

Currently little is known about the structure and function of many microbiologic carotenoids. Evidently, as more research is done into the field of microbiologic colorants and dyes, it will widen the spectrum of known carotenoids. This will also open the door for the biochemical use and exploitation in other areas of medicine. Furthermore, using the metabolism of microorganisms, carotenoids could be synthesized in an economical viable way. This work has thus laid some foundation for the analysis of microbial carotenoids.

## Publikationen

### Originalarbeiten

Philipp Kaiser, Peter Surmann, Gerald Vallentin, Herbert Fuhrmann, A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts, *Journal of Microbiological Methods*, **2007**, 70, 142–149 (DOI 10.1016/j.mimet.2007.04.004).

Philipp Kaiser, Peter Surmann, Herbert Fuhrmann, Mobile phase additives for enhancing the chromatographic performance of astaxanthin on non-encapped polymeric C<sub>30</sub>-bonded stationary phases, *The Journal of Separation Science*, **2009**, 32, 34-43, (DOI10.1002/jssc.200800408).

Philipp Kaiser, Herbert Fuhrmann, Peter Surmann, Roland Geyer, An LC-MS-Method for profiling isoprenoid biomarkers in bacteria and yeast, *in preparation*, **2009**.

### Poster

Kaiser, P., Surman, P., Fuhrmann, H., Improved peak shape and relative recovery of all-trans-astaxanthin on a RP-C<sub>30</sub> stationary HPLC phase modified by ammoniumacetate and triethanolamine. *Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Fachgruppe Physiologie und Biochemie*, Gießen **2006**, P33.

Kaiser, P., Surmann, P., Fuhrmann, H., Mobile phase additives for enhancing the rpHPLC performance of astaxanthin. *Leipziger Blaue Hefte Proceedings, 18. Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe Physiologie und Biochemie*, Leipzig **2008**, P116.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Carotinoide in photosynthetisch inaktiven Mikroorganismen	2
1.1.1	Wirtschaftliche und biotechnologische Bedeutung	3
1.1.2	Biochemische und medizinische Aspekte	5
1.2	Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit	7
1.2.1	Entwicklung und Optimierung einer analytischen Methode zur Gewinnung und Bestimmung mikrobieller Carotinoide	7
1.2.2	Screening ausgewählter Bakterien und Hefen auf Carotinoide	7
1.2.3	Untersuchungen zum Einfluss von Nährmedienzusätzen auf das Carotinoid-Spektrum ausgewählter Bakterien- und Hefe-Spezies	8
1.2.4	Nachweis und Charakterisierung von Isoprenoid-Biomarkern	8
<b>2.</b>	<b>Entwicklung, Optimierung und Etablierung einer analytischen Methode zur Gewinnung und Bestimmung mikrobieller Carotinoide</b>	<b>9</b>
2.1	Theoretische Vorüberlegungen zur Entwicklung des analytischen Verfahrens	9
2.2	Aufzucht und Ernte der Mikroorganismen	9
2.2.1	Bemerkungen zu allgemein üblichen Methoden	10
2.2.2	Ergebnisse der etablierten Methode zur Aufzucht und Ernte der Zellen	11
2.2.3	Zusammenfassung der etablierten Aufzuchtmethode	12
2.3	Zellaufschlussverfahren	13
2.3.1	Theoretische Vorüberlegungen und Zielsetzung	13
2.3.2	Ergebnisse der Vorversuche zum Zellaufschluss	14
2.3.3	Ablauf des optimierten Zellaufschlussverfahrens	16
2.3.4	Untersuchungen zur Effizienz des optimierten Zellaufschlussverfahrens	17
2.3.5	Zusammenfassung und Bewertung des optimierten Zellaufschlussverfahrens	19
2.4	Extraktionsverfahren	20
2.4.1	Theoretische Vorüberlegungen und Zielsetzung	20
2.4.2	Auswahl eines Fällungsmittels für hydrophil substituierte Carotinoide aus der Aufschluss suspension	21
2.4.3	Untersuchungen zum Verlust von Carotinoiden durch Adsorption, Isomerisierung und Degradation	21
2.4.4	Auswahl des Extraktionsmittels	23
2.4.5	Auswahl des Phasentrennungsmittels	26
2.4.6	Ablauf des optimierten Extraktionsverfahrens	26



2.4.7	Zusammenfassung und Bewertung des Extraktionsverfahrens .....	27
2.5	Auftrennung der Extrakte mittels HPLC .....	28
2.5.1	Aktueller Wissensstand zur Trennung von Carotinoiden mittels HPLC .....	28
2.5.2	Auswahl der Trennsäule und des Fließmittels .....	29
2.5.3	Nachteile von RP-C <sub>30</sub> -Säulen .....	30
2.5.4	Optimierung der HPLC .....	31
2.5.4.1	Untersuchungen von Fließmittel-Additiven .....	31
2.5.4.1.1	Entwicklung der Testmethode .....	32
2.5.4.1.2	Tests verschiedener Fließmittel-Zusätze .....	33
2.5.4.1.3	Einfluss der Elutionsstärke und des pH der mobilen Phase auf die Peakfläche und die Peaksymmetrie .....	37
2.5.4.1.4	Temperaturabhängigkeit der Peakfläche und der Peaksymmetrie .....	39
2.5.4.1.5	Steigerung der Empfindlichkeit der Methode .....	41
2.5.4.1.6	Vergleich von verschiedenen Säulen-Fabrikaten und Säulen-Chargen .....	41
2.5.4.1.7	Erklärungsansatz zum Wirkmechanismus von Fließmittel-Additiven .....	44
2.5.4.1.8	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Fließmittel-Additive .....	47
2.5.4.2	Einfluss der Fließmittelgeschwindigkeit auf die Trennleistung und Entwicklung geeigneter Fließmittelgradienten zur Trennung der Extrakte .....	48
2.5.4.3	Einfluss der Säulentemperatur auf die Trennleistung .....	51
2.5.5	Zusammenfassung der etablierten chromatographischen Methode .....	55
2.6	Leistungsmerkmale der etablierten gesamten Methode .....	57
2.6.1	Linearitätsbereich und Präzision .....	57
2.6.2	Wiederfindungsrate der Extraktion .....	58
2.6.3	Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze .....	59
2.7	Zusammenfassende Diskussion der etablierten Methode zur Gewinnung und Bestimmung von mikrobiellen Carotinoiden .....	60
<b>3.</b>	<b>Anwendung der Methode (I) - Screening ausgewählter Bakterien und Hefen auf Carotinoide .....</b>	<b>62</b>
3.1	Für das Screening ausgewählte Hefen und Pilze .....	62
3.2	Ergebnisse des Screenings der Hefen und Pilze .....	64
3.3	Für das Screening ausgewählte Bakterien .....	67
3.4	Ergebnisse des Screenings der Bakterien .....	69
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse des Screenings .....	71

<b>4.</b>	<b>Anwendung der Methode (II) - Untersuchungen zum Einfluss von Nährmedienzusätzen auf das Carotinoid-Spektrum ausgewählter Bakterien und Hefen .....</b>	<b>73</b>
4.1	Einführung .....	73
4.2	Auswahl der Supplemente .....	76
4.3	Supplementierungsversuche mit Hefen .....	77
4.3.1	Supplementierung von <i>Rhodotorula spp.</i> .....	77
4.3.2	Supplementierung von <i>Phaffia rhodozyma</i> .....	81
4.4	Supplementierungsversuche mit Bakterien .....	85
4.4.1	Supplementierung von <i>Micrococcus luteus</i> .....	85
4.4.2	Supplementierung von <i>Arthrobacter luteus</i> .....	88
4.4.3	Supplementierung von <i>Brevibacterium linens</i> .....	91
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Supplementierungsversuche .....	94
<b>5.</b>	<b>Anwendung der Methode (III) - Nachweis und Charakterisierung von Isoprenoid-Biomarkern .....</b>	<b>96</b>
5.1	Massenspektrometrische Identifizierung von Carotinoid-Biomarkern unter Zuhilfenahme von Vergleichssubstanzen .....	97
5.2	Identifizierung von Carotinoid-Biomarkern anhand ihres Massenspektrums .....	99
5.3	Identifizierung von isoprenoiden Chinonen als Biomarker .....	103
5.4	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der LC-MS-Messungen .....	106
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeit und Ausblick .....</b>	<b>107</b>
6.1	Zusammenfassung .....	107
6.2	Ausblick .....	109
<b>7.</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>111</b>
7.1	Material .....	111
7.1.1	Verwendete Mikroorganismen .....	111
7.1.1.1	Bakterien .....	111
7.1.1.2	Hefen .....	111
7.1.1.3	Pilze mit hefeähnlichem Stadium .....	111
7.1.2	Chemikalien .....	112
7.1.3	Medien, Puffer und Lösungen .....	114
7.1.4	Geräte und Zubehör .....	114

7.1.5	Verbrauchsmaterialien .....	115
7.1.6	Software .....	116
7.2	Methoden .....	116
7.2.1	Allgemeine Methoden .....	116
7.2.1.1	Herstellung und Aufbewahrung von Standard- und Vergleichslösungen .....	116
7.2.1.2	Methodik der Untersuchung zu Verlusten von Carotinoiden durch Degradation und Adsorption .....	117
7.2.1.3	Methodik zur Quantifizierung der Carotinoide .....	117
7.2.1.4	Methodik der Bestimmung von Verlusten an Carotinoiden bei der Aufarbeitung ....	118
7.2.1.5	Methodik zur Optimierung und Bestimmung des Linearitätsbereiches und der Wiederfindung .....	118
7.2.1.6	Methodik zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....	119
7.2.1.7	Graphische und statistische Verfahren zur Darstellung und Auswertung der Daten ...	119
7.2.2	Mikrobiologische Methoden .....	119
7.2.2.1	Nährmedienbereitung und Supplementierung .....	119
7.2.2.2	Anlegen von Dauerkulturen .....	120
7.2.2.3	Anzucht, Ernte und Lyophilisation der Mikroorganismen .....	121
7.2.2.4	Methoden zum Zellaufschluss .....	121
7.2.2.5	Methodik und Parameter bei der Entwicklung des Extraktionsverfahrens .....	122
7.2.3	Instrumentelle Methoden .....	122
7.2.3.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	122
7.2.3.1.1	Fließmittelherstellung und Vorgehen beim Zusatz von Additiven .....	123
7.2.3.1.2	Variation der Säulentemperatur .....	123
7.2.3.1.3	Variation der Fließmittelgeschwindigkeit und des Fließmittelgradienten .....	123
7.2.3.2	Massenspektrometrisch gekoppelte Flüssigkeitschromatographie (LC-MS) .....	124
7.2.3.2.1	Chromatographische und massenspektrometrische Parameter .....	125
7.2.3.2.2	Methodik zur Identifizierung und Strukturaufklärung .....	126
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>127</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>145</b>
9.1	Tabellen .....	145
9.2	Fotos .....	146
9.3	Chromatogramme und UV-VIS-Spektren .....	149
9.4	Selbstständigkeitserklärung .....	169
9.5	Lebenslauf .....	171

## Abkürzungsverzeichnis

### Carotinoide

AST	Astaxanthin
<i>at</i>	<i>all-trans</i> (geometrisches Isomer)
$\alpha$ CAR	<i>alpha</i> -Carotin
$\beta$ APO	$\beta$ -8'- <i>apo</i> -Carotenal
CAR	Carotin
$\beta$ CAR	<i>beta</i> -Carotin
$\beta$ CRY	<i>beta</i> -Cryptoxanthin
CAN	Canthaxanthin
<i>c</i>	<i>cis</i> (geometrisches Isomer)
DEP	Decaprenoxanthin
ECH	Echinenon
<i>iso</i>	Isomer
LUT	Lutein
LYC	Lycopen
NFX	Nonaflavuxanthin
REN	Reniraten
SAR	Sarxinaxanthin
THI	Torularhodin
TOR	Torulen
ZEA	Zeaxanthin

### Chinone

DE(Me)MC	De- <i>methyl</i> -Menachinon
DE(H <sub>2</sub> )MC	De- <i>dihydro</i> -Menachinon
MC	Menachinon
UQ	Ubichinon
MC(H <sub>2</sub> )	Di- <i>hydro</i> -Menachinon
UQ(H <sub>2</sub> )	Di- <i>hydro</i> -Ubichinon

### Mikroorganismen

AL	<i>Arthrobacter luteus</i>
AB	<i>Acremonium butyrii</i>
ABe	<i>Arthrobacter bergerei</i>
AC	<i>Acidobacterium capsulatum</i>
AN	<i>Arthrobacter nicotianae</i>
AP	<i>Arthrobacter protophormoniae</i>
AU	<i>Arthrobacter uratoxydans</i>
BC	<i>Bacillus cereus</i>
BL	<i>Brevibacterium linens</i>
BV	<i>Bullera variabilis</i>
CI	<i>Candida intermedia</i>

EA	<i>Enterobacter agglomerans</i>
ED	<i>Exophiala dermatitidis</i>
FF	<i>Filobasidium floriformae</i>
LH	<i>Lecytophora hoffmannii</i>
ML	<i>Micrococcus luteus</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PR	<i>Phaffia rhodozyma</i>
RE	<i>Rhodococcus equi</i>
RFI	<i>Rhodotorula spp.</i> , Feld-Isolat
RGL	<i>Rhodotorula glutinis</i>
RGR	<i>Rhodotorula graminis</i>
RMU	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
RSF	<i>Rhodotorula spp.</i> , Faces-Isolat
SS	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
TO	<i>Trichosporon ovoides</i>

### allgemeine Abkürzungen

AA	Essigsäure
AAc	Amoniumacetat
ACl	Ammoniumchlorid
Add	Fließmittel-Additiv
$A^{1\%}_{1\text{cm}}$	spezifische Absorption
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
<i>aq. dem.</i>	<i>aqua demineralisata</i>
<i>aq. dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
ASC	<i>L</i> -Ascorbinsäure
$\alpha$ TOC	<i>alpha</i> -Tocopherol
b.a.	bezogen auf
BIL	Bilirubin
BHT	3,5- <i>di-tert</i> -Butyl-4-Hydroxy-Toluol
BSG	Bestimmungsgrenze
B <sub>12</sub>	Vitamin B <sub>12</sub>
B <sub>1/6</sub>	Vitamin B <sub>1</sub> und B <sub>6</sub> Mischung
CA	Citronensäure
CASO	Casein-Pepton-Soja-Pepton-Agar
CN	Candida-Elektivagar nach Nickerson
DAD	Dioden-Array-Detektor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

EPI	Enhanced-Product-Ion	OH	Hydroxy
ESI	Electrospray Ionisation	p.a.	<i>purum analyticum</i>
EtOH	Ethanol	PBS	Phosphat-Puffer
EW	Einwaage	PHE	Phenylalanin
FE	Eisen-(III)-Chlorid	PP	Polypropylen
<i>ferm.</i>	fermentiert	PTWI	wöchentlich duldbare Aufnahmemenge
FOL	Folsäure		
FTIR	Fourier-Transformations- Infrarot-Spektroskopie	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
GCG	Gesamt-Carotinoidgehalt	RP	Umkehrphase
g.ID	gesicherte Identität	rpm	Umdrehungen pro Minute
GLC	Glucose	RT	Raumtemperatur
IfEP	Institut für Ernährungs- wissenschaft Potsdam	SAB	Sabouraud-Agar
INAP	Industrielle Neben- und Abfallprodukte	SACC	Saccharose
ISTD	Interner Standard	SDS	Natriumdodecylsulfat
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	sog.	sogenannte(s)
k.A.	keine Angaben	<i>spp.</i>	Spezies
kAdd	kein Fließmittel-Additiv	Std.	Standard
<i>lat.</i>	lateinisch	StSa	Stammsammlung
LC	Flüssig Chromatographie	TEA	Triethanolamin
LB	Luria-Bertani-Agar	TEAAc	Triethanolaminacetat
LBK	Luria-Bertani-Kanamycin-Agar	THF	Tetrahydrofuran
LfL	Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft (Leipzig)	THF	Tetrahydrofuran
Lsg.	Lösung	TIC	Totalinonenchromatogramm
LY	Zell-Lyophilisat	TRP	Tryptophan
LYS	Lysin	TS	Trockensubstanz
m.	Mutante	T <sub>s</sub>	Säulentemperatur
MAL	Maltose	UV	Ultraviolett
ME	Malz-Extrakt-Agar	u.w.	und weitere
MET	Methyl	VDLUFA	Verband Deutscher Landwirt- schaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
MeCN	Acetonitril	vgl.	vergleiche
MeOH	Methanol	v.ID	vorläufige Identität
MS	Massen-Spektrometrie	VIS	sichtbarer Spektralbereich
MTBE	<i>tert</i> -Methyl-Buthyl-Ether	VO (EG)	Verordnung der Europäischen Gemeinschaft
NaAc	Natriumacetat	<i>vs.</i>	<i>versus</i> (gegen)
NaMal	Natriummalonat	XYL	Xylose
n.ID	nicht identifiziert	YGC	Hefe-Extrakt-Glucose- Chloramphenicol-Agar
NWG	Nachweisgrenze	z.T.	zum Teil
		ZZuV	Zusatzstoffzulassungs-Verordnung

## 1. Einleitung

Unter den verschiedenen in der Natur vorkommenden Pigmenten kommt den Carotinoiden auf Grund ihrer vielfältigen Eigenschaften und Funktionen eine besondere Bedeutung zu. Carotinoide sind biologisch essentiell für die Photosynthese und für das Leben in einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre. Ernährungsphysiologisch zeigen einige Vertreter Provitamin-A-Aktivität und/oder besitzen medizinisch-prophylaktischen Charakter gegen viele degenerative Zivilisationskrankheiten wie Atherosklerose, Macula-Degeneration, Katarakt und Krebs als eine der mortalitätshöchsten Erkrankungen überhaupt (MAIANI et al. 2009, RAO et al. 2007, KRINSKY et al. 2005, COOPER et al. 1999, COLLINS 2001, AGARWAL et al. 2000, PAIVA et al. 1999, GRADELET et al. 1998, PETO et al. 1981). Des Weiteren werden Carotinoide auf Grund ihrer effizienten Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff und der starken Hautakkumulation bei oraler Supplementierung (Carotinodermie) erfolgreich zur Behandlung von erythropoetischer Protoporphyrinurie eingesetzt (KELLEY et al. 2007, ALEMZADEH et al. 2004, STAHL et al. 2002, EICHLER et al. 2002). Darüber hinaus sind Carotinoide die am häufigsten verwendeten Farbstoffzusätze in Lebensmitteln und Futtermitteln sowie in Kosmetika (LUCAS et al. 2008, BAKER et al. 2005, MÖLLER et al. 2000, NELIS et al. 1991).

Carotinoide verfügen über ein erhebliches Anwendungspotential auf medizinischem, biotechnologischem und lebensmitteltechnologischem Gebiet, was dank aktueller Forschung stetig an Bedeutung gewinnt. Trotzdem zeigt sich speziell auf dem Gebiet der mikrobiellen Carotinoide sowohl in der analytischen Methodik als auch für anwendungsbezogene Untersuchungen ein beachtlicher Forschungsbedarf.

Das Vorkommen, die Struktur und die Funktion vieler mikrobieller Carotinoide sind vielfach noch unbekannt und nicht abschließend erforscht. Strukturell bekannt sind gegenwärtig über 700 verschiedene Carotinoide (FRASER et al. 2004, HORNERO-MENDEZ et al. 2002). Über 80% dieser Carotinoide wurden dabei ursprünglich aus Pflanzen oder Tieren isoliert und sind Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten, welche in zwei Fällen sogar die Verleihung des Nobelpreises nach sich zogen (RICHARD KUHN und PAUL KARRER, Nobelpreis für Chemie 1937 und 1938). Im Vergleich dazu sind Carotinoide aus Mikroorganismen, insbesondere aus photosynthetisch inaktiven Mikroorganismen wie Hefen, Pilzen und Bakterien, bisher wenig untersucht worden.

Unabdingbare Voraussetzung für jede Forschungsarbeit über mikrobielle Carotinoide ist eine reproduzierbare und robuste Analytik. Da Carotinoide sehr instabil gegenüber Licht, Sauerstoff und erhöhten Temperaturen sind und zur Isomerisierung und Degradation neigen, muss bei der Analytik und vor allem bei der Extraktion darauf geachtet werden, dass diese einerseits möglichst schnell und probendurchsatz-stark (wirtschaftlich) ist, aber andererseits auch selektiv, quantitativ und artefaktfrei verläuft. Dies gelingt zumeist nur durch die Entwicklung von einer speziell auf das Problem zugeschnittenen Analysenmethode.

## 1.1 Carotinoide in photosynthetisch inaktiven Mikroorganismen

Carotinoide sind in der mikrobiellen Biosphäre weit verbreitet, wobei sie nicht nur obligat in photosynthetisch aktiven, sondern fakultativ auch in photosynthetisch inaktiven Mikroorganismen vorkommen (LIAAEN-JENSEN et al. 1972). Zur ersten Kategorie zählen alle Algen und zur zweiten viele Pilze und Hefen. Im Reich der Pilze können Carotinoide in Vertretern aller vier Klassen (*Myxomycetes*, *Phycomycetes*, *Ascomycetes* und *Basidiomycetes*), aber vor allem auch in der Gruppe der *Fungi imperfecti* (*Deuteromycetes*) gefunden werden (SANDMANN et al. 2002a, DAVOLI et al. 2007, CIEGLER 1965). Im Reich der Bakterien können Carotinoide sowohl in phototrophen als auch in heterotrophen Arten vorkommen (LIAAEN-JENSEN et al. 1972, TAYLOR 1984a). Soweit die bisherigen Ergebnisse eine Verallgemeinerung für mikrobielle Carotinoide zulassen, treten im Vergleich zu den pflanzlichen Carotinoiden neben den sauerstofffreien Carotinoiden (Carotine) bevorzugt mehr oder weniger hoch oxidierte Xanthophylle in strukturell großer Vielfalt auf (LIAAEN-JENSEN et al. 1972). Dennoch konnte das Xanthophyll Lutein, im Gegensatz zu seinem Konstitutionsisomer Zeaxanthin, in photosynthetisch inaktiven Mikroorganismen bislang noch nicht eindeutig nachgewiesen werden (BHOSALE et al. 2003a, BHUPINDER et al. 1991, CIEGLER 1965). Neben der Akkumulation von sauerstofffreien Carotinoiden ist für viele Pilze und Hefen die Akkumulation von Xanthophyllen mit sauren Molekülgruppen, wie beispielsweise Neurosporoanthin, Torularhodin und Rhodotorulin, charakteristisch (CIEGLER et al. 1965).

Abgesehen von ihrer Funktion als sekundäre Lichtsammel-Pigmente können Carotinoide in photosynthetisch aktiven Bakterien die Zelle vor letaler Photooxidation, verursacht unter anderem durch zelleigenes Bakteriochlorophyll, schützen (MATHIS et al. 1982, BURNETT et al. 1976, SISTROM et al. 1956, FULLER et al. 1958, MARESCA et al. 2006). In photosynthetisch inaktiven Bakterien und Hefen scheinen Carotinoid-Pigmente eine ähnliche photoprotektive Funktion zu erfüllen (GESSLER et al. 2002, TADA 1993, KUNISAWA et al. 1958, MICHELINE et al. 1959, DUC et al. 2006). Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass eine Exposition der Zellen mit UV-Licht in Kombination mit Sauerstoff auf Carotinoid-pigmentierte Bakterien im Gegensatz zu ihren pigmentlosen Mutanten kaum phototoxisch wirkt (MATHEWS et al. 1960, DWORKIN et al. 1958). Allerdings zeigen nicht alle Experimente mit farblosen Mutanten eine verstärkte Phototoxizität im Vergleich zum Wildtyp (GOODWIN 1980). Manche Zellen zeigen Phototoxizität, unabhängig von einem endogenen Photosensitizer, nur bei Anwesenheit eines exogenen Photosensitizers (MICHELINE et al. 1960). Die Annahme, dass mikrobielle Carotinoide nicht zwingend notwendig für den Schutz vor Photooxidationen sind, wird von der Tatsache gestützt, dass in nicht-phototrophen, aeroben Bakterien und in Hefen Carotinoid-Pigmente eher sporadisch vorkommen. Eine gesicherte photoprotektive Funktion für Carotinoide in photosynthetisch inaktiven Mikroorganismen bleibt demzufolge fraglich, letztlich auch deshalb, weil viele sekundäre Metabolite eher als Abfallprodukte angesehen werden, die einem metabolischen Überschuss der Zelle mit Kohlenstoff entstammen sollen (ROSE 1979). Gleichwohl werden sekundäre Metabolite von den Zellen hauptsächlich erst dann abgesondert, wenn das Wachstum zum Stillstand gekommen ist, wohingegen intrazelluläre Carotinoide oftmals wachstums-gekoppelt sind (TANAKA et al. 1971, ROSE 1979). Eine vergleichsweise wenig geprüfte Hypothese zur Funktionalität nicht-phototropher bakterieller Carotinoide ist die Funktion eines Membranverstärkers, welche in Eukaryoten von Cholesterol und anderen Sterolen übernommen wird (MITCHELL et al. 1986, OURISSON et al. 1994). Durch ihre membranähnliche Lipophilie und Molekülgeometrie können sich Carotinoide in biologische

Membranen einlagern und in der Folge ihre Fluidität verändern (PINTEA et al. 2005). Bei thermophilen Bakterien wird beispielsweise eine funktionelle Membranverstärkung durch Carotinoide als Überlebensstrategie bei extrem hohen Temperaturen postuliert (HARA et al. 1999, SUBCZYNSKI et al. 1992). Hierfür sind besonders geeignet Carotinoide mit polaren Endgruppen wie Hydroxycarotinoide und deren Glycoside sowie Fettsäureester, welche vor allem in thermophilen Bakterien zahlreich vertreten sind (ROTTEM et al. 1979, LAZRAK et al. 1988).

Prinzipiell ist die Untersuchung von Strukturen und biologischen Funktionen mikrobieller Pigmentierungen schon seit einiger Zeit Gegenstand von Forschungsarbeiten. Viele dieser Arbeiten liegen jedoch sehr lang zurück und wurden nicht mit den heute zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten und der hoch entwickelten Analytik durchgeführt. Daher ist es sinnvoll, bereits bestehende Ergebnisse mit einer adäquaten Methode zu überprüfen und zu verifizieren, insbesondere da manche Ergebnisse häufig widersprüchlich sind. Beispielsweise sei hier die äußerst kontroverse Diskussion um das Vorkommen von Canthaxanthin in *Micrococcus roseus* genannt (NELIS et al. 1991 u. 1989a, COONEY et al. 1966 u. 1981, UNGERS et al. 1968, SCHWARTZEL et al. 1970 u. 1974a, ASCENZI et al. 1975, DIERINGER et al. 1977). Darüber hinaus ist insbesondere bei photosynthetisch inaktiven Mikroorganismen das Wissen über die Zusammensetzung und die Steuerung der Pigmentbildung noch lückenhaft, während photosynthetisch aktive Organismen diesbezüglich genauer untersucht worden sind.

### **1.1.1 Wirtschaftliche und biotechnologische Bedeutung**

Der Bedarf an preisgünstigen Carotinoiden für Lebensmittel, Futtermittel, Arzneimittel und Kosmetika ist in den letzten Jahren enorm angestiegen (CIAPARA et al. 2006, BAKER et al. 2005). Parallel zu dem wachsenden Einsatz von Carotinoiden fordert der Verbraucher verstärkt möglichst naturbelassene Produkte und natürliche Quellen für die Carotinoidgeinnung (SILVA et al. 2004, JAYARAJ et al. 2007, BRAMLEY et al. 2003). Beide Ansprüche lassen sich mit Hilfe der chemisch-technischen Synthese nicht erfüllen: Die Entwicklung, Zulassung und Produktion ist preisintensiv und die resultierenden „synthetischen“ Produkte werden beim Verbraucher oftmals weniger akzeptiert als die auf „natürlichem“ Wege hergestellten Produkte (HUSSAIN et al. 2006). Auch gentechnische Herstellungsverfahren sind beim Verbraucher zumeist unerwünscht und werden deshalb und auf Grund der kostspieligen Entwicklung sowie zahlloser gesetzlicher Vorschriften (Zulassung, Kennzeichnung, Ausbringen in Freilandversuchen etc.) bislang nur in geringem Umfang zur Herstellung von Carotinoiden angewandt (DUC et al. 2006, FRASER et al. 2004). Gleichermaßen sind gentechnisch, für Futtermittel gewonnene Carotinoide im Moment wirtschaftlich wenig attraktiv (BAKER et al. 2004). Demgegenüber ist die biotechnologische Produktion mit Hilfe von genetisch nicht veränderten Mikroorganismen eine vom Verbraucher akzeptierte und zur Deckung des steigenden Bedarfes an speziellen Carotinoiden bevorzugte Variante (AMITABHA et al. 2007, DUC et al. 2006, SAJILATA et al. 2008).

In Deutschland und in der EU sind gegenwärtig über 20 verschiedene Carotinoide zur Färbung verschiedenster Lebensmittel und Futtermittel zugelassen (ZZuV 2008, Anlage 1). Einige wenige Vertreter, wie beispielsweise Bixin und  $\beta$ -Apo-8'-carotenal ( $\beta$ APO), werden dabei ausschließlich synthetisch hergestellt (COUNSELL 1984). Die Mehrzahl der gegenwärtig verwendeten Carotinoide hingegen wird sowohl synthetisch als auch durch Extraktion von Pflanzen gewonnen (FRASER et al. 2004, MANGELS et al. 1993,



KLÄUI et al. 1981, TAYLOR et al. 1984b). Ein nicht unerheblicher Anteil der verwendeten Carotinoide stammt aus biotechnologischer Produktion mittels Mikroorganismen (FRASER et al. 2004, EVANS et al. 1990). Vornehmlich für die orangeroten Ketocarotinoide gibt es anstelle von Mikroorganismen bislang keine andere preiswerte kommerziell nutzbare pflanzliche oder tierische Quelle (JAYARAJ et al. 2007, CUNNINGHAM et al. 2005, HUSSAIN et al. 2006). Besonders die Pigmentgruppe der Ketocarotinoide hat in letzter Zeit enorm an medizinischem und wirtschaftlichem Interesse gewonnen. Das verstärkte wirtschaftliche Interesse an der mikrobiellen Carotinoid-Synthese resultiert hauptsächlich aus dem Ausbau der Meerestierzucht (Aquakultur), wobei Astaxanthin (AST) dem Futter zugesetzt wird, um bei Lachsen, Forellen und Krebstieren die vom Verbraucher gewünschte Pigmentierung zu erreichen (BOEHMER et al. 2005, OSTERMEYER et al. 2004, SPRINGATE 1999). Medizinisch ist die mikrobielle Synthese von Ketocarotinoiden, wie beispielsweise AST und Canthaxanthin (CAN), überaus interessant, da beide Xanthophylle eine bessere antioxidative Aktivität und andere physiologische Effekte zeigen als ihre sauerstofffreien Analoga (JAYARAJ et al. 2007, SUZUKI et al. 2006, OHGAMI et al. 2003, LEE et al. 2003, MIKI et al. 1991, KRINSKY et al. 1993).

Konkurrierend zur mikrobiell-biotechnologischen Produktion werden Ketocarotinoide wie AST und CAN von Hoffmann-La Roche und der BASF AG auch mittels chemischer Totalsynthese hergestellt (CIAPARA et al. 2006, DE MIGUEL et al. 2001, SPRINGATE 1999).

Mikrobiell-biotechnologisch können Carotinoide prinzipiell aus photosynthetisch aktiven und photosynthetisch nicht aktiven Zellen gewonnen werden. Inzwischen werden sowohl aus Algen (*Dunaliella spp.* und *Haematococcus spp.*) als auch aus Hefen bzw. Pilzen (*Phaffia rhodozyma* und *Blakeslea trispora*), Produkte versuchsweise kommerzialisiert (GARCÍA-MALEA et al. 2009, LIU et al. 2008, BOONYARATPALIN et al. 2001, MANTZOURIDOU et al. 2008). Die ökonomische Produktion von Carotinoiden mit Algen oder anderen phototrophen Mikroorganismen im Großmaßstab wird jedoch durch einige Nachteile begrenzt:

- Die Carotinoid-Synthese und Akkumulation ist an die Sonneneinstrahlung gekoppelt. Aus diesem Grund muss die Anzucht in großflächigen Teichanlagen an geographisch und klimatisch geeigneten Orten erfolgen (ASKER et al. 2002, DOMINGUEZ-BOCANEGRA et al. 2007, MALDONADE et al. 2008).
- Photosynthetisch aktive Mikroorganismen synthetisieren überwiegend  $\beta$ -Carotin ( $\beta$ CAR) und/oder  $\alpha$ -Carotin ( $\alpha$ CAR) als Hauptcarotinoid und seltener die bevorzugten Ketocarotinoide (CIEGLER et al. 1965 u. 1959).
- Die Synthese von wirtschaftlich bedeutsamen Ketocarotinoiden, wie CAN und AST mit Hilfe von Algen stellt hohe Ansprüche an das Wachstumsmedium und muss häufig erst induziert werden (DOMINGUEZ-BOCANEGRA et al. 2007, HARKER et al. 1996, NELIS et al. 1991).
- Zur Gewinnung der Carotinoide muss Chlorophyll aufwendig abgetrennt werden (GRIEHL et al. 2007, GARCÍA-MALEA et al 2009, HUANG et al. 2008, MACIAS-SANCHEZ et al. 2008).

Aus den genannten Gründen sollte die Verwendung photosynthetisch nicht aktiver Mikroorganismen für eine biotechnologisch effiziente Carotinoid-Produktion besser geeignet sein. Hierbei können entweder die in der Natur vorkommenden Wildstämme oder gentechnisch modifizierte Mikroorganismen wie beispielsweise *Escherichia coli* und *Candida utilis* verwendet werden (ALBRECHT et al. 1997 u. 2000a/b, WANG et al. 1999, MIURA et al. 1998). Allerdings offenbaren die gentechnisch modifizierten Stämme, neben der bereits erwähnten mangelnden Verbraucherakzeptanz, auch einige biochemische Nachteile:

- Es können spontane Rückmutationen mit einem daraus resultierenden partiellen bis vollständigen Verlust der Fähigkeit zur Carotinoid-Biosynthese auftreten (BAEZA et al. 2008, DOMINGUEZ-BOCANEGRA et al. 2007 u. 2004, VOET 2002).
- Es können wichtige Gene stillgelegt werden und in der Folge auxotrophe Mutanten entstehen, wodurch preisintensive Nährmedienzusätze, die für ein Wachstum notwendig sind (z.B. Aminosäuren) supplementiert werden müssen (BAEZA et al. 2008, RODRIGUEZ-VILLALON et al. 2008, DE MIGUEL et al. 2001, FRASER et al. 2004).

Bei gleichbleibender Verbraucherhaltung ist die Verwendung natürlicher Wildstämme folglich die ökonomischere Variante zur Produktion mikrobieller Carotinoide. Allerdings befindet sich diese, bis auf einige Ausnahmen, überwiegend noch in der Testphase. Dabei fehlt es insbesondere an effizienten und probendurchsatz-starken analytischen Methoden, um derartige biotechnologische Verfahren kostengünstig entwickeln und optimieren zu können.

### **1.1.2 Biochemische und medizinische Aspekte**

Biochemisch besitzen mikrobielle Carotinoide wie auch ihre pflanzlichen Vertreter die drei charakteristischen Eigenschaften: 1. Radikalfänger (Antioxidans), 2. Dioxygenase-Affinität (Pro-Vitamin-A-Aktivität) und 3. UV-VIS-Absorption (Lichtsammelpigmente). Neben letzterer ist zumeist die Pro-Vitamin-A-Aktivität von  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin und  $\beta$ -Cryptoxanthin ( $\beta$ CRY) die bekannteste Eigenschaft (SIMPSON et al. 1983). Menschen und Tiere können Carotinoide, die mindestens einen funktionellen  $\beta$ -Ionon-Ring im Molekül enthalten, zu Retinal und weiter zu Retinol konvertieren. Ähnlich dazu ist Lutein (LUT) ein Vorläufer von 3-Dehydroretinol (Vitamin A2) in Fischen und ein Vorläufer von 3-Hydroxyretinol in einigen Insekten (OLSON et al. 1989, VOGT et al. 1984).

In der Funktion als Radikalfänger (Antioxidans) können mikrobielle Carotinoide nicht nur positiv, wie beispielsweise Astaxanthin, sondern auch negativ als Resistenzfaktor, wie beispielsweise Staphyloxanthin, wirken (WALSH et al. 2008, LIU et al. 2008). Dies wird im Zusammenhang mit *Staphylococcus aureus* deutlich. *S. aureus* ist einer der widerstandsfähigsten und gegen gängige Antibiotika zunehmend unempfindlichen Keime, welcher biochemisch zugleich Carotinoide (beispielsweise Staphyloxanthin) synthetisieren kann (PELZ et al. 2005, WIELAND et al. 1994, MARSHALL et al. 1981, HAMMOND et al. 1970a/b/c). Auf Grund der Resistenz werden bestimmte Stämme auch als MRSA-Stämme (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*) bezeichnet (Daum 2008, KLEVENS et al. 2007, SINGLETON et al. 2001). Vor allem bei immun-supprimierten Patienten können solche Erreger neben Abszessen und

Wundinfektionen auch lebensbedrohliche Erkrankungen wie eine Herzmuskelentzündung (Myokarditis) und eine Lungenentzündung (Pneumonie) oder eine Blutvergiftung (Sepsis) auslösen. Die Resistenz von MRSA-Stämmen kann dabei zusätzlich durch Carotinoide, die beispielsweise die goldschimmernde Oberfläche von *S. aureus*-Kolonien bewirken (u.a. Staphyloxanthin), noch gesteigert werden. Diese Carotinoid-Pigmente können das Bakterium vor aggressiven Molekülen schützen, welche das Immunsystem zur Abwehr nutzt (WALSH et al. 2008, LIU et al. 2005, PELZ et al. 2005). Die Pigmente wirken – wie in Obst und Gemüse – als Antioxidationsmittel, d.h. sie können Reaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies verhindern, welche von Makrophagen und Granulozyten zur Abwehr generiert werden. Diese Theorie resultiert aus den Erkenntnissen, dass *S. aureus*-Pigment-Mangelmutanten, im Gegensatz zum Wildtyp, *in vitro* eine stark erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Angriff von neutrophilen Granulocyten zeigten (LIU et al. 2005). In Übereinstimmung dazu wurde der unpigmentierte - und für den Menschen normalerweise ungefährliche - *Staphylococcus pyogenes* mit der Transformation und Befähigung zur Biosynthese der *S. aureus*-Carotinoide gegenüber dem Angriff der Neutrophilen deutlich resistenter (LIU et al. 2005). Analoge Ergebnisse zur Beeinflussung der Pathogenität zeigen auch *in vivo*-Versuche im Mausmodell (LIU et al. 2008 und 2005).

Neben *S. aureus* existieren noch eine Reihe weiterer pathogener und/oder fakultativ pathogener Bakterien, die Carotinoide synthetisieren. Beispielsweise kann der gelb pigmentierte *Enterobacter sakazakii* unter bestimmten Bedingungen, insbesondere bei Säuglingen und Kleinkindern, Sepsis, Meningitis und Enteritis auslösen, die nicht selten letal verlaufen (NAZAROWEC-WHITE et al. 1997). Auch fakultativ pathogene *Streptococcus spp.* können durch Carotinoide pigmentiert sein (MERRITT et al. 1978).

Der orange bis rötliche *Rhodococcus equi* hingegen ist hauptsächlich von veterinärmedizinischem Interesse. Er tritt im Tierreich als Pathogen bei Pferden, insbesondere bei Fohlen, auf und verursacht subakute bis chronische Bronchopneumonien, ulzerative Enteritiden, Pyämie sowie auch subkutane Abszesse (SELBITZ 1992, GIGUERE et al. 1997, TAKAI et al. 1997). Beim Menschen verursacht *R. equi* nur gelegentlich opportunistische Pneumonien - vorrangig bei immungeschwächten Personen (EMMONS et al. 1991). Für die Pathogenität von *R. equi* ist u.a. der fakultativ intrazelluläre Parasitismus (beispielsweise in Makrophagen) bedeutsam (ASHOUR et al. 2003, TAKAI et al. 1997). Inwieweit die Pathogenität von *R. equi*, *E. sakazakii* und bestimmten *Streptococcus spp.* analog *S. aureus* durch Carotinoide unterstützt wird, ist jedoch bislang noch nicht untersucht worden. Darüber hinaus zeigen noch weitere potentiell pathogene Bakterien aber auch fakultativ pathogene Hefen Pigmentierungen, die in der Regel auf Carotinoide zurückzuführen sind (NAZAROWEC-WHITE et al. 1997). Ein möglicher Beitrag dieser Carotinoid-Pigmentierungen zum Pathogenitäts-Mechanismus analog zu *S. aureus* wurde ebenfalls noch nicht geprüft.

Demzufolge stellen die mikrobiellen Carotinoide in Bezug auf ihr Mitwirken im Pathogenitäts-Mechanismus bzw. in Bezug auf ihre Eigenschaft als Resistenzfaktor ein bislang kaum erforschtes Gebiet mit vielversprechendem medizinischem Anwendungspotential dar. Sowohl für das Screening und die Strukturaufklärung mikrobieller Carotinoide als auch für Untersuchungen zur Funktionalität derartiger Carotinoide in Mikroorganismen fehlt es bislang noch an adäquaten und leistungsfähigen Methoden.

## 1.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Vielfalt der Mikroorganismen bietet ein noch nicht erschöpftes Potential für das Auffinden neuer Carotinoidstrukturen mit neuen physiologischen Funktionen - medizinisch positiven wie negativen - und mit zahlreichen wirtschaftlichen Verwendungsmöglichkeiten.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung, Etablierung und Anwendung einer Methode zur Gewinnung und Bestimmung mikrobieller Carotinoide. Dabei sollen ausschließlich Carotinoide aus photosynthetisch inaktiven (nicht-phototrophen) Bakterien und Hefen untersucht werden. Zusätzlich soll die Methode auch an Pilzen getestet und weiterführend auf spezielle Fragestellungen angewendet werden.

Die nachstehend aufgeführten Punkte geben die speziellen Ziele und Untersuchungsschwerpunkte der einzelnen Kapitel dieser Arbeit im Detail wieder.

### 1.2.1 Entwicklung und Optimierung einer analytischen Methode zur Gewinnung und Bestimmung mikrobieller Carotinoide

Kapitel 2 beschreibt die Entwicklung und Bewertung der analytischen Methode. Dabei sollen folgende Parameter untersucht und optimiert werden:

- das Verfahren der Keim-Aufzucht und der Zellernte,
- die Gewinnung der für eine Bestimmung notwendigen Probenmenge,
- die Effizienz des Zellaufschlussverfahrens,
- die Effizienz der Extraktion,
- die Effizienz der Trennung und
- die Linearität und Wiederfindungsrate der Methode.

Es wird angestrebt, dass die Methode eine präzise Quantifizierung von mikrobiellen Carotinoiden erlaubt. Das Protokoll der Methode soll hierbei so gestaltet werden, dass eine möglichst breite Anwendbarkeit auf verschiedene Mikroorganismen („mikrobielle Robustheit“) sowie ein hoher Probendurchsatz gewährt wird.

### 1.2.2 Screening ausgewählter Bakterien und Hefen auf Carotinoide

Kapitel 3 beschreibt das Screening, als erste Anwendung der Methode, auf eine Reihe von Bakterien und Hefen sowie auf zwei Pilz-Spezies mit hefeähnlichem Stadium. Basierend auf der optimierten und validierten Methode (Kapitel 2) soll beim Screening qualitativ und quantitativ auf Carotinoide untersucht werden.

### **1.2.3 Untersuchungen zum Einfluss von Nährmedienzusätzen auf das Carotinoid-Spektrum ausgewählter Bakterien- und Hefe-Spezies**

In Kapitel 4 ist die zweite Anwendung der Methode dargelegt. Hierbei sollen an Hand der Ergebnisse des vorangegangenen Screenings bestimmte Mikroorganismen ausgewählt und bei diesen der Einfluss definierter Nährmedienzusätze (Supplemente) auf die Bildung und Verteilung ihrer Carotinoide untersucht werden. Die Ergebnisse sollen dem Auffinden biotechnologisch nutzbarer Nährmedien bzw. Nährmedienzusätze dienen, um die Ausbeute bestimmter Carotinoide zu erhöhen.

### **1.2.4 Nachweis und Charakterisierung von Isoprenoid-Biomarkern**

Kapitel 5 beschreibt die dritte Anwendung und die hierfür eigens entwickelte LC-MS-Methode. Hierbei soll basierend auf der Aufarbeitungsmethode aus Kapitel 2 eine neue LC-MS-Methode entwickelt werden, die potentielle Isoprenoid-Biomarker bekannter Struktur nachweisen und Isoprenoid-Biomarker unbekannter Struktur identifizieren kann. Für letztere sollen anhand der Massenspektren Strukturvorschläge gemacht werden.

## 2. Entwicklung, Optimierung und Etablierung einer analytischen Methode zur Gewinnung und Bestimmung mikrobieller Carotinoide

### 2.1 Theoretische Vorüberlegungen zur Entwicklung des analytischen Verfahrens

Um eine robuste Methode für ein möglichst breites Spektrum von Bakterien (gram-negative und gram-positive) sowie für Hefen und Pilze zu entwickeln, mussten zuerst geeignete Modellorganismen gefunden werden. Die gesuchten Testorganismen sollten dabei folgende Kriterien erfüllen:

- obligate Biosynthese von Carotinoiden,
- leichte Kultivierbarkeit,
- Apathogenität,
- schwer aufschließbare bzw. rigide Zellwand,
- photosynthetische Inaktivität.

Aus den genannten Anforderungen heraus wurde für Bakterien *Micrococcus luteus* und für Hefen *Rhodotorula glutinis* ausgewählt. Beide produzieren bekanntermaßen Carotinoide und sind schwer aufschließbar (SINGLETON et al. 2001, CHISTI et al. 1986, SIMPSON et al. 1977 u. 1963). Des Weiteren zeigen beide keine Photosyntheseaktivität und sind für den Menschen apathogen.

Um die nachfolgende Entwicklung der Methode möglichst effizient zu gestalten, wurde das analytische Verfahren in die folgenden Arbeitsschritte untergliedert:

1. Aufzucht und Ernte der Mikroorganismen,
2. Zellaufschluss bzw. Zell-Lyse,
3. Extraktion und Aufreinigung des Extraktes,
4. Separieren bzw. Auftrennen des Extraktes in Einzelkomponenten,
5. Identifizieren einzelner Komponenten,
6. Quantifizieren einzelner Komponenten und des Gesamt-Carotinoidgehaltes.

Anhand von Vorversuchen wurde jeder Arbeitsschritt einzeln betrachtet und nach Möglichkeit optimiert.

### 2.2 Aufzucht und Ernte der Mikroorganismen

Im Folgenden wird die Entwicklung der Methodik des ersten Arbeitsschrittes, die Aufzucht und Ernte Carotinoid-synthetisierender Mikroorganismen, beschrieben (vgl. 1.2.1).

### 2.2.1 Bemerkungen zu allgemein üblichen Methoden

Die zur Aufzucht Carotinoid-synthetisierender Mikroorganismen im Labormaßstab am häufigsten verwendete Methode ist die Kolben-Schüttelkultur. Diese Form der Anzucht bietet folgende Vorteile:

- einheitliche Wachstumsbedingungen für jede Einzelzelle,
- hohe Biomasseproduktion pro Einzelansatz,
- gute Voraussetzungen für die Übertragung auf die biotechnologische Großproduktion (sog. „Scaling-up“),
- preisgünstige Labormethode.

In einer Flüssigkultur kann das Spektrum und die Menge der gebildeten Carotinoide, neben der chemischen Zusammensetzung des Wachstumsmediums, erheblich durch Faktoren wie dem Lichteinfall und dem Luftzutritt sowie durch die Keimdichte bzw. die Wachstumsphase der Zellen beeinflusst werden (MICHELINE et al. 1960, KRZEMINSKI et al. 1960). Einige Mikroorganismen synthetisieren erst dann bestimmte Carotinoide, wenn sie mit einer gewissen Menge Luftsauerstoff in Berührung kommen (CIEGLER et al. 1965, ANDREWS et al. 1976, AKSU et al. 2005 u. 2007). Daraus ergeben sich für eine mikrobielle Carotinoidproduktion in einer Flüssig-Schüttelkultur folgende Nachteile:

- unzureichendes Sauerstoffangebot (z.T. Verwendung von Schikanekolben notwendig),
- mangelnder bzw. inhomogener Lichteinfall bei einer beleuchtungsgesteuerten Carotinoidbiosynthese,
- Minderung der Carotinoidproduktion durch Diffusion von löslichen Hemmstoffen,
- mangelnde Vergleichbarkeit zwischen Kolben mit unterschiedlichem Volumen/Oberflächen-Verhältnis.

Die Ernte von Zellen aus einer Schüttelkultur erfolgt im Allgemeinen mittels Zentrifugation. Hierbei können lösliche Schwebstoffe und andere Begleitstoffe mit in das Zellpellet gelangen. Diese zusätzliche nicht-zelluläre Biomasse kann beim Auswiegen zu einer systematischen Überschätzung des Trockengewichtes der Zellen führen. Auch Reste von Carotinoiden nicht-mikrobiellen Ursprungs können so aus dem Flüssigmedium in das Zentrifugat gelangen. Beide Gegebenheiten machen einen zusätzlichen Waschschrift notwendig, sofern die Zellen aus einer Flüssigkultur durch Zentrifugieren gewonnen werden. Ein alternatives Verfahren ist die Anzucht der Mikroorganismen auf Platten. Auch dieses Verfahren besitzt im Hinblick auf die Produktion mikrobieller Carotinoide gegenüber der Schüttelkultur einige Nachteile:

- inhomogenes Nährstoffangebot für jede Einzelzelle,
- mögliche Wachstumshemmung durch statische Zell-Zell-Kontakte,
- arbeitsaufwändiger und kostenintensiver als eine Schüttelkultur,
- schwierige Übertragbarkeit auf industrielle Produktionsmaßstäbe (sog. *Scaling up*).

Dessen ungeachtet bietet die Aufzucht Carotinoid-synthetisierender Mikroorganismen auf Platten insbesondere für analytische Zwecke entscheidende Vorteile:

- natürliche Wachstumsform vieler Carotinoid-produzierender Mikroorganismen,
- direkte Lichteinwirkung möglich,
- direkte Sauerstoffeinwirkung möglich,
- direkte Einwirkung von Gasen (z.B. Ozon) als Induktoren/Repressoren der Carotinoidbiosynthese möglich.

### 2.2.2 Ergebnisse der etablierten Methode zur Aufzucht und Ernte der Zellen

Basierend auf den vorgenannten Betrachtungen wurden alle Mikroorganismen letztendlich ausschließlich auf Platten angezüchtet. Die Aufzucht erfolgte auf Basis der Methode der amtlichen Futtermittelkontrolle (VDLUFA). In den Vorversuchen wurde das Animpfen der Platten (Ausstreichen) mittels Drigalski-Spatel sowie mittels Impföse erprobt. Sowohl für *Micrococcus luteus* als auch für *Rhodotorula glutinis* zeigte sich bei Verwendung des Spatelverfahrens eine verminderte Ausbeute an Biomasse pro Platte gegenüber dem Impfösenausstrich. Auf Grund dessen wurden alle nachfolgenden Beimpfungen von Platten mittels Impföse vorgenommen. Ein Überblick über die etablierte Plattenmethode ist in Abbildung 1 dargestellt.

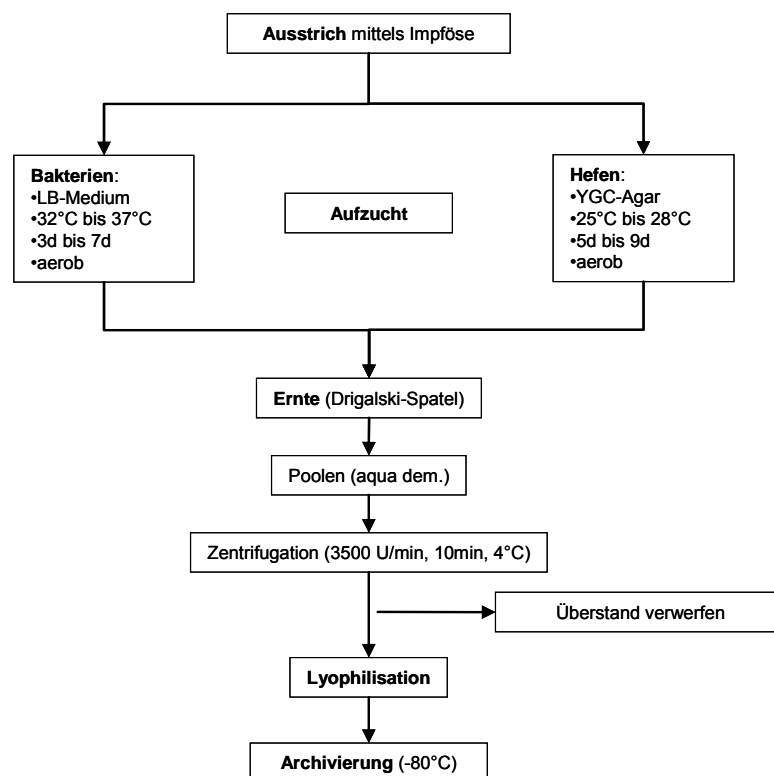


Abbildung 1: Ablauf des etablierten Verfahrens zur Aufzucht und Zellernte von Carotinoid-produzierenden Mikroorganismen.



Um zu überprüfen, ob auf ein zusätzliches Waschen der Zellen verzichtet werden kann, wurde der Carotinoidgehalt mit und ohne Waschschrift bestimmt. Des Weiteren wurde der wässrige Überstand des Zentrifugates quantitativ auf Carotinoide geprüft. Die Ergebnisse mit und ohne Waschschrift (n = 2) zeigten keine nachweisbaren Carotinoide im Überstand und keine Unterschiede im Gesamt-Carotinoidgehalt. Somit konnte ein systematischer Fehler durch Verunreinigungen der Zellen mit Wachstumsmedium ausgeschlossen und ein zusätzlicher Waschschrift eingespart werden.

### **2.2.3 Zusammenfassung der etablierten Aufzuchtmethode**

Die etablierte Plattenmethode lieferte eine sehr zweckdienliche und praktikable Aufzuchtmethode für Untersuchungen des Carotinoid-Spektrums bzw. des Carotinoidgehaltes im analytischen Maßstab. Im Gegensatz zur Schüttelkultur können mit der Plattenmethode, aufgrund der Möglichkeit einer direkten Bestrahlung und Begasung der Platten, photo- und/oder sauerstoff-induktive Effekte besser untersucht werden. Verfälschungen durch Fremdorganismen konnten leicht erkannt und betreffende Platten aussortiert werden, ohne den gesamten Ansatz verwerfen zu müssen. Des Weiteren ermöglichte die Plattenmethode leichter „echte“ Mehrfach-Bestimmungen im Gegensatz zur Schüttelkultur. Bei einer Schüttelkultur erfolgt eine Mehrfachbestimmung zumeist über mehrere Proben aus einem einzelnen Kolben, während bei der oben beschriebenen Plattenkultur eine separate Aufzucht und die weitere Bearbeitung einzelner Platten möglich ist. Hierdurch kann die Streuung des gesamten Verfahrens zwischen mehreren Platten problemlos bestimmt werden. Ferner können einzelne Platten individuellen Wachstumsbedingungen ausgesetzt und so deren Einfluss auf das Carotinoid-Spektrum bzw. den Carotinoidgehalt bestimmt werden. Es sei jedoch erwähnt, dass die Methode gegenüber der Aufzucht als Schüttelkultur in Kolben kosten- und arbeitsintensiver (Anfertigung der Platten etc.) ist. Dagegen entfällt bei dieser Methode der bei der Ernte der Zellen aus einer Flüssigkultur notwendige Waschschrift.

Von biotechnologischem Interesse ist, dass mittels Impfösen-Ausstrich pro Platte mehr Biomasse gewonnen werden konnte, als mittels Drigalski-Ausstrich. Möglicherweise hemmt beim Drigalski-Ausstrich ein allseitiger Zell-Zell-Kontakt das Wachstum stärker als ein einseitiger Zell-Zell-Kontakt beim Impfösen-Ausstrich.

## 2.3 Zellaufschlussverfahren

Im Folgenden wird die Entwicklung der Methodik des zweiten Arbeitsschrittes, das Zellaufschlussverfahren, beschrieben (vgl. 1.2.1).

### 2.3.1 Theoretische Vorüberlegungen und Zielsetzung

Bis auf wenige *Archaea* erfordert die Gewinnung von Carotinoiden aus Pflanzen, Algen, Hefen, Pilzen und Bakterien ein mehr oder weniger kompliziertes Aufschlussverfahren (ASKER et al. 2002). Insbesondere Hefen und gram-positive Bakterien sind gegenüber gram-negativen Bakterien, Algen und höheren Pflanzen deutlich schwerer aufschließbar (ZIPPER et al. 1966, ANDERSON 2004). Aus diesem Grund wurden für die Entwicklung und Optimierung des Aufschlussverfahrens die Hefe *Rhodotorula glutinis* und der gram-positive *Micrococcus luteus* als Testorganismen ausgewählt (vgl. 2.1). Grundsätzlich können Mikroorganismen mechanisch, chemisch und enzymatisch aufgeschlossen werden (DINGERMAN 1999, CIEGLER et al. 1965). Hierbei bietet der mechanische Aufschluss die größte Verfahrensvielfalt:

- Mörsern oder Verreiben mit Quarzsand oder Aluminiumoxid,
- Glasperlenaufschluss im Vortexer oder in einer Schwingmühle,
- Frier-Tau-Zyklen bei verschiedenen Temperaturen oder mit Flüssigstickstoff,
- Ultraschallaufschluss mittels Ultraschallsonde oder Ultraschallkammer,
- Hochdruckaufschluss mittels *French-Press*, Homogenizer, Kugelmühle, Schwingmühle u.w..

Bis auf das Ultraschallverfahren sind mechanische Aufschlüsse meist arbeits- und zeitaufwendig. Sie sind teilweise sehr kostenintensiv (Anschaffungs-, Wartungs- und Prozesskosten) und erfordern ein entsprechendes technisches *Know-how* (CAPELO et al. 2004, JOHNSON et al. 1978). Des Weiteren werden einige mechanische Verfahren bei gram-positiven Bakterien (Quarzsand, Glasperlen, Ultraschall) und bei Hefen (*French-Press* u.w. Hochdruckverfahren) zum Teil als mangelhaft bewertet und ihre Effizienz zur Gewinnung verschiedenster Biomaterialien unterschiedlich beurteilt (NI et al. 2008, DINGERMAN 1999, SANGHA et al. 1995). Daher sollte beachtet werden, dass zur Gewinnung bakterieller Carotinoide bestimmte Zellaufschlussverfahren, insbesondere Verfahren, die häufig zur Protein- oder DNA-Gewinnung genutzt werden, unzureichend sein können. Mikrobielle Carotinoide werden auf Grund ihrer Struktur zum großen Teil in Membranen eingelagert, weshalb für ihre Extraktion auch die Membran selbst (Zellwand) zertrümmert (aufgeschlossen) werden muss.

Die beste Effizienz gegenüber einem breiten Spektrum von Mikroorganismen zeigt der Hochdruckaufschluss (SIMPSON et al. 1963 u. 1977, MITCHELL et al. 1986). Das Verfahren ist allerdings von allen mechanischen das prozessintensivste und erfordert einen enormen apparativen und finanziellen Aufwand, bei gleichzeitig nur geringem Probendurchsatz (JOHNSON et al. 1978, SIMPSON et al. 1963 u. 1964). Da Carotinoide temperaturempfindlich sind, muss bei der Verwendung mechanischer Aufschlussverfahren, wie beispielsweise beim Ultraschall und Hochdruckaufschluss, die mitunter in beträchtlichem Maße entstehende Prozesswärme beachtet werden (NI et al. 2008, MERRITT et al. 1978). Alternativ zum mechanischen Zellaufschluss werden chemische und enzymatische Verfahren genutzt. Chemisch können Bakterienzellen mit einer Reihe von Detergentien (z.B. SDS und Guanidin-Isothiocyanat) und Hefezellen mit dem

wassermischbaren Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) oder mit Methylphenidat lysiert werden (PARK et al. 2007, SEDMAK et al. 1990, SPOERL et al. 1971, DINGERMANN 1999, RICHTER et al. 2006). Allerdings wurden Detergentien zur Gewinnung mikrobieller Carotinoide bisher noch nicht eingesetzt. Möglicherweise ist das Verfahren für die Carotinoidgewinnung ineffizient, da die Zellwand an sich intakt bleibt und nur ihre Integrität verliert. Wesentlich attraktiver erscheint die enzymatische Form des Zellaufschlusses von Bakterien mittels Lysozym bzw. von Hefen mittels Lyticase. Problematisch an diesem Verfahren ist, dass die Wirksamkeit von Lysozym gegenüber gram-negativen Keimen eingeschränkt ist und nicht alle Hefe-Spezies und Pilz-Arten mittels Lyticase angreifbar sind (BAUER 2002, ANDERSON 2004, DOI et al. 1976, OBATA et al. 1977, SINGLETON 2001, CHISTI et al. 1986, SANGHA et al. 1995). Des Weiteren wurde festgestellt, dass es im Vergleich zu den aus *Arthrobacter spp.* gewonnenen, weniger aufgereinigten Enzympräparaten, bei Verwendung von zuvor hoch-aufgereinigter und/oder rekombinant hergestellter Lyticase zu einer Minderung der Aufschluss-Effektivität kommt (SHEN et al. 1991, FERRER 2006). Demzufolge werden beim Aufschlussmechanismus von Hefen mittels Lyticase zusätzlich noch weitere, unterstützende Enzyme wie Lipasen und Proteinasen diskutiert (FERRER 2006, SCOTT et al. 1980, CAPELO et al. 2004, ADAMITSCH et al. 2003). Für analytische Zwecke werden alle drei Aufschluss-Methoden (mechanisch, chemisch und enzymatisch) genutzt. In der industriellen Anwendung hingegen ist vor allem der enzymatische Aufschluss wegen der zum Teil sehr hohen Kosten für Enzyme (wie z.B. für Lyticase) bisher limitiert (TAUBERT et al. 2000, CHISTI et al. 1986, SAJILATA et al. 2008). Aus diesem Grund wurden bereits für industrielle Zwecke einige weniger effektive Aufschluss-Verfahren dafür aber ökonomischere Alternativen wie die Sprühtrocknung und die Co-Kultur mit enzymproduzierenden Bakterien (*Bacillus circulans*) getestet (BHOSALE et al. 2003b, TONY et al. 2002, GENTLES et al. 1991, OKAGBUE et al. 1983, JOHNSON et al. 1978).

Während für die Analytik mikrobieller DNA und Proteine eine Vielzahl von Verfahren zum Zellaufschluss existieren, ist die Methodenvielfalt zum Zellaufschluss und zur Gewinnung von Carotinoiden aus Bakterien und Hefen eher begrenzt. Ein effizientes und robustes Verfahren zum effektiven und probendurchsatzstarken Aufschluss von gram-positiven und gram-negativen Bakterien, von Pilzen, Hefen sowie von *Archae* existiert bislang nicht.

### **2.3.2 Ergebnisse der Vorversuche zum Zellaufschluss**

Im Rahmen der Entwicklung des Zellaufschlussverfahrens wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Die Effektivität des Aufschlusses wurde dabei indirekt über die Extraktausbeute zunächst visuell bestimmt. Dazu wurde sowohl die Färbung des Zellresiduums nach erfolgter Extraktion mit verschiedenen Extraktionsmitteln (MeOH, EtOH, Aceton, 2-Propanol) als auch die Farbtiefe des erhaltenen Extraktes beurteilt. Ziel war es, praktikable Verfahren mit guter Extraktausbeute und möglichst hohem Probendurchsatz sowohl für *Rhodotorula glutinis* als auch *Micrococcus luteus* zu finden, die in der Verfahrensoptimierung später sinnvoll kombiniert werden sollten. Aufschluss-Verfahren mit keiner oder mangelhafter Extraktausbeute wurden nicht weiter untersucht. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der in den Vorversuchen getesteten Verfahren.

**Tabelle 1:** Vorversuche zum Zellaufschluss, verwendet wurde lyophilisiertes Zellmaterial, im wässrigen Medium aufgeschlossene Zellen wurden zentrifugiert und danach das Zellpellet extrahiert, alle anderen Proben wurden direkt extrahiert, visuelle Bewertung der Extrahierbarkeit: erschöpfend (+ + +), mäßig (+ +), unzureichend (+), keine (-), Zwischenstufen sind durch Schrägstrich getrennt.

Verfahren	Extrahierbarkeit <i>M. luteus</i>	Extrahierbarkeit <i>Rhodotorula spp.</i>	Bemerkungen zur Methodik	Literaturbezug
<i>French-Press</i>	+ + +	+ / + +	wiederholter Aufschluss einer Zellsuspension in PBS und MeOH	SANGHA 1995 ASCENZI 1975, ANDREWS 1976, SCHARF 1968
heißes Methanol oder heißes Aceton	+ +	+	Test bei 50°C und > 65°C (siedend)	RODRIGUEZ-V.2008 NELIS 1989A, SOBIN 1942
Schwingmühle mit Stahlkugeln	- / +	-	Aufschlussversuche von Zellsuspensionen in PBS, Aceton, MeOH, EtOH	WO/2000/008201, SCHÜTTE 1988, SCHWEDES 1990
alkalisches Methanol	+ / -	-	Direktextraktion (MeOH mit 1% [m/V] KOH)	TAYLOR 1971, NELIS 1989A
Ultraschall	+	- / +	Aufschlussversuche von Zellsuspensionen in MeOH; Aceton/MeOH (1:1, [V/V]) und PBS	MARESCA 2006, ZHENXIN 2008, CAPELO 2004
Ultra-Turrax	- / +	-	Aufschlussversuch in PBS sowie Direktextraktion mit MeOH, Aceton (30.000 U/min)	TAUBERT 2000
Lysozym/Lyticase	+ +	+ +	Aufschluss in PBS bei 37°C	SINGLETON 2001

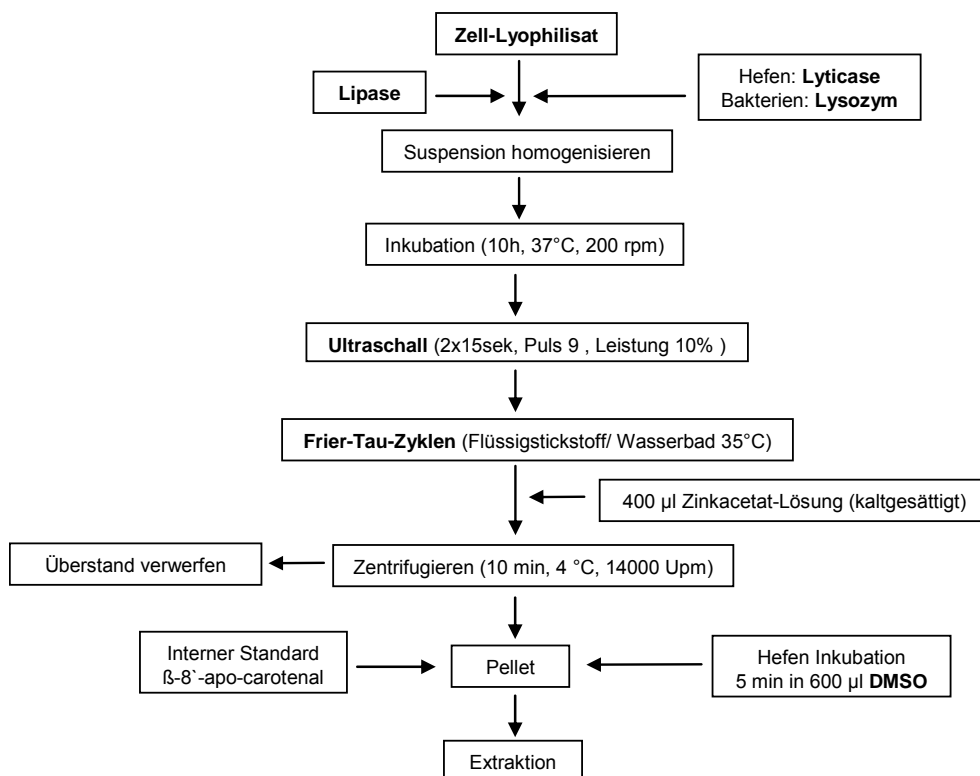
Die beste Extraktausbeute zeigte der Hochdruckaufschluss mittels *French-Press* gefolgt von der enzymatischen Methode. Mittels der Hochdruckmethode konnte für *Micrococcus luteus* eine erschöpfende Extrahierbarkeit (farbloses Residuum) erzielt werden, während für die Hefe *Rhodotorula glutinis* trotz mehrmaligen Durchlaufens des Prozesses keine vollständige Extraktion der Zellen erlangt wurde. Aus diesem Grund wurde das Verfahren zur weiteren Beurteilung zusätzlich an dem Pilz *Lecytophora hoffmanii* getestet. Im Ergebnis war die Effizienz des *French-Press*-Aufschluss für den Pilz ebenfalls nicht zufriedenstellend, da insbesondere das Zellpellet (Residuum) nach der Behandlung in eine graue bis bräunliche Eigenfärbung überging und nicht sicher war, ob die Färbung von nicht extrahierbaren Carotinoiden stammte. Möglicherweise resultierte die Farbänderung der Zellen aus einer latenten Erwärmung der Zellsuspension während des Aufschlusses. Dass sich durch derartige Erwärmungen beim Zellaufschluss Artefakte bilden können, wird in der Literatur zwar bemerkt (ZHENXIN et al. 2008, FOSTER 1992, SIMPSON et al. 1963 u. 1964, HARI et al. 1992), ist für Carotinoide jedoch bislang nicht untersucht worden. Auch bei der Aufschlussmethode mit heißem Methanol sind temperaturbedingt Artefaktbildungen, z.B. *cis-trans*-Isomerisierungen, sehr wahrscheinlich. Daher wurde diese Methode nicht weiter verwendet, zumal die Extraktausbeute bei *Rhodotorula glutinis* nur mangelhaft war.

Grundsätzlich benötigte der *French-Press*-Aufschluss relativ große Probenmengen (40 ml), wobei das Verfahren äußerst arbeits- und zeitaufwendig war. Ein einzelner Durchlauf dauerte mit Zerlegung, Reinigung und Zusammensetzung der Aufschlusskammer über 40 Minuten, was den Probendurchsatz dieser Methode stark limitierte. Des Weiteren geht beim Aufschluss Zellmaterial verloren, da eine komplette Rückgewinnung der eingesetzten Probe aus der Aufschlusskammer nur schwer möglich ist.

Die praktikabelsten Methoden waren der enzymatische Aufschluss und der Ultraschall-Aufschluss. Beide Methoden eignen sich, im Gegensatz zum *French-Press*-Aufschluss, hervorragend zur Bearbeitung von analytisch kleinen Mengen. Da mit der enzymatischen Methode und mit der Ultraschall-Methode im Einzelnen keine erschöpfende Extrahierbarkeit erzielt werden konnte, mussten die Verfahren weiter optimiert werden. Dazu wurden beide Methoden miteinander verknüpft und die zum Aufschluss eingesetzte Enzymmenge erhöht. Auch diese Zweierkombination führte bei *R. glutinis* noch zu keiner erschöpfenden Extrahierbarkeit. Daher wurde das Protokoll zum Zellaufschluss noch um drei Frier-Tau-Zyklen und speziell bei Hefen zusätzliche um eine Inkubation der Zellen in DMSO ergänzt. Abschließend wurde der enzymatische Schritt noch um Lipase ergänzt, um mikrobielle Lipide abzubauen und um mögliche Verstopfungen von HPLC-Kapillaren und von Filtern durch unlösliche Lipide und/oder Lipide zu vermeiden (KAISER et al. 2008, MOROS et al. 2002).

### 2.3.3 Ablauf des optimierten Zellaufschlussverfahrens

Um die Aufschlussmethode für ein breites Spektrum an Mikroorganismen so robust wie möglich zu gestalten, wurden basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche alle drei Verfahren (mechanisch, chemisch, enzymatisch) in geeigneter Reihenfolge miteinander kombiniert. Einen Überblick über das schlussendlich etablierte Zellaufschlussverfahren zeigt Abbildung 2.



**Abbildung 2:** Ablauf des optimierten Verfahrens zum Zellaufschluss Carotinoid-produzierender Bakterien (gram-positive, gram-negative, atypische) und Hefen (Pilze), Einführung der Zinkacetat-Fällung zur Minderung des Verlustes hydrophil substituierter Carotinoide vgl. 2.4.2, verwendete Enzymsuspensionen vgl. 7.1.2.1.

Die beim Ultraschall-Aufschluss häufig auftretende Erwärmung wurde durch eine zeitlich sehr kurze und gepulste Beschallung minimiert. Die fehlende Effizienz von Ultraschall zum Aufschluss gram-positiver Bakterien und Hefen (vgl. 2.3.2) wurde durch den vorgeschalteten enzymatischen Verdau und durch die vorgeschalteten Frier-Tau-Zyklen ausgeglichen. *Micrococcus luteus* und *Rhodotorula glutinis* erwiesen sich auf Grund ihrer rigiden Zellwand als ideale Testkeime zur Entwicklung und Optimierung des Zellaufschlussverfahrens. Bei dem gram-positiven *M. luteus* wurde ein farbloses Residuum (nach Extraktion) erst nach einem Vorverdau mit Lysozym und anschließender Ultraschallbehandlung erhalten. Ähnliches zeigte sich bei *R. glutinis*, bei der die maximale Extraktausbeute erst durch die Kombination aus enzymatischem Verdau (Lyticase) und mechanischer Behandlung (Ultraschall, Frier-Tau-Zyklen) sowie einer Inkubation des Residuums in DMSO erreicht wurde. Da bei dem chemischen Aufschluss in DMSO Artefakte gebildet werden können, wurde dieser ohne zusätzliche Erwärmung bei Raumtemperatur durchgeführt und zeitlich auf fünf Minuten begrenzt.

#### **2.3.4 Untersuchungen zur Effizienz des optimierten Aufschlussverfahrens**

Um die Effizienz des Aufschlussverfahrens zu testen, wurde das nach der Extraktion verbliebene Zellpellett mikroskopisch auf den Zerstörungsgrad sowie auf noch intakte, lebende Zellen mit einem Anzüchtungsversuch und einer Trypanblaufärbung getestet. Der Trypanblau-Test ist ein weit verbreiteter Färbetest, der eine Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen erlaubt. In toten Zellen reichert sich der Farbstoff an (tiefe Blaufärbung). Vitale Zellen sind jedoch in der Lage, den Farbstoff aktiv aus dem Zytoplasma zu entfernen. Der Trypanblau-Test lässt nur die Aussage „lebend“ oder „tot“ zu. Eine Einteilung in einen Zerstörungsgrad ist somit nicht möglich. In Abbildung 3 sind einige mikroskopische Bilder der Zellen mit Trypanblaufärbung dargestellt. Während bei den Bakterien nach erfolgtem Aufschluss keinerlei zelluläre Strukturen mehr zu erkennen sind, zeigen die Hefen noch intakte Membranstrukturen.

Weder Bakterien noch Hefen, einschließlich die Pilze *Acremonium butyrii* und *Lecytophora hoffmanii*, konnten aus dem Residuum nach erfolgter Extraktion wieder angezüchtet werden. An dieser Stelle soll bemerkt werden, dass die Ergebnisse nur Indizien für die Effizienz des Zellaufschlusses darstellen. Um eine detailliertere Aussage über den Aufschlussgrad zu erhalten, wäre ein höheres Auflösungsvermögen des Mikroskops, wie z.B. bei der Elektronenmikroskopie, hilfreich.

Zur weiteren Beurteilung der Aufschlusseffizienz wurde der extrahierbare Anteil an Carotinoiden wie unter 2.3.2 dargestellt, jedoch unter Auslassen des beschriebenen Zellaufschlusses bestimmt. Ohne vorherigen Zellaufschluss konnten im Vergleich zur erzielten Ausbeute des Gesamt-Verfahrens aus Bakterien nur 70% (*A. luteus*, n = 3) und aus Hefen nur 21% (*R. glutinis*, n = 3) der Carotinoide extrahiert werden.

vor dem Zellaufschluss

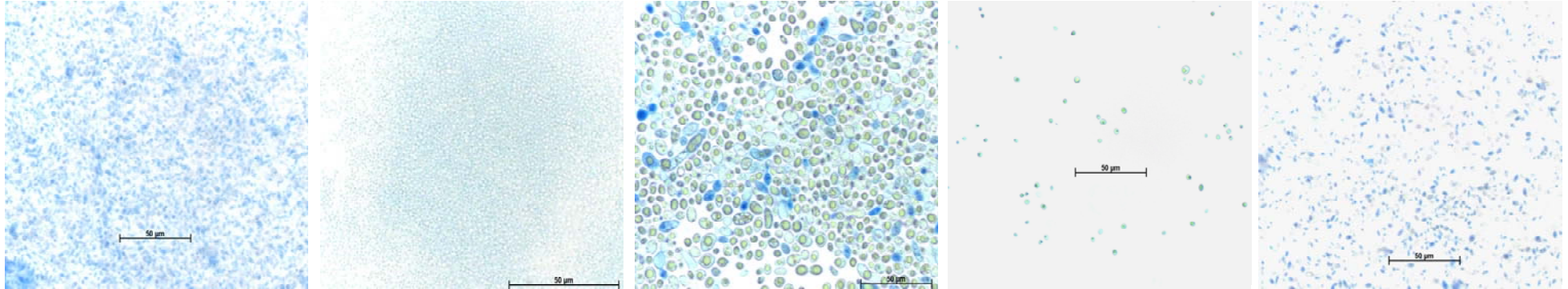
AB

ML

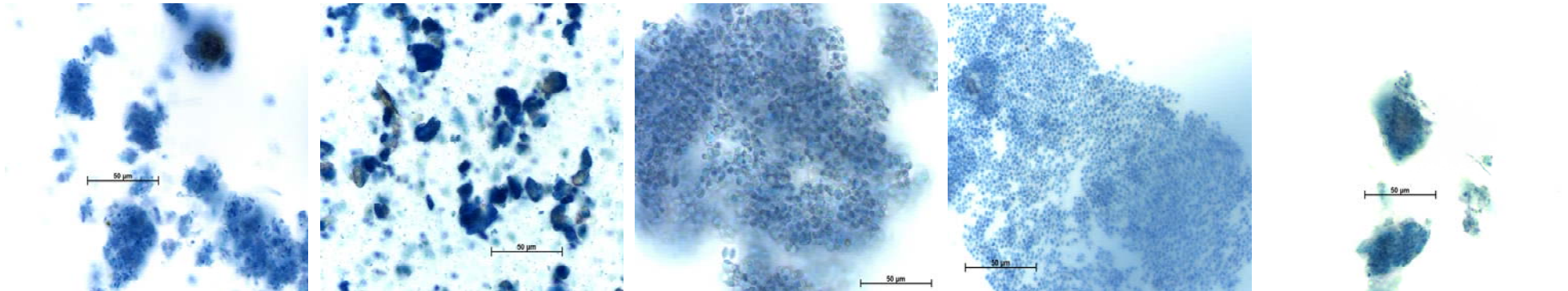
PR

RGL

LH



nach dem Zellaufschluss



**Abbildung 3:** Mikroskopische Bilder vitaler Zellen (Bilder obere Reihe) im Vergleich zu Zellen bzw. zum Zell-Detritus nach erfolgter Aufschluss-Prozedur (Bilder untere Reihe) unter Anfärbung mit Trypanblau, Mikroorganismen von links nach rechts: AB *Acremonium butyrii*, ML *Micrococcus luteus*, PR *Phaffia rhodozyma*, RGL *Rhodotorula glutinis*, LH *Lecytophora hoffmannii*.

### 2.3.5 Zusammenfassung und Bewertung des optimierten Zellaufschlussverfahrens

Ziel war die Entwicklung eines effizienten und probendurchsatz-starken Zellaufschlussverfahrens, welches zugleich möglichst wenig Probenmaterial benötigt. Das Verfahren sollte geeignet sein, ein breites Spektrum von Mikroorganismen praktikabel und effektiv aufzuschließen („mikrobielle Robustheit“). Das Protokoll der etablierten Methode unterscheidet lediglich zwischen Bakterien und Hefen bzw. Pilzen. Eine Differenzierung nach Zellwandtyp (beispielsweise nach gram-positiv und gram-negativ) vor Beginn des Zellaufschlusses ist nicht erforderlich. Außerdem wurde beachtet, dass Bakterien, wie auch Hefen und Pilze in ihrer Sensitivität gegenüber Lysozym bzw. Lyticase stark variieren (FOSTER 1992, ADAMITSCH et al. 2003, ANDREWS et al. 1987, BREITENBACH et al. 2001, FERRER 2006, HARI et al. 1992, LOTTSPREICH 1998, MIDDELBERG 1995, REZWAN et al. 2007, SABOYA et al. 2003, SANTOS et al. 1996, SEDMAK et al. 1990, SINGLETON et al. 2001). Die eingangs gestellten Anforderungen konnten schließlich durch eine Kombination der enzymatischen Aufschlussmethode mit weiteren mechanischen und chemischen Verfahren erreicht werden.

Die Tatsache, dass eine erschöpfende Extraktion des gram-positiven Testkeimes *Micrococcus luteus* nur mit einer Kombination aus Lysozym-Verdau und zusätzlicher Ultraschallbehandlung erreicht werden konnte, ähnelt den Beobachtungen von REZWAN et al. (2007). Mikrobielle Carotinoide können tief in die Zellwand oder in der *Cortex* von Sporen eingebettet vorliegen (DEMBITSKY 2005, MERRITT et al. 1978, ASCENZI et al. 1975). Dabei können sie zusätzlich über Acylgruppen relativ fest mit der Membranen verbunden sein (MARESCA et al. 2006). Angesichts dessen kann es insbesondere bei einem nur „einfachen Aufbrechen“ der Zelle zu einer mangelhaften Extrahierbarkeit der Carotinoide kommen. Gleiches gilt für den Aufschluss von Hefen (*Rhodotorula glutinis*), wobei die durch Lyticase generierten Sphäroblasten offenbar erst durch eine darauf folgende Ultraschallbehandlung bzw. Frier-Tau-Zyklen effektiv zertrümmert werden können. Die Effekte von Frier-Tau-Zyklen und Ultraschall auf Mikroorganismen zur Gewinnung verschiedenster biologischer Substanzen wurden zwar bereits untersucht, jedoch nicht zum Zweck der Gewinnung von Carotinoiden (SINGLETON et al. 2001, BAKIR et al. 1996, SANTOS et al. 1996, MIDDELBERG 1995, ANDREWS et al. 1987).

Um das beschriebene Aufschlussverfahren für ein breites Spektrum von Bakterien und Hefen verwenden zu können, sollten sowohl die Frier-Tau-Zyklen, als auch die Ultraschallbehandlung mit dem enzymatischen Verdau immer in Kombination zur Anwendung kommen. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die vorherige Lyophilisation der Zellen zur Erhöhung der Aufschluss-Effizienz beitragen kann (RICHTER et al. 2006, KLEBER et al. 1997). Diese Form der Trocknung wurde jedoch nicht als Aufschlussschritt an sich verwendet, sondern diente vielmehr der Bestimmung einer korrekten Trockenmasse und gleichzeitig der Vermeidung einer Bildung von Artefakten, wie beispielsweise *cis*-Isomeren, die bei einer konventionellen Hitzetrocknung der Zellen (80°C bis 105°C) entstehen können (SOMASHEKAR et al. 2000, VAZQUEZ et al. 1997).

Die etablierte Methode (vgl. Abbildung 2) bietet, unter Verwendung laborüblicher Geräte und Materialien, eine sehr gute Alternative zu Aufschlussmethoden, die einen hohen apparativen Aufwand oder ein bestimmtes technisches *Know-how* erfordern. Die geringe Probenmenge und der gleichzeitig hohe Probendurchsatz machen das Aufschlussverfahren insbesondere für analytische Screening-Versuche sehr nützlich.



## 2.4 Extraktionsverfahren

Im Folgenden wird die Entwicklung der Methodik des dritten Arbeitsschrittes, das Extraktionsverfahren, beschrieben (vgl. 1.2.1).

### 2.4.1 Theoretische Vorüberlegungen und Zielsetzung

Auf Grund ihrer Struktur können Carotinoide während der Extraktion auf dreierlei Art und Weise verloren gehen (RODRIGUEZ-AMAYA ET AL. 2004, GANG et al. 2001, TADA 1993, BRITTON 1993, SAJILATA et al. 2008):

1. Carotinoide können lichtbedingt isomerisieren.
2. Carotinoide können oxidativ durch Luftsauerstoff angegriffen und abgebaut werden.
3. Carotinoide können irreversibel an Oberflächen adsorbieren.

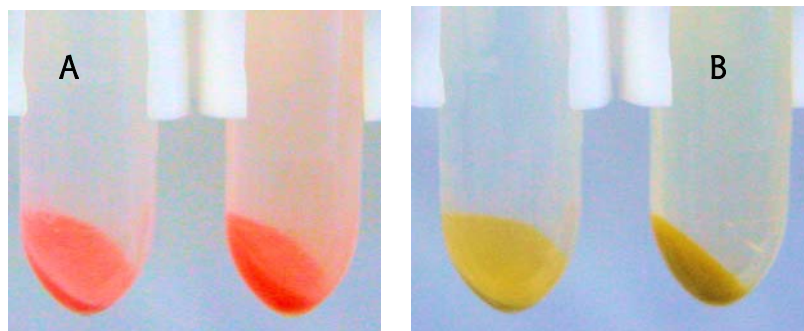
Dabei sind Art und Ausmaß von *cis-trans*-Isomerisierungen, oxidativen und adsorptiven Verlusten einerseits von physikalischen Faktoren wie Licht, Temperatur und der Oberflächenbeschaffenheit des Materials und andererseits auch von chemischen Faktoren, wie z.B. dem verwendeten Lösungsmittel abhängig (DIAS et al. 2008). Oxidative Degradationen lassen sich durch Antioxidantien unterdrücken. Photoisomerisierungen können durch die Verwendung gefärbter Gefäße, irreversible Adsorption durch die Wahl geeigneter Gefäßmaterialien minimiert werden (BRITTON 1993, RODRIGUEZ-AMAYA et al. 2004 u. 2001, EDGE et al. 1997, GANG et al. 2001). Vor diesem Hintergrund wurden anhand einiger Vorversuche oxidative und adsorptive Verluste im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit geplanten Extraktionsschritten untersucht. Die dabei ermittelten Ergebnisse wurden im Anschluss zur Optimierung des Extraktionsprotokolls verwendet. Weitere Parameter zur Optimierung waren die Auswahl und Zusammensetzung des Extraktionsmittels sowie die Wahl des Phasen-Trennungsmittels zwischen hydrophiler und lipophiler Phase. Einerseits bestand das Ziel darin eine hohe Extraktionskraft zu erhalten, um alle Carotinoide möglichst erschöpfend extrahieren zu können. Andererseits sollten während der Extraktion möglichst milde Extraktionsmittel bzw. mit geeigneten Antioxidantien stabilisierte Extraktionsmittel, zur Anwendung kommen, um den Verlust an Carotinoiden zu minimieren.

Insbesondere glycosidisch bzw. glycosidartig gebundene Xanthophylle gelten im Rahmen der Extraktion als analytisch schwer zugänglich (TAYLOR et al. 1974, HARA et al. 1999, YOKOYAMA et al. 1995, GOODWIN et al. 1980, LIAAEN-JENSEN et al. 1972). Diese können kovalent an Zellmatrix-Bestandteile gebunden vorliegen und somit schwer extrahierbar sein. In diesem Fall kann auch eine Steigerung der Effizienz des Zellaufschlusses die Extrahierbarkeit nicht verbessern. Außerdem gehen Xanthophylle mit hydrophilen Substituenten schlecht in die lipophile Phase über (DEMBITSKY 2005, KORONELLI et al. 1982 und 1987). Es gibt Hinweise, dass sich besonders Xanthophylle mit sauren Substituenten bei der Phasentrennung (lipophile/hydrophile Phase) in der Interphase sammeln können und in der Folge schwer zu gewinnen sind (ASCENZI et al. 1975, NELIS et al. 1989a). Die Methode sollte folglich so entwickelt werden, dass derartig amphiphile Carotinoide mit einem geeigneten Fällungsmittel aus der wässrigen Phase gefällt und mit einem lösungsstarken Extraktionsmittel möglichst quantitativ in die lipophile Phase überführt werden.

Zusammenfassend bestand die Aufgabe darin, ein robustes Extraktionsprotokoll für ein breites Spektrum an mikrobiellen Carotinoiden aus verschiedenen mikrobiellen Zellmatrizes zu entwickeln, das gleichzeitig schonend genug ist, um Artefaktbildungen und Verluste zu minimieren.

#### 2.4.2 Auswahl eines Fällungsmittels für hydrophil substituierte Carotinoide aus der Aufschlussesuspension

Bei den Vorversuchen zur Aufarbeitung einiger Testkeime zeigte sich zum Teil eine schlechte Zentrifugierbarkeit von farbigen Zellbestandteilen aus der aufgeschlossenen wässrigen Zellsuspension. Insbesondere bei einigen Bakterien war der Überstand nach dem Zentrifugieren der wässrigen Zellsuspension noch deutlich gefärbt (vgl. Abbildung 4). Hierbei ist davon auszugehen, dass es sich um hydrophil substituierte Xanthophylle handelt (DEMBITSKY 2005, TAYLOR et al. 1974). Um diese für die nachfolgende Extraktion möglichst verlustfrei in das Zentrifugat zu überführen, wurden verschiedene Fällungsmittel getestet. Dabei zeigten die kaltgesättigten Lösungen von Zinnacetat und Zinkacetat im



**Abbildung 4:** Fällung hydrophil substituierter Carotinoide aus dem wässrig, gepufferten (PBS) Zellüberstand mittels Zinkacetat: A: *M. luteus*, B : *Acidobacterium capsulatum*. Jeweils die linke Probe wurde zuvor mit mit Zinkacetat behandelt (400 µl kaltgesättigte Zinkacetatlösung wurden zu 1,2 ml wässrig, gepuffertes Aufschlussesuspension gegeben), jeweils Probe rechts unbehandelt zum Vergleich.

Vergleich zu den Lösungen von Natrium-Dodecylsulfat (SDS), Guanosyltrisphosphat, Harnstoff und Ammoniumsulfat die besseren Fällungseigenschaften (getestete Konzentrationen vgl. 7.2.1.5). SDS als Tensid verursachte sogar einen gegenteiligen Effekt. Der Überstand färbte sich nach dem Zentrifugieren stärker als ohne Fällungsmittel. Da Zink- und Zinn-Ionen bevorzugt Proteine aus wässriger Lösung fällen und SDS Proteine in Lösung hält, wird vermutet, dass die Hydrophilisierung der Xanthophylle eher auf eine Substitution mit Proteinen oder Fettsäuren, als mit Zuckern zurückzuführen ist. Auf Grund der nicht unerheblichen Toxizität von Zinnacetat (PTWI Zinn 14 mg/kg (KG), JECFA 2005) wurde schließlich dem ungiftigeren Zinkacetat der Vorzug gegeben.

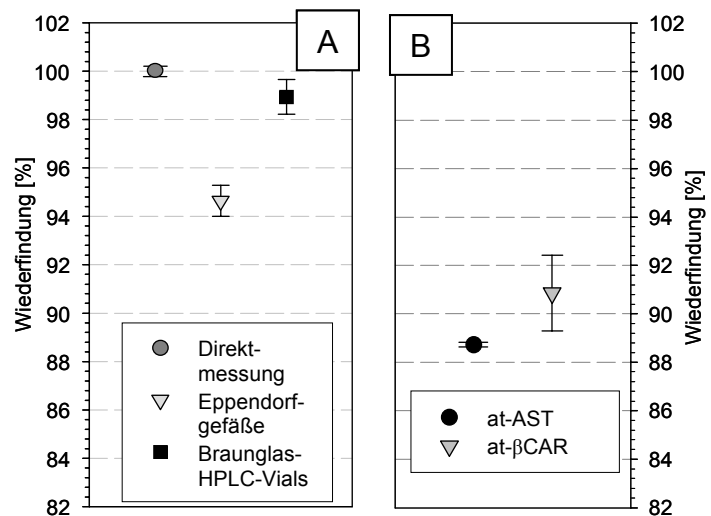
#### 2.4.3 Untersuchungen zum Verlust von Carotinoiden durch Adsorption, Isomerisierung und Degradation

Um den Verlust von Carotinoiden während der Aufarbeitung durch irreversible Adsorption und Degradation zu minimieren, wurden weitere Versuche durchgeführt. In einem ersten Experiment wurde getestet, ob die Verwendung von Eppendorfgefäßen (Polypropylen) anstelle gefärbter Glasgefäße (braun) bei der Aufarbeitung möglich ist. Dazu wurde eine AST/βCAR-Mischprobe hergestellt, photometrisch der Gehalt an

Carotinoiden bestimmt, diese in Glasröhrchen aliquotiert und anschließend die Umverteilung gegen Chloroform (0,1 % BHT [m/V]) durchgeführt. Danach wurden die unteren Chloroformphasen entweder in Eppendorfgefäßen oder in HPLC-Braunglas-Vials überführt und mit Stickstoff bei 35°C im Sandbad eingedampft. Nach dem Wiederauflösen der Residuen in Ethanol wurde der Gesamtgehalt an Carotinoiden erneut photometrisch bestimmt und die Wiederfindung berechnet. Dabei ergab sich unter Verwendung von HPLC-Braunglas-Vials ein durchschnittlicher Verlust von 1,1%, während unter Verwendung von Eppendorfgefäßen der durchschnittliche Verlust an Carotinoiden etwa 5,4% betrug (vgl. Abbildung 5-A). In weiteren Versuchen zeigte sich, dass bei Lagerung von Standardlösungen über zwei Tage bei Raumtemperatur, sowohl bei *at*-AST als auch bei *at*- $\beta$ CAR, die Summe an Verlusten durch *cis-trans*-Isomerisierungen, Degradation und Adsorptionen bis zu 11% betragen kann (vgl. Abbildung 5-B).

**Abbildung 5-A:** Prozentuale Wiederfindung einer AST/ $\beta$ CAR Mischprobe in EtOH nach dem Eindampfen in Kunststoff (PP) im Vergleich zu Braun-Glas unter Stickstoff, die Abbildung zeigt Datenpunkte mit Mittelwert und Standardfehler aus jeweils n=6, der Mittelwert der photometrischen Messung vor dem Versuch (Direktmessung) entspricht 100% Gehalt.

**Abbildung 5-B:** Prozentuale Wiederfindung der *at*-Isomere bei Lagerung einer *at*-AST/*at*- $\beta$ CAR Mischprobe in EtOH über zwei Tage bei RT in Eppendorfgefäßen, die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Spannweiten von jeweils n=2, die Gehaltsbestimmung erfolgte chromatographisch über die Peakfläche der *at*-Isomere vor und nach dem Versuch, alle Lösungen wurden vor dem Chromatographieren filtriert (0,2 $\mu$ m).



