



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Vergleich der Kultivierungsbedingungen auf die  
Inhaltsstoffe von *Actinoalloteichus hymeniacidonis*“

verfasst von / submitted by

Vanessa Krainz

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn



## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meiner Betreuerin Frau ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn und bei Frau Andrea Lubich für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes und des interessanten Themas, sowie für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre während der praktischen Arbeit bedanken. Bei jedem Problem standen sie mir sofort mit Rat und Tat zur Seite und haben dadurch maßgeblich zum Gelingen meiner Diplomarbeit beigetragen. Ich werde mich gerne an die Zeit zurück erinnern.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Martin Zehl für die Vermessung meiner Proben und die Auswertung der MS-Spektren.

Meinen Eltern, Anita und Johann Krainz, möchte ich ganz besonders für die emotionale und finanzielle Unterstützung in den vergangenen Jahren danken, ohne diese mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

**DANKE**



# Inhaltsverzeichnis

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                       | <b>1</b>  |
| <b>2. ABSTRACT.....</b>                                               | <b>2</b>  |
| <b>3. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....</b>                         | <b>3</b>  |
| 3.1 MARINE MIKROORGANISMEN.....                                       | 3         |
| 3.2 <i>ACTINOALLOTEICHUS HYMENIACIDONIS SP. NOV.</i> .....            | 5         |
| 3.3 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....                             | 6         |
| <b>4. MATERIAL.....</b>                                               | <b>7</b>  |
| 4.1 AUSGANGSMATERIALIEN.....                                          | 7         |
| 4.2 LÖSUNGSMITTEL UND REAGENZIEN .....                                | 9         |
| <b>5. METHODEN .....</b>                                              | <b>10</b> |
| 5.1 CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN .....                                 | 11        |
| 5.1.1 <i>Flash Chromatographie (FC)</i> .....                         | 11        |
| 5.1.2 <i>Säulenchromatographie (SC)</i> .....                         | 12        |
| 5.1.3 <i>Analytische High Performance Liquid Chromatography</i> ..... | 14        |
| 5.1.4 <i>Preparative High Performance Liquid Chromatography</i> ..... | 16        |
| 5.1.5 <i>Gaschromatographie (GC)</i> .....                            | 17        |
| 5.2 STRUKTURAUFKLÄRUNG .....                                          | 17        |
| 5.2.1 <i>Liquid Chromatography – Massspectrometry (LC-MS)</i> .....   | 17        |
| 5.2.2 <i>Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)</i> .....         | 18        |
| <b>6. ERGEBNISSE.....</b>                                             | <b>19</b> |
| 6.1 AUFARBEITUNG DES EXTRAKTES MEOH_Y.....                            | 19        |
| 6.1.1 <i>Isolierung der Substanz A</i> .....                          | 21        |
| 6.1.2 <i>Isolierung der Substanzen E-F</i> .....                      | 22        |
| 6.1.3 <i>Identifizierung von Substanz F</i> .....                     | 22        |
| 6.1.4 <i>Identifizierung von Substanz E</i> .....                     | 22        |
| 6.1.5 <i>Isolierung der Substanzen G-J</i> .....                      | 24        |
| 6.1.6 <i>Identifizierung der Substanzen G-J</i> .....                 | 24        |
| 6.2 AUFARBEITUNG DES EXTRAKTES ACETON_Y.....                          | 26        |