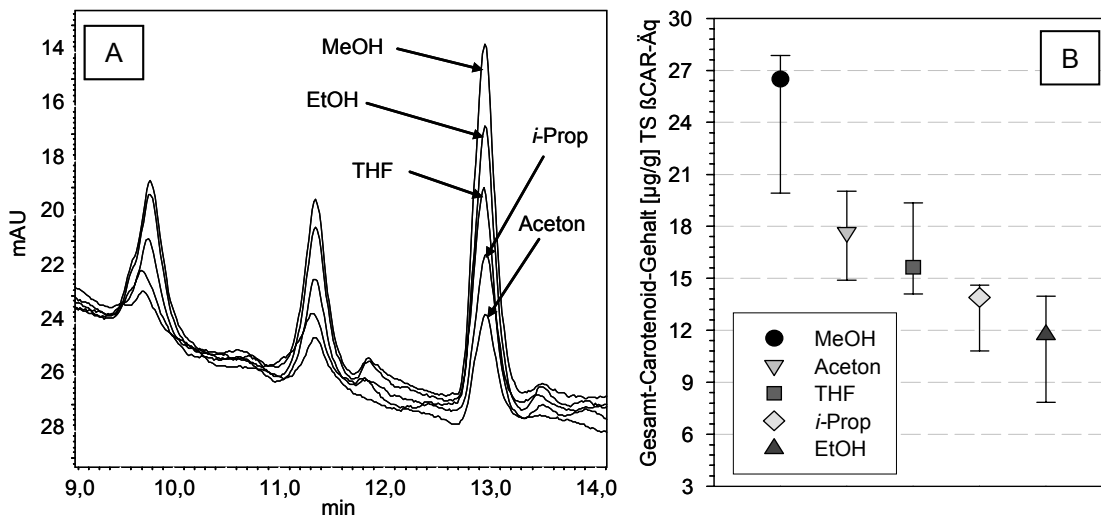
Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Lagerung von Carotinoid-Lösungen bei Raumtemperatur als auch die Adsorption von Carotinoiden aus der Lösung an Kunststoffmaterialien zu erheblichen Verlusten führen kann. Demzufolge wurden bei den folgenden Versuchen ausschließlich Glasmaterialien zum Aufbewahren der Extrakte verwendet und das Extraktionsprotokoll zeitlich so kurz wie möglich gestaltet.

Im Rahmen der Optimierungsvorversuche wurde auch der Nutzen von Pyrogallol (0,1% [m/V]) und Ascorbinsäure (0,6% [m/V]) als Antioxidationsmittel getestet. Der Pyrogallol-Ansatz zeigte nach dem enzymatischen Aufschluss der Testkeime eine starke Braunfärbung der Probe, die bei der Extraktion teilweise in den Extrakt überging (vgl. Anhang Abbildung 57). Da wegen der überdeckenden Braunfärbung die Extraktion der Zellpellets nicht mehr beurteilt werden konnte und bei der nachfolgenden Auftrennung des Extraktes über die HPLC mit Störungen zu rechnen war, wurde der Pyrogallol-Ansatz schließlich verworfen. Ascorbinsäure führte bei *Rhodotorula glutinis* zu einer um mehr als 35% (n=2) verminderten Extraktausbeute. Es wird vermutet, dass Ascorbinsäure die Enzymaktivität von Lyticase beeinflusst. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden beim Aufschlussschritt keine wasserlöslichen Antioxidantien verwendet. Nach dem Aufschluss wurden zur Stabilisierung des Carotinoid-Extraktes für den weiteren Verlauf der Aufarbeitung BHT und zusätzlich alpha-Tocopherol ( $\alpha$ TOC) als lipophile Antioxidantien eingesetzt (FRIXEL 2002, HANDELMANN et al. 1991, PALOZZA et al. 1992, YOSHIDA et al. 2003 u. vgl. 2.4.4).

#### 2.4.4 Auswahl des Extraktionsmittels

In den ersten Untersuchungen an *Rhodotorula glutinis* sollte überprüft werden, welches Extraktionsmittel ein möglichst breites Spektrum an Carotinoiden aus Hefezellen extrahieren kann. Zunächst wurden die Proben mit Lyticase inkubiert. Danach wurde zentrifugiert und fünf verschiedene Extraktionsmittel auf ihre Extraktionskraft getestet. Zum Vergleich der Ausbeuten wurde der Gesamt-Carotinoidgehalt nach erfolgter Aufarbeitung photometrisch als  $\beta$ -Carotin-Äquivalent ( $\beta$ CAR-Äq) bestimmt (vgl. 7.2.1.4).

Wie Abbildung 6 zeigt, war Methanol trotz der großen Streuung der Werte das beste Extraktionsmittel. Mit einer um über 35% signifikant geringeren Extraktausbeute ( $P < 0,05$ ; U-Test;  $n = 4$ ) folgten Aceton und THF (unstabilisiert). Letztere beiden Lösungsmittel unterschieden sich wiederum nicht signifikant in ihrer Extraktausbeute für *Rhodotorula glutinis* ( $P = 0,486$ ; U-Test;  $n = 4$ ). Die geringste Extraktausbeute zeigten Ethanol gefolgt von 2-Propanol, mit einem geringen jedoch nicht-signifikanten Unterschied ( $P = 0,686$ ; U-Test;  $n = 4$ ). Darüber hinaus waren 2-Propanol (*i*-Prop), Aceton und Tetrahydrofuran (THF) als Bestandteil des Extraktionsmittels weniger geeignet, da bei der anschließenden Phasentrennung ( $\text{CHCl}_3$ /Puffer) ein etwa doppelt so großes Volumen der unteren lipophilen Phase entstand, als unter gleichen Bedingungen mit Ethanol (EtOH) oder Methanol (MeOH). Dieser Schritt sollte jedoch der Aufreinigung und Verringerung des Extraktvolumens dienen, indem die Carotinoide aus einem amphiphilen Extrakt in ein vergleichsweise kleineres Volumen einer lipophilen Phase umverteilt werden. Löst sich das hydrophilere Extraktionsmittel übermäßig gut in dem lipophileren Anteil ( $\text{CHCl}_3$ ), resultiert nach der Phasentrennung ein erhöhtes Zielvolumen. Demzufolge kommt es zu zeitaufwendigen Eindampfzeiten unter hohem Stickstoffverbrauch. Wie auch bei *R. glutinis* zeigte MeOH bei *A. luteus* die höchste Extraktionskraft. Dem entgegen wies Aceton bei *A. luteus* eine wesentlich geringere Extraktionskraft als bei *R. glutinis* auf (vgl. Abbildung 6).



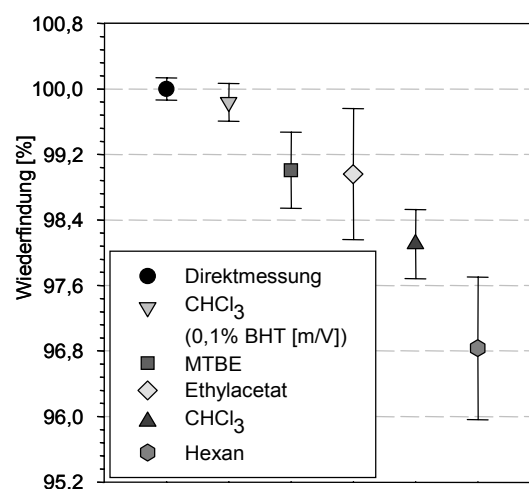
**Abbildung 6-A:** Extraktionskraft verschiedener wassermischbarer Lösungsmittel für *A. luteus*, der erhaltene Extrakt wurde im Anschluss gegen  $\text{CHCl}_3$  mit NaCl-Lösung (10% [m/V]) umverteilt, eingedampft, mit Injektionsmittel ( $\text{CHCl}_3$ /MeOH 1:1 [V/V]) wieder aufgenommen und chromatographiert, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH mit 50mM AAC [min-%]: 0–0, 13– 65, 15-100, 18-100, 23–0, 25– 0; Flow: 1,3 ml/min,  $T_5 = 12^\circ\text{C}$ , RP- $\text{C}_{30}$ -Phase, Bischoff-Chromatography, *Batch 1*, Abkürzungen alphabetisch: EtOH Ethanol, *i*-Prop 2-Propanol, MeOH Methanol, THF Tetrahydrofuran (unstabilisiert).

**Abbildung 6-B:** Extraktionskraft verschiedener Lösungsmittel für *R. glutinis* nach Digestion mit Lyticase, die Bestimmung des Gesamt-Carotenoidgehaltes erfolgte photometrisch als  $\beta$ CAR-Äq, das Diagramm zeigt Median und die 25% bzw. 75% Perzentile aus je  $n = 4$ , alle weiteren Parameter analog Abbildung 6-A.

Ethanol und Methanol wurden auch an *M. luteus* getestet, um zu untersuchen, ob hierbei trotz ähnlicher physikalischer und chemischer Eigenschaften beider Lösungsmittel ebenfalls wie bei *R. glutinis* starke Unterschiede in der Extraktionskraft bestehen. Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied in der Extraktausbeute gefunden ( $P=0,886$ , U-Test;  $n=4$ ). Anhand der Ergebnisse wurde für Bakterien und für Hefen als optimale wasser-mischbare Komponente des Extraktionsmittels MeOH ausgewählt, so dass in der Folge für beide Klassen ein einheitliches Extraktionsprotokoll entwickelt werden konnte.

Im Anschluss daran sollte ein extraktionsstarkes lipophiles, nicht-wassermischbares Lösungsmittel ausgewählt und der Verlust an Carotinoiden während der Phasentrennung untersucht werden. Dazu wurde analog des oben beschriebenen Versuches die Wiederfindungsrate einer *at*-AST/*at*- $\beta$ CAR-Mischprobe unter Verwendung verschiedener lipophiler Extraktionsmittel beim Umverteilungsschritt (Phasentrennung) bestimmt.

**Abbildung 7:** Bestimmung der Wiederfindungsrate des Umverteilungsschrittes (Phasentrennung) bei der Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln, zur Bestimmung wurde eine *at*-AST/*at*- $\beta$ CAR Mischprobe verwendet, die Ermittlung der Wiederfindung erfolgte photometrisch über die Bestimmung des Gesamt-Carotinoidgehaltes ( $\beta$ CAR-Äq) vor und nach dem Versuch, die Punkte des Diagramms zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung aus  $n=5$ , alle Meßwertreihen entsprechen den Kriterien auf Normalverteilung (vgl. 7.2.1.7).



Aus dem ersten photometrischen Versuch zur Gesamt-Wiederfindung wurde vornehmlich der Summenverlust durch oxidative Degradationen und Adsorption beurteilt. Das Ausmaß der Artefaktbildungen auf Grund von *cis-trans*-Isomerisierungen konnte erst nach einer Auftrennung der geometrischen Isomere per HPLC beurteilt werden. Eine Quantifizierung einzelner Isomere im Gemisch ist schwierig, da sich je nach Lage und Anzahl der isomerisierten Doppelbindungen die UV-VIS-Spektren und die molaren Absorptionskoeffizienten stark ähneln (QIN et al. 2008, BRITTON 1995 u. 1993). Nach einer chromatographischen Auftrennung kann die photometrische Quantifizierung einzelner Isomere leichter und wesentlich genauer erfolgen. Die Ergebnisse von AST können stellvertretend für die Gruppe der Xanthophylle und die Ergebnisse von  $\beta$ CAR stellvertretend für die Gruppe der sauerstofffreien Carotine angesehen werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus allen Versuchen (vgl. Abbildungen 7 und 8):

- Hexan liefert die geringste Wiederfindung (96,8%), wobei der Verlust durch Degradation einschließlich der Tendenz zu *cis-trans*-Isomerisierungen sich auf *at*-AST stärker auswirkt als auf *at*- $\beta$ CAR. Hexan zeigt für AST (Xanthophylle) im Vergleich zu  $\beta$ CAR (Carotine) ein schlechteres und ein hervortretend temperaturabhängiges Lösungsvermögen, woraus die geringe Wiederfindung und die zum Teil erhebliche Streuung der Werte resultieren. Das Lösungsmittel ist daher zur

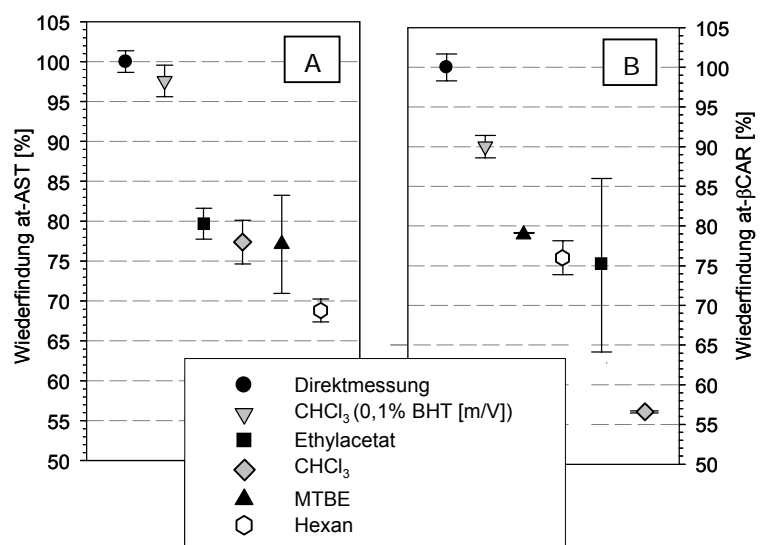
Umverteilung von den in Bakterien und Hefen häufig vorkommenden Xanthophyllen, insbesondere für hydrophil substituierte Xanthophylle, ungeeignet.

- MTBE und Ethylacetat zeigen im Schnitt die zweitbeste Wiederfindung (99,0% und 98,9%). Die Tendenz zur Bildung von *cis*-Isomeren ist in beiden Lösungsmitteln sowohl für AST (Xanthophylle) als auch für  $\beta$ CAR (Carotine) ähnlich. Ethylacetat zeigt dabei eine erhebliche Streuung der Werte, was vermutlich die Folge einer partiellen Zersetzung des Lösungsmittels zu Ethanol und Acetat ist, und darüber hinaus eine mangelhafte Phasentrennung verursacht.
- Die höchste Wiederfindungsrate (99,8%) wurde bei Verwendung von Chloroform, stabilisiert mit 0,1% BHT [m/V]) erreicht. Ohne den Zusatz des Antioxidans zeigte sich eine geringere Wiederfindung (98,1%). Einerseits wird  $\text{CHCl}_3$  wegen seiner guten Extraktionskraft für ein breites Spektrum an Carotinoiden in vielen Arbeiten verwendet. Es besitzt jedoch andererseits auch prooxidativen Charakter und sollte daher mit geeigneten Antioxidantien stabilisiert werden (FRIXEL 2002, CRAFT 1992b, RODRIGUEZ-AMAYA 2001). Dementsprechend zeigte stabilisiertes Chloroform auch eine geringere Tendenz zu *cis-trans*-Isomerisierungen sowohl für *at*-AST (Xanthophylle) als auch für *at*- $\beta$ CAR (Carotine), obgleich bei *at*- $\beta$ CAR die Isomerisierungstendenz etwas stärker ausgeprägt war als bei *at*-AST.

Auf Basis der Ergebnisse wurde in den nachfolgenden Versuchen Chloroform grundsätzlich mit BHT stabilisiert. Dabei sollte bedacht werden, dass die vergleichsweise geringen Verluste und Artefaktbildungen auch darauf zurückzuführen sind, dass  $\text{CHCl}_3$  sich als einziges der untersuchten Lösungsmittel nach der Phasentrennung in der Hypophase anreichert und der Extrakt somit besser vor Sauerstoffzutritt geschützt ist. Es wurden somit MeOH und stabilisiertes  $\text{CHCl}_3$  als die am geeignetesten Lösungsmittel für die Extraktion befunden. Beide zeigen in Kombination eine gute Carotinoidausbeute und Wiederfindung bei gleichzeitig tolerierbaren Verlusten durch Degradationen und Artefaktbildungen wie z.B. durch Isomerisierungen.

**Abbildung 8-A:** Bestimmung der Wiederfindung des Umverteilungsschrittes von *at*-AST unter Verwendung verschiedener, nicht mit Wasser mischbarer Lösungsmittel, die Auftrennung der geometrischen Isomere erfolgte per HPLC an einer RP-C<sub>30</sub>-Phase, die Berechnung der Wiederfindung erfolgte über das *at*-Peakflächenverhältnis (474 nm) aus den Chromatogrammen vor und nach dem Versuch, das Diagramm zeigt jeweils den Mittelwert zweier Peakflächen und die Spannweite, der Mittelwert aus den Chromatogrammen der Standardlösung vor dem Versuch entspricht 100%, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH [min-%]: 0-0, 24-62, 27-80, 35-0, 40-0, Flow: 1,3 ml/min, T<sub>s</sub> = 15 °C.

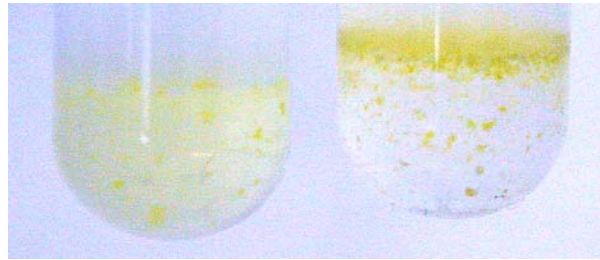
**Abbildung 8-B:** Bestimmung der Wiederfindung des Umverteilungsschrittes von *at*- $\beta$ CAR unter Verwendung verschiedener, mit Wasser nicht mischbarer Lösungsmittel, Detektion von *at*- $\beta$ CAR bei 450 nm, alle weiteren Parameter analog Abbildung 8-A.



### 2.4.5 Auswahl des Phasentrennungsmittels

Zur Trennung der lipophilen und hydrophilen Phase wurde zunächst eine 3molare Ammoniumacetatlösung wegen ihrer Puffereigenschaften und des in wässriger Lösung nahezu neutralen pH-Wertes verwendet.

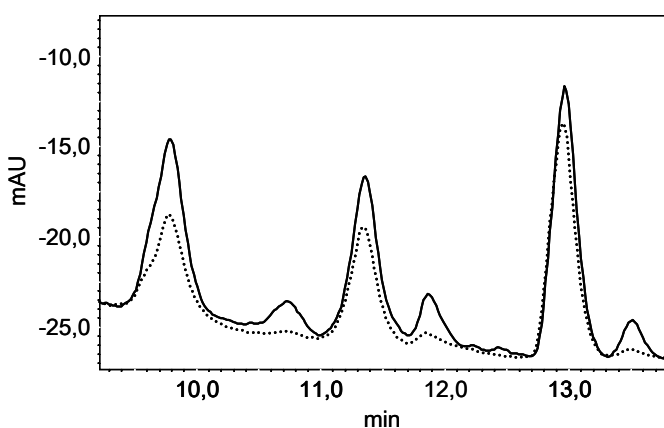
**Abbildung 9:** Phasentrennung eines Extraktes von *Micrococcus luteus*, untere Phase:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , obere Phase rechts: Ammoniumacetat (3molar), obere Phase links:  $\text{NaCl}$  (10 % [m/V])/MeOH, deutliche Ansammlung von unlöslichen, gelben Pigmenten in der Interphase rechts.



Dabei zeigten einige Extrakte von Bakterien eine schlechte Phasentrennung mit Ansammlungen von Farbpigmenten in der Interphase (vgl. Abbildung 9). Da es Hinweise gibt, dass es sich hierbei um schwer lösliche, saure Carotinoide handeln könnte (NELIS et al. 1989a), wurde der Einfluss von Säuren und Basen auf die Phasentrennung untersucht. Kalilauge (0,5% [m/V]) zeigte keinerlei Effekte auf die Phasentrennung. Zitronensäure (1% [m/V]) und Essigsäure (1% [V/V]) führten unter vergleichbaren Bedingungen zu tendenziell weniger Pigmenten in der Interphase. Allerdings bewirkten die Säuren keine bessere Löslichkeit, sondern nur eine Verdrängung der unlöslichen Pigmente aus der Interphase in die Hypophase ( $\text{CHCl}_3$ ). Überdies verschlechterte sich dabei die Phasentrennung insgesamt. Darüber hinaus kann es unter Säureeinfluß von in Methanol gelösten sauren Carotinoiden zur Methylierung und unter Baseneinfluß zur Spaltung von Carotinoid-Estern, d.h. zur unerwünschten Bildung von Artefakten kommen (TAYLOR et al. 1974, BAMJI et al. 1966). Die beste Trennung der Phasen und geringste Tendenz zur Ansammlung von Pigmenten in der Interphase wurde mit  $\text{NaCl}$ -Lösung (10% [m/V]) erzielt. Demzufolge wurde in den folgenden Versuchen ausschließlich  $\text{NaCl}$ -Lösung als Phasentrennungsmittel verwendet.

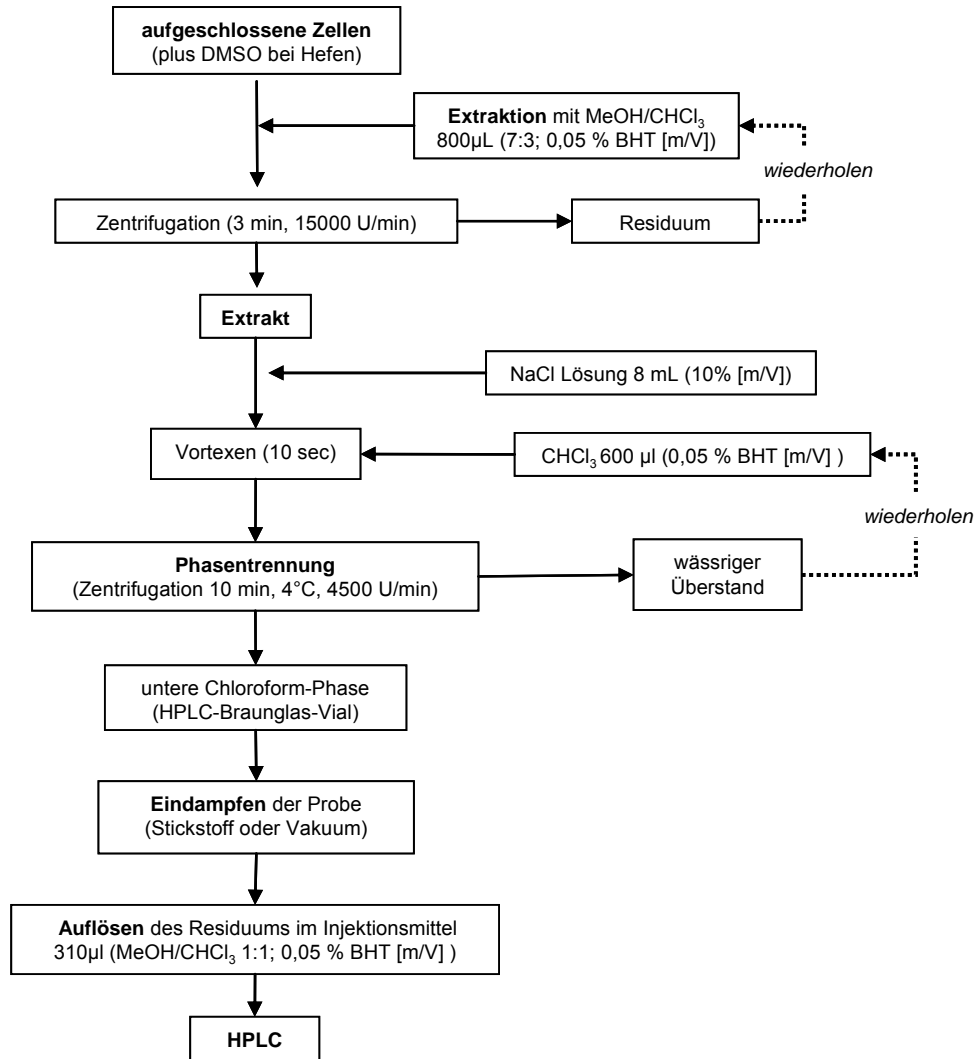
### 2.4.6 Ablauf des optimierten Extraktionsverfahrens

An Hand der Ergebnisse der Vorversuche wurde als Extraktionsmittel eine Mischung aus  $\text{MeOH}$  und  $\text{CHCl}_3$  gewählt (vgl. 2.4.4) und die Mischungsverhältnisse (1:1), (6:4) und (7:3) getestet. Schlussendlich wurde die Mischung mit 30% [V/V]  $\text{CHCl}_3$  ausgewählt, da diese als einzige keine Entmischungen bei der Extraktion der aufgeschlossenen wässrigen Zellmatrix zeigte. Wie in Abbildung 10 erkennbar ist, konnte durch diese Kombination die Extraktausbeute für bestimmte Komponenten zusätzlich deutlich gesteigert werden.



**Abbildung 10:** Vergleich der Extraktionskraft von  $\text{MeOH}$  (gepunktete Linie) mit der 7:3 [V/V] Mischung aus  $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$  (durchgezogene Linie) bei *A. luteus*, die Phasen der erhaltenen Extrakte wurden im Anschluss an die Extraktion mit  $\text{NaCl}$ -Lösung (10% [m/V]) umverteilt, die  $\text{CHCl}_3$ -Hypophase abgezogen eingedampft, mit Injektionsmittel wieder aufgenommen und chromatographiert, verwendeter Gradient von MTBE in  $\text{MeOH}$  50mM AAC [min - %]: 0-0, 13-65, 15-100, 18-100, 23-0, 25-0;  $T_s = 12^\circ\text{C}$ ,  $\text{RP-C}_{30}$ -Phase, Bischoff-Chromatographie, Batch 1.

Den Ablauf des optimierten und schlussendlich etablierten Extraktionsverfahrens zeigt Abbildung 11.



**Abbildung 11:** Ablaufschema für das optimierte Extraktionsverfahren zur Gewinnung von Carotinoiden aus Bakterien (gram-positive, gram-negative, atypische) sowie von Carotinoiden aus Hefen und Pilzen, der mit dem zweiten Antioxidanz alpha-Tocopherol (1% [m/m]) stabilisierte interne Standard wurde jeweils zuvor auf die aufgeschlossenen Zellen gegeben (vgl. 7.2.1.1 u. 7.2.1.5).

#### 2.4.7 Zusammenfassung und Bewertung des Extraktionsverfahrens

Einer der bedeutendsten und anspruchsvollsten Arbeitsschritte in der Analytik von Carotinoiden ist die Extraktion (ZHENXIN et al. 2008, FRASER et al. 2000, TAUNGBODHITHAM et al. 1998). Hierbei sollen alle Carotinoide quantitativ, möglichst schonend und schnell extrahiert werden, da sie insbesondere in organischen Lösungsmitteln zu Degradationen und Artefaktbildung neigen (CRAFT 1992b, FRIXEL 2002, CALVO et al. 2007). Ungünstigerweise sind viele Extraktionsmittel mit einem breiten Löslichkeitsspektrum und hoher Extraktionskraft für Carotinoide zugleich am stärksten degradationsfördernd (RODRIGUEZ-AMAYA et al. 2001 und 2004, CRAFT 1992b). Vor diesem Hintergrund zeigt das entwickelte Extraktionsprotokoll folgende Vorteile:

Es wird ein breites Spektrum an Carotinoiden durch das lösungsstarke Extraktionsgemisch MeOH/CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Dabei wurden Degradationen und Artefaktbildungen durch den Einsatz von BHT und αTOC minimiert. Ersteres stabilisiert vorrangig prooxidatives CHCl<sub>3</sub> und schützt Carotinoide vor Isomerisierungen



(FRIXEL 2002, CRAFT 1992b, RODRIGUEZ-AMAYA 2001 u. 2004, EL-AGAMEY et al. 2004). Letzteres hingegen hemmt insbesondere die Autoxidation von Carotinoiden durch freien Sauerstoff (EL-AGAMEY et al. 2004, HANDELMANN et al. 1991, PALOZZA et al. 1992). Das in der Literatur zur Extraktion von Mikroorganismen oftmals verwendete Aceton wurde auf Grund der ermittelten mangelhaften Extraktionskraft und der Gefahr der Bildung von Acetoniden, insbesondere mit Keto- und Hydroxycarotinoiden, nicht verwendet (BRITTON 2004, LEA 1988, LEE et al. 2004b, DE MIGUEL et al. 2001). Die während der Extraktion erhöhte Tendenz zu Photoisomerisierungen von gelösten Carotinoiden wurde durch die Verwendung von gefärbten Glasmaterialien und dem Arbeiten unter Vermeidung von direktem Lichteinfall minimiert.

Zu bemerken ist, dass Ethanol trotz ähnlicher chemisch-physikalischer Eigenschaften eine durchschnittlich schlechtere Extraktausbeute lieferte als MeOH. MeOH ist allerdings gesundheitlich bedenklicher als EtOH, wodurch die Anwendbarkeit der Methode auf futtermitteltechnologischer und lebensmitteltechnologischer Belange durch die Toxizität der Lösungsmittelrückstände limitiert wird (DE MIGUEL et al. 2001). Weiterhin ist zu bemerken, dass, entgegen den Untersuchungen zur Extraktion pflanzlicher Materialien, THF und Aceton bei Bakterien und Hefen eine deutlich schlechtere Extraktionskraft aufwiesen als MeOH, was die Besonderheit mikrobieller Matrices unterstreicht. Extraktionsprotokolle pflanzlicher Proben sind nicht ohne weiteres auf Bakterien und Hefen übertragbar und müssen für mikrobielle Matrices speziell entwickelt werden.

Das hier vorgestellte Extraktionsverfahren liefert ein zuverlässiges und robustes Protokoll zur Extraktion von Carotinoiden aus verschiedensten Bakterien- und Hefespezies unter Minimierung von Artefaktbildungen und Verlusten.

## **2.5 Auftrennung der Extrakte mittels HPLC**

Carotinoide sind hochgradig ungesättigte, lipophile, gefärbte, redoxaktive Kohlenwasserstoff-Verbindungen (Carotine) bzw. deren sauerstoffhaltige Derivate (Xanthophylle). Im Gegensatz zu den verwandten Retinoiden, Tocopherolen und Ubichinonen sind Carotinoide nicht fluoreszierend (FURR 2004, BRITTON et al. 2004). Wie auch andere Naturstoffgruppen lassen sich Carotinoide zweckmäßigerweise chromatographisch trennen und analysieren. Neben der qualitativ und semiquantitativ verwendbaren Dünnschichtchromatographie wird vorrangig die Säulenchromatographie zur Aufreinigung und Trennung, zur genauen Quantifizierung die Photometrie genutzt. Da es sich bei Carotinoiden grundsätzlich um nicht flüchtige Verbindungen handelt, ist die Auftrennung per Gaschromatographie nur nach arbeitsaufwändiger Derivatisierung möglich (FURR 2004). Aus diesem Grund wird die flüssigchromatographische Trennung (LC) mit photometrischer, elektrochemischer oder massenselektiver Detektion bevorzugt (FRASER et al. 2000, FERRUZZI et al. 2001 u. 1998). Im Folgenden ist die im Rahmen dieser Arbeit speziell für die Trennung mikrobieller Carotinoide entwickelte HPLC-Methode beschrieben.

### **2.5.1 Aktueller Wissensstand zur Trennung von Carotinoiden mittels HPLC**

Zurzeit werden Carotinoide mehrheitlich mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) und photometrischer Detektion - zumeist Dioden-Array (DAD) - an verschiedensten mobilen und stationären Phasen separiert und analysiert (OLIVER et al. 2000, BARUA et al. 1998). Die klassische Normalphasen-

Flüssigkeits-Chromatographie (NP-LC) von Carotinoiden wird vorwiegend an Kieselgel, Aluminiumoxid und Calciumhydroxid oder weniger üblich an Nitrilphasen durchgeführt (BHOSALE et al. 2004, CORAL-HINOSTROZA et al. 2004, HUMPHRIES et al. 2003, SCHMITZ et al. 1995, HASHIMOTO et al. 1988). Einige dieser Materialien zeigen hierbei eine relativ gute Selektivität gegenüber einzelnen Carotinoiden, einschließlich gegenüber geometrischen Isomeren. Dennoch sind solche Phasen nicht in der Lage, das komplette Isoprenoidspektrum bestehend aus Carotinen, Xanthophyllen, Tocopherolen, Retinoiden und Ubichinonen effizient zu trennen (BHOSALE et al. 2004, DACHTLER et al. 2001, EMENISHER et al. 1996, SANDER et al. 1994a/b). Des Weiteren sind Materialien wie Calciumhydroxid schwer zu handhaben, da geringste Änderungen im Wassergehalt der stationären Phase oder der Säulentemperatur zu enormen Problemen in der Chromatographie führen können (SCHMITZ et al. 1994, HASHIMOTO et al. 1988, TSUKIDA et al. 1982). Darüber hinaus kann es vorkommen, dass Xanthophylle, insbesondere solche mit sauren Endgruppen, dauerhaft auf der Phase gebunden werden und nicht eluieren (NOLLET 2004, LEA 1988, SCHMITZ et al. 1995). Demzufolge werden Carotinoide üblicherweise mittels Umkehrphasen-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-LC) getrennt, wobei RP-C<sub>18</sub>-Materialien lange Zeit bevorzugt verwendet wurden (CORTES et al. 2004, EPLER et al. 1992, CRAFT et al. 1992a). RP-C<sub>18</sub>-Phasen sind im Allgemeinen leicht zu handhaben und robust. Andererseits besitzen sie ein begrenztes Auflösungsvermögen gegenüber geometrischen Isomeren und Konstitutionsisomeren, wobei die Selektivität mit der Art des Phasenbindungstypes (monomer, polymer) variiert (EMENISHER et al. 1995, SANDER et al. 2000, 1994a/b u. 1987, PFANDER et al. 1994, EPLER et al. 1993, KHACHIK et al. 1989). Um sowohl strukturell ähnliche Carotinoide als auch ihre geometrischen Isomere und Konstitutionsisomere trennen zu können, wurde eine RP-C<sub>30</sub> stationäre Phase entwickelt (SANDER et al. 1994b u. 1987). Inzwischen konnten RP-C<sub>30</sub>-Materialien ein erstaunliches Trennungspotential - nicht nur für Carotinoide sondern auch für Tocopherole, Tocotrienole, Ubichinone und Retinoide demonstrieren (SANDER et al. 2000, LESSIN et al. 1997, COOK et al. 1999, BARUA et al. 1998). Mit Hilfe dieser stationären Phase konnten komplexe Isoprenoidgemische aus verschiedensten biologischen Materialien effizient separiert und analysiert werden (KAISER et al. 2007, RAJENDRAN et al. 2005, FRASER et al. 2000).

### 2.5.2 Auswahl der Trennsäule und des Fließmittels

Das Spektrum mikrobieller Carotinoide umfasst neben den stark lipophilen C<sub>50</sub>-Carotinen vor allem auch polare und zum Teil polar-substituierte Xanthophylle in großer struktureller Vielfalt (LIAAEN-JENSEN et al. 1972). Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer HPLC-Methode zur Auftrennung möglichst der gesamten Bandbreite mikrobieller Carotinoide.

Die Vorversuche mit einer vollständig-*endcapped*, monomeren RP-C<sub>18</sub>-Säule (Chrompack®) zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur, dass sich insbesondere die frühzeitig eluierenden Xanthophylle Lutein (LUT), Zeaxanthin (ZEA) und Astaxanthin (AST) sowie die Konstitutionsisomere  $\alpha$ CAR und  $\beta$ CAR trotz der Anwendung verschiedener Fließmittel und Gradienten nicht oder nur unzureichend trennen lassen (CRAFT et al. 1992a, NAKAGAWA et al. 2008). Daraufhin wurde eine RP-C<sub>30</sub>-Säule getestet, die sowohl in der Trennung der Xanthophylle und Konstitutionsisomere (LUT/ZEA) als auch in der Trennung von *cis-trans*-Isomeren sehr gute Ergebnisse lieferte. Da es Hinweise gibt, dass die Interaktion der freien Silanolgruppen der stationären Phase mit den funktionellen Sauerstoffgruppen der Xanthophylle zur Effizienz der Trennung erheblich beitragen können, wurde ein nicht-*endcapped* Material verwendet (SANDER et al. 1994a/b). Um die

Anfälligkeit der Säule hinsichtlich von Verstopfungen und Druckschwankungen zu verringern, wurde eine Säule mit 5 µm Partikeln anstelle von 3 µm Partikeln gewählt. Zur Erhaltung der Leistungsfähigkeit wird bei Säulen mit 5 µm Partikeln üblicherweise eine Länge von 25 cm anstelle von 15 cm verwendet. Bei der HPLC-Trennung von Carotinoiden werden Edelstahl-Metallfritten am Säuleneingang und Säulenausgang für Degradationen und Verluste verantwortlich gemacht (SCOTT 1992, EMENHISER et al. 1996). Aus diesem Grund wurde ein Säulenhersteller ausgewählt (Bischoff), der anstelle von Metallfritten Metall-Siebe mit wesentlich geringerer spezifischer Oberfläche einsetzt. Hierdurch sollen die Absorption schädlicher Metallionen reduziert und Verluste minimiert werden (LAMOTTE 2005). Analog dazu können auch Kunststofffritten verwendet werden, die allerdings wesentlich preisintensiver sind (BÖHM 2005, KONINGS et al. 1997).

Die Fließmittel wurden anhand einer Literaturrecherche nach ihrer Eignung für einen Niederdruckgradienten, der Kompatibilität mit der RP-C<sub>30</sub>-Phase, dem Differenzierungsvermögen für Carotinoide an RP-Phasen und einer möglichst niedrigen Viskosität ausgewählt. Diese Kriterien schränkten die Auswahl für die Fließmittel-Basis auf Acetonitril (MeCN) und MeOH ein (CORTES et al. 2004). MeOH besitzt gegenüber MeCN eine geringere Toxizität und ist weniger preisintensiv. Als lipophile Modifier zur Verkürzung der Retentionszeiten und zur Optimierung der Selektivität werden in der RP-Chromatographie von Carotinoiden üblicherweise CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, THF, MTBE oder Ethylacetat verwendet (BELL et al. 1997). Dabei ist der Verlust von Carotinoiden während der Säulenpassage auch von der Art des verwendeten Fließmittels abhängig (EMENHISER et al. 1996). Prinzipiell zeigen MeOH-basierte mobile Phasen eine höhere Wiederfindung als MeCN basierte Fließmittel (EPLER et al. 1993 und 1992, SCOTT 1992). Für die Modifier CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und CHCl<sub>3</sub> gibt es Hinweise, dass herstellungsbedingt Spuren von Salzsäure (HCl) im Lösungsmittel vorkommen können, die für eine Degradation von Carotinoiden während des Trennprozesses verantwortlich gemacht werden (BRITTON et al. 1993 u. 1995). Ähnliches gilt für Ethylacetat und THF. Ethylacetat kann durch Esterspaltung Essigsäure freisetzen und THF kann prooxidative Peroxide bilden, wodurch eine Artefaktbildung von Carotinoiden begünstigt wird. Bei einer Verwendung als Fließmittel, wird THF daher häufig mit BHT stabilisiert, welches jedoch bei der RP-Chromatographie von der stationären Phase ebenfalls adsorbiert wird und somit die Trennung beeinflussen kann. Aus den genannten Gründen wurde MeOH als hydrophile Fließmittel-Basis und MTBE als modifizierende lipophile Komponente ausgewählt.

### 2.5.3 Nachteile von RP-C<sub>30</sub>-Säulen

Die Anwendung von nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Phasen zur Trennung von Carotinoiden bringt neben den oben aufgeführten Vorteilen auch Nachteile mit sich. Prinzipiell lassen sich die auftretenden Probleme in zwei Gruppen einordnen:

Zur ersten Gruppe gehören die Peakverzerrungen, wobei insbesondere ein *Peak-Tailing* vorkommt (EMENHISER et al. 1996). Dies führt schließlich zu schlecht reproduzierbaren Retentionszeiten sowie zu Beeinträchtigungen der Selektivität und des Auflösungsvermögens (BREITHAUPT 2004, COOK et al. 1999). Die zweite Gruppe beinhaltet die zum Teil nicht unerheblichen Verluste einiger Analyte während der Säulenpassage und die dadurch resultierende Minderung der Peakflächen-Response. Dabei kann das Ausmaß des Verlustes von Carotinoiden auf RP-C<sub>30</sub>-Phasen den Verlust von Carotinoiden auf RP-C<sub>18</sub>-Trennmaterialien unter Umständen übersteigen (EMENHISER et al. 1996). Das wiederum kann eine

beträchtliche Minderung der Empfindlichkeit und erhebliche Probleme bei der Quantifizierung, insbesondere bei kleinen Carotinoidmengen, verursachen. Störungen beider Arten sind unerwünscht, da sie die Leistungsfähigkeit der Säule mindern und die Effizienz einer Trennung beträchtlich verschlechtern.

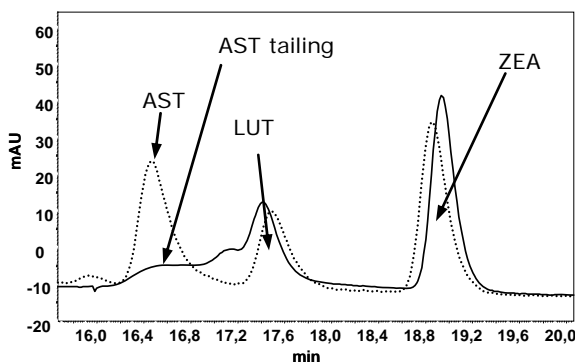
#### 2.5.4 Optimierung der HPLC

In der Literatur ist bisher noch keine HPLC-Methode zur Trennung von mikrobiellen Carotinoiden an einer nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Phase beschrieben, die ein binäres Gemisch, bestehend aus MeOH und MTBE als mobile Phase, verwendet. Gegenstand der Arbeit war es deshalb auch, eine geeignete HPLC-Methode zu erstellen und zu testen. Dabei wurden folgende Parameter untersucht und optimiert:

- der Einsatz von Fließmittel-Additiven,
- der Gradient von MTBE in MeOH,
- die Fließmittelgeschwindigkeit (Flow),
- die Säulentemperatur.

##### 2.5.4.1 Untersuchungen von Fließmittel-Additiven

Ausgangspunkt der Untersuchungen von Fließmittel-Additiven war die Beobachtung, dass sich AST und LUT bei Gradienten-Elution mit MTBE in MeOH an der verwendeten RP-C<sub>30</sub>-Phase auf Grund eines außergewöhnlich starken *Peak-Tailings* von AST nicht zufriedenstellend trennen ließen (vgl. Abbildung 12). Auch eine Variation des Gradienten von MTBE in MeOH oder der Säulentemperatur erbrachte keine Verbesserung der Auflösung. Erst mit Hilfe des Fließmittel-Zusatzes Ammoniumacetat (AAc) konnte eine



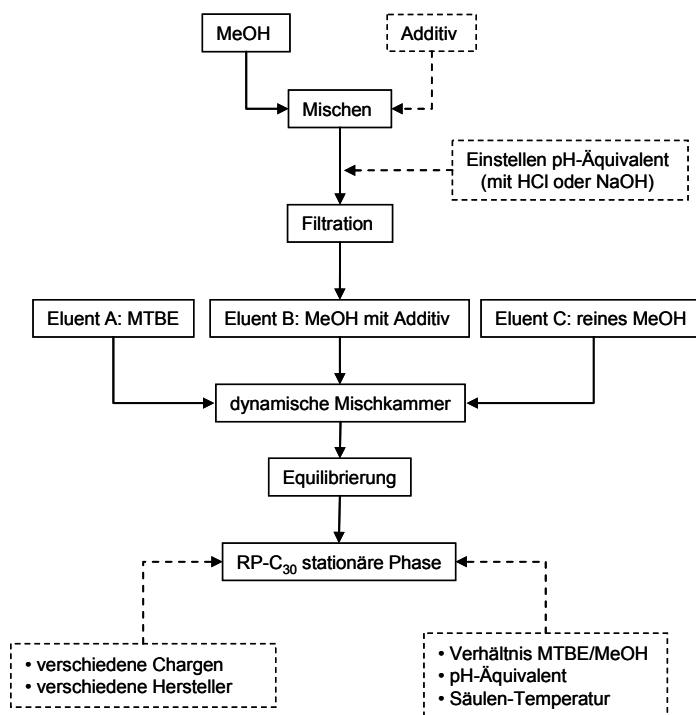
**Abbildung 12:** Chromatographische Trennung eines Gemisches bestehend aus LUT, ZEA und AST unter Verwendung von 0,1 M AAc als Fließmittel-Zusatz (durchgezogene Linie) und ohne AAc als Fließmittel-Zusatz (gepunktete Linie), ohne AAc als Fließmittel-Additiv *tailt* der AST-Peak bis in den LUT-Peak hinein, wodurch eine Trennung unmöglich wird, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH [min - %]: 0-0, 40-50; Flow 1,2 ml/min, T<sub>s</sub> = 15°C, RP-C<sub>30</sub>-Phase, Bischoff-Chromatography, *Batch 1*.

gute Basislinien-Trennung erreicht werden. Als Grundlage für die Anwendung von Fließmittel-Additiven wurden die Angaben von CORTES et al. (2004) zur Verbesserung der Trennung pflanzlicher Carotinoide an einer RP-C<sub>18</sub>-Phase unter Verwendung von Ammoniumacetat als Fließmittel-Zusatz herangezogen. Weil AST und zahlreiche strukturell ähnliche Carotinoide auch in Mikroorganismen vorkommen können und biochemisch sowie zum Teil ernährungsphysiologisch bedeutsam sind, sollte die Trennleistung der HPLC-Methode an dieser Stelle weiter optimiert werden. Da die Literatur für AST keine und für andere Carotinoide nur sehr spärliche Informationen bezüglich der Anwendung von Fließmittel-Additiven an RP-C<sub>30</sub>-Phasen aufweist, wurden zur Optimierung der Methode eigene Untersuchungen durchgeführt.

Der Zweck der Untersuchungen bestand darin, neben Ammoniumacetat den Nutzen weiterer Fließmittel-Additive auf das Elutionsverhalten und die Trennung von Carotinoiden an der verwendeten RP-C<sub>30</sub>-Phase zu beurteilen und dadurch die Effizienz der HPLC-Methode zu verbessern. Bei der Auswahl der Substanzen sollten bedeutsame Eigenschaften wie die Komplexbildung mit Metallionen, der pH-Wert des Elutionsmittels und antioxidative Effekte berücksichtigt werden. Anhand der Untersuchungen sollte ein spezieller Fließmittel-Zusatz ausgewählt und dessen Einsatz optimiert werden. Ziel war die Ermittlung quantitativ vergleichbarer Daten bezüglich eines Einflusses auf die Kapazität, die Peaksymmetrie und die Peakfläche. Die ermittelten Effekte sollten auch in Abhängigkeit von bestimmten Systemparametern wie der Säulentemperatur und der Verweilzeit der Analyten auf der Säule untersucht werden. Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Versuche sollte die Trennleistung der HPLC-Methode für mikrobielle Carotinoide erweitert und optimiert werden.

#### 2.5.4.1.1 Entwicklung der Testmethode

Zuerst wurde eine geeignete Testmethode basierend auf einer Fließmittel-sparenden, isokratischen Elutionsmethode entwickelt, die qualitative und quantitative Aussagen bezüglich der Peaksymmetrie und Peakfläche sowie Aussagen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erlaubte. Einen Überblick über den Aufbau der hierzu entwickelten Methode und der Versuchs-Parameter gibt die Abbildung 13. Gleichzeitig



**Abbildung 13:** Aufbau und Ablauf des Verfahrens zum Test der Fließmittel-Zusätze, die gestrichelten Kästchen und Linien kennzeichnen die wichtigsten Testparameter, es wurde grundsätzlich isokratisch bei 1 ml/min, d.h. mit konstant zusammengesetzten MTBE/MeOH-Mischungen und bei konstanten Säulentemperaturen (*isotherm*) gearbeitet.

wurde anhand einiger Vorversuche der Einfluss von AAC auf das Elutionsverhalten von weiteren Carotinoiden wie  $\beta$ CAR und Canthaxanthin (CAN) überblicksmäßig getestet. Anhand dieser Resultate ließ sich erkennen, dass die Effekte eines Fließmittel-Zusatzes auf das Elutionsverhalten (Peaksymmetrie und Peakfläche) bei AST wesentlich stärker ausgeprägt waren, als bei allen anderen getesteten Carotinoiden.

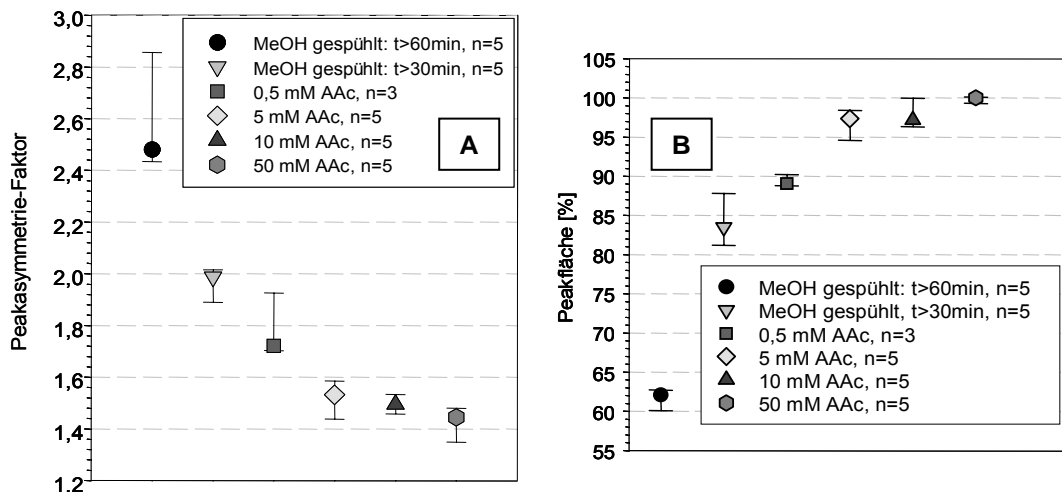
Um den Umfang der folgenden Untersuchungen zu begrenzen, wurde AST als primäre Testsubstanz ausgewählt. Im Rahmen der Entwicklung der Methode wurde berücksichtigt, dass nach LIETZ et al. (1997) bei Carotinoid-Lösungen in einem nicht temperierbaren Autosampler auf Grund von Degradationen und Isomerisierungen Verfälschungen der Analyseergebnisse auftreten können. Da auch der in dieser Arbeit verwendete Autosampler keine Kühlung aufwies und die Dauer bestimmter Tests mehrere Tage betrug, wurden die Versuche auf mehrere separate Test-Ansätze aufgeteilt. Hierbei wurde die Dauer der einzelnen Versuchsansätze auf maximal zehn Stunden begrenzt, wobei bei jedem Versuch der reine Eluent und der mit AAc modifizierte Eluent immer als „Vergleich“ mitgeführt wurde. Die verwendeten Carotinoid-Standardlösungen und die modifizierten Fließmittel wurden jeweils erst kurz vor Testbeginn frisch hergestellt. Durch diese Vorgehensweise wurden Artefaktbildungen der Carotinoid-Standardlösungen während der Versuche minimiert und so eine bessere Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Streuungen von Peaksymmetrie und Peakfläche) erzielt.

Die im Folgenden beschriebenen Versuche dienten zunächst der Auswahl eines geeigneten Fließmittel-Additivs sowie der Optimierung der Anwendung der ausgewählten Substanz.

#### 2.5.4.1.2 Tests verschiedener Fließmittel-Zusätze

Folgende Fließmittel-Additive wurden für die oben beschriebene Testmethode ausgewählt:

- Säuren: Ammoniumchlorid (ACI) und Essigsäure (AA),
- Basen: Natriumacetat (NaAc) und Triethanolamin (TEA),
- Puffer-Substanzen: Ammoniumacetat (AAc) und Triethanolaminacetat (TEAAc),
- Komplexbildner: EDTA, Citronensäure (CA),
- hydrophile und lipophile Antioxidantien: Ascorbinsäure (ASC) und Butyl-hydroxy-Toluol (BHT).



**Abbildung 14-A:** Einfluss der verwendeten Konzentration an AAc auf die Peaksymmetrie von AST, die Darstellung zeigt den Peakasymmetrie-Faktor bestimmt bei 10% der Peakhöhe und jeweils die Mediane und Spannweiten der Peakasymmetrie-Faktoren bei unterschiedlichen AAc-Konzentrationen, zwischen den Konzentrationen 10 mM AAc und 50 mM AAc konnte in der erzielten Peaksymmetrie kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $P = 0,056$ ; U-Test;  $n = 5$ ).

**Abbildung 14-B:** Einfluss der verwendeten Konzentration an AAc auf die Peakfläche von AST, das Diagramm zeigt die Mediane und Spannweiten der relativen Peakfläche bei unterschiedlichen AAc-Konzentrationen, der Median der bei einem Zusatz von 50 mM AAc erzielten Peakfläche von AST (größte erzielte Peakfläche) wurde gleich 100% gesetzt, zwischen den Konzentrationen 10 mM AAc und 50 mM AAc konnte in der erzielten Peakfläche kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $P = 0,056$ ; U-Test;  $n = 5$ ).

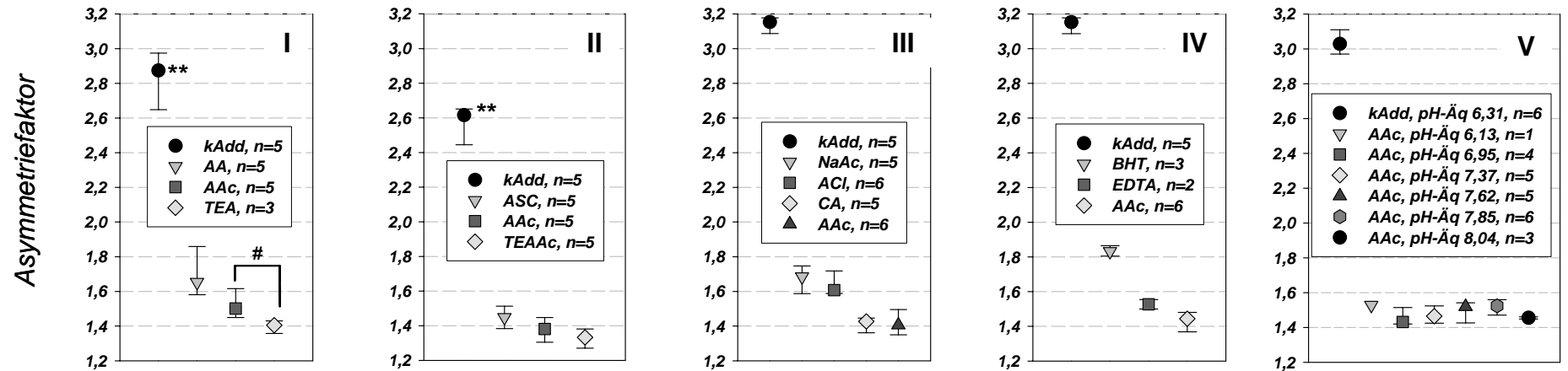
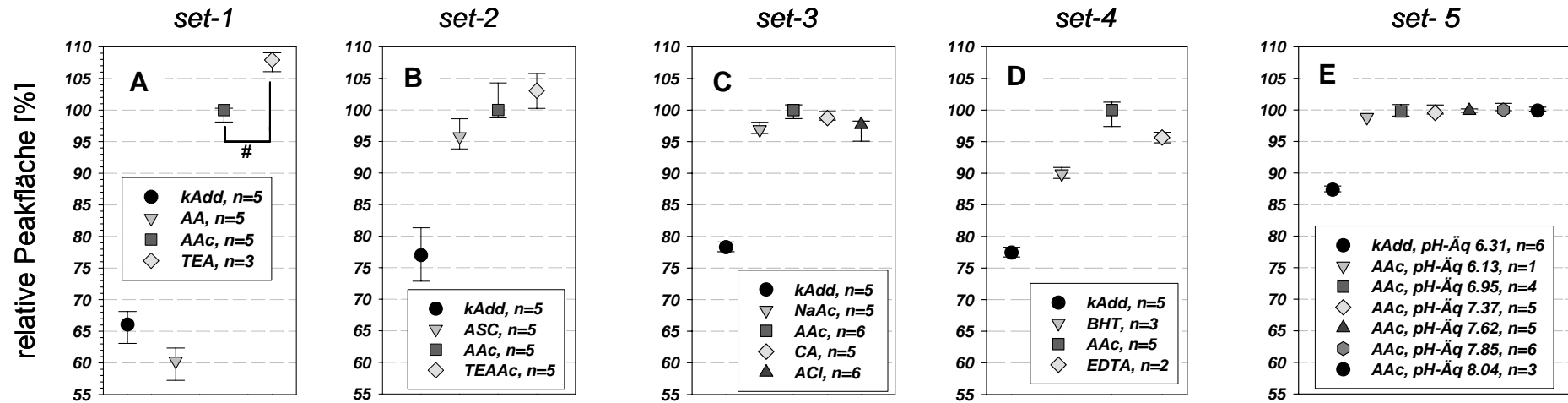
Die Auswahl zeigt, dass bestimmte Additive mehrere chemische Eigenschaften zugleich erfüllen. ASC beispielsweise besitzt die drei Eigenschaften Säure, Komplexbildner und Antioxidans zugleich. CA hingegen ist lediglich Säure und Komplexbildner und AA weist überwiegend nur noch saure Eigenschaften auf. Diese Auswahl sollte zur Differenzierung der erzielten Effekte in Gegenüberstellung zu bestimmten Eigenschaften der ausgewählten Substanzen sowie der Aufklärung der Wirkungsweise von Additiven dienen.

**Tabelle 2:** Ermittelte pH-Äquivalente (pH-Äq) der getesteten Fließmittel-Additive im MeOH-Eluenten, \*das pH-Äq entspricht rechnerisch dem pH-Wert jedoch gemessen im nicht-wässrigen Milieu, \*\*kein pH-Äq (pH-Wert) messbar, Methodik der Herstellung und Messung der pH-Äquivalente der Fließmittel vgl. Abbildung 13 sowie 2.5.4.1.3 und 7.2.3.1.1 .

Fließmittel-Additiv	eingesetzte Konzentration im MeOH-Eluent [mM]	pH-Äq*
Essigsäure (AA)	50	3,90
L-Ascorbinsäure (L-ASC)	50	5,05
kein Additiv	-	6,37
Ammoniumchlorid (ACl)	50	6,38
Citronensäure (CA)	20	7,32
Triethanolamin-Acetat (TEAAc)	50	7,32
EDTA	gesättigte Lösung in MeOH	7,63
Ammoniumacetat (AAc)	50	7,72
Natriumacetat (NaAc)	50	7,80
Triethanolamin (TEA)	50	9,30
tert-Buthyl-hydroxy-toluol (BHT)	50	**

Um die Effekte der ausgewählten Additive miteinander vergleichen zu können, erfolgte ihr Einsatz in gleicher Konzentration. Zur Ermittlung einer gemeinsamen Konzentration wurde das Elutionsverhalten von AST bei aufsteigenden Stoffmengenkonzentrationen des Additivs AAc untersucht. Unter Verwendung der oben beschriebenen Methode zeigte sich in der Peakfläche und der Peaksymmetrie von AST ab einer Konzentration von 10 mM AAc keine weitere Änderung (vgl. Abbildung 14). Um maximale Effekte zu garantieren und gleichzeitig die Vergleichbarkeit der Additive untereinander zu gewährleisten, wurden alle nachfolgenden Tests einheitlich mit einer 5fach höheren Konzentration (50 mM) durchgeführt (vgl. Tabelle 2). Abweichend dazu wurde CA als dreiwertige Säure auf eine 20 mM Konzentration begrenzt und EDTA auf Grund seiner schlechten Löslichkeit als gesättigte Lösung in MeOH verwendet. Die Ergebnisse der Tests verschiedener Fließmittel-Additive sind zusammenfassend in Abbildung 15 dargestellt. Prinzipiell waren alle Effekte der Additive nach einem Spülen mit MeOH/H<sub>2</sub>O (95:5; [v/v]) reversibel, wobei jedoch beachtet werden muss, dass nach der Anwendung eines Additivs die anfänglichen Eigenschaften der unbenutzten stationären Phase möglicherweise nicht wieder vollständig wiederherstellbar sind (HART et al. 1995). Außerdem waren die Basislinien nach der Elution der Peaks mit und ohne Additiv identisch. Somit konnte eine Abweichung der Peakfläche auf Grund einer fehlerhaften Integration der Fläche im „auslaufenden“ Peakende ausgeschlossen werden. Die Auswertung der DAD-Spektren ergab keine detektierbaren Artefakte oberhalb von 230 nm und das Maximum von AST im UV-VIS-Spektrum blieb konstant ( $\pm 2$  nm), unabhängig von der Art des verwendeten Additivs.

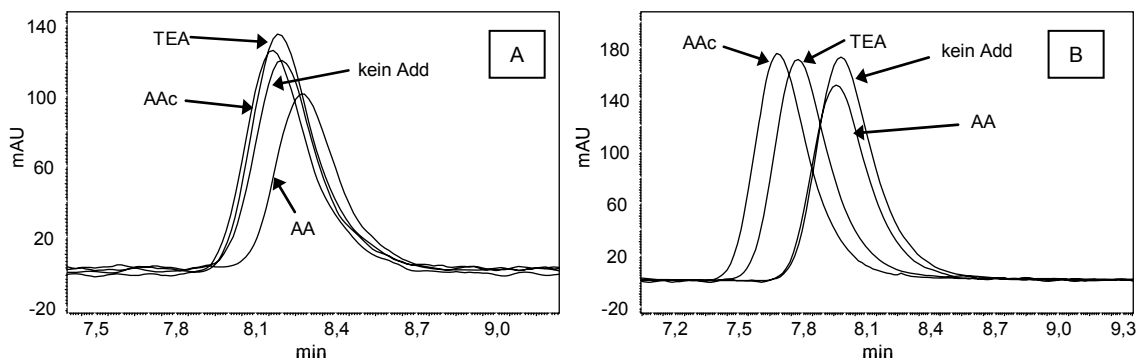
Bei der Elution von AST erzeugten die Fließmittel-Additive TEA gefolgt von AAc, TEAAc und CA die höchste Peaksymmetrie und Peakfläche (vgl. Abbildung 15). AA als Additiv hingegen führte zu einer Reduktion der Peakfläche. Gleichzeitig kam es unter der Verwendung von AA analog allen anderen Additiven zu einer Erhöhung der Peaksymmetrie im Vergleich zum Eluenten ohne Additiv (vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Effekte verschiedener Fließmittel-Additive und des pH-Äquivalentes (pH-Äq) auf die Peakflächen-Response und die Peaksymmetrie (Peaksymmetrie-Faktor berechnet bei 10% Peakhöhe) von *at*-AST in fünf separaten Versuchsansätzen (Set-1 bis Set-5), alle Additive wurden in einer Konzentration von 50 mM verwendet, außer Citronensäure (CA) in 20 mM und EDTA als gesättigte Lösung in MeOH, chromatographische Bedingungen: isokratische Elution mit MeOH/MTBE (70/30, [V/V]) an einer RP-C<sub>30</sub>-Phase, Bischoff-Chromatography, T<sub>s</sub> = 12 °C, die Diagramme zeigen die Mediane mit den zugehörigen Spannweiten der gemessenen Werte für jedes Additiv, die Berechnung der relativen Mediane der Peakflächen erfolgte indem der Median des mit AAC-modifizierten Eluenten auf 100 % als Bezug gesetzt wurde, \*\* die Peaksymmetrie wurde durch einen nach dem *at*-AST-Peak im Anschluss eluierenden *c*-AST Peak (Artefakt) verfälscht, was zu einem Peak-Split durch die Software führte, die statistische Signifikanz für # wurde festgelegt bei P≤0,05 (F-Test u. t-Test), die statistisch auf Unterschiede im arithmetischen Mittelwert getesteten Werte entsprachen alle den Kriterien auf Normalverteilung, auf Normalverteilung wurde zuvor über einen Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft, Abkürzungen alphabetisch: AA Essigsäure, AAC Ammoniumacetat, ASC Ascorbinsäure, ACI Ammoniumchlorid, BHT *tert*-Butyl-hydroxy-toluol, CA Citronensäure, kAdd kein Additiv zugesetzt, NaAc Natriumacetat, pH-Äq pH Äquivalent (analog pH Wert im nichtwässrigen Milieu vgl. 2.5.1.3), TEAAc Trietanolamin-Acetat, TEA Triethanolamin.



Um zu ermitteln, ob bzw. welche der funktionellen Sauerstoffgruppen von AST in Zusammenhang mit einem Additiv die Peaksymmetrie und die Peakfläche beeinflussen, wurden ausgewählte Additive zusätzlich an CAN und  $\beta$ CAR getestet. Im Ergebnis war ein Peakflächen-Verlust bei Verwendung von AA auch bei CAN und  $\beta$ CAR zu beobachten, was einen analogen Mechanismus vermuten lässt (vgl. Abbildung 16). Gleichzeitig zeigte die deutlich schwächere Ausprägung der Effekte von AAc und TEA auf die Peaksymmetrien und die Peakflächen von CAN und  $\beta$ CAR, dass sowohl die Ketogruppen als auch die Hydroxylgruppen für die bei AST vergleichsweise stärker ausgeprägten Effekte von Bedeutung sind. Für die Bewertung, ob Ammonium oder Acetat oder beide Ionen zum Wirkmechanismus von AAc beitragen, wurden ACI und NaAc getestet (vgl. Abbildung 15, Set-III). Die hierbei beobachteten schwächeren Effekte auf die Peakfläche und Peaksymmetrie von AST (ACI und NaAc vs. AAc) deuten darauf hin, dass hinsichtlich der Wirkweise von AAc beide, Anion (Acetat) und Kation (Ammonium), wirksam sind.



**Abbildung 16-A:** Chromatogramme von *at*- $\beta$ CAR (3,71  $\mu$ g/g in EtOH) bei isokratischer Elution an einer RP-C<sub>30</sub>-Phase (Bischoff Chromatography, *Batch 1*) mit MeOH/MTBE (50:50 [V/V]) und unter dem Zusatz der Additive (alphabetisch): AA Essigsäure, AAc Ammoniumacetat, Add Additiv, TEA Triethanolamin, Flow: 1 ml/min, T<sub>s</sub> = 12 °C.

**Abbildung 16-B:** Chromatogramme von CAN (6,2  $\mu$ g/ml in EtOH) bei isokratischer Elution unter denselben Bedingungen wie *at*- $\beta$ CAR (vgl. Abbildung 17-A) allerdings mit MeOH/MTBE (70:30 [V/V]).

Der Komplexbildner EDTA zeigte gegenüber TEA, TEAAc, CA und AAc eine deutlich schwächere Anhebung der Peaksymmetrie und Peakfläche. Auch das lipophile Antioxidans BHT und das hydrophile Antioxidans ASC erbrachten bezüglich der Peakfläche und der Peaksymmetrie nicht dieselben Effekte wie die oben genannten Additive.

Somit wurde AAc als am besten geeigneter Fließmittel-Zusatz befunden und für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Die Entscheidungsgründe hierfür waren:

1. Die Additive AAc, TEAAc und CA bewirken nach TEA die zweit höchste Peakfläche und Peaksymmetrie. TEA erzeugt jedoch gegenüber AAc einen deutlich höheres pH-Äquivalent (pH-Äq, vgl. 2.5.4.1.3) und CA einen deutlich saureres pH-Äq der mobilen Phase (vgl. Tabelle 2). Dabei kann es insbesondere im Basischen zu irreversiblen Schäden an der Kieselgel-basierten stationären Phase und daraus folgend zu einem Verlust an Trenneffizienz und an Auflösungsvermögen kommen (BREITHAUPT 2004, AZEVEDO-MELEIRO et al. 2004). Das nahezu pH-neutrale AAc hingegen verträgt sich als Fließmittel-Zusatz besser mit der stationären Phase (vgl. Tabelle 2).

2. Für die Kopplung der HPLC mit einer massenselektiven Detektion (LC-MS) sind Additive mit einem messbaren Dampfdruck von Vorteil. AAC ist für die Anwendung der massenspektrometrischen Detektion von Carotinoiden hinreichend flüchtig genug, so dass die Methode problemlos auf LC-MS Systeme übertragbar ist. Darüber hinaus ermöglicht AAC als Neutralsalz eine massenselektive Detektion im positiven und im negativen Ionisierungs-Modus (EMMERT et al. 2006, PRASAIN et al. 2005, CARERI et al. 1999).
3. AAC ist kommerziell in hochreiner LC-MS-Qualität und vergleichsweise preisgünstig erhältlich. Es muss weder aufwendig vorgereinigt werden, noch muss der pH der mobilen Phase vor der Anwendung eingestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei der Verwendung des pH-verträglichen AAC als Additiv die Peakfläche und Peaksymmetrie gegenüber TEA geringfügig erniedrigt ist, was die Trenneffizienz und Sensitivität der Methode jedoch nur wenig beeinflusst. Die Robustheit der Methode hinsichtlich pH-bedingter Degradationen der stationären Phase und dadurch bedingter Drifts chromatographischer Größen wird hingegen deutlich verbessert.

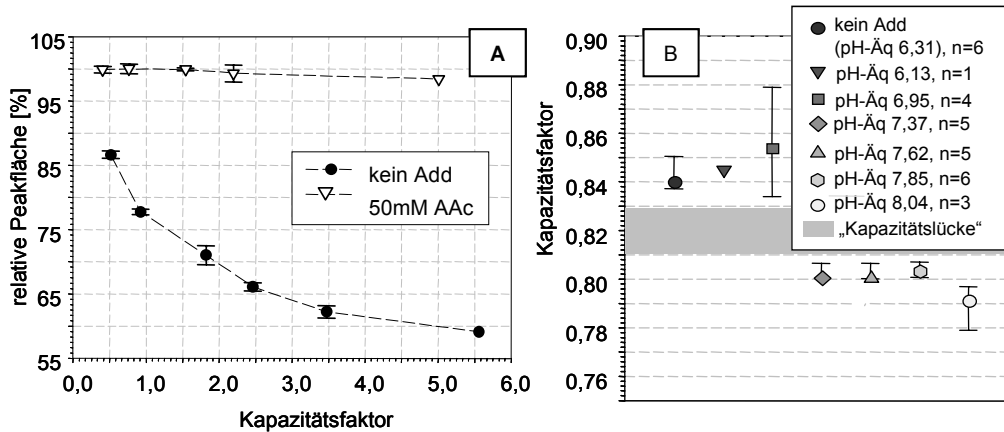
#### *2.5.4.1.3 Einfluss der Elutionsstärke und des pH der mobilen Phase auf die Peakfläche und die Peaksymmetrie*

Für die Trennung einer Vielzahl unbekannter Carotinoide in möglichst kurzer Zeit ist eine isokratische Elution oftmals nicht ausreichend, weshalb häufig Fließmittelgradienten angewendet werden. Dabei ist es von Vorteil, wenn die Peakflächen-Response des Analyten unabhängig von dem Anteil der einzelnen Fließmittelkomponenten in dem verwendeten Fließmittelgemisch ist. Unter dieser Voraussetzung können die Quantitäten ein und derselben Substanz ungeachtet der Verwendung verschiedener Gradienten (d.h. Elution bei unterschiedlichen Retentionszeiten) direkt miteinander verglichen werden. Die Vorgehensweise ist vor allem dann von praktischer Bedeutung, wenn zur Trennung von Gemischen mit bekannten und unbekanntem Komponenten, wie beispielsweise Carotinoid-Extrakten aus Mikroorganismen, eine Variation des Gradienten zur Optimierung der Auftrennung erforderlich ist.

Um abzusichern, dass durch den Zusatz des Additivs AAC die erzielte Peakfläche auch bei Verwendung verschiedener Gradienten, d.h. auch bei der Elution mit unterschiedlichen MeOH/MTBE Verhältnissen konstant bleibt, wurden entsprechende Versuche durchgeführt. Außerdem wurde die Robustheit der Methode hinsichtlich der Variation des pH der mobilen Phase geprüft. Da es sich bei dem verwendeten Fließmittel prinzipiell um ein nicht-wässriges System handelt, wird anstelle des pH-Wertes der Begriff pH-Äquivalent (pH-Äq) verwendet (vgl. 7.2.3.1.1).

Zuerst wurde die Peakfläche und die Peaksymmetrie von AST bei Elution mit unterschiedlichen Anteilen an MTBE in MeOH mit und ohne dem Zusatz von AAC im Fließmittel verglichen. Im Ergebnis blieb unter Verwendung von AAC die Peakfläche von AST konstant, unabhängig von dem Verhältnis von MTBE zu MeOH, d.h. auch unabhängig von der Retention von AST auf der Säule. Ohne AAC hingegen sank die Peakfläche mit steigendem Anteil an MeOH bzw. mit steigender Retention von AST auf der Säule exponentiell ab (vgl. Abbildung 17-A).

Unter Punkt 2.5.4.1.2 konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in der Peakflächen-Response und in der Peaksymmetrie zwischen dem basischen Additiv TEA und dem Neutralsalz AAC bei einer Neutralisation von TEA mit Essigsäure (Bildung von TEAAc) verschwinden (vgl. Abbildung 15). Auf Basis dieses Ergebnisses wurde weiterführend untersucht, inwieweit das pH-Äq der mobilen Phase und/oder das Acetat-Ion für die Angleichung der Peakflächen-Response und Peaksymmetrie ausschlaggebend sind. Dazu wurde das pH-Äq des Fließmittels unter Verwendung von AAC als Additiv mit Hilfe konzentrierter Salzsäure bzw. Natronlauge zwischen einem pH-Äq von 6 und 8 variiert (vgl. 7.2.3.1.1). Die Verschiebung des pH-Äq um zwei



**Abbildung 17-A:** Änderung der relativen Peakflächen-Response von *at*-AST mit steigender Retention auf der Säule (Kapazitätsfaktor) mit und ohne AAC als Additiv, isokratische Elution bei verschiedenen MeOH/MTBE Mischungen (von links nach rechts: 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5 [V/V]),  $T_s = 15^\circ\text{C}$ , jeweils  $n=2$ , Flow: 1 ml/min, Median der Peakflächen bei der Elution mit MeOH/MTBE (60/40 [V/V]) wurde gleich 100% gesetzt, die gestichelten Linien kennzeichnen den angenommenen Trend zwischen den getesteten MeOH/MTBE Mischungen.

**Abbildung 17-B:** Einfluss des pH-Äquivalentes (pH-Äq) auf das Retentionsverhalten von *at*-AST bei Verwendung einer mit AAC modifizierten mobilen Phase bestehend aus (MeOH/MTBE 70/30 [V/V]) mit 50mM AAC im MeOH Eluenten), Flow: 1 ml/min,  $T_s = 12^\circ\text{C}$ , die Datenpunkte zeigen jeweils den Median und die Spannweite, die graue Fläche kennzeichnet den beobachteten Versatz der Retentionszeit („Kapazitätslücke“) beim Übergang von einem „sauren“ in ein „basisches“ pH-Äq.

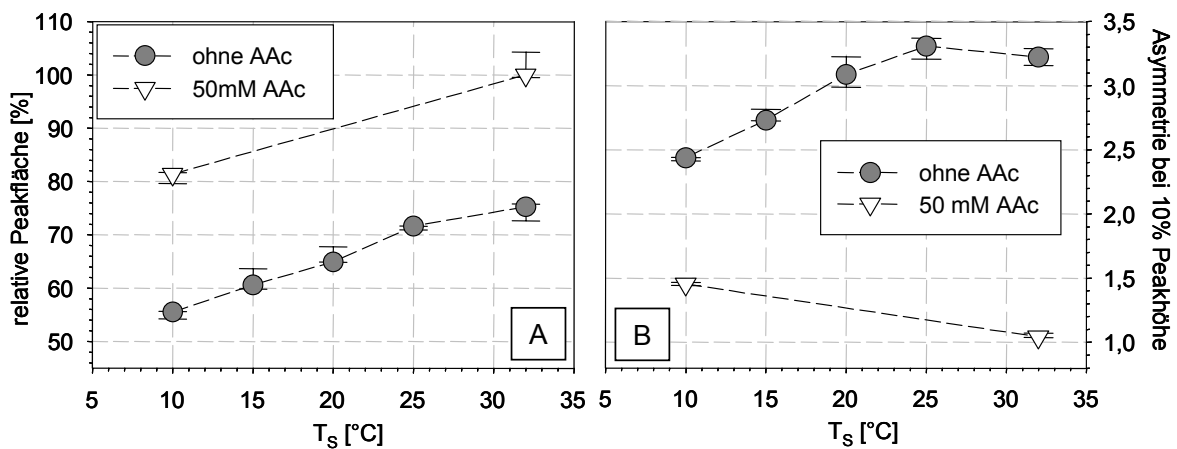
Einheiten deckt dabei eine 100fache Änderung des Konzentrations-Verhältnisses Ammonium/Ammoniak bzw. Acetat/Essigsäure ab. Im Ergebnis waren weder in der Peaksymmetrie noch in der Peakfläche deutliche Unterschiede innerhalb des pH-Äq-Intervalls von 6 bis 8 erkennbar (vgl. Abbildung 15, Set-5). Es konnte einzig ein Versatz der Retentionszeiten (Kapazität) von AST zwischen einem pH-Äq von 7,37 und 6,95 festgestellt werden (vgl. Abbildung 17-B).

Die Ergebnisse zeigen, dass die mit AAC modifizierte mobile Phase robust gegenüber Änderungen im pH-Äq, d.h. robust gegenüber dem Zusatz von anorganischen Säuren oder Basen ist. Die resultierende Peakfläche sowie die Peaksymmetrie von AST sind offensichtlich weniger vom pH-Äq der mobilen Phase und stärker von der chemisch-physikalischen Natur des Additivs abhängig. Des Weiteren konnte mit dem Zusatz von AAC als Fließmittel-Additiv eine vom MTBE/MeOH-Verhältnis unabhängige Peakflächen-Konstanz von AST erzielt werden. Dadurch wird eine quantitative Vergleichbarkeit der Peakflächen identischer Carotinoide aus Chromatogrammen verschiedener Extrakte auch bei Verwendung abweichender Gradienten ermöglicht. Die Notwendigkeit der Modifizierung des Gradienten ergibt sich aus dem Anspruch, möglichst alle Carotinoide aus Extrakten von unterschiedlichen Mikroorganismen vollständig aufzutrennen.

2.5.4.1.4 Temperaturabhängigkeit der Peakfläche und der Peaksymmetrie

Bekanntermaßen sind die Selektivität und das Auflösungsvermögen von Umkehrphasen (RP) insbesondere von RP-C<sub>30</sub>-Phasen deutlich von der Säulentemperatur abhängig (DUGO et al. 2008a, SANDER et al. 1994a/b, BÖHM 2001, BELL et al. 1997). Allerdings wurde noch nicht untersucht, inwiefern sich eine Variation der Säulentemperatur auf die Peakflächen-Response und die Peaksymmetrie von Carotinoiden bei chromatographischer Trennung an RP-C<sub>30</sub>-Phasen auswirkt. Aus diesem Grund wurde zur abschließenden Optimierung der bisher beschriebenen Methode die Abhängigkeit der Peakflächen-Response und der Peaksymmetrie von der Temperatur der stationären Phase untersucht. Ziel war es, aufzuklären ob die Peakflächen ein und desselben Carotinoids aus Läufen bei unterschiedlichen Säulentemperaturen miteinander vergleichbar sind. Ferner sollten die Ergebnisse die Grundlage für die Versuche zur Optimierung der Trennung durch Variation der Säulentemperatur bilden (vgl. 2.5.4.3).

Die ermittelten Daten zeigen, dass mit sinkender Temperatur der stationären Phase die Peakflächen-Response von AST, unabhängig von einem Zusatz an AAc zum Fließmittel, abnimmt (vgl. Abbildung 18-A). Die Differenz zwischen den absoluten Peakflächen, der mit AAc modifizierten mobilen Phase und des reinen Eluenten, bleibt jedoch annähernd konstant (parallel verlaufende Trendlinien in Abbildung 18-A). Demgegenüber zeigt die Peaksymmetrie ein mit der Säulentemperatur wechselndes Verhalten. Während mit steigender Temperatur der stationären Phase die Symmetrie des AST-Peaks unter der Verwendung von AAc zunimmt, kommt es bei dem reinen Eluenten mit einer Erhöhung der Säulentemperatur zur Abnahme der Peaksymmetrie (vgl. Abbildung 18-B).



**Abbildung 18-A:** Einfluss der Säulentemperatur ( $T_s$ ) auf die Peakflächen-Response von AST (4,28  $\mu\text{g/mL}$ , in EtOH) mit und ohne Verwendung des Fließmittel-Additivs AAc, isokratische Elution mit MeOH/MTBE (70:30, [v/v]) an einer RP-C<sub>30</sub>-Phase (Bischoff Chromatography, *Batch 1*), Detektion bei 474 nm, Darstellung der Werte mit Median ( $n=3$ ) und Spannweiten, der Median der Peakflächen bei 32°C wurde als 100% definiert, die gestrichelten Linien kennzeichnen den jeweils angenommenen Trend zwischen den Messpunkten.

**Abbildung 18-B:** Einfluss der Säulentemperatur auf die Peakasymmetrie von AST (4,28  $\mu\text{g/mL}$ , in EtOH) mit und ohne Verwendung des Fließmittel-Additivs AAc, alle weiteren Parameter analog Abbildung 18-A.

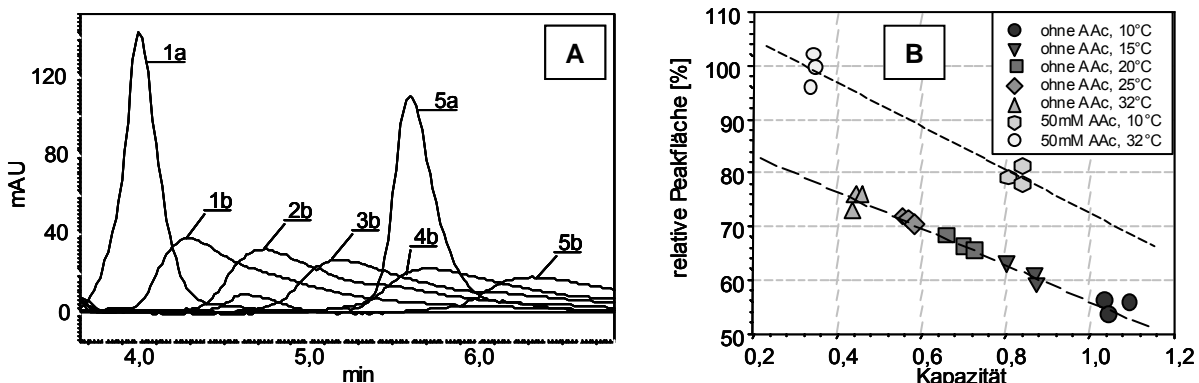
Prinzipiell kann mit der Veränderung der Säulentemperatur sowohl die Selektivität als auch das Auflösungsvermögen von RP-C<sub>30</sub>-Phasen beeinflusst werden. Dabei sinkt mit steigender Säulentemperatur die Viskosität der mobilen Phase, wodurch sowohl Geschwindigkeit des Masse-Transfer als auch die Löslichkeit der Analyte erhöht werden. In der Folge sinkt die Kapazität, und die Peaks werden trennschärfer bzw. symmetrischer (BRAITHWAITE et al. 1996). Dies trifft für die Peaksymmetrie von AST bei Verwendung

der mit AAC modifizierten Eluenten zu, nicht jedoch bei Verwendung des reinen Eluenten (vgl. Abbildung 18-B). Ohne den Fließmittel-Zusatz AAC zeigte der AST-Peak ein gegenteiliges Verhalten mit einem starken *Peak-Tailing*, was mindestens zwei verschiedene Wechselwirkungen zwischen dem Analytem und der stationären Phase vermuten lässt (lipophile Interaktionen mit den C<sub>30</sub>-Seitenketten und hydrophile Interaktion mit den nicht-*endcapped* Silanol-Gruppen).

Mit einem Absenken der Temperatur der stationären Phase wird die Geschwindigkeit der Einstellung des Gleichgewichts zwischen dem an/in der stationären Phase adsorbierten/gelösten Analyten und dem in der mobilen Phase gelösten Analyten erniedrigt. Offenbar werden hierbei die Kinetiken von verschiedenartigen Wechselwirkungen einander angeglichen, was in der Folge die Peaksymmetrie des AST Peaks erhöht. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass eine Erhöhung der Säulentemperatur auch eine vermehrte konformative Umwandlung der lipophilen C<sub>30</sub>-Seitenketten der stationären Phase von der *trans*-Konformation in die *gauche*-Konformation bewirkt, was die Peaksymmetrie zusätzlich beeinflussen kann (ALBERT et al. 1998, BELL et al. 1997).

Da mit steigender Temperatur die Retentionszeit sinkt, könnte der Gewinn an Peakflächen-Response (analog 2.5.4.1.3) unter Umständen aus der mit steigender Säulentemperatur einhergehenden Verringerung der Kapazität resultieren. Die Vermutung, dass die Änderung der Peakflächen-Response aus der Verschiebung der Retentionszeiten resultiert, steht jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den vorangegangenen Versuchen. Erstens: Trotz AAC-Zusatz kommt es bei unterschiedlichen Temperaturen zu einem Flächenverlust des AST-Peaks, obwohl gezeigt werden konnte, dass bei Zusatz des Additivs und isothermer Arbeitsweise mit steigender Säulenverweildauer keine Abnahme der Peakfläche auftritt (vgl. Abbildung 17-A).

Zweitens: Bei Verwendung des reinen Eluenten weist die mit steigender Kapazität abnehmende Peakflächen-Response (vgl. Abbildungen 19) nicht den unter Punkt 2.5.4.1.3 ermittelten typischen exponentiell abfallenden Verlauf auf (vgl. Abbildung 17-A). Die Werte zeigen vielmehr eine proportionale Veränderung der relativen Fläche mit steigender Kapazität (vgl. Abbildung 19-B). Das deutet darauf hin, dass der mit dem Absenken der Säulentemperatur auftretende Verlust an Peakflächen-Response nicht durch den Anstieg der Säulenverweildauer verursacht wird.



**Abbildung 19-A:** Chromatogramme der Änderung der Peakflächen-Response und der Peakform von AST ( $c = 4,28 \mu\text{g/mL}$ , EtOH) mit der Säulentemperatur, jeweils (a) mit und (b) ohne einem Zusatz von 50 mM Ammoniumacetat (AAC) zum Methanoleluenten, isokratische Arbeitsweise mit MeOH/MTBE (70:30, [V/V]) an einer RP-C<sub>30</sub>-Phase (Bishoff Chromatography, Batch 1), T<sub>s</sub>: 1a und 1b 32°C, 2b 25°C, 3b 20°C, 4b 15°C, 5a und 5b 10°C, Detektion bei 474nm.

**Abbildung 19-B:** Streudiagramm von Peakfläche vs. Kapazität von AST bei verschiedenen Säulentemperaturen (T<sub>s</sub>), chromatographische Bedingungen vgl. Abbildung 19-A, Median der Peakflächen bei 32°C wurde gleich 100% gesetzt, die gestrichelten Linien kennzeichnen den jeweils angenommenen Trend zwischen den einzelnen Messpunkten.

Das gleichartige Verhalten aller Peakflächen mit sinkender bzw. steigender Temperatur der stationären Phase deutet darauf hin, dass der temperaturbedingten Änderung der Peakflächen-Response identische oder ähnliche Mechanismen zu Grunde liegen, die durch einen Zusatz von AAc nicht beeinflusst werden können. Es wird angenommen, dass die vom Fließmittel-Additiv unabhängige Veränderung der Peakflächen-Response durch die temperaturbedingte Änderung der spezifischen Absorption von AST zustande kommt.

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Vergleichbarkeit der Peakflächen eines Carotinoids aus unterschiedlichen Läufen die Temperatur der stationären Phase dieselbe sein muss. Folglich wird durch eine konstante Säulentemperatur die Genauigkeit und Robustheit der Methode erhöht.

#### *2.5.4.1.5 Steigerung der Empfindlichkeit der Methode*

Die Quantifizierung von Carotinoiden per HPLC kann nach einer entsprechenden Kalibrierung der Methode über die Peakfläche oder die Peakhöhe eines geeigneten Standards erfolgen. Der resultierende Anstieg der Kalibrationsgeraden kennzeichnet dabei die Empfindlichkeit der Methode (KROMIDAS 2000). Um die Wirkung von AAc auf den Anstieg der Kalibrationsgeraden bzw. auf die Empfindlichkeit der Methode zu ermitteln, wurde ein separater Versuch für die verwendete RP-C<sub>30</sub>-Phase durchgeführt. Das Prinzip dieses Versuches beruhte auf der Erstellung der Kalibrationsgeraden für AST mit und ohne dem Zusatz von AAc und unter Verwendung identischer Kalibrationslösungen.

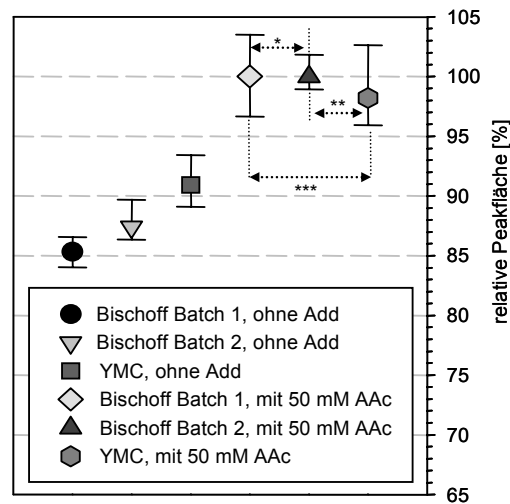
Mit dem Zusatz von AAc zum Eluenten konnte der Anstieg der Kalibrationsgeraden der Peakfläche um 30% und der Anstieg der Kalibrationsgeraden der Peakhöhe um 45% gesteigert werden. Der Unterschied in den relativen Geradenanstiegen zwischen Peakfläche und Peakhöhe von 15% resultierte aus dem *Peak-Tailing* von AST, welches die Peakhöhe gegenüber der Peakfläche überproportional verringerte. Da die Regressionen mit und ohne AAc jeweils einen linearen Zusammenhang mit unterschiedlichen Geradenanstiegen jedoch identischen Achsenabschnitten ergaben, kann davon ausgegangen werden, dass der Anteil an Response-Verlust (sowohl bei der Peakfläche als auch bei der Peakhöhe) unabhängig von der Konzentration der Kalibrierlösung, d.h. konstant ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Empfindlichkeit der Methode gegenüber AST durch den Zusatz von AAc zum Fließmittel beachtlich gesteigert wird. Dies hat insbesondere bei der Bestimmung sehr kleiner Mengen positive Auswirkungen auf die Genauigkeit der Methode (KROMIDAS 2000). Dementsprechend können bei einer höheren Empfindlichkeit auch geringere Probenmengen genau vermessen werden, was insbesondere bei begrenzt zugänglichem oder aufwändig gewinnbarem Probenmaterial von Vorteil ist.

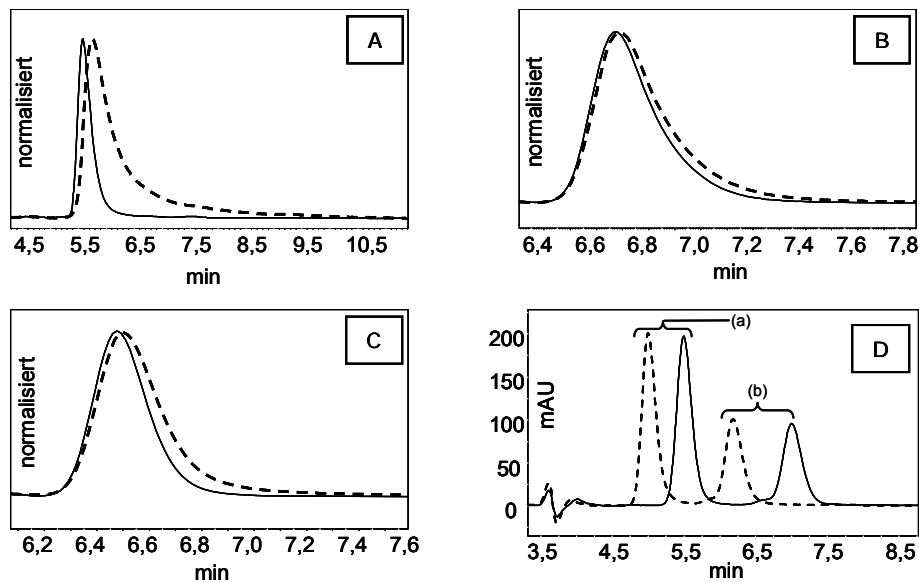
#### *2.5.4.1.6 Vergleich von verschiedenen Säulen-Fabrikaten und Säulen-Chargen*

Gleichartige Umkehrphasen verschiedener Hersteller können je nach Ausgangsmaterial und Reaktionsführung bei der Derivatisierung mit Alkylchlorosilanen stark voneinander abweichende Trenneigenschaften aufweisen. Da die Phasenmaterialien im *Batch*-Verfahren hergestellt werden, kann es sogar bei ein und demselben Hersteller zu enormen Unterschieden im Trennverhalten verschiedener Säulen-Chargen kommen. Für verschiedene Chargen von Trennmaterialien sind deshalb die chromatographischen Parameter nicht immer vollständig reproduzierbar (GALENSA et al. 1995, KROMIDAS 2002).

**Abbildung 20:** Einfluss von 50 mM AAC im MeOH-Eluenten auf die Peakflächen-Response von AST bei Elution an verschiedenen *Batches* und Fabriken von RP-C<sub>30</sub>-Phasen (YMC Europe GmbH und Bischoff Chromatography, Leonberg), isokratische Arbeitsweise mit MeOH/MTBE (70:30 [V/V]), Flow: 1 ml/min, T<sub>s</sub>=12°C, ohne Add - kein Additiv zugesetzt, pro Messpunkt jeweils n=4, der Median der Bischoff-Säule (*Batch 2*) mit AAC im MeOH-Eluenten wurde gleich 100% gesetzt (höchste erzielte Peakfläche), mit AAC im MeOH-Eluenten war zwischen den erzielten Peakflächen statistisch kein signifikanter Unterschied feststellbar (\*P=0,933; \*\* P=0,414; \*\*\* P=0,549).



Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche durchgeführt, die die Robustheit der eigenen Methode im Hinblick auf die *Batch*-Reproduzierbarkeit sowie die Vergleichbarkeit von verschiedenen RP-C<sub>30</sub>-Säulen-Fabriken einschätzen sollten. Hierbei sollte speziell auch der Nutzen eines Additivs unter dem Einsatz verschiedener Säulen-Chargen und Säulen-Hersteller beurteilt werden. Außerdem sollte getestet werden, in wie weit die bisherigen Beobachtungen übertragbar auf eine vollständig-*endcapped* RP-C<sub>18</sub>-Phase sind.



**Abbildung 21-A bis 21-C:** Einfluss von 50 mM AAC auf das Peak-Tailing von AST (5,31 µg/mL in EtOH) bei Elution an verschiedenen polymeren RP-C<sub>30</sub>-Phasen (A und B zwei verschiedene Säulen-*Batches* von Bischoff-Chromatography (Leonberg), C Säule von YMC-Europe, gestrichelte Linie ohne Additiv, durchgezogene Linie mit 50 mM AAC als Additiv im MeOH-Eluenten, isokratische Arbeitsweise mit MeOH/MTBE (70:30 [V/V]), Flow: 1 ml/min, T<sub>s</sub>=12°C, zum Vergleich der Peakformen wurden alle Peakhöhen normalisiert.

**Abbildung 21-D:** Einfluss von 50 mM AAC auf das Elutionsverhalten von *at*-AST (a) und *iso*-AST (b) an einer monomeren, vollständig *endcapped* RP-C<sub>18</sub>-Phase (Varian), isokratische Elution mit MeOH/MTBE (95:5 [V/V]), gestrichelte Linie ohne Additiv, durchgezogene Linie mit 50 mM AAC im MeOH-Eluenten.

Die Ergebnisse zeigen, dass zwar zwischen verschiedenen Fabriken von RP-C<sub>30</sub>-Säulen, jedoch nicht zwischen verschiedenen Chargen von RP-C<sub>30</sub>-Säulen signifikante Unterschiede in der Peakflächen-Response für AST bestehen (vgl. Abbildung 20). Diese Unterschiede werden mit dem Einsatz von AAC als Fließmittel-Additiv *nivelliert*. Dabei wird die Peakflächen-Response von AST bei allen getesteten RP-C<sub>30</sub>-Säulen unter Verwendung von Ammoniumacetat als Additiv zwischen 8% bis 14% auf dasselbe Niveau angehoben.

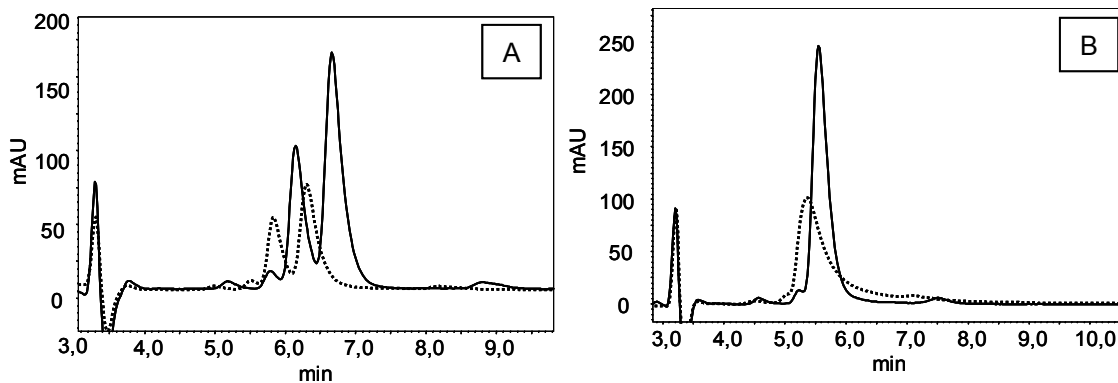
Anders als bei der Peakflächen-Response unterscheidet sich das *Peak-Tailing* von AST an RP-C<sub>30</sub>-Phasen nach Fabrikat und nach Charge (vgl. Abbildung 21-A bis C u. Tabelle 3). Dem ungeachtet wird mit dem Zusatz von AAC zum Fließmittel die Schwankungsbreite der Peaksymmetrien von AST zwischen verschiedenen Säulen-Fabrikaten enorm verringert (vgl. Tabelle 3).

Abweichend zu allen getesteten nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Phasen zeigte die vollständig-*endcapped* RP-C<sub>18</sub>-Phase sowohl bei *at*-AST als auch bei *c*-AST kein *Peak-Tailing* und ebenso keinen Verlust an Peakflächen-Response ohne den Fließmittel-Zusatz AAC. Nur ein Versatz der Retentionszeit war deutlich erkennbar (vgl. Abbildung 21-D).

**Tabelle 3:** Unterschiede in der Peaksymmetrie verschiedener RP-C<sub>30</sub>-Phasen (Angabe von Median aus n = 4 ± Spannweite/2)

Unterschied bei		Peakasymmetrie	
		kein Additiv	mit AAC
Hersteller	YMC Europe	1,45 ± 0,05	1,23 ± 0,01
	Bischoff ( <i>Batch 1</i> )	3,11 ± 0,08	1,61 ± 0,08
Charge	Bischoff ( <i>Batch 2</i> )	1,65 ± 0,05	1,63 ± 0,08
Schwankungsbreite [%]		100%	25%

Nach dem Ersetzen der Säulen durch eine PEEK-Kapillare (Poly-Ethyl-Ether-Keton) waren die AST-Peaks mit und ohne AAC als Fließmittel-Additiv schließlich vollständig identisch. Das bedeutet, dass ohne Säule unabhängig vom Einsatz eines Fließmittel-Zusatzes bei der Elution von AST unter identischen Bedingungen weder ein *Peak-Tailing* noch eine Variation in der Peakflächen-Response auftritt.



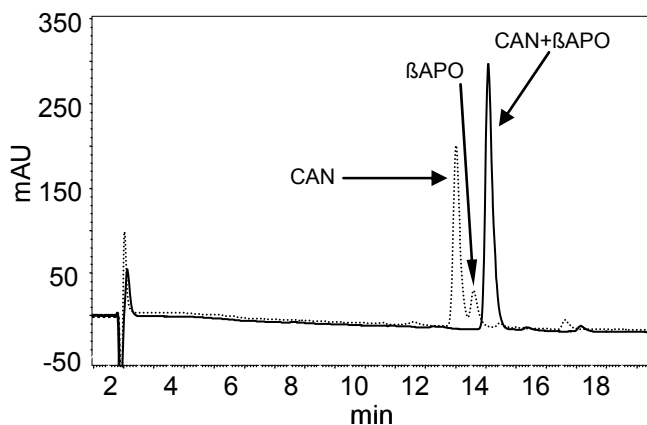
**Abbildung 22-A:** Elutionsverhalten von geometrischen AST-Isomeren (*iso*-AST) am *Batch 2* der nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Säule von Bischoff Chromatography, T<sub>s</sub> = 12°C, Flow: 1 ml/min, isokratische Elution, mit MTBE/MeOH (70:30 [V/V]), gepunktete Linie: Elution ohne AAC, durchgezogene Linie: Elution mit 50 mM AAC im MeOH-Eluenten.

**Abbildung 22-B** Elutionsverhalten derselben geometrischen AST-Isomere (*iso*-AST) aus Abbildung 22-A jedoch am *Batch 1* der nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Säule von Bischoff Chromatography, alle weiteren Parameter analog Abbildung 22-A.

Grundsätzlich darf bei einem erhöhten *Peak-Tailing* von AST an einer bestimmten Säule nicht zwingend auf die Trenneffizienz dieser Säule gegenüber anderen Carotinoiden geschlossen werden. So zeigte beispielsweise *Batch 1* der Bischoff-Säulen gegenüber *Batch 2* zwar eine schlechtere Trennung der AST-Isomere (vgl. Abbildung 22), gleichzeitig wurde jedoch eine bessere Trennung von  $\beta$ APO und CAN erreicht (vgl. Abbildung 23). Beide Carotinoide waren auf *Batch 2* unter denselben Bedingungen nicht trennbar.



Zusammenfassend offenbarten die nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Phasen gegenüber der vollständig-*endcapped* RP-C<sub>18</sub>-Phase eine wesentlich bessere Selektivität und ein höheres Auflösungsvermögen bei allerdings verminderter Peakflächen-Response für AST. Mit dem Zusatz von AAc zum Fließmittel konnte die Peakflächen-Response bei allen Säulen (RP-C<sub>30</sub> und RP-C<sub>18</sub>) auf ein und dasselbe Niveau angehoben werden. Außerdem wurde bei allen RP-C<sub>30</sub>-Säulen die Schwankungsbreite der Asymmetrie des AST-Peaks unter Verwendung von AAc als Fließmittel-Additiv beträchtlich vermindert.



**Abbildung 23:** *Batch*-Reproduzierbarkeit der Trennung von  $\beta$ AP0 und CAN an RP-C<sub>30</sub>-Phasen (Bischoff-Chromatography). Gepunktete Linie: Säule *Batch 1*, durchgezogene Linie: Säule *Batch 2*, Chromatographische Bedingungen: Flow: 1,3 ml/min, T<sub>s</sub>=20°C, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 50 mM AAc [min - %]: 0-0, 24-62, 26-100, 31-100, 34-0, 41-0; alle Läufe wurden mit derselben Vorsäule durchgeführt, Detektion bei 450 nm.

Schlussendlich wird durch das Angleichen der Eigenschaften unterschiedlicher Säulen-Chargen und/oder Säulenfabrikate die Übertragbarkeit und Vergleichbarkeit der Methode mit ähnlichen Methoden erheblich verbessert. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die zum Teil erheblichen Variationen der Trenneigenschaften (Auflösungsvermögen und Selektivität) von RP-C<sub>30</sub>-Säulen sich je nach Trennproblem positiv oder negativ auswirken können. Aus diesem Grund kann eine allgemeine Eignungsreihenfolge der getesteten Säulen nach *Batch* oder Fabrikat nicht festgelegt werden.

#### 2.5.4.1.7 Erklärungsansatz zum Wirkmechanismus von Fließmittel-Additiven

Bei der Trennung von Carotinoiden an RP-C<sub>18</sub>-Phasen sind Fließmittel-Zusätze zur Verbesserung der Trenneffizienz nicht unüblich (vgl. Anhang 9.1, Tabelle 12). Dennoch sind der Nutzen und die Wirkungsweise solcher Substanzen, insbesondere für RP-C<sub>30</sub>-Phasen, bislang nicht abschließend erforscht (vgl. Anhang 9.1, Tabelle 13). Als potentielle Wirkmechanismen werden unter anderem die Veränderung des pH-Wertes (HART et al. 1995), die Verminderung der Rest-Silanol-Aktivität (BARUA et al. 1998) oder die Komplexbildung von Metallionen diskutiert (EPLER et al. 1993, SCOTT 1992). Prinzipiell gibt es bei den bestehenden Erklärungsansätzen jedoch viele Unstimmigkeiten. Gegen die Hypothese einer einfachen Komplexbildung von Metallionen durch einen Fließmittel-Zusatz spricht beispielsweise die Beobachtung, dass N,N-Di-iso-propyl-amin als Additiv bei der NP-Chromatographie von Carotinoiden weder die Wiederfindung noch die Peakaufklärung positiv beeinflusst (KHACHIK et al. 1992). Nur wenige Arbeiten beschreiben bei der Verwendung eines Additivs in einem Methanol-basierten Eluenten an RP-Phasen, in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen, neben der Verbesserung der Peakform auch eine Erhöhung der relativen Wiederfindung (erhöhte Peakfläche) von Carotinoiden nach dem Säulendurchgang (SHARPLESS et al. 1996, EPLER et al. 1993). Dabei wurden die Additive Triethylamin (EMENHISER et al. 1996) und Ammoniumacetat in verschiedenen Konzentrationen verwendet (EPLER et al. 1993, CORTÈZ et al. 2004). Experimentell eindeutig bestätigte Mechanismen der beschriebenen Effekte - sowohl für RP-C<sub>18</sub>-Trenn-

materialien als auch für RP-C<sub>30</sub>-Phasen - existieren noch nicht. Deshalb soll im Folgenden, basierend auf den eigenen Ergebnissen unter Einbeziehung der in der Literatur bislang bestehenden Hypothesen, ein Vorschlag zum Wirkmechanismus derartiger Additive gegeben werden.

Da mit dem Austauschen der Säule gegen eine PEEK-Kapillare weder ein *Peak-Tailing* noch eine Veränderung der Peakflächen-Response von AST auftrat, ist davon auszugehen, dass der primäre Mechanismus ausschließlich auf der Säule stattfindet. Übereinstimmend dazu zeigte AAc als Additiv bei Verwendung einer PEEK-Kapillare anstelle einer Säule keinerlei Einfluss mehr auf die Peakgeometrie oder die Peakfläche von AST. Ohne Säule (mit PEEK-Kapillare) überstieg die absolute Peakfläche grundsätzlich die Peakfläche von AST bei Verwendung einer Trennsäule, unabhängig davon, ob mit oder ohne Fließmittel-Additiv gearbeitet wurde. Gleichzeitig wurden mit der Zugabe von AAc, ob mit oder ohne Verwendung einer Säule, weder im DAD noch isoliert in einer Küvette, Veränderungen im UV-VIS-Absorptionsspektrum beobachtet. Somit kann eine durch AAc bedingte Änderung der Peakflächen-Response von AST infolge der Bildung supra-molekularer Aggregate (FOSS et al. 2005, KÖPSEL et al. 2005) und/oder der Verschiebung des Keto-Enol-Gleichgewichtes von AST (NELIS et al. 1988) ausgeschlossen werden. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass AST auf der Säule während der Passage verloren geht. Die Minderung der Peakflächen-Response resultiert hierbei offenbar einzig aus dem Substanz-Verlust des Analyten beim Säulendurchgang. Dieser Verlust wird über einen Fließmittel-Zusatz vermindert, was die Wiederfindung erhöht und durch den Anstieg der Peakflächen-Response deutlich wird. Dabei zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass dem *Peak-Tailing* und der veränderlichen Peakflächen-Response von AST zwei verschiedene oder zumindest sich überlagernde Mechanismen zu Grunde liegen, die beide durch den Zusatz eines Fließmittel-Additivs beeinflusst werden können. Die Annahme von zwei unterschiedlichen Mechanismen resultiert insbesondere aus der Beobachtung, dass mit der Verwendung von Essigsäure als Fließmittel-Zusatz die Peaksymmetrie zunahm, während die Peakfläche des AST-Peaks deutlich abnahm. Bei allen anderen Additiven wurde gegenüber dem reinen Eluenten sowohl die Peaksymmetrie, als auch die Peakfläche erhöht (vgl. Abbildung 15). In der Literatur wird als mögliche Ursache für den Verlust von Carotinoiden während der Säulenpassage u.a. ein Kontakt der Analyten mit Spuren von Metallionen aus dem Trennmateriale postuliert. Kontaminationen mit Metallionen können herstellungsbedingt bei vielen RP-Trennmateriale auftreten oder beispielsweise durch die Verwendung von Edelstahlkapillaren, Säuleneingangs-Fritten und Säuleneingangs-Sieben aus Metall auf die Säule gelangen (KROMIDAS 2002, HART et al. 1995, TADA et al. 1993, SCOTT 1992). Insbesondere zwei- und dreiwertige Eisen-Ionen, die im Kieselgelgerüst eingebaut sind bzw. während des Säulenbetriebs dorthin eingelagert werden, können die Dissoziation ungebundener Restsilanolgruppen begünstigen (KROMIDAS 2006, KIMATA et al. 1992). Anhand der Ergebnisse aus den eigenen Versuchen wird angenommen, dass hierbei Silanol-Metallionen-Zentren entstehen, die bei den beobachteten Degradationen eine wesentliche Rolle spielen. Übereinstimmend zur Annahme von Metallionen als Ursache des Substanzverlustes zeigten die Versuche mit AST in einer Küvette und gelöst im Fließmittel (MeOH/MTBE) nach dem Zusatz von Spuren an Eisen-(III)-Ionen (~ 500ppm) deutliche Veränderungen des UV-VIS-Spektrums. Innerhalb von wenigen Minuten kam es zu einer drastischen Abnahme der molaren Absorption im Maximum. Unter dem Zusatz von AAc zur Lösung blieb das UV-VIS-Spektrum von AST unabhängig von einer Kontamination mit Eisen-(III)-Ionen jedoch konstant. Demzufolge wird auch bei der beobachteten Degradation von AST auf RP-Phasen als Ursache der Kontakt

mit Metallionen vermutet. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die vorliegenden Ergebnisse für die vollständig-*endcapped* RP-C<sub>18</sub>-Säule gegenüber allen getesteten nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Phasen einen deutlich geringeren Peakflächen-Verlust zeigte, ist anzunehmen, dass die freien Silanol-Gruppen einer nicht-*endcapped* RP-Phase im Mechanismus der Degradation von AST neben den Metallionen eine wesentliche Rolle spielen. Es wird vermutet, dass die Metallionen unter dem hier verwendeten lipophilen Fließmittel (MeOH/MTBE) bevorzugt an freie Silanolgruppen des Trennmaterials binden. Hydrophile Carotinoide wie AST interagieren im Vergleich zu lipophileren Carotinoiden wie  $\beta$ CAR stärker mit solchen hydrophilen Silanol-Metallion-Zentren und zeigen infolgedessen auch höhere Verluste beim Säulendurchgang. Die aufgestellte Theorie der Oberflächen gebundenen Silanol-Metallion-Analyt-Degradation wird dadurch gestützt, dass weder im Fließmittel gelöste Antioxidantien (BHT, ASC) noch Komplexbildner (EDTA) als Additive einen gleich hohen Gewinn an Peakfläche wie AAc erzeugen konnten. Das bedeutet, dass die stattfindenden Degradationen ursächlich *nicht ausschließlich* durch freie Metallionen und ebenso *nicht ausschließlich* durch oxidative Reaktionen in Lösung zustande kommen können. Ebenso wird angenommen, dass auch die freien Silanol-Gruppen nicht die alleinige Ursache der Degradationen sein können, da die Wechselwirkungen von Analyten und freien Silanolgruppen deutlich vom pH abhängig sind und weder die Verschiebung des pH-Äquivalentes der mobilen Phase noch der Einsatz von sauren und basischen Additiven deutliche Trends in der Peakflächen-Response von AST bewirken konnten. Demzufolge sind auf Basis der vorliegenden Ergebnisse für die Degradation von AST auf der Säule sehr wahrscheinlich Silanol-Metallion-Analyt-Wechselwirkungen verantwortlich. Allerdings konnten die bei Degradationen entstehenden Abbauprodukte mittels DAD nicht detektiert werden. Möglicherweise besitzen die entstehenden Artefakte eine sehr langsame Desorptions-Kinetik oder werden irreversibel adsorbiert. Darüber hinaus ist der nach der Degradation zurückbleibende Chromophor der Artefakte möglicherweise so klein, dass diese vom DAD unterhalb von 250 nm auf Grund der zunehmenden Eigenabsorption des Fließmittels schlecht detektierbar sind.

Die Wirkungsweise eines Additivs beruht folglich darauf, dass ein polarer Fließmittel-Zusatz die Interaktionen von AST mit den Silanol-Metallion-Zentren eliminiert bzw. behindert. Sowohl der Analyt als auch das Additiv befinden sich nebeneinander im Fließmittel und konkurrieren folglich um die Silanol-Metallionen-Zentren. Da das Additiv im Vergleich zum Analyten jedoch immer im Überschuss vorhanden ist, wird die durch Diffusion bedingte Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung des Analyten mit einem Silanol-Metallionen-Zentrum stark verringert, wodurch Degradationen minimiert werden und infolgedessen die Peakflächen-Response steigt.

Als Ursache für das enorme *Peak-Tailing* von AST werden hingegen ausschließlich sekundäre, hydrophile Interaktionen der funktionellen Sauerstoffgruppen von AST mit den freien Silanol-Gruppen der stationären Phase vermutet. Diese können durch das nichtwässrige Milieu deutlich intensiviert werden (KROMIDAS 2006, SCOTT 1991). Primär treten bei der RP-Chromatographie lipophile Interaktionen d.h., hauptsächlich Verteilungen der Analyten zwischen den lipophilen Kohlenwasserstoff-Seitenketten der stationären Phase und der mobilen Phase auf (KROMIDAS 2006, SCOTT 1991). Nichtsdestoweniger können freie ungebundene Silanol-Gruppen auch sekundäre Interaktionen insbesondere mit hydrophilen Molekül-Gruppen verursachen (LESELLIER et al. 2005 u. 2006, TCHAPLER et al. 1993, SANDER et al. 1990). Je nach dem pH-Äquivalent der mobilen Phase können die entstehenden Effekte das chromatographische Verhalten von Analyten infolge

einer Bildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen und von Ionen-Austausch-Wechselwirkungen modifizieren (HERRERO-MARTINEZ et al. 2004, NAWROCKI 1997). In der Folge wird die Peaksymmetrie und das Retentionsverhalten insbesondere von polarerer Analyten stark beeinflusst (FLIEGER 2006, LESELLIER et al. 2005). Analog dazu wird für AST angenommen, dass die funktionellen Sauerstoffgruppen des Moleküls und die freien Silanolgruppen der stationären Phase eine sekundäre hydrophile Wechselwirkung eingehen. Neben der primären lipophilen Wechselwirkung von AST mit den C<sub>30</sub>-Seitenketten weist diese sekundäre Interaktion jedoch eine andere Adsorptions/Desorptions-Kinetik auf. Da AST insgesamt vier endständige polare Sauerstoff-Gruppen besitzt, ist die Bindung an die freien Silanolgruppen relativ stark. Durch die unterschiedliche Natur von sekundärer und primärer Interaktion verläuft der Austausch (Adsorptions/Desorptions-Kinetik) zwischen AST und den Silanolgruppen wesentlich langsamer als zwischen AST und den C<sub>30</sub>-Seitenketten der stationären Phase. Eine Folge davon ist das überdurchschnittlich starke *Peak-Tailing* von AST im Vergleich zu anderen Carotinoiden. Ein ionisches Additiv eliminiert bzw. verringert derartige hydrophile Wechselwirkungen, wodurch prinzipiell nur noch die Kinetik der Interaktion von AST mit den lipophilen C<sub>30</sub> Seitenketten zum Tragen kommt und das *Peak-Tailing* minimiert wird (FLIEGER 2006). Der angenommene Mechanismus wird durch die Beobachtung untermauert, dass an der vollständig *endcapped* RP-C<sub>18</sub>-Phase kein *Peak-Tailing* von AST beobachtet werden konnte.

Schlussendlich wird als Ursache für die Degradation von AST eine Silanol-Metallion-Analyt-Wechselwirkung und für das *Peak-Tailing* eine Silanol-Analyt-Wechselwirkung angenommen. Die Degradation verläuft anscheinend oberflächengebunden, so dass ein im Eluenten lösliches Antioxidans wenig Einfluss zeigt. Das Fließmittel-Additiv AAc kann als relativ kleines Molekül tief in die stationäre Phase diffundieren und dort sowohl an Silanol-Metallionen-Zentren als auch an freie Silanol-Gruppen binden und somit den Analyten vor Degradationen schützen sowie ein *Peak-Tailing* minimieren. Eine Maskierung der freien Silanol-Gruppen und/oder der Metallionen ist dabei deutlich von der chemisch-physikalischen Natur des verwendeten Additivs abhängig. Demzufolge fallen die Effekte in der Peakgeometrie und in der Peakflächen-Response je nach Additiv unterschiedlich stark aus, weshalb die Art und Konzentration des Additivs immer dem jeweiligen Trennproblem angepasst werden muss.

#### *2.5.4.1.8 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Fließmittel-Additive*

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass zur Optimierung der Trennung von Carotinoiden auf einer nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Phase und zur Beseitigung von Störungen (schlechte Peakflächen-Response und Peaksymmetrie) Fließmittel-Additive überaus nützlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass mit der Verwendung von Ammoniumacetat (AAc) als Fließmittel-Additiv die Selektivität, Sensitivität und die Robustheit der HPLC-Methode erheblich verbessert werden. Gleichwohl muss die Auswahl und Applikation des Additivs auf die Erfordernisse der jeweiligen Methode angepasst werden, da herstellungsbedingt Unterschiede in den Trenneigenschaften je nach Säulen-Charge und Säulen-Fabrikat auftreten und einzelne Fließmittel-Additive auch nachteilige Effekte offenbaren. Da Umkehrphasen in der Regel auf Kieselgel basieren, kann es beispielsweise durch basische Additive zu irreversiblen Schäden und in Folge dessen zum Ausbluten der Säule und zum Verlust von Trennleistung kommen (KROMIDAS 2006). Dies ist insbesondere bei Verwendung von relativ preisintensiven RP-C<sub>30</sub>-Phasen nachteilig, für die gewöhnlich eine lange Lebensdauer angestrebt wird. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass AAc derartige Nachteile nicht

besitzt. Es erzeugt in Lösung einen neutralen pH und ist für Anwendungen mit massenspektrometrischer Detektion hinreichend flüchtig (BURNS et al. 2003). Mit AAC als Fließmittel-Additiv wurde bei der Trennung von Carotinoiden an RP-C<sub>30</sub>-Phasen mit einem MeOH/MTBE basierten Fließmittelgradienten eine optimale Peakform und Peakflächen-Respons bei gleichzeitig guter Verträglichkeit für das chromatographische System erreicht.

Für AST zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass durch AAC als Fließmittel-Additiv eine Steigerung der relativen Wiederfindung um bis zu 30% unabhängig von der Analyt-Konzentration erreichbar ist. Gleichzeitig wird der mit zunehmender Säulenverweildauer steigende Analyt-Verlust vollständig beseitigt und eine Vergleichbarkeit der Peakflächen trotz unterschiedlicher Gradienten (MeOH/MTBE Verhältnisse) ermöglicht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Peakflächen-Response mit sinkender Temperatur der stationären Phase auch unter Verwendung von AAC abnimmt. Demzufolge besitzt die Säulentemperatur einen additiv-unabhängigen Einfluss auf die absolute Peakfläche und somit auf die Empfindlichkeit jeder Messung. Messergebnisse, die bei verschiedenen Temperaturen erhalten werden, sind nicht vergleichbar. Deshalb sollte bei einer Kalibration sowie bei der Quantifizierung von Carotinoiden grundsätzlich eine konstante Säulentemperatur verwendet werden. Da mit sinkender Säulentemperatur auch die Peakflächen-Response sinkt, sollte diese zur Verbesserung der Auflösung nur soweit wie unbedingt nötig herabgesetzt werden.

Als Ursache für das Peak-*Tailing* von AST werden sekundäre hydrophile Interaktionen zwischen Analyt und den freien Silanolgruppen der nicht-*endcapped* stationären Phase angenommen. In der Folge kommt es zur Überlagerung unterschiedlich schneller Adsorptions/Desorptions-Kinetiken, welche mehrere Verteilungsformen zwischen Analyt und stationärer Phase bedingen und somit ein Peak-*Tailing* verursachen. Als Ursache für den Response-Verlust der Peakfläche werden hingegen Degradationen infolge von Wechselwirkungen des Analyten mit den an freie Silanolgruppen gebundenen Metallionen angenommen.

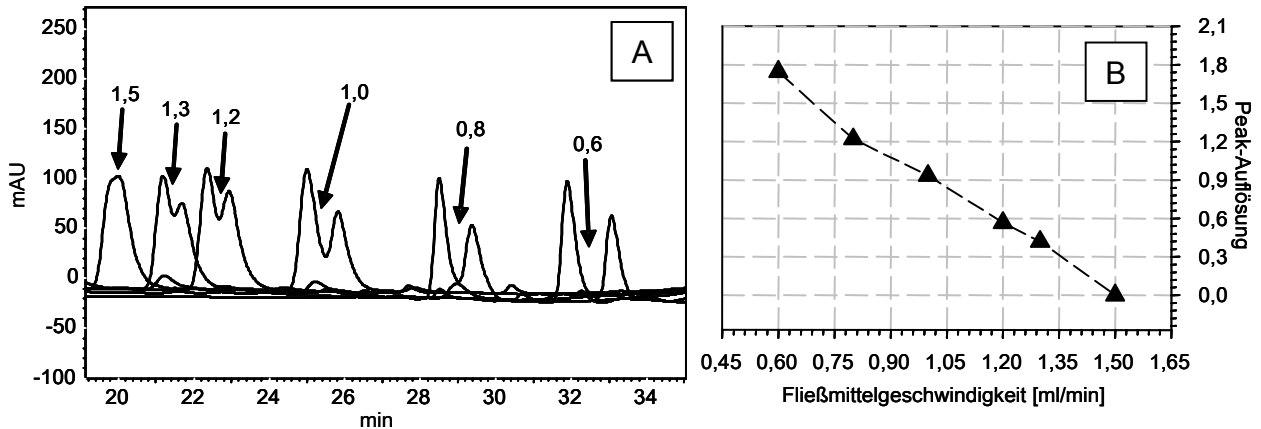
Zusammenfassend wird deutlich, dass bei der Trennung von Carotinoiden ungebundene Silanolgruppen zwar einerseits notwendig für die Selektivität einer nicht-*endcapped* stationären Phase sind, andererseits jedoch ebenso Peakverzerrungen und gemeinsam mit Metallionen auch Degradationen bedingen können. Es konnte gezeigt werden, dass AAC die negativen Eigenschaften der verwendeten RP-C<sub>30</sub>-Phase nahezu vollständig beseitigt, wodurch die positiven Trenneigenschaften der Phase hervorgehoben werden.

#### ***2.5.4.2 Einfluss der Fließmittelgeschwindigkeit auf die Trennleistung und Entwicklung geeigneter Fließmittelgradienten zur Trennung der Extrakte***

Die Fließ-Geschwindigkeit der mobilen Phase (Flow) besitzt einen bedeutenden Einfluss auf die Trenneffizienz von chromatographischen Methoden, wobei der Effekt bei kleineren Korngrößen des Säulenfüllmaterials weniger stark ausgeprägt ist (SCOTT 1991, SNYDER 1997). Eine Erhöhung der Fließmittelgeschwindigkeit erzeugt prinzipiell schmalere Basis-Peakbreiten und infolgedessen oft eine bessere Peakauflösung bei gleichzeitiger Reduzierung der Analysenzeiten. Jedoch führt die Anhebung der Fließmittelgeschwindigkeit auch zu einem vermehrten Fließmittelverbrauch sowie zu einem Druckanstieg im gesamten chromatographischen System. Letzteres wird insbesondere durch die für Detektor-Durchflusszellen (UV-VIS, Fluoreszenz etc.) maximal zulässigen hydrostatischen Drücke limitiert. Demzufolge wird für ein

bestimmtes Trennproblem die maximale Trenneffizienz eines chromatographische Trennsystems nur bei einer bestimmten (optimalen) Fließmittelgeschwindigkeit erreicht.

Vor diesem Hintergrund wurde neben den Untersuchungen zur Applikation der Fließmittel-Additive für die bis dahin erarbeitete HPLC-Trennmethode (RP-C<sub>30</sub>-Säule, Fließmittel MeOH/MTBE, Additiv AAC) der Einfluss der Fließmittelgeschwindigkeit (Flow) untersucht. Parallel dazu wurden die für das Screening und die Supplementierungsversuche benötigten Basis-Gradienten zur Trennung der aus den Mikroorganismen gewonnenen Carotinoide entwickelt.



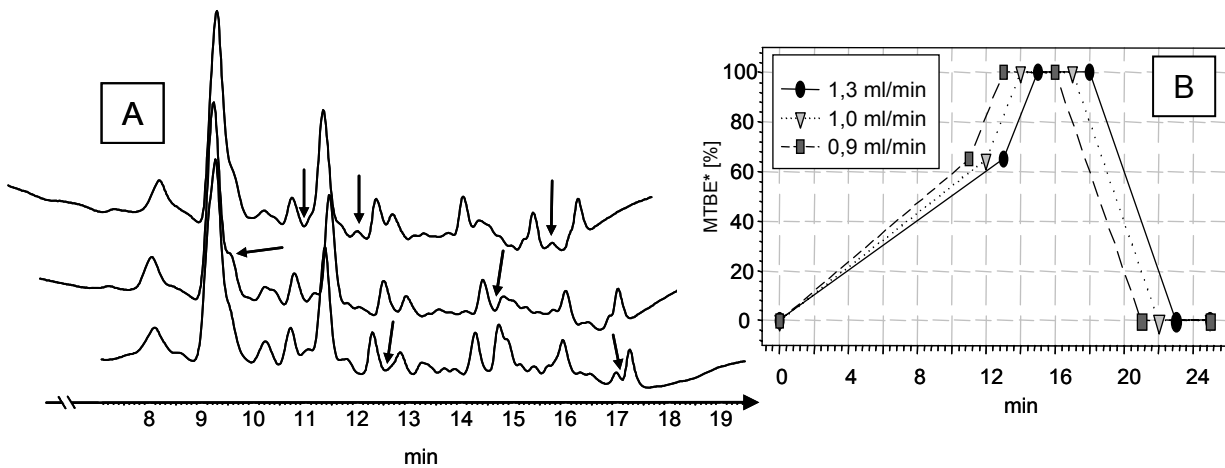
**Abbildung 24-A:** Chromatogramme der Optimierungsversuche zur Trennung von CAN und  $\beta$ APO durch Variation der Fließmittelgeschwindigkeit, der linke Peak entspricht jeweils CAN und der rechte Peak jeweils  $\beta$ APO, die Zahlenwerte über den Peaks geben die jeweils getestete Fließmittelgeschwindigkeit in [ml/min] an,  $T_s = 12^\circ\text{C}$ , verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 50mM AAC [min-%]: 0-0, 20-20, 26-45, 31-90, 39-90, 44-0, 50-0.

**Abbildung 24-B:** Abhängigkeit der Peak-Auflösung zwischen CAN und  $\beta$ APO von der Fließmittelgeschwindigkeit, die gestrichelte Linie kennzeichnet den angenommenen Verlauf zwischen den Messpunkten, alle weiteren Parameter analog Abbildung 24-A.

Zum Erzielen optimaler Trennergebnisse wird vom Hersteller für die verwendete RP-C<sub>30</sub>-Säule eine Fließmittelgeschwindigkeit zwischen 1,2 ml/min und 1,3 ml/min angegeben. Wie eigene Tests zeigten, können jedoch auch wesentlich kleinere Flüsse für die Trennung bestimmter Carotinoide notwendig werden (vgl. Abbildung 24). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass es bei komplexen Carotinoidegemischen mit der Variation der Fließmittelgeschwindigkeit bei einigen Komponenten zu einem Gewinn an Auflösung und bei anderen zu einem Verlust an Auflösung kommt (vgl. Abbildung 25). Die Trennung aller Komponenten von komplexen Naturstoffextrakten, wie mikrobiellen Carotinoiden (einschließlich deren Isomere) ist daher praktisch oft nicht möglich. Demzufolge wurde die Fließmittelgeschwindigkeit, insofern notwendig, auf das jeweilige Trennproblem, d.h. den jeweiligen Extrakt angepasst.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der Fließmittelgeschwindigkeit auf die Trenneffizienz der Methode, konnten die Angaben des Herstellers (1,2 ml/min bis 1,3 ml/min) zumeist bestätigt werden. Folglich wurde, abgesehen von einigen Läufen mit Extrakten von *Brevibacterium linens* bei der Trennung der mikrobiellen Carotinoide durchweg mit einer Fließmittelgeschwindigkeit von 1,3 ml/min gearbeitet.

Für die Trennung der aus den Mikroorganismen erhaltenen Carotinoide wurden zwei separate Gradienten parallel entwickelt: ein Gradient mit kurzer und ein Gradient mit langer Laufzeit. Die Entwicklung separater Gradienten wurde aus Zeit- und Kostengründen (Fließmittelverbrauch) gewählt, da für das Screening nur Einzel- oder Doppelbestimmungen, dagegen für die Supplementierungsversuche Dreifach- bis Vierfach-Bestimmungen mit jeweils bis zu zehn Supplementen geplant waren

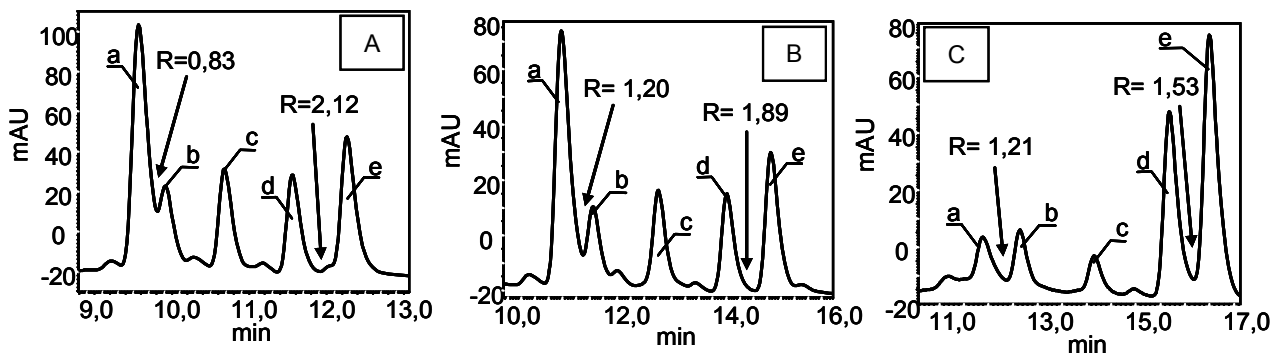


**Abbildung 25-A:** Chromatogramme eines Carotinoidextraktes aus *Brevibacterium linens*, getrennt bei unterschiedlichen Fließmittelgeschwindigkeiten mit aufeinander aufbauenden (konvergenten) Gradienten, die Pfeile kennzeichnen jeweils beispielhaft einen Gewinn an Auflösung,  $T_s = 12^\circ\text{C}$ , die zu den Chromatogrammen zugehörigen Fließmittelgeschwindigkeiten (von unten nach oben) sind: 0,9 ml/min; 1,0 ml/min und 1,3 ml/min (vgl. Abbildung 25-B).

**Abbildung 25-B:** Diagramm mit den Verläufen der für die Trennung des *B. linesns* Extraktes aus Abbildung 25-A verwendeten Fließmittelgradienten, \* die Ordinate beschreibt den Anteil von MTBE in MeOH mit 50 mM AAC in [%].

(vgl. Kapitel 3 u. 4). Das Ziel bestand zum einen darin, für das Screening einen einheitlichen Gradienten mit hoher Trennleistung und vergleichbaren Chromatogrammen für alle Mikroorganismen zu entwickeln. Hingegen sollte für die Vielzahl der Supplementierungsproben ein möglichst kurzer Lauf mit hohem Probendurchsatz und mit der Fähigkeit zur Trennung der jeweiligen Hauptcarotinoide entwickelt werden. Im Ergebnis wurden empirisch zwei Gradienten mit je einem zweistufig, linearen Anstieg von MTBE in MeOH mit 50mM AAC gefunden.

Der für das Screening verwendete 50minütige Gradient verläuft dabei flacher als der für die Supplementierungsversuche verwendete 25minütige Gradient. Dadurch wird bei ersterem eine bessere Trenneffizienz insbesondere gegenüber den frühzeitig eluierenden Xanthophyllen erzielt. Beispielsweise konnten mit der 50minütigen Methode AST und LUT basisliniengetreunt werden, während dies mit der 25minütigen Methode nicht bzw. nur unter Verlust von Trenneffizienz für die später eluierenden, sauerstofffreien Carotine möglich war. Bei einer vorgegebenen Laufzeit von nur 25 min kann selbst mit einer



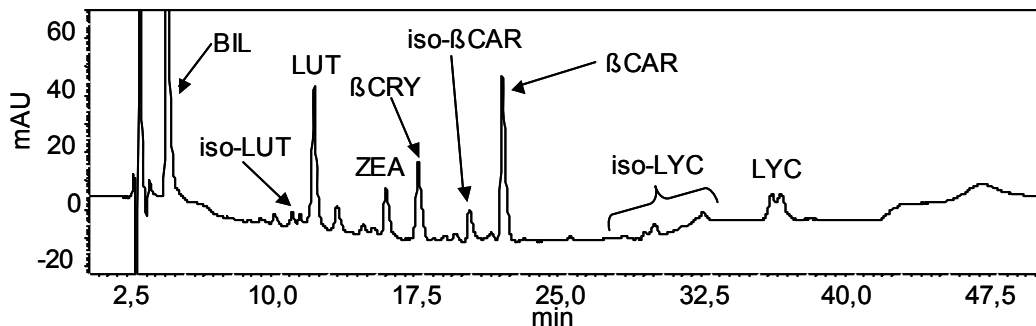
**Abbildung 26:** Trennergebnisse ausgewählter getesteter 25min-Gradienten der Optimierungsversuche zur Trennung eines Carotinoidgemisches bestehend aus: a=AST, b=LUT, c=ZEA, d=CAN, e=βAPO, an einer RP-C<sub>30</sub>-Säule (Bischoff-Chromatography), die Auflösung R (nach USP) ist beispielhaft für AST/LUT sowie für CAN/βAPO angegeben,  $T_s = 10^\circ\text{C}$ , Flow: 1,3ml/min.

**Abbildung 26-A:** Gradient MTBE in MeOH 50mM AAC [min-%]: 0-0, 13-65, 15-100, 18-100, 23-0, 25-0.

**Abbildung 26-B:** Gradient MTBE in MeOH 50mM AAC [min-%]: 0-0, 13-39, 15-100, 18-100, 23-0, 25-0.

**Abbildung 26-C:** Gradient MTBE in MeOH 50mM AAC [min-%]: 0-0, 13-30, 15-90, 18-95, 23-0, 25-0.

Abflachung im ersten Teil des Gradienten nur ein Kompromiss an Auflösungsgewinn und Auflösungsverlust von bestimmten Carotinoiden erzielt werden (vgl. Abbildungen 26). Für die Supplementierungsversuche mit ausgewählten Mikroorganismen war die Effizienz der 25minütigen Methode zur Trennung der Hauptcarotinoide (Probendurchsatz) jedoch wesentlich höher und die Trennleistung völlig ausreichend (vgl. Kapitel 4). Um die Leistungsfähigkeit der 50minütigen Screening-Methode abschließend zu beurteilen, wurde die Auftrennung von Carotinoiden aus einem Human-Plasma-Extrakt getestet, da dieser natürlicherweise viele bekannte Carotinoide beinhaltet (PRASAIN et al. 2005, KHACHIK et al. 1992). Das Ergebnis zeigte eine zufriedenstellende Trennung aller Hauptcarotinoide einschließlich einiger geometrischer Isomere (vgl. Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Trennung der Carotinoide eines humanen Blutplasmas, Aufarbeitung von 1 ml Blutplasma analog den Mikroorganismen (vgl. 2.4.6) jedoch ohne vorherigen Zellaufschluss, Test des 50min-Gradienten der späteren Screeningversuche (vgl. Kapitel 3) von MTBE in MeOH mit 50mM AAC [min-%]: 0-0, 24-62, 27-80, 38-80, 43-0, 50-0, Flow: 1,3 ml/min,  $T_s = 12^\circ\text{C}$ , Abkürzungen alphabetisch: BIL = Bilirubin,  $\beta\text{CAR}$   $\beta$ -Carotin,  $\beta\text{CRY}$   $\beta$ -Cryptoxanthin, iso- $\beta\text{CAR}$  *cis*-Isomer von  $\beta$ -Carotin, iso- $\beta\text{CRY}$  *cis*-Isomer von  $\beta$ -Cryptoxanthin, iso-LUT *cis*-Isomer von Lutein, iso-LYC *cis*-Isomer von Lycopene, LUT Lutein, LYC Lycopene, ZEA Zeaxanthin.

### 2.5.4.3 Einfluss der Säulentemperatur auf die Trennleistung

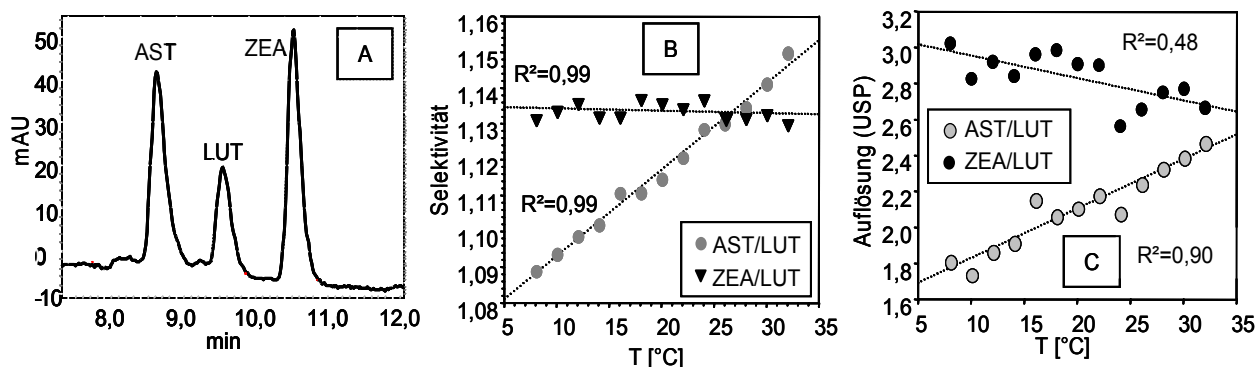
Im Vergleich zur Gaschromatographie besitzt die Temperatur der stationären Phase in der HPLC einen wesentlich geringeren Einfluss auf das Trennergebnis. Dennoch kann insbesondere bei der Verwendung von RP-C<sub>30</sub>-Phasen mit der Variation der Säulentemperatur ein zum Teil erheblicher Gewinn an Trennleistung erzielt werden (CORTEZ et al. 2004, DOLAN 2007). Bei RP-C<sub>30</sub>-Phasen dominiert bei Raumtemperatur die mehr geordnete *trans*-Alkylketten-Konformation der Seitenketten, wohingegen mit höheren Temperaturen die weniger geordnete *gauche*-Alkylketten-Konformation zunimmt (ALBERT et al. 1998, BELL et al. 1997). Bei niedrigeren Temperaturen, wenn der Anteil der *trans*-Konformationen den Anteil der *gauche*-Konformationen übersteigt, zeigt die Phase eine erhöhte Selektivität gegenüber geometrischen Isomeren (ALBERT et al. 1998, BREITENBACH et al. 2001). Höhere Temperaturen bedingen prinzipiell kürzere Retentionszeiten, was sich auf lineare Carotinoide stärker auswirkt, als auf Carotinoide mit zyklischen Endgruppen (BELL et al. 1997). Als Faustregel für die Retentionszeitänderung gilt, dass ein Temperaturanstieg von 1°C die Retentionszeit um etwa 2% vermindert (DOLAN 2007). Mit der Temperatur der stationären Phase ändert sich ebenfalls das pH-Äquivalent (pH-Äq) der mobilen Phase. Deshalb kann die Änderung von 0,1 pH-Einheiten der mobilen Phase auch über eine Temperaturänderung der Säule von einem bis zwei Grad erzielt werden (DOLAN 2007), was in der Praxis mittels Säulenofen relativ einfach durchführbar ist. Die direkte Abänderung des pH-Äq der mobilen Phase mittels Säuren- bzw. Basen-Zusatz



um genau 0,1 pH-Einheiten gestaltet sich demgegenüber oft schwieriger und ist praktisch aufwändig. Weil sich mit der Temperatur der stationären Phase das pH-Äq der mobilen Phase und infolgedessen auch das Dissoziationsverhalten freier Silanolgruppen ändert, kann über die Säulentemperatur gegebenenfalls die Trennung bestimmter Komponenten optimiert werden (DOLAN 2007).

Der Einfluss der Säulentemperatur auf bestimmte Trennprobleme kann zwar anhand der genannten Gesetzmäßigkeiten vorhergesagt werden, das tatsächliche Trennverhalten jeder Säule kann jedoch, in Abhängigkeit von Hersteller und Charge, erheblich abweichen. Aus diesem Grund wurde abschließend zur Optimierung der Parameter der chromatographischen Methode der Einfluss der Temperatur der verwendeten RP-C<sub>30</sub>-Phase auf das Trennergebnis untersucht. Ziel war es, den optimalen Temperaturbereich der Methode für das spätere Screening sowie die Supplementierungsversuche zu ermitteln. Dazu wurde das chromatographische Verhalten einiger ausgewählter Carotinoide einschließlich ihrer *cis*-Isomere sowie das aus den vorangegangenen Untersuchungen bekannte Trennproblem von  $\beta$ APO und CAN in Abhängigkeit von der Säulentemperatur betrachtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Trennung von Carotinoiden über die Säulentemperatur beeinflusst werden kann, dass für komplexe Carotinoidegemische jedoch keine diskrete, optimale Temperatur zur Trennung existiert. Beispielsweise verbessert sich mit steigender Säulentemperatur sowohl die Selektivität als auch die Auflösung von AST und LUT. Die Selektivität für LUT und ZEA hingegen stagniert und die Auflösung beider Xanthophylle nimmt mit steigender Säulentemperatur tendenziell ab (vgl. Abbildungen 28).



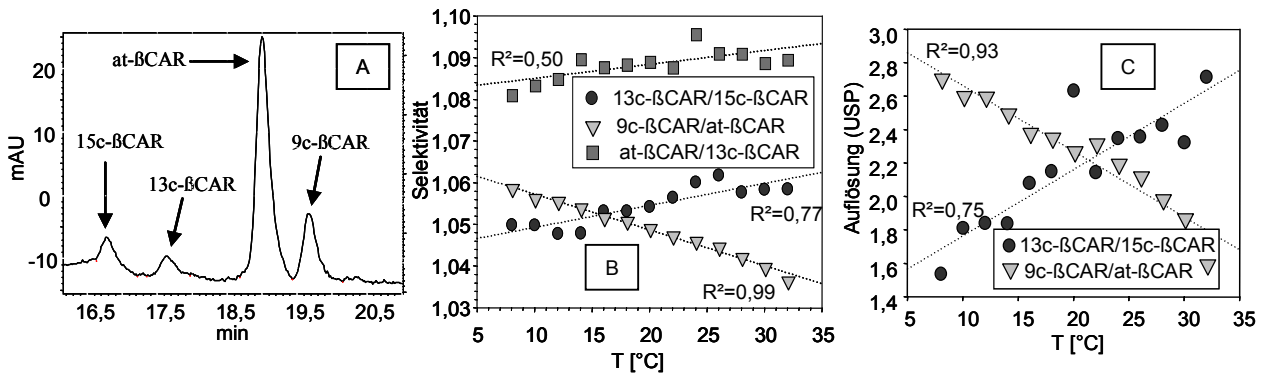
**Abbildung 28-A:** Chromatographisches Trennergebnis eines Standardgemisches bestehend aus AST, LUT und ZEA aus den Versuchen zur Optimierung der Säulentemperatur, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH mit 50 mM AAC [%-min]: 0-0, 24-62, 27-80, 38-80, 43-0, 50-0; Flow: 1,3 ml/min, T<sub>s</sub> = 12°C, Detektion bei 450 nm.

**Abbildung 28-B:** Einfluss der Säulentemperatur auf die Selektivität zwischen AST und LUT sowie zwischen LUT und ZEA, die gepunkteten Linien kennzeichnen den angenommenen Trend zwischen den einzelnen Messpunkten sowie außerhalb des untersuchten Temperaturintervalls, R<sup>2</sup> Bestimmtheitsmaß des linearen Trends, alle weiteren Parameter analog Abbildung 28-A.

**Abbildung 28-C:** Einfluss der Säulentemperatur auf die Auflösung zwischen AST und LUT sowie zwischen LUT und ZEA, alle weiteren Parameter analog Abbildung 28-B.

Es wird angenommen, dass der Einfluss der Temperatur auf das Retentionsverhalten von LUT und ZEA ähnlich - der Einfluss der Temperatur auf die Peaksymmetrie jedoch verschiedenartig ist. Das beobachtete Verhalten hängt vermutlich mit dem Temperatur-Effekt auf den pH der mobilen Phase und die daraus folgende Änderung der Dissoziation freier Silanolgruppen zusammen. Ändert sich mit der Temperatur der stationären Phase nicht nur die Konformation der C<sub>30</sub>-Alkylketten, sondern auch das Dissoziationsverhalten freier Silanol-Gruppen, können Peaksymmetrie und Retentionsverhalten verschiedenartig modifiziert werden. In der Folge können temperaturbedingte Änderungen von Selektivität und Auflösung an nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Phasen, entsprechend der vielfältigen Struktur von Carotinoiden, kongruent oder divergent verlaufen.

Im Gegensatz zu den Xanthophyllen verliefen die Selektivitäten und Auflösungen bei den sauerstofffreien Carotinen kongruent. So zeigten *15cis*- $\beta$ CAR mit *13cis*- $\beta$ CAR bei steigender Säulentemperatur jeweils steigende und *at*- $\beta$ CAR mit *9cis*- $\beta$ CAR jeweils sinkende Selektivitäten und Auflösungen (vgl. Abbildungen 29). Auch für LYC und *cis*-LYC nahm sowohl die Selektivität als auch die Auflösung mit steigender Säulentemperatur ab.



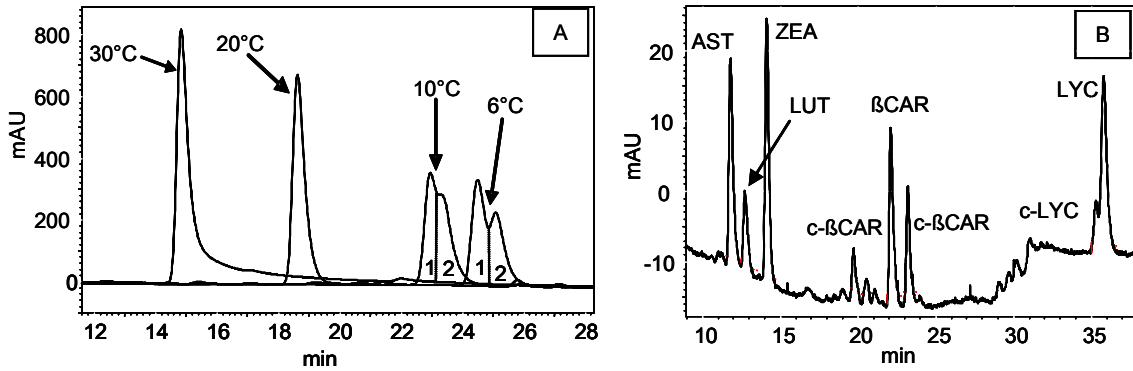
**Abbildung 29-A:** Chromatographisches Trennergebnis von verschiedenen geometrischen  $\beta$ -Carotin-Isomeren aus den Versuchen zur Optimierung der Säulentemperatur (*13c*- entspricht dem *cis*-Isomer der Doppelbindung bei Kohlenstoffatom 13 im Molekül u.s.w.), verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 50 mM AAc [%-min]: 0-0, 24-62, 27-80, 38-80, 43-0, 50-0, Flow: 1,3 ml/min,  $T_s = 12^\circ\text{C}$ .

**Abbildung 29-B:** Einfluss der Säulentemperatur auf die Selektivität zwischen verschiedenen geometrischen  $\beta$ -Carotin-Isomeren, die gepunkteten Linien kennzeichnen den angenommenen Trend zwischen den einzelnen Messpunkten sowie außerhalb des untersuchten Temperaturintervalls,  $R^2$  Bestimmtheitsmaß des linearen Trends, alle weiteren Parameter analog Abbildung 29-A.

**Abbildung 29-C:** Einfluss der Säulentemperatur auf die Auflösung zwischen verschiedenen geometrischen  $\beta$ -Carotin-Isomeren, alle weiteren Parameter analog Abbildung 29-B.

Der kongruente Verlauf von Selektivität und Auflösung bei den sauerstofffreien Carotinen und der zum Teil divergente Verlauf beider Kenngrößen bei den Xanthophyllen ist über die Anwesenheit funktioneller Sauerstoffgruppen im Molekül erklärbar. Sauerstoffhaltige polare Xanthophylle können mit den freien Silanolgruppen wesentlich stärker interagieren, als die apolaren sauerstofffreien Carotine. Infolgedessen wirkt sich eine temperaturbedingte Änderung des pH-Äquivalents und die dadurch bedingte Änderung des Dissoziationsverhaltens freier Silanolgruppen auf das Trennverhalten der Xanthophylle gegenüber den Carotinen wesentlich stärker aus. Das Trennverhalten der Carotine wird bei Variation der Säulentemperatur somit nahezu ausschließlich durch die Konformationsänderung der  $C_{30}$ -Alkylketten bestimmt. Infolgedessen wird die Auflösung und Selektivität für Carotine gleichartig (kongruent) geändert.

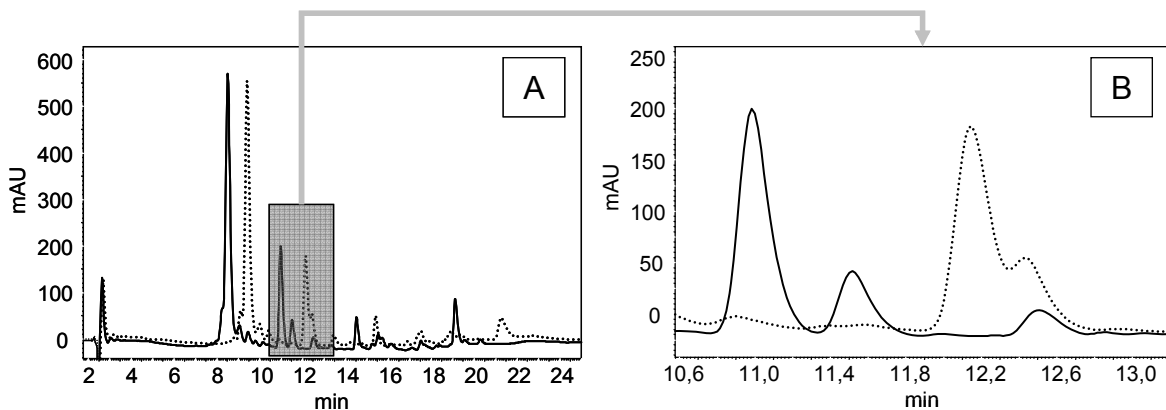
Unter Betrachtung aller vorliegenden Ergebnisse wurde eine Säulentemperatur zwischen  $10^\circ\text{C}$  und  $15^\circ\text{C}$  als optimal befunden. Übereinstimmend dazu zeigten auch die Versuche zur Trennung von  $\beta$ APO und CAN erst bei einer Absenkung der Säulentemperatur auf  $10^\circ\text{C}$  eine Trennung (vgl. Abbildungen 30). Dennoch sind Säulentemperaturen von RP- $C_{30}$ -Phasen unterhalb von  $15^\circ\text{C}$  nicht zwangsläufig für alle Trennprobleme optimal. So konnte beispielsweise bei Extrakten von *Phaffia rhodozyma* im Rahmen der Supplementierungsversuche erst durch die Anhebung der Säulentemperatur von  $10^\circ\text{C}$  auf  $20^\circ\text{C}$  die Trennung der mikrobiellen Carotinoide vom internen Standard ( $\beta$ APO) erzielt werden (vgl. Abbildungen 31).



**Abbildung 30-A:** Chromatogramme zur Optimierung der Trennung von CAN und βAPO durch Variation der Säulentemperatur (Angaben im Diagramm), verwendeter Gradient von MTBE in MeOH mit 50 mM AAC [min-%]: 0-0, 20-20, 26-45, 31-90, 40-90, 44-0, 50-0; Flow: 1,3 ml/min, Ziffer 1 entspricht jeweils CAN und Ziffer 2 entspricht jeweils βAPO.

**Abbildung 30-B:** Im Rahmen der Temperaturoptimierung der Methode erzieltes Trennergebnis eines Carotinoid-Standardgemisches,  $T_s = 15^\circ\text{C}$ , Flow: 1,3 ml/min, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 50 mM AAC [min-%]: 0-0, 20-20, 26-45, 31-90, 39-90, 44-0, 50-0.

Im Vergleich zu anderen chromatographischen Parametern wurde der Säulentemperatur bei der Trennung von Carotinoiden im Rahmen der Methodenoptimierung bisher wenig Beachtung geschenkt (CRAFT et al. 1992a, LESELLIER et al. 1989, LIEW et al. 1982). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Säulentemperatur insbesondere bei RP- $C_{30}$ -Phasen ein durchaus leistungsstarker Parameter zur Anpassung der Selektivität gegenüber Carotinoiden und deren geometrischen Isomeren ist und daher im Rahmen der Methodenentwicklung berücksichtigt werden sollte. Die Säulentemperatur kann neben der Konformationsänderung der  $C_{30}$ -Alkylketten einen erheblichen Einfluss auf die Retention und das pH-Äq von mobiler und stationärer Phase bewirken. In der Folge kann auch das Dissoziationsverhalten ungebundener Silanolgruppen der stationären Phase und das Retentionsverhalten insbesondere von polaren Carotinoiden beeinflusst werden. Um eine gute Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse für Carotinoide an RP- $C_{30}$ -Phasen



**Abbildung 31-A:** Chromatogramme der Trennung des internen Standards (ISTD) βAPO von den Carotinoiden des Extraktes aus *Phaffia rhodozyma*,  $T_s = 10^\circ\text{C}$  (gestrichelte Linie) und  $T_s = 20^\circ\text{C}$  (durchgezogene Linie), Detektion bei 450 nm, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH mit 50 mM AAC [min-%]: 0-0, 13-65, 15-100, 18-100, 23-0, 25-0; Flow: 1,3 ml/min.

**Abbildung 31-B:** Vergrößerung des in Abbildung 31-A gekennzeichneten Chromatogrammabschnittes, die Basislinientrennung des ISTD von den Carotinoiden aus *Phaffia rhodozyma* konnte erst durch eine Erhöhung der Säulentemperatur auf  $20^\circ\text{C}$  erreicht werden.

zu erzielen, sollte daher immer eine Temperaturkontrolle (Säulenofen) erfolgen und eine Puffersubstanz (beispielsweise Ammoniumacetat) als Fließmittel-Additiv verwendet werden. Schließlich kann bei der Trennung von Carotinoiden die Variation der Säulentemperatur dazu dienen, eine durch „Alterung“ der Säule bedingte oder eine durch pH-Verschiebung verursachte Minderung der Auflösung zu korrigieren.

### 2.5.5 Zusammenfassung der etablierten chromatographischen Methode

Mikrobielle Carotinoide zeigen typischerweise charakteristische Absorptionsbanden im nah-UV bis visuellen Bereich (300 bis 500 nm). Alle anderen in mikrobiellen Probenmatrizes vorkommenden Bestandteile absorbieren, bis auf wenige Ausnahmen (z.B. isoprenoide Chinone), nicht bei diesen Wellenlängen (LEE et al. 2008). Unter weiterer Beachtung der geringen Flüchtigkeit und hohen Degradationstendenz von Carotinoiden wurde deshalb die HPLC-DAD-Kopplung als selektive, robuste und vor allem relativ empfindliche Methode zur Trennung und Detektion der Extrakte gewählt. Dabei konnte gezeigt werden, dass RP-C<sub>30</sub>-Trennmateriale im Vergleich zu RP-C<sub>18</sub>-Phasen eine deutlich bessere Trenn-Effizienz gegenüber dem gesamten Carotinoid-Spektrum einschließlich der geometrischen Isomere aufweisen. Die verbesserte Trennbarkeit von Carotinoiden an RP-C<sub>30</sub>-Phasen ergibt sich zum einen aus der gegenüber RP-C<sub>18</sub>-Phasen wesentlich höheren Hydrophobie und der damit verbundenen Zunahme der Wechselwirkungen zwischen Probe und stationärer Phase (SANDER et al. 1994b, KROMIDAS et al. 2006, TCHAPLA et al. 1993). Zum anderen konnte anhand eigener Ergebnisse gezeigt werden, dass neben den hydrophoben Wechselwirkungen speziell auch hydrophile Wechselwirkungen für die Selektivität der Phase gegenüber Carotinoiden eine wesentliche Rolle spielen. Vornehmlich Xanthophylle sowie hydrophil substituierte Carotinoide verfügen über Molekül-Gruppen, die zu polaren Wechselwirkungen in der Lage sind. Gleichwohl kann aber auch die Polarisierbarkeit von isolierten Doppelbindungen (wie z.B. bei  $\beta$ CAR und LYC) polare Interaktionen ermöglichen. Darüber hinaus können sterische Aspekte insbesondere bei der Trennung von apolaren Carotinoiden (Carotinen) einen enormen Einfluss zeigen. Bei *cis-trans*-Isomeren wird durch die sterischen Unterschiede beispielsweise das Diffusionsverhalten der Analyte an der Phasenoberfläche beeinflusst und so die Selektivität erhöht (SANDER et al. 1994a/b, TCHAPLA et al. 1993). Zusammenfassend sind für die hohe Selektivität von nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Phasen gegenüber mikrobiellen Carotinoiden folgende Aspekte wichtig:

- erhöhte Retention (Interaktionen) der Analyte durch die hohe Hydrophobie der Phase,
- polare Wechselwirkungen mit ungebundenen Silanolgruppen an der Phasen-Oberfläche (Wasserstoffbrückenbindungen,  $\pi$ ... $\pi$ -Wechselwirkungen u.w.),
- sterische Charakteristika, d.h. die Differenzierung über die Diffusionsfähigkeit der Analyte in die und in der stationären Phase.

Dabei muss berücksichtigt werden, dass das Endergebnis der Trennung zumeist das Resultat sich überlagernder Mechanismen ist. Um die Selektivität der verwendeten RP-C<sub>30</sub>-Phase optimal auszunutzen, wurde anstelle von Acetonitril Methanol als Fließmittel-Basis gewählt. Insbesondere bei stark hydrophoben Phasen werden Selektivitätsunterschiede zwischen Methanol und Acetonitril wirksam und das protische Methanol zeigt gegenüber dem aprotischen Acetonitril bei gleicher Elutionskraft ein besseres Trennergebnis (KROMIDAS 2006). Allerdings bewirkt Methanol wegen der höheren Viskosität im Vergleich zu Acetonitril häufig eine schlechtere Peakform (KROMIDAS et al. 2006, KHACHIK et al. 1988). Wie mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, lassen sich derartige Probleme (*Peak-Tailing* und/oder Degradationen) wirksam über ein Fließmittel-Additiv minimieren, ohne dass die Methode an Effizienz verliert. Auch die in diesem Zusammenhang aufgezeigte zum Teil enorme Chargen- (*Batch*) und Hersteller-abhängige Variation

störender Phänomene (*Peak-Tailing* und Minderung der Peakflächen-Response) konnte mit Hilfe eines Fließmittel-Additivs wirksam gemindert und infolgedessen die Reproduzierbarkeit der Methode wesentlich verbessert werden. Zudem wird, beispielsweise durch Ammoniumacetat als Fließmittel-Additiv, aus dem ungepufferten ein gepuffertes chromatographisches System. Zum einen ist dies für das Adsorptionsverhalten apolarer Carotinoide wenig bedeutsam. Zum anderen können insbesondere bei mikrobiellen Carotinoiden hoch-polare Vertreter (mit Carboxylgruppen oder mit sauren/basischen Kohlenhydraten/Aminozuckern substituierte Carotinoide) auftreten, die bei Interaktionen mit freien Silanolgruppen irreversibel adsorbiert werden können. Ein gepuffertes System schützt vor solchen irreversiblen Adsorptionen.

Über die zahlreichen Versuche konnte gezeigt werden, dass an dem *Peak-Tailing* und der Degradation von Carotinoiden ursächlich sowohl freie Silanolgruppen als auch auf der Phase gebundene Metallionen beteiligt sind. Demzufolge werden für den tatsächlichen Mechanismus sekundäre, oberflächengebundene Wechselwirkungen von Carotinoiden mit freien Silanolgruppen bzw. Wechselwirkungen mit Silanol-Metallion-Zentren angenommen.

Schlussendlich ermöglichten die entwickelten einfachen, binären Fließmittelgradienten von MTBE in MeOH durch die Anpassung des Gradienten-Profiles und der Fließmittelgeschwindigkeit hinsichtlich der getesteten Carotinoid-Gemische sehr gute Trennergebnisse für mikrobielle Carotinoide bei gleichzeitig guter Praktikabilität. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Säulentemperatur einen erheblichen Einfluss auf das Trennergebnis hat. Im Allgemeinen wird bei RP-Phasen mit einem Absenken der Säulentemperatur der Einfluss der mobilen Phase geringer, wodurch letztendlich die individuellen Eigenschaften der stationären Phasen ausschlaggebend für die Trennung werden (KROMIDAS 2006, TCHAPLA et al. 1993). Bei niedrigen Temperaturen sind die Enthalpiedifferenzen bei der Wechselwirkung der einzelnen Carotinoide mit der stationären Phase größer als bei höheren Temperaturen. Auch die Entropiedifferenzen machen sich bei niedrigen Temperaturen stärker bemerkbar (BELL et al. 1997, TCHAPLA et al. 1993). Somit ist die Differenzierbarkeit (Selektivität) der Phase bei niedrigen Temperaturen höher. Bei einer Herabsetzung der Temperatur nimmt die Kinetik aller Wechselwirkungen und in der Folge die Bodenzahl ab, welche wiederum ein Maß für die Verbreiterung der Substanzonen (schmale oder breite Peaks) ist. Auf Grund von Diffusionsvorgängen werden die Peaks mit einem Absenken der Temperatur zumeist breiter (KROMIDAS 2006). Im Gegensatz dazu konnte anhand der eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass mit sinkender Temperatur der stationären Phase die Selektivität eher positiv beeinflusst wird. Damit wird deutlich, dass bei RP-C<sub>30</sub>-Phasen die Temperatur ein wichtiger Parameter zur Optimierung der Trennung von Carotinoiden ist, der bei der Entwicklung der Methode berücksichtigt werden sollte.

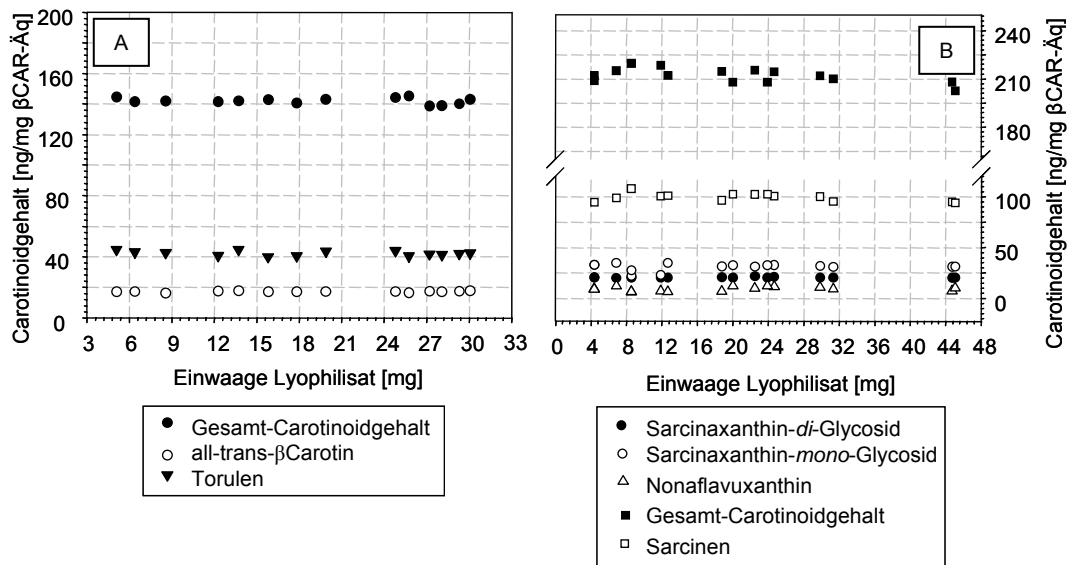
Abschließend lässt sich feststellen, dass im Rahmen der chromatographischen Methodenentwicklung alle bedeutsamen Parameter (Art der stationären Phase, Fließmittelauswahl, Fließmittelgradient, Fließmittelgeschwindigkeit, Fließmittel-Additiv, Temperatur der stationären Phase) untersucht und nach Möglichkeit optimiert wurden.

## 2.6 Leistungsmerkmale der etablierten gesamten Methode

Nachdem die chromatographische Methode im Einzelnen optimiert worden war, sollten die Leistungsmerkmale der gesamten Methode (bestehend aus Aufschluss, Aufarbeitung, chromatographischer Trennung und Quantifizierung) ermittelt und die Methode nach Möglichkeit weiter optimiert werden. An dieser Stelle soll bemerkt werden, dass es für Methoden zur Bestimmung mikrobieller Carotinoide in der Literatur bislang keine entsprechenden Daten, wie beispielsweise zum Linearitätsbereich, zur Präzision oder zur Wiederfindungsrate gibt.

### 2.6.1 Linearitätsbereich und Präzision

Für die Bestimmung des Linearitätsbereiches und der Präzision wurden steigende Einwaagen von *Micrococcus luteus*- und *Rhodotorula glutinis*-Lyophilisat aufgeschlossen, mit internem Standard ( $\beta$ APO) dotiert und vermessen (vgl. Anhang Abbildung 58). Der jeweils ermittelte Gesamtgehalt sowie der Gehalt einzelner Hauptcarotinoide (> 15 % vom Gesamtgehalt) wurde im Anschluss über der zugehörigen Einwaage graphisch dargestellt (sog. Linearitätsplot). Ziel war es denjenigen Bereich zu finden, wo die ermittelten Gehalte konstant und unabhängig von der Einwaage sind.



**Abbildung 32-A:** Linearitätsplot für *Rhodotorula glutinis*, Darstellung der ermittelten Carotinoidgehalte über der jeweiligen Einwaage an Zell-Lyophilisat,  $\beta$ CAR-Äq  $\beta$ -Carotin-Äquivalent vgl. 7.2.1.3 .

**Abbildung 32-B:** Linearitätsplot für *Micrococcus luteus*, alle weiteren Parameter analog Abbildung 32-A.

Anhand der Diagramme wurde der lineare Bereich für Hefen zwischen 10 mg und 34 mg Lyophilisat-Einwaage und für Bakterien zwischen 10 mg und 50 mg Lyophilisat-Einwaage festgelegt. Innerhalb dieses Bereiches zeigte die Methode im Gesamt-Carotinoidgehalt und bei einzelnen Hauptcarotinoiden mit einem Variationskoeffizienten von kleiner 3,8 % eine sehr gute Präzision sowohl für *Rhodotorula glutinis* als auch für *Micrococcus luteus*.

Oberhalb des linearen Bereiches werden für eine vollständige Gewinnung der Carotinoide (farbloses Residuum) zu viele Wiederholungen der Extraktion mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  notwendig (vgl. Abbildung 11), so dass die Methode unpraktikabel wird. Des Weiteren steigt auf Grund der zunehmenden Extraktions-

Wiederholungen das Extraktvolumen, wodurch sich die Eindampfzeit und der Stickstoffverbrauch erhöhen. Nicht zuletzt zeigen die stark konzentrierten Extrakte eine sehr hohe Viskosität, was zu Druckerhöhungen und zum Verstopfen der HPLC-Anlage führen kann und insbesondere bei *R. glutinis* beobachtet wurde. Unterhalb von 10 mg an Einwaage sinkt die Präzision der Methode aufgrund des beim Einwiegen an lyophilisierten Zellmaterials steigenden Wägefehlers.

Im Allgemeinen sind sowohl der erreichte Linearitätsbereich als auch die erzielte Präzision der Methode für die Untersuchungen mikrobieller Carotinoide als gut zu beurteilen.

### **2.6.2 Wiederfindungsrate der Extraktion**

Wird bedingt durch Einflüsse der aufgeschlossenen Zellmatrix ein gewisser Anteil an Analyten im Zellpellet zurückgehalten, zieht das einen systematischen Fehler nach sich. Insofern es sich hierbei um einen konstanten Anteil handelt, unterliegen die erzielten Messwerte dabei keiner Streuung. Dennoch weichen sie von der tatsächlich enthaltenen Menge an Carotinoiden um einen bestimmten Faktor ab. Dieser Faktor ist in der Regel kleiner eins und wird häufig als Prozent an Wiederfindung bezeichnet.

Um alle Carotinoide des jeweiligen Mikroorganismus wiederfinden zu können, müsste gewährleistet sein, dass nach der Extraktion im Zellpellet keinerlei Rückstände an Carotinoiden mehr verbleiben. Dabei ist die erzielte Entfärbung des Zellpellets, nach erfolgter Extraktion nur ein Indiz für eine vollständige Extraktion. Hierbei können durchaus nicht sichtbare Anteile an Carotinoiden durch Adsorption und/oder chemische Bindung zurückgehalten werden. Insbesondere Xanthophylle, die trotz Zellaufschluss chemisch fest an Zellmatrix-Bestandteile gebunden sind, können mit einem lipophilen Lösungsmittel nur schwer extrahiert werden und dadurch „verloren“ gehen. Damit ist die Wiederfindung bezüglich der gesamten Methode (einschließlich Zellaufschluss) praktisch nicht genau ermittelbar. Auch die näherungsweise Bestimmung der Wiederfindung über die direkte Dotierung des Lyophilisates mit einem Standard, bereitete in den Vorversuchen erhebliche Schwierigkeiten. Der Standard ließ sich nicht homogen im Lyophilisat verteilen und adsorbierte zum großen Teil irreversibel an der Wand des Reaktionsgefäßes. Des Weiteren behinderte das zum Lösen des Standards verwendeten Ethanol nachweislich die Effizienz des enzymatischen Aufschlusses. Sowohl bei *Micrococcus luteus* als auch bei *Rhodotorula glutinis* sank dabei deutlich die extrahierbare Menge an Carotinoiden. Aus den genannten Gründen konnte die Wiederfindung der Methode erst nach Abschluss des Aufschlusses im wässrigen Milieu (mit Beginn der Extraktion einschließlich der DMSO Behandlung bei Hefen) bestimmt werden. Da sich sowohl die Matrices als auch die Linearitätsbereiche bei Bakterien und Hefen deutlich unterscheiden, wurde die Wiederfindung für beide Mikroorganismen getrennt bestimmt. Um eine mögliche irreversible Adsorption von Carotinoiden an die aufgeschlossene Zellmatrix zu erkennen bzw. zu berücksichtigen, wurde die Wiederfindung jeweils über den gesamten entsprechenden Linearitätsbereich der Methode (unterschiedliche Einwaagen an Lyophilisat, vgl. 2.6.1) bestimmt. Für *Micrococcus luteus* ergab sich eine Wiederfindung von  $85,5 \% \pm 3,12 \%$  (95 % Konfidenzintervall von dotiertem  $\beta$ AP0) und für *Rhodotorula glutinis* eine Wiederfindung von  $87,1 \% \pm 2,56 \%$  (95 % Konfidenzintervall von dotiertem  $\beta$ AP0). Die gegenüber *R. glutinis* signifikant geringere Wiederfindung bei *M. luteus* ( $P=0,014$ ; t-Test) kann zum einen aus der unterschiedlichen Matrix beider Mikroorganismen, zum anderen aber auch aus der bei Hefen zusätzlichen DMSO-Extraktion (Aufschluss) resultieren. Infolgedessen wird möglicherweise von der gram-positiven Mureid-Matrix mehr

Carotinoid zurückgehalten, als von der Glucan-Matrix der Hefe. Analog dazu lässt sich auch die größere Streuung der Wiederfindung bei *M. luteus* erklären, die allerdings auch durch den weiteren Linearitätsbereich (höhere Einwaagen an Lyophilisat) zustande kommen kann.

Prinzipiell ist bei der Beurteilung der Werte zu beachten, dass die Methode zwischen *cis*- und *trans*-Isomeren unterscheidet (Auftrennung der Isomere auf der Säule). Das bedeutet, dass sich die ermittelte Wiederfindung speziell auf das *all-trans*-Isomer von  $\beta$ APO bezieht und somit die Methode auch den Verlust auf Grund von *cis-trans*-Isomerisierungen berücksichtigt. Das bedeutet aber ebenso, dass 15 % Verlust an Carotinoiden nicht nur allein durch Degradationsprozesse, sondern auch durch Isomerisierungen zustande kommen. In der Literatur lassen sich bislang nur für pflanzliche Matrices und Blutplasmen Wiederfindungsraten von Carotinoiden finden, wobei jedoch nur selten angegeben ist, ob bei der Ermittlung der Wiederfindung *cis-trans*-Isomerisierung mit berücksichtigt wurden (INBARAJ et al. 2008 u. 2006, NAKAGAWA et al. 2008).

Im Allgemeinen ist die erzielte Wiederfindung für die Methode als gut zu beurteilen, wobei die ermittelten Wiederfindungsraten vergleichbar mit Methoden zur Bestimmung von Carotinoiden aus Blutplasma und aus pflanzlichen Materialien sind (MÜLLER et al. 1999, NAKAGAWA et al. 2008, DIAS et al. 2009, RAJENDRAN et al. 2005, HART et al. 1995).

### 2.6.3 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind wichtige Parameter der Leistungsfähigkeit der vorliegenden Methode. Sie geben Aufschluss über die Menge an Carotinoid, die in einem Mikroorganismus enthalten sein muss, um qualitativ nachweisbar bzw. quantitativ bestimmbar zu sein. Beide Kenngrößen wurden über die Methode des Kalibriergeradenverfahrens ermittelt (vgl. 7.2.1.6). Voraussetzungen des Verfahrens sind, dass die verwendeten Kalibrierproben unabhängig und normalverteilt sind. Weiterhin muss die ermittelte Regressionsgerade den Linearitätskriterien genügen. Alle geforderten Kriterien konnten erfüllt werden. Der Gehalt jeder einzelnen Kalibrationslösung wurde kurz vor ihrer Messung separat bestimmt. Die Nachweisgrenze und die Bestimmungsgrenze wurden einzig für *at*- $\beta$ CAR bestimmt, da auch die Quantifizierung als  $\beta$ -Carotin-Äquivalent ( $\beta$ CAR-Äq) vorgenommen wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Methode auch noch Mengen an Carotinoid bestimmen kann, die allein mit dem Auge an Hand einer Zellfärbung nicht mehr eindeutig erkennbar sind (visuell falsch negative Ergebnisse, vgl. Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Nachweisgrenze (NWG) und Bestimmungsgrenze (BSG) der optimierten Methode, <sup>1</sup>Die Werte wurden berechnet für ein Injektionsvolumen von 50 $\mu$ L. <sup>2</sup>Die Werte wurden berechnet für die Aufarbeitung einer Mindestmenge von 10 mg an Zell-Lyophilisat (wie beispielsweise bei schwer kultivierbaren Mikroorganismen mit geringer Biomasseausbeute bei der Aufzucht) und unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Wiederfindung (vgl. 2.6.2).

at- $\beta$ CAR		NWG	BSG
absolute Wiederfindung	absolute Menge auf der Säule	1 ng	3ng
relative Wiederfindung	Konzentration in der Injektionslösung <sup>1</sup>	20 ng/mL	60 ng/mL
	im Lyophilisat <sup>1,2</sup> der Mikroorganismen	0,73 $\mu$ g/g	2,2 $\mu$ g/g



## 2.7 Zusammenfassende Diskussion der etablierten Methode zur Gewinnung und Bestimmung von mikrobiellen Carotinoiden

Die wenigen bislang bestehenden Methoden zur Bestimmung von Carotinoiden aus Bakterien und Hefen sind oft nur qualitativer Art und ermöglichen auf Grund des zumeist erheblichen apparativen Aufwandes beim Zellaufschluss einen nur geringen Probendurchsatz. Außerdem sind die vorhandenen Verfahren methodisch zum Teil veraltet und nicht für gram-positive und gram-negative Bakterien sowie für Hefen gleich gut geeignet. Überdies kann die Leistungsfähigkeit der bislang beschriebenen Methoden nur schwer beurteilt werden, da die Literatur weder Angaben zur Präzision noch zur Wiederfindung und Robustheit aufweist. Aus den genannten Gründen waren die bereits existierenden Methoden für die im Rahmen dieser Arbeit geplanten Untersuchungen nicht geeignet.

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war demzufolge die Entwicklung, Optimierung und Etablierung einer einheitlichen Methode zur Gewinnung und Bestimmung von Carotinoiden aus Bakterien und Hefen. Dabei wurde bei der Entwicklung des Zellaufschlussverfahrens auf einzelne, vom Prinzip her verschiedene Verfahren (enzymatisch, mechanisch, chemisch) zurückgegriffen und diese zweckmäßig miteinander kombiniert. Dadurch konnten nachfolgend unterschiedlichste mikrobielle Carotinoide aus gram-positiven und gram-negativen Bakterien aber auch aus Hefe- bzw. Pilz-Zellen extrahiert werden. Das extrahierbare Spektrum schließt sowohl die sauerstofffreien Carotine als auch polare Xanthophylle und substituierte Carotinoide sowie weitere lipophile Stoffe, wie beispielsweise isoprenoide Chinone, mit ein. Letztendlich stellt das etablierte Aufschluss-Verfahren dadurch eine effektive Methode zur Gewinnung von Carotinoiden aus einem breiten Spektrum von Mikroorganismen dar („mikrobielle Robustheit“).

In der gesamten Entwicklungs- und Optimierungsphase wurden bewusst schwierige Bedingungen (schwer aufschließbare Mikroorganismen, variable Substanzmengen) sowie die bei der Methodenentwicklung auftretenden Probleme (adsorbtive Verluste, schwer trennbare Substanzen, *Peak-Tailing*) ausgewählt und zweckgerichtet untersucht. Alle auftretenden Probleme konnten nahezu vollständig behoben und das Verfahren an vielen Stellen optimiert werden. Neben dem Aufschlussverfahren wurde auch die Zusammensetzung des Extraktionsmittels verbessert und das Phasentrennungsmittel sowie ein geeignetes Gefäßmaterial ausgewählt. Des Weiteren konnte über ein Fließmittel-Additiv und über die Absenkung der Säulentemperatur das Trennergebnis und die Empfindlichkeit der chromatographischen Methode erheblich gesteigert werden. Abschließend wurden für die etablierte Methode für Bakterien- und Hefe-Matrizes konkrete Leistungsparameter bestimmt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse ergaben eine sehr zufriedenstellende Wiederfindung und Präzision der Methode, wobei sich in der bisherigen Literatur speziell für Bakterien und Hefen keine vergleichbaren Daten finden ließen. Schlussendlich konnte durch die beschriebene Vorgehensweise eine relativ robuste Gesamtmethode entwickelt werden.

Mit Hilfe der etablierten Methode können strukturell unbekannte, auf Grund gleicher Retention und UV-VIS-Spektren mutmaßlich jedoch ähnliche Carotinoide, in ihrem Gehalt über die Quantifizierung als  $\beta$ CAR-Äq verglichen und so ein Gesamt-Carotinoidgehalt berechnet werden. Dabei können auf Grund der relativ niedrigen Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze der Methode auch noch Gehalte an mikrobiellen Carotinoiden bestimmt werden, die allein durch Betrachtung einer Plattenkultur mit dem Auge nicht mehr feststellbar sind (visuell falsch negative Ergebnisse). An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass der als  $\beta$ CAR-Äq ermittelte Gehalt von strukturell unbekanntem Carotinoiden nur eine Näherung darstellt, da

sich die molaren Absorptionskoeffizienten verschiedener Carotinoide zum Teil erheblich unterscheiden können (BRITTON 2004, 1995 u. 1993, CRAFT 1992b). Dennoch ist die Quantifizierung über ein  $\beta$ CAR-Äq eine äußerst zweckmäßige Methode, um unbekannte Carotinoide zu quantifizieren und strukturell gleiche oder ähnliche Carotinoide in ihrer Quantität überhaupt vergleichen zu können.

Analog zu den bisherigen Methoden der Literatur zeigte sich auch bei der etablierten Gesamtmethode, dass das Verfahren zum Zellaufschluss der zeitaufwendigste Schritt und somit für den Probendurchsatz die einflussreichste Größe ist. Prinzipiell ist der erreichbare Probendurchsatz einerseits vom Zeitaufwand der Methode selbst (Anzahl aufeinanderfolgender Proben pro Zeit), andererseits aber auch von der Serientauglichkeit der Methode (der Anzahl an parallel bearbeitbaren Proben) abhängig. Letzteres ist im Gegensatz zum Zeitaufwand des jeweiligen Verfahrens meist leichter optimierbar. So konnte durch die Kombination der gewählten, apparativ wenig aufwändigen Zellaufschlussverfahren neben der „mikrobiellen Robustheit“ auch der Probendurchsatz der etablierten Methode (durch die Möglichkeit der parallelen Aufarbeitung vieler Einzelproben/Serien) enorm gesteigert werden.

Des Weiteren wurde die Methode speziell für den analytischen Halbmikro-Maßstab entwickelt. Dadurch wurde erreicht, dass für eine Einzelbestimmung (je nach Carotinoidgehalt der untersuchten Mikroorganismen) eine Anzucht auf nur ein bis drei einzelnen Platten notwendig ist. Letztendlich werden dadurch leicht „echte“ Mehrfachbestimmungen ermöglicht, wodurch die quantitativen Aussagen repräsentativ und robuster werden. Das breite Extraktionsspektrum der entwickelten Methode sowie der hohe Probendurchsatz und die nur geringe, notwendige Probenmenge stellen einen erheblichen Vorteil gegenüber vielen anderen Verfahren zur analytischen Bestimmung mikrobieller Carotinoide dar. Letzten Endes erweitern diese Eigenschaften enorm das Anwendungsspektrum der Methode.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und etablierte Verfahren beinhaltet eine genaue und effiziente analytische Methode zur Gewinnung, Trennung und Quantifizierung mikrobieller Carotinoide. Das Procedere wurde dabei vornehmlich für Carotinoide aus Bakterien und Hefen entwickelt und wichtige Schritte wie Zellaufschluss, Extraktion und Trennung der gewonnenen Carotinoide anhand geeigneter Versuche optimiert. Die Methode kann sowohl zum Screening auf mikrobielle Carotinoide als auch zum Prüfen und Optimieren biotechnologischer Verfahren sowie zur biotechnologischen Prozess-Kontrolle bei der Gewinnung von Carotinoiden mit Hilfe von Mikroorganismen verwendet werden.

### 3. Anwendung der Methode (I) - Screening ausgewählter Bakterien und Hefen auf Carotinoide

In Pflanzen aber auch in Mikroorganismen werden Carotinoide als Metabolite des Sekundärstoffwechsels generiert. Die Isolation und die Analytik von Sekundär-Stoffwechselprodukten ist im Vergleich zur chemischen Totalsynthese ein relativ preisgünstiges Verfahren zum Auffinden neuartiger Substanzen und neuer Leitstrukturen (FIRN et al. 2000). Die Fähigkeit zur Biosynthese von Carotinoiden ist für viele Mikroorganismen bereits bekannt und einige Substanzen sind bereits strukturell identifiziert worden (BRITTON 2004). Das prokaryontische Reich (einschließlich der *Archae*) ist aber so groß und die strukturelle Diversität mikrobieller Carotinoide so beachtlich, dass ihr Vorkommen und ihre genaue Struktur für viele Arten bisher nur ansatzweise erforscht werden konnten (FONG et al. 2001). Dabei basieren viele der bislang verfügbaren Ergebnisse auf Untersuchungen aus älteren Arbeiten. Auf Grund dessen fehlt es, insbesondere für das Spektrum der Minor-Carotinoide, vielfach noch an aktuellen Ergebnissen, die auf den derzeitigen leistungsstarken analytischen Verfahren basieren.

Vor diesem Hintergrund wurden, nachdem die Methode entwickelt und abschließend optimiert worden war (vgl. Kapitel 2), eine Reihe von Bakterien, Hefen und zwei Pilz-Arten mit einem hefeähnlichen Stadium ausgewählt und auf Carotinoide untersucht. Zum einen sollte dadurch die Effizienz der Methode an verschiedenen Mikroorganismen getestet werden. Zum anderen sollten die Ergebnisse des Screenings einen Überblick über die Qualität und Quantität der Carotinoide in den ausgewählten Mikroorganismen geben. Dabei sollten die erhaltenen UV-VIS-Spektren zunächst nur zum Erkennen von Carotinoiden und der Unterscheidung zwischen Carotinoiden und anderen lipophilen Substanzen dienen, die ebenfalls im Bereich von 450 nm absorbieren. Darüber hinaus sollten mit Hilfe der Ergebnisse des Screenings geeignete Mikroorganismen für die Supplementierungsversuche (vgl. Kapitel 4) ausgewählt werden. Schlussendlich sollten die UV-VIS-Spektren und das Retentionsverhalten der im Screening erkannten Substanzen die geplante massenspektrometrische Identifizierung von mikrobiellen Carotinoiden als Biomarker (vgl. Kapitel 5) unterstützen.

Die Auswahl der Mikroorganismen zum Screening richtete sich in erster Linie nach der makroskopisch erkennbaren Eigenfärbung der Kolonien von zuvor auf der Platte angezüchteten verschiedenen Bakterien und Hefen. Dabei wurden auch bekannte, biotechnologisch nutzbare Mikroorganismen (Carotinoid-Produzenten) und medizinisch bedeutsame Mikroorganismen (fakultative Pathogene) ausgewählt. Außerdem wurden solche Mikroorganismen ausgesucht, für die bislang noch keine oder nur sehr wenige Ergebnisse zum Carotinoid-Spektrum und Carotinoidgehalt existieren.

#### 3.1 Für das Screening ausgewählte Hefen und Pilze

Insgesamt wurden für das erste Screening zwölf Hefen und zwei Pilz-Stämme ausgesucht und auf Platten angezüchtet. Einen Überblick über die Färbung der Kolonien und der erhaltenen Extrakte geben die Abbildungen 55 bis 60 (vgl. Anhang 9.2). Für viele der getesteten Hefen bzw. Pilze fehlt es noch an detaillierten Daten und an Untersuchungen zur Bestätigung der bisher nachgewiesenen Carotinoide (vgl. Tabelle 5). Bei den Hefen *Phaffia rhodozyma* und den *Rhodotorula spp.* handelt es sich um vergleichsweise gut untersuchte Carotinoid-produzierende Gattungen. Beide gelten toxikologisch als unbedenklich und

können daher als farbgebende Supplemente in Futtermitteln verwendet werden (MOCANU et al. 1997, NAIDU et al. 1999, KREISEL et al. 2005, ONODERA et al. 1997). Relativ gut untersucht ist auch das Carotinoid-Spektrum der Gattung *Sporobolomyces* (WEBER et al. 2007, BUZZINI et al. 2007, DAVOLI et al. 2007). Dennoch fehlt es speziell für die Art *Sporobolomyces salmonicolor* noch an detaillierten Daten zum Carotinoid-Spektrum und Carotinoidgehalt. Die Eignung der Gattung *Sporobolomyces* für biotechnologische Zwecke wird, wegen des gegenüber der Gattung *Rhodotorula* zwar ähnlichem Carotinoid-Spektrums aber deutlich geringeren Carotinoidgehaltes, kontrovers diskutiert (RAZANI et al. 2007, DAVOLI et al. 2004 u. 2007, BHOSALE et al. 2004).