|                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.2.1 Isolierung der Substanzen aus dem Extrakt Aceton_Y .....                      | 27         |
| 6.2.2 Isolierung von Substanz L .....                                               | 27         |
| 6.2.3 Identifizierung von Substanz L.....                                           | 27         |
| 6.2.4 Isolierung von Substanz O .....                                               | 30         |
| 6.2.5 Identifizierung von Substanz O.....                                           | 30         |
| 6.2.6 Isolierung von Substanz W .....                                               | 32         |
| 6.2.7 Identifizierung von Substanz W.....                                           | 32         |
| 6.2.8 Isolierung und Identifizierung der Substanzen K, M, N, P, V, Y und Z.....     | 34         |
| 6.3 AUFARBEITUNG DES EXTRAKTES Z_Y .....                                            | 36         |
| 6.4 AUFARBEITUNG VON FRAKTION C_25 .....                                            | 37         |
| 6.4.1 Isolierung der Substanzen Q und R.....                                        | 39         |
| 6.4.2 Identifizierung von Substanz Q.....                                           | 40         |
| 6.4.3 Identifizierung von Substanz R .....                                          | 42         |
| 6.4.4 Isolierung der Substanzen S1 und S2.....                                      | 42         |
| 6.4.5 Identifizierung von Substanz S1 .....                                         | 43         |
| 6.4.6 Identifizierung von Substanz S2 .....                                         | 44         |
| 6.5 AUFARBEITUNG VON FRAKTION G_100 .....                                           | 46         |
| 6.5.1 Isolierung der Substanz T .....                                               | 47         |
| 6.5.2 Identifizierung von Substanz T .....                                          | 47         |
| 6.6 ÜBERSICHT DER ISOLIERTEN UND IDENTIFIZIERTEN SUBSTANZEN AUS DEN EXTRAKTEN ..... | 50         |
| <b>7. DISKUSSION.....</b>                                                           | <b>51</b>  |
| <b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                                                | <b>53</b>  |
| <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>                                                   | <b>I</b>   |
| <b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>                                                     | <b>III</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|       |                                                                         |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|
| ACN   | Acetonitril                                                             |
| AH    | <i>Actinoalloteichus hymeniacidonis sp. nov.</i> (Zhang H. et al, 2006) |
| CAD   | Charged Aerosol Detector                                                |
| DCM   | Dichlormethan                                                           |
| dest. | destilliert                                                             |
| DKP   | Diketopiperazin                                                         |
| ELSD  | Evaporative Light Scattering Detector                                   |
| ESI   | Elektronensprayionisation                                               |
| eV    | Elektronenvolt                                                          |
| FC    | Flash Chromatographie                                                   |
| GC    | Gaschromatographie                                                      |
| HPLC  | High Performance Liquid Chromatography                                  |
| HR-MS | Hochauflösende Massenspektrometrie                                      |
| Ile   | Isoleucin                                                               |
| LC-MS | Liquid Chromatography MS                                                |
| Leu   | Leucin                                                                  |
| MeOH  | Methanol                                                                |
| MS    | Massenspektrometrie                                                     |
| Phe   | Phenylalanin                                                            |
| pHPLC | präparative HPLC                                                        |
| Pro   | Prolin                                                                  |
| RP    | Reversed Phase (Umkehrphase)                                            |
| Rt    | Retentionszeit                                                          |
| SC    | Säulenchromatographie                                                   |
| SF    | Sammelfraktion                                                          |
| TSB   | Trypticase Soy Broth                                                    |
| Tyr   | Tyrosin                                                                 |

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Marine Aktinobakterien sind eine wichtige Quelle neuer aktiver Naturstoffe, die als Wirkstoffe und Leitsubstanzen eingesetzt werden können. Vor allem die Gattung *Streptomyces* ist ein wichtiger Vertreter der wirkstoffproduzierenden Aktinobakterien.

*Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. ist ein streng aerober Actinomycete, welcher aus einem Schwamm isoliert wurde. Bisher ist wenig über die Inhaltsstoffe dieses Bakterium bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Produktion von Sekundärmetaboliten überprüft, welche aufgrund der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen vom Bakterium produziert wurden. Die Extrakte, welche nach Kultivierung des Mikroorganismus erhalten wurden, wurden mittels verschiedener chromatographischer Methoden aufgetrennt. Ziel war es, aus den komplexen Gemischen einzelne Substanzen zu isolieren und identifizieren.

Die Extrakte wurden durch Flash Chromatographie und weiter mittels Säulenchromatographie an Sephadex® LH20 in weniger komplexe Fraktionen aufgetrennt. Die Substanzen wurden durch analytische und präparative HPLC isoliert. Mit Hilfe der LC-MS und HR-MS konnten die Substanzen identifiziert werden. Auf diese Weise konnten Methylparaben, Daidzein und die cyclischen Dipeptide cyclo(Pro-Leu/Ile), cyclo(Phe-Leu/Ile), cyclo(Pro-Phe) und cyclo(Pro-Tyr) isoliert und identifiziert werden.

Methylparaben, sowie die cyclischen Dipeptide waren bereits in vorangegangenen Diplomarbeiten beschrieben worden. Bei Daidzein handelt es sich um eine Komponente aus dem Sojamehl, das im Kulturmedium enthalten war. Daidzein wurde im Extrakt angereichert, da das Bakterium während der Kultivierung geeignete Zuckerquellen aus Glykosiden erschloss.