**Tabelle 5:** Übersicht über die für das Screening ausgewählten Hefen und Pilz-Arten sowie die in ihnen oder verwandten Arten bislang nachgewiesenen Carotinoide, \*nur nachweisbar wenn auf Xylose-Medium und in Dunkelheit angezüchtet, Abkürzungen alphabetisch: AST Astaxanthin, CAR Carotin, CAN Canthaxanthin, ECH Echinenon, k.A. keine Angaben, LYC Lycopene, OH Hydroxy, syn. synonym, THI Torularhodin, TRE Torulen, u.w. CAR und weitere Carotinoide, [+] gesicherte Identität via Massenspektrometrie und/oder NMR-Spektrometrie; [-] in der Literatur angegebene bisher nur vorläufige Identität über UV-VIS-Spektroskopie und/oder dem Retentionsverhalten bei DC/HPLC.

ausgewählte Art der vorliegenden Arbeit (alphabetisch)	Koloniefarbe auf der Platte	bisher nachgewiesene Carotinoide der Art	bislang nachgewiesene Carotinoide bei verwandten Arten	Literatur
<i>Acremonium butyrii</i>	orange - rötlich	k.A.	<i>A. diospyri</i> : βCAR [-], γCAR [-], LYC [-], TRE [-], u.w. CAR [-]	DEED 1990
<i>Bullera variabilis</i>	orange - rotbraun	k.A.	<i>Bulleromyces albus</i> : βCAR [-], γCAR [-], TRE [-]	FIASSON 1972
<i>Candida intermedia</i>	rosa - violett	k.A.	k.A.	KURTZMAN 1999
<i>Exophiala dermatitidis</i> (syn. <i>Wangiella dermatitidis</i> )	schwarz	TRE [-] THI [-]	k.A.	GEIS 1984 SCHNITZLER 1999
<i>Filobasidium floriformae</i>	beige, leicht rötlich	k.A.	k.A.	KURTZMAN 1999
<i>Lecytophora hoffmannii</i> ( <i>Phialophora hoffmannii</i> )	blasrosa - glebbraun	k.A.	k.A.	SAMSON 2000
<i>Phaffia rhodozyma</i> ( <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> )	lachsfarben - orange	(3R,3'R) AST [+]; βCAR [+]; 3-OH-3',4'-dihydro β,Ψ caroten-4-one [-]* ; 3-OH-ECH [-]; CAN [-] Rhodoxanthin [-], Adonirubin [-], Neurosporen [-], ECH [-] u.w. CAR [-]		ANDREWS 1976, LAMPILA 1985, VÁZQUEZ 1998, An 1989, ANDREWS 1976, WEBER 2007, BUZZINI 2007
<i>Rhodotorula</i> spp. ( <i>glutinis</i> , <i>graminis</i> , <i>mucilaginoso</i> )	orange - rot		βCAR [+]; γCAR [+]; TRE [+], THI [+], u.w. CAR [-]	NAM 1988, WEBER 2007, BUZZINI 2007
<i>Sporobolomyces</i> spp. ( <i>salmonicolor</i> )	lachsfarben - rosa	k.A.	<i>Sporobolomyces</i> spp: βCAR [+], TRE [+], THI [+], 2-OH-THI [+], 2-Methyl-OH-THI [+], 2-OH-TRE [+], u.w. CAR [-]	DAVOLI 2002, WEBER 2007, BUZZINI 2007
<i>Trichosporon ovoides</i>	beige	k.A.	k.A.	KURTZMAN 1999

Für die schwarze Hefe *Exophiala dermatitidis* (syn. *Wangiella dermatitidis*) wird neben der Fähigkeit zur Bildung von Melaninen auch die Synthese von zwei Carotinoiden (Torulen und Torularhodin) postuliert (GEIS et al. 1984). Eine Überprüfung dieser Befunde erfolgte bislang jedoch nicht. *Exophiala dermatitidis* kann insbesondere bei immungeschwächten Patienten und solchen mit bösartigen Tumoren lebensbedrohliche Phaeohyphomycosen verursachen und führt bei Patienten mit zystischer Fibrose häufig zu einer subklinischen Besiedelung der Lunge (AJANEE et al. 1996, BENETT et al. 1997, HAASE et al. 1991,

KUSENBACH et al. 1992, MATSUMUTO et al. 1993). Dabei werden sowohl Melanine als auch Carotinoide als Pathogenitätsfaktoren in Erwägung gezogen. Darüber hinaus wird den Carotinoiden eine protektive Funktion sensitiver Moleküle und/oder Organellen der Hefezelle vor schädlichen UV-Strahlen zugeschrieben (SCHNITZLER et al. 1999). Ähnlich *Exophiala dermatitidis* kann auch *Lecytophora hoffmannii* in seltenen Fällen schwere opportunistische Infektionen verursachen, jedoch ausschließlich bei immungeschwächten Patienten (MARRIOTT et al. 1997). Untersuchungen zum Carotinoid-Spektrum des Pilzes existieren bislang nicht.

Die Gattung *Acremonium* (*syn. Cephalosporium*) ist besonders wegen ihrer Fähigkeit zur Produktion von Antibiotika für biotechnologische Zwecke relevant (SINGLETON et al. 2001). Hinsichtlich des Carotinoid-Spektrums existieren für *Acremonium spp.* sowie für die Gattung *Bullera* bisher nur sehr wenige und nicht verifizierte Befunde (DEED et al. 1990). Für die Gattungen *Candida*, *Filobasidium* und *Trichosporon* können in der Literatur keinerlei Hinweise zur Fähigkeit der Produktion von Carotinoiden gefunden werden.

Mit Hilfe des Screenings sollte die entwickelte Methode an verschiedenen Hefe- und Pilz-Matrizes dahingehend getestet und untersucht werden, ob die makroskopisch erkennbare Farbigkeit der Kolonien der ausgewählten Arten durch Carotinoide verursacht wird. Untergeordnet dazu sollte herausgefunden werden, in wie weit auch visuell nicht-farbige isoprenoide Vorstufen und/oder andere lipophile Substanzen mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methode aus Hefen und Pilzen bestimmt werden können.

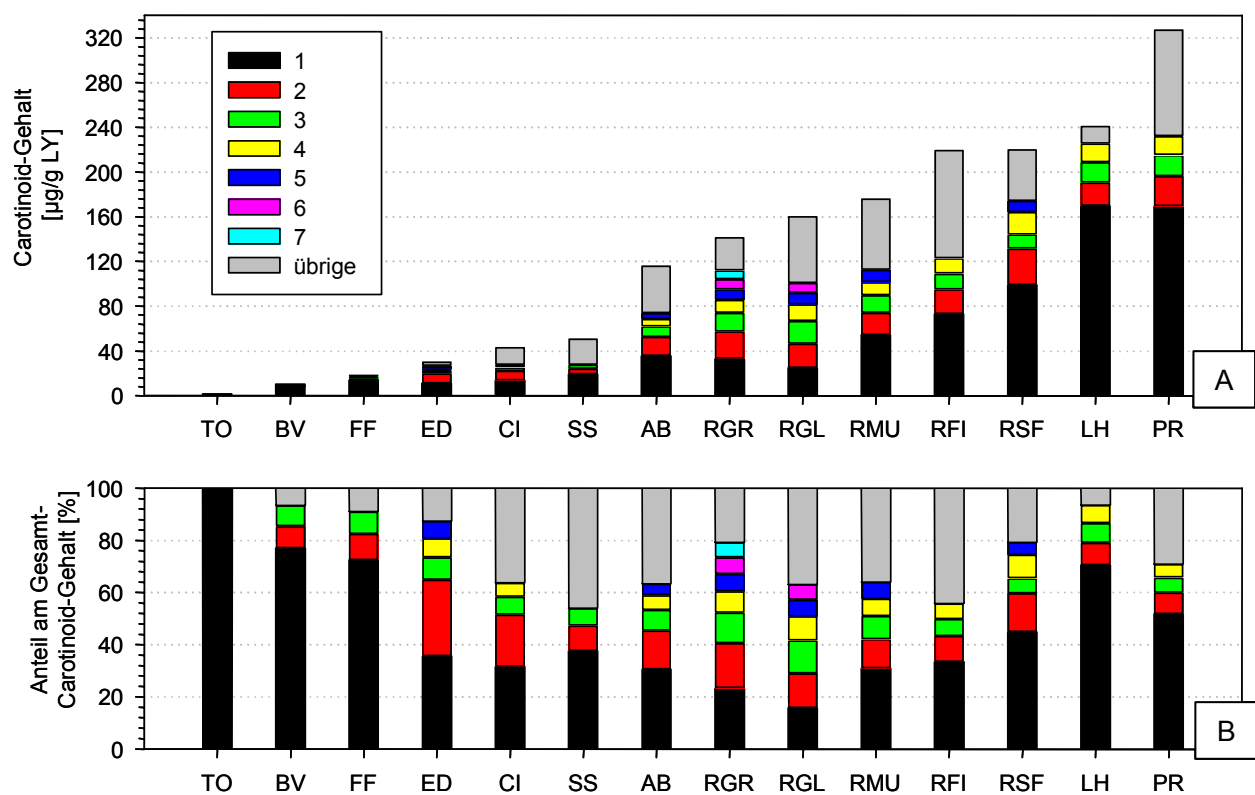
### 3.2 Ergebnisse des Screenings der Hefen und Pilze

Die Auswertung der UV-VIS-Spektren (DAD-Daten) des Screenings zeigte, dass die entwickelte Methode, wie vermutet, neben Carotinoiden auch andere lipophile Verbindungen aus Mikroorganismen erfasst. Den Absorptionsspektren nach handelt es sich hierbei offenbar um Chinoide und isoprenoide Vorstufen von Carotinoiden, wie beispielsweise Phytoen (vgl. Abbildung 34, LEE et al. 2008, AONO et al. 1991, TYIAK et al. 1964). Bis auf wenige Ausnahmen zeigten bei den Hefen die meisten der detektierten nicht-Carotinoide oberhalb von 400 nm keine nennenswerte Absorption mehr, weshalb ihr Anteil bei der Bestimmung des Gesamtgehaltes an Carotinoiden (bei 450 nm) im Allgemeinen nicht berücksichtigt wurde. Für *Trichosporon ovoides* ist der zu 1,7 µg/g [LY] bestimmte Gehalt jedoch nicht eindeutig auf Carotinoide zurückzuführen, da das Spektrum an dieser Stelle stark von einem nicht-Carotinoid mit geringer Absorption bei 450 nm überlagert wurde. Die Ergebnisse der Verteilungsmuster der detektierten Carotinoide (Chromatogramme bei 450 nm) und nicht-Carotinoide (Chromatogramme bei  $\geq 290$  nm) sowie charakteristische UV-VIS-Spektren können dem Anhang entnommen werden (vgl. 9.3). An Hand dieser UV-VIS-Spektren und des Retentionsverhaltens im Vergleich zu Standardsubstanzen sowie unter Einbeziehung der Ergebnisse aus bisherigen Arbeiten konnten im Screening der Hefen folgende bereits bekannte Carotinoide mit Sicherheit identifiziert werden:

- in *Phaffia rhodozyma* *at*-AST und *at*- $\beta$ CAR sowie deren *cis*-Isomere,
- in *Rhodotorula spp.* *at*- $\beta$ CAR und *c*- $\beta$ CAR,
- in *Sporobolomyces salmonicolor* *at*- $\beta$ CAR.

Viele der Carotinoide für die keine Vergleichs- bzw. Standardsubstanzen zur Verfügung standen, konnten später über ihre Massenspektren in Kombination mit den Ergebnissen der Vergleiche der UV-VIS-Spektren aus dem Screening mit entsprechenden Literatur-Spektren identifiziert werden (vgl. Kapitel 5).

Im Ergebnis wiesen die untersuchten Hefen und Pilze Gesamt-Carotinoidgehalte (berechnet als  $\beta$ CAR-Äq) von  $<2 \mu\text{g/g}$  [LY] bis  $>320 \mu\text{g/g}$  [LY] auf. Den höchsten Carotinoidgehalt pro Zelltrockenmasse zeigte *Phaffia rhodozyma* mit  $327 \mu\text{g/g}$  [LY] gefolgt von den *Rhodotorula spp.* mit bis zu  $241 \mu\text{g/g}$  [LY] (vgl. Abbildung 33-A). Die für beide Gattungen ermittelten Gehalte entsprechen damit den bisherigen Literaturangaben (BUZZINI et al. 2007, BHOSALE et al. 2001a, FRENGOVA et al. 1994, AN et al. 1989, KURTZMAN et al. 1999, ANDREWS et al. 1976). Das zeigt, dass die Leistungsfähigkeit der mit dieser Arbeit etablierten Methode für Hefen äquivalent zu anderen, zum Teil aufwändigeren Methoden mit mechanischen Aufschlussverfahren, ist.

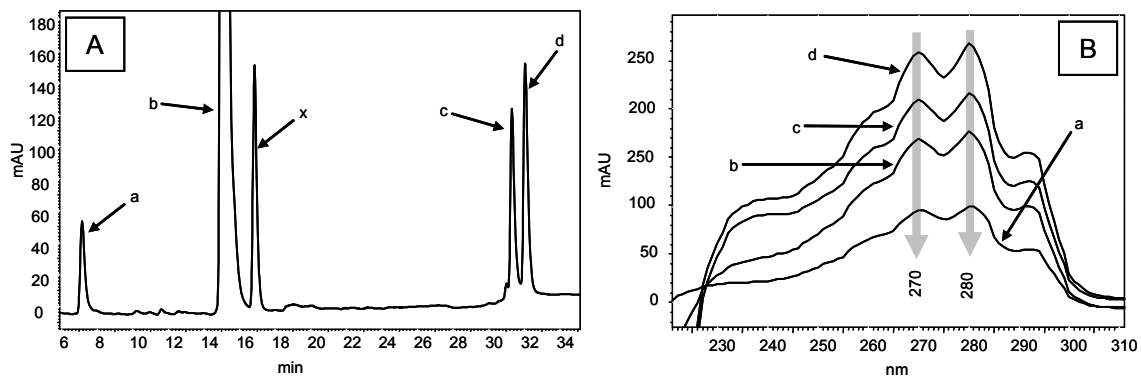


**Abbildung 33-A:** Balkendiagramm mit den Gesamt-Carotinoidgehalten und den anteiligen Gehalten der jeweiligen Hauptcarotinoide (Anteil  $>5\%$  vom Gesamtgehalt im Zellyophilisat [LY]) der im Screening untersuchten Hefen und Pilze berechnet als  $\beta$ CAR-Äq, Mikroorganismen von links nach rechts: TO *Trichosporon ovoides*, BV *Bullera variabilis*, FF *Filobasidium floriformae*, ED *Exophiala dermatididis*, CI *Candida intermedia*, SS *Sporobolomyces salmonicolor*, AB *Acremonium butyrii*, RGR *Rhodotorula gramnis*, RGL *Rhodotorula glutinis*, RMU *Rhodotorula mucilaginosa*, RFI *Rhodotorula spp.* (Feld-Isolat), RSF *Rhodotorula spp.* (Faeces-Isolat), LH *Lecytophora hoffmanii*, PR *Phaffia rhodozyma*; die Summe aller Carotinoide mit einem Gehalt  $<5\%$  am Gesamtgehalt sind grau als „übrige“ zusammengefasst.

**Abbildung 33-B:** Prozentuales Verteilungsmuster der Hauptcarotinoide (Anteil  $>5\%$  am Gesamtgehalt) der im Screening untersuchten Hefen und Pilze bezogen auf den jeweils bestimmten Gesamt-Carotinoidgehalt, alle weiteren Parameter und Abkürzungen analog Abbildung 33-A.

Für *Acremonium butyrii* und *Sporobolomyces salmonicolor* lassen sich in der Literatur zum Gesamt-Carotinoidgehalt nur für verwandte Arten Werte finden. Der für *Acremonium butyrii* ermittelte Gesamt-Carotinoidgehalt (116 µg/g [LY]) beträgt dabei etwa das Doppelte dessen, was in der Literatur für die verwandte Art *Acremonium diostryi* (62 µg/g Zelltrockenmasse) angegeben wird (DEED et al. 1990). Der für *Sporobolomyces salmonicolor* bestimmte Gesamt-Carotinoidgehalt von 51 µg/g [LY] liegt zwischen den in der Literatur aufgeführten Gesamt-Carotinoidgehalten von *Sporobolomyces patagonicus* mit 29,2 µg/g Zelltrockenmasse und *Sporobolomyces roseus* mit 82,3 µg/g Zelltrockenmasse (BUZZINI et al. 2007). Für alle anderen untersuchten Hefen und Pilze existieren in der Literatur bisher noch keine Angaben zum Carotinoidgehalt, weder für einzelne Arten noch für die Gattung.

Bei der Betrachtung der UV-VIS-Spektren des Pilzes *Lecytophora hoffmanii* zeigte sich, dass der scheinbar hohe Gehalt an Carotinoiden (241 µg/g [LY]) überwiegend durch nicht-Carotinoide bedingt wird, obgleich auch Carotinoide an Hand ihrer Absorptionsspektren mit insgesamt 28,3 µg/g [LY] eindeutig nachgewiesen werden konnten (vgl. UV-VIS-Spektren Anhang 9.3). Die Ergebnisse der Verteilung der Carotinoide in den



**Abbildung 34-A:** Chromatogramm eines Extraktes von *Trichosporon ovoides*, Detektion bei 290 nm, die „vorläufige“ Identifizierung [v.ID] der Peaks erfolgte über Vergleiche der UV-VIS-Spektren mit den Spektren der Literatur (LEE et al. 2008) und dem Retentionsverhalten vergleichbarer lipophiler Carotinoide auf der RP-C<sub>30</sub>-Säule, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 50mM AAC [min-%]: 0-0, 24-62, 27-80, 38-80, 43-0, 50-0; Flow: 1,3 ml/min, T<sub>s</sub> = 12°C, Peak-Identitäten [v.ID]: a Diaphytoen, b Apophytoen, c und d *cis* und *trans*-Phytoen, x nicht identifizierbarer Peak [n.ID].

**Abbildung 34-B:** UV-VIS-Spektren der in Abbildung 34-A identifizierten Peaks.

untersuchten Hefen/Pilzen veranschaulichen, dass der Gehalt von mindestens einem Carotinoid pro Mikroorganismus stets mehr als 15% am Gesamt-Carotinoidgehalt beträgt (vgl. Abbildung 33-B). Allerdings macht der Gehalt einzelner Carotinoide nur in wenigen Fällen mehr als die Hälfte (50%) vom Gesamt-Carotinoidgehalt aus (bei 5 von 14 Mikroorganismen). Hierbei zeigt allein *Phaffia rhodozyma* ein Verteilungsmuster, bei dem über 50% des Gesamt-Carotinoidgehaltes durch ein einzelnes, wirtschaftlich bedeutsames Carotinoid (AST) bedingt wird (vgl. Abbildung 33-B). Dieses stark durch AST bestimmte Carotinoid-Spektrum zeichnet die Hefe gegenüber anderen Mikroorganismen besonders aus und prädestiniert sie für die biotechnologische Nutzung (JOHNSON et al. 2003, BUZZINI et al. 2001).

### 3.3 Für das Screening ausgewählte Bakterien

Insgesamt wurden für das zweite Screening zwölf Bakterien-Stämme ausgewählt und auf Platten angezüchtet. Einen Überblick über die Färbung der Kolonien und die bei der Aufarbeitung der Lyophilisate erhaltenen Extrakte geben die Abbildungen 55 bis 60 (vgl. Anhang 9.2). Analog zu den untersuchten Hefen und Pilzen wurden vorzugsweise die Arten ausgewählt, bei denen die Fähigkeit zur Carotinoid-Biosynthese noch nicht erforscht wurde oder die bisherigen Ergebnisse noch lückenhaft und/oder nicht gesichert sind (vgl. Tabelle 6). Beispielsweise wird für *Acidobacterium capsulatum* in der Literatur eine orangefarbene Pigmentierung der Kolonien als Merkmal beschrieben (KISHIMOTO et al. 1991). Untersuchungen, ob oder welche Carotinoide diese Pigmentierung hervorrufen, fehlen jedoch bislang. Um über die Ergebnisse des Screenings die Leistungsfähigkeit der Methode für Bakterien beurteilen zu können, wurde bei der Auswahl darauf geachtet, dass die ausgewählten Gattungen sowohl *gram-positive* als auch *gram-negative* und *atypische* Arten beinhalten. Analog zum Screening der Hefen wurden dabei auch bekannte und gut untersuchte Carotinoid-produzierende Arten wie *Brevibacterium linens*, *Enterobacter agglomerans* (syn. *Panthoea agglomerans*) und *Micrococcus luteus* ausgewählt. Überdies wurden bei den betreffenden Bakterien fakultativ pathogene Gattungen wie *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. und *Rhodococcus* spp. einbezogen. Letztere Spezies ist insbesondere veterinärmedizinisch relevant (vgl. 1.1.2).

Im Gegensatz zu *Rhodococcus equi* sind *Bacillus cereus* und *Pseudomonas aeruginosa* von größerem humanmedizinischem Interesse. Der fakultativ pathogene Sporenbildner *Bacillus cereus* gilt als häufiger Lebensmittel-Verderbniskeim, der infolge einer Bildung von hitzelabilen Enterotoxinen unter anderem schwere Diarrhöen verursachen kann (GUINEBRETIERE et al. 2002). *Pseudomonas aeruginosa* ist besonders bei immunsupprimierten und geschwächten Patienten einer der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen. Erkrankungen mit *Pseudomonas aeruginosa* können auf Grund der zunehmenden Antibiotikaresistenz des Keimes (Bildung von Efflux-Pumpen und  $\beta$ -Lactamase) unter Umständen lebensbedrohlich sein (MESAROS et al. 2007). Sowohl für *Ps. aeruginosa* als auch für *B. cereus* existieren bislang keine Untersuchungen bezüglich der Befähigung zur Bildung von Carotinoiden und/oder von nicht-farbigem Isoprenoiden, obgleich in verwandten Arten diese bereits nachgewiesen werden konnten (vgl. Tabelle 6).

Der im Rahmen des Screenings ausgewählte *Enterobacter agglomerans* zählt im Gegensatz zu dem ebenfalls pigmentbildenden *Enterobacter sakazakii* zu den für den Menschen selten pathogenen Vertretern seiner Gattung (SINGLETON et al. 2001, BARASH et al. 2007, LEHNER et al. 2006). Gleichwohl ist das *gram-negative* Bakterium pflanzenpathogen und kann insbesondere bei Kindern mit dauerhafter Katheterisierung oder bei der Anwendung von Sonden zur total-parenteralen Ernährung (TPN) Bakteriämien verursachen (CRUZ et al. 2007, BARASH et al. 2007). Auf Grund der hohen phenotypischen und genotypischen Ähnlichkeit werden *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola* und *Erwinia milletiae* unter ein und derselben Art - *Panthoea agglomerans* - subsummiert (GAVINI et al. 1989). Sowohl das Spektrum der von *Panthoea agglomerans* gebildeten Carotinoide als auch die für ihre Biosynthese zuständigen Genabschnitte und Enzyme sind bereits relativ gut untersucht. Bislang wurden in *Panthoea agglomerans* eine Reihe wirtschaftlich bedeutungsvoller Carotinoide und die jeweils zugehörigen codierenden Gene der Synthese-Enzyme identifiziert (SANDMANN et al. 1990, BHUPINDER et al. 1991). Außerdem wurde festgestellt, dass aus *Panthoea agglomerans* in *Escherichia coli* transformierte Gene eine höhere Aktivität zeigen, als in *E. coli* transformierte, äquivalente



Gene anderer Arten (YOON et al. 2007, SEDKOVA et al. 2005). Solche Genabschnitte könnten beispielsweise zur gentechnischen Erzeugung leistungsfähiger Mikroorganismen für die biotechnologische Gewinnung wirtschaftlich bedeutender Carotinoide wie Lycopon oder Astaxanthin verwendet werden (SEDKOVA et al. 2005, YOON et al. 2007). Für die untersuchten *Arthrobacter spp.* gilt ähnlich *Bacillus cereus* und *Pseudomonas aeruginosa*, dass zwar für verwandte, jedoch nicht für die ausgewählten Arten Ergebnisse zum Carotinoid-Spektrum und Carotinoidgehalt existieren.

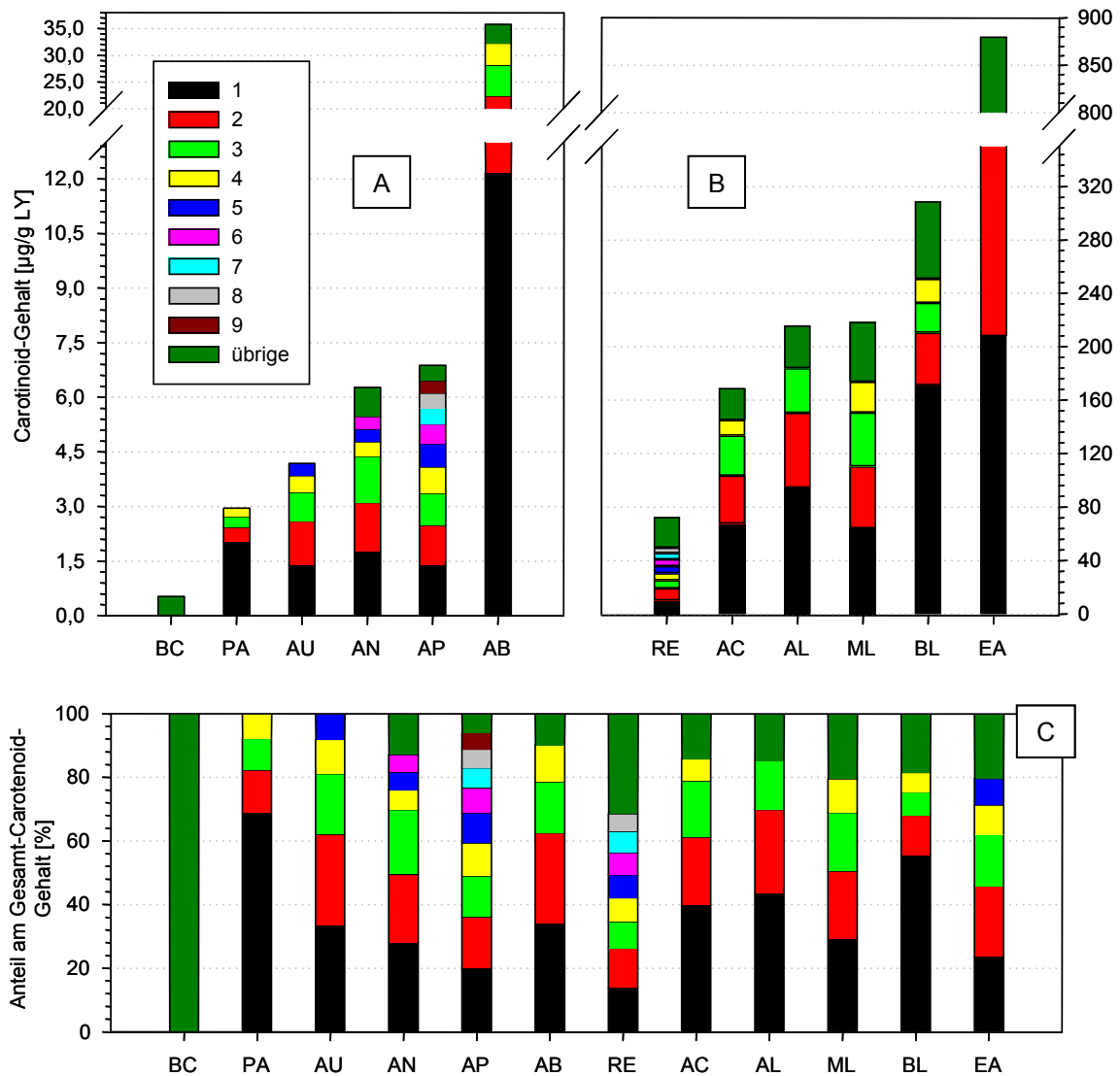
**Tabelle 6:** Übersicht über die für das Screening ausgewählten Bakterien und die in ihnen oder verwandten Arten bislang nachgewiesenen Carotinoide, Abkürzungen alphabetisch: AST Astaxanthin, CAN Canthaxanthin, CAR Carotin, CRY Cryptoxanthin, ECH Echinenon, Glc Glucose, k.A. keine Angaben, LYC Lycopon, MET Methyl, OH Hydroxy, pos. auf Carotinoide positiv getestet, u.w. und weitere, ZEA Zeaxanthin, [+] gesicherte Identität [g.ID] mittels Massenspektrometrie und/oder NMR-Spektrometrie; [-] in der Literatur angegebene bislang nur vorläufige Identität [v.ID] mittels UV-VIS-Spektroskopie und/oder dem Retentionsverhalten bei DC/HPLC.

zum Screening ausgewählte Bakterien (Arten) (alphabetisch)	Kolonie-farbe auf der Platte	bisher nach-gewiesene Carotinoide der Art	bislang nachgewiesene Carotinoide bei verwandten Arten	Literatur
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	rot	k.A.	<i>Acidobacterium candidatus</i> : ECH [-], CAN [-], $\beta$ CAR [-], $\gamma$ CAR [-], LYC [-]	GARCIA-COSTAS 2007
<i>Arthrobacter spp. (luteus, bergerei, uratoxydans, protophormoniae, nicotianae)</i>	gelb	k.A.	<i>Arthrobacter spp.</i> : 4-Keto- $\gamma$ CAR [-], <i>A. glacialis</i> : Decaprenoxanthin (mono u. di-Glycoside) [+], Bisanhydrobacterioruberin [+], 2-(4-OH-3-MET-But-2-enyl)-2'-(3-MET-but-2-enyl)-3',4-dihydro-1',2'-dihydro- $\epsilon$ , $\Psi$ -caroten-1'-ol [+], <i>A. agilis</i> : Bacterioruberin-Derivate (+) sowie deren mono u. di-Glycoside (+)	FIASSON 1976, ARPIN 1972 u. 1975 FONG 2001
<i>Bacillus cereus</i>	gelblich-beige	k.A.	<i>Bacillus spp.</i> : 4,4'-Diapo- $\zeta$ -CAR [-], 4,4'-Diaponeurosporen [-], <i>B. megaterium</i> : pos.	AONO 1991 MITCHELL 1986 Duc 2006
<i>Brevibacterium linens</i>	gelb-orange	Renieraten [+], Isorenieraten [+], 3-OH-Isorenieraten [+], 3,3'-di-OH-Isorenieraten [+], AST [-]		NELIS 1991, KOHL 1983
<i>Micrococcus luteus (Sarcinea lutea)</i>	gelb	Sarcinaxanthin (mono u. di-Glycoside) [+], u.w. [-]		HERTZBERG 1977 NORGARD 1970
<i>Panthoea agglomerans (syn. Enterobacter agglomerans, Erwinia herbicola, Erwinia milletiae)</i>	gelb	$\beta$ CRY [+], $\beta$ CAR [+], ZEA [+], u.w. mono-/di-Glycoside	<i>Panthoea spp. (Enterobacter spp.)</i> : $\beta$ CRY [+], $\beta$ CAR [+], ZEA [+] <i>Enterobacter sakazakii</i> : pos.	SANDMANN 1990 BHUPINDER 1991 LEHNER 2006 SEDKOVA 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	grünlich	k.A.	<i>Pseudomonas rhodos</i> : 4,4'-Diapocaroten-4'-al-4-oic-acid [-], <i>Pseudomonas sp.</i> : Okadaxanthin [+]	KLEINIG 1979 MIKI 1994
<i>Rhodococcus equi</i>	lachs-farben - rot	$\gamma$ CAR [-]	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> : 1'OH- $\gamma$ CAR-(glycoside) [+], 1',2'-Dihydro-1'OH-4Keto- $\gamma$ CAR u. 1'- $\beta$ -D-Glc-Ester [+]	ICHIYAMA 1989 TAKAICHI 1990 u. 1999

Analog dem Screening der Hefen sollte die in Kapitel 2 entwickelte Methode an verschiedenen bakteriellen Matrizes getestet werden. Die erhaltenen UV-VIS-Spektren sollten vorerst nur dem Erkennen von Carotinoiden dienen - vor allem bei den noch nicht auf Carotinoide untersuchten Arten. Darüber hinaus sollten später mit Hilfe der UV-VIS-Spektren und mit Hilfe von Massenspektren bekannte Carotinoide bestätigt und unbekannte Carotinoide identifiziert werden (vgl. Kapitel 5). Untergeordnet dazu sollte untersucht werden, inwieweit auch nicht-farbige isoprenoide Vorstufen (beispielsweise Farnesol, Phytoen, Phytofluen und Neurosporen) aus Bakterien bestimmt werden können (SEDKOVA et al. 2005, BHUPINDER et al. 1991, AONO et al. 1991).

### 3.4 Ergebnisse des Screenings der Bakterien

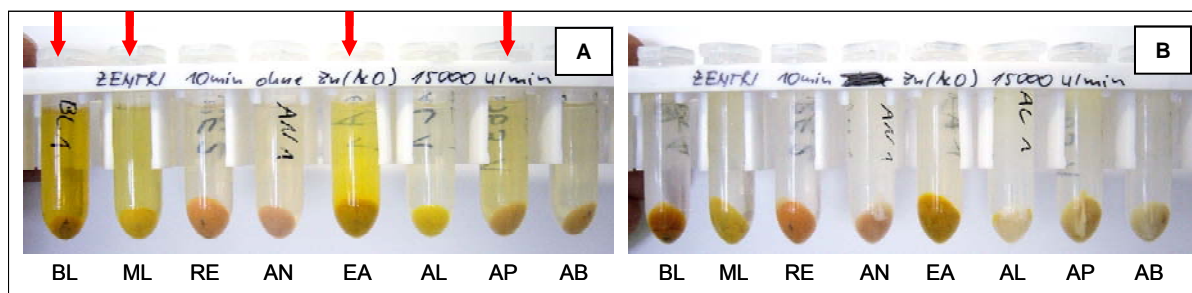
Bis auf wenige Ausnahmen zeigten die detektierten bakteriellen nicht-Carotinoide im Vergleich zu den Carotinoiden in ihrem Absorptionsspektrum oberhalb von 400 nm keine nennenswerte Absorption mehr. Demzufolge wurde ihr Gehalt bei der Bestimmung des Gesamtgehaltes an Carotinoiden (bei 450 nm) analog den Hefen im Allgemeinen nicht berücksichtigt. Die einzelnen Chromatogramme und UV-VIS-Spektren der im Screening untersuchten Bakterien können dem Anhang entnommen werden (vgl. 9.3). Zwei der untersuchten Bakterien-Spezies wiesen im Gegensatz zu den untersuchten Hefen eine makroskopisch erkennbare Koloniefärbung auf, die jedoch, wie die zugehörigen UV-VIS-Spektren belegten, nicht durch Carotinoide bedingt war. Speziell bei Bakterien, die keine oder nur sehr wenig Carotinoide synthetisieren, können nicht-Carotinoide, trotz einer nur geringfügigen Absorption bei 450 nm, zu einem



falsch positiven Nachweis führen oder einen systematisch zu hohen Gehalt an Carotinoiden vortäuschen. Im Screening wurde für die makroskopisch gefärbten Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus cereus* über die bei 450 nm detektierten Peakflächen ein Gehalt an Carotinoiden von bis zu 3 µg/g [LY] errechnet. Ein geringerer Carotinoidgehalt wäre für beide Bakterien durchaus denkbar, da für die Gattungen *Bacillus* und *Pseudomonas* bereits Carotinoide nachgewiesen werden konnten (vgl. Tabelle 6). Bei der Auswertung der UV-VIS-Spektren der detektierten Peaks zeigte sich jedoch, dass die Farbigekeit der Kolonien nicht durch Carotinoide verursacht wird (kein Carotinoidgehalt bei einer NWG von 700 ng/g [LY] und einer BSG von 2,3 µg/g [LY] nachweisbar, berechnet für eine Einwaage von jeweils etwa 30 mg an Lyophilisat).

Die Untersuchungen an *Ps. aeruginosa* und *B. cereus* zeigen, dass Methoden, die Carotinoide nur bei einer Wellenlänge erfassen, für ein Screening nicht ausreichend sicher bzw. nicht ausreichend genau sind. Im Allgemeinen offenbaren die Ergebnisse der Bakterien im Vergleich zu den Hefen eine größere Vielfalt im Carotinoide-Spektrum. Die untersuchten Bakterien wiesen dabei Gesamt-Carotinoidgehalte (berechnet als  $\beta$ CAR-Äq) von sowohl <5 µg/g [LY] als auch >850 µg/g [LY] auf. Die Spannweite der ermittelten Carotinoidgehalte ist somit deutlich größer als bei den Hefen. Den höchsten Carotinoidgehalt pro Zelltrockenmasse zeigte *Enterobacter agglomerans* mit 879 µg/g [LY] gefolgt von *Brevibacterium linens* mit 308 µg/g [LY] (vgl. Abbildung 35-B). Der in der Literatur für *Enterobacter agglomerans* (syn. *Panthoea agglomerans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*) angegebene Gehalt von 74 µg/g [LY] beträgt nur ein Zehntel (BHUPINDER et al. 1991). Einerseits kann der in den eigenen Untersuchungen bestimmte erhöhte Gehalt an den Aufzuchtbedingungen (vgl. 7.2.2.3) und der Vitalität des Keimes liegen. Andererseits kann ein erhöhter Carotinoidgehalt ebenso durch das Vorliegen einer Subspezies von *Enterobacter agglomerans* zustande kommen. Möglicherweise ist der in der Literatur angegebene geringere Gehalt auch darauf zurückzuführen, dass BHUPINDER et al. (1991) nur eine „einfache“ Extraktion ohne vorherigen Zellaufschluss verwendete. Darüber hinaus zeigte sich bei der Aufarbeitung von *E. agglomerans* sowie auch bei einer Reihe weiterer Bakterien-Stämme die Notwendigkeit einer Fällung von hydrophil substituierten Carotinoiden aus dem Überstand vor Beginn der Extraktion (vgl. Abbildungen 36 u. Methodenentwicklung 2.4.2, Einführung einer Zinkacetat-Fällung für hydrophil substituierte Carotinoide). Im Gegensatz zu *Enterobacter agglomerans* entsprach der für *Brevibacterium linens* ermittelte Gesamt-Carotinoidgehalt von 309 µg/g [LY] den in der Literatur angegebenen Gehalten für verschiedene *B. linens* ssp. von 146 µg/g bis 975 µg/g (TS) (DUFOSSE et al. 2001).

Abschließend kann die Methode in Bezug auf die Quantifizierung von bakteriellen Carotinoiden als genau und in Bezug auf den zugleich erzielten hohen Probendurchsatz als effizient beurteilt werden.



**Abbildung 36-A:** Verlust von hydrophil substituierten Carotinoiden im Überstand beim Verwerfen der wässrigen Zellaufschluss-Flüssigkeit, die roten Pfeile kennzeichnen Bakterien mit besonders vielen hydrophilen Carotinoiden im Überstand (deutliche Färbungen des Überstandes), das Bild zeigt den Zustand jeweils nach der Zentrifugation (10 min, 15000 U/min), Abkürzungen von links nach rechts: BL *Brevibacterium linens*, ML *Micrococcus luteus*, RE *Rhodococcus equi*, AN *Arthrobacter nicotianae*, EA *Enterobacter agglomerans* (syn. *Pantoea agglomerans*), AL *Arthrobacter luteus*, AP *Arthrobacter protophormoniae*, AB *Arthrobacter bergerei*.

**Abbildung 36-B:** Minderung des Verlustes von hydrophil substituierten Carotinoiden beim Verwerfen des wässrigen Überstandes der aufgeschlossenen Zellen durch eine vorgeschaltete Fällung mit kaltgesättigter Zinkacetat-Lösung, es wurden jeweils 400 µl Zinkacetat-Lösung auf 1,2 ml Aufschluss suspension gegeben, Abkürzungen und weitere Parameter analog Abbildung 36-A.

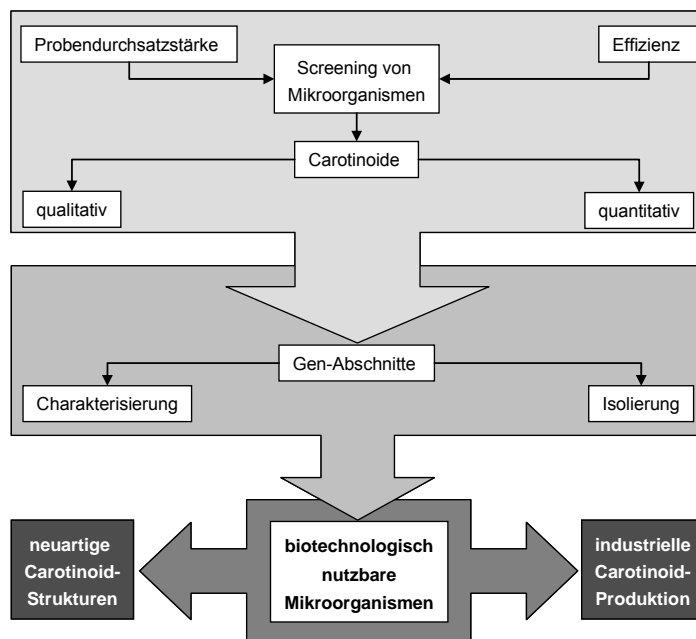
### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des Screenings

Um die Effizienz der entwickelten Methode an verschiedenen mikrobiellen Matrizes zu testen, wurden eine Reihe von Bakterien und Hefen sowie zwei Pilz-Arten auf Carotinoide untersucht. Alle ausgewählten Mikroorganismen konnten dabei über die entwickelte Aufschluss- und Extraktionsmethode erschöpfend extrahiert und die Carotinoide der erhaltenen Extrakte mit Hilfe der entwickelten HPLC-DAD-Methode entsprechend aufgetrennt werden. Es konnten sowohl bekannte mikrobielle Carotinoid-Produzenten bestätigt als auch noch nicht untersuchte, neue mikrobielle Carotinoid-Produzenten erkannt werden.

Die Ergebnisse des Screenings zeigen, dass über die in der Arbeit etablierte Methode visuell falsch positive Ergebnisse, von scheinbar durch Carotinoide gefärbten Kolonien, auch eindeutig als solche erkannt werden können. Gleichwohl können mit Hilfe derselben Methode auch Carotinoide bestimmt werden, die mit dem Auge makroskopisch, anhand von gefärbten Kolonien auf der Patte, nicht mehr erkennbar sind (visuell falsch negative Ergebnisse).

Bisher lassen sich in der Literatur nur für *Rhodotorula glutinis*, *Phaffia rhodozyma*, *Enterobacter agglomerans* und *Brevibacterium linens* genaue Angaben zum Carotinoidgehalt finden. Bis auf *Enterobacter agglomerans*, für den ein wesentlich höherer Gesamt-Carotinoidgehalt ermittelt wurde, zeigen alle anderen ermittelten Carotinoidgehalte eine gute Übereinstimmung zu den Literaturwerten. Das beweist, dass die Methode gleichwertig zu anderen Verfahren ist, wobei im Gegensatz zu vielen älteren Verfahren ein wesentlich höherer Probendurchsatz und eine bessere Auftrennung des Carotinoidextraktes ermöglicht wird. Auf Grund oft fehlender vergleichbarer Literaturdaten stellen die meisten der quantitativen Ergebnisse des Screenings einen ersten Richtwert sowohl für Carotinoide aus bislang nur qualitativ untersuchten Mikroorganismen als auch für viele noch nicht auf Carotinoide untersuchte Arten dar. Da ohne geeignete Carotinoid-Standardsubstanzen über die im Screening erhaltenen UV-VIS-Spektrum keine sichere Identifizierung von Carotinoiden erreicht werden konnte, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit eine geeignete LC-MS-Methode zur direkten Verifizierung und Identifizierung entwickelt (vgl. Kapitel 5).

Die Ergebnisse des Screenings zeigen, dass die in dieser Arbeit entwickelte Methode für Bakterien, d.h. für *gram-positive*, *gram-negative* und *atypische* Vertreter, sowie für Hefen und für Pilze geeignet ist, um diese qualitativ und quantitativ auf Carotinoide zu untersuchen. Anhand der daraus resultierenden Ergebnisse können bestimmte Mikroorganismen ausgewählt und diese im Anschluss beispielsweise auf die zur Carotinoid-Biosynthese zuständigen Enzyme und Gene untersucht werden. Durch simultane Klonierung von isolierten Genen aus unterschiedlichen – auch aus pathogenen – Mikroorganismen können neuartige Carotinoide erhalten und biotechnologisch leistungsfähige apathogene Mikroorganismen erzeugt werden (CHENG et al. 2006a/b, UMENO et al. 2003, SANDMANN et al. 2002b, ALBRECHT et al. 1997). Eine leistungsstarke und effiziente Screening-Methode ist somit Grundlage und Voraussetzung zum Auffinden von dafür geeigneten Carotinoid-synthetisierenden Mikroorganismen (vgl. Abbildung 37).



**Abbildung 37:** Darstellung des „Screenings auf mikrobielle Carotinoide“ als Grundlage zum Auffinden neuartiger Carotinoidstrukturen und als Ausgangspunkt zur Gewinnung oder Erzeugung industriell, biotechnologisch nutzbarer Mikroorganismen mit einem hohem Gesamt-Carotinoidgehalt bzw. einer hohen Carotinoid-Biomasse.

## 4. Anwendung der Methode (II) - Untersuchungen zum Einfluss von Nährmedienzusätzen auf das Carotinoid-Spektrum ausgewählter Bakterien und Hefen

### 4.1 Einführung

Auf Grund der steigenden Nachfrage steht die biotechnologische Produktion von Carotinoid-Pigmenten mit Hilfe von Mikroorganismen in direkter Konkurrenz zur chemisch-technischen Synthese. Die Wirtschaftlichkeit eines biotechnologischen Verfahrens hängt dabei von der Art des Mikroorganismus (Bakterium, Hefe oder Alge), dessen Leistungsfähigkeit und von seinen individuellen Ansprüchen an das Wachstumsmedium ab (LOWRIE et al. 2000, BHOSALE et al. 2004b, VANDAMME 1992). Bei der biotechnologischen Produktion mit Hilfe von Mikroorganismen kann eine Erhöhung der Carotinoid-Ausbeute einerseits über eine Steigerung der Biomasse (erzeugte Zellzahl und Zellgröße pro Zeit) und andererseits über die Steigerung der Carotinoid-Bioakkumulation (erzeugter Carotinoidgehalt pro Zelle und Zeit) erfolgen. Von beiden Möglichkeiten ist die Steigerung der Bioakkumulation der wirtschaftlichere Weg, da hierbei keine Volumenerhöhung (keine Vergrößerung des Fermenters) notwendig wird und damit die bei großvolumigen Fermentern häufig auftretenden Probleme umgangen werden (TANAKA et al. 1971, NELIS et al. 1991, BHOSALE et al. 2004b).

Zur Erhöhung der Bioakkumulation von Carotinoiden und der damit einhergehenden Verbesserung der Ausbeute und Effizienz mikrobieller Carotinoid-Biosynthesen werden verschiedenste Initiatoren bzw. Stimulantien eingesetzt. Diese können sowohl physikochemischer als auch biochemischer Natur sein, wobei den erstgenannten bislang wesentlich mehr Beachtung geschenkt wurde (TADA et al. 1993, BRAMLEY et al. 2005). Insbesondere für die Hefen *Phaffia rhodozyma* und *Rhodotorula spp.* existieren bereits eine Vielzahl von Untersuchungen zur Erhöhung der Bioakkumulation von mikrobiellen Carotinoiden durch den gezielten Einsatz von physikochemischen Faktoren (vgl. Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Überblick über einige Arbeiten zu Untersuchungen der Abhängigkeit der mikrobiellen Carotinoid-Biosynthese von physikochemischen Faktoren, Abkürzungen alphabetisch: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Wasserstoffperoxid, p(O<sub>2</sub>) Sauerstoffpartialdruck, ROS reaktive Sauerstoffspezies generierende Substanzen (z.B. Methylenblau, Methyviologen, [2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid]), \* Zusatz von .

physikochemische Faktoren		Mikroorganismen	Literatur
Temperatur		<i>Arthrobacter agilis</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>R. rubra</i> , <i>Gordonia jacobaea ssp.</i> , <i>P. rhodozyma</i> , <i>Mucor rouxii</i> , <i>Blakeslea trispora</i>	FONG 2001, AKSU 2007, MARTIN 1993, DE MIGUEL 2000, JOHNSON 1979, MOSQUEDA- CANO 1995, CERDA-OLMEDO 1989
Beleuchtung		<i>Micrococcus roseus</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>R. minuta</i> , <i>P. rhodozyma</i> , <i>Mucor rouxii</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Aspergillus giganteus</i>	SCHWARTZEL 1974b, SAKAKI 2001, TADA 1982 u. 1993, MEYER 1994a, AN 1990, MOSQUEDA- CANO 1995, ARAKAWA 1977, KIM 2006, HARDING 1969, EL-JACK 1988, BHOSALE 2002
Redoxstatus	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>P. rhodozyma</i>	LIU 2006, CHANG 1990, KIM 2006, JEONG 1999
	ROS*	<i>R. glutinis</i> , <i>R. mucilaginoso</i>	SAKAKI 2002, MORRE 1989
	Metall-Salze *	<i>R. glutinis</i> , <i>P. rhodozyma</i> , <i>Rhodobacter</i> <i>sphaeroides</i> , <i>Blakeslea trispora</i>	KOMEMUSHI 1994, WANG 2007b, CHEN 2006, BHOSALE 2001a, AN 1996, GOVIND 1982, CHANG 1990
	p(O <sub>2</sub> )	<i>R. glutinis</i> , <i>P. rhodozyma</i>	AKSU 2007, JOHNSON 1979, YAMANE 1997
pH-Wert		<i>R. glutinis</i> , <i>R. rubra</i> , <i>P. rhodozyma</i>	AKSU 2007, JOHNSON 1979, MARTIN 1993, HU 2006, MUNCNEROVA 1994
Osmolarität		<i>Arthrobacter agilis</i> , <i>Haloferax mediteraranei</i>	FONG 2001, D'SOUZA 1997

Bei der Untersuchung der Wirkung biochemischer Faktoren auf die mikrobielle Carotinoid-Biosynthese können zwei verschiedene Vorgehensweisen verfolgt werden. Zum einen können definierte Nährmedienzusätze, d.h. einzelne Supplemente getestet werden. Zum anderen kann der Nutzen von komplex zusammengesetzten Mischungen, entweder als Nährmedium selbst oder als Zusatz zu einem geeigneten Basis-Nährmedium untersucht werden. Da in diesem Zusammenhang zumeist auch wirtschaftliche Interessen von Bedeutung sind, werden überwiegend die zuletzt genannten Mischungen und hierbei bevorzugt industrielle Neben- und Abfall-Produkte (INAPs) untersucht (AKSU et al. 2005, DOMINGUEZ-BOCANEGRA et al. 2004). Eine Auswahl an derartigen INAPs, die zur Optimierung der Ausbeute von mikrobiell erzeugten Carotinoiden bereits getestet wurden, zeigt Tabelle 8.

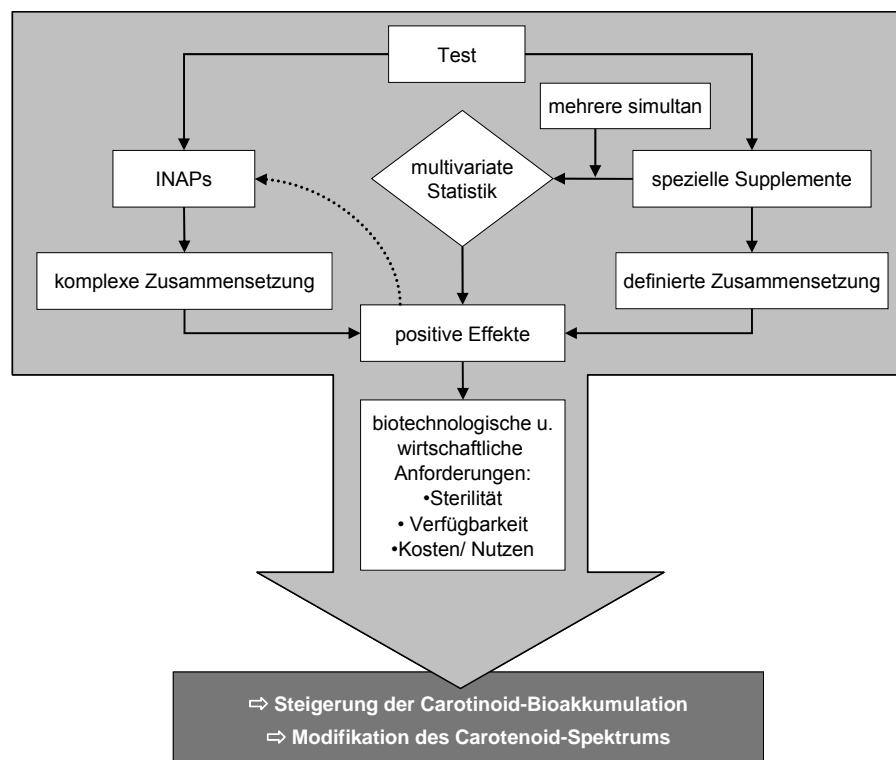
**Tabelle 8:** Übersicht über die zur Erhöhung der mikrobiellen Carotinoideausbeute bisher getesteten industriellen Neben- und Abfallprodukte (INAPs); Abkürzungen alphabetisch: ferm. fermentiert, m Mutantenstamm, NP Nebenprodukte, z.T. zum Teil.

INAP	Herkunft	Mikroorganismen	Literatur
Melasse	Rüben	<i>Brevibacterium</i> sp. (KY-4313) <i>P. rhodozyma</i> (Wildtyp u. GM807, n485, 2AZN)	NELIS 1989B HAARD 1988, JIRASRIPONGPUN 2007, AN 2001
	Zuckerrohr	<i>R. glutinis</i> (m), <i>P. rhodozyma</i>	BHOSALE 2001b, HAARD 1988
Pflanzen-Extrakte, Pflanzen-Abfälle	Seesamblätter, Lauchzwiebel	<i>P. rhodozyma</i> (G276)	KIM 2006
	Ackersenf	<i>P. rhodozyma</i>	TINOI 2006
	Kokos (Milch)		DOMINGUEZ-B. 2004
	Zuckerrohr (Saft)		FONTANA 1996
	Alfalfa (NP)		OKAGBUE 1984B
Weintraube	<i>P. rhodozyma</i> (m)	MEYER 1994B	
tierische Extrakte, Boullion	Rindfleisch	<i>P. rhodozyma</i> (Wildtyp u. GM807)	JIRASRIPONGPUN 2007, NI 2007
	Hirn und Herz	<i>Brevibacterium</i> sp. (KY-4313), <i>Gordonia jacobaea</i> (MV-26)	NELIS 1989B VEIGA-CRESPO 2005
Ultrafiltrat	Molke	<i>R. glutinis</i>	FRENGOVA 1994
Lake	Sauerkraut	<i>R. rubra</i>	SHIH 1996
	Rettich (ferm.)	<i>R. glutinis</i> DM28	MALISORN 2008
Hydrolysat	Torf	<i>R. rubra</i> , <i>P. rhodozyma</i>	ACHEAMPONG 1995, MARTIN 1993
	Mungbohnenmehl	<i>R. glutinis</i>	TINOI 2005
Öle	Baumwollsamensamen	<i>R. mucilaginoso</i>	AKSU 2005
	Erdnuss	<i>R. glutinis</i>	WANG 2007A
Pulpe, Mus, Pressrückstände	Tomate	<i>P. rhodozyma</i> , <i>R. glutinis</i>	JOHNSON 1979, WANG 2007A
	Kokos	<i>P. rhodozyma</i>	DOMINGUEZ-B. 2004
	Weintrauben	<i>R. glutinis</i>	BUZZINI 1999
Naßmahlung (NPs)	Getreide	<i>P. rhodozyma</i>	HAYMAN 1995
Mehl	Sojabohne, Mais (Extrakt), Getreide (Sirup)	<i>Gordonia jacobaea</i> (MV-26), <i>R. glutinis</i> (z.T. in Co-Kultur mit <i>Debaryomyces castellii</i> zum Stärkeabbau)	VEIGA-CRESPO 2005 BUZZINI 1999 u. 2001

Insbesondere in der angewandten Biotechnologie werden die Untersuchungen von INAPs gegenüber dem Testen einzelner, stofflich definierter Supplemente bevorzugt (BUZZINI et al. 2001). Einer der Nachteile dieser Vorgehensweise ist, dass eine Zuordnung der erzielten Effekte zu einzelnen INAP-Bestandteilen (definierten Supplementen) oft nicht möglich ist. Zugleich ist es von Bedeutung, ob es sich um INAPs handelt, die preisgünstig aseptisch hergestellt werden können. Wenn nicht, sollten sie ohne erhebliche stoffliche Minderungen (Millard-Reaktion, Degradation thermolabiler Stoffe wie Vitamine etc.)

hitzeesterilisierbar sein. Da die wirksamen Bestandteile von komplex zusammengesetzten INAPs zumeist nicht vollständig bekannt sind, ist auch eine Aussage über die Eignung dieser Erzeugnisse für eine Hitzeesterilisation nur eingeschränkt möglich. Eine alternative Sterilfiltration ist vergleichsweise preisintensiv und somit wirtschaftlich unattraktiv, abgesehen davon, dass das Verfahren bei vielen partikulären INAPs nicht durchführbar ist. Aus diesem Grund muss der Nutzen derartiger Produkte, einschließlich des Einflusses der eventuell notwendigen Aufbereitungsverfahren (wie beispielsweise der Hitzeesterilisation), im Einzelnen praktisch durchgetestet werden. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere, eventuell noch effektivere oder preisgünstigere industrielle Nebenprodukte, ist schwierig.

Die Untersuchung einzelner genau definierter Stoffe hingegen bietet den Vorteil, dass anhand der Ergebnisse nützliche Supplemente erkannt und im Anschluss preisgünstigere INAPs mit genau diesen enthaltenen Supplementen, einschließlich der für sie geeigneten Aufbereitungsverfahren gezielt ausgewählt werden können (vgl. Abbildung 38). Ob dabei zum Erreichen einer optimalen Ausbeute an Carotinoiden



**Abbildung 38:** Gegenüberstellung der beiden Möglichkeiten zur Steigerung der Bioakkumulation von mikrobiellen Carotinoiden: über die Untersuchung von Industriellen Abfall- und Nebenprodukten (INAPs) als komplexe Nährmedien und/oder über die Untersuchung von einzelnen Substanzen als definierte Supplemente, die gepunktete Linie kennzeichnet die Schnittstelle beider Möglichkeiten und den Vorteil der Verfahrensweise der Testung von einzelnen Supplementen (vgl. Text).

mehrere Supplemente gleichzeitig erforderlich sind (Synergismen), kann beispielsweise über die Kombination verschiedener Stoffe und die anschließende statistische Auswertung der Ergebnisse mittels multivariater Verfahren aufgeklärt werden (LIU et al. 2007 u. 2009, CHEN et al. 2006a). Darüber hinaus kann über diese Vorgehensweise möglicherweise auch das Carotinoid-Spektrum in die Richtung bestimmter, wirtschaftlich bedeutsamer Carotinoide verschoben werden (vgl. Abbildung 38). Gleichwohl existieren bisher nur wenige Reihenuntersuchungen zu einzelnen Supplementen, wobei besonders für Carotinoidproduzierende Bakterien nur sehr wenige Daten vorhanden sind.



Prinzipiell sind bei Untersuchungen zur Optimierung der Bioakkumulation von mikrobiellen Carotinoiden eine Vielzahl von Analysen, d.h. ein hoher Probendurchsatz erforderlich. Vor diesem Hintergrund wurde anhand von Supplementierungsversuchen auch die Eignung der etablierten Methode (vgl. Kapitel 2) für derartige Fragestellungen geprüft. Gleichzeitig wurde der Einfluss einer Reihe von Nährmedienzusätzen auf die Bildung und Verteilung der Carotinoide bei fünf Mikroorganismen untersucht, welche zuvor anhand der Ergebnisse des Screenings ausgewählt wurden (*Rhodotorula spp.*, *Phaffia rhodozyma*, *Micrococcus luteus*, *Arthrobacter luteus* und *Brevibacterium linens*). Mit Hilfe der Supplementierungsversuche wurden folglich, anstelle von komplexen preisgünstigen INAPs, mehrere Einzelsubstanzen getestet. Die erzielten Effekte sollten schließlich dem Auffinden biotechnologisch nutzbarer Nährmedienzusätze bzw. der Auswahl und/oder der zweckmäßigen Kombination von preisgünstigen INAPs dienen.

## 4.2 Auswahl der Supplemente

Im Rahmen der Supplementierungsversuche wurden überwiegend Nährmedienzusätze untersucht, die an den ausgewählten Mikroorganismen (s.o.) noch nicht getestet wurden. Die meisten der in der Literatur beschriebenen Supplementierungsversuche basieren methodisch auf der Anzucht von Mikroorganismen in Schüttelkulturen. Demgegenüber wurden die Supplementierungsversuche der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer Plattenmethode durchgeführt, da diese gegenüber der Schüttelkultur in Bezug auf die Biosynthese mikrobieller Carotinoide einige Vorteile aufweist (vgl. 2.2.1). Um eine Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen aus der Literatur zu gewährleisten, wurden eine Reihe bereits untersuchter Supplemente mit einbezogen.

Die ausgewählten Stoffe lassen sich grob in anorganische (Salze) und organische Supplemente unterteilen. Sie schließen Nährstoffe, Präkursoren und Stimulantien mit ein, wobei eine eindeutige Zuordnung zum Teil nicht möglich ist (vgl. Tabelle 9). Beispielsweise ist noch nicht abschließend geklärt, ob Aminosäuren als Nährstoffe und/oder als Präkusoren fungieren (CERDA-OLMEDO 1989, PETERSON et al. 1957, ALCANTARA et al. 1999).

**Tabelle 9:** Überblick über die für die Supplementierungsversuche ausgewählten Substanzen (CN Candida-Elektivagar nach Nickersen).

Obergruppe	Supplement
Disaccharide	Saccharose, Maltose
Monosaccharide	Glucose, Xylose
Aminosäuren	L-Asparaginsäure, L-Cystin, L-Glutamin, L-Histidin, L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Threonin, L-Tryptophan
Vitamine	Thiamin, Riboflavin, Cyanocobalamin, Pyridoxin, Folsäure
Redox-aktive Substanzen	Eisen-(III)-chlorid, Bismut-(III)-Clorid (CN-Agar)
sonstige	Natrium-Malonat, Kanamycin

Als Nährmedium-Grundlage und Kontrolle wurden möglichst einfach zusammengesetzte unselektive Basis-Nährmedien und geeignete Anzuchtbedingungen ausgewählt (vgl. 7.2.2.1 u. 7.2.2.3). Um Verfälschungen der Ergebnisse durch Artefaktbildungen (Millard-Reaktion von Zuckern und Aminosäuren) und/oder Degradationen thermolabiler Stoffe (Vitamine) infolge eines Autoklavierens zu vermeiden, erfolgte die Zudosierung der Supplemente zu den Basis-Nährmedien über eine Sterilfiltration (vgl. 7.2.2.1).

### 4.3 Supplementierungsversuche mit Hefen

Basierend auf dem per Screening ermittelten Verteilungsmuster der detektierten Carotinoide und den jeweiligen Gesamt-Carotinoidgehalten sowie unter Berücksichtigung der biotechnologischen Nutzbarkeit, Kultivierbarkeit und Pathogenität wurden als Test-Hefen für die Supplementierungsversuche *Rhodotorula spp.* (Faeces-Isolat) und *Phaffia rhodozyma* ausgewählt.

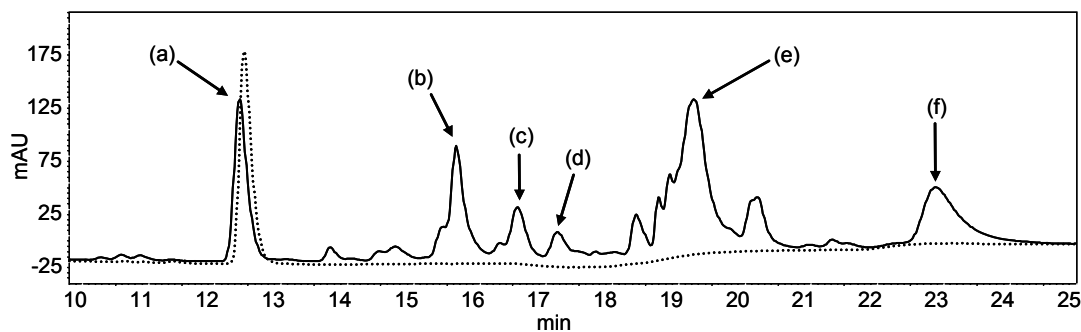
#### 4.3.1 Supplementierung von *Rhodotorula spp.*

Die Vertreter der Gattung *Rhodotorula* synthetisieren neben Torularhodin, Torulen und einigen weiteren Minor-Carotinoiden auch  $\beta$ -Carotin (WEBER et al. 2007, PERRIER et al. 1995). Allerdings ist die Menge des in verschiedenen Wildstämmen von *Rhodotorula spp.* produzierten  $\beta$ -Carotins ( $\beta$ CAR) im Vergleich zu anderen Pilz-Arten relativ gering (WANG et al. 2007a, CIEGLER 1965). Außerdem besitzen *Rhodotorula spp.* eine sehr rigide Zellwand, was die Extrahierbarkeit der Carotinoide aus den Zellen erheblich erschwert (SIMPSON et al. 1977, PETERSON et al. 1957, KARRER et al. 1978). Auf Grund des geringeren  $\beta$ CAR-Gehaltes und der robusten Zellwand der Hefe gestaltet sich die Nutzung des mit Hilfe von *Rhodotorula spp.* biotechnologisch produzierten  $\beta$ CAR als schwierig (BHOSALE et al. 2001c, WANG et al. 2007a). Gleichwohl besitzen *Rhodotorula spp.* gegenüber anderen Pilzen, Algen und Bakterien den Vorteil eines unizellularen Wachstums und einer relativ hohen Wachstumsrate bei gleichzeitig sehr niedrigen Anforderungen an das Wachstumsmedium, weshalb die Hefe für eine biotechnologische Produktion im Großmaßstab prinzipiell gut eignet ist (MALISORN 2008, WANG et al. 2007a). Des Weiteren wurden *Rhodotorula spp.* auch auf der Oberfläche einiger Rotschmierkäse-Sorten nachgewiesen (BOCKELMANN et al. 2005). Inwieweit die von *Rhodotorula spp.* synthetisierten Carotinoide die Farbgebung derartiger Käseprodukte mitbestimmen, wurde jedoch bislang noch nicht untersucht.

Um die Carotinoide von *Rhodotorula spp.* als farbgebende Futtermittel-Zusätze verwenden zu können, gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann die Bioverfügbarkeit der Carotinoide aus der Hefezelle durch geeignete Behandlungsverfahren erhöht werden. Hierbei können Verfahren, wie die Sprühtrocknung oder eine Vorbehandlung der Zellen mit Säure die Bioverfügbarkeit der Hefe-Carotinoide für bestimmte Tierarten erhöhen (MOCANU et al. 1997, BHOSALE et al. 2003b, AN et al. 2003). Die resultierenden Formulierungen können industriell im Großmaßstab preisgünstig produziert und als Futtermittel-Zusätze gewinnbringend eingesetzt werden. Zum anderen kann aber auch durch eine Erhöhung des Gesamt-Carotinoidgehaltes (Bioakkumulation) bzw. des Gehaltes einzelner Carotinoide die bioverfügbare Menge gesteigert werden. Die Optimierung der Bioakkumulation kann über die Variation der Wachstumsbedingungen bzw. des für die Carotinoid-Biosynthese erforderlichen Nährstoffangebotes erfolgen. Im Folgenden sind die bei *Rhodotorula spp.* (Faeces-Isolat) erzielten Ergebnisse der durchgeführten Supplementierungsversuche dargestellt (vgl. Abbildungen 39 u. 40):

Der unter der Verwendung von Malz-Extrakt-Agar (Basis-Nährmedium und Kontrolle) ermittelte Gesamt-Carotinoidgehalt, der Gehalt an  $\beta$ -Carotin ( $\beta$ CAR) und der Gehalt an Torulen (TOR) stimmen gut mit den Angaben für *Rhodotorula glutinis* aus der Literatur überein (FRENGOVA et al. 1997). Lediglich der für Torularhodin (THI) bestimmte Gehalt ist um etwa 40% geringer als der in der Literatur angegebene (FRENGOVA et al. 1997). Werden allerdings die Peaks vor und hinter dem Torularhodin-Peak

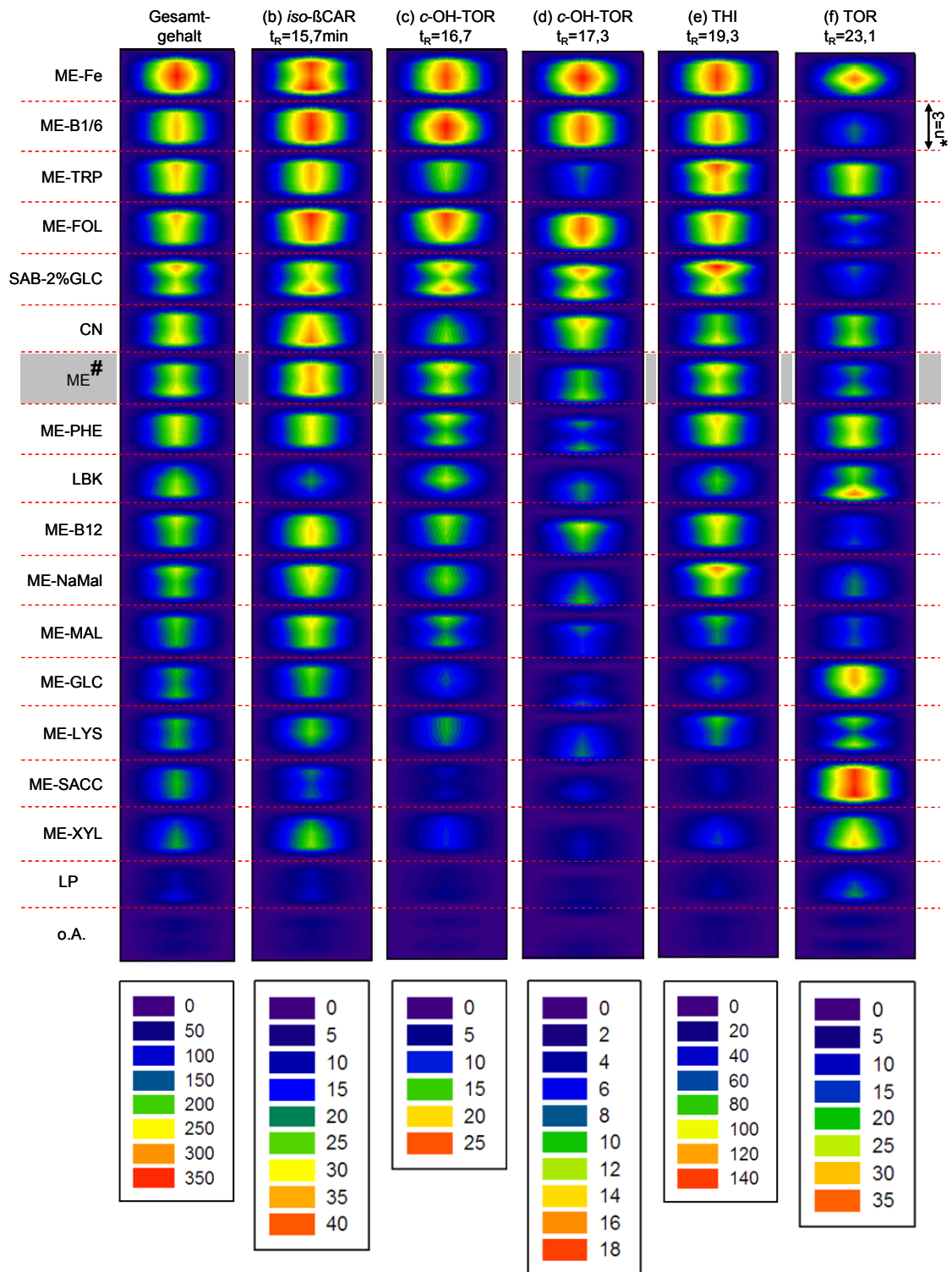
(vgl. Abbildung 39) mit hinzugerechnet, entspricht der THI-Gehalt dem der Literatur. Dem UV-VIS-Spektrum nach könnte es sich bei diesen Peaks um *cis*-Isomere von THI handeln. Durch die Verwendung einer RP-C<sub>30</sub>-Phase wurden diese mit aufgetrennt, wodurch vermutlich die Abweichung des bestimmten THI-Gehaltes zustande kommt.



**Abbildung 39:** Chromatogramme aus den Supplementierungsversuchen von *Rhodotorula spp.* (Faeces-Isolat), durchgezogene Linie: Extrakt von *Rhodotorula spp.* dotiert mit internem Standard  $\beta$ APO (ISTD), gepunktete Linie: Direkteinspritzung des dotierten ISTD als Einzellauf zum Vergleich, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 50 mM AAC [min-%]: 0-0, 13-65, 15-100, 18-100, 23-0, 25-0; RP-C<sub>30</sub>-Phase Bischoff-Chromatography (Batch 1), T<sub>s</sub> = 12°C, Flow: 1,3 ml/min, Peak-Identitäten: (a)  $\beta$ APO (ISTD), (b) *iso*- $\beta$ CAR [v.ID], (c) und (d) *c*-OH-TOR [v.ID], (e) THI [v.ID] (f) TOR [v.ID] (Abkürzungen vgl. Abkürzungsverzeichnis und Abbildung 40).

Die stärkste Zunahme des Gesamt-Carotinoidgehaltes bewirkte die Supplementierung mit Eisen-(III)-Chlorid. Über die Wirkung von Eisen-(III)-Chlorid auf *Rhodotorula spp.* ist in der Literatur bislang nichts bekannt. Allerdings wurde unter der Supplementierung von *Rhodotorula spp.* mit Eisen-(II)-Sulfat eine Verlängerung der Generationszeit beobachtet (KOMEMUSHI et al. 1994). Ähnliches zeigten auch die Ergebnisse der Versuche dieser Arbeit. Das Wachstum von *Rhodotorula spp.* auf den Kontrollplatten (ME-Agar) war wesentlich stärker und schneller, als auf den mit Eisen-(III)-Chlorid supplementierten Agar-Platten. Eine Erhöhung der Carotinoid-Ausbeute bei gleichzeitiger Minderung der Biomasse-Akkumulation (vermindertes Wachstum auf der Platte) wurde ebenso bei der Supplementierung von *Rhodotorula spp.* mit Thiamin/Riboflavin und bei der Supplementierung mit Folsäure beobachtet. Die Tatsache, dass einige Supplemente die Carotinoid-Bioakkumulation erhöhen, die Ausbeute an Biomasse aber gleichzeitig mindern, schränkt den Einsatz derartiger Substanzen zur Steigerung der Carotinoid-Ausbeute bei biotechnologischen Verfahren ein. Möglicherweise kann durch eine Änderung der eingesetzten Konzentration solcher Stoffe oder durch die Kombination solcher Stoffe mit weiteren Supplementen ein Optimum an Biomasse-Ausbeute und Carotinoid-Ausbeute und damit eine bessere Gesamtausbeute erzielt werden.

Eine deutliche Erhöhung des Gesamt-Carotenoidgehaltes wurde unter der Supplementierung des Basis-Nährmediums mit der Aminosäure Tryptophan erzielt (vgl. Abbildung 40). Zugleich wurde dabei der Anteil an THI leicht erhöht. Im Gegensatz dazu erzielte der Zusatz von Phenylalanin einen dem reinen Basis-Nährmedium (ME-Agar) ähnlichen Gesamt-Carotenoidgehalt, wobei allerdings das Carotinoid-Spektrum deutlich in Richtung TOR und THI verschoben wird. Dass Aminosäuren die Carotinoid-Ausbeute von Hefen auch mindern können, beweist der im Vergleich zur Kontrolle (Malz-Extrakt-Agar) festgestellte geringere Gesamt-Carotenoidgehalt bei Supplementierung von *Rhodotorula spp.* mit Lysin (vgl. Abbildung 40). Hefen bevorzugen im Allgemeinen ein leicht saures Wachstumsmedium (SÜßMUTH et al. 1999). Demzufolge wird die bei der Supplementierung des Mediums mit der basischen Aminosäure Lysin beobachtete Minderung des Carotinoidgehaltes vermutlich durch eine Anhebung des pH-Wertes im Medium verursacht.



**Abbildung 40:** Ergebnisse der Supplementierungsversuche von *Rhodotorula* spp. (Faeces-Isolat); die Carotinoide einschließlich des Gesamt-Carotinoidgehaltes sind horizontal angeordnet, die jeweiligen Supplemente sowie das Basis-Nährmedium (ME#, kein Supplement zugesetzt) sind vertikal angeordnet, die Carotinoidgehalte sind in  $\mu\text{g/g}$  [LY] als Farben dargestellt, pro Diagrammpunkt sind drei Einzelwerte (\*n=3) untereinander angegeben (dadurch kein Informationsverlust infolge einer Mittelwertbildung und somit an der Formbildung des Datenpunktes „echte“ Einzelwerte ablesbar, insgesamt n=54 Proben), die rot-gepunkteten Linien trennen einzelne Supplemente innerhalb eines Balkens, ein Beispielchromatogramm für die in der Abbildung aufgeführten Carotinoide [(b), (c), (d), (e), (f)] mit den zugehörigen Peaks und Retentionszeiten ( $t_R$ ) ist in Abbildung 39 dargestellt, Abkürzungen alphabetisch: at-βCAR *all-trans*-β-Carotin, B1/6 Thiamin/Riboflavin-Mischung, B12 Cyanocobalamin, c *cis*-Isomer, CN *Candida* Elektivagar nach Nickersen (Bismut), FE Eisen-(III)-Chlorid, GLC Glucose, FOL Folsäure, *iso* Isomer (geometrisch), LBK Luria-Bertani-Kanamycin Agar, LP Lysis-Puffer (anstelle des etablierten Aufschlussverfahrens, vgl. 2.3.3), LYS L-Lysin, MAL Maltose, ME Malz-Extrakt-Agar (Basis-Nährmedium), NaMal Natrium-Malonat, o.A. ohne vorherigen Zellaufschluss, OH Hydroxy, PHE L-Phenylalanin, THI Torularhodin, TOR Torulen, TRP L-Tryptophan, SAB Sabouraud-Agar, SACC Saccharose, XYL Xylose; verwendete Konzentrationen der Supplemente vgl. 7.2.2.1 .

Die höchsten Gehalte an  $\beta$ CAR in *Rhodotorula spp.* wurden unter einer Supplementierung des Basis-Nährmediums mit Eisen, mit Thiamin/Riboflavin und mit Folsäure erzielt (vgl. Abbildung 40). Die genannten Substanzen können dabei als Vitamine (Co-Enzyme), Präkursoren oder aber auch als Stimulantien wirken. Natrium-Malonat erzielte einen deutlich geringeren Gehalt an Carotinoiden und kann daher von der Hefe offensichtlich nicht als Präkursor im Carotinoid-Stoffwechsel verwendet werden.

Die getesteten Zucker (Maltose, Saccharose, Glucose und Xylose) zeigten im Gegensatz zu anderen Arbeiten (AKSU et al. 2005, GOVINDASWAMY et al. 1999) und im Vergleich zur Kontrolle sogar eine Minderung des Gesamt-Carotinoidgehaltes (vgl. Abbildung 40). Die unterschiedlichen Befunde kommen möglicherweise dadurch zustande, weil in diesen Arbeiten andere Stämme (*Rhodotorula mucilaginosa*, u.w.), abweichende Aufzuchtbedingungen (Schüttelkultur etc.) und eine niedrigere Konzentration der Zucker zur Supplementierung verwendet wurden. *Rhodotorula spp.* synthetisieren zum Teil erst in der späten stationären Phase (nach Abschluss der Zellproliferation) Carotinoide bzw. erst dann, wenn der im Nährmedium verfügbare Zucker aufgebraucht ist (SOMASHEKAR et al. 2000, MATELLI et al. 1990). Möglicherweise waren trotz neun Tagen Wachstums von *Rhodotorula spp.* auf der Platte noch Zucker vorhanden, wodurch die Carotinoid-Biosynthese gehemmt wurde. Das Wachstum der Hefe auf den Platten (Biomasse-Ausbeute) war unter der Zucker-Supplementierung hingegen sehr gut. Prinzipiell stehen die vorliegenden Ergebnisse im Einklang mit denen von SOMASHEKAR et al. (2000), wonach sich die Carotinoid-Biosynthese invers zum Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis im Nährmedium verhält. Folglich kann sich die Carotinoid-Biosynthese vermindern, wenn ausschließlich der Zuckergehalt des Basis-Nährmediums erhöht wird, d.h., wenn das Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis im Nährmedium ansteigt. Für die biotechnologische Produktion bedeutet dies, dass bei der Anzucht nur so viel Zucker verwendet werden sollte, wie notwendig ist, um die gewünschte Biomasse zu erzeugen (entsprechend der Fermenter-Größe). Nach dem Abschluss der Zellproliferation sollte der Anteil an unverbrauchten Zuckern so klein sein, dass die anschließende Carotinoid-Biosynthese durch ein ungünstiges Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis im Nährmedium nicht gehemmt wird. Beispielsweise wurde mit einer Supplementierung von nur 2% Glucose (Sabouraud-Agar) eine erkennbare Steigerung des Gesamt-Carotinoidgehaltes unter sonst identischen Aufzuchtbedingungen erzielt (vgl. Abbildung 40).

Interessanterweise wurde unter der Saccharose-Supplementierung unabhängig vom Gesamt-Carotinoidgehalt der höchste Gehalt an TOR ermittelt. Auch unter der Glucose-Supplementierung zeigte sich eine Anreicherung von TOR gegenüber allen anderen Hauptcarotinoiden (Anteil > 15% vom Gesamt-Carotinoidgehalt). Weniger deutlich ausgeprägt trat dieser Effekt bei einer Supplementierung mit Xylose oder bei der Verwendung von Luria-Bertani-Grundnährmedium supplementiert mit Kanamycin (0,1%) auf. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass die bei einer übermäßigen Versorgung von *Rhodotorula spp.* mit Zucker beobachtete Hemmung der Carotinoid-Bildung nicht ausschließlich am Anfang der Carotinoid-Biosynthese eingreift. Die Carotenoid-Biosynthese bei *Rhodotorula spp.* verzweigt sich ab  $\gamma$ CAR zu  $\beta$ CAR und TOR, wobei letzteres oxidativ weiter zu THI umgesetzt wird (SIMPSON et al. 1964 u. 1977). Offensichtlich wird, insofern ausreichend Zucker für ein weiteres Wachstum der Hefen vorhanden ist,  $\gamma$ CAR zunächst weiter zu TOR verstoffwechselt. Die Bildung von  $\beta$ CAR aus  $\gamma$ CAR (zweite Ringzyklisierung) und die weitere Oxidation von TOR zu THI (Bildung einer Carboxylgruppe) werden hingegen gehemmt. Die Ergebnisse bestätigen die

eingangs aufgestellte These, dass durch gewisse Supplemente die Carotinoid-Biosynthese gezielt in bestimmte Richtungen verschoben werden kann („gelenkte Biosynthese“).

Trotz des verminderten Wachstums (Biomasse-Ausbeute) von *Rhodotorula spp.* unter Eisen-(III)-Chlorid, ist die Substanz biotechnologisch gesehen das attraktivste der getesteten Supplemente zur Steigerung der Carotenoid-Ausbeute. Eisen-(III)-Chlorid ist kommerziell preisgünstig erhältlich, nachhaltig einsetzbar und hitzestabil (ohne Zersetzung bzw. Verlust autoklavierbar). Des Weiteren ist die zur Supplementierung verwendete Konzentration an Eisen-(III)-Chlorid toxikologisch unbedenklich. Darüber hinaus wird unter der Supplementierung mit Eisen-(III)-Chlorid das Carotinoid-Spektrum von *Rhodotorula spp.* in Richtung  $\beta$ CAR verschoben. Folsäure und die Mischung der Vitamine B<sub>1</sub> und B<sub>6</sub> führen zwar zu einer stärkeren Zunahme des  $\beta$ CAR-Anteils in *Rhodotorula spp.*, sind aber als Supplemente weder hitzestabil noch preisgünstig erhältlich. Hier gilt es preisgünstige INAPs (vgl. 4.1) zu finden, die den notwendigen Gehalt dieser Stoffe in einer für die Hefe bioverfügbaren Form aufweisen. Durch die Kombination mit weiteren Supplementen, vor allem mit solchen, die eine höhere Biomasse-Ausbeute (Zellproliferation) bewirken, kann letztlich die Carotinoid-Ausbeute optimiert werden.

Die Daten der Versuche ohne einen adäquaten Zellaufschluss bzw. bei Ersetzen des Zellaufschlusses durch einen Zell-Lyse-Puffer, welcher zur DNA-Extraktion aus Hefen verwendet wird, zeigten einen vergleichsweise geringen Carotinoidgehalt. Die Ergebnisse heben somit nochmals deutlich die Notwendigkeit einer adäquaten Zellaufschluss-Methode bei der Analytik mikrobieller Carotinoide hervor (vgl. Kapitel 2).

Prinzipiell zeigen die Ergebnisse für *Rhodotorula spp.* in ihrer Größenordnung gute Übereinstimmungen mit den bisherigen Daten aus der Literatur. Gleichwohl ist zu beachten, dass die Werte (d.h. der Carotinoidgehalt und das Carotinoidmuster) unter abweichenden Aufzucht- und Analysen-Bedingungen erzielt wurden. Für einen genauen Vergleich der Werte mit denen der Literatur sind standardisierte Methoden und standardisierte Bedingungen notwendig.

### 4.3.2 Supplementierung von *Phaffia rhodozyma*

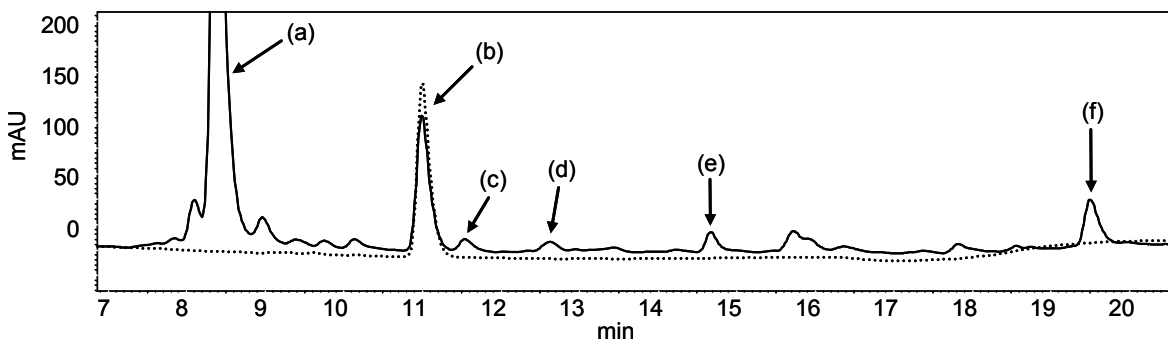
Die Hefe *Phaffia rhodozyma* (syn. *Xanthophyllomyces dendrorhous*) ist neben bestimmten Algen (wie z.B. *Haematococcus pluvialis*), Schalentieren (*Crustaceae*) und der chemischen Synthese eine der vier kommerziellen Quellen für das Ketocarotinoid Astaxanthin (ARMSTRONG et al. 1994, PO-FUNG et al. 2005, SACHINDRA et al. 2007).

Ursprünglich wurde die Hefe aus einem Ahornbaum isoliert (MILLER et al. 1976). Sie zeigt kaum Ähnlichkeit mit anderen rot oder orange gefärbten Hefen, welche streng aerob sind und überwiegend  $\beta$ CAR und/oder monocyclische Carotinoide synthetisieren (GOODWIN et al. 1980). Deshalb und auch weil die Hefe Astaxanthin (AST) synthetisiert und Zucker fermentieren kann, ist *Phaffia rhodozyma* ein besonderer Vertreter der *Basidiomyceten* (ANDREWS et al. 1976). Hierbei erfolgt die Biosynthese von AST durch die Hefe überwiegend erst nach der Assimilation der Zucker (NI et al. 2007). Ferner ist die absolute Konfiguration des von *Phaffia rhodozyma* synthetisierten AST (3R,3'R) einzigartig (GREWE et al. 2007). In allen anderen Organismen, wie beispielsweise in Algen, ist die Konfiguration von AST 3S,3'S (ANDREWS et al. 1976, DOMINGUEZ-BOCANEGRA et al. 2007). Dieser Unterschied in der Konfiguration kann beispielsweise bei der Differenzierung von konventionell gefarmten Fischbeständen und Fischbeständen aus biologischer Aufzucht hilfreich sein (OSTERMEYER et al. 2004). So dürfen Lachse aus ökologischem Landbau mit *Phaffia rhodozyma*,

nicht jedoch mit chemisch-synthetisch gewonnenem AST (z.B. Carophyll Pink<sup>®</sup>, Carophyll Red<sup>®</sup>) gefüttert werden. Synthetisches AST lässt sich anhand seiner variablen Konfiguration nachweisen, da das Produkt synthesebedingt stets eine Mischung der Isomere 3R,3'R AST, 3R,3'S AST und 3S,3'S AST enthält (OSTERMEYER et al. 2004, TURUJMAN 1993). AST, welches auf der Basis einer chemischen Synthese produziert wurde, ist im Vergleich zu anderen Carotinoiden, wie beispielsweise  $\beta$ CAR, ein sehr preisintensiver Futtermittel-Zusatzstoff (JOHNSON et al. 1991). Entsprechend können bis zu 20% der Kosten des Fischfutters zur Fütterung von Salmoniden in Aquakultur auf AST entfallen (CHOUBERT et al. 2009, NI et al. 2007, JOHNSON et al. 1991). Trotz der vergleichsweise hohen Kosten von AST zeigt die Substanz als Futtermittel-Zusatzstoff einen stetig wachsenden Marktanteil (GREWE et al. 2007, GUERIN et al. 2003). Dabei ist in Futtermittel-Formulierungen die Stabilität von synthetischem AST schlechter als die Stabilität von „natürlichem“ AST in Formulierungen auf Basis von *Phaffia rhodozyma* (STOREBAKKEN et al. 2004, ANDERSON et al. 2002). Seit der Entdeckung von AST in *P. rhodozyma* wurden dementsprechend viele Untersuchungen zur Verwendung der Hefe insbesondere als Futtermittelzusatz zur Pigmentierung von tierischen Lebensmitteln durchgeführt (WALDENSTEDT et al. 2003, JOHNSON et al. 1977 und 1980 a/b). Dabei wurden in den bisherigen Untersuchungen der Wild-Hefe Gesamt-Carotinoidgehalte von bis zu 400  $\mu$ g/g (TS) bestimmt, wobei der Anteil von AST zwischen 45% und 95% betrug (JOHNSON et al. 2003, LODATO et al. 2007). In der Alge *Haematococcus pluvalis* ist die Konzentration an AST zwar höher, jedoch hat die Hefe den Vorteil, dass sich das Ketocarotinoid auf Grund der wesentlich schnelleren Zellvermehrung von *P. rhodozyma* gegenüber der Alge wesentlich leichter produzieren lässt (JOHNSON et al. 2003, NI et al. 2008). Demzufolge bietet *Phaffia rhodozyma* gegenwärtig die beste Möglichkeit, um AST als Futtermittel-Zusatzstoff preisgünstig biotechnologisch zu gewinnen (NI et al. 2007, JOHNSON et al. 1991 und 2003). Infolgedessen und infolge zahlreicher Patente wurde Astaxanthin (E161) aus *P. rhodozyma* (ATCC 74219) auch für Alleinfuttermittel für Forellen und für Lachse in der EU (mit max. 100 mg/kg in der Summe mit Canthaxanthin) und in den USA (mit max. 8 mg/kg) zugelassen (VO (EG) Nr. 2316/98, VO (EG) Nr. 1288/2004, VÁZQUEZ et al. 1998). Analog *Rhodotorula spp.* ist auch bei *Phaffia rhodozyma* der bioverfügbare Anteil der Carotinoide aus der Hefe-Zelle ein limitierender Faktor. Insbesondere, wenn aufgeschlossene Zellen zum Futter hinzugesetzt werden, wird AST gut absorbiert, wodurch in der Folge Fisch- und Geflügelfleisch sowie Eidotter effizient mit dem Ketocarotinoid gefärbt werden können (FRENGOVA et al. 1997). Zugleich ist der bioverfügbare und somit der in der Farbgebung des Lebensmittels wirksame Anteil von Carotinoiden aus *P. rhodozyma* prinzipiell von dem absoluten Carotinoidgehalt der Hefe abhängig. Entsprechend beschäftigten sich manche Arbeiten auch mit der Optimierung des Wachstums und des Carotinoidgehaltes der Hefe. Die Informationen über die Effekte unterschiedlicher Zusammensetzungen des Kultivierungsmediums auf die Carotinoidbiosynthese von *P. rhodozyma* sind jedoch begrenzt und basieren nahezu ausschließlich auf der Anzucht der Hefe in Schüttelkultur (NI et al. 2007, PARAJÓ et al. 1998, VÁZQUEZ et al. 1997). Deswegen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der in Kapitel 2 entwickelten Methode verschiedene für *Phaffia rhodozyma* relevante Supplemente zur gezielten Beeinflussung des Carotinoid-Spektrums und zur Optimierung der Carotinoid-Ausbeute getestet werden. Einerseits sollten mit Hilfe der Supplementierungsversuche solche Substanzen gefunden werden, die die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute von *P. rhodozyma* erhöhen. Zum anderen sollten solche Substanzen gefunden werden, die einen hohen Anteil von AST am Gesamt-Carotinoidgehalt bewirken.

Die Ergebnisse der Supplementierungsversuche von *Phaffia rhodozyma* (Abbildungen 41 u. 42) zeigen folgendes:

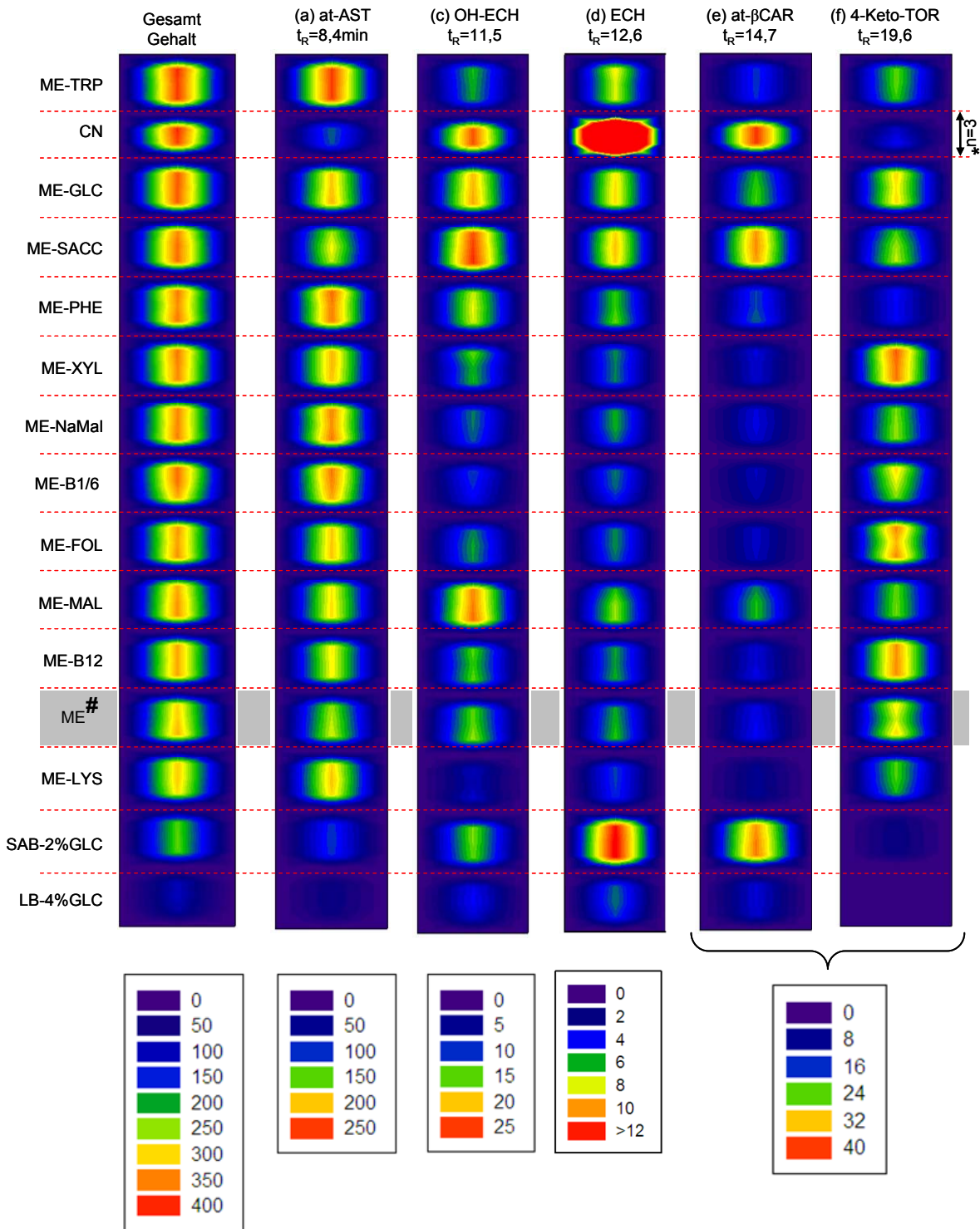
Der für den untersuchten Wildstamm von *Phaffia rhodozyma* (DSMZ Nr.: 5626) unter gewöhnlichen Aufzucht-Bedingungen (Malz-Extrakt-Agar, Kontrolle) ermittelte Gesamt-Carotinoidgehalt von 307 µg/g [LY] liegt innerhalb des in der bisherigen Literatur angegebenen Intervalls von 200 µg/g bis 400 µg/g (TS) (LODATO et al. 2007). Von allen getesteten Supplementen bewirkte Tryptophan mit 388 µg/g [LY] den höchsten Gesamt-Carotinoidgehalt und einen Gehalt an AST von 220 µg/g [LY] (entsprechend 56,7% [m/m] bezogen auf den Gesamt-Carotinoidgehalt [b.a. GCG]). Der auf den Gesamt-Carotinoidgehalt von *P. rhodozyma* bezogene höchste Anteil an AST (58,2% [m/m]) wurde durch die Supplementierung des Basis-Nährmediums mit der Aminosäure Phenylalanin erzielt. Den niedrigsten Anteil an AST (24,7% [b.a. GCG]) bewirkte die Aufzucht der Hefe auf Candida-Elektivagar nach Nickersen mit Bismut. Unter denselben Bedingungen wurde jedoch der höchste Gehalt an Echinenon (ECH, 33 µg/g [LY]) erzielt und ein deutlich erhöhter βCAR Gehalt (40 µg/g [LY]) festgestellt. Der höchste Anteil an βCAR (10% [b.a. GCG]) wurde unter Anzucht der Hefe auf Saboraud-Agar mit 2% [m/V] Glucose-Zusatz erzielt. Analog der Verwendung von Candida-Elektivagar nach Nickersen bewirkte das Saboraud-Medium eine deutliche Verschiebung des Carotinoid-Spektrums in Richtung ECH und βCAR.



**Abbildung 41:** Chromatogramme aus den Supplementierungsversuchen von *Phaffia rhodozyma* (syn. *Xanthophyllomyces dendrorhous*), durchgezogene Linie: Extrakt von *P. rhodozyma* dotiert mit internem Standard βAPO (ISTD), gepunktete Linie: Direkteinspritzung des dotierten ISTD als Einzellauf zum Vergleich, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 50 mM AAc [min-%]: 0-0, 13-65, 15-100, 18-100, 23-0, 25-0; RP-C<sub>30</sub>-Phase Bischoff-Chromatography (Batch 1), T<sub>s</sub>=20°C, Flow: 1,3 ml/min, Peak-Identitäten: (a) at-AST [g.ID], (b) ISTD (βAPO), (c) OH-ECH [v.ID], (d) ECH [v.ID], (e) at-βCAR [g.ID], (f) 4-Keto-TOR [v.ID], (Abkürzungen vgl. Abkürzungsverzeichnis und Abbildung 42).

Den niedrigsten Gesamt-Carotinoidgehalt (93 µg/g [LY]) im Rahmen des Versuches bewirkte die Anzucht der Hefe auf Luria-Bertani-Agar mit einem Zusatz von 4% [m/V] Glucose. Die Synthese von AST durch *Phaffia rhodozyma* beginnt frühestens am Ende der exponentiellen Wachstumsphase der Hefe, wobei sie insbesondere dann induziert wird, wenn die freie Glucose des Mediums aufgebraucht ist (LODATO et al. 2007, AN et al. 1989). Die Ergebnisse der Supplementierungen mit 2% Glucose (SAB) und 4% Glucose (LB) zeigen, dass diese Menge an Glucose nach neun Tagen Wachstum offenbar noch nicht vollständig verstoffwechselt wurde und die Hefe folglich im Vergleich zur Kontrolle weniger AST synthetisiert. Demgegenüber wurde unter der Supplementierung mit 1,6% Glucose (entsprechend 87,5 mM) im Vergleich zum Basis-Nährmedium eine deutliche Steigerung des Gesamt-Carotinoidgehaltes erreicht. Die für das exponentielle Wachstum der Hefe auf Platten in neun Tagen assimilierbare Menge an Glucose im Basis-Nährmedium liegt demzufolge zwischen 1,6% und 2%.





**Abbildung 42:** Ergebnisse der Supplementierungsversuche von *Phaffia rhodozyma* (*syn. Xanthophyllomyces dendrorhous*); die Carotinoide einschließlich des Gesamt-Carotinoidgehaltes sind horizontal angeordnet, die jeweiligen Supplemente sowie das Basis-Nährmedium (ME#, kein Supplement zugesetzt) sind vertikal angeordnet, die jeweiligen Carotinoidgehalte sind in  $\mu\text{g/g}$  [LY] als Farben dargestellt, pro Diagrammpunkt sind drei Einzelwerte ( $n=3$ ) untereinander angegeben (dadurch kein Informationsverlust infolge einer Mittelwertbildung und somit an der Formbildung des Datenpunktes „echte“ Einzelwerte ablesbar, insgesamt  $n=45$  Proben), die rot-gepunkteten Linien trennen einzelne Supplemente innerhalb eines Balkens, ein Beispielchromatogramm für die in der Abbildung aufgeführten Carotinoide [(a), (c), (d), (e), (f)] mit den zugehörigen Peaks und Retentionszeiten ( $t_r$ ) ist in Abbildung 41 dargestellt, Abkürzungen alphabetisch: at-AST *all-trans*-Astaxanthin, at-βCAR *all-trans*-β-Carotin, B1/6 Thiamin/Riboflavin-Mischung, B12 Cyanocobalamin, CN *Candida* Elektivagar nach Nickersen (Bismut), ECH Echinenon, GLC Glucose, FOL Folsäure, LYS *L*-Lysin, MAL Maltose, ME Malz-Extrakt-Agar (Basis-Nährmedium), NaMal Natrium-Malonat, OH Hydroxy, PHE *L*-Phenylalanin, TOR *Torulena*, TRP *L*-Tryptophan, SAB Saboraud-Agar, SACC Saccharose, XYL Xylose; verwendete Konzentrationen der Supplemente vgl. 7.2.2.1 .

Ähnlich der Glucose-Supplementierung (1,6% [m/V]) konnte auch mit der Zugabe von Xylose und mit der Zugabe von Saccharose (jeweils 1,6% [m/V]) zum Basis-Nährmedium die Gesamt-Carotinoid-Ausbeute leicht erhöht werden. Die Ergebnisse der Anzucht der Hefe auf Platten ähneln dabei den bisherigen Erkenntnissen mit Schüttelkulturen (VAZQUEZ et al. 1997). Der Anteil an AST am Gesamt-Carotinoidgehalt änderte sich dabei jedoch um weniger als 5% (von 48% auf 52% bei Xylose und von 48% auf 44% bei Saccharose). Zugleich bewirkte die Xylose-Supplementierung die stärkste Verschiebung des Carotinoid-Spektrums in Richtung 4-Keto-Torulen (36,5 µg/g [LY]). Demgegenüber bewirkte die Supplementierung des Basis-Nährmediums mit Saccharose die stärkste Verschiebung des Carotinoid-Spektrums in Richtung Hydroxy-Echinenon (25 µg/g [LY]), einer Zwischenstufe von ECH und AST (SANDMANN et al. 2002a, BRAMLEY et al. 2005, JAYARAJ et al. 2007).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Zugabe verschiedener Zucker zu einem Basis-Nährmedium das Carotinoid-Spektrum der Hefe variabel beeinflusst werden kann. Hierbei zeigt insbesondere Xylose biotechnologisch nutzbare Eigenschaften, da durch die Supplementierung mit diesem Zucker sowohl der Gesamt-Carotinoidgehalt, als auch der Anteil an AST am Gesamtgehalt erhöht wird (PARAJÓ et al. 1998, VÁZQUEZ et al. 1998). Im Gegensatz zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Zuckern existieren in der Literatur für die untersuchten Aminosäuren bislang keinerlei vergleichbare Daten. Die Ergebnisse zeigen hier, dass insbesondere Tryptophan und Phenylalanin biotechnologisch nutzbar sind, da durch sie sowohl der Gesamt-Carotinoidgehalt positiv beeinflusst wird, als auch das Carotinoid-Spektrum in Richtung AST verschoben wird.

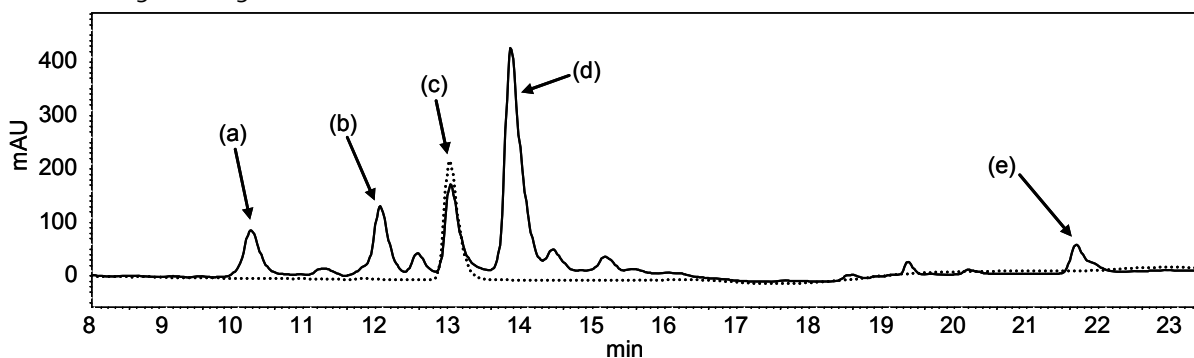
### 4.4 Supplementierungsversuche mit Bakterien

Basierend auf dem im Screening ermittelten Verteilungsmuster der detektierten Carotinoide und den bestimmten Gesamt-Carotinoidgehalten sowie unter Berücksichtigung der biotechnologischen und lebensmittel-technologischen Bedeutung wurden als Test-Bakterien für die Supplementierungsversuche *Arthrobacter luteus*, *Brevibacterium linens* und *Micrococcus luteus* ausgewählt. Die gewählten Bakterien sind u.a. Bestandteil der oberflächlichen Mikroflora bestimmter Rotschmierkäse-Sorten (MOUNIER et al. 2005, BOCKELMANN et al. 1997b u. 2001, BRENNAN et al. 2002, GALAUP et al. 2005). Auf Grund der Fähigkeit zur Synthese von orange-roten bis gelblichen Carotinoiden sind die Gattungen der genannten Arten maßgeblich an der Farbgebung der Käserinde beteiligt (GALAUP et al. 2005). Demzufolge bestimmen die Menge und das Spektrum der gebildeten Carotinoide auch die sensorische Qualität derartiger Produkte mit. Die Ausprägung der mikrobiellen Carotinoid-Synthese wiederum kann von den jeweiligen Wachstumsbedingungen abhängen. Aus diesem Grund sollte anhand der folgenden Versuche der Einfluss bestimmter Supplemente auf die Pigmentbildung der oben genannten Bakterien untersucht werden.

#### 4.4.1 Supplementierung von *Micrococcus luteus*

*Micrococcus luteus* zählt neben anderen *Micrococccen*, *Corynebacterien*, *Mycobacterien*, *Nocardien* und *Rhodococccen* zu den am häufigsten vorkommenden Luftkeimen, die im Vergleich zu anderen Gattungen in starkem Umfang Pigmente bilden (STEINBÜCHEL et al. 2003, ARMSTRONG 1997). Die gelbe Pigmentierung von *Micrococcus luteus* (syn. *Sarcina lutea*) wird ausschließlich durch Carotinoide hervorgerufen (HERTZBERG

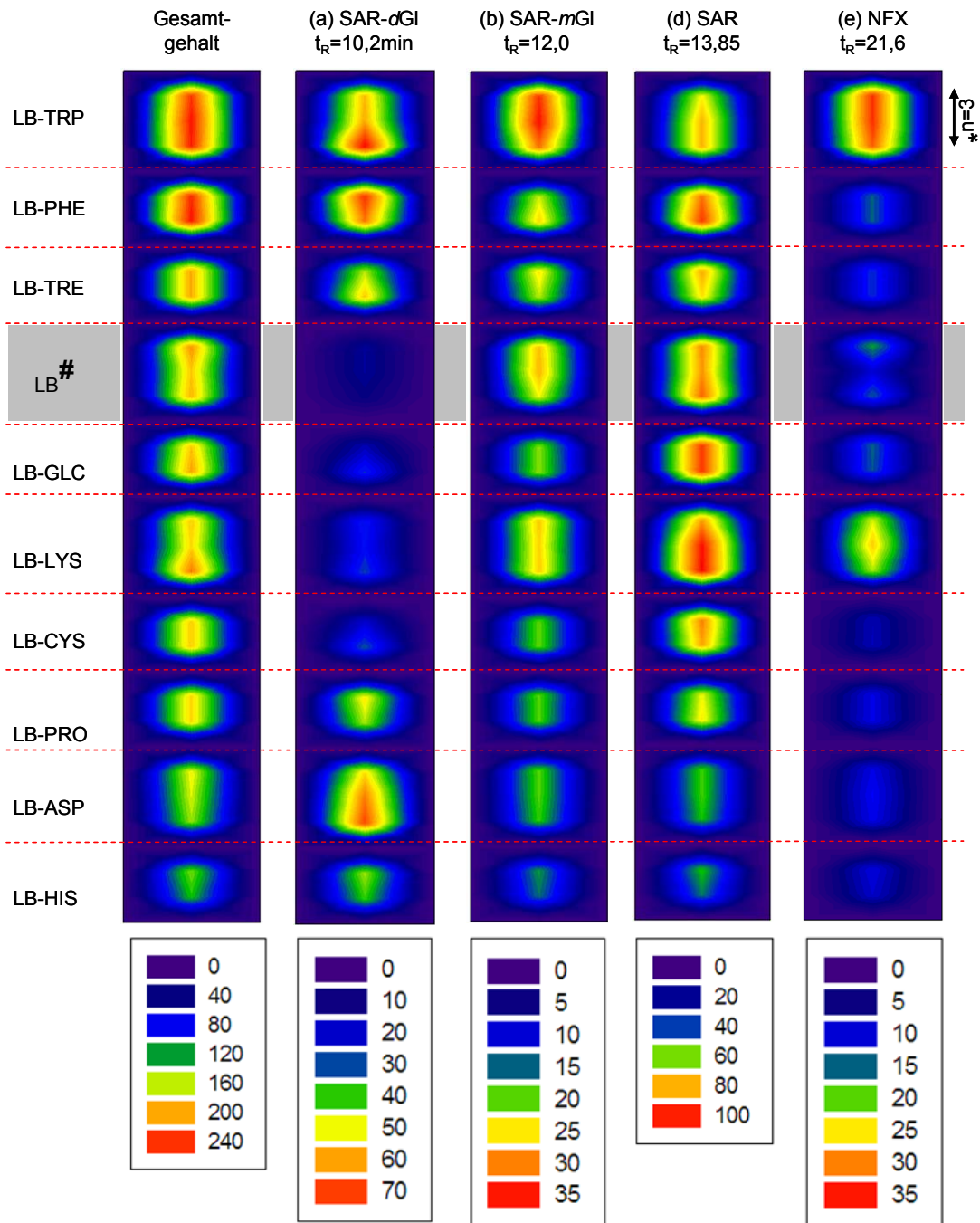
et al. 1977, NORGARD et al. 1970, BRITTON 2004). Die biochemische Funktion von Carotinoiden bei *Micrococcus spp.* ist der Schutz der Bakterien vor letalen Photooxidationen. Bei aeroben Luftkeimen werden diese besonders durch die Bildung von Singulett-Sauerstoff verursacht (ASCENZI et al. 1975, DIERINGER et al. 1977). Durch ihre Fähigkeit zur Bildung von Carotinoiden beeinflussen *Micrococcus spp.* auch die Farbgebung der Oberfläche bestimmter Rotschmierkäse-Sorten (BOCKELMANN et al. 2005, MOUNIER et al. 2005). *M. luteus* synthetisiert bevorzugt *mono*- und *di*-glycosidisch-substituierte Carotinoide (HERTZBERG et al. 1977, NORGARD et al. 1970, BRITTON 2004). Aus diesem Grund sollte mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methode (vgl. Kapitel 2) der Einfluss unterschiedlicher Supplemente auf das Carotinoid-Glycosid-Muster des Bakteriums untersucht werden. Die hierzu erforderliche chromatographische Auftrennung der *mono*- und *di*-Carotinoid-Glycoside sowie die Auftrennung der unsubstituierten Hauptcarotinoide einschließlich einiger *cis*-Isomere und einschließlich dem internen Standard ( $\beta$ APO) ist in Abbildung 43 dargestellt.



**Abbildung 43:** Chromatogramme aus den Supplementierungsversuchen von *Micrococcus luteus* (*syn. Sarcina lutea*), durchgezogene Linie: Extrakt von *M. luteus* dotiert mit internem Standard  $\beta$ APO (ISTD), gepunktete Linie: Direkteinspritzung des dotierten ISTD als Einzellauf zum Vergleich, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 50 mM AAc [min-%]: 0-0, 13-57, 15-100, 18-100, 23-0, 25-0; RP-C<sub>30</sub>-Phase Bischoff-Chromatography (Batch 1), T<sub>s</sub> = 10°C, Flow: 1,3 ml/min, Peak-Identitäten: (a) Sarcinaxanthin-*di*-Glycosid (SAR-*dGI*, [v.ID]), (b) Sarcinaxanthin-*mono*-Glycosid (SAR-*mGI*, [v.ID]), (c) ISTD ( $\beta$ APO), (d) Sarcinaxanthin (SAR, [v.ID]), (e) Nonaflavuxanthin (NFX, [v.ID]), (Abkürzungen vgl. Abkürzungsverzeichnis und Abbildung 44).

Die Ergebnisse der Supplementierungsversuche von *Micrococcus luteus* zeigen folgendes (vgl. Abbildung 44):

Werden dem Basis-Nährmedium (LB-Agar) keine zusätzlichen Supplemente beigemischt, beträgt der für *Micrococcus luteus* ermittelte durchschnittliche Gesamtgehalt an Carotinoiden 193,9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  [LY]. Unter der Supplementierung des Basis-Nährmediums mit Phenylalanin oder mit Tryptophan steigt der Gesamt-Carotinoidgehalt (GCG) von *M. luteus* um über 20 % an (bei Phenylalanin auf 242,25  $\mu\text{g}/\text{mg}$  [LY], bei Tryptophan auf 240,81  $\mu\text{g}/\text{mg}$  [LY]). Dabei bewirkt Tryptophan von allen getesteten Supplementen gleichzeitig den höchsten Gehalt an Nonaflavuxanthin, während der Zusatz von Phenylalanin den höchsten Gehalt an Sarcinaxanthin-*mono*-Glycosid erzeugt. Alle anderen getesteten Supplemente senken den GCG in *M. luteus*. Die geringsten GCGs wurden unter dem Zusatz von Asparaginsäure (159,59  $\mu\text{g}/\text{mg}$  [LY]) und Histidin (134,85  $\mu\text{g}/\text{mg}$  [LY]) gemessen. Die Befunde von Asparaginsäure und Histidin zeigen, dass die Absenkung des GCG gegenüber dem Basis-Nährmedium nicht durch eine Verschiebung des pH-Wertes im Nährmedium zustande kommt. Unabhängig vom sinkenden GCG erzeugte Asparaginsäure eine deutliche Verschiebung des Carotinoid-Spektrums in Richtung von Sarcinaxanthin-*di*-Glycosid. Der Anteil von Sarcinaxanthin-*di*-Glycosid am GCG betrug bei Aufzucht des Bakteriums auf dem reinen Basis-Nährmedium etwa 26,0%, während er unter der Supplementierung mit Asparaginsäure auf 38,1% anstieg.



**Abbildung 44:** Ergebnisse der Supplementierungsversuche von *Micrococcus luteus* (*syn. Sarcina lutea*); die Carotinoide einschließlich des Gesamt-Carotinoidgehaltes sind horizontal angeordnet, die jeweiligen Supplemente sowie das Basis-Nährmedium (LB#, kein Supplement zugesetzt) sind vertikal angeordnet, die Carotinoidgehalte sind in µg/g [LY] als Farben dargestellt, pro Diagrammpunkt sind drei Einzelwerte (\*n = 3) untereinander angegeben (dadurch kein Informationsverlust infolge einer Mittelwertbildung und somit an der Formbildung des Datenpunktes „echte“ Einzelwerte ablesbar, insgesamt n = 30 Proben), die rot-gepunkteten Linien trennen einzelne Supplemente innerhalb eines Balkens, ein Beispielchromatogramm für die in der Abbildung aufgeführten Carotinoide [(a), (b), (d), (e)] mit den zugehörigen Peaks und Retentionszeiten ( $t_R$ ) ist in Abbildung 43 dargestellt, Abkürzungen alphabetisch: ASP *L*-Asparaginsäure, CYS *L*-Cystein, GLC Glucose, HIS *L*-Histidin, LB Luria-Bertani-Agar (Basis-Nährmedium), LYS *L*-Lysin, NFX Nonaflavuxanthin, PHE *L*-Phenylalanin, PRO *L*-Prolin, SAR Sarcinaxanthin, SAR-*d*GI Sarcinaxanthin-*d*-Glycosid, SAR-*m*GI Sarcinaxanthin-*mono*-Glycosid, TRE *L*-Threonin, TRP *L*-Tryptophan; verwendete Konzentrationen der Supplemente vgl. 7.2.2.1 .

Im Gegensatz dazu bewirkte der Zusatz von Lysin zum Basis-Nährmedium eine deutliche Verschiebung des Carotinoid-Spektrums in Richtung der nicht-glycosidisch gebundenen Carotinoide Sarcinaxanthin (Anteil am GCG 49,5%) und Nonaflavuxanthin (Anteil am GCG 12,2%). Die Lysin-Supplementierung bewirkte von allen Supplementen auch den höchsten Gehalt an nicht-glycosidisch gebundenem Sarcinaxanthin (94,5 µg/g [LY]) und den zweithöchsten Gehalt an Nonaflavuxanthin (23,5µg/g [LY]).

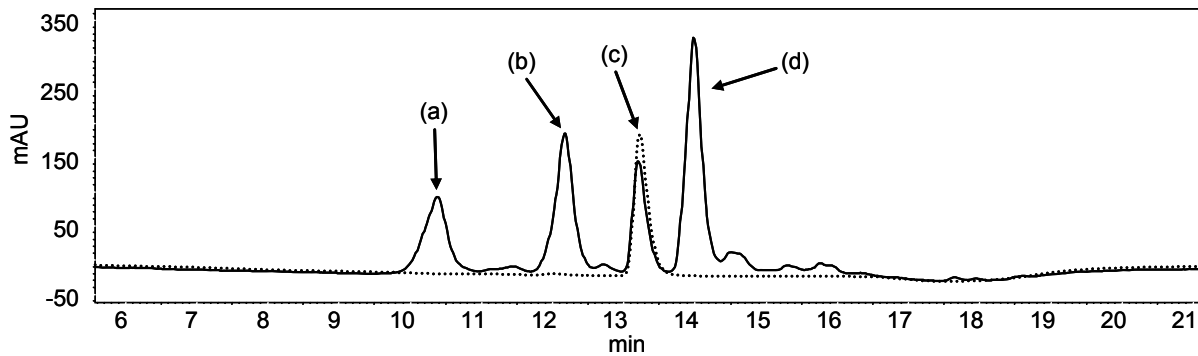
Die Ergebnisse zeigen, dass sich bei *M. luteus* sowohl das Spektrum verschiedener Carotinoide als auch der Substitutionsgrad mit Zuckern durch eine Supplementierung mit Aminosäuren gezielt beeinflussen lassen. Hierbei erzeugen die meisten der getesteten Aminosäuren jedoch eine Minderung des GCG des Bakteriums. Einzig Tryptophan und Phenylalanin bewirkten einen deutlichen Anstieg des GCG des Bakteriums.

Supplemente, die eine Absenkung des GCG bewirken, eignen sich prinzipiell weniger gut für die Optimierung der biotechnologischen Carotinoid-Produktion. Daher wurden einige Aminosäuren, welche bei *M. luteus* eine Absenkung des GCG bewirkten, in den folgenden Supplementierungsversuchen bei *Arthrobacter luteus* und *Brevibacterium linens* nicht erneut getestet.

#### 4.4.2 Supplementierung von *Arthrobacter luteus*

*Arthrobacter luteus* ist ein unter verschiedenen synonymen Bezeichnungen, wie *Cellulosemicrobium cellulans*, *Cellulomonas cellulans* und *Oerskovia xanthineolytica*, bekannter aerober Bodenkeim (FERRER 2006, SCHUMANN et al. 2001). Das Bakterium ist nahe verwandt mit der Gattung *Brevibacterium* und synthetisiert eine Reihe biotechnologisch wertvoller glucanolytischer und proteolytischer Enzyme (FERRER 2006, SCOTT et al. 1980, ONRAEDT et al. 2005). Darüber hinaus besitzen einige *Arthrobacter spp.* die Fähigkeit der Biosynthese von Carotinoiden, wobei ähnlich *M. luteus* auch glycosidisch substituierte C<sub>50</sub>-Carotinoide gebildet werden können (FONG et al. 2001, ARPIN et al. 1972, FIASSON 1976, BRITTON 2004). Für den gelb pigmentierten *Arthrobacter luteus* sind sowohl das Carotinoid-Spektrum als auch der Einfluss des Wachstumsmediums auf die Carotinoid-Biosynthese noch nicht ausreichend untersucht. Dennoch trägt *A. luteus* durch die Bildung von Carotinoiden entscheidend zur Farbgebung der Rinde einiger Käsesorten bei (BOCKELMANN et al. 1997a/b u. 2001, BARRY 1999).

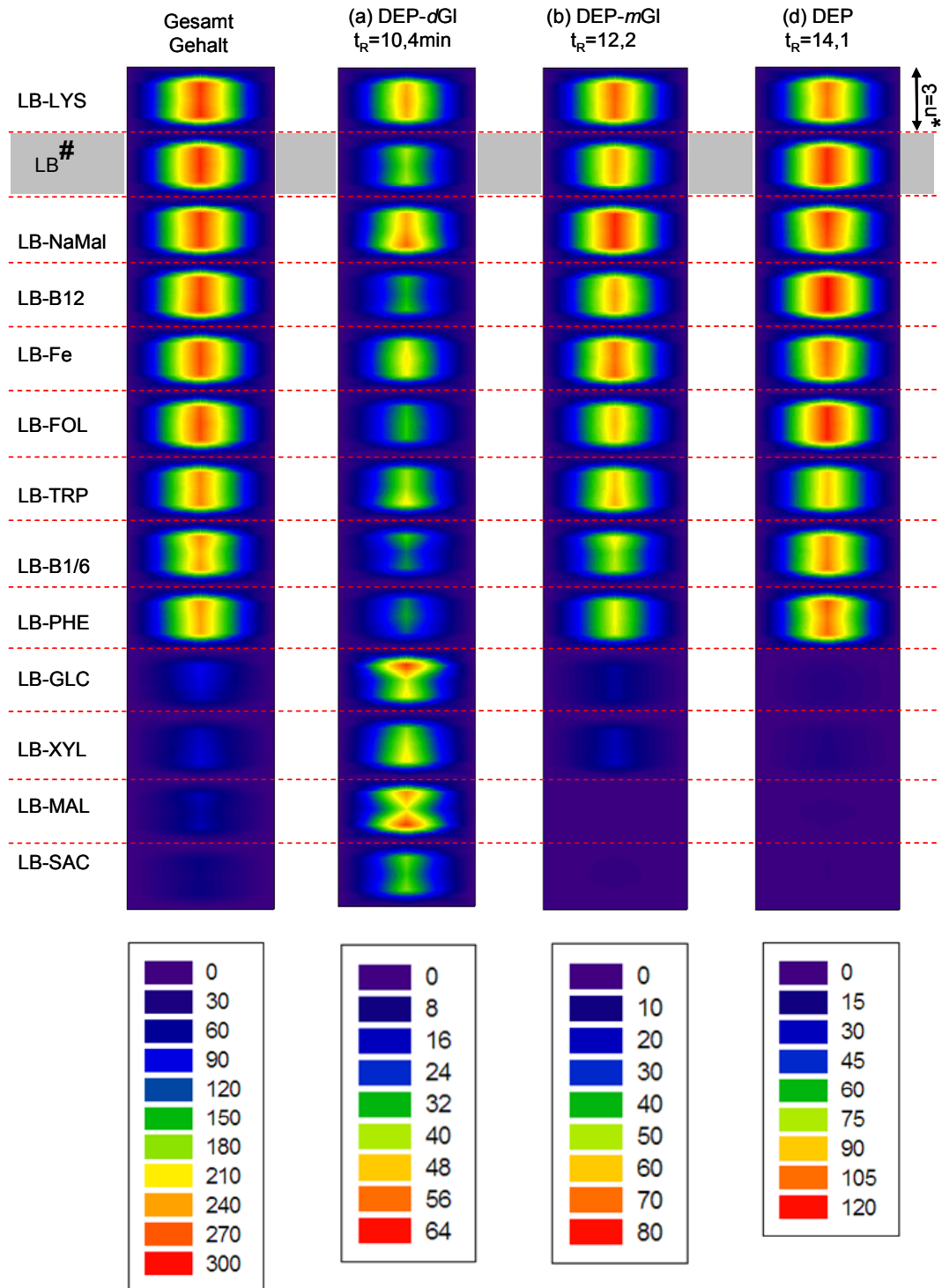
Aus diesem Grund wurde für *A. luteus* mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methode (vgl. Kapitel 2) der Einfluss unterschiedlicher Supplemente auf das Carotinoid-Spektrum des Bakteriums untersucht. Die verwendete chromatographische Auftrennung der Hauptcarotinoide einschließlich des internen Standards zeigt Abbildung 45. Das erhaltene Carotinoid-Spektrum ähnelt dem von *Micrococcus luteus* da auch bei *Arthrobacter luteus* ein *mono*- und ein *di*-glycosidisch-substituiertes Carotinoid neben der unsubstituierten Form auftreten. Jedoch zeigt *Arthrobacter luteus* eine Verteilung von drei Hauptcarotinoiden, wohingegen bei *Micrococcus luteus* vier Hauptcarotinoide chromatographisch aufgetrennt werden konnten (vgl. Abbildungen 43 u. 45).



**Abbildung 45:** Chromatogramme aus den Supplementierungsversuchen von *Arthrobacter luteus*, durchgezogene Linie: Extrakt von *A. luteus* dotiert mit internem Standard  $\beta$ APO (ISTD), gepunktete Linie: Direkteinspritzung des dotierten ISTD als Einzellauf zum Vergleich, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 50 mM AAc [min-%]: 0-0, 13-57, 15-100, 18-100, 23-0, 25-0; RP-C<sub>30</sub>-Phase Bischoff-Chromatography (Batch 1), T<sub>s</sub> = 12°C, Flow: 1,3 ml/min, Peak-Identitäten: (a) Decaprenoxanthin-*di*-glycosid (DEP-*d*GI, [v.ID]), (b) Decaprenoxanthin-*mono*-glycosid (DEP-*m*GI, [v.ID]), (c) ISTD ( $\beta$ APO), (d) Decaprenoxanthin (DEP, [v.ID]), (Abkürzungen vgl. Abkürzungsverzeichnis und Abbildung 46).

Die Ergebnisse der Supplementierungsversuche von *Arthrobacter luteus* zeigen folgendes (vgl. Abbildung 46): Im Gegensatz zu *Micrococcus luteus* konnte bei *Arthrobacter luteus* durch die Zugabe verschiedener Supplemente im Vergleich zum Basis-Nährmedium (LB-Agar) keine Steigerung des Gesamt-Carotinoidgehaltes (GCG) erzielt werden. Die Nährmedienzusätze Lysin, Natrium-Malonat, Vitamin B<sub>12</sub> und Eisen-(III)-Chlorid erzeugten einen der Kontrolle (LB-Medium) ähnlichen GCG von etwa 282  $\mu$ g/g [LY]. Unabhängig davon bewirkte der Zusatz von Lysin, Natrium-Malonat und Eisen-(III)-Chlorid eine leichte Verschiebung des Carotinoid-Spektrums in Richtung des *mono*-glycosidisch substituierten Decaprenoxanthins (Erhöhung von 22,4% auf über 25%; bezogen auf den GCG [b.a. GCG]). Demgegenüber wurde mit der Zugabe von Vitamin B<sub>12</sub> eine leichte Verschiebung des Carotinoid-Spektrums in Richtung des unsubstituierten Decaprenoxanthins erzeugt (Erhöhung von 40,8% auf 43,3% [b.a. GCG]). Eine ähnliche Verschiebung des Carotinoid-Spektrums bei jedoch deutlich vermindertem Gesamt-Carotinoidgehalt (270,2  $\mu$ g/g [LY]) bewirkte der Zusatz von Folsäure zum Basis-Nährmedium (Erhöhung von 40,8% auf 43,0% [b.a. GCG]).

Die stärkste Abnahme des GCG (um über 70% gegenüber der Kontrolle mit 282  $\mu$ g/g [LY]) erzeugten die getesteten Zucker Xylose, Maltose, Glucose und Saccharose. Eine Minderung der bakteriellen Carotinoid-Biosynthese durch eine Supplementierung des Nährmediums mit Zuckern ist zwar bekannt, der Mechanismus jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (AMITABHA et al. 2007, LEE et al. 2004a, MERRITT et al. 1978). Unabhängig von der Minderung des GCG bewirkten die getesteten Zucker die stärkste Verschiebung des Carotinoid-Spektrums in Richtung des *di*-glycosidisch substituierten Decaprenoxanthins (Anteile Decaprenoxanthin-*di*-Glycosid jeweils b.a. GCG: Basis-Nährmedium 14,0%; Xylose 52,0%; Glucose 65,6%; Maltose 76,5%; Saccharose 83,0%). Offenbar werden durch die Anreicherung des Nährmediums mit Zucker besonders die initialen Schritte der Carotinoid-Biosynthese gehemmt. Alle nachfolgenden Biosynthese-Schritte wie die Glycosilierung bleiben offenbar unberührt oder werden sogar gefördert, wodurch der erhöhte Anteil an *di*-glycosidisch substituiertem Decaprenoxanthin zustande kommt. Eine weitaus weniger stark ausgeprägte Verschiebung des Carotinoid-Spektrums in Richtung des *di*-glycosidisch substituierten Decaprenoxanthins bewirkte die Supplementierung mit Natrium-Malonat, Eisen-(III)-Chlorid und die Supplementierung mit den Aminosäuren Lysin und Tryptophan (Steigerung um mindestens 2% [b.a. GCG]).



**Abbildung 46:** Ergebnisse der Supplementierungsversuche von *Arthrobacter luteus*, die Carotinoide einschließlich des Gesamt-Carotinoidgehaltes sind horizontal angeordnet, die jeweiligen Supplemente sowie das Basis-Nährmedium (LB#, kein Supplement zugesetzt) sind vertikal angeordnet, die Carotinoidgehalte sind in µg/g [LY] als Farben dargestellt, pro Diagrammpunkt sind drei Einzelwerte (\*n=3) untereinander angegeben (dadurch kein Informationsverlust infolge einer Mittelwertbildung und somit an der Formbildung des Datenpunktes „echte“ Einzelwerte ablesbar, insgesamt n=39 Proben), die rot-gepunkteten Linien trennen einzelne Supplemente innerhalb eines Balkens, ein Beispielchromatogramm für die in der Abbildung aufgeführten Carotinoide [(a), (b), (d), (e)] mit den zugehörigen Peaks und Retentionszeiten (t<sub>r</sub>) ist in Abbildung 45 dargestellt, Abkürzungen alphabetisch: B1/6 Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>6</sub> Mischung, B12 Vitamin B<sub>12</sub>, DEP-dGI Decaprenoxanthin-*d*-glycosid, DEP-mGI Decaprenoxanthin-*mono*-glycosid, DEP Decaprenoxanthin, FE Eisen-(III)-Chlorid, FOL Folsäure, GLC Glucose, LB Luria-Bertani-Agar (Basis-Nährmedium), LYS L-Lysin, MAL Maltose, PHE L-Phenylalanin, SACC Saccharose, TRP L-Tryptophan, XYL Xylose; verwendete Konzentrationen der Supplemente vgl. 7.2.2.1 .

Interessanterweise erzeugte die Zugabe der Aminosäure Phenylalanin einen gegenteiligen Effekt, d.h. eine Verminderung des Anteils an *di*-glycosidisch gebundenem Decaprenoxanthin (-1,8% [b.a. GCG]) und eine Erhöhung des unsubstituierten Decaprenoxanthins (um ca. 3% [b.a. GCG]).

Die Ergebnisse zeigen, dass der GCG mit Hilfe der getesteten Supplemente nicht erhöht, das Carotinoid-Spektrum jedoch erheblich beeinflusst werden kann. Eine Änderung des Spektrums der von *Arthrobacter spp.* gebildeten Carotinoide ist z.B. bei der Käsereifung von Bedeutung. Möglicherweise resultieren die bei der Reifung der Käse gelegentlich auftretenden Fehlfarben der Käseoberfläche aus einer Änderung des Carotinoid-Spektrums von *Arthrobacter spp.* (BARRY 1999, BOCKELMANN et al. 2001 und 2005, GALAUP et al. 2005). Die Bildung abweichender Farbnuancen könnte das Ergebnis einer weiteren Modifizierung der Struktur von Carotinoiden aus *Arthrobacter spp.* durch Enzyme anderer Carotinoid-produzierender Arten wie beispielsweise *Brevibacterium linens* sein. Voraussetzung hierfür ist ein Austausch artfremder Carotinoide, z.B. über Diffusionsvorgänge.

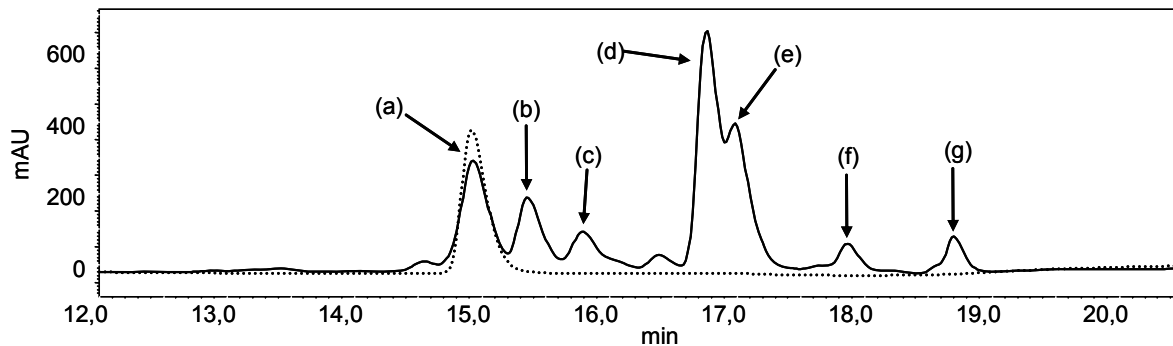
Prinzipiell nimmt die Hydrophilie von Carotinoiden durch eine glycosidische Substitution deutlich zu, wodurch u.a. auch ihre Dispergierbarkeit in Wasser erheblich verbessert wird (FOSS et al. 2005). Darüber hinaus ist *Brevibacterium linens* durch die Synthese einer Reihe von lytischen Enzymen in der Lage, Zellen der Begleitflora vollständig oder partiell zu lysieren (BOCKELMANN et al. 2001). Durch eine enzymatische Lyse von *Arthrobacter luteus* Zellen werden Carotinoide freigesetzt und eine anschließende Diffusion insbesondere glycosidisch substituierter Carotinoide wird ermöglicht. Hierbei kann es zu einem Substrataustausch von Carotinoiden zwischen zwei Arten und in der Folge zur enzymatischen Verstoffwechslung von artfremden Carotinoiden zu solchen mit abweichendem Farbton (sog. Fehlfarben) kommen. Über einen, den beschriebenen Supplementierungsversuchen, analogen Versuchsaufbau kann die hier beschriebene Theorie mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Methode adäquat überprüft werden.

### 4.4.3 Supplementierung von *Brevibacterium linens*

Das äußere Erscheinungsbild - insbesondere die Farbigkeit - von Lebensmitteln ist beim Verbraucher ein entscheidendes Kriterium, welches mit über den Erwerb eines Produktes entscheidet (GALAUP et al. 2005). *Brevibacterium linens* ist die Hauptkomponente der Mikroflora roter Schmierkäse-Kulturen und beeinflusst auf Grund seiner Fähigkeit zur Biosynthese von Carotinoiden die Farbe der Käserinde nachhaltig (EPPERT et al. 1997, GALAUP et al. 2005, KOHL et al. 1983, SEILER et al. 1986). Darüber hinaus synthetisiert *B. linens* extrazelluläre Proteasen, die während des Reifevorganges Proteine abbauen (ONRAEDT et al. 2005, FRINGS et al. 1993). Einige der dabei entstehenden Aminosäuren (insbesondere Phenylalanin und Tryptophan) werden von dem Bakterium weiter verstoffwechselt, wodurch u.a. charakteristische Aromakomponenten des Käses entstehen (RATTRAY et al. 1999). Demzufolge wird bei Rotschmierkäsen (Limburger, Romadour, Maroilles, Taleggio, Munster, Appenzeller und Tilsiter) bei der Prüfung der sensorischen Qualität des Produktes insbesondere die Farbe der schmierigen Oberfläche in Verbindung mit dem Aroma, dem Reifezustand und der Zusammensetzung der Konkurrenzflora beurteilt (DUFOSSÉ et al. 2001, KOLLÖFFEL et al. 1999). Für die sensorische Qualität solcher Käsesorten ist demzufolge nicht nur die Menge an farbgebenden Carotinoiden sondern auch das Farb-Spektrum der von *B. linens* gebildeten Carotinoide von Bedeutung. Ob dabei die infolge der Enzym-Exkretion von *B. linens* entstandenen Stoffwechselprodukte, wie beispielsweise Aminosäuren, einen Einfluss auf die Carotinoid-Biosynthese ausüben, ist bislang nicht untersucht worden.

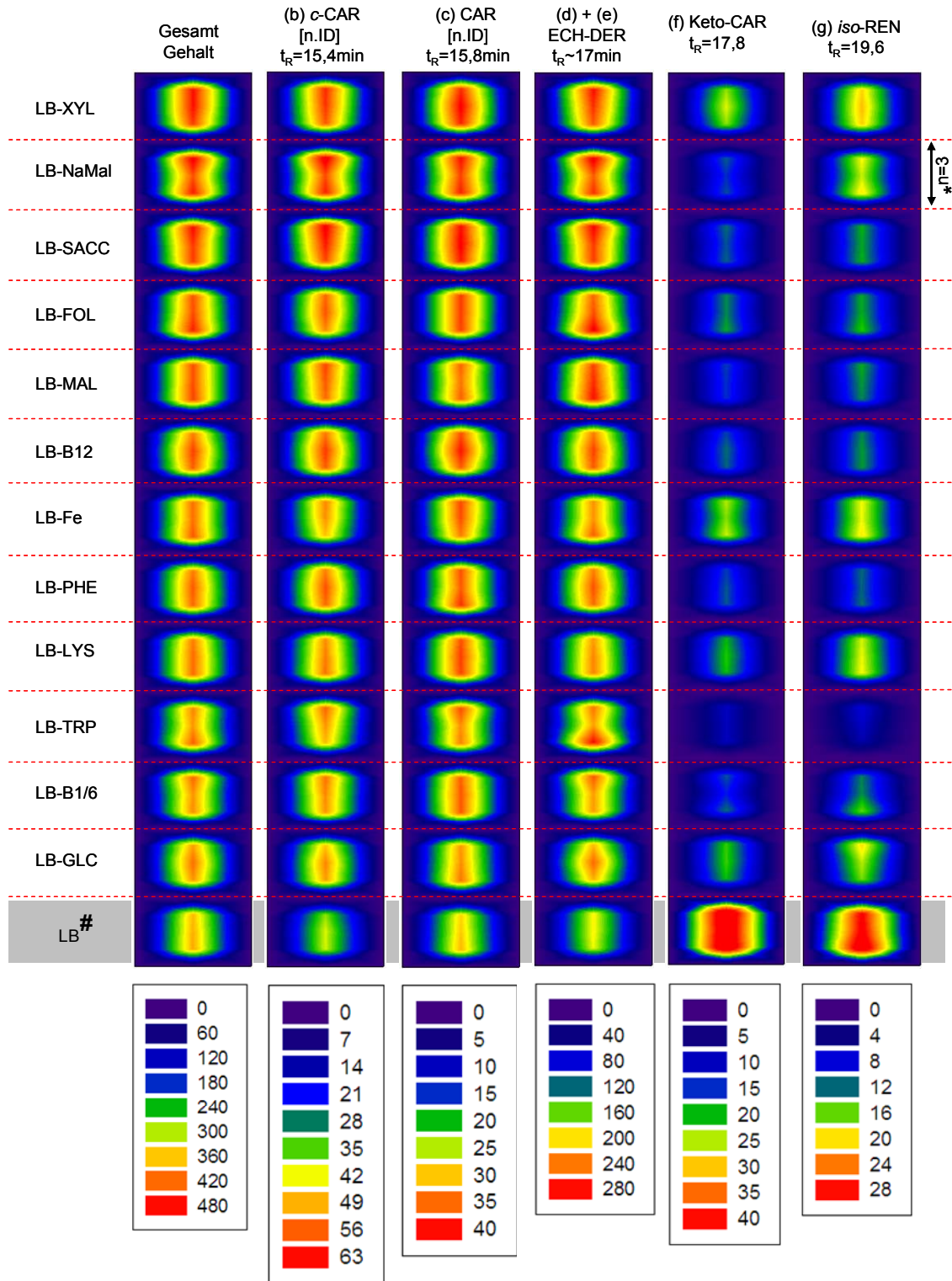


Vor diesem Hintergrund wurde mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methode (vgl. Kapitel 2) der Einfluss verschiedener Supplemente auf das Carotinoid-Spektrum von *Brevibacterium linens* untersucht. Die Ergebnisse der Supplementierungsversuche von *B. linens* sind nachfolgend dargestellt (vgl. Abbildungen 47 und 48).



**Abbildung 47:** Chromatogramme aus den Supplementierungsversuchen von *Brevibacterium linens*, durchgezogene Linie: Extrakt von *B. linens* dotiert mit internem Standard  $\beta$ APO (ISTD), gepunktete Linie: Direkteinspritzung des dotierten ISTD als Einzellauf zum Vergleich, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 50 mM AAC [min-%]: 0–0, 12–65, 14–100, 16–100, 21–0, 25–0; RP-C<sub>30</sub>-Phase Bischoff-Chromatography (Batch 1), T<sub>s</sub> = 10°C, Flow: 0–16 min (0,9 ml/min), 16–21min (1,2 ml/min), 21–25 min (0,9 ml/min), Peak-Identitäten: (a) ISTD  $\beta$ APO, (b) unidentifiziertes *cis*-Isomer (*c*-CAR [n.ID]), (c) unidentifiziertes Carotinoid (CAR [n.ID]), (d) Echinenon (ECH [v.ID]), (e) Echinenon-Derivat (ECH-DER, [v.ID]), (f) Keto-Carotinoid-Derivat (Keto-CAR, [n.ID]), (g) Isoreniraten (iso-REN [v.ID]), (Abkürzungen vgl. Abkürzungsverzeichnis und Abbildung 48).

Der für *Brevibacterium linens* unter verschiedenen Supplementierungen ermittelte Gesamt-Carotinoidgehalt (GCG) betrug zwischen 360  $\mu$ g/g [LY] und 495  $\mu$ g/g [LY]. Die bestimmten Gehalte stimmten mit denen bei 29 verschiedenen *B. linens ssp.* von DuFOSSÉ et al. (2001) ermittelten Carotinoidgehalten (146  $\mu$ g/g bis 975  $\mu$ g/g b.a. Zelltrockenmasse) überein. Zugleich wird deutlich, dass der GCG zwischen verschiedenen *B. linens ssp.* stärker variiert, als durch die getesteten Nährmedienzusätze bewirkt werden kann. In Übereinstimmung dazu zeigen die Ergebnisse des Supplementierungsversuches von *B. linens* auch eine relativ geringe Variation des Carotinoid-Spektrums d.h., ein relativ konstantes Verteilungsmuster der Hauptcarotinoide (vgl. Abbildung 48). Beispielsweise betrug die Variationsbreite der ersten beiden eluierenden Carotinoide (vgl. Peak (b) und Peak (c) in Abbildung 47) weniger als 1,5% [b.a. GCG] bzw. weniger als 1% [b.a. GCG]. Im Allgemeinen wird anhand der Ergebnisse deutlich, dass das Carotinoid-Spektrum von *Brevibacterium linens* im Vergleich zu *Micrococcus luteus* und *Arthrobacter luteus* nur mäßig durch Nährmedienzusätze beeinflussbar ist (vgl. Abbildungen 44, 46, 48). Gleichwohl bewirkten alle bei *B. linens* getesteten Supplemente im Vergleich zur Kontrolle eine messbare Steigerung des GCG - bei Xylose und Natrium-Malonat sogar um bis zu 25% [b.a. GCG]. Dabei führten die getesteten Zucker (ausgenommen Glucose) generell zu einer stärkeren Zunahme des GCG (18% bis 25% [b.a. GCG]), als die getesteten Aminosäuren (8% bis 12% [b.a. GCG]). Des Weiteren ist, trotz der bei Xylose und Natrium-Malonat beobachteten gleichstarken Zunahme des GCG, das resultierende Carotinoid-Spektrum nicht völlig identisch. Unter der Natrium-Malonat-Supplementierung ist der Anteil des Keto-Carotinoides (vgl. Peak (f) in Abbildung 47) etwas niedriger (3,4% [b.a. GCG]) als unter dem Zusatz von Glucose zum Basismedium (5,3% [b.a. GCG]).



**Abbildung 48** Ergebnisse der Supplementierungsversuche von *Brevibacterium linens*; die Carotinoide einschließlich des Gesamt-Carotinoidgehaltes sind horizontal angeordnet, die jeweiligen Supplemente sowie das Basis-Nährmedium (LB#, kein Supplement zugesetzt) sind vertikal angeordnet, die Carotinoidgehalte sind in  $\mu\text{g/g}$  [LY] als Farben dargestellt, pro Diagrammpunkt sind drei Einzelwerte (\* $n=3$ ) untereinander angegeben (dadurch kein Informationsverlust infolge einer Mittelwertbildung und somit an der Formbildung des Datenpunktes „echte“ Einzelwerte ablesbar, insgesamt  $n=39$  Proben), die rot-gepunkteten Linien trennen einzelne Supplemente innerhalb eines Balkens, ein Beispielchromatogramm für die in der Abbildung aufgeführten Carotinoide [(b), (c), (d), (e), (f), (g)] mit den zugehörigen Peaks und Retentionszeiten ( $t_R$ ) ist in Abbildung 47 dargestellt, Abkürzungen alphabetisch: B1/6 Vitamin B<sub>1</sub> und B<sub>6</sub> Mischung, B12 Vitamin B<sub>12</sub>, CAR [n.ID] nicht identifiziertes Carotinoid, *c*-CAR [n.ID] nicht identifiziertes *cis*-Carotinoid, DER Derivat, ECH Echinenon, FE Eisen-(III)-Chlorid, FOL Folsäure, GLC Glucose, iso Isomer (geometrisches), LB Luria-Bertani-Agar (Basis-Nährmedium), LYS L-Lysin, MAL Maltose, NaMal Natrium-Malonat, PHE L-Phenylalanin, REN Reniraten, SACC Saccharose, TRP L-Tryptophan, XYL Xylose; verwendete Konzentrationen der Supplemente vgl. 7.2.2.1 .

Mengenmäßig besitzen die Echinenon-Derivate jeweils den größten Anteil am GCG. Unter der Maltose- und unter der Tryptophan-Supplementierung ist dieser am größten (61% [b.a. GCG]) und bei Verwendung des reinen Basis-Nährmediums am kleinsten (51% [b.a. GCG]). Im Gegensatz zum Echinenon-Anteil wurden beim Wachstum von *Brevibacterium linens* auf dem reinen Basis-Nährmedium der höchste Gehalt an *iso*-Reniraten (8,2% [b.a. GCG]) und der höchste Gehalt an einem *Keto*-Carotenoid (13,2% [b.a. GCG]) gemessen. Bei Verwendung eines Nährmedienzusatzes wurde, unabhängig von der Art des getesteten Supplementes, der Gehalt beider Carotinoide generell erniedrigt. Die geringsten Gehalte für *iso*-Reniraten (1,7% [b.a.GCG]) und für das *Keto*-Carotenoid-Derivat (2,4% [b.a.GCG]) wurden unter der Tryptophan-Supplementierung gemessen.

*Brevibacterium linens* ist osmotolerant, nicht human-pathogen und nicht photosynthetisch aktiv, weshalb sich das Bakterium, im Gegensatz zu vielen anderen Carotinoid-produzierenden Mikroorganismen, prinzipiell gut zur biotechnologischen Carotinoid-Produktion eignet. Darüber hinaus synthetisiert *B. linens* antimikrobielle Substanzen wodurch das Risiko einer Kontamination biotechnologischer Ansätze mit Fremdorganismen vermieden wird und gleichzeitig hohe Zelldichten erzielt werden können (ONRAEDT et al. 2005).

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Supplementierungsversuche konnte für *B. linens* gezeigt werden, dass sich sowohl der GCG als auch das Carotinoid-Spektrum des Keimes mit den getesteten Supplementen nur mäßig beeinflussen lässt. Um die biotechnologische Carotinoid-Ausbeute des Bakteriums grundlegend zu verbessern, sollten weitere Tests mit anderen Supplementen oder Tests von Supplement-Kombinationen durchgeführt werden. Möglicherweise kann die Carotinoid-Ausbeute auch über die Interaktion von *Brevibacterium linens* mit anderen Pigmentbildnern (beispielsweise die Co-Kultur mit *Arthrobacter luteus*) verbessert werden.

## 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Supplementierungsversuche

Mit Hilfe der oben beschriebenen Supplementierungsversuche wurde der Einfluss einer Reihe definierter Nährmedienzusätze auf die Bildung und die Verteilung der Carotinoide ausgewählter Bakterien und Hefen untersucht. In diesem Zusammenhang wurde auch die prinzipielle Eignung der in dieser Arbeit entwickelten Methode (vgl. Kapitel 2) für die Untersuchung hoher Probenzahlen von biotechnologisch bedeutsamen Mikroorganismen getestet.

Im Allgemeinen zeigen die Ergebnisse, dass bei den Hefen und bei den Bakterien der Einfluss eines Supplementes auf die Verteilung der Carotinoide auch bei relativ nahe verwandten Arten sehr unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Demzufolge sind für sichere und genaue Ergebnisse für jeden einzelnen Mikroorganismus zahlreiche Einzeltests mit definierten Nährmedienzusätzen unumgänglich.

Bei den untersuchten Hefen konnte unter der Supplementierung des Basis-Nährmediums mit Eisen-(III)-Chlorid, mit bestimmten Zuckern (wie z.B. Xylose) und mit bestimmten aromatischen Aminosäuren (wie z.B. Phenylalanin und Tryptophan) eine Steigerung der Carotinoid-Bioakkumulation erzielt werden. Demgegenüber erbrachten die bei den gewählten Bakterien getesteten Supplemente bezüglich der Carotinoid-Bioakkumulation keine einheitlichen Effekte. Unter Berücksichtigung des biotechnologischen Kosten-Nutzen-Verhältnis zeigten die getesteten B-Vitamine im Hinblick auf die Carotinoid-Bioakkumulation die geringsten gewinnbringenden Effekte, sowohl bei den Bakterien als auch bei den Hefen. Andererseits

führte die Verwendung von B-Vitaminen zum Teil zu bedeutsamen Variationen im Carotinoid-Spektrum. Ein potentieller Nutzen dieser Stoffgruppe, vor allem in Kombination mit anderen Supplementen, kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Die biotechnologische Großproduktion von Carotinoiden mit Hilfe Carotinoid-produzierender Bakterien und Hefen ist bislang noch unzureichend untersucht und nicht weit entwickelt. Demzufolge finden sich derzeit nur sehr wenige wirtschaftliche Anwendungen auf dem Markt (KIM et al. 2006, DOMINGUEZ-BOCANEGRA et al. 2007). Das für die Marktreife derartiger Produkte zuvor notwendige *Scaling up* beinhaltet eine Reihe von Monitoring- und Optimierungs-Versuchen, bei denen der mit der jeweiligen Kultur erzielte Carotinoidgehalt optimiert bzw. maximiert und letztendlich überwacht werden muss. Insbesondere bei voluminösen Ansätzen müssen hierbei aus Gründen der Repräsentativität der ermittelten Gehalte oft zahlreiche Proben gezogen und untersucht werden. Analytisch ist hierfür eine möglichst genaue Methode mit hohem Probendurchsatz notwendig. Anhand der Supplementierungsversuche konnte gezeigt werden, dass derartige Fragestellungen mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methode adäquat und effizient bearbeitet werden können.

Grundsätzlich können mit der etablierten Methode hinsichtlich einer biotechnologischen Nutzung der mikrobiellen Carotinoid-Biosynthese folgende Fragestellungen und Probleme weiterführend bearbeitet werden:

- die Untersuchung und Auswahl biotechnologisch nutzbarer Supplemente bzw. INAPs,
- die Untersuchung des Einflusses physikalischer Faktoren (Beleuchtung, Temperatur, Luftfeuchte, Partialdruck definierter Gase, Wachstumszeit etc.),
- Prozess-Optimierungsversuche im Rahmen der biotechnologisch-mikrobiellen Carotinoid-Produktion,
- Untersuchung des Einflusses von Co-Kulturen auf die Carotinoid-Biosynthese (z.B. die Wechselwirkung zweier mikrobieller Carotinoid-Produzenten bei Rotschmierkäse-Kulturen).

## 5. Anwendung der Methode (III) - Nachweis und Charakterisierung von Isoprenoid-Biomarkern

Viele Faktoren tragen zur biologischen Diversität von Mikroorganismen bei. Dabei kann die Chemotaxonomie basierend auf der Verteilung und der Struktur ausgewählter, sekundärer Metabolite (Biomarker) in Kombination mit anderen Kriterien ein nützliches Werkzeug zur Klassifizierung einzelner Organismen darstellen. Auch mikrobielle Carotinoide zeigen zahlreiche strukturelle Variationen, weshalb diese ebenfalls als chemotaxonomische oder identifikatorische Biomarker dienen können (LIAAEN-JENSEN et al. 1972). Das Auffinden und Untersuchen von Biomarkern erfordert grundsätzlich eine robuste, sensitive und genaue analytische Methode, welche nicht nur terminale Stoffwechselprodukte, sondern auch Zwischenprodukte in geringer Konzentration zu detektieren vermag (LIAAEN-JENSEN et al. 1972). Daher wird bei Fragestellungen auf dem Gebiet der Biomarker analytisch häufig die Massenspektrometrie (MS) eingesetzt. Zur Steigerung der Empfindlichkeit und Selektivität des Verfahrens wird dabei die MS zumeist mit der leistungsstarken Trennmethode der HPLC gekoppelt. Dadurch können nicht nur die Molekülmassen mehrerer Biomarker simultan bestimmt, sondern über das Fragmentierungsmuster auch die Struktur dieser Biomarker aufgeklärt werden.

Im Vergleich zur UV-VIS-Spektroskopie ermöglicht die MS eine sichere Identifizierung von Carotinoiden. Bei der UV-VIS-Spektroskopie beeinflussen zum einen die physikalischen Eigenschaften des Lösungsmittels (Brechungsindex, Polarisierbarkeit, Lipophilie etc.) die Energieübergänge bei der Absorption. Daher zeigen viele Carotinoide in verschiedenen Lösungsmitteln auch erhebliche Unterschiede in der Ausprägung sowie in der Lage und der Form ihrer UV-VIS-Absorptionsbanden. Zum anderen wird zum Erzielen einer hohen Effizienz der Trennung von komplexen Carotinoid-Gemischen oft eine HPLC-Methode mit Gradienten-Elution angewandt. Die bei der Gradienten-Elution vollzogene permanente Umänderung des Lösungsmittelgemisches und die damit verbundene Variation der UV-VIS-Spektren erschweren eine Identifizierung der aufgetrennten Carotinoide anhand von Literatur-Vergleichsspektren erheblich. Eine sichere Identifizierung von unbekanntem Carotinoiden und Carotinoid-Isomeren, allein mittels UV-VIS-Spektroskopie aus HPLC-DAD-Daten und ohne entsprechende Vergleichssubstanzen, ist deshalb nicht möglich (AZEVEDO-MELEIRO et al. 2004, INBARAJ et al. 2008, CARERI et al. 1999). Die MS ist gegenüber den beschriebenen Einflüssen wesentlich robuster. Die Schwierigkeit der massenspektrometrischen Analyse von Carotinoiden besteht in der hohen Labilität, der niedrigen Polarität und der geringen Flüchtigkeit der Analyte. Dies bedingt eine teilweise schlechte Ionisierbarkeit der Substanzen und die Bildung von Artefakten (DACHTLER et al. 2001). Vor diesem Hintergrund wurde, basierend auf der Aufarbeitungsmethode aus Kapitel 2, eine spezielle LC-MS-Methode entwickelt, die potentielle mikrobielle Isoprenoid-Biomarker auch ohne die Verwendung entsprechender Vergleichssubstanzen nachweisen bzw. identifizieren kann. Auf der Basis der Ergebnisse aus den Vorversuchen (vgl. 7.2.3.2), wurde als Ionisierungstechnik die APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*) im positiven Modus angewandt und optimiert. Zusätzlich ermöglichte die Funktionalität des *hybrid*-Triple-Quadrupol/Linear-Ion-Trap-Massenspektrometers (4000QTRAP, APPLIED BIOSYSTEMS, MDS ANALYTICAL TECHNOLOGY, FOSTER CITY, CA) die sensitive Generierung von charakteristischen Fragment-Spektren (*enhanced-product-ion*, EPI) der Carotinoid-Spezies. Damit war eine gezielte Filterung und Fragmentierung von Vorläuferionen möglich. Praktisch werden hierbei Molekülonen isoliert und diese fragmentiert, wobei der Selektions- und Scannvorgang des Spektrums solange abläuft, wie

die Auftretshäufigkeit des gesamteten Mutterions ansteigt. Bei abnehmender Auftretshäufigkeit des Mutterions schaltet das Gerät automatisch auf das Ion mit der nächsthöheren Auftretshäufigkeit um. Je nach dem Grad der Vortrennung der Komponenten eines Extraktes mittels HPLC können hierdurch für einzelne Analyte sukzessive komplette Massenspektren, ohne die Überlagerung oder Störung dieser durch Fremdionen, erhalten werden. Soweit möglich, wurden basierend auf den erhaltenen EPI-Massenspektren (Fragmentierungsmuster), für die bei den ausgewählten Mikroorganismen analysierten Carotinoide plausible Strukturen vorgeschlagen.

## 5.1 Massenspektrometrische Identifizierung von Carotinoid-Biomarkern unter Zuhilfenahme von Vergleichssubstanzen

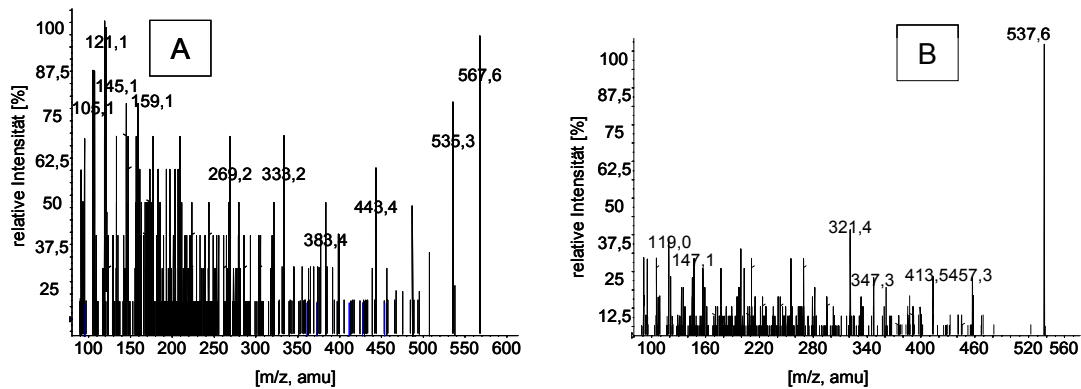
Der erste Abschnitt des Kapitels behandelt den Nachweis allgemein bekannter Carotinoide. Diese wurden über den Vergleich der bei den Mikroorganismen ermittelten Massenspektren mit den Massenspektren entsprechender Standard- bzw. Vergleichssubstanzen identifiziert. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Über den Vergleich der Massenspektren von Standard- bzw. Vergleichssubstanzen in den untersuchten Bakterien und Hefen identifizierte Carotinoide (vgl. Kapitel 4), verwendete Abkürzungen: AST Astaxanthin,  $\beta$ APO  $\beta$ -8'-Apo-Carotenal, at- $\beta$ CAR all-trans- $\beta$ -Carotin, iso- $\beta$ CAR  $\beta$ -Carotin-Isomer, CAN Canthaxanthin, Lut Lutein, LYC Lycopene, ZEA Zeaxanthin, iso- $\beta$ CAR und at- $\beta$ CAR (\*) sowie LUT und ZEA (\*\*) werden auf der verwendeten RP-C<sub>18</sub>-Säule nicht getrennt und können daher nicht eindeutig unterschieden werden.

Carotinoid	Molekülpeak	Mikroorganismen (alphabetisch nach ihrer Gattungsbezeichnung)
AST	[M + H] <sup>+</sup> 597,4	<i>Phaffia rhodozyma</i>
$\beta$ APO	[M + H] <sup>+</sup> 417,4	Molekülpeak nur beim Standard detektierbar
at- $\beta$ CAR u. iso- $\beta$ CAR*	[M + H] <sup>+</sup> 537,4	<i>Acremonium butyrii</i> , <i>Arthrobacter bergerei</i> , <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Exophiala dermatitidis</i> , <i>Filobasidium floriformae</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Phaffia rhodozyma</i> , <i>Rhodotorula spp.</i> ,
CAN	[M + H] <sup>+</sup> 565,4	<i>Brevibacterium linens</i>
LUT u. ZEA**	[M + H] <sup>+</sup> 569,4	Molekülpeak nur beim Standard detektierbar
LYC	-	Molekülpeak nicht detektierbar

Die bei den massenspektrometrischen Untersuchungen der Standardsubstanzen aufgenommenen Spektren zeigten zum Teil unterschiedliche Ionisierungs- und Fragmentierungstendenzen. Prinzipiell war die Neigung zur Ionisierung und Fragmentierung bei den sauerstoffhaltigen Xanthophyllen gegenüber den sauerstofffreien Carotinen etwas stärker ausgeprägt (vgl. Abbildungen 49). Dementsprechend zeigten sich bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Mikroorganismen auf  $\beta$ CAR insbesondere oberhalb von m/z 400 bis hin zum Molekülpeak (m/z 537) verhältnismäßig wenig charakteristische Fragmente. Darüber hinaus wiesen die bei  $\beta$ CAR detektierten Fragmente gegenüber denen der Xanthophylle eine deutlich geringere Intensität auf (vgl. Abbildungen 49). Auf Grund dessen war eine Abgrenzung von  $\beta$ CAR zu etwaigen massengleichen isomeren Carotinoiden (beispielsweise  $\alpha$ CAR,  $\gamma$ CAR,  $\epsilon$ CAR,  $\gamma$ , $\psi$ CAR und LYC) nicht eindeutig möglich. In vielen der untersuchten Gattungen konnte  $\beta$ CAR bzw. ein massengleiches Carotinoid (iso- $\beta$ CAR) nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 10). Das Vorkommen an  $\beta$ CAR in den Gattungen *Bullera* und *Sporobolomyces* konnte entgegen den Literaturangaben nicht bestätigt werden (vgl. Tabelle 5 in Kapitel 3).

In beiden Gattungen ist  $\beta$ CAR allerdings nur eines der möglichen Endprodukte der Carotinoid-Biosynthese (CERDA-OLMEDO 1989, SIMPSON et al. 1977 u. 1964, BHOSALE et al. 2001a, BONALY et al. 1968). Da sowohl in der Gattung *Sporobolomyces* als auch in der Gattung *Bullera* andere Carotinoide nachgewiesen werden konnten (vgl. 3.2), ist der Biosyntheseweg zu  $\beta$ CAR unter den gewählten Wachstumsbedingungen (Wachstumszeit, Nährstoffe, Temperatur etc.) möglicherweise gehemmt.

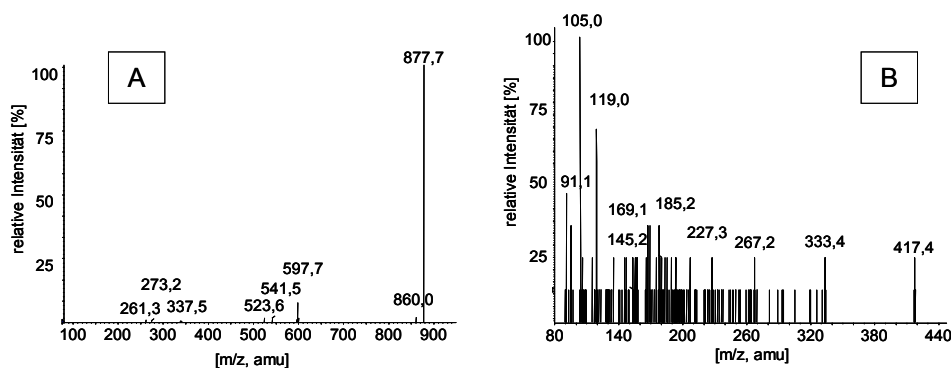


**Abbildung 49-A:** EPI-Massenspektrum des Xanthophylls Canthaxanthin (CAN, Vergleichssubstanz gelöst in MeOH), [m/z, amu] Masse/Ladung-Verhältnis, atomic-mass-unit, EPI Enhanced-Product-Ion.

**Abbildung 49-B:** EPI-Massenspektrum des Carotins all-trans- $\beta$ -Carotin ( $\alpha$ - $\beta$ CAR, Standardsubstanz gelöst in MeOH), [m/z, amu] Masse/Ladung-Verhältnis, atomic-mass-unit, EPI Enhanced-Product-Ion.

Im Gegensatz zu dem in Mikroorganismen weit verbreiteten  $\beta$ CAR konnte AST erwartungsgemäß nur in *Phaffia rhodozyma* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen hierbei, dass offenbar auch substituierte AST-Derivate (beispielsweise Ester, Ether etc.) mit erfasst werden können (vgl. Abbildung 50-A).

Der interne Standard  $\beta$ APO offenbarte eine gute Ionisierbarkeit sowie einen deutlichen Molekülpeak und ein charakteristisches Fragmentierungsmuster (vgl. Abbildung 50-B). Die Substanz konnte in keinem der untersuchten Mikroorganismen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass  $\beta$ APO als interner Standard bei der massenspektrometrischen Untersuchung mikrobieller Isoprenoide prinzipiell gut geeignet ist. Im Gegensatz zu dem sauerstoffhaltigen und grundsätzlich gut detektierbaren  $\beta$ APO war das sauerstofffreie Lycopren unter denselben Bedingungen massenspektrometrisch nicht bestimmbar. Möglicherweise wurde die Ionisierung des Moleküls durch das ursprünglich zur Stabilisierung des Standards im Überschuss zugegebene



**Abbildung 50-A:** EPI-Massenspektrum eines substituierten Astaxanthin-Derivates aus *Phaffia rhodozyma*, [m/z, amu] Masse/Ladung-Verhältnis, atomic-mass-unit, EPI Enhanced-Product-Ion.

**Abbildung 50-B:** EPI-Massenspektrum des internen Standards  $\beta$ -8'-apo-Carotenal ( $\beta$ APO, gelöst in MeOH), [m/z, amu] Masse/Ladung-Verhältnis, atomic-mass-unit, EPI Enhanced-Product-Ion.

Antioxidans  $\alpha$ TOC gehemmt. Bedauerlicherweise stand kein reiner Lycopendstandard zur Verfügung, um diese Theorie zu überprüfen (vgl. 7.1.2). Da beim Vermessen des Lycopendstandards vermehrt Massen größer als  $m/z$  537 festgestellt wurden, ist es ebenso möglich, dass der Standard trotz des Antioxidanzzusatzes bereits oxidiert war.

Die Massenspektren der beiden massengleichen Carotinoide Lutein (LUT) und Zeaxanthin (ZEA) unterschieden sich nur geringfügig in ihrem Fragmentierungsmuster. LUT zeigte im Gegensatz zu ZEA eine höhere Tendenz zur Abspaltung von Wasser aus dem ionisierten Molekül ( $[M+H^+]-18$ ). Möglicherweise trägt die Lage der isolierten Doppelbindung von LUT zu einer wesentlich leichteren Abspaltung von Wasser bei, weil hierdurch ein erweitertes konjugiertes Doppelbindungssystem innerhalb des Moleküls entstehen kann (DUGO et al. 2008a, KURZ et al. 2008, GREWE et al. 2008). In der Folge ist bei dem Massenspektrum von LUT die Intensität des Molekülpeaks häufig gering, wohingegen der Peak bei  $m/z$  551 eine hohe Intensität aufweist. Da das in Bakterien und Hefen häufig vorkommende Echinenon (ECH) ebenfalls die Masse  $m/z$  551 (vgl. Kapitel 3) besitzt, kann es unter Umständen zu Verwechslungen zwischen LUT und ECH kommen. Da jedoch LUT natürlicherweise in photosynthetisch inaktiven Mikroorganismen bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte, ist dies bislang nur von theoretischem Belang. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder LUT noch sein Stellungsisomer ZEA in den untersuchten Mikroorganismen nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 10).

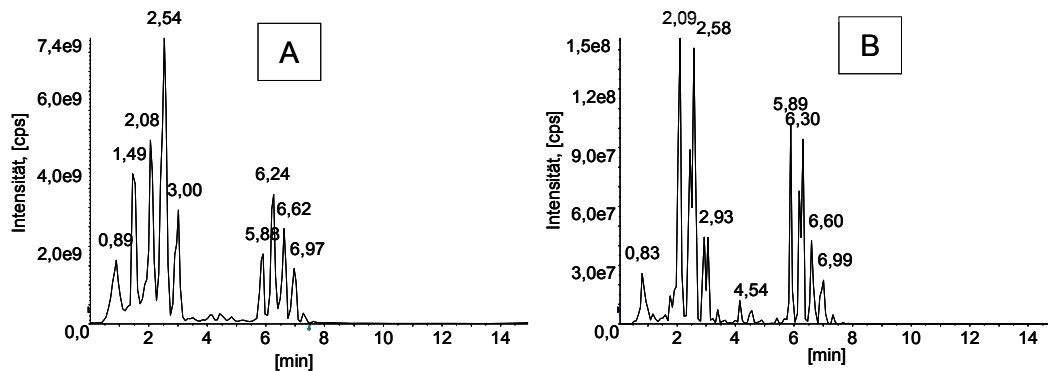
## 5.2 Identifizierung von Carotinoid-Biomarkern anhand ihres Massenspektrums

Die Identifizierung von Carotinoiden, für welche keine entsprechenden Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen, erfolgte anhand der massenspektrometrisch detektierten Molekülmassen und insofern möglich, über die Zuordnung von charakteristischen Fragmentmassen zu den entsprechenden Carotinoid-Fragmenten. Als Orientierungshilfe für die Interpretation der Massenspektren dienten die in der Literatur aufgeführten Carotinoidstrukturen sowie die für Carotinoide postulierten Fragmentierungsschemata und typischen Fragmente (BRITTON 1995 u. 2004, Dugo 2008a/b, INBARAJ et al. 2008, WEBER et al. 2007, GREWE et al. 2008). Zu Anfang der Versuche wurden neben der ESI-Technik auch der negative APCI-Modus und der positive APCI-Modus getestet (vgl. 7.2.3.2). Dabei zeigte der positive APCI-Modus eine gute Ionenausbeute und generierte zugleich interpretierbare Massenspektren, weshalb diese Ionisierungstechnik auch bei allen darauffolgenden Experimenten angewendet wurde. Zur simultanen Bestimmung möglichst vieler Carotinoide wurden die Extrakte über einen kurzen linearen HPLC-Gradienten auf einer RP-C<sub>18</sub>-Phase aufgetrennt und im Anschluss über die Funktion des *Enhanced-Product-Ion-Monitoring* (EPI) des *Triple*-Quadrupol-Massenspektrometers vermessen. In Kombination mit der milden Ionisierungstechnik der APCI konnten so von zahlreichen unbekannt Substanzen störungsfreie Molekülpeaks mit relativ hoher Intensität und zugleich häufig charakteristische Produkt-Ion-Massenspektren detektiert werden. Durch dieses Vorgehen erlangte die Methode in Bezug auf die Detektion und Charakterisierung strukturell unbekannter mikrobieller Carotinoide aus Gemischen eine hohe Selektivität und Sensitivität.



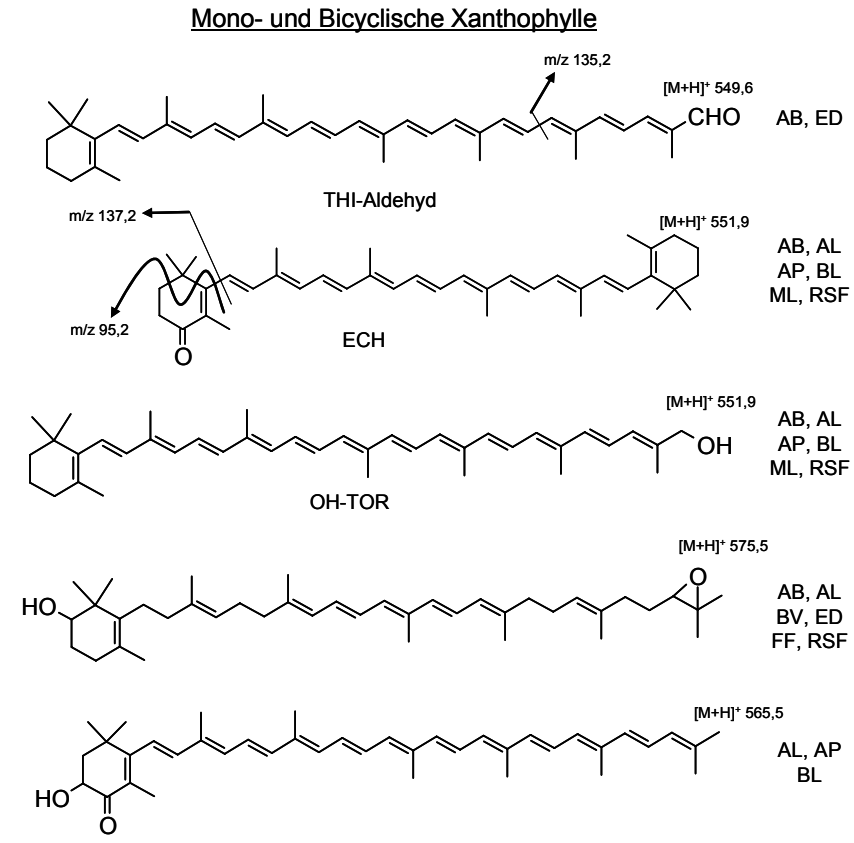
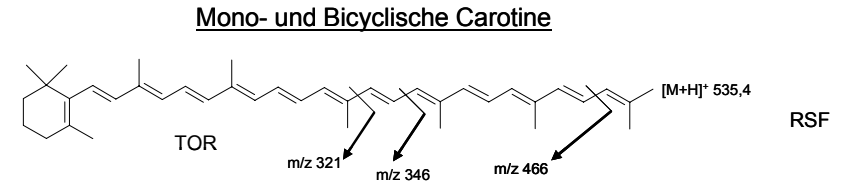
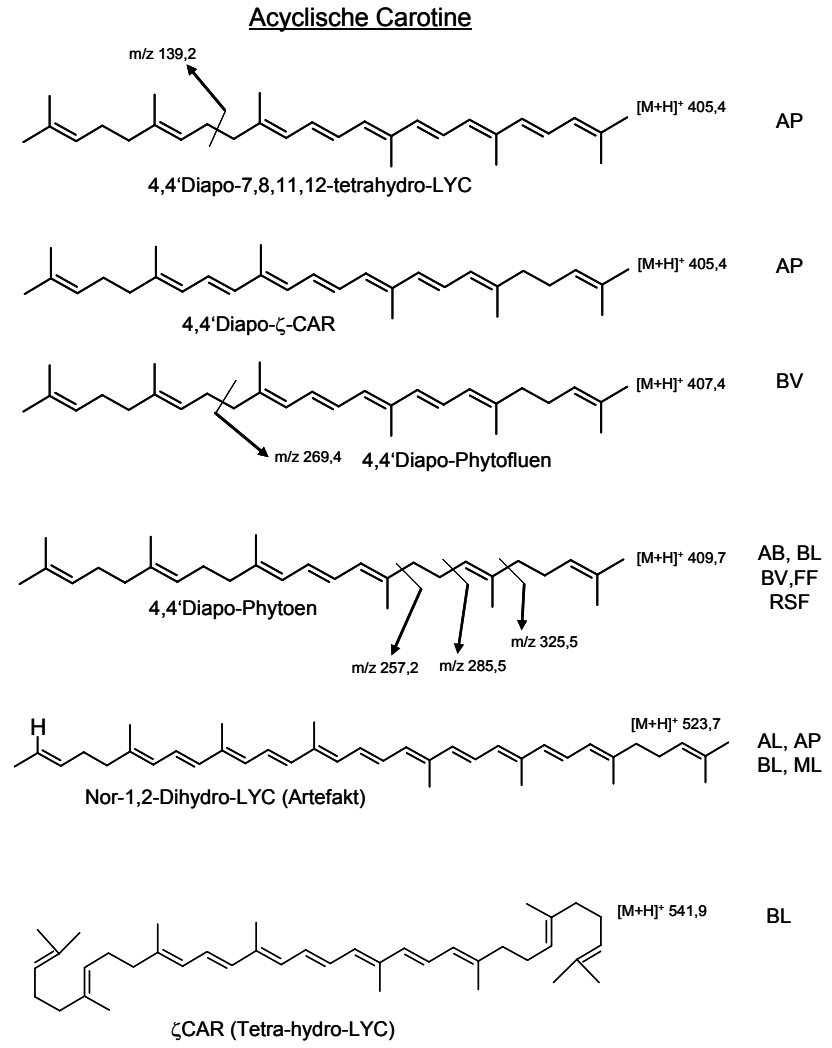
Im Ergebnis zeigten die erhaltenen Total-Ionen-Chromatogramme (TIC) und die Ionen-Chromatogramme des EPI prinzipiell eine Zweiteilung (vgl. Abbildung 51). Den Massenspektren zufolge handelt es sich bei der ersten zusammenhängenden Gruppe von Peaks um Monosubstanzen und bei der zweiten Peakgruppe offenbar um substituierte Derivate, wie beispielsweise Ester und Ether (DUGO et al. 2008a/b, KURZ et al. 2008, IBARAJ et al. 2008).

Abschließend konnten mit Hilfe der beschriebenen Methode die in den Abbildungen 52 und 53 aufgezeigten Carotinoide detektiert bzw. entsprechende Carotinoidstrukturen vorgeschlagen werden.



**Abbildung 51-A:** Total-Ionen-Chromatogramm (TIC) eines Extraktes aus *Exophiala dermatididis*, verwendeter Gradient von MTBE in MeOH 5 mM AAc [min-%]: 0-0, 10-50, 12-50, 15-0; Flow: 0,4 ml/min,  $T_s = 10^\circ\text{C}$ , [cps] Anzahl pro Sekunde (counts per second).

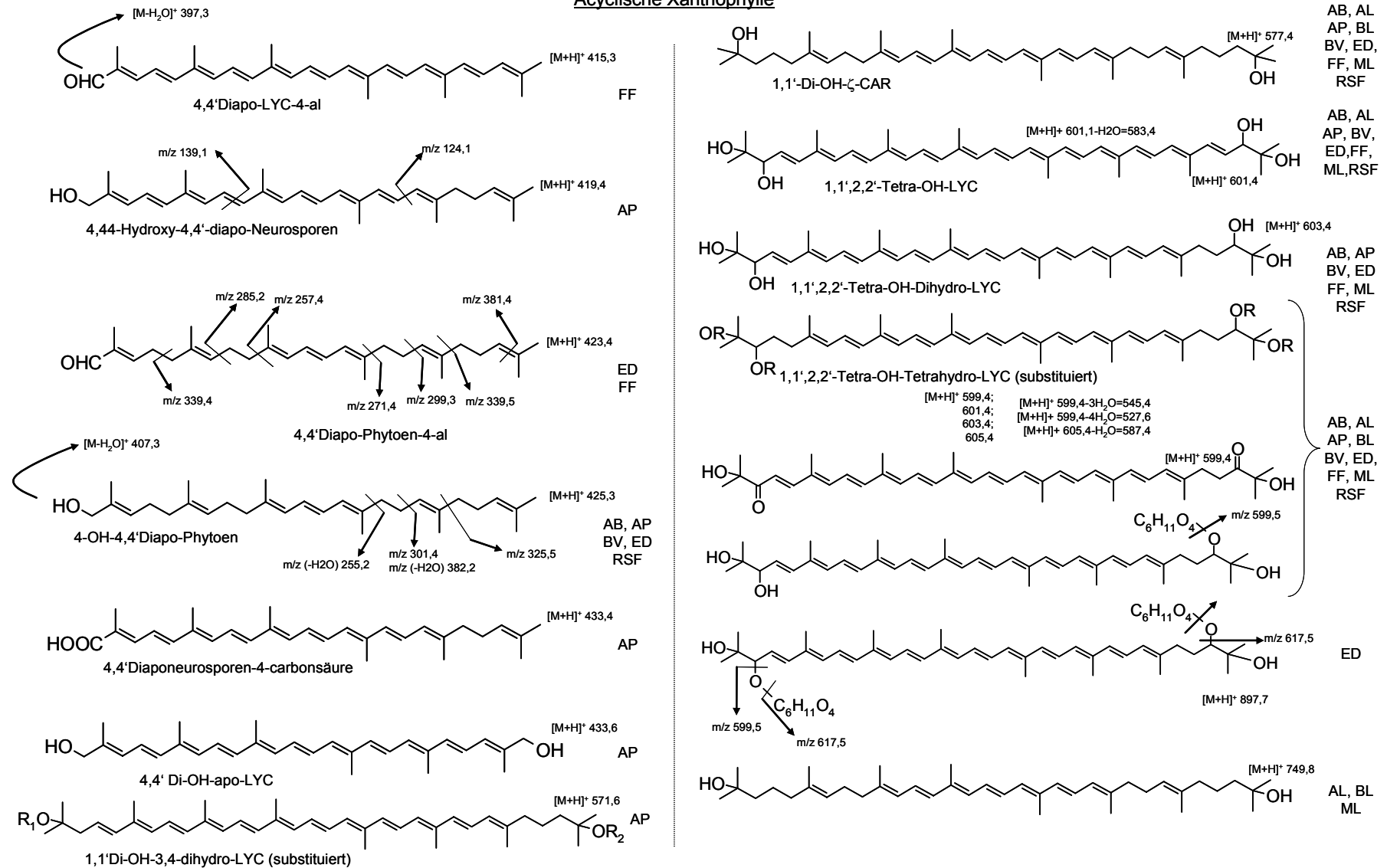
**Abbildung 51-B:** TIC der *Enhanced-Produkt-Ion-Scans* (EPI-Scan) des Extraktes aus *Exophiala dermatididis*, alle weiteren Parameter und Abkürzungen vgl. Abbildung 51-A.



**Abbildung 52:** Überblick über die anhand der detektierten EPI-Massenspektren vorgeschlagenen Carotinoid-Strukturen, die Namen der Carotinoide sind, soweit in der Literatur bereits vorhanden (vgl. BRITTON 2004) jeweils unterhalb der aufgezeigten Strukturen und die zugehörigen Mikroorganismen jeweils rechts von den aufgezeigten Strukturen angegeben, die Wahrscheinlichkeit der vorgeschlagenen Strukturen steigt prinzipiell mit der Anzahl der aus den Spektren detektierten und zugleich zuordbaren Fragmente, verwendete Abkürzungen alphabetisch: AB *Acremonium butyrii*, AL *Arthrobacter luteus*, AP *Arthrobacter protophormoniae*, BL *Brevibacterium linens*, BV *Bullera variabilis*, CAR Carotin, ECH Echinenon, ED *Exophiala dermatididis*, FF *Filobasidium floriformae*, LYC Lycopon, ML *Micrococcus luteus*, OH Hydroxy, RSF *Rhodotorula spp.* (Faeces-Isolat).

## Kapitel 5 – Carotinoid-Biomarker

### Acyclische Xanthophylle



**Abbildung 53:** Überblick über die anhand der detektierten EPI-Massenspektren vorgeschlagenen Carotinoid-Strukturen, die Namen der Carotinoide sind, soweit in der Literatur bereits vorhanden (vgl. BRITTON 2004) jeweils unterhalb der aufgezeigten Strukturen und die zugehörigen Mikroorganismen jeweils rechts von den aufgezeigten Strukturen angegeben, die Wahrscheinlichkeit der vorgeschlagenen Strukturen steigt prinzipiell mit der Anzahl der aus den Spektren detektierten und zugleich zuordbaren Fragmente, verwendete Abkürzungen alphabetisch: AB *Acremonium butyrii*, AL *Arthrobacter luteus*, AP *Arthrobacter protophormoniae*, BL *Brevibacterium linens*, BV *Bullera variabilis*, CAR Carotin, ECH Echinenon, ED *Exophiala dermatididis*, FF *Filobasidium floriformae*, LYC Lycopene, ML *Micrococcus luteus*, OH Hydroxy, RSF *Rhodotorula spp.* (Faeces-Isolat).

Bei der Betrachtung der gesamten Ergebnisse wird deutlich, dass mit Hilfe der entwickelten Methode zahlreiche Molekülmassen detektierbar sind. Andererseits ist bei den Messungen von unverseiften, mikrobiellen Extrakten die Matrixbelastung relativ hoch. Aufgrund dessen war im EPI-Modus die Fragmentierungstendenz vieler Analyte im Vergleich zur Fragmentierungstendenz der lediglich in Lösungsmittel gelösten und daher weitgehend matrixfreien Standardsubstanzen deutlich geringer ausgeprägt. Aus diesem Grund konnten für viele Substanzen zum Teil nur Molekülpeaks detektiert werden. Zudem zeigen APCI-Spektren für Carotinoide in der Regel eine oft nur geringe Anzahl an Fragment-Ionen mit einer darüber hinaus häufig auch niedrigen Intensität der Fragmentpeaks (DUGO et al. 2008b, HARKEY et al. 2005). Dadurch wird letztlich die Spezifität der Methode gemindert. Ohne charakteristische Massefragmente kann zwischen massengleichen bzw. strukturisomeren Carotinoiden nicht unterschieden werden (DUGO et al. 2008a/b). Die Molekülmasse  $m/z$  551 (vgl. Abbildung 52) wurde beispielsweise mehrfach bei unterschiedlichen Retentionszeiten detektiert. Demzufolge muss es sich um unterschiedliche Carotinoidstrukturen handeln. Auf Grund der jedoch nur geringen Tendenz zur Fragmentierung der Masse  $m/z$  551 in Zusammenhang mit der nur geringen Intensität der auftretenden Fragmentpeaks war eine detaillierte Strukturaufklärung und damit eine Unterscheidung der detektierten Substanzen nicht möglich. Aus diesem Grund ist eine analytische Bestätigung der vorgeschlagenen Strukturen nur über das Vermessen von entsprechenden Vergleichssubstanzen oder mittels NMR-Analyse möglich.

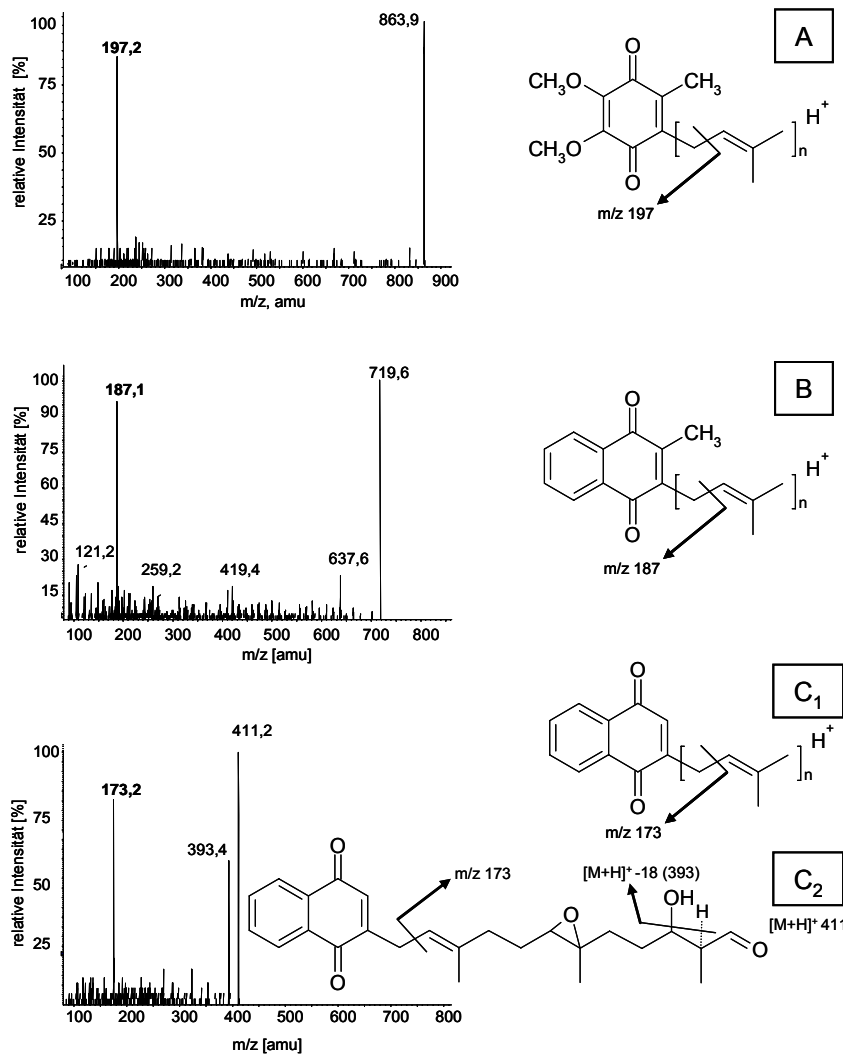
### 5.3 Identifizierung von isoprenoiden Chinonen als Biomarker

Isoprenoide Chinone sind charakteristische Bestandteile von mikrobiellen Plasmamembranen, wobei sie sowohl in cytoplasmatischen als auch in mitochondrialen Membranen vorkommen (COLLINS et al. 1981). Im Gegensatz zu anderen Elektronenüberträgern zeigen Chinone innerhalb einer Elektronentransportkette die Fähigkeit zur stufenweisen Übertragung von Elektronen, weshalb sie wichtige Komponenten der Atmungskette darstellen (COLLINS et al. 1979 u. 1981).

Zu den isoprenoiden Chinonen gehören die Gruppe der Naphthochinone und die Gruppe der Benzochinone. Erstere können weiter in Phyllochinone sowie Menachinone und letztere in Plastochinone und Ubichinone unterteilt werden. Die für die Charakterisierung von Bakterien bedeutsamsten Chinone sind Ubichinon, Menachinon sowie die Derivate Dihydromenachinon, Demethylmenachinon und Rhodochinon (COLLINS et al. 1981, YOKOTA et al. 1992, HIRAISHI et al. 1999). Ubichinone werden in Bakterien der *Alpha*-, *Beta*- und *Gamma-Proteobacteria* sowie in *Fungi* und Hefen gefunden. Die Länge der isoprenoiden Seitenketten ist dabei häufig charakteristisch für die Klasse der *Proteobacteria*. Auch Menachinone können in einigen Gruppen der oben aufgeführten Klassen der *Proteobacteria* vorkommen. In den Gruppen der *Delta*- und *Epsilon-Proteobacteria* und in Vertretern der *Archaea* sind Menachinone die einzige vorkommende chinoiden Stoffgruppe. Gram-positive Bakterien synthetisieren gleichermaßen ausschließlich Menachinone, welche sich neben der Länge der isoprenoiden Seitenketten auch in der Anzahl der gesättigten Isoprenoid-Einheiten unterscheiden (BUSSE et al. 1996, HIRAISHI et al. 1999).

Die Bedeutung von mikrobiellen Chinonen als chemotaxonomische Biomarker sowie als indikative Biomarker für den Ablauf der Atmungskette und als Hilfsgröße für die Quantifizierung mikrobieller Biomasse konnte mehrfach bewiesen werden (GEYER et al. 2004 u. 2005, HIRAISHI et al. 1999 u. 2003, NISHIJIMA et al. 1997, SHAH et al. 1980). Die hierbei heranzuziehenden Unterscheidungsmerkmale beruhen

auf den verschiedenen Chinontypen, der Länge der isoprenoiden Seitenkette, der Anzahl der gesättigten Isoprenoid-Einheiten und dem quantitativen Verhältnis bestimmter Chinone zueinander. Für eine detaillierte Biomarker-Analyse von mikrobiellen Chinonen ist auf Grund der oft geringen Konzentration der Substanzen in den Zellen eine selektive, vor allem aber eine sensitive Methode notwendig. Dabei beinhalten Zellextrakte von Mikroorganismen neben isoprenoiden Chinonen auf Grund der ähnlichen Lipophilie zugleich auch Carotinoide. Infolgedessen und infolge der Vielzahl an verschiedensten Strukturen beider Stoffklassen lassen sich derartige Extrakte mittels HPLC häufig nicht vollständig in alle Einzelkomponenten auftrennen. Es kommt zwangsläufig zu Co-Elutionen von Carotinoiden und Chinonen, wobei auf Grund der isoprenoiden Strukturanteile der Chinone sich diese von den Carotinoiden anhand des UV-VIS-Spektrums (DAD) nicht immer eindeutig unterscheiden lassen. Aus diesem Grund wurden die über die Aufarbeitungsmethode aus Kapitel 2 erhaltenen Extrakte mittels der für Carotinoide entwickelten LC-MS-Methode zusätzlich qualitativ auf isoprenoide Chinon-Biomarker untersucht. Die Identifizierung erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von LEE et al. (2008) GEYER et al. (2004) und LYTLE et al. (2001). Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 54 und Tabelle 11 dargestellt.



**Abbildung 54:** Beispiel-Massenspektren und Strukturen für die mit Hilfe der entwickelten Methode und über Literaturdaten (GEYER et al. 2004, LYTLE et al. 2001, LEE et al. 2008) identifizierten isoprenoide Chinone in den untersuchten Bakterien und Hefen.

**Abbildung 54-A:** Ubichinone (UQ), charakteristisches Massefragment m/z 197.

**Abbildung 54-B:** Menachinone (MC), charakteristisches Massefragment m/z 187.

**Abbildung 54-C1:** Demethylmenachinone (DE(Me)MC), charakteristisches Massefragment m/z 173.

**Abbildung 54-C2:** Struktur eines identifizierten Demethylmenachinons.

**Tabelle 11:** Übersicht über die anhand ihres EPI-Massenspektrums in den untersuchten Mikroorganismen nachgewiesenen isoprenoiden Chinone, die tiefgestellten Zahlenwerte kennzeichnen die Länge der isoprenoiden Seitenkette (vgl. Abbildung 54), die Modifikationen der isoprenoiden Seitenkette sind: (H<sub>2</sub>)=Dihydro-, DE(H<sub>2</sub>)=Dehydro-, (H<sub>4</sub>)=Tetrahydro-, OH=Hydroxy, x= unbekannte isoprenoide Seitenkette, alle Ubichinone (UC) zeigten das charakteristische Fragment m/z 197, alle Menachinone (MC) das charakteristische Fragment m/z 187 und alle Demethylmenachinone (DE(Me)MC) das charakteristische Fragment m/z 173 als deutlichen Masse-Peak (vgl. Abbildung 54 sowie LEE et al. 2008, GEYER et al. 2004 und LYTLE et al. 2001).

isoprenoides Chinon	Molekülpeak [M + H] <sup>+</sup>	Mikroorganismen (alphabetisch nach ihrer Gattungsbezeichnung)
UC <sub>7</sub>	659,6	<i>Candida intermedia</i>
UC <sub>8</sub>	727,6	<i>Candida intermedia, Rhodotorula spp.</i>
UC <sub>9</sub>	795,7	<i>Exophiala dermatitidis, Phaffia rhodozyma, Rhodotorula spp.</i>
UC <sub>9</sub> (H <sub>2</sub> )	797,6	<i>Bullera variabilis</i>
UC <sub>10</sub>	863,8	<i>Exophiala dermatitidis, Filobasidium floriformae, Phaffia rhodozyma, Rhodotorula spp.</i>
UC <sub>10</sub> (H <sub>2</sub> )	865,8	<i>Acremonium butyrii, Bullera variabilis, Lecytophora hoffmanii, Micrococcus luteus</i>
MC <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> )	447,4	<i>Micrococcus luteus</i>
MC <sub>5</sub>	513,4	<i>Brevibacterium linens</i>
MC <sub>5</sub> H <sub>2</sub>	515,4	<i>Micrococcus luteus</i>
MC <sub>6</sub>	581,3	<i>Arthrobacter bergerei, Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter protophormoniae, Arthrobacter uratoxydans</i>
MC <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> )	583,6	<i>Micrococcus luteus</i>
DE(H <sub>2</sub> )MC <sub>7</sub>	647,4	<i>Micrococcus luteus</i>
MC <sub>7</sub>	649,4	<i>Arthrobacter bergerei, Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter protophormoniae, Arthrobacter uratoxydans, Micrococcus luteus, Rhodococcus equi</i>
MC <sub>7</sub> (H <sub>2</sub> )	651,5	<i>Arthrobacter nicotianae, Brevibacterium linens, Micrococcus luteus, Rhodococcus equi</i>
MC <sub>7</sub> (H <sub>4</sub> )	653,8	<i>Arthrobacter luteus</i>
DE(H <sub>2</sub> )MC <sub>8</sub>	715,6	<i>Arthrobacter bergerei, Arthrobacter uratoxydans</i>
MC <sub>8</sub>	717,7	<i>Arthrobacter bergerei, Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter protophormoniae, Arthrobacter uratoxydans, Brevibacterium linens, Micrococcus luteus, Rhodococcus equi</i>
MC <sub>8</sub> (H <sub>2</sub> )	719,6	<i>Arthrobacter luteus, Arthrobacter nicotianae, Brevibacterium linens, Micrococcus luteus, Rhodococcus equi</i>
MC <sub>8</sub> (H <sub>4</sub> )	721,7	<i>Arthrobacter luteus, Brevibacterium linens, Micrococcus luteus, Rhodococcus equi</i>
DE(H <sub>2</sub> )MC <sub>9</sub>	783,6	<i>Arthrobacter bergerei, Arthrobacter uratoxydans</i>
MC <sub>9</sub>	785,6	<i>Arthrobacter bergerei, Arthrobacter protophormoniae, Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter uratoxydans</i>
MC <sub>9</sub> (H <sub>2</sub> )	787,7	<i>Arthrobacter luteus, Arthrobacter nicotianae, Brevibacterium linens, Micrococcus luteus</i>
MC <sub>9</sub> (H <sub>4</sub> )	789,7	<i>Arthrobacter luteus</i>
MC <sub>x</sub>	791,6	<i>Arthrobacter luteus</i>
MC <sub>x</sub>	735,5	<i>Brevibacterium linens, Micrococcus luteus</i>
MC <sub>x</sub>	731,4	<i>Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter uratoxydans</i>
DE(Me)MC <sub>x</sub>	393,2	<i>Candida intermedia, Exophiala dermatitidis, Lecytophora hoffmanii</i>
DE(Me)MC <sub>x</sub> OH	411,4	<i>Acremonium butyrii, Bullera variabilis, Candida intermedia, Exophiala dermatitidis, Filobasidium floriformae, Lecytophora hoffmanii, Rhodotorula spp., Sporobolomyces salmonicolor</i>

Die Ergebnisse zeigen, dass die Methode neben mikrobiellen Carotinoiden auch hervorragend für die qualitative Bestimmung von isoprenoiden Chinonen aus verschiedensten Bakterien, Hefen und Pilzen geeignet ist. Darüber hinaus können mit Hilfe der etablierten Methode durch isoprenoide Chinone bedingte falsch positive Carotinoid-Befunde erfasst werden, die auf Grund der ähnlichen UV-VIS-Spektren allein mittels DAD nicht eindeutig erkennbar sind.

## 5.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der LC-MS-Messungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Methode für die qualitative Untersuchung mikrobieller Isoprenoide als Biomarker ausreichend sensitiv und selektiv ist und sich daher prinzipiell gut für ein Screening auf Carotinoide und isoprenoide Chinone eignet. Im Vergleich zur UV-VIS-Spektroskopie konnten über das Verfahren diverse Carotinoide und ebenso isoprenoide Chinone auch ohne entsprechende Vergleichssubstanzen mit hinreichender Sicherheit nachgewiesen werden.

Das Grundgerüst von mikrobiellen Carotinoiden wird analog zu den pflanzlichen Carotinoiden durch ein relativ starres Biosyntheschema (Isoprenoidsynthese) generiert (SANDMANN et al. 2002a/b, SCHNEIDER et al. 1999). Insbesondere die sauerstofffreien Carotine sind daher untereinander strukturell oft gleich oder zumindest sehr ähnlich. Die für die Biomarkeranalytik erforderliche Strukturvielfalt der Zielsubstanzen wird deshalb erst durch den Einbau von Sauerstoff in das Carotinoidmolekül und insbesondere durch die anschließende Substitution der entstehenden Xanthophylle mit charakteristischen, nicht-isoprenoiden Strukturen erzeugt. Durch die Bestimmung von intakten, substituierten mikrobiellen Isoprenoiden wird folglich die Spezifität eines Biomarkers für einzelne Arten von Mikroorganismen erheblich gesteigert. Da die etablierte Methode solche substituierten, mikrobiellen Carotinoide grundsätzlich mit erfasst, verfügt sie über die für die Analytik artspezifischer isoprenoider Biomarker erforderliche Selektivität.

Gleichwohl war auf Grund der für die APCI typischen Minderfragmentierungen (vgl. 7.2.3.2) und wegen Störungen der Matrix die Differenzierung zwischen Substanzen gleicher Molekülmasse zum Teil nicht möglich. Eine zusätzliche Steigerung der Selektivität und Sensitivität der etablierten Methode könnte über die Verbesserung der Vortrennung der Extrakte, beispielsweise durch die Verwendung einer gegenüber der benutzten RP-C<sub>18</sub>-Phase trennstärkeren, LC-MS-kompatiblen RP-C<sub>30</sub>-Phase erzielt werden.

Basierend auf dem aufgezeigten breiten Spektrum an detektierten Isoprenoiden, eignet sich die entwickelte LC-MS-Methode prinzipiell gut

- zum Screening auf strukturell unbekannte mikrobielle Carotinoide und isoprenoide Chinone, d.h. dem Auffinden mikrobieller, isoprenoider Biomarker,
- zur Unterstützung des Nachweises pathogener, Carotinoid-pigmentierter Mikroorganismen über artspezifische Carotinoide bzw. deren substituierte Derivate,
- zur Untersuchung des Beitrages von Carotinoiden zum Pathogenitätsmechanismus bei Carotinoid-pigmentierten pathogenen Mikroorganismen,
- und schließlich zur Untersuchung von Carotinoid-Metaboliten und von Biosyntheseschritten der mikrobiellen Carotinoidbiosynthese.

## 6. Zusammenfassung der Arbeit und Ausblick

### 6.1 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung einer effizienten analytischen Methode zur Bestimmung mikrobieller Carotinoide aus photosynthetisch-inaktiven Bakterien und Hefen sowie in der Anwendung der etablierten Methode.

Zur Aufzucht und Ernte der Mikroorganismen wurde eine geeignete Plattenmethode entwickelt und etabliert. Hierdurch konnten die für eine robuste Analytik notwendige Biomasse erzeugt und unkompliziert „echte“ Mehrfachbestimmungen sowie eine gezielte Einflussnahme auf die Wachstumsbedingungen der untersuchten Arten ermöglicht werden.

Die Entwicklung der analytischen Methode beinhaltete drei Schwerpunkte: Der erste Schwerpunkt war die Entwicklung eines leistungsstarken, praktikablen und vor allem probendurchsatz-starken Zellaufschlussverfahrens im Halbmikromaßstab. Diese Anforderungen konnten durch eine Kombination aus enzymatischen, mechanischen und chemischen Aufschlussmethoden erfüllt werden. Dadurch wurde ein breites Spektrum an Carotinoiden aus verschiedensten mikrobiellen Zellstrukturen einer nachfolgenden Extraktion zugänglich („mikrobielle Robustheit“). Die beschriebenen Fähigkeiten der etablierten Aufschlussmethode stellen in Verbindung mit der Verwendung von laborüblichen Geräten und Materialien eine Verbesserung, insbesondere gegenüber Aufschlussverfahren mit hohem apparativem Aufwand und wesentlich geringerem Probendurchsatz dar.

Der zweite Schwerpunkt lag auf der Entwicklung des Extraktionsverfahrens, mit welchem mikrobielle Carotinoide nach dem Zellaufschluss einerseits erschöpfend, andererseits möglichst schonend d.h., unter Vermeidung von Artefaktbildungen, Degradationen und adsorptiven Verlusten, gewonnen werden können. Die extraktionsstärksten Eigenschaften wurden durch eine spezielle Mischung aus Chloroform und Methanol (Extraktionsmittel) erhalten. Dabei konnte der für Carotinoide prooxidative Charakter von Chloroform durch Antioxidantien inhibiert und adsorptive sowie photooxidative Verluste durch die Verwendung gefärbter Glasmaterialien minimiert werden. Darüber hinaus wurden mittels einer der Extraktion vorgeschalteten Zinkacetat-Fällung die Verluste an hydrophil-substituierten Carotinoiden stark reduziert und diese so quantitativ der Analytik zugänglich gemacht.

Der dritte und letzte Schwerpunkt lag auf der Entwicklung und Optimierung einer robusten und effizienten chromatographischen Trennmethode zur Durchführung der nachfolgenden Screening- und Supplementierungsversuche. Prinzipiell wurde für das Screening eine höchstmögliche Selektivität und für die Supplementierungsversuche eine möglichst kurze Trennzeit (Lauf-Zeit) bei gleichzeitiger Trennung der Hauptcarotinoide (zweckmäßige Auflösung) unter vertretbarem Aufwand angestrebt. Dies konnte durch die Verwendung einer RP-C<sub>30</sub>-Phase, durch die Entwicklung spezieller Gradienten und durch die Optimierung der Fließmittelgeschwindigkeit, der Säulentemperatur sowie durch den Einsatz eines Fließmittel-Additivs realisiert werden. Die Ergebnisse der zahlreichen chromatographischen Optimierungsversuche lassen vermuten, dass an dem *Peak-Tailing* und an der Degradation von Carotinoiden beim Säulendurchgang ursächlich sowohl freie Silanolgruppen als auch auf der Phase gebundene Metallionen beteiligt sind.



Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Fließmittel-Additive die negativen Eigenschaften von nicht-*endcapped* RP-C<sub>30</sub>-Phasen nahezu vollständig beseitigen und somit die positiven Eigenschaften der Phase hervorheben. Schlussendlich stellt das etablierte chromatographische Verfahren für mikrobielle Carotinoide einen sehr nützlichen Kompromiss zwischen Trennproblem-bezogener Analysendauer, Robustheit und geforderter Auflösung dar.

Zur abschließenden Beurteilung der optimierten gesamten Methode wurden geeignete Leistungsparameter wie Linearitätsbereich, Präzision, Wiederfindung sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt. Die erhaltenen Parameter belegen, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und etablierte Methode ein genaues und effizientes analytisches Verfahren zur Gewinnung, Trennung und Quantifizierung von Carotinoiden aus Bakterien und Hefen darstellt.

Nach der Methodenentwicklung folgten drei Anwendungen des etablierten Verfahrens: Die erste Anwendung war das Screening verschiedenster Bakterien, Hefen und zweier Pilz-Arten. Hierbei konnte u.a. der Carotinoidgehalt und das Carotinoid-Spektrum von einigen bislang noch nicht auf Carotinoide untersuchten Mikroorganismen erstmalig charakterisiert werden. Das entwickelte Extraktionsverfahren bewies in Kombination mit dem etablierten Aufschlussverfahren beim Screening der Bakterien, Hefen und Pilze eine sehr gute „mikrobielle Robustheit“ und darüber hinaus die Fähigkeit zum Erkennen von visuell falsch positiven Carotinoidgehalten. Außerdem waren beim Screening und auch bei der nachfolgenden zweiten Anwendung, den Supplementierungsversuchen, die für eine Bestimmung nötige geringe Probenmenge und der gleichzeitig hohe Probendurchsatz der Methode von großem Vorteil.

Bei der zweiten Anwendung der Methode wurden anhand der Ergebnisse der Screeningversuche ausgewählte Bakterien und Hefen über ein Basis-Wachstumsmedium gezielt mit mehr als 20 verschiedenen Additiven supplementiert. Die Ergebnisse der Carotinoidgehalte und der Carotinoid-Spektren zeigten, dass neben der Steigerung auch eine Lenkung der Carotinoidbiosynthese durch definierte Supplemente möglich und zum Teil wirtschaftlich nutzbar ist. Die besten Effekte wurden durch die Supplemente Eisen-(III)-Chlorid und Xylose bei *Phaffia rhodozyma* und *Rhodotorula spp.* erzielt. Mithilfe beider Gattungen können die wirtschaftlich außerordentlich wichtigen Carotinoide Astaxanthin und  $\beta$ -Carotin biotechnologisch produziert werden. Somit liefern die erhaltenen Ergebnisse vor allem für die Optimierung dieser biotechnologischen Verfahren nützliche Daten.

Bei der dritten und letzten Anwendung diente das etablierte Verfahren als Basis zur Entwicklung einer weiterführenden LC-MS-Methode, welche für die Charakterisierung von strukturell bekannten, aber auch von strukturell unbekanntem mikrobiellen Isoprenoiden entwickelt wurde. Im Ergebnis konnten sowohl bekannte Carotinoide nachgewiesen als auch bei einigen der untersuchten Mikroorganismen bislang noch unbekannte Carotinoide identifiziert werden. Die resultierende LC-MS-Methode bewies insbesondere durch die Möglichkeit der Detektion von substituierten Carotinoiden eine vornehmliche Eignung für die Biomarker-Analytik, wenngleich die Selektivität der chromatographischen Vortrennung analog der ursprünglichen Methodenentwicklung noch verbessert werden kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die etablierte Methode effizient und für die aufgezeigten Anwendungen adäquat verwendbar war.

## 6.2 Ausblick

Ausgehend von der in dieser Arbeit entwickelten Methode und den aufgezeigten Anwendungen lassen sich zahlreiche Fragestellungen, insbesondere Fragestellungen aus biotechnologischen, taxonomischen und medizinischen Gebieten fortführend bearbeiten.

Mit der Ausweitung des Screenings könnte u.a. umfassend geklärt werden, inwieweit die Farbigkeit pathogener Mikroorganismen durch Carotinoide bedingt wird. Möglicherweise lässt sich z.B. bei *Enterobacter sakazakii* oder bei *Rhodococcus equi* sowie auch bei anderen pigmentierten Mikroorganismen, analog *Staphylococcus aureus*, ein Zusammenhang zwischen der Bildung von Carotinoiden und der Pathogenität und/oder der Persistenz und Resistenz der Keime nachweisen (LIU et al. 2008, DAUM 2008). Im Anschluss könnte festgestellt werden, ob sich die mikrobielle Carotinoidbiosynthese solcher Keime hemmen lässt und ob dadurch auch die Pathogenität gehemmt wird. In diesem Fall könnte mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Verfahren auf entsprechende Carotinoid-Biosynthesehemmer gescreent und dadurch Leitstrukturen für neue Arzneistoffe gefunden werden. Für den pigmentierten *S. aureus* wurde bereits gezeigt, dass solche Carotinoid-Biosynthesehemmer die Pathogenität senken können (LIU et al. 2008 und 2005, WALSH et al. 2008). Auf Basis dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass derartige Substanzen die immuneigene Abwehr des Menschen und auch die Wirksamkeit von Antibiotika möglicherweise entscheidend unterstützen können (LIU et al. 2005 und 2008, WALSH et al. 2008, DAUM 2008).

Des Weiteren kann mit der Ausweitung des Screenings das Carotinoid-Spektrum, von bislang noch nicht auf Carotinoide untersuchten (pigmentierten) Bakterien und Hefen, charakterisiert werden. Da die Methode ebenfalls substituierte Carotinoide miterfasst, können speziell auch diese als charakteristische, chemotaxonomische und/oder identifikatorische Biomarker verwendet werden. Durch den Nachweis eines für eine Spezies oder Gattung spezifischen Carotinoid-Biomarkers könnten mittels LC-MS-Methode im Zusammenhang mit anderen empfindlichen Verfahren, wie beispielsweise der PCR, einzelne Arten von Mikroorganismen schnell und sicher nachgewiesen und gegebenenfalls auch das Wechselspiel mit ihrer Umwelt präzise charakterisiert werden. Forschungsbedarf besteht hier u.a. wieder für *Enterobacter sakazakii*, für den bisher nur wenige Quellen für sein Vorkommen bekannt sind. Der natürliche Ursprung der Art ist gegenwärtig immer noch unbekannt (NAZAROWEC-WHITE et al. 1997). Letzten Endes könnten so auch wesentlich schneller lebensmittelhygienisch-relevante und medizinisch-heikle mikrobielle Kontaminationen von *E. sakazakii* in Kinder- und Säuglingsnahrung festgestellt werden (VO (EU) 2073/2005, HEECHEN 2007).

Mikrobielle Carotinoide sind jedoch nicht nur medizinisch, sondern vor allem auch wirtschaftlich überaus bedeutsam, insbesondere als Pigmente für Lebensmittel und Kosmetika. Zur Deckung des wirtschaftlichen Bedarfs können Carotinoide prinzipiell auch mittels photosynthetisch inaktiven Bakterien und Hefen biotechnologisch produziert werden. Allerdings sind viele der bislang getesteten biotechnologischen Produktionsverfahren von Carotinoiden wirtschaftlich betrachtet noch nicht so effizient, wie die konkurrierenden Verfahren der chemisch-technischen Synthese. Demzufolge besteht auf dem biotechnologischen Sektor ein großer Bedarf an neuen und effizienten Verfahren bzw. die Notwendigkeit zur Verbesserung und Optimierung der bisherigen biotechnologischen Verfahren. Auf Grund des in den drei Anwendungen aufgezeigten analytischen Potentials der in dieser Arbeit etablierten Methoden ergeben sich

zahlreiche Möglichkeiten zum Prüfen und Optimieren biotechnologischer Verfahren. Des Weiteren kann die Methode auch im Rahmen der Suche nach geeigneten Supplementen oder Nährmedien zur Steigerung der Carotinoid-Ausbeute, insbesondere durch Steigerung der Bioakkumulation, herangezogen werden. Die in den Supplementierungsversuchen erhaltenen zahlreichen Daten liefern dazu viele nutzbare Ansatzpunkte. Nicht zuletzt kann die Methode auch zur biotechnologischen Prozesskontrolle und zur Lenkung der Biosynthese von bereits kommerzialisierten biotechnologischen Produktionsverfahren von Carotinoiden dienen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Photosynthetisch inaktive Mikroorganismen bieten ein enormes und in weiten Teilen noch unerforschtes Reservoir an neuartigen Carotinoidstrukturen mit vielen, bislang noch unbestimmten biologischen Funktionen. Durch die Untersuchung mikrobieller Carotinoide können nicht nur neue Carotinoidstrukturen und Funktionen gefunden, sondern auch attraktive biotechnologische Synthesewege sowie neue wirtschaftliche und medizinische Verwendungsmöglichkeiten erschlossen werden (MARTIN et al. 2008, KLEIN-MARCUSCHAMER et al. 2007, MAURY et al. 2005, SCHMIDT-DANNERT et al. 2000). Die hierzu notwendige adäquate analytische Methode zur Bestimmung von mikrobiellen Carotinoiden wurde im Rahmen dieser Arbeit geschaffen.

## 7. Experimenteller Teil

### 7.1 Material

#### 7.1.1 Verwendete Mikroorganismen

##### 7.1.1.1 Bakterien

<u>Spezies lat. (alphabetisch)</u>	<u>Herkunft und Charakterisierung</u>
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	StSa. UFZ Leipzig, API
<i>Arthrobacter bergerei</i>	LfL, DSMZ-Nr.: 16367
<i>Arthrobacter luteus</i>	DSMZ, Nr.: 20424
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	LfL, DSMZ-Nr.:20123
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	LfL, DSMZ-Nr.: 20168
<i>Arthrobacter uratoxydans</i>	LfL, DSMZ-Nr.: 20647
<i>Bacillus cereus</i>	StSa. Institut für Bakteriologie, VetMed Leipzig, API
<i>Brevibacterium linens</i>	StSa. Institut für Lebensmittelhygiene, VetMed Leipzig, API
<i>Micrococcus luteus</i> (syn. <i>Sarcina lutea</i> )	StSa. Institut für Bakteriologie, VetMed Leipzig, API
<i>Enterobacter agglomerans</i> (syn. <i>Panthoea agglomerans</i> )	StSa. Institut für Bakteriologie, VetMed Leipzig, API
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	StSa. Institut für Bakteriologie, VetMed Leipzig, API
<i>Rhodococcus equi</i>	StSa. Institut für Bakteriologie, VetMed Leipzig, API

##### 7.1.1.2 Hefen

<u>Spezies lat. (alphabetisch)</u>	<u>Herkunft und Charakterisierung</u>
<i>Bullera variabilis</i>	LfL, FTIR
<i>Candida intermedia</i>	LfL, FTIR
<i>Exophiala dermatitidis</i>	LfL, FTIR
<i>Filobasidium floriformae</i>	LfL, FTIR
<i>Phaffia rhodozyma</i> (syn. <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> )	DSMZ, Nr.: 5626
<i>Rhodotorula glutinis</i>	LfL, FTIR
<i>Rhodotorula graminis</i>	LfL, FTIR
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	LfL, FTIR
<i>Rhodotorula spp.</i> (Faces-Isolat)	StSa. Institut für Mycologie VetMed Leipzig, API
<i>Rhodotorula spp.</i> (Feld-Isolat)	StSa. Institut für Mycologie VetMed Leipzig, API
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	StSa. Institut für Mycologie VetMed Leipzig, API
<i>Trichosporon ovoides</i>	LfL, FTIR

##### 7.1.1.3 Pilze mit hefeähnlichem Stadium

<u>Spezies lat. (alphabetisch)</u>	<u>Herkunft und Charakterisierung</u>
<i>Acremonium butyrii</i>	LfL, FTIR
<i>Lecytophora hoffmannii</i>	LfL, FTIR

7.1.2 Chemikalien

<u>Substanz (alphabetisch)</u>	<u>Firma und Reinheit</u>
Aceton	p.a., Hollborn u. Söhne GmbH & Co KG
alpha-Tocopherol	Merck (Reinheit 98%)
Ammoniumacetat	HPLC-Reinheitsgrad, Fisher Scientific
Ammoniumacetat	p.a., Reachim
Ammoniumchlorid	p.a., Apolda
Ammoniumchlorid	p.a., Fluka
Butylhydroxytoluol (2,6- <i>di-tert</i> -butyl-p-cresol)	HPLC-Reinheitsgrad, Fluka
Chloroform	HPLC Reinheitsgrad, Fisher Scientific
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (Reinheit: 99,9 %)
Di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	p.a., Roth
EDTA	p.a., Baker
Eisen-(III)-chlorid	p.a., Merck
Eisessig	p.a. (98% [V/V]), Merck
Ethanol	p.a., Fisher Scientific
Ethylacetat	HPLC-Reinheitsgrad, Merck
Folsäure	Solvay, Hannover, 400 µg/Tbl
Glycerin	p.a., Roth
GPT (Guanidin- <i>tris</i> -Phosphat)	p.a., Merck
Hefeextrakt	Roth
Hexan	HPLC-Reinheitsgrad, Fisher Scientific
2-Propanol	HPLC-Reinheitsgrad, Fisher Scientific
Kaliumchlorid	p.a., Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a., Roth
<i>L</i> -Ascorbinsäure	p.a., Fluka
<i>L</i> -Asparaginsäure	p.a., Reanal, Budapest
<i>L</i> -Cystin	p.a., Berlin-Chemie
<i>L</i> -Glutamin	p.a., Reanal, Budapest
<i>L</i> -Histidin	p.a., Reanal, Budapest
<i>L</i> -Lysin,	p.a., Base, kristallin, Serva
<i>L</i> -Phenylalanin	p.a., Serva
<i>L</i> -Prolin	p.a., Reanal, Budapest
<i>L</i> -Threonin	p.a., Reanal, Budapest
<i>L</i> -Tryptophan	p.a., Reanal, Budapest
Maltose	p.a., Serva
Methanol	HPLC-Reinheitsgrad, Fisher Scientific
Natriumacetat	p.a., Apolda
Natriumacetat	p.a., Fluka

## Kapitel 7 – Material

Natriumchlorid	p.a., Roth
Natriumhydroxid	p.a., Chemapol
Natriumhydroxid (solid)	p.a., Merck
Natrium-Malonat	p.a., Serva
Saccharose	p.a., Serva
Salzsäure	p.a., 37% [V/V], Merck
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	p.a., Merck
Standard I Nähragar	Merck, Fertigtrockennährmedium
Stickstoff	technisch, Linde Gas Therapeutics
<i>tert</i> -Methyl-butyl-ether	HPLC-Reinheitsgrad, Fisher Scientific
Tetrahydrofuran	p.a., Merck (unstabilisiert)
Triethanolamin	p.a., Fluka
Tryptic Soy Broth	Sigma
Vitamin B <sub>1</sub> /B <sub>6</sub>	100 mg B <sub>1</sub> und 100 mg B <sub>6</sub> pro Tbl., STADA AG, Bad Vilbel
Vitamin B <sub>12</sub>	100 µg/10 ml Ampulle, Wörwag Pharma, Ankermann
Xylose	p.a., Merck
YGC-Agar	Merck, Fertigtrockennährmedium
Zinnacetat-Dihydrat	p.a., Merck
Zink-Dihydrat	p.a., Merck
Zitronensäure	p.a., Merck

<u>Enzyme</u>	<u>Firma, spezifische Aktivität, LOT-Nummer</u>
Lysozym	aufgereinigt aus Hühnereiweiß, 62970, Lot 117802631405184, 97940 U/mg, Fluka
Lyticase	aufgereinigt aus <i>Arthrobacter luteus</i> , L4025, Lot (I) 093K8601, 983 U/mg, Sigma und Lot (II) 093K8604, 167 Units/mg
Lipase	aufgereinigt aus <i>Penicillium camemberti</i> , 96888, Lot 410529/141205009; 5,9 U/g, Fluka

### Carotinoid-Standards und Vergleichssubstanzen

	<u>Herkunft, Spezifikationen, Reinheit</u>
<i>all-trans</i> -Astaxanthin	Standardqualität, Acros Organics, Reinheit > 99% (UV-VIS)
<i>all-trans-α</i> -Carotin	in EtOH, IfEP
<i>all-trans-β</i> -Carotin	Reinheit > 97 %, Fluka
Cryptoxanthin	in EtOH, IfEP
Lutein	in EtOH, IfEP
Lycopene	stabilisiert in alpha-Tocopherol, IfEP
β-apo-8'-carotenal (trans)	Reinheit > 96 %, Fluka
Canthaxanthin	BASF AG Ludwigshafen, technische Reinheit > 90% (UV-VIS)
Zeaxanthin	in EtOH, IfEP

### 7.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Ammoniumacetatlösung	3 mol/l (500 ml dest. Wasser: 115,62 g Ammoniumacetat)
Chloroform	(0,1% BHT [m/V]): 100 ml Chloroform (HPLC-Reinheitsgrad); 0,1 g BHT
Lipaselösung:	Einwaage: 1,25 mg bis 1,5 mg Lipase in 1 ml PBS-Puffer, entspricht bei 50 mg Einwaage an Lyophilisat einer Aktivität von 0,04 U/ml bis 0,06 U/ml in der endgültigen Aufschlussesuspension
Lyozymlösung:	Einwaage: 1,25 mg – 1,5 mg Lyozym in 1 ml PBS-Puffer, entspricht bei 50 mg Einwaage an Lyophilisat einer Aktivität von 600 – 750 kU/ml in der endgültigen Aufschlussesuspension
Lyticaselösung:	Einwaage: 1,25 mg – 5 mg Lyticase (je nach Ausgangsaktivität) in 1 ml PBS-Puffer, entspricht bei 50 mg Einwaage an Lyophilisat einer Aktivität von 6 - 8 kU/ml in der endgültigen Aufschlussesuspension
Methanol-Chloroform-Extraktionsgemisch	105 ml Methanol (HPLC-Reinheitsgrad mit 0,1% BHT [m/V]) + 45 ml Chloroform (HPLC-Reinheitsgrad), entspricht 7:3 MeOH/CHCl <sub>3</sub>
Natriumchloridlösung 10%	100g NaCl <i>ad</i> 1000 ml <i>aq. dem.</i>
PBS-Puffer:	bezogen auf 1 Liter: 8,0 g Natriumchlorid, 2,3 g Di-Natrium-hydrogenphosphat-Dihydrat, 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,2 g Kaliumchlorid
Zinkacetat-Dihydratlösung (kaltgesättigt bei RT)	30 ml dest. Wasser mit ca. 13,0 g Zinkacetat-dihydrat
Candida Elektivagar nach Nickerson (CN)	Merck, Fertigplatten
Sabouraud (SAB) Agar	Merck, Sifin, Fertigplatten
Yeast-Extrakt-Glucose-Chloramphenicol (YGC) Agar	Merck, Fertig-Trockennährmedium
Luria Bertani (LB) Agar	bezogen auf 1 Liter: 37 g Standardnähragar 1 (Merck), 5 g Soja-Trypton (Merck), 2 g Hefelysate (Merck), 4 g NaCl
Malzextrakt (ME) Agar	Sifin, Fertigtrockennährmedium
Casein Peptone Soymeal Peptone (CASO) Agar	Sifin, Fertigtrockennährmedium
Plate Count (PC) Agar	Sifin, Fertigtrockennährmedium

### 7.1.4 Geräte und Zubehör

<u>HPLC-DAD Anlage:</u>	<u>Knauer</u>
Autosampler	Marathon, 50 µl Injektionsschleife, Knauer*
Dioden-Array-Detektor (DAD)	Wellchrom DAD K-2700 Lampe K-2701, Knauer*
dynamische Mischkammer	Knauer*
Fließmittelentgaser	Degasser, Knauer*
HPLC-Pumpe	K-1001, Knauer*
HPLC-Säulen	RP-C <sub>30</sub> -Phase, 250x4,6mm; 5 µm; 300 Å, Prontosil, polymers Bonding, nicht- <i>endcapped</i> , Bishoff Chromatography, Vorsäule: gleiches Material (10x4,6mm); <i>Batches</i> : 1 = 2005, 2 = 2007 RP-C <sub>18</sub> -Phase, Chrompack Inertsil ODS-3, monomers Bonding, vollständig- <i>endcapped</i> (250x4,4 mm), 5 µm, Vorsäule gleiches Material (10x4,6 mm), <i>Batch</i> : 516011, Serien-Nr.: 104092
Kapillaren	Edelstahl und Poly-Ethyl-Ether-Keton (PEEK)
Lösungsmittelorganisator	K-1500, Knauer*
Säulenofen	Jetstream Plus, Thermotechnic Products

## Kapitel 7 – Material

<u>LC-MS Anlage:</u>	<u>Shimadzu - Applied Biosystems / AB Sciex Instruments</u>
MS-Detektor	Shimadzu-Applied Biosystems Analytical Technology MS-Dtektor, 4000QTRAP (Triple-Quadrupol/Linear-Ion-Trap-Massenspektrometer)
HPLC-Pumpe	Shimadzu LC20AD
Autosampler	Shimadzu SIL20AC
Säulenofen	Shimadzu CTO20AC
Kapillaren	PEEK
HPLC-Säule	RP-C <sub>18</sub> -Phase, Synergi-MAX-RP, 50x2 mm, 2 µm, 100 Å, Phenomenex

### sonstige Geräte

<i>French-Press</i>	French Pressure Cell Press (SLM Instruments)
pH-Meter	WTW series (inoLab)
Autoklav	Varioklav® Dampfsterilisatoren (H + P Labortechnik GmGH)
Mikroskop	Axiovert 200 (Zeiss)
Ultraschallsonode	UP 200H (Dr. Hielscher GmbH)
Sterilbank	Hera-Safe (Heraeus Instruments)
Spektrometer	Photometer Varian Carry
Vortex	Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
Inkubator	Heidolf UNIMAX 1010

### **7.1.5 Verbrauchsmaterialien**

Membranfilter	0,2 µm; Durchmesser 47 mm; Cellulose, Alltech (zur Filtration des Fließmittels)
Petrischalen	greiner bio-one
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Polypropylen), 1,5 ml; 2,0 ml
Spritzen	BD Plastipak, 20 ml
Spritzenvorsatzfilter	0,2 µm; Durchmesser 4 mm; Nylon-Membran, (zur Filtration der HPLC-Proben) Phenomenex
Spritzenvorsatzfilter, steril	0,2 µm; Durchmesser 25 mm; PES-Membran, (zur Filtration der Standardlösungen und Medienzusätze) Meus SRL Diagnostici per Analisi
Zentrifugenröhrchen	greiner, Polypropylen, 15 ml
<u>Sonstige Materialien</u>	<u>Hersteller Spezifikationen</u>
Braunglasvials	Amber Screw Thread Vial 2 ml 12x32, YMC Europe GmbH
Deckel (für Braunglasvials)	AGE-A1225, YMC Europe GmbH
Drigalskispatel	Selbsterstellung aus Glasstäben
Glasinserts	(für Braunglasvials) AHO-4608, Phenomenex
Impföse	Edelstahl-Spezialdraht, Durchmesser 2mm, Schütt-Labortechnik
Wheaton-Kulturröhrchen	100x16 mm, mit teflonbeschichteten Verschlüssen, Wheaton Science Products



## 7.1.6 Software

Chromgate	Version 3.1, Knauer Copyright® ASI (1998-2003)
GraphPad Prism	Version 4.0
Microsoft Excel	Version 2002
SigmaPlot	Version 9.0
SigmaStat	Version 3.5
Analyst	Version 1.4.2, Applied Biosystems/AB Sciex Instruments 2004

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 Allgemeine Methoden

#### 7.2.1.1 Herstellung und Aufbewahrung von Standard- und Vergleichslösungen

Auf Grund ihrer chemischen Struktur unterliegen Carotinoide leicht temperatur- und lichtbedingten Isomerisierungen sowie oxidativen Abbauprozessen (RODRIGUEZ-AMAYA 2001 u. 2004). Um insbesondere letztere zu unterbinden, wurden alle Standard- und Vergleichssubstanzen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  unter Lichtausschluss und Stickstoffatmosphäre gelagert. Nach jedem Gebrauch der Gefäße wurde zum Schutz vor Oxidationen die eingetretene Luft wieder mit Stickstoff verdrängt und das Gefäß luftdicht verschlossen. Zur Verhinderung von Photo-Isomerisierungen erfolgte die Herstellung der Lösungen ausnahmslos bei Raumtemperatur unter Vermeidung von direktem Lichteinfall in Braunglasgefäßen (RODRIGUEZ-AMAYA 2001 u. 2004). Zur Herstellung der Stammlösungen wurden je nach Löslichkeit etwa 0,5 mg bis 1 mg Substanz mit 5 mL absolutem EtOH 0,05% BHT [m/V] versetzt, ca. 30 sek. ins Ultraschallbad gestellt und über Nacht im Kühlschrank ( $8^{\circ}\text{C}$ ) belassen. Für die Arbeitslösung wurde am darauf folgenden Tag ein Aliquot der Stammlösung durch  $0,2\ \mu\text{m}$  filtriert und anschließend mit absolutem EtOH entsprechend verdünnt. Von einer geeigneten Verdünnung der Arbeitslösung (EtOH/BHT 0,05%) wurde nach einer Basislinienkorrektur das UV-VIS-Spektrum zwischen 250 nm und 600 nm aufgenommen. Der Gehalt wurde über die Messung der Absorption im Maximum des Spektrums unter Verwendung der spezifischen Absorptionskoeffizienten (BRITTON 1993 u. 2004) als Mittelwert aus drei Messungen bestimmt. Die Herstellung der Lösung des internen Standards erfolgte analog. Zusätzlich zu BHT wurde das Lösungsmittel hierbei mit 1% [m/V] *alpha*-Tocopherol ( $\alpha\text{TOC}$ ) stabilisiert und diese Lösung bei der Basislinienkorrektur verwendet. Alle Standard- bzw. Vergleichslösungen wurden nach erfolgter Gehaltsbestimmung maximal 36 h verwendet und im Anschluss entweder verworfen oder der Gehalt neu bestimmt.

### 7.2.1.2 Methodik der Untersuchung zu Verlusten von Carotinoiden durch Degradation und Adsorption

Um die Verluste einschätzen und minimieren zu können wurden geeignete Vorversuche durchgeführt. Von einem *all-trans*-Astaxanthin-Standard (AST) und von einem *all-trans*- $\beta$ -Carotin-Standard ( $\beta$ CAR) wurden ethanolische Lösungen hergestellt. Jeweils zwei Proben wurden in Gefäßen aus braunem Glas im Kühlschrank (8°C) gelagert bzw. bei Raumtemperatur (RT) in Eppendorfgefäßen (Polypropylen) belassen. Nach zwei Tagen wurden alle Lösungen filtriert (0,2  $\mu$ m) und anschließend chromatographiert. Der Verlust an Carotinoid wurde über das Peakflächenverhältnis (RT vs. Kühlschranklagerung sowie Glaslagerung vs. Kunststofflagerung) bestimmt.

### 7.2.1.3 Methodik zur Quantifizierung der Carotinoide

Alle Carotinoide mit der Ausnahme von AST wurden als *all-trans*-Carotin-Äquivalent ( $\beta$ CAR-Äq) quantifiziert (BHUPINDER et al. 1991, VAZQUEZ et al. 1998). AST wurde über einen separaten Standard bestimmt. Dazu erfolgte eine externe Kalibration der HPLC Methode mit einem *all-trans*- $\beta$ -Carotin (*at*- $\beta$ CAR) und einem *all-trans*-Astaxanthin (*at*-AST) Standard bei 450 nm bzw. 474 nm. Die gesamte Laufzeit aller Kalibrationslösungen konnte hierbei bis zu sechs Stunden betragen, wobei der Autosampler keine Kühlung der jeweils verbliebenen Kalibrationslösungen ermöglichte. Unter diesen Bedingungen musste bei lange im Autosampler verbleibenden Standardlösungen mit Degradationen und *cis-trans*-Isomerisierungen gerechnet werden (LIETZ et al. 1997). Um eine genaue Kalibration für das *all-trans*-Isomer zu erhalten, wurde daher jede Kalibrationslösung erst kurz vor Applikation in die HPLC Anlage aus der Stammlösung hergestellt und photometrisch der Gehalt bestimmt. Im Anschluss an alle Läufe wurde die Peakfläche des *at*- $\beta$ CAR-Peaks bzw. des *at*-AST-Peaks unter konstanten Integrationsbedingungen ermittelt. Für den Fall, dass sich insbesondere bei hohen Standard-Konzentrationen kleinere Peaks von *cis*-Isomeren vor oder hinter dem Hauptpeak sichtbar wurden, wurde wie folgt verfahren: Es wurde die gesamte detektierbare Peakfläche integriert und der Anteil des *all-trans*-Peaks an dieser ermittelt. Im Anschluss daran wurde der Gehalt der jeweiligen Kalibrationslösung um genau diesen Anteil korrigiert. Dabei wurde vorausgesetzt, dass die spezifische (molare) Absorption von *trans*-Isomeren und *cis*-Isomeren sich nur geringfügig unterscheiden (RAJENDRAN et al. 2005, BRITTON et al. 2004). Die nachfolgende lineare Regression der Peakfläche in Abhängigkeit zur jeweils eingesetzten Standardkonzentration wurde mittels GraphPad Prism 4.0 durchgeführt. Neben der Anpassungsgüte ( $R^2 > 0,99$ ) und der Linearität (Runs Test) wurde geprüft, ob das 95% Konfidenzintervall des Ordinatenabschnittes der Geraden den Nullpunkt mit einschließt. Wenn dies gegeben war, konnte davon ausgegangen werden, dass der Schnittpunkt der Gerade nicht signifikant von null verschieden ist (KROMIDAS 2000). Abschließend wurden die Kalibrationsgeraden des 25min Laufes und des 50min Laufes über das Programm statistisch gegeneinander getestet (Covarianz-Analyse). Da sich hier keine signifikanten Unterschiede ergaben, konnte die resultierende Gerade zur Gehaltsbestimmung aller Carotinoide als  $\beta$ CAR-Äq auch bei leicht modifizierten Gradienten verwendet werden. Geringfügige Modifizierungen der Gradienten wurden im Zuge einer Optimierung der Trennung einzelner Carotinoide für einige Mikroorganismen separat vorgenommen. Die hierbei entwickelten Gradienten können jeweils den zugehörigen Bildunterschriften entnommen werden.

#### 7.2.1.4 Methodik der Bestimmung von Verlusten an Carotinoiden bei der Aufarbeitung

Für die Untersuchungen wurden sowohl Extrakte von *Rhodotorula spp.* und *Micrococcus luteus*, als auch Mischproben bestehend aus *at*-AST/*at*- $\beta$ CAR in Ethanol (EtOH) verwendet. Von letzteren wurde zusätzlich zum Gehalt der einzelnen Standardlösungen der Gesamtgehalt photometrisch als  $\beta$ CAR-Äq ( $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2590$ ) über das Absorptionsmaximum des UV-VIS-Spektrum bestimmt (BRITTON 1995 u. 1993). Alle Proben wurden in Wheaton-Kulturröhrchen aliquotiert. Anschließend wurden jeweils 500  $\mu$ l Chloroform ( $\text{CHCl}_3$  mit 0,1% BHT [m/V]), *tert*-Methyl-Buthylether (MTBE), Ethylacetat,  $\text{CHCl}_3$  (unstabiliert) oder Hexan zugefügt. Die Trennung der Phasen erfolgte zunächst versuchsweise mit jeweils 8 ml Ammoniumacetatlösung (3 mol/l), später mit Natriumchloridlösung (10% [m/V]) und durch anschließendes Zentrifugieren (10 min, 4500 U/min, 4°C). Die Umverteilung wurde dreimal mit dem Lösungsmittel (nach Bedarf jeweils 500  $\mu$ l bis 800  $\mu$ l) bis zur vollständigen Entfärbung der lipophilen Phase wiederholt. Die gesammelten, lipophilen Hyper- bzw. Hypo-Phasen wurden in Braunglas-HPLC-Vials überführt und unter Stickstoff im Sandbad bei ca. 35°C abgedampft und mit Ethanol wieder aufgenommen. Der Gesamtgehalt des Standardmixes wurde anschließend erneut photometrisch und die Einzelgehalte (*at*- $\beta$ CAR vs. Summe an *c*- $\beta$ CAR sowie *at*-AST vs. Summe an *c*-AST) chromatographisch über die Peakflächen bestimmt. Die Beurteilung der Eignung der Lösungsmittel erfolgte sowohl über das prozentuale Verhältnis der Gesamtgehalte ( $\beta$ CAR-Äq), als auch über das Verhältnis der Peakflächen der *at*-Peaks und über das bei der Umverteilung resultierende Zielvolumen der lipophilen Phase.

#### 7.2.1.5 Methodik zur Optimierung und Bestimmung des Linearitätsbereiches und der Wiederfindung

Die Optimierung und die Bestimmung des Linearitätsbereiches sowie der Wiederfindung der gesamten Methode erfolgte auf Grund des unterschiedlichen Aufbaus von Bakterien- und Hefezellen getrennt anhand der gewählten Modelkeime *Rhodotorula glutinis* und *Micrococcus luteus*. Dazu wurde eine ausreichend große Menge an Biomasse beider Mikroorganismen nach den unter 7.2.2.1 und 7.2.2.3 beschriebenen bzw. den in der Abbildung 1 dargestellten Verfahren angezüchtet, geerntet und lyophilisiert. Von dieser Charge wurden steigende Einwaagen (zwischen 3 mg und 55 mg) an Lyophilisat nach dem unter 2.3.3 beschriebenen bzw. den in den Abbildungen 2 und 11 dargestellten Verfahren aufgearbeitet und vermessen. Die Linearität wurde graphisch über die Darstellung der ermittelten Gehalte in Abhängigkeit zu der eingesetzten Menge an Lyophilisat (sog. Linearplot) beurteilt (KROMIDAS 2000). Zuerst wurden einige Vorversuche durchgeführt und der lineare Bereich der Methode erweitert: Die zum Aufschluss eingesetzte Menge an Enzym wurde schrittweise erhöht (Lysozym von  $1,5 \cdot 10^5$  U/ml bis auf  $2 \cdot 10^6$  U/ml, Lytikase von  $2 \cdot 10^2$  U/ml bis auf  $2 \cdot 10^3$  U/ml und Lipase von 0,5 U/ml bis auf 10 U/ml). Die 1,5 ml Inkubationsgefäße wurden durch 2 ml Gefäße ausgetauscht und so die Fassungskapazität für die Menge an Lyophilisat erhöht. Gleichzeitig wurde dadurch eine ausreichend gute Durchmischung der Enzym-Zell-Suspension insbesondere bei hohen Einwaagen an Lyophilisat und hoher Enzymkonzentration ermöglicht. Zusätzlich wurde ein geeignetes Fällungsmittel zu besseren Zentrifugierbarkeit der aufgeschlossenen Suspension eingeführt. Dazu wurden folgende Substanzen getestet: Natrium-Dodecylsulfat (SDS, 20% [m/V]), Guanosin-*tris*-Phosphat (GTP, 10% [m/V]), Zinkacetat (bei RT kaltgesättigte Lösung in *aq. dem.*), Zinnacetat (bei RT kaltgesättigte

Lösung in *aq. dem.*) und Harnstoff (10% [m/V]). Des Weiteren wurde für Hefezellen zusätzlich eine Inkubation in Dimethylsulfoxid (DMSO) eingeführt. Die abschließende Prüfung des optimierten Linearitätsbereiches wurde mit der Bestimmung der Wiederfindungsrate des gesamten Extraktionsverfahrens kombiniert. Dazu wurden analog den Vorversuchen steigende Mengen an *Micrococcus luteus* bzw. *Rhodotorula spp.* eingewogen und aufgeschlossen. Nach erfolgtem Zellaufschluss wurde das Zellpellet mit  $\beta$ -8'-apo-Carotenal ( $\beta$ APC) als internem Standard dotiert (etwa 1 mg photometrisch genau bestimmt und als Stammlösung stabilisiert mit 1%  $\alpha$ TOC [m/V]) und die dotierte Suspension weiter aufgearbeitet. Die Ermittlung der Wiederfindung der Extraktion erfolgte über einen Vergleich mit der Direktvermessung des Internen Standards (ISTD) mittels HPLC. Durch die steigende Einwaage an Zellmaterial konnten mit Hilfe der Methode auch Matrixeffekte (wie beispielsweise Verluste von Carotinoiden durch Adsorption) erkannt werden. Für die Berechnung der relativen Wiederfindung eines Carotinoides im Lyophilisat wurde der durchschnittliche Verlust (die zuvor bestimmte absolute Wiederfindung) an Carotinoiden berücksichtigt (vgl. Tabelle 3, Kapitel 1).

### **7.2.1.6 Methodik zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Zur Bestimmung wurden von fünf Kalibrationswerten mit einer Konzentration an Carotinoid nahe der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze mittels GraphPad Prism die Residuen und aus diesen die Reststandardabweichung für die Kalibriergerade berechnet (KROMIDAS 2000, DIN 32645). Im Anschluss daran wurde über die Steigung der Geraden und unter Berücksichtigung eines Faktors die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt („Geradenverfahren“, vgl. KROMIDAS 2000).

### **7.2.1.7 Graphische und statistische Verfahren zur Darstellung und Auswertung der Daten**

Um die graphische Aussagekraft der Rohwerte in den Diagrammen zu erhalten, wurden Mehrfachbestimmungen vornehmlich durch Median und Spannweite bzw. Percentile dargestellt. Wenn zweckdienlicher wurden normalverteilte Messwertreihen mit  $n=5$  graphisch durch Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Auf Normalverteilung wurde zuvor statistisch nach KOLMOGOROV-SMIRNOV mittels SigmaStat 3.5 getestet.

Für einen statistischen Vergleich zweier Mittelwerte wurde jede Messreihe zusätzlich auf Varianzhomogenität mittels F-Test geprüft. Bei Erfüllung der Testbedingungen wurde zum Vergleich der arithmetischen Mittelwerte der t-Test angewendet. Bei nicht Entsprechen der Testbedingungen (Normalverteilung und Varianzhomogenität) wurden die Mediane der Messwertreihen mit Hilfe des MANN-WHITNEY-Rangsummen-Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests auf  $p \leq 0,05$  begrenzt.

## **7.2.2 Mikrobiologische Methoden**

### **7.2.2.1 Nährmedienbereitung und Supplementierung**

Für die Aufzucht der Mikroorganismen wurden sowohl Fertig-Agarplatten (SAB, CN) als auch Agarplatten aus eigener Anfertigung (LB, YGC, ME) verwendet. Letztere wurden aus Trockennährmedien hergestellt und gegebenenfalls mit definierten Nährstoffzusätzen supplementiert. Die Schritte zur Bereitung der

Trockennährmedien waren Einwiegen, Suspendieren in *aq. dest.*, Autoklavieren für 15min bei 121°C (2 bar) und Ausgießen bei etwa 70°C. Alle Fertig-Trockennährmedien wurden gemäß dieser Reihenfolge und nach den vom Hersteller angegebenen Spezifikationen hergestellt. Beim Autoklavieren können sich bei Zusätzen wie Zuckern oder Aminosäuren Millard-Produkte in erheblichem Ausmaß bilden (SÜßMUTH et al. 1999). Je nach Art und Menge des/der zugesetzten Zuckers/Aminosäure wird die Bioverfügbarkeit solcher Supplemente dadurch stark gemindert. Insbesondere die in dieser Arbeit verwendeten Aminosäuren Lysin, Cystein und Asparagin stellen dabei überaus reaktive Partner der Millard-Reaktion dar. Um eine Minderung der Bioverfügbarkeit von Nährstoffzusätzen durch eine Millard-Reaktion zu unterbinden, wurde zur Herstellung der supplementierten Grundnährmedien unter sterilen Bedingungen (unter der Sterilwerkbank) wie folgt verfahren:

Von allen Supplementen wurde eine konzentrierte Stammlösung in *aq. dest.* hergestellt und steril filtriert (0,2 µm). Parallel dazu wurde das Trockennährmedium mit nur 85% des vom Hersteller geforderten Wasseranteils hergestellt und autoklaviert. Innerhalb der Abkühlphase (ca. 70°C bis 80°C) wurde ein definiertes Volumen des noch flüssigen Mediums in einen Standzylinder überführt. Danach wurde die gewünschte Menge an Supplement, berechnet auf das jeweilige Endvolumen, zugegeben. Anschließend wurde mit ca. 70°C warmen sterilem *aq. dest.* anhand der Scala des Standzylinders *ad.* 100% ergänzt. Der Ansatz wurde durch leichtes Schwenken gemischt und in Platten gegossen. Bei der Supplementierung des Mediums mit Folsäure, Vitamin B<sub>12</sub>, und Vitamin B<sub>16</sub> sowie Eisen-(III)-Chlorid wurden jeweils 100 µl der Stammlösung direkt auf die kurz zuvor gegossene, noch flüssige Platte (ca. 12 ml Medium) gegeben. Vor der Verwendung wurden alle Platten unter sterilen Bedingungen in geöffnetem Zustand über Nacht getrocknet. Folgende Konzentrationen wurden über das beschriebene Verfahren eingestellt: *L*-Phenylalanin 85 mM, *L*-Tryptophan 50 mM, *L*-Lysin 175 mM, alle Zucker und Natriummalonat 875 mM, dreiwertiges Eisen 3,0 mM, Folsäure 23,2 µM, Vitamin B<sub>12</sub> 52,2 nM und Vitamin B<sub>16</sub> 1,1 mM/2,0 mM.

### 7.2.2.2 Anlegen von Dauerkulturen

Zur Weiterverwendung der eingesetzten Mikroorganismen wurde eine Stammsammlung mittels Kryokonservierung angelegt. Aus dem konservierten Material konnte bei Bedarf das Animpfen einer neuen Kultur erfolgen.

Von allen Hefen und Bakterien wurde von einer bebrüteten Platte eine einzelne Kolonie mittels Impföse in ein steriles Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit Medium überführt. Hierbei wurde 1 ml LB-Medium für Bakterien und 0,5 ml LB-Medium mit 4% Glucose [m/V] für Hefen verwendet. Anschließend wurden die Hefen bei RT und die Bakterien bei 37°C im Trockenschrank über Nacht angezüchtet. Am darauf folgenden Tag erfolgte der Zusatz des Kryokonservans. Für Bakterien wurde hierbei sowohl Glycerol als auch DMSO verwendet; für Hefen nur Glycerol (SÜßMUTH 1999, BAEZA et al. 2008). Die Konzentration des Kryokonservans bei Bakterien betrug 10% und bei Hefen 50%. Nach dem Vortexen wurden die Proben bei -80°C eingefroren und aufbewahrt. DMSO wurde vor Gebrauch steril filtriert (0,2 µm) und Glycerol autoklaviert (15 min, 121°C, 2 bar). Parallel zur kryokonservierten Dauerkultur wurde das jeweilige Bakterium auf einer LB-Platte und die jeweilige Hefe auf einer YGC-Platte mitgeführt. Alle Platten wurden mittels Parafilm luftdicht verschlossen und bei ca. 8°C im Kühlschrank gelagert. Eine Überimpfung auf eine neue Platte erfolgte je nach Wachstum des Mikroorganismus alle vier bis sechs Wochen.

### 7.2.2.3 *Anzucht, Ernte und Lyophilisation der Mikroorganismen*

Es wurden Petrischalen mit dem gewünschten Nährmedium vorbereitet (vgl. 7.2.2.1) und unter sterilen Bedingungen mit dem jeweiligen Mikroorganismus mittels Impfösenausstrich beimpft. Während die Bakterien auf LB-Agarplatten aerob bei 37°C im Inkubationsschrank angezüchtet wurden, wurden die Hefen auf YGC-Agarplatten aerob bei RT (ca. 26°C) und unter indirekter, diffuser Tageslichteinwirkung kultiviert (CERDA-OLMEDO 1989, ALPER et al. 2006, VDLUFA amtliche Methode zur Futtermittelkontrolle). Abhängig vom Wachstum des jeweiligen Mikroorganismus erfolgte die Ernte nach fünf bis neun Tagen in der Plateau-Phase der mikrobiellen Carotinoid-Synthese der meisten Mikroorganismen (CIEGLER 1965, LIAAEN-JENSEN et al. 1972, VAZQUEZ et al. 1997, AKSU et al. 2005 u. 2007). Dazu wurde die Biomasse mittels Drigalski-Spatel von den Agarplatten entfernt und die anhaftenden Zellen in *aq. dest.* suspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen abgefüllt und zentrifugiert (4500 rpm, 4 °C, 30 min), so dass sich Wasser und Biomasse wieder trennten. Danach wurde der wässrige Überstand dekantiert und der verbliebene Inhalt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im folgenden Arbeitsschritt wurde der Inhalt der Zentrifugenröhrchen gefriergetrocknet (je nach Menge 24 h bis 48 h bei P < 1 mbar). Anschließend konnte die lyophilisierte Biomasse zur Aufarbeitung weiter verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

### 7.2.2.4 *Methoden zum Zellaufschluss*

Für die Frier-Tau-Zyklen wurden die Proben in dicht verschlossenen Eppendorf-Gefäßen zunächst in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren (ca. 30 sek). Für das Absenken und Wiederherausheben der Proben in/aus dem Stickstoff wurde ein Nylon-Strumpf verwendet. Das anschließende Wiederauftauen der Proben erfolgte im Wasserbad bei 30°C bis 35°C solange (ca. 6 min), bis wieder eine homogene Suspension ohne sichtbare Eiskristalle vorhanden war. Die Einfrier-Auftau-Prozedur wurde bei allen Proben jeweils dreimal durchgeführt.

Der Ultraschallaufschluss erfolgte in denselben Eppendorfgefäßen. Die Eintauchtiefe der Ultraschallsonode in die Suspension betrug dabei etwa 0,5 cm bis 1 cm. Die Leistung der des Gerätes wurde zuvor auf 10% (ca. 70 Watt) eingestellt, da eine Leistung von über 10% häufig zu einem Verspritzen der Probe führte. Der Aufschluss erfolgte gepulst über zweimal 15 sek mit einem Puls von jeweils neun. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden wurde die Sonode nach jeder Probe mit einem trockenen Papiertuch abgewischt. Die Aufschlussprozedur erfolgte unter Vermeidung von direktem Lichteinfall.

Der Aufschluss der Zellen mittels *French-Press* wurde bei einem Druck von 900 PSI durchgeführt. Das Auslassventil wurde dabei so weit geöffnet, dass die resultierende Suspension tropfenweise aus der Aparatur floss. Die aufgeschlossene Suspension wurde erneut in die Aufschlusskammer gefüllt und der Aufschluss wiederholt. Um durch den Aufschluss nur so wenig wie möglich Material zu verlieren, wurde nach dem Aufschließen einer Probe die Aufschlusskammer mit 2 ml bis 5 ml *aq. dem.* vorsichtig ausgespült und das Spülwasser zur aufgeschlossenen Suspension hinzugegeben.

Der Aufschluss mittels Schwingmühle (Mikro-Dismembrator® U, Braun Biotech International GmbH) erfolgte über Stahlkugeln (70% Füllung der Kammer, Durchmesser 0,5 cm) bei einer Frequenz von bis zu 3000/min. Die Aufschlussdauer betrug jeweils 1 min und wurde für eine einzelne Probe bis zu viermal wiederholt.

### 7.2.2.5 Methodik und Parameter bei der Entwicklung des Extraktionsverfahrens

Bei der Entwicklung des Extraktionsverfahrens wurde zunächst die Extraktionskraft einzelner wassermischbarer Lösungsmittel (2-Propanol, Aceton, Tetrahydrofuran, Methanol, Ethanol) an jeweils 20 mg bis 40 mg lyophilisiertem Zellmaterial von *Micrococcus luteus* oder *Rhodotorula glutinis* getestet. Alle Test-Extraktionen wurden solange wiederholt bis das neu zugegebene Extraktionsmittel nach dem Zentrifugieren im Überstand keine erkennbare Eigenfärbung mehr aufwies. Die Arbeiten wurden bei Raumtemperatur (ca. 26°C) und unter Vermeidung von direktem Lichteinfall durchgeführt. Zum Vergleich der Extraktionskraft der Lösungsmittel wurde der Gesamt-Carotinoidgehalt (GCG) als  $\beta$ CAR-Äq bei 450 nm photometrisch bestimmt. Für Lösungen in MeOH und EtOH wurde dabei der spezifische Absorptionskoeffizient von  $\beta$ CAR verwendet (BRITTON 1995 u. 2004). Bei den Tests anderer organischer Lösungsmittel wurde das zur Extraktion verwendete Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch vor der Bestimmung des GCG zunächst unter Stickstoff bei RT abgedampft. Im Anschluss daran wurde das Residuum mit 3,0 ml EtOH wiederaufgenommen und der GCG als  $\beta$ CAR-Äq photometrisch bei 450 nm bestimmt. Insofern mit EtOH das Residuum nicht wieder vollständig lösbar war, wurden alle Lösungen (auch die in MeOH und EtOH) unter Stickstoff eingedampft, in  $\text{CHCl}_3$  wiederaufgenommen und als  $\beta$ CAR-Äq mit Hilfe der spezifischen Absorption dieses Lösungsmittels für  $\beta$ CAR bestimmt. Bei dem Auftreten von Trübungen der Messlösungen durch weiße unlösliche Partikel (vermutlich schwer lösliche Fettbestandteile, Proteine oder Kohlenhydrate) wurden die Lösungen vor der photometrischen Messung durch einen HPLC-Spritzenfilter (0,45  $\mu\text{m}$ , PP) filtriert. Um dabei die Ergebnisse durch die beim Filtrieren möglicherweise entstehenden Verluste an Carotinoiden nicht zu verfälschen, wurden ebenso auch alle anderen zum Vergleichen verwendeten Lösungen filtriert. Die Bestimmung des GCG bei den Tests zur Wahl des Umverteilungsmittels von der hydrophilen zur lipophilen Phase erfolgte analog. Insofern bei der Umverteilung eine schlechte Phasentrennung resultierte, wurden die Lösungen mit 4500 U/min bei 10°C für 10min zentrifugiert. Die Gewinnung der farbigen Hyperphase (bei  $\text{CHCl}_3$  die Hypophase) erfolgte mittels einer Hamilton-Spritze aus Glas mit einer Stahlkanüle. Zwischen zwei verschiedenen Lösungen wurde die Spritze jeweils dreimal mit MeOH/ $\text{CHCl}_3$  (1:1 [V/V]) gespült. Die Extraktionskraft von Mischungen lipophiler nicht wassermischbarer Lösungsmittel mit wassermischbaren Lösungsmitteln wurden analog getestet.

### 7.2.3 Instrumentelle Methoden

#### 7.2.3.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zu Anfang jedes Messtages wurden alle Lösungsmittelkanäle vor der Inbetriebnahme der HPLC-Anlage luftblasenfrei gespült (*gepurged*). Im Anschluss daran wurde das Basislinienrauschen und auf elektronische Störpeaks (*Spikes*) über einen Lauf mit MeOH-Injektion geprüft. Sofern das Basislinienrauschen über 1 mAU betrug oder mehr als zwei elektronische Störpeaks in 10 min Laufzeit auftraten, wurde der Computer und die HPLC heruntergefahren, der Detektor mit 2-Propanol gespült, der Netzstecker geerdet und die Anlage erneut gestartet. Zum Spülen der Injektionsnadel und Injektionsschleife wurde ebenfalls 2-Propanol verwendet. Die Leistungsfähigkeit des DAD wurde alle vier Monate über einen Lampentest geprüft. Dazu wurde in der Software unter „*Mode Intensity*“ mit einer „*Integration Time*“ von 100 msek zwischen 300 nm bis 600 nm gescannt. Das erwartete Maximum sollte bei 485 nm liegen und eine Intensität von mindestens

79000 mAU erreichen. Um Druckschwankungen des Systems und die damit verbundenen Basislinienschwankungen durch den Druckabfall nach dem Detektor zu kompensieren, wurde eine etwa 50 cm lange Stahlkappillare dem Detektor nachgeschaltet. Darüber hinaus wurde zur Verlängerung der Lebensdauer der Hauptsäule eine Vorsäule vorgeschaltet, welche gegebenenfalls Verunreinigungen abfängt. Die Ansammlung von Verunreinigungen auf der Vorsäule konnte über den Druckanstieg innerhalb des gesamten Systems beurteilt werden. Die Vorsäule wurde spätestens bei Erreichen eines Systemdrucks von 160 bar (1,2 mL/min) gewechselt. Insofern eine Säule länger als fünf Tage nicht verwendet werden sollte, wurde sie nach den Messungen mit MeOH bei 25°C und einem Flow von 1 ml/min frei von AAc gespült und anschließend unter 100% MeOH mit fest verschlossenen Enden luftdicht bei RT gelagert.

### 7.2.3.1.1 Fließmittelherstellung und Vorgehen beim Zusatz von Additiven

Alle Fließmittel wurden vor ihrem Einsatz durch 0,2 µm filtriert. Bei einigen Fließmitteln erfolgte die Messung und Einstellung des pH-Äquivalentes der mobilen Phase (pH-Äq) mittels pH-Meter unter automatischer Temperaturkompensation des Gerätes (vgl. 2.5.4.1.1 und Abbildung 13). Hierzu wurde das pH-Meter zuvor mit wässrigen Kalibrationspuffern zwischen pH 4 und pH 12 kalibriert und die Elektrode im Anschluss nacheinander sorgfältig mit *aq. dest.* und danach mit MeOH abgespült. Die pH-eingestellten Fließmittel wurden in geschlossenen Glasgefäßen luftdicht aufbewahrt und über einen Zeitraum von maximal 48 h verwendet. Bei den Tests des Einflusses des pH-Äq auf die Elution von AST wurde dem als Vergleich verwendeten, „reinen“ Fließmittel (ohne Additiv) 0,17% [V/V] *aq. dest.* zugesetzt. Der Anteil ergab sich aus der Menge an Wasser, welches aus dem Zusatz konzentrierter, wässriger Säuren oder Basen (NaOH 30% [m/V] od. HCl 6N) aus der Herstellung des pH-modifizierten Fließmittels resultierte. Anhand dieses Vorgehens konnten die erzielten Effekte des pH-Äq-modifizierten Fließmittels und die des „reinen“ Fließmittels (ohne Additiv) direkt miteinander verglichen werden. Die Effekte des Wasseranteils wurden gewissermaßen nivelliert.

### 7.2.3.1.2 Variation der Säulentemperatur

Die Säulentemperatur wurde zwischen 6°C und 32°C sukzessive, aufsteigend variiert. Während der Einstellung der gewählten Säulentemperatur wurde der Flow zwecks Fließmittelverbrauchs zunächst auf 0,5 ml/min abgesenkt. Nach dem Erreichen der eingestellten Säulentemperatur wurde der Flow auf die für den Versuch jeweilige Höhe angehoben und das System für etwa 10 min equilibriert. Die Tests erfolgten für ein und dieselbe Standardlösung von AST verteilt auf mehrere Braunglas-Vials.

### 7.2.3.1.3 Variation der Fließmittelgeschwindigkeit und des Fließmittelgradienten

Die jeweils beschriebenen Fließmittelgradienten wurden empirisch, d.h. durch „geordnetes Probieren“ ermittelt. Anfangs wurde die vom Hersteller empfohlene Fließmittelgeschwindigkeit von 1,3 ml/min angewandt und zuerst verschiedene isokratische Elutionen mit Mischungen aus MTBE/MeOH mit 50 mM AAc an AST, βCAR und LYC getestet. Eine hinreichend gute Peakhöhe und Peakform bei gleichzeitiger Abtrennung einiger *cis*-Isomere zeigte sich für das gegenüber anderen Carotinoiden



vergleichsweise hydrophile AST bei einer isokratischen Elution mit MTBE/MeOH (30:70 [V/V]), für das apolare  $\beta$ CAR mit MTBE/MeOH (50/50 [V/V]) und für das stark apolare LYC mit MTBE/MeOH (60/40 [V/V]). Die Steilheit der für die mikrobiellen Carotinoid-Extrakte entwickelten Gradienten von MTBE in MeOH wurde zwischen 80% in 40 min und 90% in 13 min sukzessive variiert und an Extrakten aus *Micrococcus luteus* und bei *Rhodotorula spp.* sowie an einer Standardmischung bestehend aus AST, LUT, ZEA,  $\beta$ CAR, CAN,  $\beta$ APO und LYC getestet und optimiert. Dabei zeigten CAN und  $\beta$ APO häufig eine mangelhafte Trennung. Ein noch steilerer Gradient zeigte (vermutlich auf Grund der unterschiedlichen Komprimierbarkeit der Fließmittel) erhebliche Schwankungen in der Grundlinie und ein noch flacherer Gradient schlechte Peakformen sowie geringe Peakhöhen insbesondere bei den apolaren, spät eluierenden Carotinoiden. Darüber hinaus zeigten zwei Tests von einem konkavem und einem konvexen Gradienten an dem genannten Standardgemisch keine bessere Trennung als die linearen Gradienten. Aus diesem Grund wurde ein linearer Gradient grundsätzlich bevorzugt. Insofern sich für bestimmte Extrakte keine ausreichende Trennung auch unter Berücksichtigung einer Verbesserung durch die Variation der Säulentemperatur ergab, wurden die Gradienten innerhalb des oben angegebenen Intervalls für eine optimale Trennung angepasst.

Zur Untersuchung des Einflusses der Fließmittelgeschwindigkeit insbesondere auf die Trennung von CAN und  $\beta$ APO wurde diese sukzessive zwischen 0,6 ml/min und 1,5 ml/min variiert. Zuvor wurde die Säule bei dem jeweiligen Flow für jeweils 30 min eingespült. Insofern nach den Testläufen nicht sicher war, ob alle Analyte eluiert waren, wurde die Säule mit MTBE/MeOH (80/20 [V/V]) bei 1 ml/min für mindestens 30 min gespült. Bei Bedarf wurde hierbei, wie vom Hersteller empfohlen, die entgegengesetzte Fließrichtung gewählt, d.h. die Säule umgedreht.

### 7.2.3.2 *Massenspektrometrisch gekoppelte Flüssigkeitschromatographie (LC-MS)*

Zuerst wurde anhand von Vorversuchen eine für Carotinoide geeignete Ionisierungstechnik ausgewählt. Prinzipiell standen hierfür die Elektrospray Ionisierung (ESI), die Photochemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APPI), und die Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) als Ionisierungstechniken zur Verfügung. Der Literatur zufolge wird die ESI-Technik bevorzugt für polare Analyte, wie Tocopherole, Catechine oder Flavonoide angewandt und ist für die Detektion von Carotinoiden nur beschränkt einsetzbar (SANTOS et al. 2000, STROHSCHNEIN et al. 1999, ZEEB et al. 2000, RAO et al. 2005). Zur Bestätigung dieser Befunde wurden Lösungen der Standardsubstanzen AST und  $\beta$ CAR in MeOH sowohl mittels der ESI-Technik als auch mittels der APCI-Technik im positiven und negativen Modus jeweils mit und ohne dem Zusatz von AAc zum Eluenten vermessen. Dabei waren AST und  $\beta$ CAR prinzipiell über beide Techniken detektierbar. Allerdings zeigte das polarere AST im Gegensatz zu dem apolareren  $\beta$ CAR unter ESI eine deutlich bessere Ionisierbarkeit. Darüber hinaus konnte die Ionisierbarkeit von AST durch den Zusatz von AAc noch deutlich gesteigert werden, für  $\beta$ CAR hingegen kaum. Die Ergebnisse zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur, dass bei der Verwendung der ESI-Technik für die hinreichende Ionisierbarkeit von apolaren Carotinoiden häufig polare Additive zugesetzt werden müssen (LI et al. 2005, RENTEL et al. 1998, VAN BREEMEN 1995, SANDER et al. 2000). Außerdem kommt es unter ESI, bedingt durch die hohe Energieweinwirkung, zu einer stärkeren Fragmentierung der Analyte als unter APCI und infolgedessen oft zum Verlust des Molekülpeaks, was die Strukturaufklärung erheblich erschwert (HARKEY

et al. 2005, VAN BREEMEN 1995, CARNEVALE et al. 1978). Die Vorversuche bestätigten, dass bei der HPLC-APCI-MS-Kopplung zur Ionisierung von Carotinoiden eine polare mobile Phase der HPLC mit Wasser oder Methanol im Eluat ausreichend ist (VAN BREEMEN 1996). Durch die schonende Ionisierung entsteht ein protoniertes Carotinoid-Molekülion bei zugleich schwacher Fragmentierung. Die HPLC-APCI-MS-Kopplung besitzt eine hohe Empfindlichkeit, welche für Carotinoide im Picogramm-Bereich liegt (QIN et al. 2008, DACHTLER et al. 2001, LACKER et al. 1999). Die Detektion unterschiedlicher Molekülmassen und die Strukturaufklärung von Carotinoiden über das Fragmentierungsmuster kann so innerhalb nur eines chromatographischen Laufes erfolgen (HAGIWARA et al. 1998). Die Grenze der Methode liegt in der Unterscheidung von massengleichen Carotinoiden. Häufig kann zwischen isomeren Carotinoiden wie z.B. Lutein und Zeaxanthin, über unterschiedliche Fragmentierung nicht eindeutig unterschieden werden (DUGO et al. 2008a, KURZ et al. 2008, DACHTLER et al. 2001). Verschiedene geometrische Isomere eines Carotinoids verhalten sich dabei so ähnlich, dass ihre Massenspektren nahezu identisch aussehen können.

Auf der Basis der Ergebnisse der Vorversuche wurde für alle Versuche die APCI-Technik im positiven Modus verwendet, welche eine leistungsstarke, selektive Trennmethode der HPLC mit der hoch empfindlichen, massenspezifischen Detektionsmethode der Massenspektrometrie (MS) verbindet (KURZ et al. 2008, NAKAGAWA et al. 2008, LEHMANN 1996, BUDZIKIEWICZ 1992).

#### 7.2.3.2.1 Chromatographische und massenspektrometrische Parameter

Im Rahmen der massenspektrometrischen Untersuchungen der Extrakte zeigte die RP-C<sub>30</sub>-Säule bei einem für die Anlage üblichen Injektionsvolumen von 5 µL eine schlechte Wiederfindung, d.h. nur wenig oder gar keine detektierbaren Carotinoide. Dies kann auf eine Bandenverbreiterung auf Grund der Säulenabmessungen der getesteten RP-C<sub>30</sub>-Säule sowie auf Verluste während der Säulenpassage zurückgeführt werden. Deshalb wurde anstelle der RP-C<sub>30</sub>-Säule eine von den Säulenabmessungen her LC-MS-kompatible RP-C<sub>18</sub>-Säule verwendet. Alle Proben wurden nach dem Abdampfen in 510 µl CHCl<sub>3</sub>/MeOH (3:7 [V/V]) aufgenommen und davon 5 µl injiziert.

Die optimierten chromatographischen Bedingungen waren:

- Säulentemperatur 10°C
- Injektionsvolumen 5 µl
- Flow 0,4 ml/min
- Gradient MTBE in MeOH [min-%]: 0–0, 10-50, 12–50, 15–0
- Fließmittel-Additiv: 5 mM AAc im MeOH Eluent
- Spühlvolumen: 200 µl
- *Needle Stroke*: 48 mm
- Spühlgeschwindigkeit: 35 µl/sek
- *Sample* Geschwindigkeit: 15.0 µl/sek
- Purge Zeit: 5,0 min

- Temperatur Autosampler: 10°C
- *Control Vial Needle Stroke*: 48 mm
- *Pump Method: Rinse Port Only*
- *Rinse Time*: 2 sek

Die optimierten MS-Bedingungen waren:

- *Vacuum Gauge*:  $4.5 \times 10^{-5}$  Torr
- Temperature der Quelle (*at set-point*) 300°C
- Massenbereich 400 m/z bis 1500 m/z
- Ionisierungsmodus: positiv-APCI
- Scan-Modi: EMS (*Enhanced MS*), ER (*Enhanced-Resolution*), EPI (*Enhance-Product-Ion*)
- maximale Füllzeiten: EMS Scan 150 msek, ER Scan 250 msek, EPI Scan 250 msek
- minimale Füllzeiten: EMS Scan 1 msek, ER Scan 1 msek, EPI Scan 1 msek
- *Default* Füllzeiten: EMS Scan 20 msek, ER Scan 20 msek, EPI Scan 20 msek

#### 7.2.3.2.2 Methodik zur Identifizierung und Strukturaufklärung

Für die Identifizierung der Carotinoide wurden folgende Charakteristika und Parameter herangezogen und diese mit den Kenngrößen entsprechender Carotinoide aus der Literatur verglichen:

- der Verlauf bzw. die Feinstruktur der UV-VIS-Spektren des DAD zwischen 250 nm und 650 nm
- die Absorptionsmaxima und -minima der UV-VIS-Spektren des DAD zwischen 300 nm und 500 nm
- das Peakhöhenverhältnis der Absorptionsbanden (III/II [%]) zwischen 300 nm und 500 nm
- die Massen der Molekülpeaks und Fragmentpeaks aus den LC-MS-Messungen

Darüber hinaus wurde die Hydrophilie bzw. Lipophilie der detektierten Carotinoide durch den Vergleich der Retentionszeiten mit denen von Standardsubstanzen beurteilt. Die Elutionsreihenfolge der über die RP-C<sub>30</sub>-Säule eluierten Standardsubstanzen war AST, LUT, ZEA,  $\beta$ APO, CAN,  $\beta$ CRY,  $\alpha$ CAR,  $\beta$ CAR, LYC, wobei  $\beta$ APO und CAN nur unter speziellen Bedingungen Basislinien-getrennt wurden (vgl. 2.5.4.2 und Abbildung 34).

Die Qualität der Identifizierung von Carotinoiden wurde wie folgt beurteilt bzw. eingeteilt:

- vorläufige Identität [v.ID], wenn die betreffenden Carotinoide nur anhand ihrer UV-VIS-Spektren identifiziert werden konnten,
- gesicherte Identität [g.ID], wenn die betreffenden Carotinoide per UV-VIS-Spektrum identifiziert und über ein entsprechendes Massenspektrum bestätigt werden konnten,
- nicht identifizierbar [n.ID], wenn über den Vergleich der in der Literatur existierenden Daten das UV-VIS-Absorptionsspektrum keinem Carotinoid zugeordnet werden konnte.

## 8. Literaturverzeichnis

- ACHEAMPONG E.A., MARTIN A.M. (1995) Kinetic studies on the yeast *Phaffia rhodozyma*, *J. Basic Microbiol.*, 35, 147-55.
- ADAMITSCH B.F., KARNER F., HAMPEL W. (2003) Proteolytic activity of a yeast cell wall lytic *Arthrobacter* species, *Letters in Applied Microbiology*, 36, 227-229.
- AGARWAL S., RAO A.V. (2000) Carotenoids and chronic diseases, *Drug Metab. Drug Interact.*, 17, 189-210.
- AJANEE N., ALAM M., HOLMBERG K., KAHN J. (1996) Brain abscess caused by *Wangiella dermatitidis*: case report, *Clin. Infect. Dis.*, 23, 197-201.
- AKSU Z., EREN A.T. (2007) Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotrula glutinis*, *Biochemical engineering Journal*, 35, 107-113.
- AKSU Z., TUGBA EREN A. (2005) Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as carbon source, *Process Biochemistry*, 40, 2985-2991.
- ALBRECHT M., TAKAICHI S., MISAWA N., SCHNURR G., BÖGER P., SANDMANN G. (2000a) Synthesis of atypical cyclic and acyclic hydroxy carotenoids in *Escherichia coli* transformants, *J. Biotechnol.*, 58, 177-185.
- ALBRECHT M., TAKAICHI S., STEIGER S., WANG Z.-Y., SANDMANN G. (2000b) Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.*, 18, 843-846.
- ALBERT K., LACKER T., RAITZA M., PURSCH M., EDELHAAF H.-J., OELKRUG D. (1998) Investigating the selectivity of triacontyl interphases, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 777-780.
- ALBRECHT M., TAKAICHI S., MISAWA N., SCHNURR G., BÖGER P., SANDMANN G. (1997) Synthesis of atypical cyclic and acyclic hydroxy carotenoids in *Escherichia coli* transformants. *J. Biotechnol.*; 58, 177-185.
- ALCANTARA S., SANCHEZ S. (1999) Influence of carbon and nitrogen sources on *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 697-700.
- ALEMZADEH R., FEEHAN T. (2004) Variable effects of beta-carotene therapy in a child with erythropoietic protoporphyria, *Eur J Pediatr.*, 163, 547-549.
- ALPER H., MIYAOKU K., STEPHANOPOULOS G. (2006) Characterization of lycopene overproducing *E. coli* strains in high cell density fermentations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 968-974.
- AMITABHA D., SANG-HWAI Y., SOOK-HEE L., JAE-YEAN K., DEOK-KUN O., SEON-WON K. (2007) An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77, 505-512.
- AN G.H., CHOI E.-S. (2003) Preparation of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*, as feed additive with increased availability of astaxanthin, *Biotechnology Letters*, 25, 767-771.
- AN G.H., JANG B.G., CHO M.H. (2001) Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses, *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 121-126.
- AN G.-H., JOHNSON E.A. (1996) Effect of oxygen radicals and aeration on carotogenesis and growth of *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), *J. Microbiol. Biotechnol.*, 6, 103-109.
- AN G.-H., JOHNSON E.A. (1990) Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 57, 91-203.
- AN G.-H., SCHUHMAN D.B., JOHNSON E.A. (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content, *Appl. Env. Microbiol.*, 55, 116-124.
- ANDERSON T.-H. (2004) Isolierung von dsDNA aus Boden-Mikroorganismen - Bedeutung mechanischer und enzymatischer Verfahren für den Zellaufschluss, Workshop, *Gesellschaft für Ökologie & Deutsche Bodenkundliche Gesellschaft*, [www.bodenoekologie.de/inkedDocuments/ Anderson.pdf](http://www.bodenoekologie.de/inkedDocuments/Anderson.pdf).
- ANDERSON J.S., SUNDERLAND R. (2002) Effect of extruder and dryer processing temperature on vitamin C and E and astaxanthin stability, *Aquaculture*, 207, 137-149.
- ANDREWS B. A., ASENJO J.A. (1987). Enzymatic lysis and disruption of microbial cells, *Trends in Biotechnology*, 5, 273-277.
- ANDREWS G.A., PHAFF H.J., STARR M.P. (1976) Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast, *Phytochemistry*, 15, 1003-1007.
- AONO R., HORIKOSHI K. (1991) Carotenes produced by alkaliphilic yellow-pigmented strains of *Bacillus*, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2643-2645.
- ARAKAWA Y., HASHIMOTO K., SHIBATA A., UMEZU M. (1977) Studies on the biosynthesis of carotenoids by microorganisms, II. Effect of visible light on the growth and carotenoids production of *Flavobacterium sp.* TK-70, *Hakko Kagaku Kaishi*, 55, 319-24.
- ARMSTRONG G.A. (1997) Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A colourful tale. *Annual Review of Microbiology*, 51, 629-659.

- ARMSTRONG G.A. (1994) Eubacteria show their true colors: Genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants, *J. Bacteriol.*, 176, 4795-4802.
- ARPIN N., FIASSON J.L., NORGDARD S., BORCH G., LIAAEN-JENSEN S. (1975) Bacterial carotenoids, XLVI. C50-Carotenoids, 14. C40-Carotenoids from *Arthrobacter glacialis*, *Acta Chem. Scand. B*, 29, 921-927.
- ARPIN N., LIAAEN-JENSEN S., TROUILLOUD M. (1972) Bacterial carotenoids. 38. C50-carotenoids. 9. Isolation of decaprenoxanthin mono- and diglycoside from an *Arthrobacter sp.*, *Acta Chem. Scand.*, 26, 2524-2530.
- ASCENZI J.M., COONEY J.J. (1975) Action of visible light on enzymes in cell envelopes of *Micrococcus roseus*, *Phytochem. Phytobiol.*, 21, 307-311.
- ASHOUR J., HONDALUS M.K. (2003) Phenotypic mutants of the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi* created by in vivo himar transposon mutagenesis, *J. Bacteriol.*, 185, 2644-2652.
- ASKER D., OHTA Y. (2002) Production of canthaxanthin by *Halofax alexandrinus* under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 743-750.
- AZEVEDO-MELEIRO C.H., RODRIGUEZ-AMAYA D.B. (2004) Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS, *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 385-396.
- BAEZA M., RETAMALES P., SEPULVEDA D., LODATO P., JIMENEZ A., CIFUENTES V. (2008) Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Journal of Basic Microbiology*, 48, 1-7.
- BAKER R., GÜNTHER C. (2004) The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption, *Trends in Food Science and Technology*, 15, 484-488.
- BAKER R., GÜNTHER C. (2005) Carotenoids for all! The antioxidant value of pigments, *Feed Mix*, 13, 18-21.
- BAKIR U., HAMAMCI H. (1996) Short Communication: The effect of freeze-thawing on the release of intracellular proteins from *Escherichia coli* by means of a bead mill, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 475-477.
- BAMJI M.S., KRINSKY N. I. (1966) The carotenoid pigments of a radiation-resistant *micrococcus* species, *Biochimica et Biophysica Acta*, 115, 276-284.
- BARASH I., MANULIS-SASSON S. (2007) Virulence mechanisms and host specificity of gall-forming *Pantoea agglomerans*, *Trends in Microbiology*, 15, 538-545.
- BARUA B., OLSON J. A. (1998) Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatographic procedure for simultaneous analysis of very polar to nonpolar retinoids, carotenoids and tocopherols in animal and plant samples, *J. Chrom. B*, 707, 69-79.
- BARRY A. LAW, LAW A. LAW (1999) Technology of Cheesemaking, Sheffield Academic Press, *CRC Press*, pp. 155-156.
- BAUER N. (2002) Curdlanase ein extrazelluläres Enzym von *Streptomyces*, Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- BELL C. M., SANDER L. C., WISE S. A. (1997) Temperature dependence of carotenoids on C18, C30 and C34 bonded stationary phases, *J. Chrom. A*, 757, 29-39.
- BENETT I., KNOUSE C., JOHNSON J., MEYER R. L., MILLARD M. W. (1997) *Wangiella dermatitidis* from acystic fibrosis patient, *Clin. Microbiol. Newsl.*, 19, 164-166.
- BHOSALE P., A.J. LARSON, P.S. BERNSTEIN (2004a) Factorial analysis of tricarboxylic acid cycle intermediates for optimization of zeaxanthin production from *Flavobacterium multivorum*, *Journal of applied Microbiology* 96, 623-629.
- BHOSALE P. (2004b) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 351-361.
- BHOSALE P., ERMAKOV I.V., ERMAKOVA M.R., GELLERMANN W., BERNSTEIN P.S. (2003a) Resonant raman quantification of zeaxanthin production from *Flavobacterium multivorum*, *Biotchnol. Lett.*, 25, 1007-1011.
- BHOSALE P., JOGDAND V.V., GADRE R.V. (2003b) Stability of  $\beta$ -carotene in spray dried preparation of *Rhodotorula glutinis* mutant 32, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 584-590.
- BHOSALE P., GADRE R.V. (2002) Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced  $\beta$ -carotene production by mutant 3 of *Rhodotorula glutinis*, *Letters in Applied Microbiology*, 34, 349-353.
- BHOSALE P.B., GADRE R.V. (2001a) Production of  $\beta$ -Carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 423-427.
- BHOSALE P.B., GADRE R.V. (2001b)  $\beta$ -Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 327-332.
- BHOSALE P., GADRE R.V. (2001c) Production of  $\beta$ -carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium, *Bioresource Technology*, 76, 53-55.
- BHUPINDER S., HUNDLE S., BEYER P., KLEINIG H., ENGLERT G., HEARST J.E. (1991) Carotenoids of *Erwinia herbicola* and *Escherichia coli* HB101 strain carrying the *Erwinia herbicola* carotenoid gene cluster, *Photochemistry and Photobiology*, 54, 89-93.

- BOCKELMANN W., WILLEMS K.P., NEVE H., HELLER K.H. (2005) Cultures of the ripening of smear cheeses, *International Dairy Journal*, 15, 719-732.
- BOCKELMANN W., HOPPE-SEYLER T. (2001) The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk, *International Dairy Journal*, 11, 307-314.
- BOCKELMANN W., FUEHR C., MARTIN D., HELLER K.J. (1997a) Color development by red-smear surface bacteria, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 49, 285-292.
- BOCKELMANN W., KRUSCH U., ENGEL G., KLIJN N., SMIT G. UND HELLER K. J. (1997b) The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora, *Nahrung*, 41, 208-212.
- BÖHM V. (2005) Ernährungswissenschaften, Universität Jena, Vortrag: Carotinoid-Spektrum der Hagebutte, Chrom-Forum Berlin.
- BÖHM V. (2001) Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by C<sub>30</sub> high performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.*, 24, 955-959.
- BOEHMER, S., GOLD, M., HAUSER, S., THOMAS, B. & YOUNG, A. (2005) Organic Aquaculture, pp. 46. Alternative Farming Systems Information Center, National Agricultural Library, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland.
- BONALY R., MALEMGE J.P. (1968) Biosynthese des Carotinoides cycliques chez *Rhodotorula Mucilaginosa* et *Rhodotorula aurantiaca*, *Biochem. Biophys. Acta*, 164, 306-316.
- BOONYARATPALIN M., THONGROD S., SUPAMATTAYA K., BRITTON G., SCHLIPALIUS L. E. (2001) Effects of carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon* Aquaculture Research, 32, 182-190.
- BRAITHWAITE A, SMITH F.J. Eds., (1996) Chromatographic Methods 5. ed., pp. 277-278, *Kluwer Academic Publishers*, London
- BRAMLEY P.M. (2005) Carotenoid biosynthesis and its regulation in filamentous fungi, Annual Meeting and International Symposium, *KMB Awardee's Lecture*, 89-96.
- BRAMLEY P.M., in: JOHNSON I., WILLAMSON G., eds. (2003) Phytochemical functional foods, Boca Raton, pp. 253-279, *CRC Press*, New York.
- BREITENBACH J., BRAUN G., STEIGER S., SANDMANN G. (2001) Chromatographic performance on a C<sub>30</sub>-bonded stationary phase of monohydroxycarotenoids with variable chain length or degree of desaturation and of lycopene isomers synthesized by various carotene desaturases, *Journal of Chromatography A*, 936, 59-69.
- BREITHAUPT D.E. (2004) Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction, *Food Chem.*, 86, 449-456.
- BRENNAN N.M., WARD A.C., BERESFORD T.P., FOX P.F., GOODFELLOW M., COGAN T.M. (2002) Biodiversity of the bacterial flora on the surface of smear cheeses, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 820-830.
- BRITTON G., LIAAEN-JENSEN S., PFANDER H. eds. (2004) Carotenoids Handbook, compiled by Mercadante A.Z., Egeland E.S., Birkhäuser, Basel.
- BRITTON G., LIAAEN-JENSEN S., PFANDER H. eds. (1995) Carotenoids, Volume 1B: Spectroscopy, *Birkhäuser*, Basel.
- BRITTON G. (1993) in LAW J.H., RILLING H.C., eds., COLOWICK SIDNEY P., KAPLAN N.O., *Methods in Enzymol.*, Volume 111, pp113-217, Steroids and Isoprenoids Part B, *Academic Press*, Chapter 5, General Carotenoid Methods, Orlando, Florida.
- BUDZIKIEWICZ H. Hrsg. (1992) in: Massenspektrometrie, *VCH Verlag*, 3. Auflage.
- BURNETT J. H. (1976) Function of carotenoids other than in photosynthesis, in: *Chemistry and Biotechnology of plant pigments*, Vol. 1, 2<sup>nd</sup> edn, ed. GOODWIN T. W. Chap. 14, pp. 655-679, Academic Press, New York.
- BURNS J., FRASER P.D., BRAMLEY P.M. (2003) Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetable, *Phytochem.*, 62, 939-947.
- Busse, H. J., Denner, E. B. and Lubitz, W. (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J Biotechnol* 47, 3-38.
- BUZZINI P., INNOCENTI M., TURCHETTI B., LIBKIND D., VAN BROECK M., MULINACCI N. (2007) Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*, *Can. J. Microbiol.*, 53, 1024-1031.
- BUZZINI, P., RUBINSTEIN, L., MARTINI, A. (2001) Production of yeast carotenoids by using agro-industrial by-products. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, pp. 7-10.
- BUZZINI P., MARTINI A. (1999) Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin, *Bioresource Technology*, 71, 41-44.
- CALVO M. M., DADO D. (2007) Influence of extraction with ethanol or ethyl acetate on the yield of lycopene, β-carotene, phytoene and phytopfuene from tomato peel powder, *Eur. Food Res. Technol.*, 224, 567-571.
- CAPELO J.L., XIMENEZ-EMBUN P., MADRID-ALBARRAN Y., CAMARA C. (2004) Enzymatic probe sonication: Enhancement of protease-catalyzed hydrolysis of selenium bound to proteins in yeast, *Anal. Chem.*, 76, 233-237

- CARERI M., ELVIRI L., MANGIA A. (1999) Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of  $\beta$ -carotene and xanthophylls. Validation of the analytical method, *J. Chrom. A*, 854, 233-244.
- CARNEVALE J., COLE E.R., NELSON D., SHANNON J.S. (1978) Chemical ionisation mass spectrometry of carotenoids, *Biomedical mass spectrometry*, 5, 641-646.
- CERDA-OLMEDO E. (1989) Production of carotenoids with fungi, in E.J. Vandamme ed., *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*, *Elsevier Applied Science*, Amsterdam, The Netherlands, pp. 27-42.
- CHANG K.-W. (1990) Stimulation of carotenoid synthesis in *Phaffia rhodozyma* by metal ions and superoxide radicals, M.S. thesis, University of Wisconsin, Madison.
- CHEN D. HAN Y., GU Z. (2006a) Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*, *Process Biochemistry*, 41, 1773-1778.
- CHENG Q. (2006b) Structural diversity and functional novelty of new carotenoid biosynthesis genes, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 552-559.
- CHISTI Y. MOO-YOUNG M. (1986) Disruption of microbial cells for intracellular products, *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 194-204.
- CHOUBERT G., CRAVEDI J.-P., LAURENTIE M. (2009) Effect of alternate distribution of astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle pigmentation, *Aquaculture*, 286, 100-104.
- CIAPARA H.L., VAENZUELA L. F., GOYCOOLEA F.M. (2006) Astaxanthin: A review of its chemistry and applications, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46, 185-196.
- CIEGLER A. (1965) Microbial carotogenesis, *Adv. Appl. Microbiol.*, 7, 1-34.
- CIEGLER A., ARNOLD M., ANDERSON R.F. (1959) Microbiological production of carotenoids. V. Effect of lipids and related substances on production of beta-carotene, *Appl Microbiol.*, 7, 98-101.
- COLLINS A.R. (2001) Carotenoids and genomic stability, *Mutat Res.*, 18, 21-28.
- COLLINS, M. D. AND JONES, D. (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol. Rev.*, 45, 316-54.
- COLLINS M. D., JONES D., GOODFELLOW M., MINNIKIN D. E. (1979) Isoprenoid quinone composition as a guide to the classification of *Listeria*, *Brochothrix*, *Erysipelothrix* and *Caryophanon*. *J. Gen. Microbiol.* 111, 453-457.
- COOK K.K., MITCHEL G.V., GRUNDEL E., RADER J.I. (1999) HPLC analysis for trans-vitamin K1 and dihydro-vitamin K1 in margarines and margarine-like products using C<sub>30</sub> stationary phase, *Food Chem.*, 67, 79-88.
- COONEY J.J., BERRY R.A. (1981) Inhibition of carotenoid synthesis in *Micrococcus roseus*, *Can. J. Microbiol.*, 27, 421-425.
- COONEY J.J., MARKS H.W., SMITH A.M. (1966) Isolation and identification of canthaxanthin from *Micrococcus roseus*, *J. Bacteriol*, 92, 342-345.
- COOPER D.A., ELDRIDGE A.L., PETERS J.C. (1999) Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research, *Nutr Rev.*, 57, 201-214.
- CORAL-HINOSTROZA G. N., T. YTRESTOYL, B. RUYTER, B. BJERKENG (2004) Plasma appearance of unesterified astaxanthin geometrical E/Z and optical R/S isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3'R/S isomers of astaxanthin fatty acyl diesters, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 139, 99-110.
- CORTEZ C., ESTEVE M. J., FRIGOLA A., FRANCISCO T. (2004) Identification and Quantification of Carotenoids Including Geometrical Isomers in Fruit and Vegetable Juices by Liquid Chromatography with Ultraviolet-Diode Array Detection, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2203-2212.
- COUNSELL J.N. (1984) Some Synthetic Carotenoids as Food Colours, in: *Developments in Food Colours*, *Wallord*, Chapter 4, pp. 151-187.
- CRAFT N.E., WISE S.A., SOARES J.H. (1992a) Optimization of an isocratic high-performance liquid chromatographic separation of carotenoids, *J. Chrom.*, 589, 171-176.
- CRAFT N.E. (1992b) Relative Solubility, Stability, and Absorbivity of Lutein and  $\beta$ -Carotene in Organic Solvents, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 431-434.
- CRUZ A.T., CAZACU A.C., ALLEN C.H. (2007) *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease, *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 1989-1992.
- CUNNINGHAM F.X., GANTT E. (2005) A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*, *Plant J.*, 41, 478-492.
- DACHTLER M., GLASER T., KOHLER K., ALBERT K. (2001) Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina; *Anal. Chem.*, 73, 667-674.
- DAUM R.S. (2008) Removing the golden coat of *Staphylococcus aureus*, *N. Engl. J. Med.*, 359, 85-7.
- DAVOLI P. WEBER W.S. (2007) Carotenoid pigments from the red mirror yeast, *Sporobolomyces roseus*, *Mycologist*, 16, 102-108.

- DAVOLI, P., MIERAU V., WEBER, R.W. (2004) Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 40, 460-5.
- DAVOLI, P., WEBER, R.W.S. (2002) Carotenoid pigments from the red mirror yeast *Sporobolomyces roseus*. *Mycologist* 16, 103–110.
- DEED A., SEVIOR R.J., SWIFT I.E. (1990) Production of carotenoids by protoplasts of the fungus *Acremonium diospyri*, *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 941-944.
- DEMBITSKY V.M. (2005) Astonishing Diversity of Natural Surfactants: 3. Carotenoid Glycosides and Isoprenoid Glycolipids, *Lipids*, 40, 535-557.
- DE MIGUEL T., SIEIRO C., POZA M., VILLA T.G. (2001) Analysis of canthaxanthin and related pigments from *Gordonia jacobea* mutants, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1200-1202.
- DE MIGUEL T., SIEIRO C., POZA C., VILLA T.G. (2000) Isolation and taxonomic study of a new canthaxanthin-containing bacterium, *Gordonia jacobaea* MV-1 *sp. nov.*, *Internatl. Microbiol.*, 3, 107-111.
- DIAS M.G., FILOMENA M., CAMEOS G.F.C., OLIVEIRA L. (2009) Carotenoids in traditional portugese fruits and vegetables, *Food Chem.*, 113, 808-815.
- DIAS M. G., FILOMENA M., CAMOES G. F. C., OLIVEIRA L. (2008) Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production, *Food Chem.*, 109, 815-824.
- DIERINGER S.M., SINGER J.T., COONEY J.J. (1977) Photokilling of *Micrococcus roseus*, *Phytochem. Phytobiol.*, 26, 393-396.
- DINGERMANN T. Hrsg. ZÜNDORF I. (1999) Gentechnik Biotechnik, Lehrbuch und Kompendium für Studium und Praxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- DOI K., DOI A., OZAKI T., FUKUI T. (1976) Further studies on the heterogeneity of the lytic activity for isolated yeast cell walls of the components of an *Arthrobacter glucanase* system : Properties of the two components of a  $\beta$ -(1-3)-glucanase, *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1355-1362.
- DOLAN J. W. (2007) Welchen Einfluss hat die Temperatur auf die Selektivität, LC-GC, 12,16-20.
- DOMINGUEZ-BOCANEGRA A. R., PONCE-NOYOLA T., TORRES-MUNOZ J.A. (2007) Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75, 783-791.
- DOMINGUEZ-BOCANEGRA A.R., TORRES-MUNOZ J.A.(2004) Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 249-252.
- D'SOUZA SE, ALTEKAR W, D'SOUZA SF. (1997) Adaptive response of *Haloferax mediterranei* to low concentrations of NaCl (< 20%) in the growth medium, *Arch Microbiol.*, 168, 68-71.
- DUC L.H., FRASER P.D., NGUYEN K.M., CUTTING T. CUTTING S.M. (2006) Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers, *FEMS Microbiol. Lett.*, 255, 215-224.
- DUFOSSE L., MOBON P., BINET A. (2001) Assesment of the coloring strength of *Brevibacterium linens* Strains ; Spectrocolorimetry versus total carotenoid extraction/quantification, *J. Dairy Sci.*, 84, 354-360.
- DUGO P., HERRERO M., GIUFFRIDA D., RAGONESE C., DUGO G., MONDELLO L. (2008a) Analysis of native carotenoid composition in orange juice using C<sub>30</sub> columns in tandem, *J. Sep. Sci.*, 31, 2151-2160.
- DUGO P., HERRERO M., KUMM T., GIUFFRIDA D., DUGO G., MONDELLO L. (2008b) Comprehensive normal-phase x reversed-phase liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection for the analysis of free carotenoid esters from mandarin, *J. Chrom. A*, 1189, 196-206.
- DWORKIN M. (1958) Endogenous photosensitization in a carotenoidless mutant of *Rhodospseudomonas spheroides*, *J. Gen. Physiol.* 41, 1099–1112.
- EDGE R., MCGARVEY D.J., TRUSCOTT T.G. (1997) The carotenoids as anti-oxidants - a review, *New Trends in Photobiology (Invited Review)*, 41, 189-200.
- EICHLER O., SIES H., STAHL W. (2002) Divergent optimum levels of lycopene, beta-carotene and lutein protecting against UVB irradiation in human fibroblastst, *Photochem Photobiol.*, 75, 503-506.
- EL-AGAMEY A., LOWE G.M., MCGARVEY D.J., MORTENSEN A., PHILIP D.M., TRUSCOTT T.G., YOUNG A.J. (2004) Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430, 37-48.
- EL-JACK M., MACKENZIE A., BRAMLEY P.M. (1988) The photoregulation of carotenoid biosynthesis in *Aspergillus giganteus* *mut. alba.*, *Planta*, 174, 59-66.
- EMENHISER C., N. SIMUNOVIC, L.C. SANDER AND S.J. SCHWARTZ (1996) Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C<sub>30</sub> column in reversed-phase liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3887-3893.
- EMENHISER C., L.C. SANDER, S.J. SCHWARTZ, J. CHROMATOGR. (1995) Capability of a polymeric C30 stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 707, 205-216.
- EMMERT J. (2006) Mobile Phase Additives for LC-MS. Part 1-6, *Analytix* 2-8.



- EMMONS W., REICHWEIN B., WINSLOW D.L. (1991) *Rhodococcus equi* infection in the patient with AIDS: literature review and report of an unusual case, *Rev. Inf. Dis.*, 13, 91-96.
- EPLER K.S., R.G. ZIEGLER, N.E. CRAFT (1993) Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food, *J. Chromatogr.*, 619, 37-48.
- EPLER K.S., L.C. SANDER, R.G. ZIEGLER, S.A. WISE, N.E. CRAFT (1992) Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids., *J. Chromatogr.*, 595, 89-101.
- EPPERT I., VALDES-STAUER N., GÖTZ H., BUSSE M., SCHERE S. (1997) Growth reduction of *Listeria spp.* caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese, *Appl. Environm. Microbiol.*, 63, 4812-4817.
- EVANS C. T., ADAM D., WISDOM R. A. (1990) In *European Patent Application*, 90311254.8..
- FERRER P. (2006) Revisiting the *Cellulosimicrobium cellulans* yeast-lytic  $\beta$ -1,3-glucanases toolbox: A review, *Microbiol Cell Factories*, 5, 1-24.
- FERRUZZI M.G., MINH THY L., NGYEN L., SANDER L.C., ROCK C.L., SCHWARTZ S.J. (2001) Analysis of lycopene geometrical isomers in biological microsamples by liquid chromatography with coulometric array detection, *J. Chrom. B*, 760, 289-299.
- FERRUZZI M.G., SANDER L.C., ROCK C.L., SCHWARTZ S.J. (1998) Carotenoid Determination in Biological Microsamples Using Liquid Chromatography with a Coulometric Electrochemical Array Detector, *Analytical Biochemistry*, 256, 74-81.
- FIASSON J.L., ARPIN N., PERRIER J. (1976) 4-Keto-gamma-carotene (beta, psi,-caroten-4-one), the major pigment of an *Arthrobacter sp.*, *Can J. Biochem*, 54, 1016-1023.
- FIASSON J.L. (1972) Carotenoids in various anasco sporous yeasts, *Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci. D.*, 19, 3465-3472.
- FIRN R. D., JONES C. G. (2000) The evolution of secondary metabolism – a unifying model, *Mol. Microbiol.*, 37: 989-994.
- FLIEGER J. (2006) The effect of chaotropic mobile phase additives on the separation of selected alkaloids in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chrom. A*, 1113, 37-44.
- FONG N.J.C., BURGESS M.L., BARROW K.D. GLENN D.R. (2001) Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 750-756.
- FONTANA J.D., GUIMARAES M.F., MARTINS N-T-, FONTANA C.A., BARON M. (1996) Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low cost-media, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 58, 413-422.
- FOSS B.J., SLIWKA H.-R., PARTALI V., NAESS A. N., ELGSAETER A., MELO T. B., NAQVI K. R., O'MELLEY S., LOCKWOOD S. F. (2005) Chemistry and Physics of Lipids, 135,157-162.
- FOSTER D. (1992) Cell Disruption: Breaking Up Is Hard To Do, *Biotechnology*, 10, 1539-41.
- FRASER P.D., BRAMLEY P.M. (2004) The biosynthesis and nutritional use of carotenoids, *Prog. Lipid Res.*, 43, 228-265.
- FRASER P.D., PINTO M.E.S., HOLLOWAY D.E., BRAMLEY P.M. (2000) Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids, *The Plant Journal*, 24, 551-569.
- FRENGOVA G., SIMOVA E., BESHKOVA D. (1997) Carotenoid-protein and epopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 272-277.
- FRENGOVA G., SIMOVA E., PAVLOVA K., BESHKOVA D., GRIGOROVA D. (1994) Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate, *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 888-894.
- FRINGS E., HOLTZ C., KUNZ B. (1993) Studies about casein degradation by *Brevibacterium* lines, *Milchwissenschaft*, 48, 130-133
- FRIXEL S.K. (2002) Antioxidative Eigenschaften von Carotinoiden, Carotinoidaldyden, Retinoiden, phenolischen Wirkstoffen und Indigoiden Methode des Sauerstoffverbrauchs, laugural-Dissertation, *Heinrich Heine Universität, Düsseldorf*.
- FULLER R. C., ANDERSON I. C. (1958) Inhibition of Carotenoid Synthesis in Photosynthetic Bacteria: Suppression of Carotenoid Synthesis and its Effect on the Activity of Photosynthetic Bacterial Chromatophores, *Nature*, 181, 252-254.
- FURR H.C. (2004) Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved, *J.Nutr.*, 134, 281S-285S.
- GALAUP P., FLAMIN C., CARLET E., DUFOSSE L. (2005) HPLC analysis of the pigments produced by the microflora isolated from the Protected Designation of Origin French red-smear soft cheeses Munster, Epoisses, Reblochon and Livarot, *Food Res. Internat.*, 38, 855-860.
- GALENSA R., ENGELHARDT U., BAHADIR M., BÖHM H. (1995) Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der HPLC, S. 29-30, *VCH, Weinheim*.
- GANG C., ZORA D. (2001) Carotenoids are degraded by free radicals but do not affect lipid peroxidation in unilamellar liposomes under different oxygen tensions, *FEBS Letters*, 505, 151-154.

- GARCIA COSTAS M.A., GRAHAM J.E., BRYANT D.A. (2007) in "Energy from the Sun," Proceedings of the XIVth International Congress on Photosynthesis, Glasgow, Scotland, July 22-27, 2007. J. ALLEN, E. GANTT, J. H. GOLBECK, AND B. OSMOND, (eds.), in press. *Springer*, Dordrecht, The Netherlands 1, Ketocarotenoids in chlorosomes of the *acidobacterium Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*.
- GARCÍA-MALEA M. C., ACIÉN F. G., DEL RÍO E., FERNÁNDEZ J. M., CERÓN M. C., GUERRERO M. G., MOLINA-GRIMA E. (2009) Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*. Taking the one-step system outdoors, *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 651-657.
- GAVINI F., MERGAERT J., BEJI A., MIELCAREK C., IZARD D., KERSTERS K., DE LEY J. (1989) Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea gen. nov. as Pantoea agglomerans comb. nov.* and description of *Pantoea dispersa sp. nov.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 337-345.
- GEIS P. A., SZANISZLO P. (1984) Carotinoid pigments of the dermatiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*, *Mycologia*, 76, 268-273.
- GENTLES A, HAARD N.F. (1991) Pigmentation of rainbow trout with enzyme-treated and spray-dried *Phaffia rhodozyma*, *The progressive fish culturist*, 53, 1-6.
- GESSLER N.N., SOKOLOV A.V., BYKHOVSKY V.Y., BELOZERSKAYA T.A. (2002) Superoxide dismutase and catalase activities in carotenoid-synthesizing fungi *Blakeslea trispora* and *Neurospora crassa* fungi in oxidative stress, *Appl. Bioch. and Microbiol.*, 38, 205-209.
- GEYER R., PEACOCK A.D., MILTNER A., RICHNOW H.H., WHITE D.C., SUBLETTE K.L., KASTNER M. (2005) In situ assessment of biodegradation potential using biotraps amended with C-13-labeled benzene or toluene, *Environmental Science & Technology*, 39, 4983-4989.
- GEYER R., PEACOCK A.D., WHITE D.C., LYTLE C., VAN BERKEL G.J. (2004) Atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for simultaneous mass spectrometric analysis of microbial respiratory ubiquinones and menaquinones, *Journal of mass spectrometry*, 39, 922-929.
- GRIEHL C., GREWE C., PFEIFFER A., LOETTEL W. (2007) Investigations on lutein production in green microalgae In: *Proceedings of the 7th European Workshop Biotechnology of Microalgae*, Potsdam Rehbrücke, 39.
- GIUGERE S., PRSCOTT J.F. (1997) Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals, *Vet. Microbiol.*, 56, 313-334.
- GOODWIN T. W. (1980) Plants, in: *The biochemistry of the carotenoids*, Vol. 1, Plants 2<sup>nd</sup> edn. London, Chapman and Hall.
- GOVIND N.S., AMIN A.R., MODI V.V. (1982) Stimulation of carotenogenesis in *Blakeslea trispora* by cupric ions, *Phytochemistry* 21, 1043–1044.
- GOVINDASWAMY V., VASUDEVAN V. (1999) Optimisation of growth parameters for the production of carotenoids by *Rhodotorula gracilis*, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*, 208,121-124.
- GRADELET S., LE BON A.-M., BERGES R., SUSCHETET M., ASTROG P. (1998) Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism, *Carcinogen.*, 19, 403-411.
- GREWE C., GRIEHL C. (2008) Time- and media dependent secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis*, *Biotechnology Journal*, 3, 1232-1244.
- GREWE C., MENGE S., GRIEHL C. (2007) Enantioselective separation of all-E-astaxanthin and its determination in microbial sources, *J. Chrom. A*, 1166, 97-100.
- GUERIN M. HUNTLEY M.E., OLAIZOLA M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: application for human health and nutrition, *Trends Biotechnol.*, 21, 210-216.
- GUINEBRETIERE M.-H., BROUSSOLLE V., NGUYEN-THE C. (2002) Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains, *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3053-3056.
- HAARD N. F. (1988) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses, *Biotechnology Letters*, 10, 609-614
- HAASE G., SKOPNIK H., KUSENBACH G., POSSELT H.G. (1991) *Exophiala dermatitidis* infection in cystic fibrosis, *Lancet*, 336, 188-189.
- HAGIWARA T, YASUNO T, FUNAYAMA K, SUZUKI S. (1998) Determination of lycopene, alpha-carotene and beta-carotene in serum by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 24, 67-73.
- HAMMOND R.K., WHITE D.C. (1970a) Inhibition of carotenoid hydroxylation in *Staphylococcus aureus* by mixed function oxidase inhibitors, *J. Bacteriol.*, 607-610.
- HAMMOND R.K., WHITE D.C. (1970b) Inhibition of Vitamin K2 and carotenoid synthesis in *Staphylococcus aureus* by diphenylamine, *J. Bacteriol.*, 611-615.
- HAMMOND R.K., WHITE D.C. (1970c) Carotenoid formation by *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.*, 103, 191-198.

- HANDELMAN GJ, SHEN B, KRINSKY NI. (1992) High resolution analysis of carotenoids in human plasma by high-performance liquid chromatography., *Methods Enzymol.*, 213, 336-346.
- HANDELMAN G.J., VAN KUIJK F.J.G.M., CHATTERJEE A., KRINSKY N.I. (1991) Characterisation of products formed during the autoxidation of  $\beta$ -carotene, *Free Radical Bio. Med.*, 10, 427-437.
- HASHIMOTO H., Y. KOYAMA (1988) Isolation of cis-trans isomers of canthaxanthin by high-performance liquid chromatography using calcium hydroxide column and identification of their configurations by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, *J.Chrom.*, 448, 182-187.
- HARA M., YUAN H., YANG Q., HOSHINO T., YOKOYAMA A., MIYAKE J. (1999) Stabilization of liposomal membranes by thermozeaxanthins: carotenoid-glucoside esters., *Biochim. Biophys. Acta*, 1461, 147-154.
- HARDING R.W., HUANG P.C., MITCHELL H.K. (1969) Photochemical studies of the carotenoid biosynthetic pathway in *Neurospora crassa*, *Archs. Biochem. Biophys.*, 129, 696-707.
- HARI R.P.K., PATEL T., MARTIN A. (1992) A new strain of *Rhodotorula* isolated from yoghurt, *Journal of Industrial Microbiology*, 11, 43-51.
- HARKER M., TSAVALOS A.J., YOUNG A.J. (1996) Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 113-118.
- HARKEY G., BHOSALE P. (2005) Analysis of Zeaxanthin by Single Quadrupol LC-MS, Medical/Biological, The Applicationsbook, Thermo Electron Corporation, p32.
- HART D.J., SCOTT K.J. (1995) Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK, *Food Chemistry*, 54, 101-111.
- HEECHEN W. (2007) mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, *Food und Hygiene*, Behrs Verlag, Hamburg.
- HERRERO-MARTINEZ J. M., MENDEZ A., BOSCH E., ROSES M. (2004) Characterization of the acidity of residual silanol groups in microparticulate and monolithic reversed-phase columns, *J. Chrom. A*, 1060, 135-145.
- HERTZBERG S., LIAAEN-JENSEN S. (1977) Bacterial carotenoids. LIII. C50-Carotenoids. 19. Absolute configuration of sarcinaxanthin and sarcinaxanthin mono-beta-d-glycoside. Isolation of sarcinaxanthin diglycoside, *Acta Chem Scand B*, 31, 215-223.
- HAGIWARA T., YASUNO T., FUNAYAMA K., SUZUKI S. (1998) Determination of lycopene,  $\beta$ -carotene and  $\gamma$ -carotene in serum by liquid chromatography - atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring, *J. Chromatogr. B*, 708, 67-73.
- HAYMAN T.G., MANNARELLI B.N., LEATHERS T.D. (1995) Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products, *J. Ind. Microbiol.*, 115, 173-183.
- HIRAISHI A. (1999) Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment, *J. Biosci. Bioeng.*, 83, 449-453.
- HIRAISHI A., IWASAKI M., KAWAGISHI T., YOSHIDA N., NARIHIRO T., KATO K. (2003) Significance of lipoquinones as quantitative biomarkers of bacterial populations in the environment, *Microbes Environ.*, 18, 89-96.
- HORNERO-MENDEZ, D. and G. BRITTON (2002) Involvement of NADPH in the cyclization reaction of carotenoid biosynthesis, *FEBS Lett.* 515:133-136.
- HU Z.-C., ZHENG Y.-G., WANG Z., SHENG Y.-Z. (2006) pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 586-590.
- HUANG M., XU Y.-J., LV Q.-L., REN Q.-L. (2008) Separation and Purification of  $\beta$ -Carotene from Chlorophyll Factory Residues, *Chemical Engineering & Technology*, 31, 922-927.
- HUMPHRIES J. M., KHACHIK F. (2003) Distribution of lutein, zeaxanthin and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat and pasta product, *J. Agric. Food Chem.* 51, 1322-1327.
- HUSSAIN G., SANKAWA U., GOTO H., WATANABE H. (2006) Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition, *J. Nat. Prod.*, 69, 443-449.
- ICHIYAMA S., SHIMOKATA K., TSUKAMURA M. (1989) Carotenoid pigments of genus *Rhodococcus*, *Microbiol. Immunol*, 33, 503-508.
- INBARAJ B.S., LU H., HING C.F., WU C.F., LIN C.L., CHEN B.H. (2008) Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 812-818.
- INBARAJ, B. S., CHIEN, J. T., & CHEN, B. H. (2006) Improved HPLC method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *J.Chromatogr.A* 1102:193-199.
- JAYARAJ J., DEVLIN R., PUNJA Z. (2007) Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants, *Transg. Res.*, 17, 489-501.
- JEONG J.-C., LEE I.-Y., KIM S.-W., PARK Y.-H. (1999) Stimulation of  $\beta$ -carotene synthesis by hydrogen peroxide in *Blakeslea trispora*, *Biotechnol. Lett.*, 21, 683-686.

- JIRASRIPONGPUN K., PEWLONG W., NATSATHMONTHRA W., SUTHIYAPORN S. (2007) Carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant grown on molasses, *Kasetsart Journal – Natural Science*, 41, 667-674.
- JOHNSON E.A. (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey, *Int. Microbiol.*, 6, 169-174.
- JOHNSON E.A. (1991) Carotinoids from microbial sources, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11, 297-326.
- JOHNSON E.A., VILLA T.G., LEWIS M.J. (1980a) *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets, *Aquaculture*, 20, 123-134.
- JOHNSON E.A., LEWIS M.J., GRAU M.J., GRAU C.R. (1980b) Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*, *Poult. Sci.*, 59, 1777-1782.
- JOHNSON E.A., LEWIS M.J. (1979) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*, *J. Gen. Microbiol.*, 115, 173-183.
- JOHNSON E.A., VILLA T.G., LEWIS M.J., PHAFF H.J. (1978) Simple method for the isolation of astaxanthin from the Basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 1155-1159.
- JOHNSON E.A., CONKLIN D.E., LEWIS M.J. (1977) The yeast *phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans, *J. Fish. Res. Board Can.*, 34, 2417-2421.
- KAISER P., SURMANN P., VALLENTIN G., FUHRMANN H. (2008) A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts, *Journal of Microbiological Methods*, 70, 142-149.
- KARRER P., RUTSCHMANN J. (1978) Ein Carotinfarbstoff von neuartigem Charakter aus roter Hefe (*Torula rubra*) *Helvetica Chimica Acta*, 26, 2109-2114
- KELLEY S.C., PURCHELL S.M., GRIFFIN T.D. (2007) Erythropoietic Protoporphyrin (Erythrohepatic Protoporphyrin), *Pediatr. Dermatol.*, 24, E5-E9.
- KHACHIK F., BEECHER G.R., GOLI M.B. (1992) Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma, *Anal. Chem.*, 64, 2111-2122.
- KHACHIK F., BEECHER G.R., LUSBY W.R. (1989) Separation, Identification, and Quantification of the Major Carotenoids in Extracts of Apricots, Peaches, Cantaloupe, and Pink Grapefruit by Liquid Chromatography, *J. of Agric. Food Chem.*, 37, 1465-1473.
- KHACHIK F., BEECHER G.R., VANDERSLICE J.T., FURROW G. (1988) Liquid chromatographic artifacts and peak distortion: sample solvent interactions in the separation of carotenoids, *Anal. Chem.*, 60, 807-811
- KIM J.-H., CHANG H.-I. (2006) High-level production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1, using chemical and light induction, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 381-385.
- KIMATA K., TANAKA N., ARAKI T. (1992) Suppression of the effect of metal impurities in alkylsilicated silica packing materials, *J. Chrom.*, 594, 87-96.
- KISHIMOTO N., KOSAKO Y., TANO T. (1991) *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: and acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment., *Curr. Microbiol.*, 22,1-7.
- KLÄUI H., BAUERNEFELD J. C. (1981) Production of Carotenoids, in: Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors, ed. BAUERNEFELD D.J. C., Chap 1, pp. 7-21, Chap. 2, pp. 48-317, *Academic Press*, New York.
- KLEBER, H.-P.; SCHLEE, D.; SCHÖPP, W. Hrsg. (1997) Biochemisches Praktikum : Methoden für Studium, Praxis, Forschung, 5., überarb. und erw. Aufl., *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart.
- KLEIN-MARCUSCHAMER D., AJIKUMAR P. K., STEPHANOPOULOS G. (2007) Engineering microbial cell factories for biosynthesis of isoprenoid molecules beyond lycopene, *Trends in Biotechnology*, 25, 417-424
- KLEINIG H.,SCHMITT R., MEISTER W., ENGLERT G., THOMMEN H. (1979) New C30-carotenoid acid glucosyl esters from *Pseudomonas rhodos*, *Z. Naturforsch.* 34c, 181-185.
- KLEVENS R.M., MORRISON M.A., NADLE J., PETIT S., GERSHMAN K., RAY S., HARRISON L.H., LYNFIELD R., DUMYATI G., TOWNES J.M., CRAIG A.S., ZELL E.R., FOSHEIM G.E., MCDUGAL L.K., CAREY R.B., FRIDKIN S.K. (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States, *The Journal of American Medical Association*, 298,1763-71.
- KOHL W., ACHENBACH H., REICHENBACH H. (1983) The pigments of *Brevibacterium linens*: aromatic carotenoids, *Phytochem.*, 22, 207-210.
- KOLLÖFFEL B., MEILE L., TEUBER M (1999) Analysis of *Brevibacteria* on the surface of Gruyere cheese detected by in situ hybridisation and by colony hybridization, *Lett. Appl. Microbiol.*, 29, 317-322
- KOMEMUSHI S., SAKAKI H., YOKOYAMA H., FUJITA T. (1994) Effects of barium and other metals on the growth of A D-lactic acid assimilating yeast, *Rhodotorula glutinis* No. 21, *J. Antibact. Antifung. Agents*, 22, 583-587.
- KONINGS E.J.M. ROOMANS H.H.S. (1997) Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruit, *Food Chemistry*, 59, 599-603.

- KÖPSEL C., MÖLTGEN H., SCHUCH H., AUWETER H., KLEINERMANN K., MARTIN H.-D., BETTERMANN H. (2005) Structure investigations on assembled astaxanthin molecules, *Journal of Molecular Structure*, 750, 109-115.
- KORONELLI T.V., PAHLAVUNI I.K., VOROBYEVA I.A., BALASHOV S.P. (1987) The lipopeptidocarotenoid complex and cells of *Rhodococcus maris* studied by spectroscopy, *Mikrobiol.*, 56, 890-891.
- KORONELLI T.V., PAHLAVUNI I.K., ROZNOV B.V. (1982) A pigmented amphiphilic biopolymer from marine mycobacteria, *Mikrobiol.*, 51, 873-875.
- KREISEL H. (2005) Liste der ethnomykologisch und biotechnologisch relevanten Pilze, *Feddes Repertorium*, 116, 339–391.
- KROMIDAS S. Hrsg. (2006) HPLC richtig optimiert, Wiley-VCH, Weinheim.
- KROMIDAS S. Hrsg. (2002) Eigenschaften von kommerziellen HPLC-RP-Säulen im Vergleich Pirrot Verlag, Saarbrücken.
- KROMIDAS S. Hrsg. (2000) Handbuch Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, Weinheim.
- KRINSKY N.I., JOHNSON E.J. (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease, *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- KRINSKY N.I. (1993) Actions of carotenoids in biological systems, *Annu. Rev. Nutr.*, 13, 561-587.
- KRZEMINSKY L.F., QUACKENBUSH F.W. (1960) Incorporation of C14-labeled compounds into carotenes by *Neurospora crassa*, *Arch Biochem Biophys.*, 88, 287-293.
- KUNISAWA R., STANIER R. Y. (1958) Studies on the role of carotenoid pigments in a chemoheterotrophic bacterium, *corynebacterium poinsettiae*, *Arch. Microbiol.*, 31, 146-156.
- KUSENBACH G., SKOPNIK H., HAASE G., FRIEDRICH S., DOHMEN H. (1992) *Exophiala dermatitidis* pneumonia in cystic fibrosis, *Eur. J. Pediatr.*, 151, 344-346.
- KURTZMAN, C.P. & FELL J.W. eds. (1999) The Yeasts, a Taxonomic Study. 4th ed., *Elsevier*, Amsterdam.
- KURZ C., CARLE R., SCHIEBER A. (2008) HPLC-DAD-MSn characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity, *Food Chem.*, 110, 522-530.
- LACKER T., STROHSCHNEIN S., ALBERT K. (1999) Separation and identification of various carotenoids by C<sub>30</sub> reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection; *J. Chromatogr. A*, 854; 37-44.
- LAMOTTE S. (2005) Mai, pers. Mitteilung Applikations-Manager Bisschoff Chromatography und Analysetechnik, Leonberg.
- LAMPILA, L. E.; WALLIN, S. E.; BULLERMAN, L. B.; LOWRY, S. R. (1985) The effect of strain and type of whey on the production of β-carotene and other parameters, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 18, 366-375.
- LAZRAC T., WOLFF G., ALBRECHT A.-M., NAKATANI Y., OURISSON G., KATES M. (1988) Bacterioruberins reinforce reconstituted *Halobacterium* lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 939, 160-162.
- LEA A.G.H. (1988) Chapter III Carotenoids, in: HPLC in Food Analysis, Second Edition, pp. 298-314, MACRAE R. ed., Series Editor: SCHWEIGERT B.S., *Academic Press*, London.
- LEE P.-C., SALOMON C., MIJTS B., SCHMIDT-DANNERT C. (2008) Biosynthesis of ubiquinone compounds with conjugated prenyl side chains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 6908-6917.
- LEE P. C., MIJTS B. N., SCHMIDT-DANNERT C. (2004a) Investigation of factors influencing production of the monocyclic carotenoid torulene in metabolically engineered *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 538-546.
- LEE J.H., KIM Y.S., CHOI T.-J., LEE W.J., KIM Y.T. (2004b) *Paracoccus haerens* sp., a gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1699-1702.
- LEE S.J., BAI S.K., LEE K.S., NAMKOONG S., NA H.J., HA K.S., HAN J.A., YIM S.V., CHANG K., KWON Y.G., LEE S.K., KIM Y.M. (2003) Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing IκB kinase-dependent NF-κB activation, *Molecules and Cells*, 16, 97-105.
- LEHMANN W.D. Hrsg. (1996) in: Massenspektrometrie in der Biochemie, *Spektrum Akademischer Verlag Berlin*; 1. Aufl..
- LEHNER A., GRIMM M., RATTEI T., RUEPP A., FRISHMANN D., MANZARDO G.G.G., STEPHAN R. (2006) Cloning and characterization of *Enterobacter sakazakii* pigment genes and in situ spectroscopic analysis of the pigment, *FEMS Microbiol. Lett.*, 265, 244-248.
- LESELLIER E., WEST C., TCHAPLA A. (2006) Classification of special octadecyl-bonded phases by the carotenoid test, *J. Chromatogr. A*, 62, 62-70.
- LESELLIER E., TCHAPLA A. (2005) A simple subcritical chromatographic test for an extended ODS high performance liquid chromatography column classification, *J. Chrom. A*, 1100, 45-59.
- LESELLIER E., MARTY C., BERSET C., TCHAPLA A. (1989) Optimization of the isocratic non-aqueous reverse phase (NARP) HPLC separation of trans/cis α- and β-carotenes, *J. High Resolut. Chrom., Chromatogr. Commun.*, 12, 447-454.
- LESSIN W.J., CATIGANI G.L., SCHWARTZ S.J. (1997) Quantification of cis-trans Isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3728-3732.

- LI L., QUIN J., YIN S.-A., TANG G. (2007) Effects of mobile phase ratios on the separation of plant carotenoids by HPLC with a C30 column, *Chromatographia*, 65, 91-94.
- LI H., TYNDALE S. T., HEATH D. D., LETCHER R. J. (2005) Determination of carotenoids and all-trans-retinol in fish eggs by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 816, 49-56.
- LIAAEN-JENSEN S., ANDREWS A. G. (1972) Microbial Carotenoids, *Annual Reviews*, 1595, 226-247.
- LIETZ G., HENRY C. J. K. (1997) A modified method to minimise losses of carotenoids and tocopherols during HPLC analysis of red palm oil, *Food Chemistry*, 60:109-117.
- LIEW K.Y., TAN S.H., MORSINGH F., KHOO L.E. (1982) Adsorption of  $\beta$ -carotene: II. On cation exchanged bleaching clays, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59, 480-484.
- LIU Y.-S., WU J.-Y. (2009) Modeling of *Xanthophyllomyces dendrorhous* growth on glucose and overflow metabolism in batch and fed-batch cultures for astaxanthin production, *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 996-1004.
- LIU C.I., LIU G.Y., SONG Y., YIN F., HENSLER M.E., JENG W.Y., NIZET V., WANG A.H., OLDFIELD E. (2008) A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence, *Science*, 319, 1391-4.
- LIU Y.S., WU J.Y. (2007) Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design, *Biochemical Engineering Journal*, 36, 182-189.
- LIU Y.S., WU J.Y. (2006) Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 73, 663-671.
- LIU G.Y., ESSEX A., BUCHANAN J.T., DATTA V., HOFFMAN H.M., BASTIAN J.F., FIERER J., NIZET V. (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity, *Journal of Experimental Medicine*, 202, 209-15.
- LODATO P., ALCAINO J., BARAHONA J., NIKLITSCHKE S., CARMONA M., WOZNAK M., BAEZA A., JIMENEZ M., CIFUENTES V. (2007) Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Biol. Res.*, 40, 73-84.
- LOTTSPPEICH F., ZORBAS H. (1998) Bioanalytik – eine eigenständige Wissenschaft, in: Bioanalytik, Vol.1 LOTTSPPEICH F., ZORBAS H., eds, pp. 14-15, *Spektrum Akademischer Verlag*, Berlin.
- LOWRIE P., WELLS S. (2000) Microbiology and Biotechnology, published by the press syndicate of the university of cambridge, Cambridge University Press.
- LUCAS A., COULON J.B., AGABRIEL C., CHILLIARD Y., ROCK E. (2008) Relationships between the conditions of goat's milk production and the contents of some components of nutritional interest in Romadour cheese, *Small Ruminant Research*, 74, 91-106.
- LYTLE C.A., GAN Y-DM., SALONE K., WHITE D.C. (2001) Sensitive characterisation of ubiquinones from biofilmes by electrospray/mass spectrometry, *Environm. Microbiol.*, 28, 113-118.
- MACÍAS-SÁNCHEZ M.D., MANTELL C., RODRÍGUEZ M., MARTÍNEZ DE LA OSSA E., LUBIÁN L.M., MONTERO O. (2008) Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*, *Talanta* 15, 948-952.
- MAIANI G., PERIAGO CASTÓN M.J., CATASTA G., TOTI E., CAMBRODÓN I.G., BYSTED A., GRANADO-LORENCO F., OLMEDILLA-ALONSO B., KNUTHSEN P., VALOTI M., BÖHM V., MAYER-MIEBACH E., BEHNSILIAN D., SCHLEMMER U. (2008) Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans, *Mol. Nutr. Food. Res.*, 53, [Epub ahead of print].
- MALDONADE I.R., RODRIGUEZ-AMAYA B.B., SCAMPARINI A.R.P. (2008) Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem, *Food Chem.*, 107, 145-150.
- MALISORN C., SUNTORNSUK W. (2008) Optimization of  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine, *Bioresc. Technol.*, 99, 2281-2287.
- MANGELS A.R., HOLDEN J.M., BEECHER G.R., FORMAN M.R., LANZA E. (1993) Carotenoid contents of fruits and vegetables: an evaluation of analytical data, *J. Am. Diet Assoc.*, 93, 284-296.
- MANTZOURIDOU F., TSMIDOU M. Z. (2008) Lycopene formation in *Blakeslea trispora*, Chemical aspects of a bioprocess, *Trends in Food Science & Technology*, 19, 363-371.
- MARESCA J.A., BRYANT D.A. (2006) Two genes encoding neww Carotenoid-modifying enzymes in the green sulphur bacterium *Chlorobium tepidum*, *J. Bacteriol.*, 188, 6217-6223.
- MARRIOTT D.J.E., WONG K.H., AZNAR E., HARKNESS J.L., COOPER D.A., MUIR D. (1997) *Scytalidium dimidiatum* and *Lecytophora hoffmannii*: Unusual causes of fungal infections in a patient with AIDS, *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2949-2952.
- MARSHALL J.H., WILMOTH G.J. (1981) Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids, *J. Bacteriol.*, 147, 900-913.

- MARTIN H.-D., KOCK S., SCHERRES R., LUTTER K., WAGNER T., HUNSDÖRFER C., FRIXEL S., SCHAPER K., ERNST H., SCHRADER W., GÖRNER H., STAHL W. (2008) 3,3'-Dihydroxyisoreniraten. ein natürliches Carotinoid mit überlegenen antioxidativen und photoprotektiven Eigenschaften, *Angewandte Chemie*, 120, 1-6.
- MARTIN A.M., LU C., PATEL T.R. (1993) Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts, *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 321-326.
- MATELLI H.L., DA SALIVA I.M., SOUZA N.O., POMEROY E.D. (1990) Production of  $\beta$ -carotene by *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice, *Biotechnology Letters*, 12, 207-208.
- MATHEWS M. M., SISTROM W.R. (1960) The function of carotenoid pigments of *sarcinea lutea*, *Archiv für Mikrobiologie*, 35, 139-146.
- MATHIS P., SCHENCK C. C. (1982) The function of carotenoids in photosynthesis, in: Carotenoid Chemistry and Biochemistry ed. BRITTON G. and GOODWIN T. W., pp. 339-351, *Oxford Pergamon Press*, Boston.
- MATSUMOTO T., MATSUDA T., MCGINNIS M.R., AJELLO L. (1993) Clinical and mycological spectra of *Wangiella dermatitidis* infections, *Mycoses*, 36,145-55.
- MAURY J., ASADOLLAHI M.A., MOLLER K., CLARK A., NIELSEN J. (2005) Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 100, 119-124.
- MERRITT K. JACOBS N.J. (1978) Characterization and incidence of pigment production by human clinical group B *Streptococci*, *Journal of Clinical Microbiology*, 8, 105-107.
- MESAROS N., NORDMANN P., PLESIAT P., ROUSSEL-DELVALLEZ M., VAN ELDERE J., GLUPCZYNSKY Y., VAN LAETHEM Y., JACOBS F., LEBECQUE P., MALFROOT A., TULKENS P.M., VAN BAMBEKE F. (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium, *Clin. Microbiol. Infect.*, 13, 560-578.
- MEYER P.S., DUPREEZ J.C. (1994a) Photo-regulated astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants, *Syst. Appl. Microbiol.*, 17, 24-31.
- MEYER P.S., DUPREEZ J.C. (1994b) Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 178-183.
- MICHELINE M. M., SISTROM W. R. (1960) The function of the carotenoid pigments of *Sarcina lutea*, *Arch. Microb.*, 35, 139-146.
- MICHELINE M. M., MATHEWS W., SISTROM W. R. (1959) Function of carotenoid pigments in non-photosynthetic bacteria, *Nature*, 12, 1892-1893.
- MIDDELBERG A.P.J. (1995) Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, 13, 491-551.
- MIKI, W., OTAKI, N., YOKOYAMA, A., IZUMIDA, H., SHIMIDZU, N. (1994) Okadaxanthin, a Novel C50-Carotenoid from a Bacterium, *Pseudomonas sp.* KK10206C Associated with a Marine Sponge, *Halichondria okadai*, *Experientia*, 50, 684-686.
- MIKI W. (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids, *Pure Appl. Chem.*, 63, 141-146.
- MILLER M.W., YONEYAMA M., SONEDA M. (1976) *Phaffia*, a new yeast genus in the *Deuteromycotina (Blastomycetes)*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 286-291.
- MITCHELL C., IYER S., SKOMURSKI F., VARY J.C. (1986) Red pigment in *Bacillus megaterium* spores, *Appl. Env. Microbiol.*, 52, 64-67.
- MIURA Y., KONDO K., SAITO T, SHIMADA H., FRASER P.D., MISAWA N. (1998) Production of the carotenoids lycopene, beta-carotene and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*, *Appl. Environm. Microbiol.*, 64, 1226-1229.
- MOCANU E., TALOS D., PANAITESCU A., CONTREA A., TRIF A., CAPRITA R., BOGDAN G., GRAVILA C., MANU C., DRIHA R., COMAN M., MARINOVICI A.V. (1997) Studies on the metabolic role of *Rhodotorula rubra* 120r carotenoid pigments, used as a fodder additive concentrate, in laying hens nutrition, *Roum. Biotechnol. Lett.*, 2, 55-60.
- MOLLER A.P., BIARD C., BLOUNT J.D., HOUSTON D.C., NINNI P. (2000) Carotenoid-dependent signals: Indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability, *Avian and Poultry Biology Reviews*, 11, 137-159.
- MOROS E.E, DARNOKO D., CHERYAN M., PERKINS E.G., JERREL J. (2002) Analysis of xanthophylls in corn by HPLC, *J. Agric. Food. Chem.*, 50, 5787-5790.
- MORRE M.M., BREEDVELD MW., AUTOR A.P. (1989) The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 270, 419-423.
- MOSQUEDA-CANO G., GUTIERREZ-CORONA J.F. (1995) Environmental and developmental regulation of carotogenesis in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*, *Curr. Microbiol.*, 31, 141-145.
- MOUNIER J., GELSOMINO R., GOERGES S., VANCANNEYT M., VANDEMEULEBROECKE K., HOSTE B., SCHERER S., SWINGS J., FITZGERALD G.F., COGAN T.M. (2005) Surface microflora of four smear-ripened cheeses, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 6489-6500.
- MÜLLER H., BUB A., WATZL B., RECHKEMMER G. (1999) Plasma concentrations of carotenoids in healthy volunteers after intervention with carotenoid-rich foods, *European Journal of Nutrition*, 38, 35-44.
- MUNCNEROVA D., AUGUSTÍN J. (1994) The influence of pH on growth kinetics of yeasts in the presence of benzoate as a sole carbon source., *Folia Microbiol.*, 39, 265-568.

- NAKAGAWA K., KIKO T., HATADE K., ASAI A., KIMURA F., SOOKWONG P., TSUDUKI T., ARAI H., MIYAZAWA T. (2008) Development of a high-performance liquid chromatography-based assay for carotenoids in human red blood cells: application to clinical studies, *Anal. Biochem.*, 381, 129-134.
- NAIDU K. A., VENKATESWARAN G., VIJAYALAKSHMI G., MANJULA K., VISWANATHA S., MURTHY N. K., SRINIVAS L., JOSEPH R. (1999) Toxicological assessment of the yeast *Rhodotorula gracilis* in experimental animals, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 208, 444-448.
- NAM H.S., CHO S.Y., RHEE J.S. (1988) High-performance liquid chromatographic analysis of major carotenoids from *Rhodotorula glutinis*, *J. Chrom.*, 448, 445-447.
- NAWROCKI J. (1997) The silanol group and its role in liquid chromatography, *J. Chrom. A*, 779, 29-71.
- Nazarowec-White M., Farber J.M. (1997) *Enterobacter sakazakii*: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 34, 103-113.
- NELIS H.J., DE LEENHEER A., P. (1991) Microbial sources used in foods and feeds, *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 181-191.
- NELIS H.J., LEENHEER A.P. (1989a) Profiling and Quantitation of Bacterial Carotenoids by Liquid Chromatographie and Photodiode Array Detection, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 3065-3071.
- NELIS H.J., LEENHEER A.P. (1989b) Reinvestigation of *Brevibacterium sp.* Strain KY-4313 as a source of cathaxanthin, *Appl. Environm. Microbiol.*, 2505-2510.
- NELIS H.J.C.F., DE LEENHEER A.P. (1988) Reversed-phase liquid chromatography of astacane, *J. Chrom.*, 452, 535-542.
- NI H., CHEN Q., WU G., YANG Y. (2008) Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*, *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 9, 51-59.
- NI H., CHEN Q., RUAN H., YANG Y., LI L., WU G., YANG H., HE G. (2007) Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*, *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 8, 365-370.
- NISHIJIMA M., ARAKI-SAKAI M., SANO H. (1997) Identification of isoprenoid quinones by frit-FAB liquid chromatography-mass spectrometry for chemotaxonomy of microorganisms, *J. Microbiol. Methods*, 28, 113-120.
- NOLLET L. M. L. (ed.) HPLC in Food analysis, MARCEL DEKKER Inc. (2004) second edition, pp. 311-313.
- NORGARD S., AASEN A.J., LIAAEN-JENSEN S. (1970) Bacterial Carotenoids, C50-carotenoids 6, Carotenoids from *Corynebacterium pionsettiae* including four new C50-diols, *Acta Chem. Scand.*, 24, 2183-2197.
- OBATA T., FUJIOKA S., HARA S., NAMBA Y. (1977) The synergistic effects among  $\beta$ -(1-3)-glucanase from *Oerskovia sp.* CK on lysis of viable yeast cells, *Agric. Biol. Chem.*, 41, 671-677.
- OHGAMI K., SHIRATORI K., KOTAKE S., NISHIDA T., MIZUKI N., YAZAWA K., OHNO S. (2003) Effects of Astaxanthin on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation In Vitro and In Vivo, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44, 2694-2701.
- OLIVER J., PALOU A. (2000) Chromatographic determination of carotenoids in foods, *J. Chrom. A*, 881, 543-555.
- ONODERA H., MITSUMORI K., YASUHARA K., TAKEGAWA K., TAKAHASHI M. (1997) 13-week subchronic oral toxicity study of phaffia colour in F344 rats, *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, 115, 99-106.
- ONRAEDT A., SOETAERT W., VANDAMME E. (2005) Industrial importance of the genus *Brevibacterium*, *Biotchniol. Lett.*, 27, 527-533.
- OKAGBUE R.N., LEWIS M.W. (1984b) Use of alfalfa residual juice as a substrate for propagation of the red yeast yeast *Phaffia rhodozyma*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 33-39.
- OKAGBUE R.N., LEWIS M.W. (1983) Mixed culture of *Bacillus circulans* WL-12 and *Phaffia rhodozyma* on different carbon sources: Yeast-wall lytic enzyme production and extractability of astaxanthin, *Biotechnol. Lett.*, 5, 731-736.
- OLSON J.A. (1989) Provitamin A Function of Carotenoids: The Conversion of  $\beta$ -Carotene into Vitamin A, *J Nutr.*, 119, 105-113.
- OSTERMEYER U., SCHMIDT T. (2004) Differentiation of Wild Salmon, Conventionally and Organically Farmed Salmon, *Deutsche Lebensmittelrundscha*, 100, 437-444.
- OURISSON G., NAKATANI Y. (1994) The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol, *Chem. Biol.*, 1, 11-23.
- PALOZZA P., KRINSKY N.I. (1992)  $\beta$ -Carotene and alpha-Tocopherol are synergistic antioxidants, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 297, 184-187.
- PARAJÓ J.C., SANTOS V., VÁZQUEZ M. (1998) Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose, *Process Biochemistry*, 33, 181-187.
- PAIVA S., RUSSEL R. (1999) Beta carotene and other carotenoids as antioxidants, *J. Am. Coll.*, 18, 426-433.
- PARK P.K., KIM E.Y., CHU K.H. (2007) Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments, *Separation and Purification Technology*, 53, 148-152.
- PETO R., DOLL R., BUCKLEY J.D., SPORN M.B. (1981) Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?, *Nature*, 290, 201-208.
- PFANDER H., R. RIESEN AND U. NIGGLE, (1994) HPLC and SFC of carotenoids - scope and limitations, *Pure Appl. Chem.*, 66, 947-954.



- PELZ A., WIELAND K.-P., PUTZBACH K., HENTSCHEL P., ALBERT K., GÖTZ F. (2005) Structure and Biosynthesis of Staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*, *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 32493-32498.
- PERRIER V., DUBREUCQ, GALZY P. (1995) Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains, *Arch. Microbiol.*, 164, 173-179.
- PETERSON W.J., EVANS W.R., LECCE E., BELL T.A., ETCHELLS J.L. (1957) Quantitative Determination of the Carotenoids in Yeasts of the genus *Rhodotorula*, *J. Bacteriol.*, 75, 586–591.
- PINTEA A., DIEHL H.A., MOMEU C., ABERLE L., SOCACIU C. (2005) Incorporation of carotenoid esters into liposomes, *Biophys Chem.*, 118, 7-14.
- Po-Fung I., Feng C. (2005) Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark, *Process Biochemistry*, 40, 733–738
- PRASAIN J.K., MOORE R., HURST J.S., BARNES S., KUIJK F. (2005) Electrospray tandem mass spectrometric analysis of zeaxanthin and its oxidation products, *Journal of mass spectrometry*, 40, 916-923.
- QIN J., YEUM K.-J., JOHNSON E.J., KRINSKY N.I., RUSSEL R.M., TANG G. (2008) Determination of 9-cis  $\beta$ -carotene and  $\zeta$ -carotene in biological samples, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 612-618.
- RAJENDRAN V., PU Y.S., CHEN B.H. (2005) An improved HPLC method for determination of carotenoids in human serum, *J. Chrom. B*, 824, 99-106.
- RAO A.V., RAO L.G. (2007) Carotenoids in human health, *Pharmacol. Res.*, 55, 207-216.
- RAO R.N., ALVI S.N., RAO B.N. (2005) Preparative isolation and characterization of some minor impurities of astaxanthin by high-performance liquid chromatography, *J. Chrom. A*, 1076, 189-192.
- RATTRAY F. P., FOX P.F. (1999) Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review, *J. Dairy Sci.*, 82, 891-909
- RAZANI S.H., MOUSAVI S.M., YEGANEH H.M., MARC I. (2007) Fatty acid and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* when using technical glycerol and ammonium sulfate, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 1591-1598.
- RENTEL C., STROHSCHNEIN S., ALBERT K., BAYER E. (1998) Silver-plated vitamins: a method of detecting tocopherols and carotenoids in LC/ESI-MS coupling, *Anal. Chem.*, 70, 4394-4440.
- REZWAN M., LANEELLE M.-A., SANDER P., DAFTE M. (2007) Breaking down the wall: Fractionation of mycobacteria, *Journal of Microbiological Methods*, 68, 32-39.
- RICHTER G., KALDENHOFF R. Hrsg. (2006) *Praktische Biochemie, Grundlagen und Techniken*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- RODRIGUEZ-AMAYA DELIA B., KIMURA MIEKO (2004) *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*, HarvestPlus 2, Technical Monograph Series, Washington, DC and Cali, International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT).
- RODRIGUEZ-AMAYA DELIA B. (2001) *A guide to carotenoid analysis in foods*, *International Life Science Institute*, Washington DC, Ilsi Press.
- RODRIGUEZ-VILLALON A., PEREZ-GIL J., RODRIGUEZ-CONCEPCION M. (2008) Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulating of exogenous or endogenous pathways, *J. Biotechnol.*, 135, 78-84.
- ROSE A. H. (1979) Production and industrial importance of secondary products of metabolism, in: *Secondary products of metabolism*, ed. ROSE, A. H., pp. 1-33, *Academic press*, London.
- ROTTEM S., MARKOWITZ O. (1979) Carotenoids act as reinforcers of the *Acholeplasma laidlawii* lipid bilayer, *J. Bacteriol.*, 140, 944-948.
- SABOYA L.V., MAILLARD M.-B., LORTAL S. (2003) Efficient mechanical disruption of *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* and *Propionibacterium freudenreichii* by a new high-pressure homogenizer and recovery of intracellular aminotransferase activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 1-5.
- SACHINDRA N.M., BHASKAR N., SIDDEGOWDA G.S., SATHISHA A.D., SURESH P.V. (2007) Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste, *Bioresource Technology*, 98, 1642–1646.
- SAJILATA M.G., SINGHAL R.S., KAMAT M.Y. (2008) The carotenoid pigment zeaxanthin – a review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 29-49.
- SAKAKI H., NOCHIDE H., KOMEMUSHI S., MIKI W. (2002) Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* No. 21, *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 338-340.
- SAKAKI H., NAKANISHI T., TADA A., MIKI W., KOMEMUSHI S. (2001) Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak light irradiation, *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 294-297.
- SANDER L.C., SHARPLES K.E., PURSCH M. (2000)  $C_{30}$  stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography, *J. Chrom. A*, 880, 189-202.
- SANDER L.C., WISE S.A. (1994a) in: R.M. SMITH, Editor, *Retention and Selectivity Studies in HPLC*, *Elsevier*, Amsterdam p.337 Ch. 10.

- SANDER L.C., SHARPLESS K.E., CRAFT N.E., WISE S.A. (1994b) Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers, *Anal. Chem.*, 66, 1667-1674.
- SANDER L. C., GLINKA C. J., WISE S. A. (1990) Determination of bonded phase thickness in liquid chromatography by small angle neutron scattering, *Anal. Chem.*, 62, 1099–1101.
- SANDER L. C., WISE S. A. (1987) Effect of phase length on column selectivity for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 59, 2309-2313.
- SANDMANN G., MISAWA N. (2002a) Fungal Carotenoids, capital 12, pp 247-262, in: The Mycota A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research Vol. X, ESSER K., BENNETT J.W. eds., Springer, Berlin.
- SANDMANN G. (2002b) Combinatorial biosynthesis of carotenoids in a heterologous host: a powerful approach for the biosynthesis of novel structures, *Chem. Biochem.*, 3, 629-635.
- SANDMANN G., WOODS W.S., TUVESON R.W. (1990) Identification of carotenoids in *Erwinia herbicola* and a transformed *Escherichia coli* strain, *FEMS Microbiol. Lett.*, 59, 77-82.
- SANGHA R.P.K., PATEL T., MARTIN A.M. (1995) Growth and pigmentation in *Rhodotorula rubra* and *Phaffia rhodozyma*, *J. Basic Microbiol.*, 35, 53-56.
- SANTOS L. C., DACHTLER M., ANDRADE F.D.P., ALBERT K., VILEGAS W. (2000) Application of HPLC-NMR coupling using C30 phase in the separation and identification of flavonoids of taxonomic relevance, *Fresenius J Anal Chem.*, 368, 540–542.
- SANTOS J.A., BELO I., MOTA M., CABRAL J.M. (1996) Freeze/thawing and sonication of *Escherichia coli* TB1 cells for cytochrome b5 recovery, *Bioseparation 2*, 81-89.
- SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C., FILTENBORG O, (2000) Introduction to food-and airborne fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, *Ponsen & Looyen*, Wageningen, The Netherlands.
- SCHARF S.S., SIMPSON K.L. (1968) Attempts to detect lycopersene formation in yeast, *Biochem. J.*, 106, 311-315.
- SCHIERLE J. PIETSCH B., CERESA A., FIZET C., WAYSEK E.H. (2004) Method for the determination of beta-carotene in supplements and raw materials by reversed-phase liquid chromatography: single laboratory validation, *J. AOAC Int.*, 87, 1070-1082.
- SCHMIDT-DANNERT C., UMENO D., ARNOLD F.H. (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways, *Nature Biotechnology*, 18, 750-753.
- SCHMITZ H. H., EMENHISER C., SCHWARTZ S. J. (1995) HPLC separation of geometric carotene isomers using a calcium hydroxide stationary phase, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1212-1218.
- SCHMITZ H. H., SCHWARTZ S.J., CATIGNANI G.L. (1994) Resolution and Quantitation of the Predominant Geometric  $\beta$ -Carotene Isomers Present in Human Serum Using Normal-Phase, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2746-2750.
- SCHNEIDER G., HILLER K. (1999) *Arzneidrogen*, 4. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*, Berlin.
- SCHNITZLER N., PELTROCHE-LLACSAHUANGA H., BESTIER N. ZÜNDORF J., LÜTTICKEN R., HAASE G. (1999) Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala Wangiella dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst and killing by human neutrophils, *Infection and Immunity*, 67, 94-101.
- SCHUMANN P., WEISS N., STACKEBRANDT E. (2001) Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackebrand and Keie 1986) as *Cellulosimicrobium cellulans* gen.nov., comb.nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1007-1010.
- SCHÜTTE H., KULA M.-R. (1988) Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill, *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 552-558.
- SCHWARTZEL E.H., COONEY J.J. (1974a) Isolation and characterization of pigmentation mutants of *Micrococcus roseus*, *Can. J. Microbiol.*, 20, 1007-1013.
- SCHWARTZEL E.H., COONEY J.J. (1974b) Action of light on *Micrococcus roseus*. *Can J Microbiol.*, 20, 1015-21.
- SCHWARTZEL E.H., COONEY J.J. (1970) Isolation and identification of echinenon from *Micrococcus roseus*, *J. Bacteriol.*, 104, 272-274.
- SCHWEDES J., BUNGE F. (1990) Mechanische Zellaufschlussverfahren, *Jahrbuch Biotechnologie*, *Carl Hanser Verlag*, 3, 195-218.
- SCOTT J.H., SCHEKMAN R. (1980) Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis, *J. Bacteriol.*, 142, 414-423.
- SCOTT K.J. (1992) Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC, *Food Chem.*, 45, 357-364.
- SCOTT R. P.W. (1991) *Liquid Chromatography Column Theory*, *John Wiley & Sons*, New York.
- SEDKOVA N., TAO L., ROUVIERE P. E., CHENG Q. (2005) Diversity of carotenoid synthesis gene clusters from environmental *Enterobacteriaceae* strains, *Appl. Environm. Microbiol.*, 71, 8141-8146.
- SEDMAN J.J., WEERASIGHE D.K., JOLLY S.O. (1990) Extraction and quantitation of Astaxanthin from *Phaffia Rhodozyma*. *Biotechnology Techniques*, 4, 107-112.
- SEILER H., (1986) Identification of cheese-smear coryneform bacteria., *J. Dairy Res.*, 53, 439-449

- SELBITZ H.-J. Hrsg. (1992) Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie, pp. 233-234, *Gustav Fischer Verlag*, Jena.
- SHAH, H. N. AND COLLINS, M. D. (1980) Fatty acid and isoprenoid quinone composition in the classification of *Bacteroides melaninogenicus* and related taxa, *J. Appl. Bacteriol.*, 48, 75-87.
- SHARPLESS K.E., THOMAS J.B., SANDER L.C., WISE S.A. (1996) Liquid chromatographic determination of carotenoids in human serum using an engineered C30 and a C18 stationary phase, *J. Chrom. B.*, 678, 187-195.
- SHEN S.-H., CHRETIEN P., BASTIEN L., SLILATY S.N. (1991) Primary Sequence of the Glucanase Gene from *Oerskovia xanthineolytica*, *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 1058-1063.
- SHIH C.T., HANG Y.D. (1996) Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from sauerkraut brine, *Lebensmittelwissenschaft und Technologie*, 29, 570-572.
- SILVA C., CABRAL J. M. S., VAN KEULEN F. (2004) Isolation of  $\beta$ -carotene over-producing soil bacterium, *Spingomonas sp.*, *Biotechnol. Lett.*, 26, 257-262
- SIMPSON K.L, NAKAYAMA T.O.M., CHICHESTER C.O. (1964a) The Biosynthetic Origin of the Carboxyl Oxygen Atoms of the Carotenoid Pigment Torularhodin, *Biochem. J.*, 92, 508-511.
- SIMPSON K.L, NAKAYAMA T.O.M., CHICHESTER C.O. (1964b) Biosynthesis of yeast carotenoids, *Journal of Bacteriology*, 88, 1688-1694.
- SIMPSON K.L., WILSON A.W., BURTON E., NAKAYAMA T.O.M., CHICHESTER C.O. (1963) Modified French Press for the disruption of microorganisms, *J. Bacteriol.*, 86, 1126-1127.
- SIMPSON K.L. (1983) Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A, *Proceedings of the Nutrition Society*, 42, 7-17.
- SIMPSON, K.L., CHICHESTER, C.O., PHAFF, H.J. (1977) in: ROSE, A.H., HARRISON, J.S. eds., Carotenoid pigments of yeasts, The Yeasts, Vol. 2., pp. 493–515, *Academic Press*, New York.
- SINGLETON P., SAINSBURY D. eds. (2001) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, pp. 138, 323, 812, 3rd edition, *J. Wiley & Sons*, Ltd, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Toronto.
- SISTROM W.R., GRIFFITHS M. UND STANIER R.Y. (1956) The biology of a photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids., *J. Cell. Comp. Physiol.* 48, 473-515.
- SOBIN B., STAHLY G.L. (1942) The isolation and absorption maxima of bacterial carotenoid pigments, *J. Bacteriol.*, 44, 265-276.
- SOMASHEKAR D, JOSEPH R. (2000) Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 491-493.
- SNYDER L.R. ED., KIRKLAND J.R., GLAJCH A. (1997) Practical HPLC Method Development, *Wiley and Sons*, 2<sup>nd</sup>. eds., New York.
- SPOERL E. (1971) Disruption of yeast membranes by methylphenidate, *J. Bacteriol.*, 105, 1188-1174.
- SPRINGATE J. (1999) Astaxanthin for aquaculture CAROPHYLL PINK since 1985, *Blackwell Science Ltd*, Oxford OX2 OEL, UK.
- STAHL W, SIES H. (2002) Carotenoids and protection against solar UV radiation, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 15, 291-296.
- STEINBÜCHEL A., OPPERMANN-SANIO F.B. eds. (2003) Mikrobiologisches Praktikum, Versuche und Theorie, *Springer-Verlag*, Berlin.
- STOREBAKKEN T., SÖRENSEN M., BJERKENG B., HARRIS J., MONAHAN P., HIU S. (2004) Stability of astaxanthin from red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*, during feed processing: effects of enzymatic cell wall disruption and extrusion temperature, *Aquaculture*, 231, 489-500.
- STROHSCHNEIN S., RENTEL C., LACKER T., BAYER E., ALBERT K. (1999) Separation and identification of tocotrienol isomers by HPLC-MS and HPLC-NMR coupling, *Anal. Chem.*, 71, 1780-1785.
- SUBCZYNSKI W.K., MARKOWSKA E., GRUSZECKI W.I., SIELEWIESIUK J. (1992) Effects of polar carotenoid on dimyristoylphosphatidylcholin membranes: aspin-label study, *Biochim. Biophys. Acta*, 1105, 97-108.
- SÜßMUTH R., EBERSPÄCHER J., HAAG R., SPRINGER W. Hrsg. (1999) Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum, *Thieme*, Stuttgart.
- SUZUKI Y., OHGAMI K., SHIRATORI K., JIN X., ILIEVA I., KOYAMA Y., YAZAWA K., YOSHIDA K., KASE S., OHNO S. (2006) Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF- $\kappa$ B signaling pathway, *Experimental Eye Research*, 82, 275-281.
- SZPYLKA J., DEVRIES J.W. (2005) Determination of  $\beta$ -Carotene in Supplements and Raw Materials by Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography: Collaborative Study, *JAOC*, 88, 1279-1291.
- TADA M. (1993) in: Methods in Enzymology, Volume 214, Carotenoids Part B, Metabolism, Genetics and Biosynthesis, edited by PACKER L., *Academic Press INC*, London, S. 269-282.
- TADA M., SHIROISHI M. (1982) Mechanism of photoregulated carotogenesis in *Rhodotorula minuta*, II. Aspects of photoregulative reaction, *Plant Cell Physiol.*, 23, 549-556.
- TAKAI S. (1997) Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review, *Vet. Microbiol.*, 56, 167-176.
- TAKAICHI S. (1999) Carotenoids and carotenogenesis in anoxygenic photosynthetic bacteria, in: The Photochemistry of Carotenoids: Applications in Biology, Frank H.A., Young A. J., Britton G., Cogdell, R.J. eds., *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht.

- TAKAICHI, S., ISHIDSU, J.-I., SEKI, T., FUKADA, S. (1990) Carotenoid pigments from *Rhodococcus rhodochrous* RNMS1: two monocyclic carotenoids, a carotenoid monoglycoside and carotenoid glycoside monoesters. *Agric. Biol. Chem.* 54:1931-1937.
- TANAKA A., KATO K., FUKUI S. (1971) Studies on the formation of vitamins and their function in hydrocarbon fermentation (IX), Production of carotenoids from hydrocarbons by *Brevibacterium*, *J. Ferment. Technol.*, 49, 778-791.
- TAUBERT J., KRINGS U., BERGER R.G. (2000) A comparative study on the disintegration of filamentous fungi, *Journal of Microbiological methods*, 42, 225-232.
- TAUNGBODHITHAM A.K., JONES G.P., WAHLQVIST M.L., BRIGGS D.R. (1998) Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 63, 577-584.
- TAYLOR R.F. (1984a) Bacterial Triterpenoids, *Microbiological Reviews*, 48, 181-198.
- TAYLOR A. J. (1984b) Natural colours in food, in: *Developments in Food Colours*, 2.ed., WALFORD J. ed., Chap. 5, pp. 159-206, *Elsevier Applied Science*, London.
- TAYLOR R.F., DAVIS B.H. (1974) Triterpenoid carotenoids and related lipids, Triterpenoid monohydroxy- and monoglycosyloxy-carotenoids from *Streptococcus faecum* UNH 564P, *Biochem. J.*, 139, 761-769.
- TAYLOR R.F., IKAWA M., CHESBRO W. (1971) Carotenoids in Yellow-Pigmented *Enterococci*, *J. Bacteriol.*, 105, 676-678.
- TCHAPLA A., HERON S., LESELLIER E., COLIN H. (1993) General view of molecular interaction mechanism in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chrom. A.*, 656, 81-112.
- TINOI J., RAKARIYATHAM, N., DEMING, R.L. (2006) Utilization of mustard waste isolates for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 309-314.
- TINOI J., RAKARIYATHAM, N., DEMING, R.L. (2005) Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate, *Process Biochemistry*, 40, 2551-2557.
- TONY J.F., JOH-MING W. (2002) Extractability of astaxanthin in a mixed culture of carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation, *Process Biochemistry*, 37, 1235-1245.
- TSUKIDA K., SAIKI K., TAKII T., KOYAMA Y. (1982) Separation and determination of cis/trans- $\beta$ -carotenes by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 245, 359-364.
- TURUJMAN S.A. (1993) Rapid direct resolution of the stereoisomers of all-trans astaxanthin on a Pirkle covalent L-leucine column, *J. Chrom.*, 631, 197-199.
- TYIHAK E., MOLNAR G. (1964) Stereoisomere Farnesole in der Hefe, *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 4, 161-164.
- UMENO D., ARNOLD F. H. (2003) A C<sub>35</sub> Carotenoid Biosynthetic Pathway, *Appl. Env. Microbiol.*, 69, 3573-3579.
- UNGERS G.E., COONEY J.J. (1968) Isolation and characterization of carotenoid pigments of *Micrococcus roseus*, *J. Bacteriol.*, 96, 234-241.
- VAN BREEMEN R.B., HUANG C.-R., TAN Y., SANDER L.C., SCHILLING A.B. (1996) Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of carotenoids using Atmospheric Pressure Chemical Ionization; *J. Mass Spectrom.*, 31, 975-981.
- VAN BREEMEN R.B. (1995) Electrospray Liquid Chromatography - Mass Spectrometry of carotenoids, *Anal. Chem.*, 67; 2004-2009.
- VANDAMME E.J. (1992) Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 53, 313-327.
- VÁZQUEZ M., SANTOS V., PARAJO J.C. (1997) Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 263-268.
- VÁZQUEZ M., MARTIN A.M. (1998) Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology, *Biotechnol. Bioengin.*, 57, 314-320.
- VEIGA-CRESPO P., BLASCO L., DOS SANTOS F. R., POZA M., VILLA T.G. (2005) Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production, *Internat. Microbiol.*, 8, 55-58.
- VOET D., VOET J. G., PRATT C. W. (2002) *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim.
- VO (EG) 1288/2004, Verordnung der Kommission vom 14. Juli 2004 zur unbefristeten Zulassung bestimmter Zusatzstoffe und zur vorläufigen Zulassung eines neuen Verwendungszwecks eines Zusatzstoffes, der bereits zur Verwendung in der Tierernährung zugelassen ist, *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 243/10.
- VO (EG) 2316/98 Verordnung der Kommission vom 26. Oktober 1998 zur Zulassung neuer Zusatzstoffe und zur Änderung der Zulassungsbedingungen für mehrere bereits zugelassene Zusatzstoffe in der Tierernährung, *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 289 S. 4.
- VO (EU) 2073/2005 Verordnung der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 338/1.
- VOGT K., KIRSCHFELD K. (1984) Chemical Identity of the Chromophores of fly visual pigment, *Naturwissenschaften*, 71, 211-213.

- WALDENSTEDT L., INBORR J., HANSSON I., ELWINGER K. (2003) Effects of astaxanthin-rich algal meal (*Haematococcus pluvalis*) on growth performance, caecal *campylobacter* and clostridial counts and tissue astaxanthin concentration of broiler chickens, *Animal Feed Science Technology*, 108, 119-132.
- WALSH C.T., FISCHBACH M.A. (2008) Inhibitoren der Sterolbiosynthese als Antibiotika gegen *Staphylococcus aureus*, *Angew. Chem.*, 120, 5784-5786.
- WANG S.-L., SUN J.-S., HAN B.-Z., WU X.-Z. (2007a) Optimization of  $\beta$ -Carotene Production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology, *Journal of Food Science*, 72, 325-329.
- WANG W., YU L. (2007b) Study on biologic and chemical elicitors influencing growth and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces*
- WANG C.-W., OH M.-K., LIAO J. C. (1999) Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli* *Biotechnology and Bioengineering*, 62, 235-241.
- dendrorhous*, *Agro Food Industry Hi-Tech*, 18, 51-53.
- WEBER R.W.S., ANKE H., DAVOLI P. (2007) Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (*Basidiomycota, Fungi*), *J. Chrom. A.*, 1145, 118-122.
- WIELAND B., FEIL C., GLORIA-MAERCKER E., THUMM G., LECHNER M., BRAVO J.M., PORALLA K., GÖTZ F. (1994) Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.*, 176, 7719-26.
- WO/2000/008201 Method for obtaining high-molecular biologically active immunomodulating polysaccharides from *saccharomyces cerevisiae* yeast, World Intellectual Property Organization, Patentscope
- YAMANE Y., HIGASHIDA K., NAKASHIMADA Y., KAKIZONO T., NISHIO N. (1997) Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-Batch Cultures: Kinetic and Stoichiometric Analysis, *Appl Environ Microbiol.*, 63, 4471-4478.
- YOKAYAMA A., SANDMANN G., HOSHINO T., ADACHI K., SAKAI M., SHIZURI Y. (1995) Thermozeaxanthins, new carotenoid-glycoside-esters from thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*, *Tetrahedron letters*, 36, 4901-4904.
- YOKOTA, A., AKAGAWA-MATSUSHITA, M., HIRAISHI, A., KATAYAMA, Y., URAKAMI, T. AND YAMASATO, K. (1992) Distribution of quinone systems in microorganisms: gramnegative eubacteria, *Bull. Fed. Cult. Coll.*, 8, 136–171.
- YOON S.-H., KIM J.-E., LEE S.-H., PARK H.-M., CHOI M.-S., KIM J.-Y., LEE S.-H., SHIN Y.-C., KEASLING D., KIM S.-W. (2007) Engineering the lycopene synthetic pathway in *E. coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea ananatis*, *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 74, 131-139.
- YOSHIDA Y., NIKI E., NOGUCHI N. (2003) Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects, *Chemistry and Physics of Lipids*, 123, 63-75.
- ZEEB D., NELSON B., ALBERT K., DALLUGE J. (2000) Separation and identification of 12 catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization - mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 72, 5020-5026.
- ZHENXIN G., CHEN D., HAN Y., CHEN Z., GU F. (2008) Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*, *LWT*, 41, 1082-1088.
- ZIPPER H., PERSON P. (1966) Rapid disruption of intact yeasts by synthetic zeolite, *J. Bacteriol.*, 92, 1252-1253.
- ZZuIV – Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung) vom 29. Januar 1998 (BGBl. I S. 230, 231) zuletzt geändert durch Art. 3 der VO zur Änderung lebensmittelrechtlicher Vorschriften vom 30.09.2008 (BGBl. IS. 1911), Anlage 1: Zusatzstoffe die zum Färben von Lebensmitteln oder zum Erzielen von Farbeffekten bei Lebensmitteln zugelassen sind, Lebensmittelrecht Textsammlung, C.H. Beck, München.

## 9. Anhang

### 9.1 Tabellen

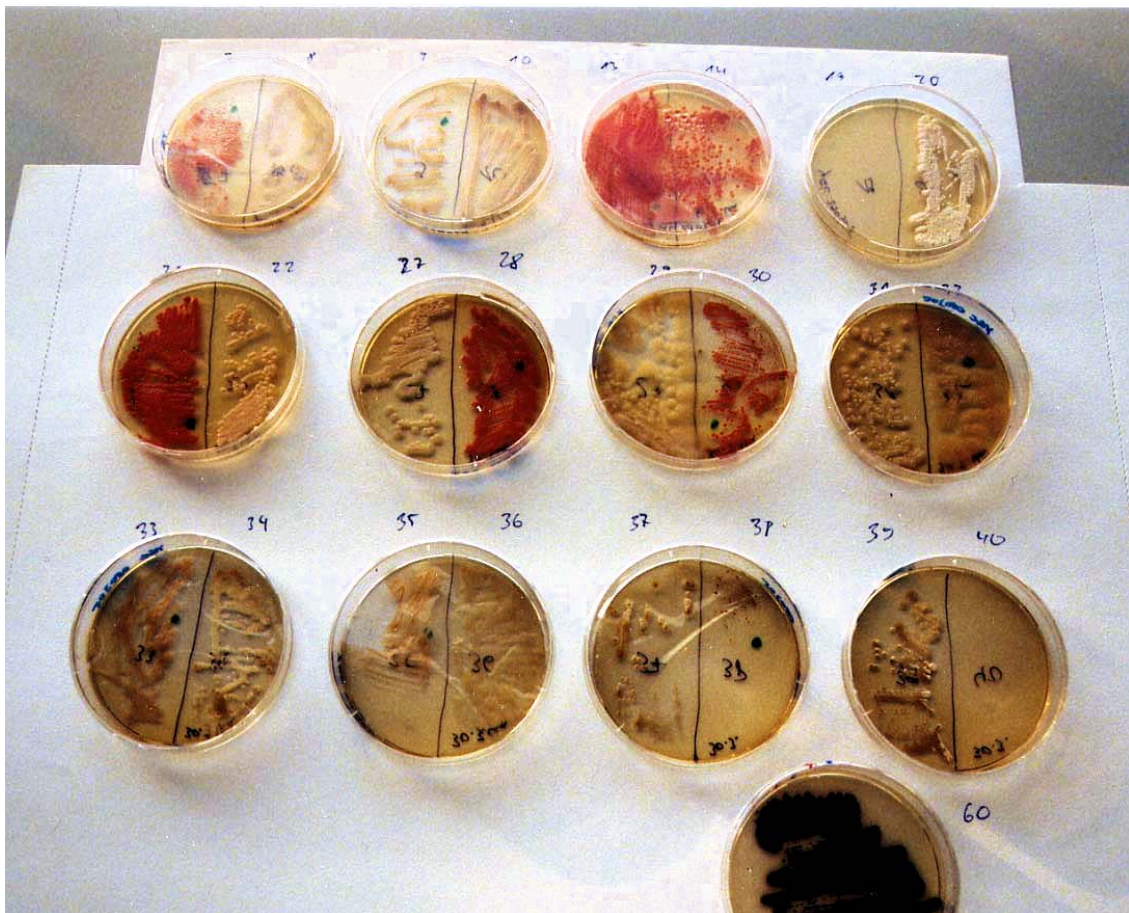
**Tabelle 12:** Übersicht über Fließmittel-Additive, die bei der Analytik von Carotinoiden mittels HPLC an verschiedenen stationären Phasen (außer RP-C<sub>30</sub>-Phasen) verwendet werden, Abkürzungen alphabetisch: AAc Ammoniumacetat, BHT *tert*-Buthyl-hydroxy-toluol, MeCN Acetonitril, MeOH Methanol, TEA Triethanolamin.

HPLC-Phase	Additiv	angeführter Nutzen	Theorie des Mechanismus	Literaturbezug
RP-C <sub>18</sub>	AAc	Reduktion eines <i>Peak-Tailing</i> bei Retinoiden mit Carboxylfunktion	Wirkung als Puffer, Maskierung der freien Silanolgruppen	BARUA 1998
		Reduktion des Carotenoidverlustes während der Säulenpassage, Verbesserung der Wiederfindung, Verbesserung der Auflösung	keine Angaben	CORTEZ 2004
		keine Angaben	keine Angaben	DIAS 2009
		Verbesserung der Wiederfindung für Zeaxanthin u.a. Carotinoide	Interaktion mit freien Silanolgruppen	HANDELMAN 1992
	MeOH	verbesserte Trennung von Lutein und Zeaxanthin und Vermeidung von starken Peakverzerrungen bei MeCN und Dichlormethan als Fließmittel	Verhinderung unspezifischer Adsorptionen des Analyten an die Säule	SCOTT 1992
	N, N-ethyl-di-iso-propyl-amin	keine Angaben	keine Angaben	SCHIERLE 2004
	TEA	keine Angaben	keine Angaben	AZEVEDO-MELEIRO 2004
	Kombination aus TEA u. AAc	keine Angaben	keine Angaben	RAVANELLO 2003
		verbessere Wiederfindung für Carotinoide im Vergleich zur Anwendung von Ammoniumacetat als einziges Additiv	Maskierung von positiv geladenen Metallionen, die Degradationen von Carotinoiden auf der Säule verursachen	EPLER 1993
	Kombination aus TEA, AAC u. BHT	Verbesserung der Wiederfindung und der Auflösung verschiedener Carotinoide	drei Theorien: 1. TEA und AAc als Puffer für Säuren im Fließmittel 2. Maskierung freier Silanolgruppen 3. Maskierung von Metallionen aus dem Säulenmaterial	HART 1995
Ca(OH) <sub>2</sub>	p-Methylanisol und Aceton	Verminderung eines <i>Peak-Tailings</i> bei Astaxanthin, Erhöhung der Auflösung und der Retentionszeit	keine Angaben	SCHMITZ 1994 und 1995
Nitril	N,N-Di-iso-propyl-ethylamin	offenbar zur Trennung von Lutein und Zeaxanthin inclusive ihrer Isomere notwendig	keine Angaben	HUMPHRIES 2003
		keine Angaben	keine Angaben	BHOSALE 2004
Kieselgel	Phosphorsäure-Puffer	keine Angaben	keine Angaben	CORAL-HINOSTROZA 2004

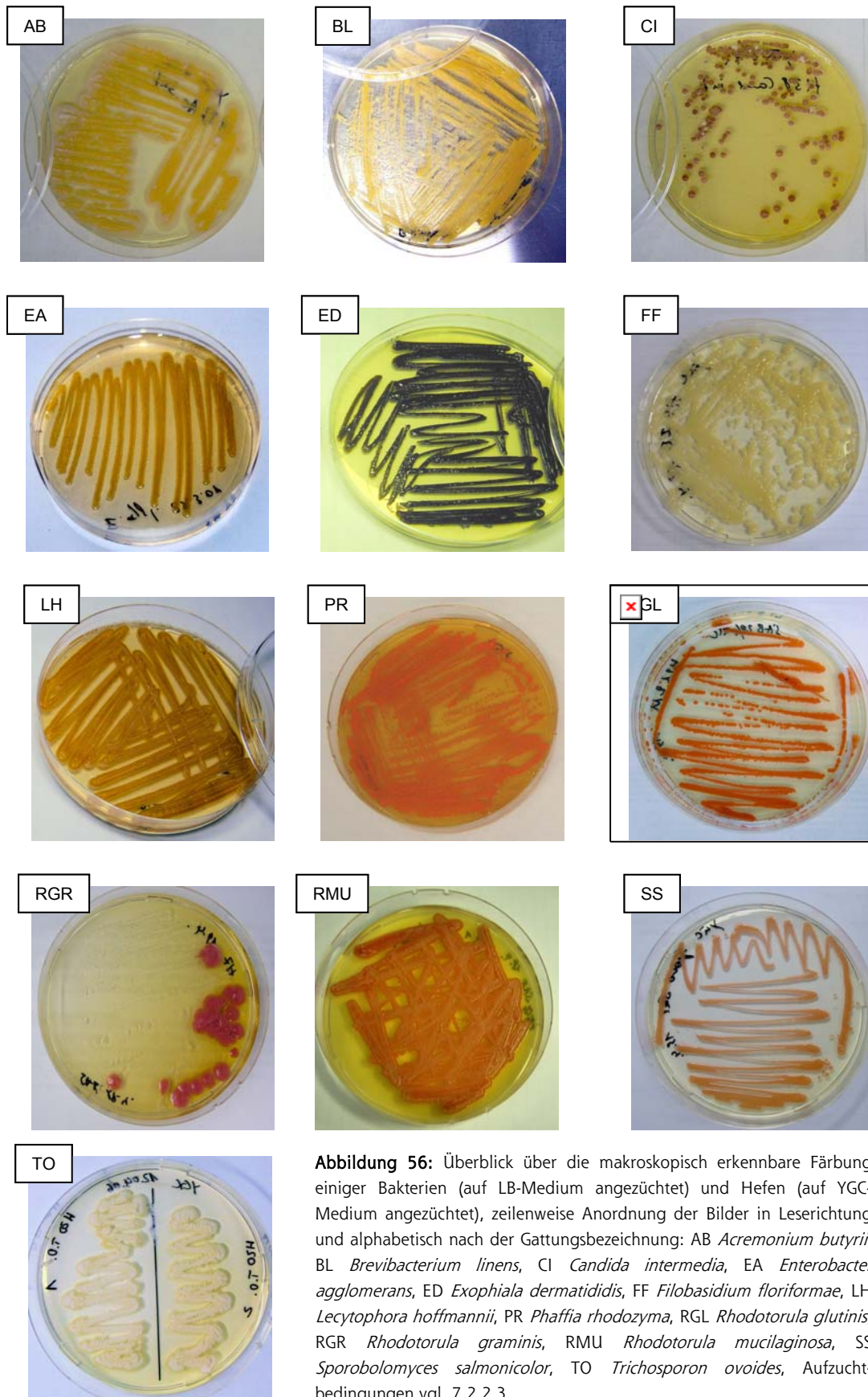
**Tabelle 13:** Übersicht über Fließmittel-Additive, die bei der Analytik von Carotinoiden mittels HPLC an RP-C<sub>30</sub>-Phasen verwendet werden, Abkürzungen alphabetisch: AA Essigsäure, AAC Ammoniumacetat, ASC Ascorbinsäure, EDTA Ethylen-diamin-tetra-essigsäure, NaAc Natriumacetat, TEA Triethanolamin, ZnCl<sub>2</sub> Zinkchlorid.

Fließmittel-Zusatz	angeführter Nutzen	Theorie des Mechanismus	Literaturbezug
AAC	keine Angaben	keine Angaben	NAKAGAWA 2008
			FRASER 2000
			BURNS 2003
			LI 2007
ASC	keine Angaben	keine Angaben	SZPYLKA 2005
ZnCl <sub>2</sub> , NaAc, AA	Verbesserung der Auflösung für Tocopherole, Carotinoide und Vitamin K	keine Angaben	COOK 1999
EDTA	Verbesserung des Peak- <i>Tailings</i> von Astaxanthin	Maskierung schädlicher Metallionen	LAMOTTE 2005
Tetrabutylammoniumhydrogenphosphat	Verbesserung der Peaksymmetrie, Erhöhung der Retentionszeit, allerdings Verringerung der Wiederfindungsrate von β-Carotin und Lycopin	keine Angaben	BREITHAUPT 2004
TEA	keine Angaben	keine Angaben	BREITHAUPT 2004
	Verbesserung der Wiederfindung (absolute Peakfläche) für β-Carotin, α-Carotin, Lutein, Zeaxanthin, β-Cryptoxanthin und Lycopin	Pufferung oder Maskierung der freien Silanolgruppen durch Wasserstoffbrücken	EMENHISER 1996

## 9.2 Fotos

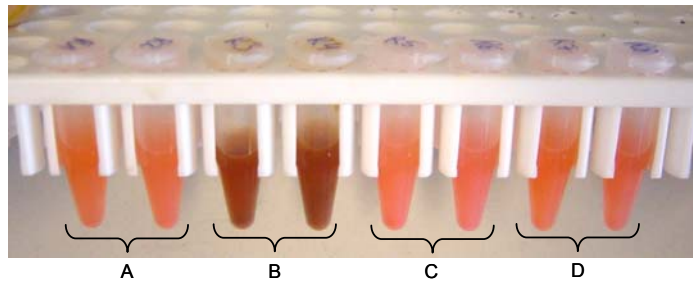


**Abbildung 55:** Übersicht über die von der LfL für die Untersuchungen zur Verfügung gestellten Hefen und Pilze und ihre makroskopisch erkennbare Kolonie-Färbung bei Aufzucht auf YGC-Medium, vgl. 7.2.2.3.

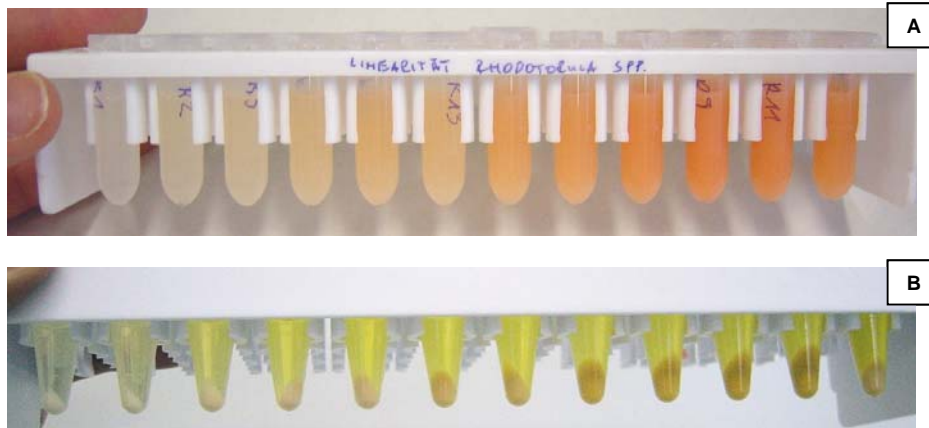


**Abbildung 56:** Überblick über die makroskopisch erkennbare Färbung einiger Bakterien (auf LB-Medium angezüchtet) und Hefen (auf YGC-Medium angezüchtet), zeilenweise Anordnung der Bilder in Leserichtung und alphabetisch nach der Gattungsbezeichnung: AB *Acremonium butyrii*, BL *Brevibacterium linens*, CI *Candida intermedia*, EA *Enterobacter agglomerans*, ED *Exophiala dermatididis*, FF *Filobasidium floriformae*, LH *Lecytophora hoffmannii*, PR *Phaffia rhodozyma*, RGL *Rhodotorula glutinis*, RGR *Rhodotorula graminis*, RMU *Rhodotorula mucilaginosa*, SS *Sporobolomyces salmonicolor*, TO *Trichosporon ovoides*, Aufzuchtbedingungen vgl. 7.2.2.3 .





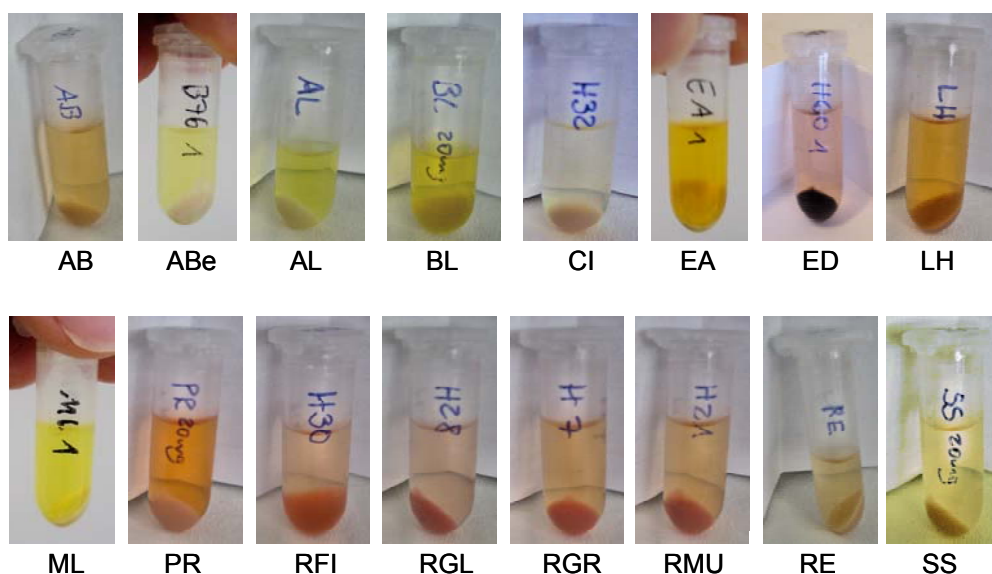
**Abbildung 57:** Dotierung der Aufschluss suspension von *Rhodotorula* spp. mit verschiedenen Antioxidantien und mit  $\beta$ -8'-Apo-Carotenal (BAPO) als internen Standard (ISTD), Zustand nach enzymatischem Zellaufschluss (A kein Antioxidanz zugesetzt, B Pyrogallol, C Ascorbinsäure, D BAPO als ISTD in ethanolischer Lösung), deutlich erkennbare Braun-Verfärbung des Pyrogallol-Ansatzes.



**Abbildung 58:** Bestimmung des Linearitätsbereiches der Methode über die Aufarbeitung steigender Mengen an Lyophilisat, A *Rhodotorula glutinis* (Zustand nach erfolgtem Zellaufschluss) und B *Micrococcus luteus* (Zustand während der Extraktion).



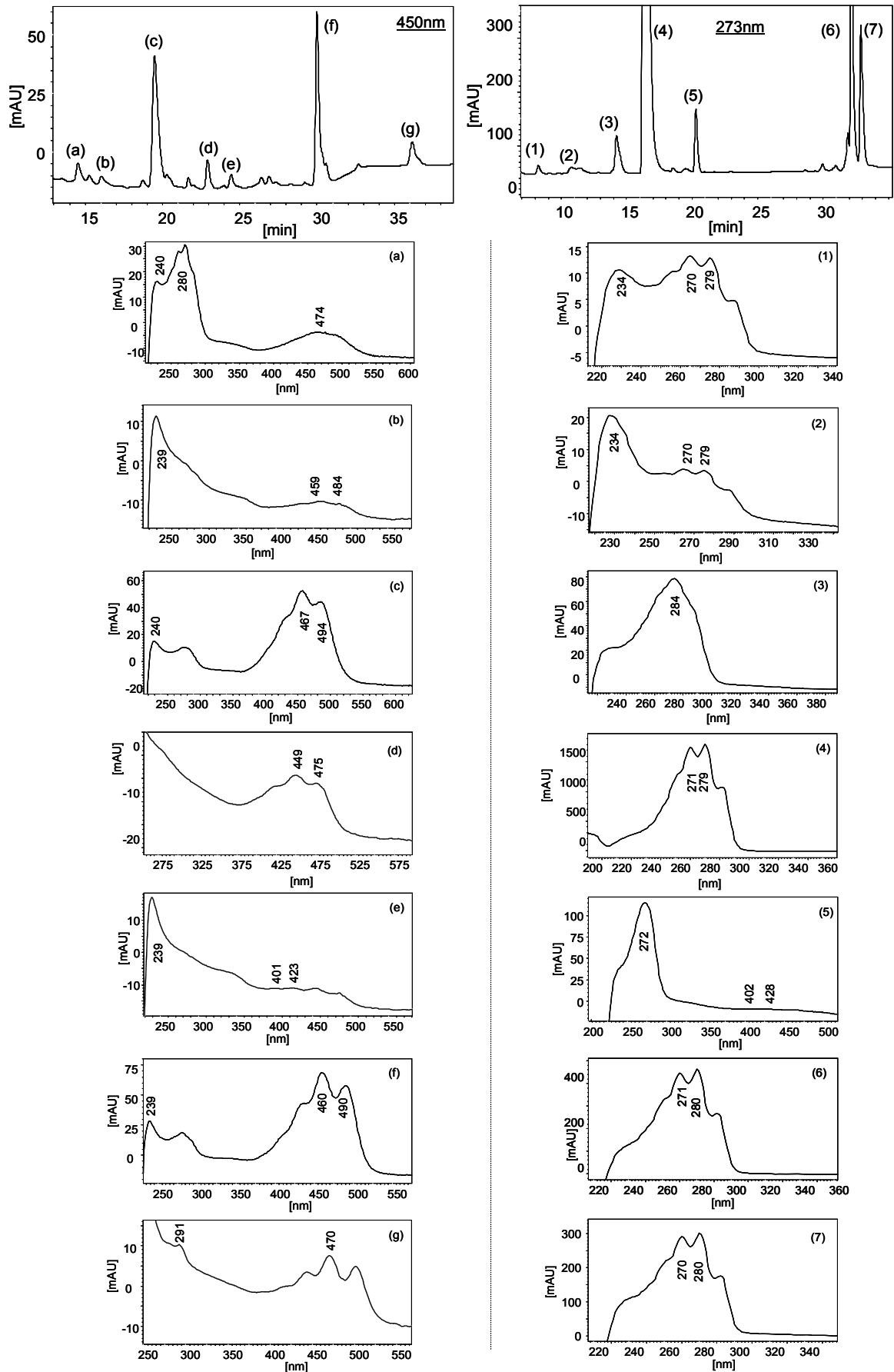
**Abbildung 59:** Überblick über die beim Screening erhaltenen Farben der aufgeschlossenen Zellsuspensionen.



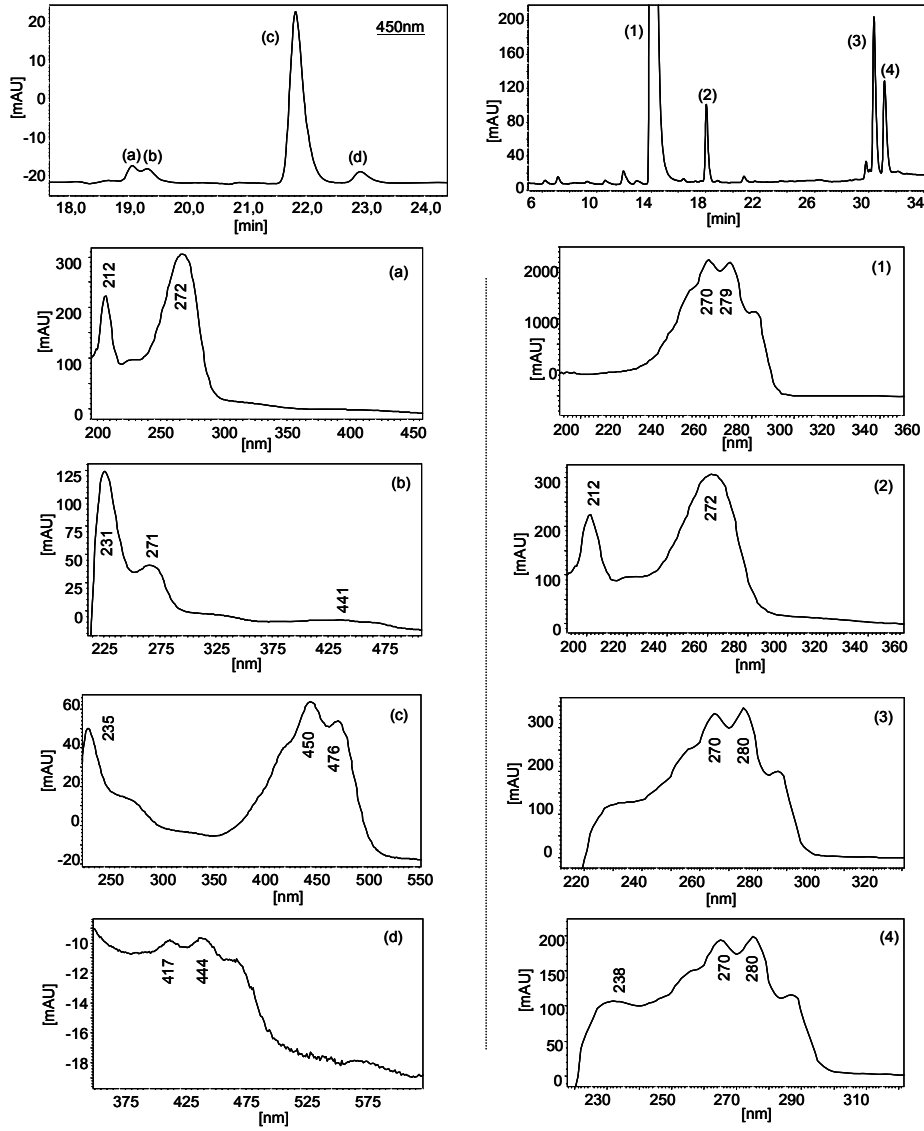
**Abbildung 60:** Überblick über die beim Screening erhaltenen Farben der Extrakte, zeilenweise Anordnung der Bilder in Leserichtung und alphabetisch nach der Gattungsbezeichnung: AB *Acremonium butyrii*, ABe *Arthrobacter bergerei*, AL *Arthrobacter luteus*, BL *Brevibacterium linens*, CI *Candida intermedia*, EA *Exophiala dermatididis*, LH *Lecytophora hoffmannii*, ML *Micrococcus luteus*, PR *Phaffia rhodozyma*, RFI *Rhodotorula* spp. (Feld-Isolat), RGL *Rhodotorula glutinis*, RGR *Rhodotorula* graminis, RMU *Rhodotorula mucilaginos*a, RE *Rhodococcus equi*, SS *Sporobolomyces salmonicolor*.

### 9.3 Chromatogramme und UV-VIS-Spektren

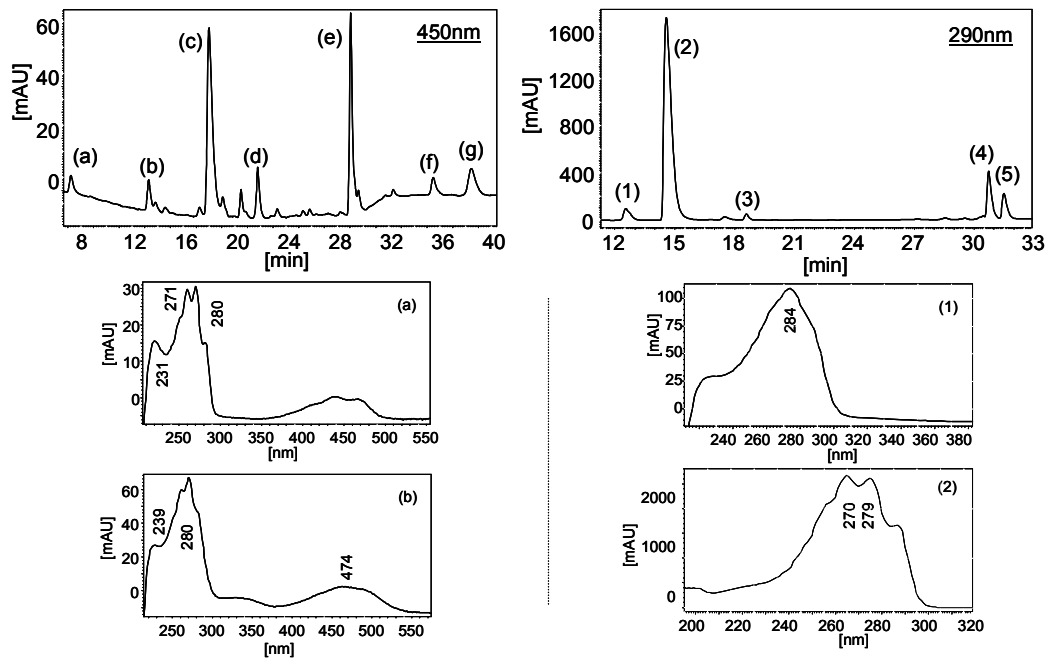
#### *Acremonium butyrii*

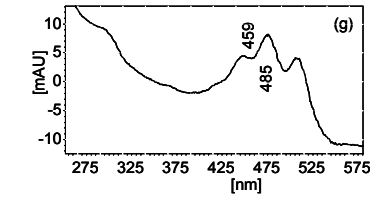
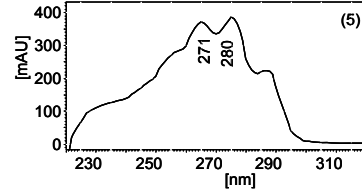
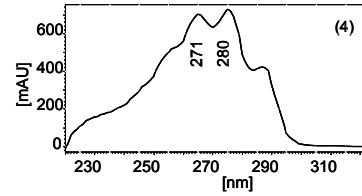
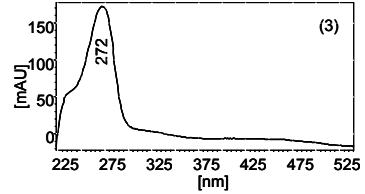
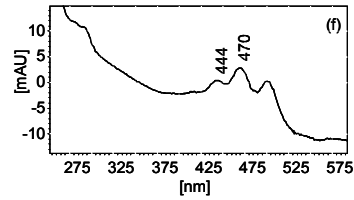
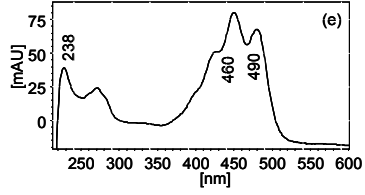
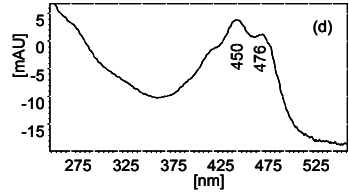
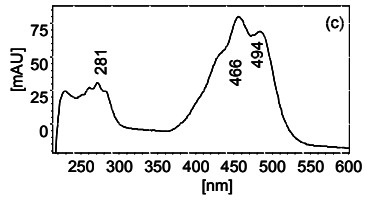


*Bullera variabilis*

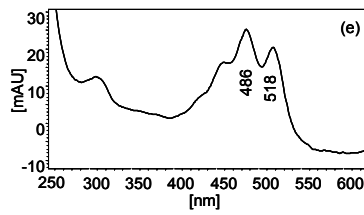
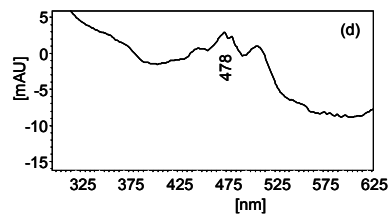
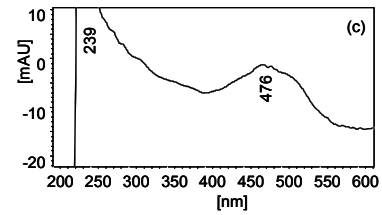
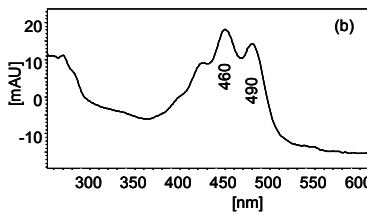
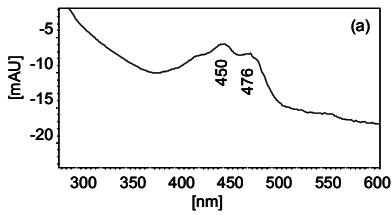
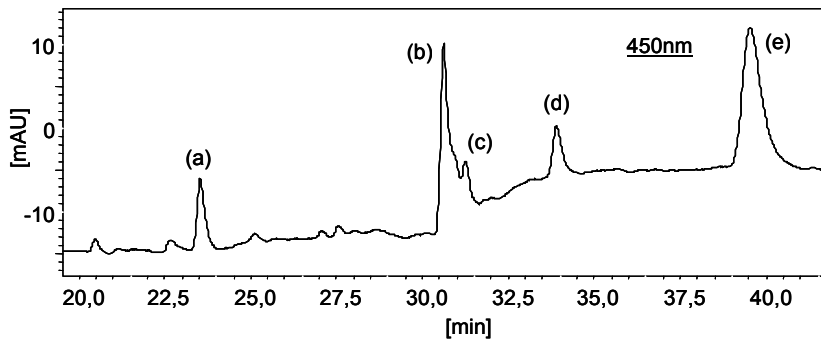


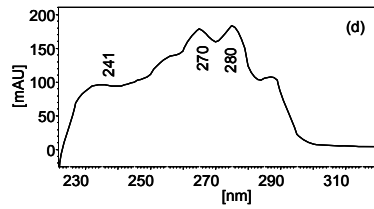
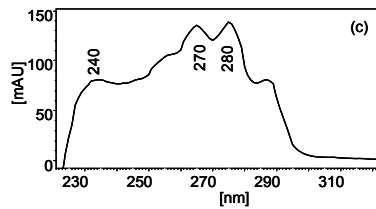
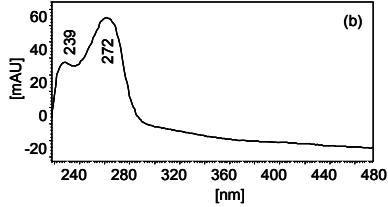
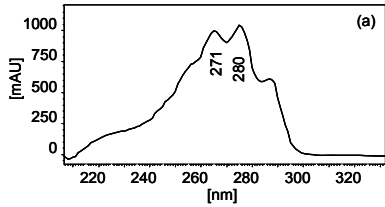
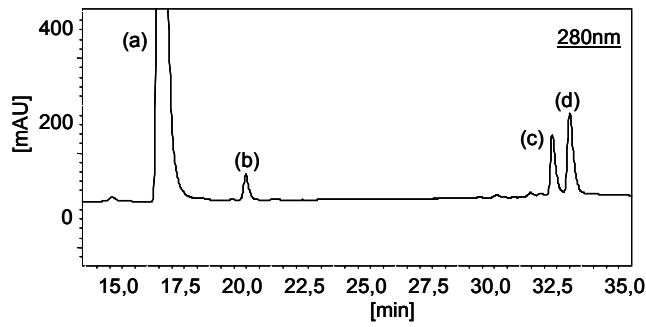
*Candida intermedia*



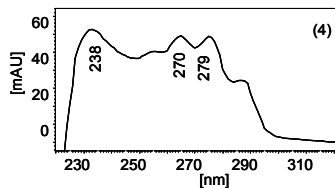
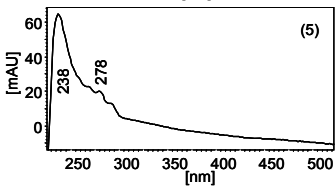
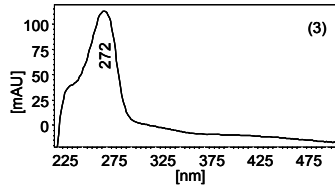
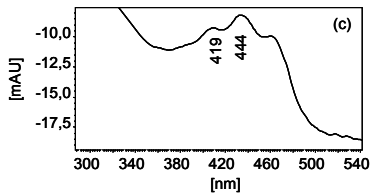
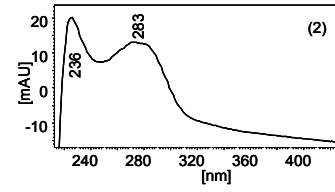
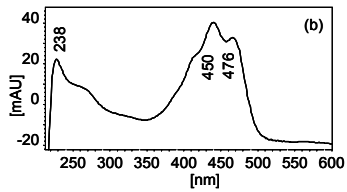
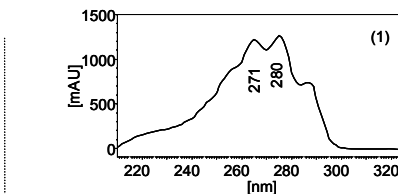
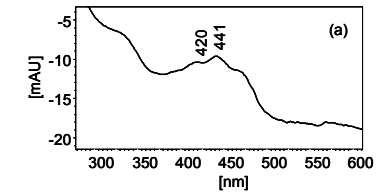
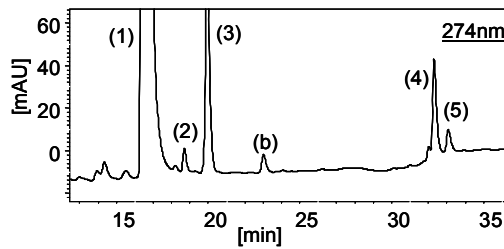
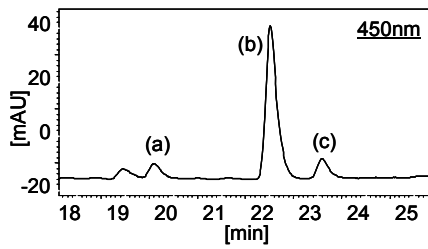


*Exophiala dermatitidis*

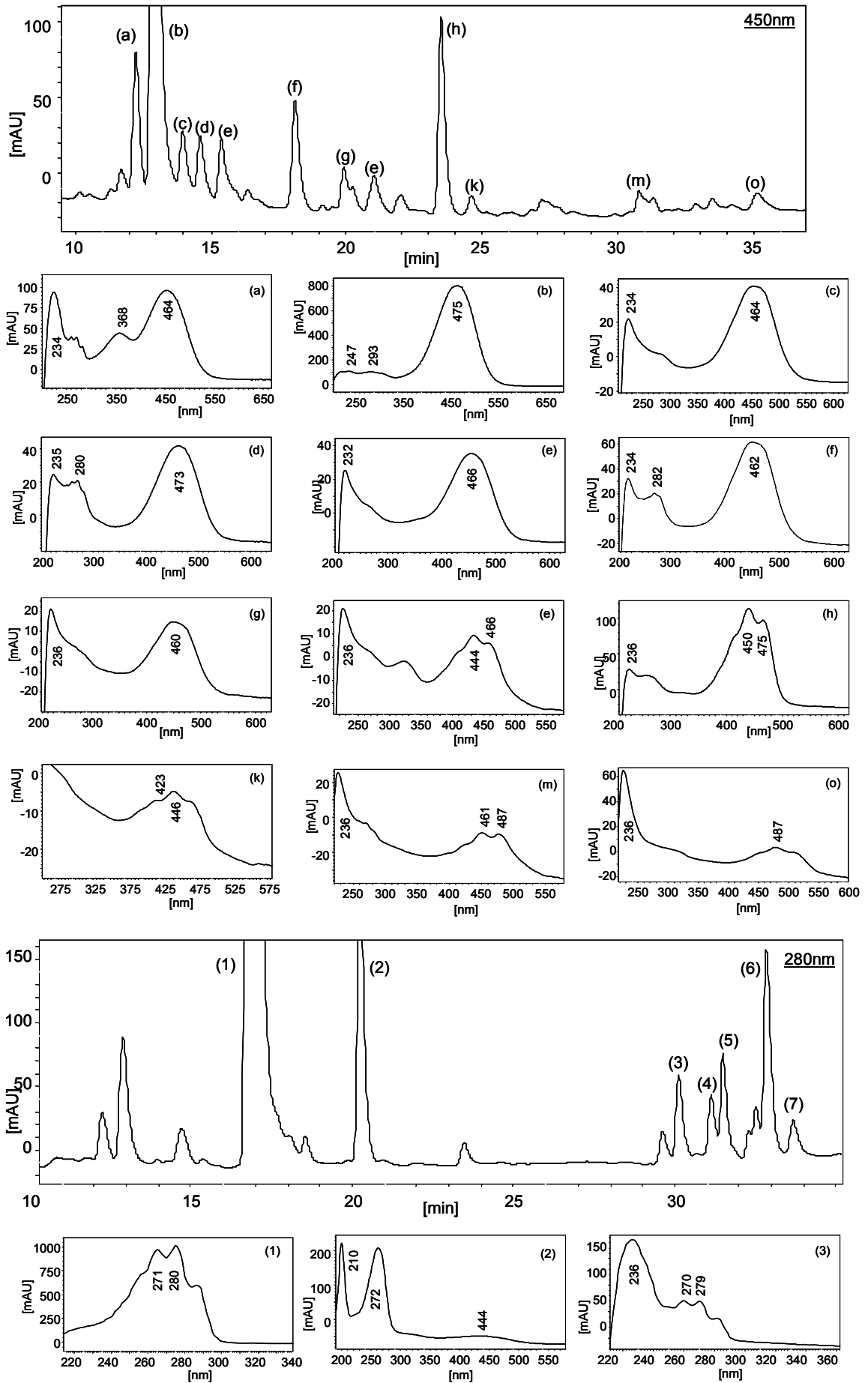


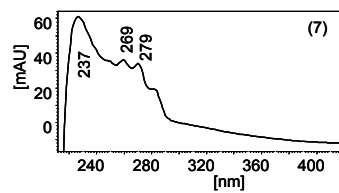
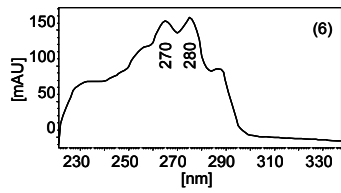
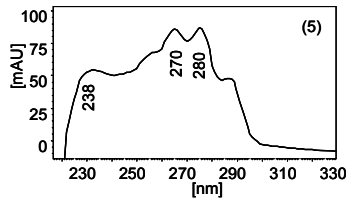
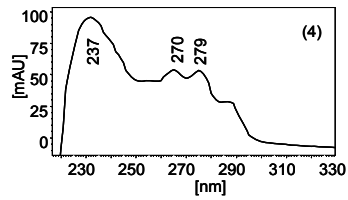


*Filobasidium floriformae*

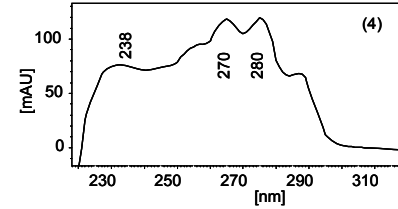
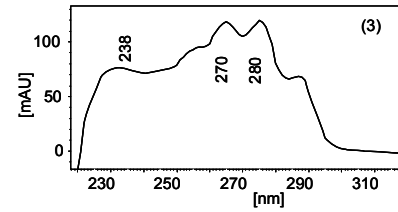
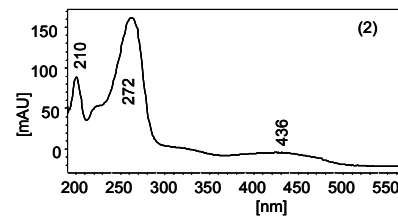
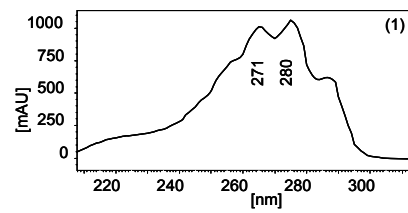
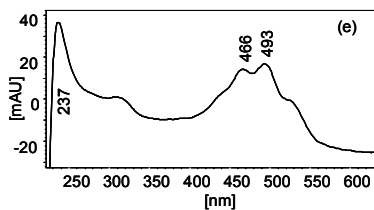
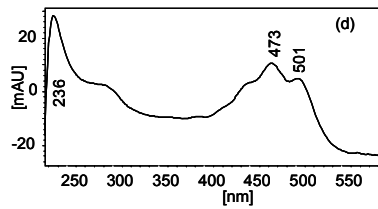
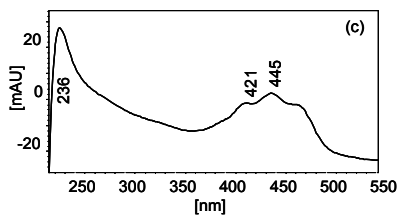
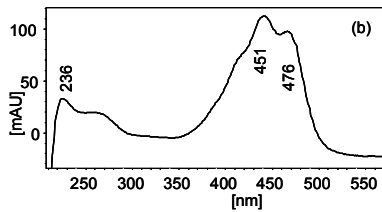
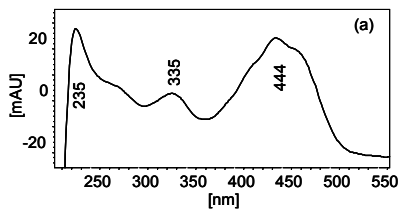
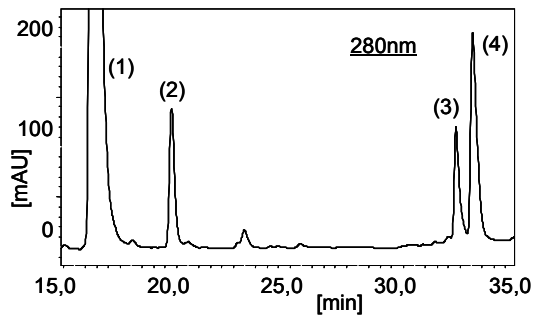
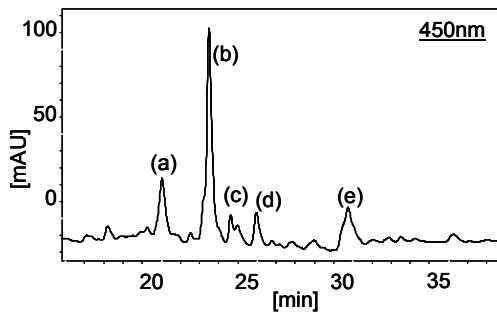


*Phaffia rhodozyma*

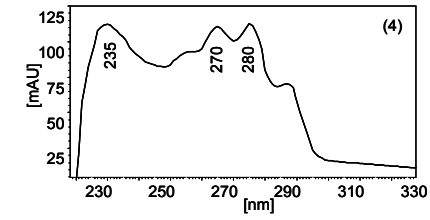
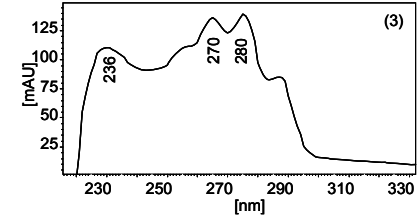
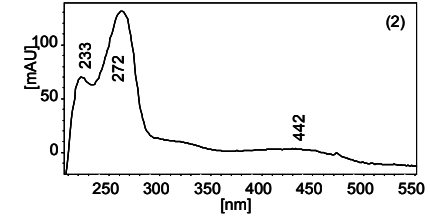
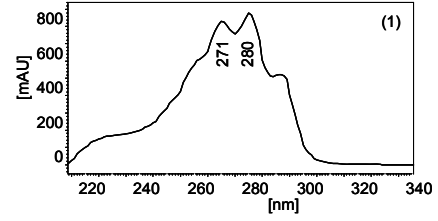
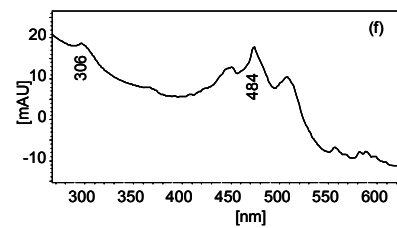
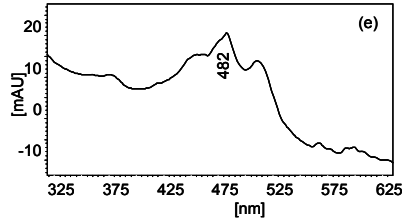
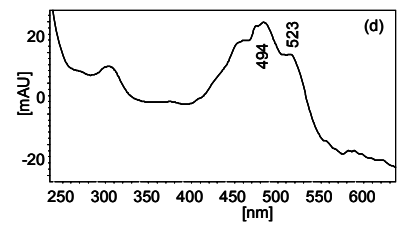
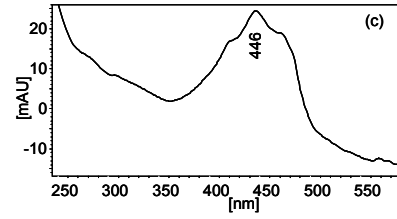
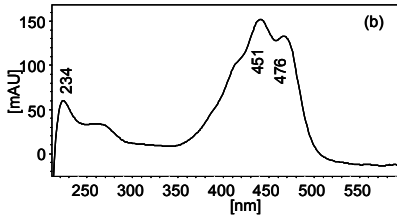
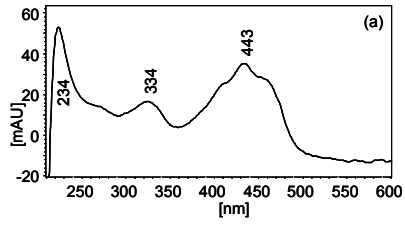
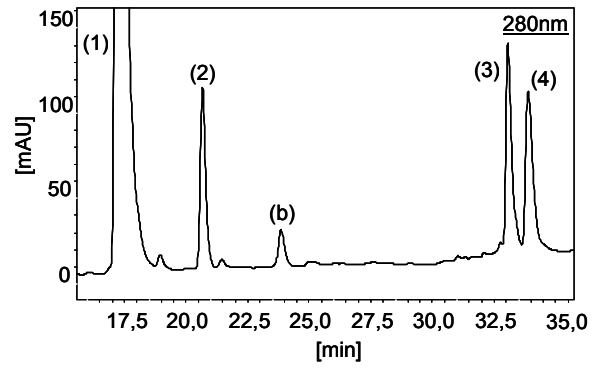
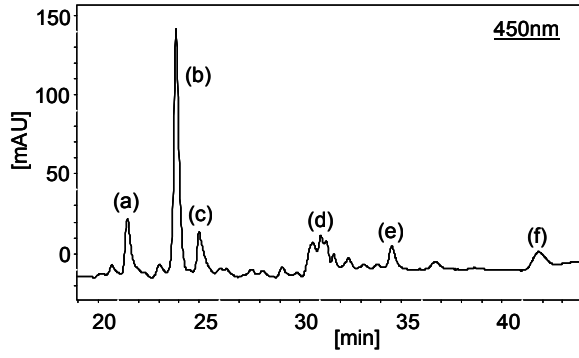




*Rhodotorula glutinis*

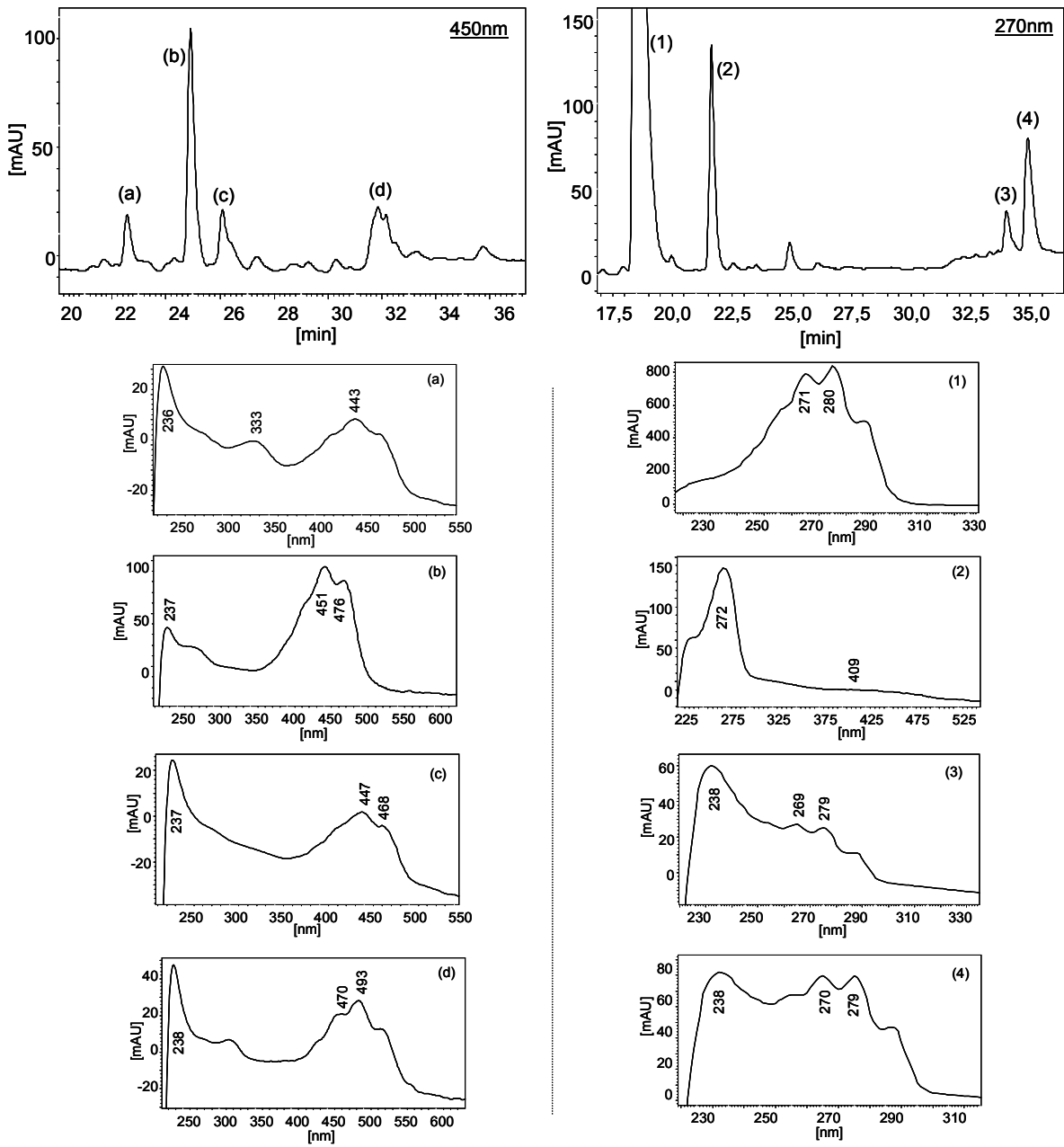


*Rhodotorula graminis*

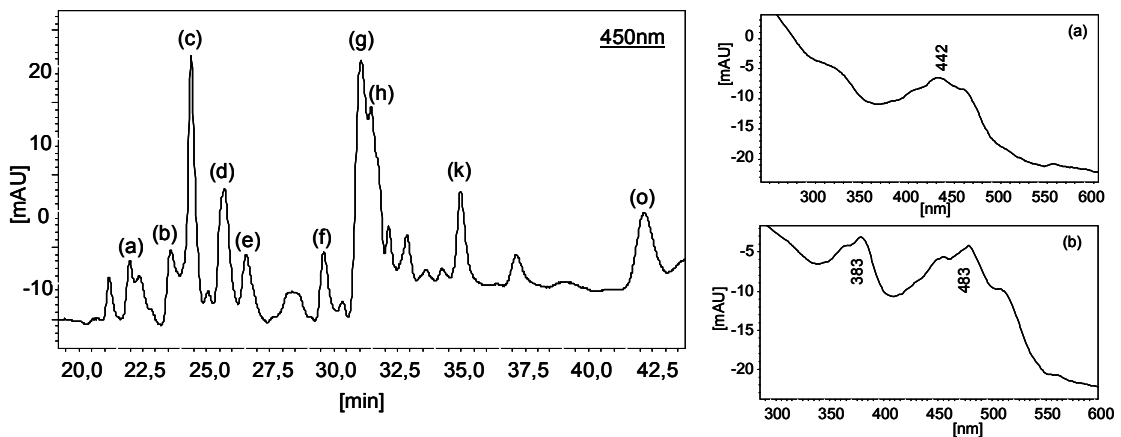


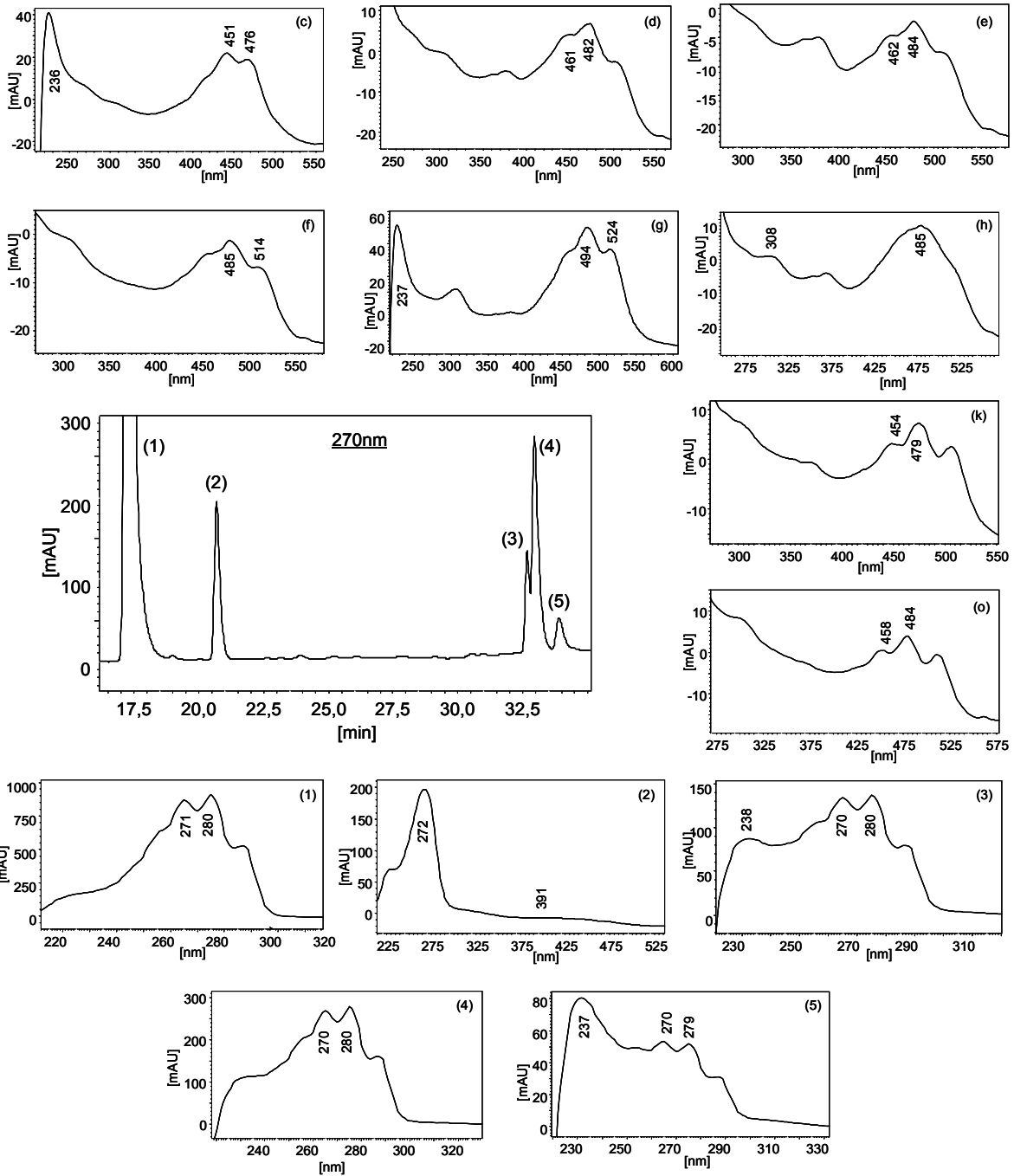


*Rhodotorula mucilaginosa*

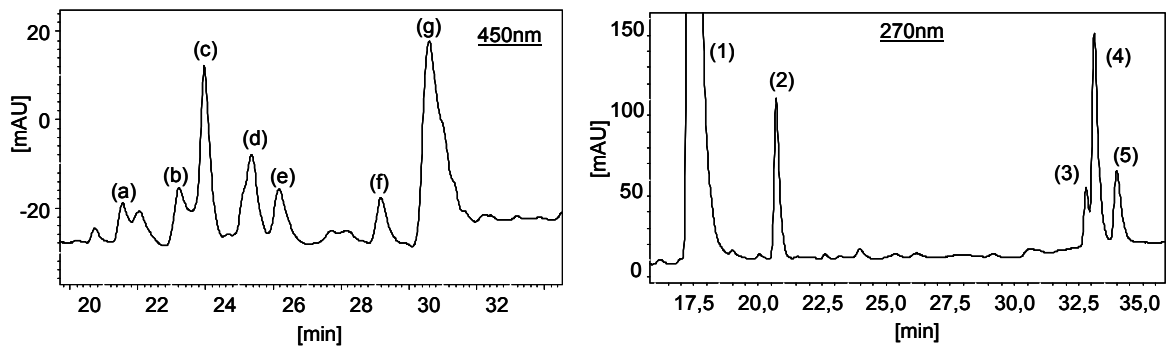


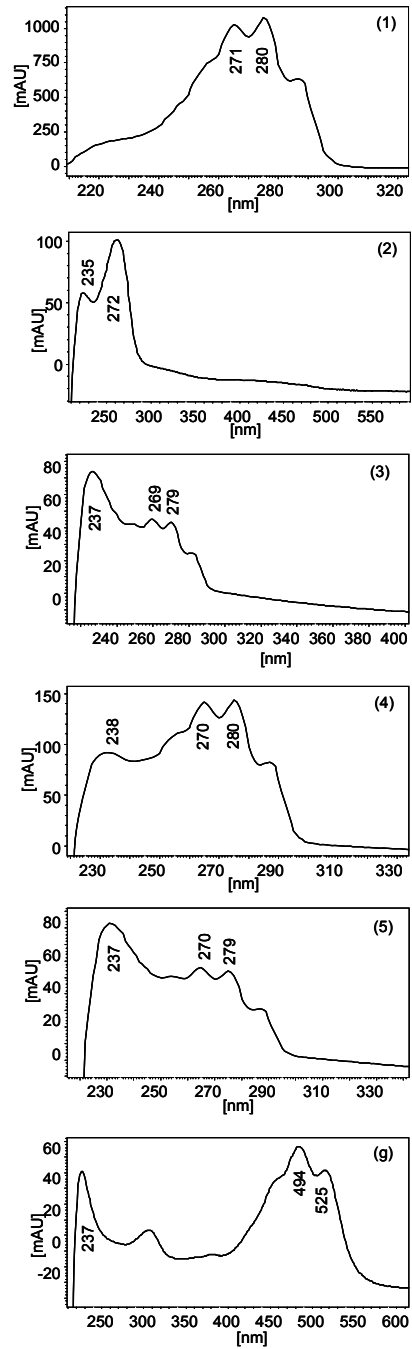
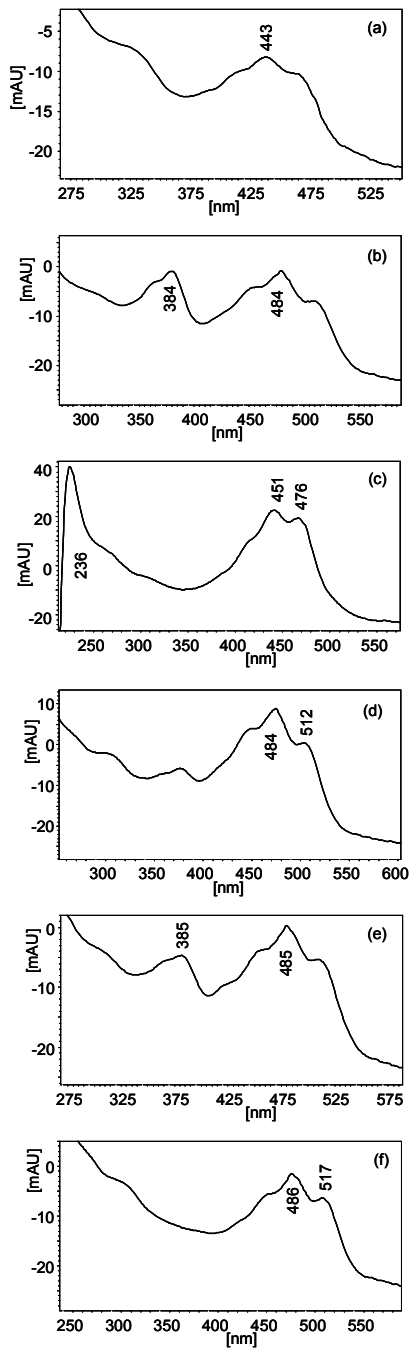
*Rhodotorula spp. (Faeces Isolat)*



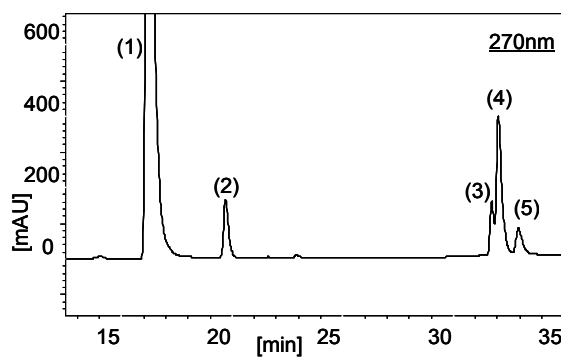
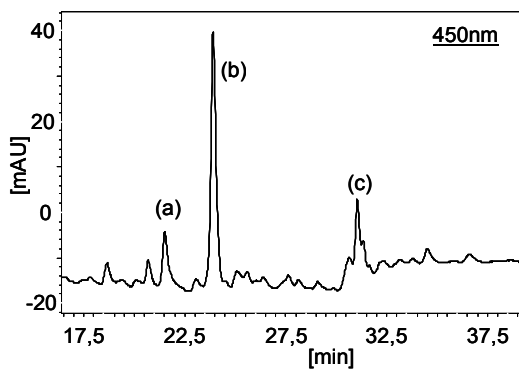


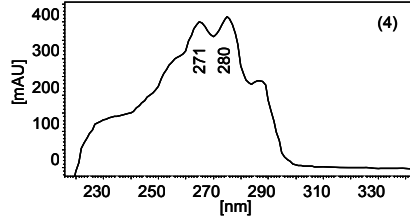
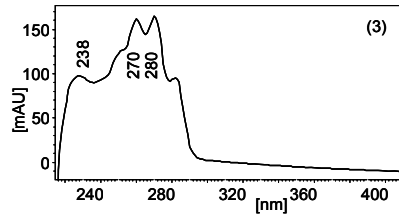
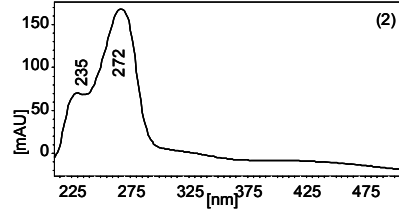
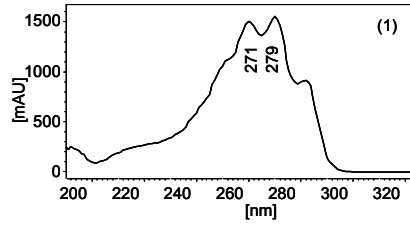
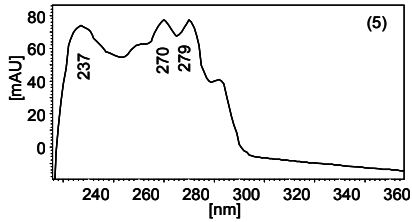
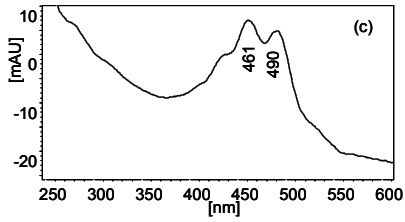
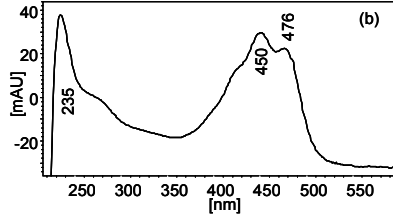
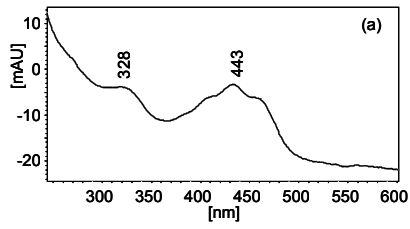
***Rhodotorula* spp. (Feld-Isolat)**



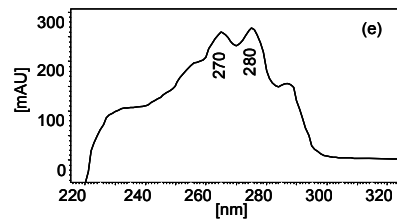
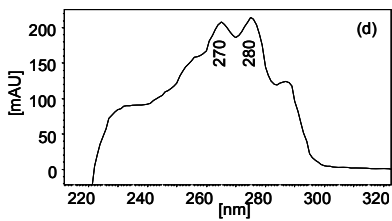
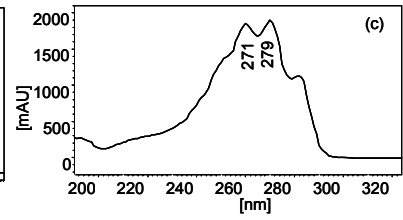
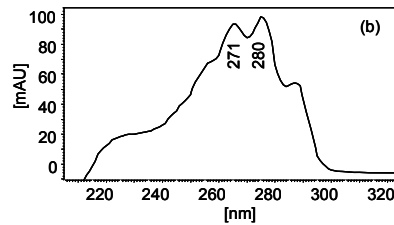
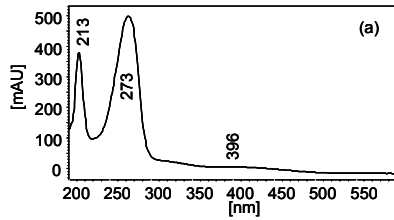
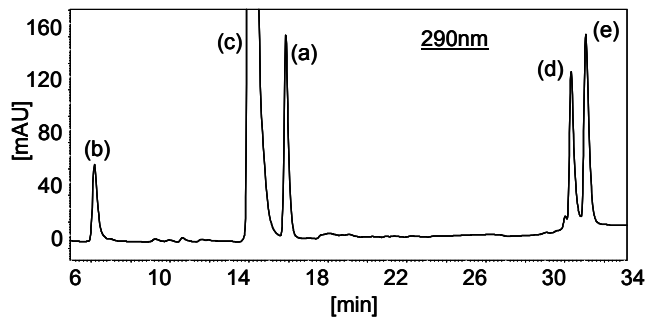
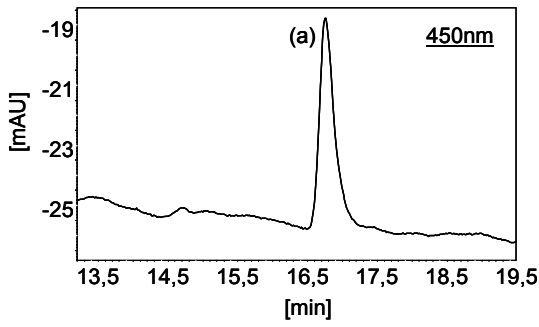


*Sporobolomyces salmonicolor*

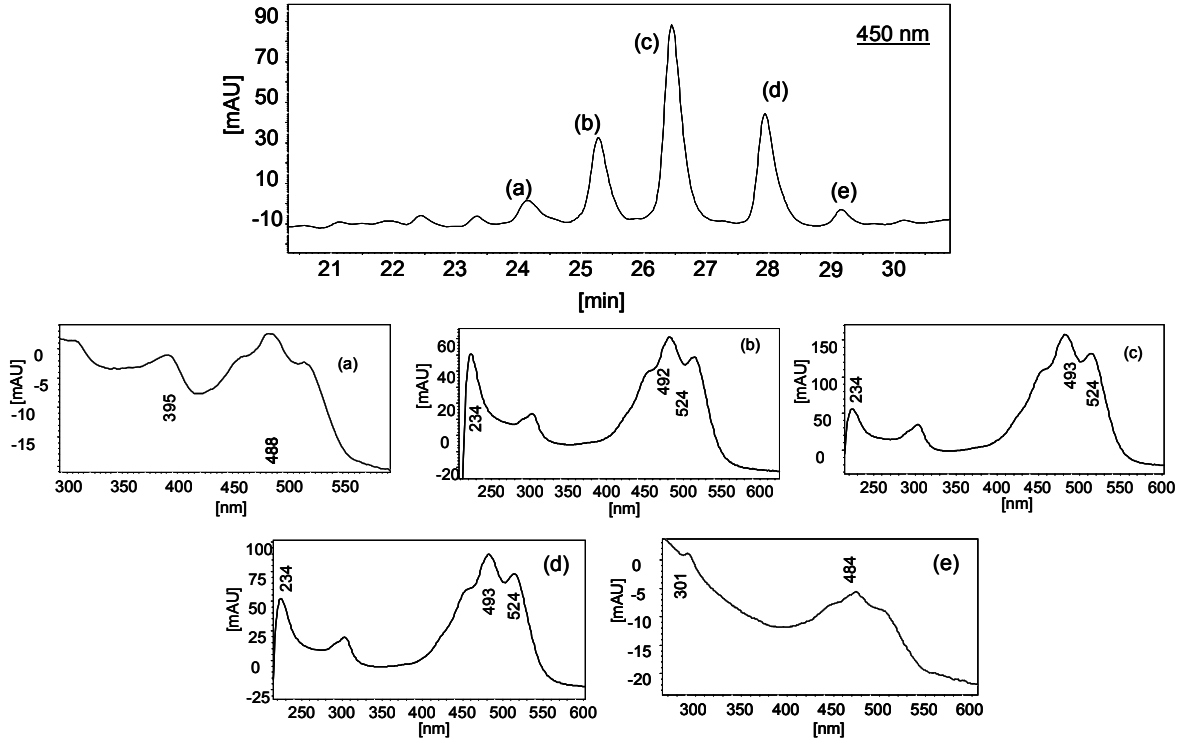




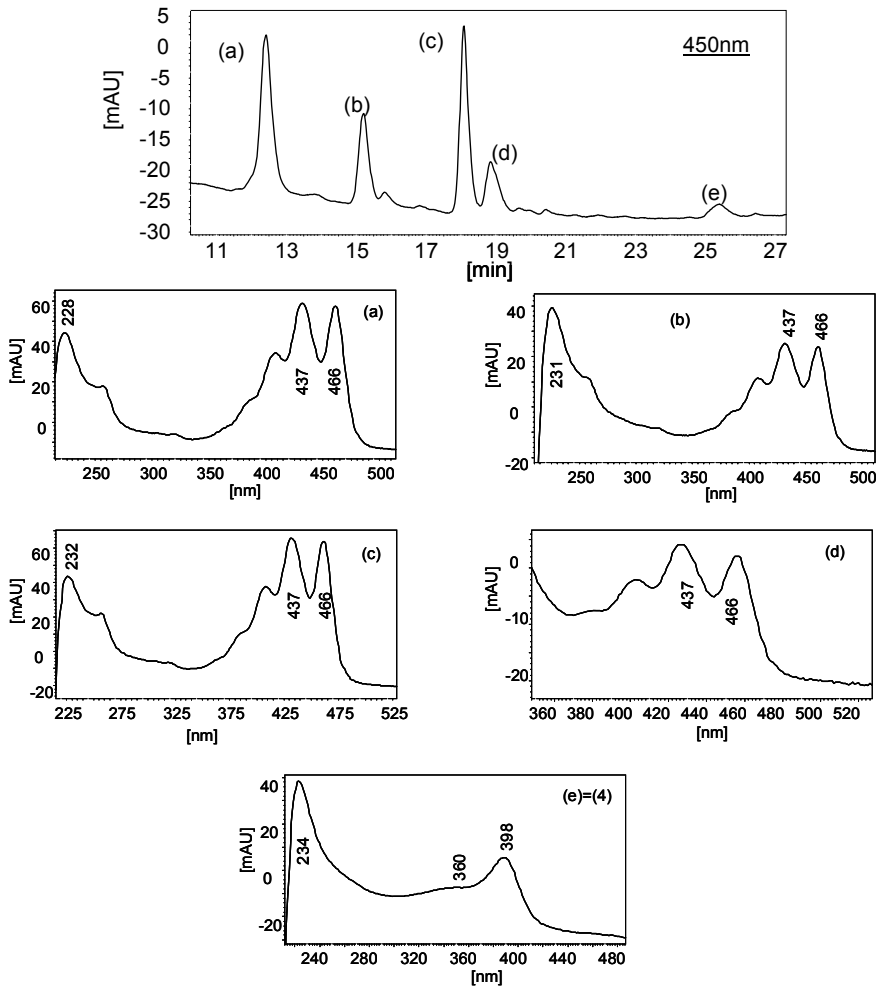
*Trichosporon ovoides*

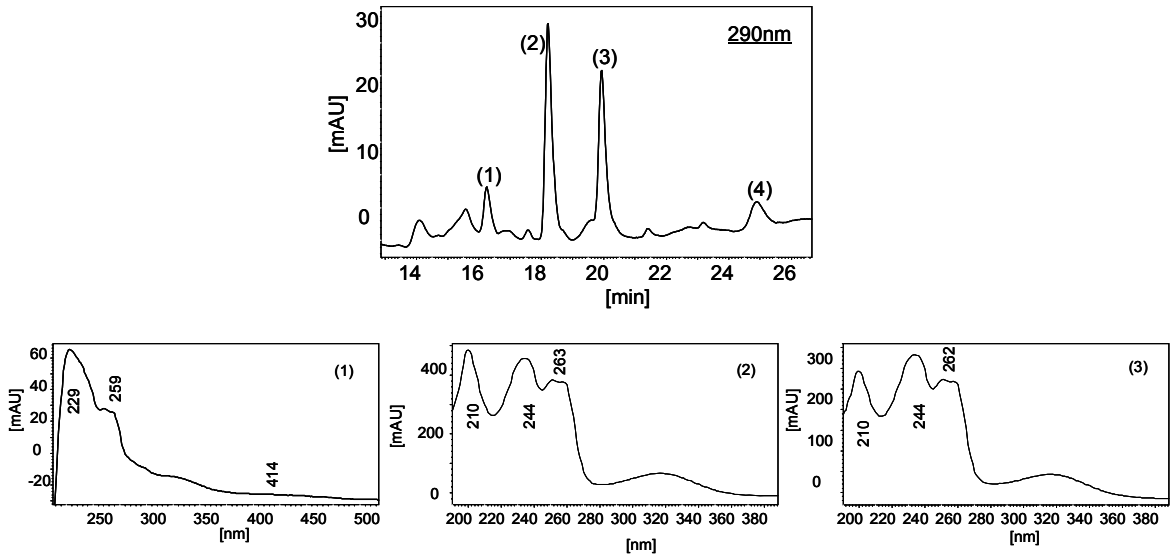


*Acidobacterium capsulatum*

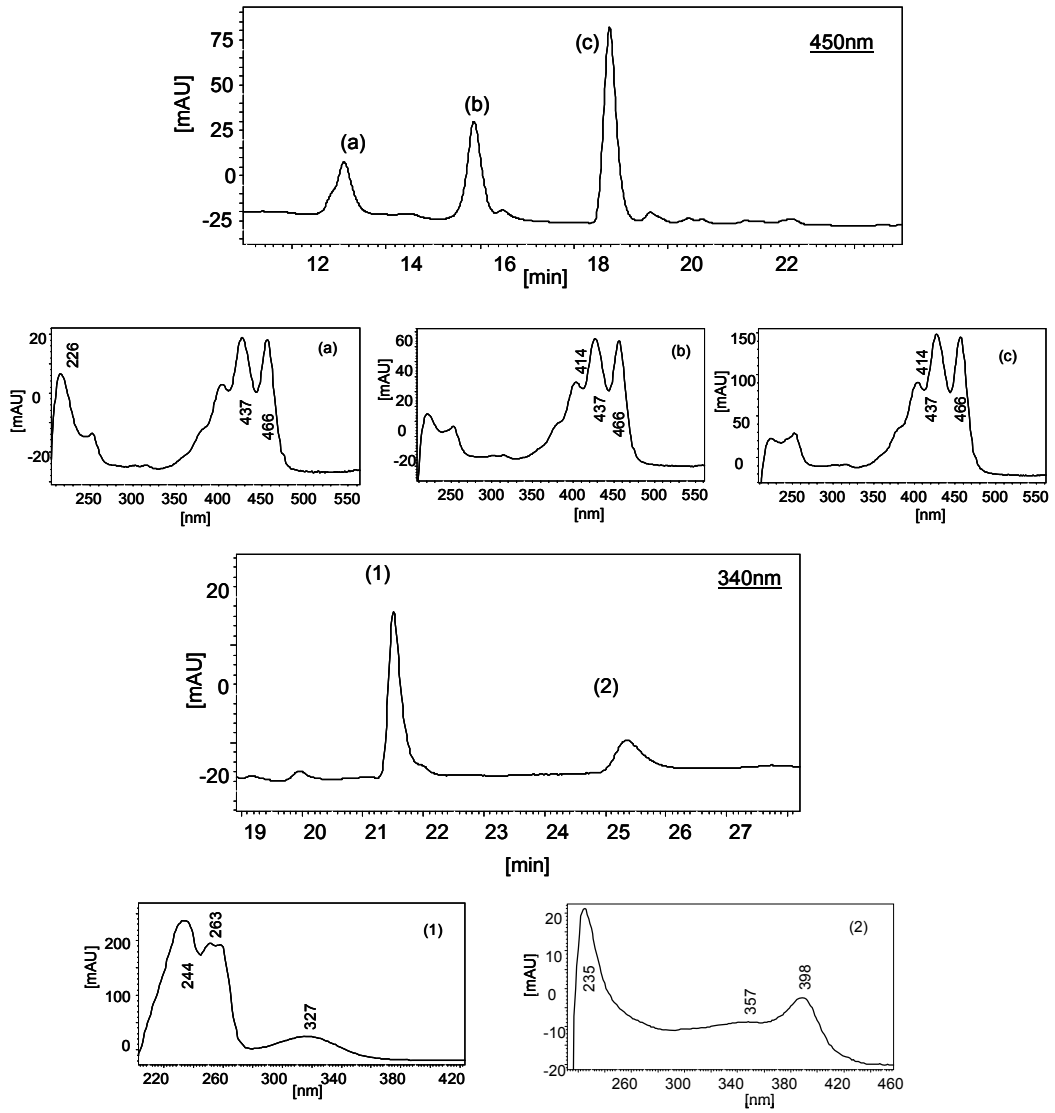


*Arthrobacter bergerei*

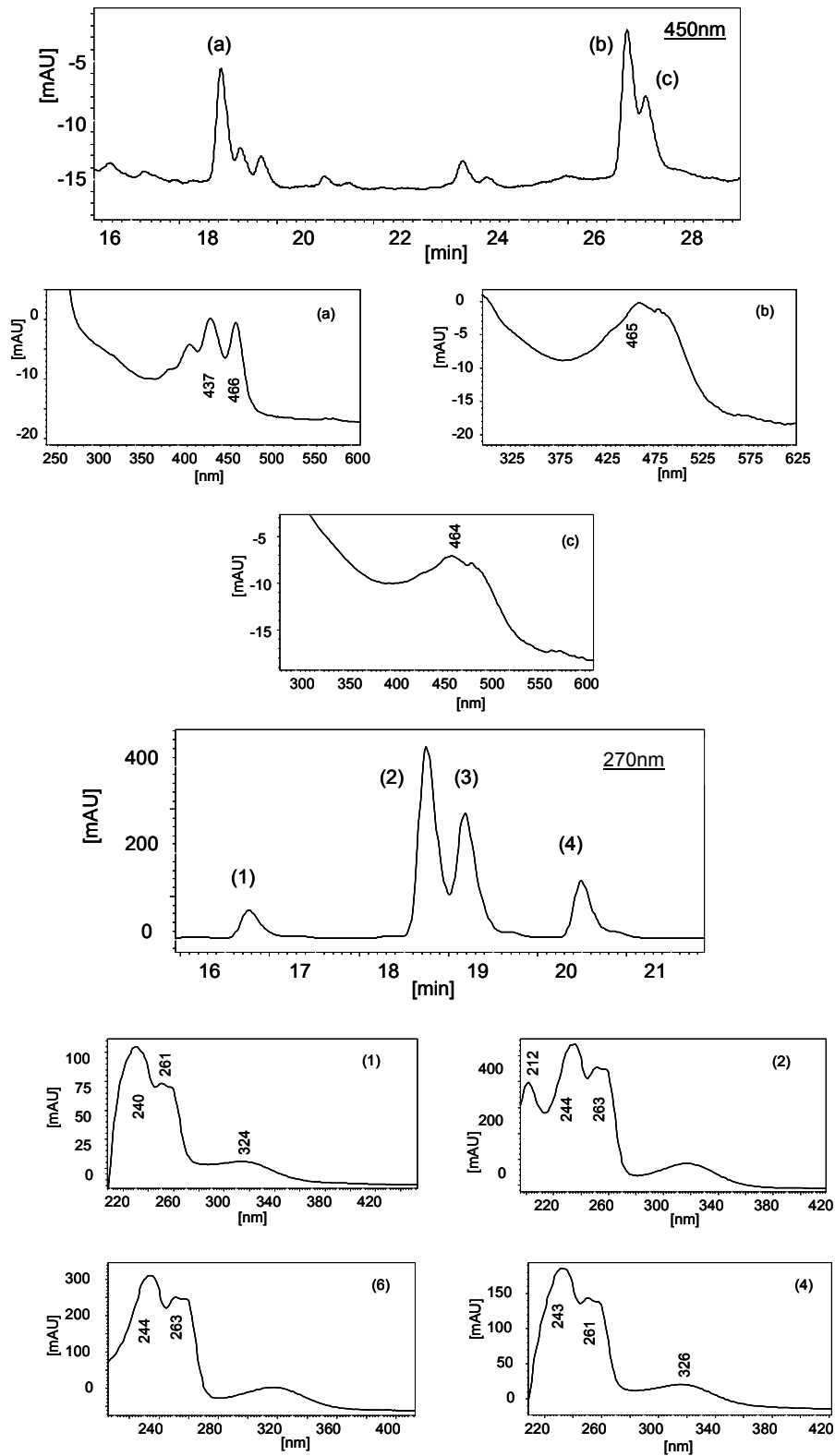




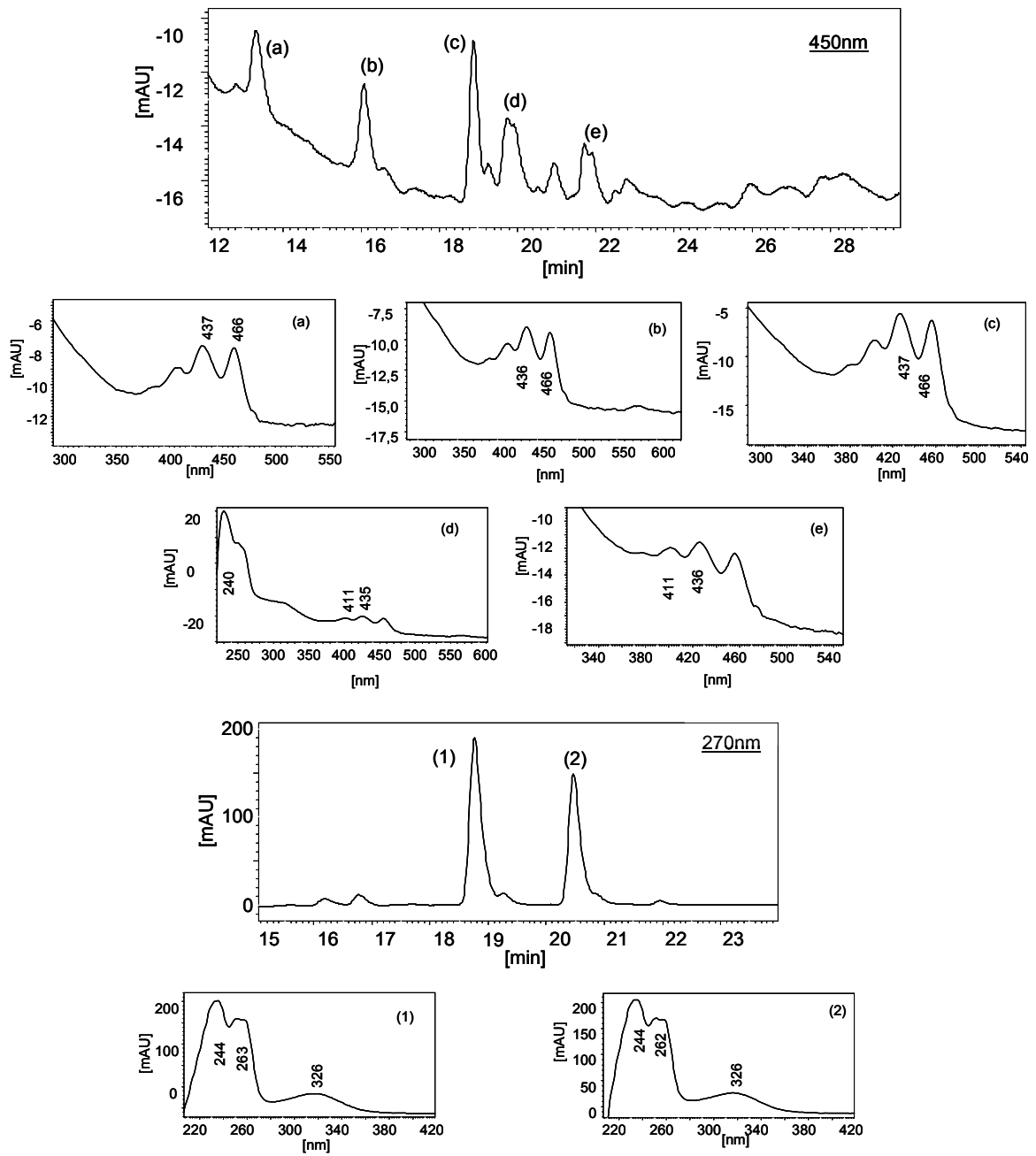
*Arthrobacter luteus*



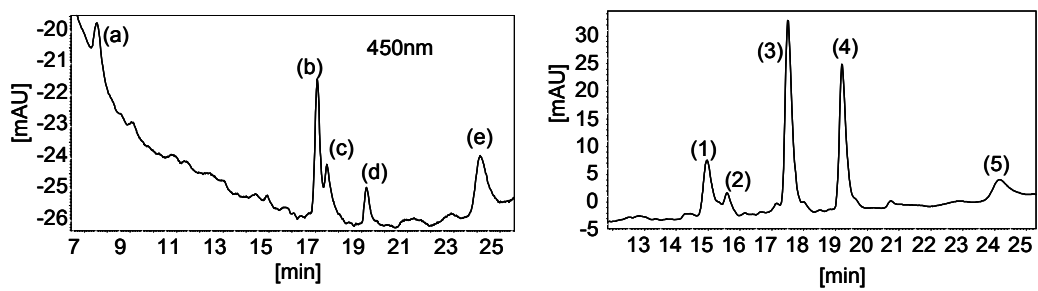
*Arthrobacter nicotianae*



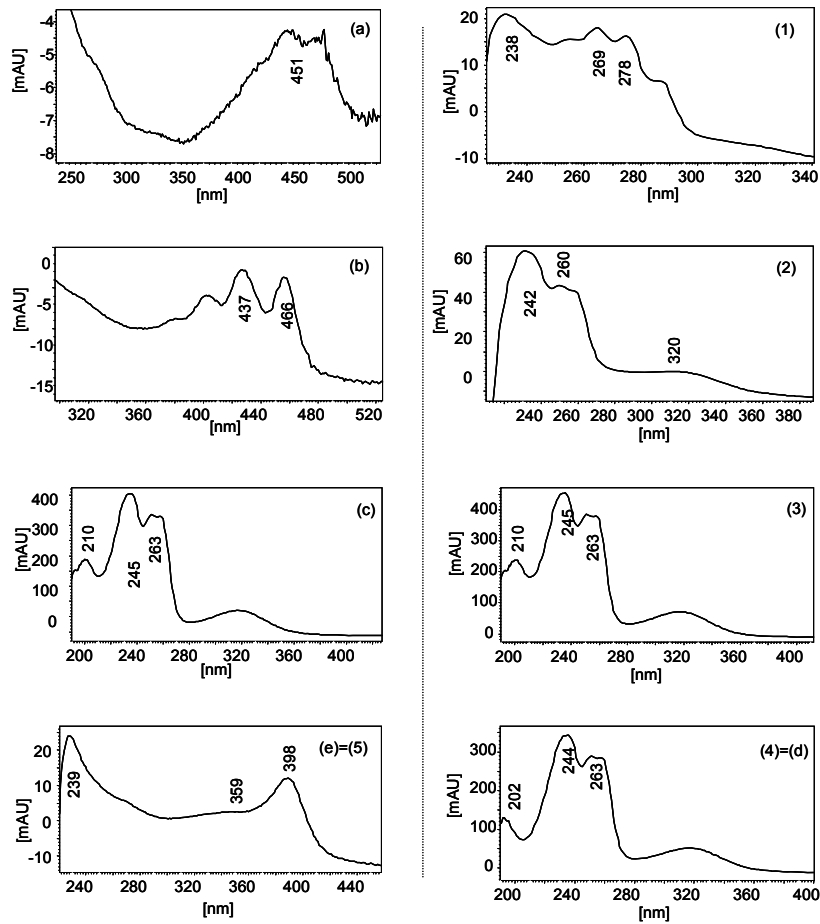
*Arthrobacter protophormoniae*



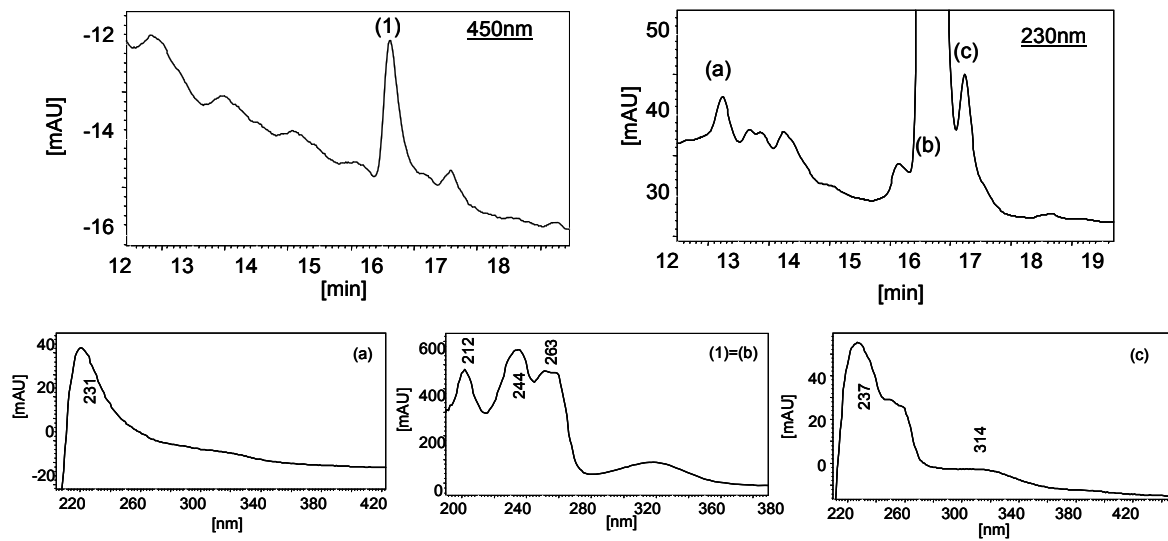
*Arthrobacter uratoxydans*



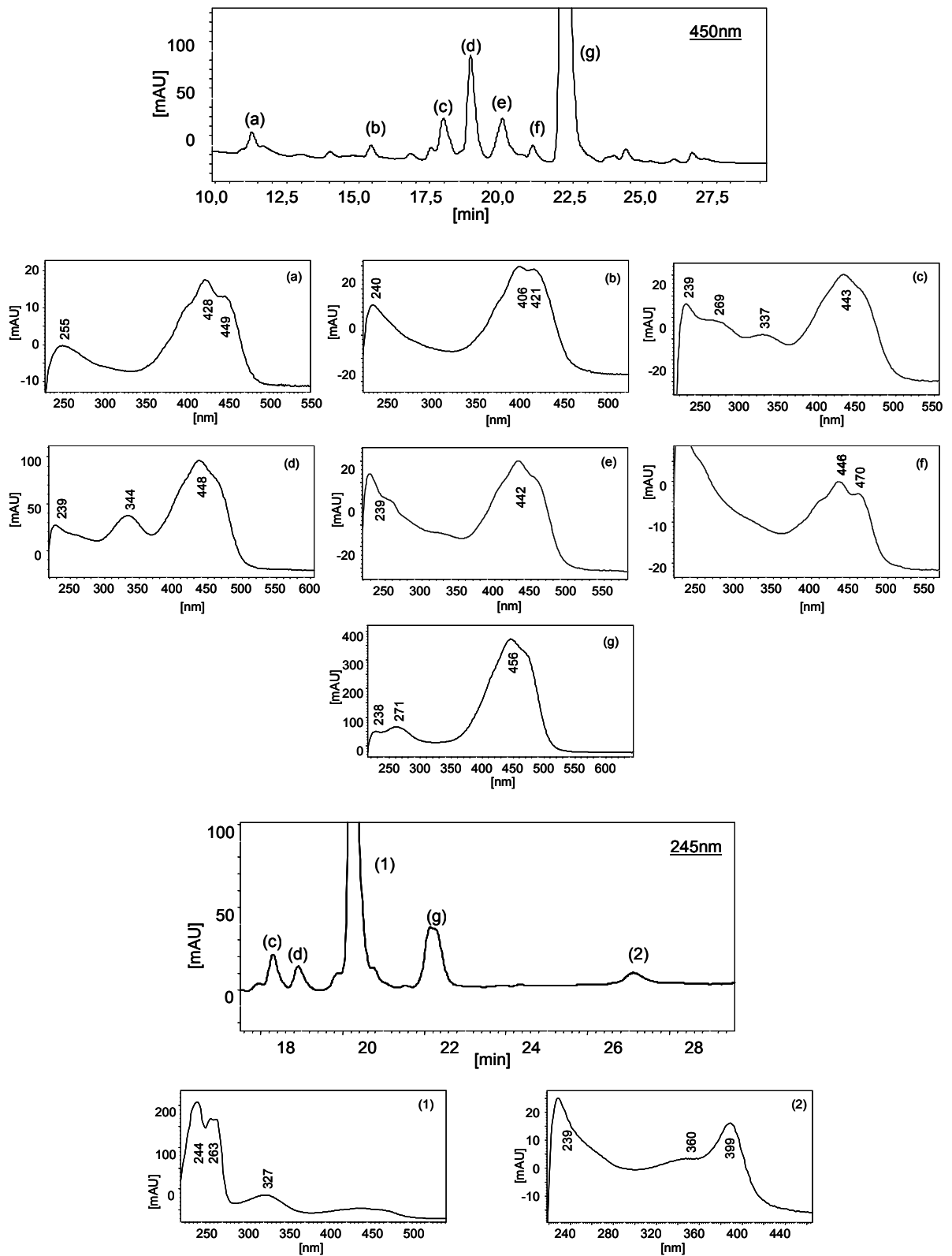




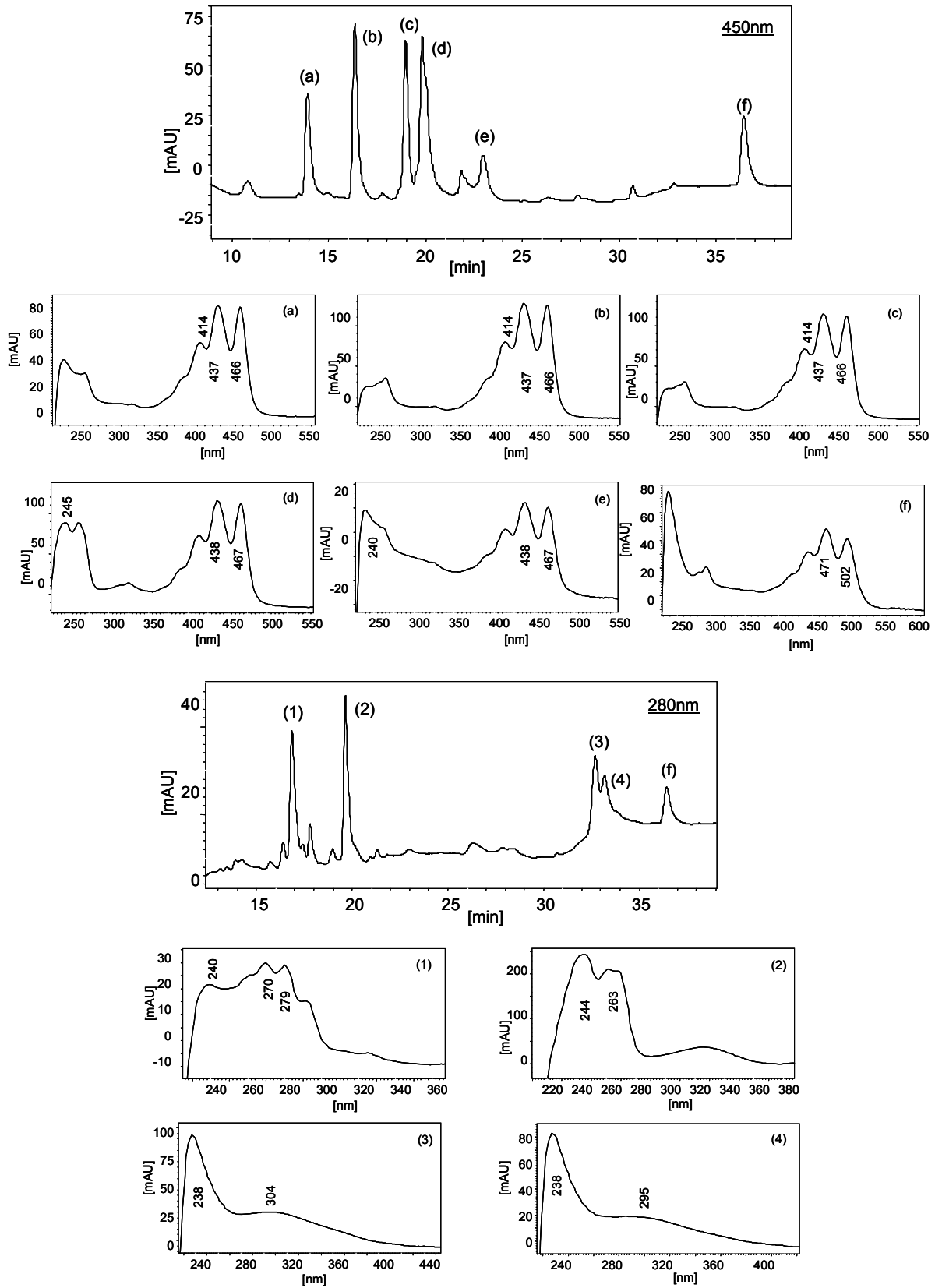
*Bacillus cereus*



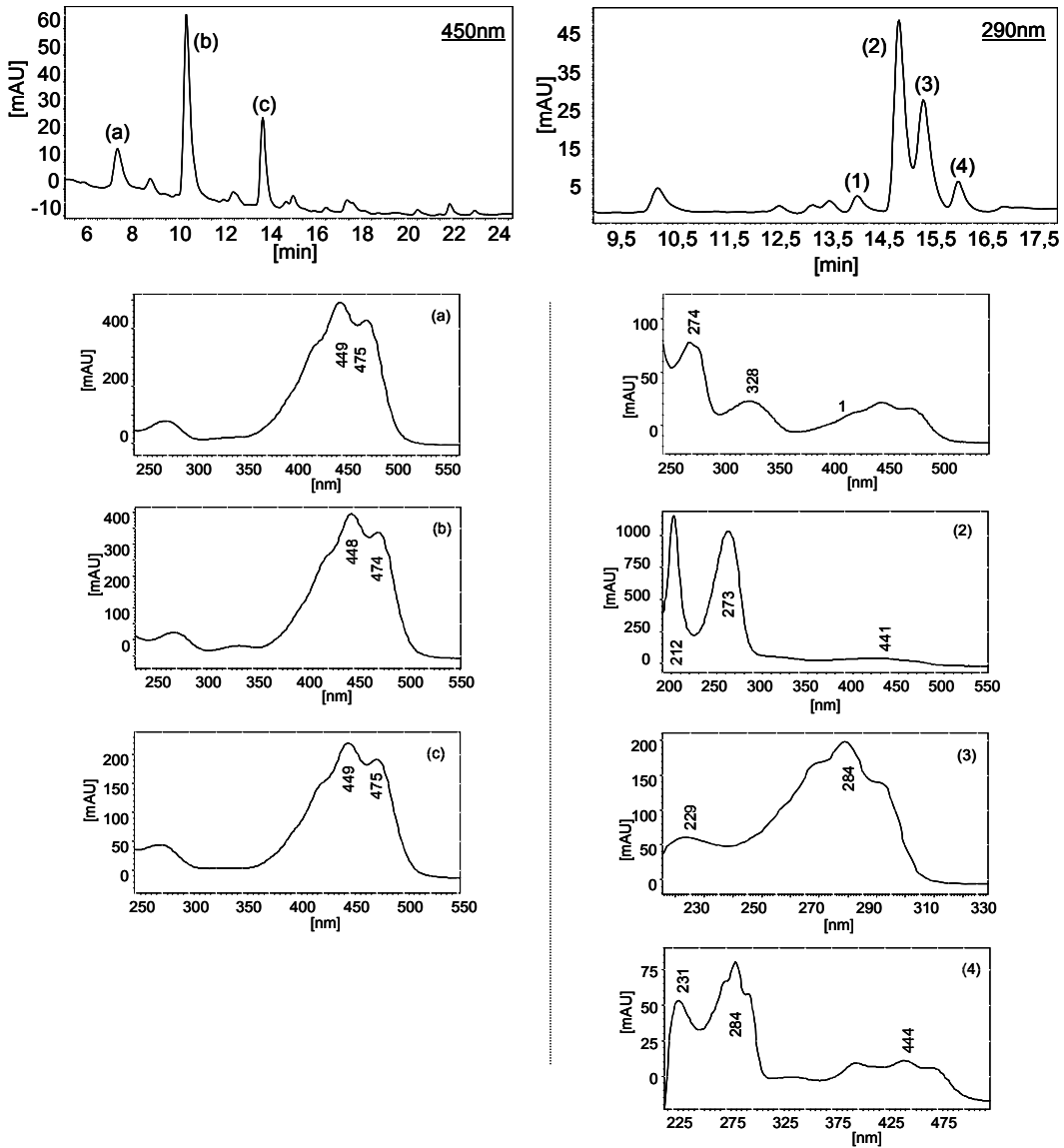
*Brevibacterium linens*



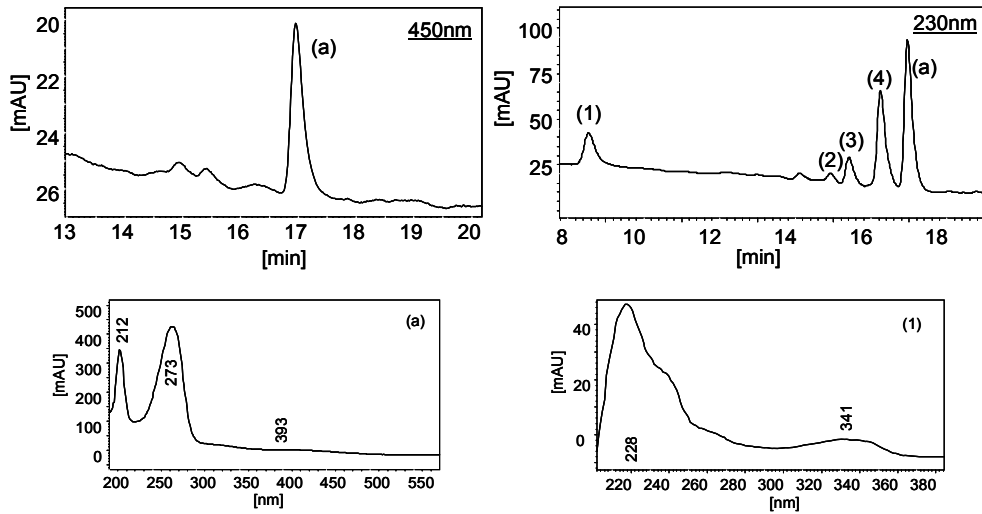
*Micrococcus luteus*

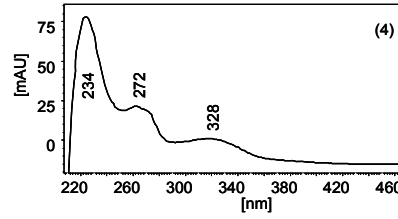
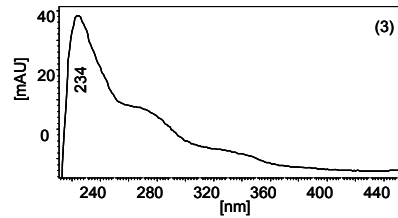
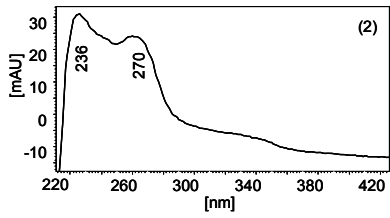


*Enterobacter agglomerans*

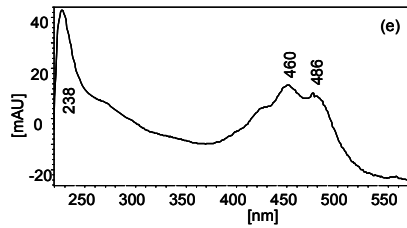
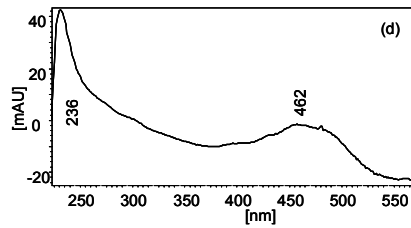
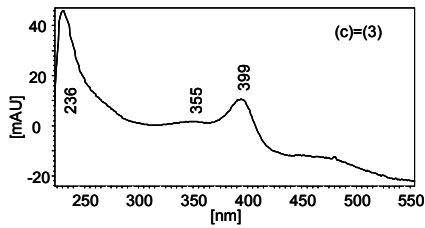
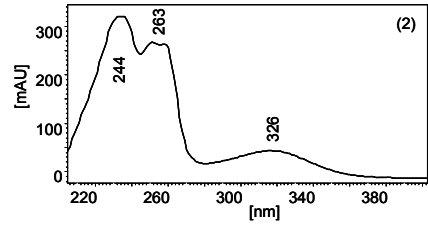
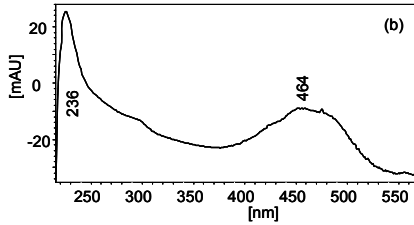
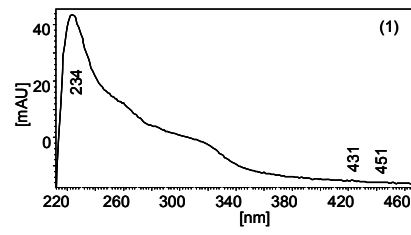
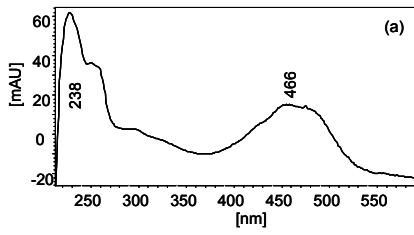
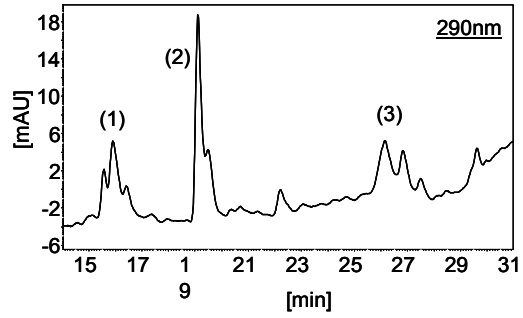
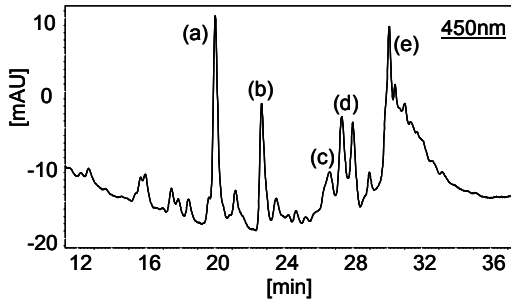


*Pseudomonas aeruginosa*





*Rhodococcus equi*



## 9.4 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Dresden , 19.02. 2009

Philipp Kaiser



## Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf in der online Version nicht mit veröffentlicht.