## 2. ABSTRACT

Marine actinobacteria are an important source of new active natural products which can be employed as active compounds and lead compounds. Especially the genus *Streptomyces* is an important representative of the natural product producing actinobacteria.

*Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. is a strictly aerobic actinomycete, which was isolated from a sponge. Little is known about the compounds in these bacteria. The main focus of this diploma thesis was the investigation of the production of secondary metabolites, which were produced by the bacteria under different culture conditions. The extracts, which were available after culture of the microorganism in different media, were fractionated by various chromatographic methods. The aim was to isolate and identified individual substances from complex mixtures.

The extracts were fractionated by flash chromatography and column chromatography on Sephadex® LH20 in less complex fractions. The substances were isolated using analytical HPLC and preparative HPLC. Via LC-MS and HR-MS the substances were identified. This way methylparaben, daidzein and the cyclic dipeptides cyclo(Pro-Leu/Ile), cyclo(Phe-Leu/Ile), cyclo(Pro-Phe) and cyclo(Pro-Tyr) were elucidated.

Methylparaben and the cyclic dipeptides had already been described in previous diploma theses. Daidzein is a component of the soybean meal included in the culture medium. Daidzein was enriched in the extract, because during cultivation the bacterium cleaved sugars from glycosides available.

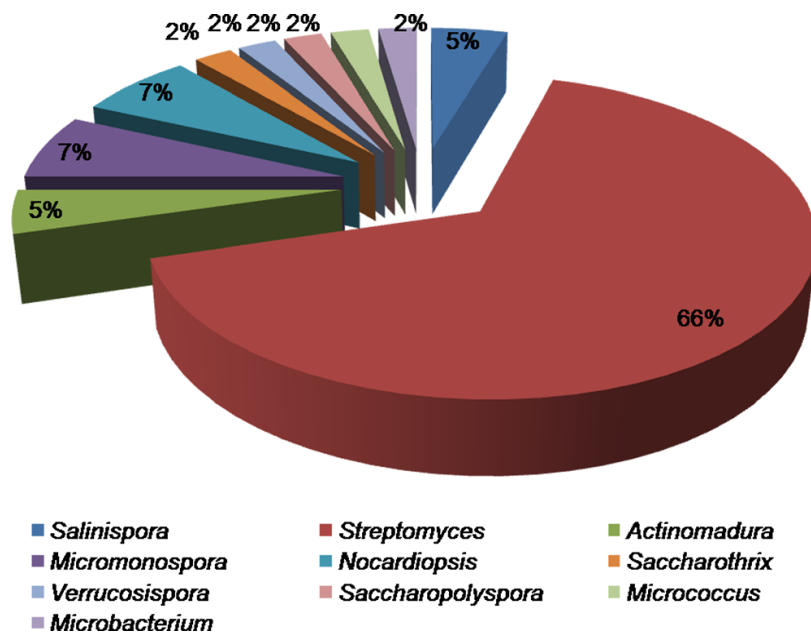
### 3. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

#### 3.1 Marine Mikroorganismen

Das Meer bedeckt mehr als 70% der Erdoberfläche (Subramani R. et al., 2012). Von der gesamten Meeresoberfläche sind lediglich 7-8% Küstengebiet und die restlichen 92-93% Tiefsee, von denen ca. 60% mehr als 2000m tief sind. Die Tiefsee ist durch eine einzigartige und extreme Umgebung, wie einem hohen Druck, niedrigen Temperaturen, Mangel an Licht und variable Salz- und Sauerstoffkonzentrationen, gekennzeichnet. Obwohl die geographische Fläche der Tiefsee groß ist, sind das Wissen, Verständnis und Studien über die Tiefseemikroorganismen dürftig (Manivasagan P. et al., 2014).

In einigen marinen Ökosystemen, wie Tiefseeboden und Korallenriffen dürfte die biologische Vielfalt höher sein, als in den tropischen Regenwäldern (Manivasagan P. et al., 2013). Marine Ökosysteme bestehen aus taxonomisch und biologisch diversen Makro- und Mikroorganismen, die einzigartige physiologische und strukturelle Eigenschaften aufweisen, damit sie unter extremem Druck, Salinität und Temperatur überleben. Viele Meeresmikroorganismen besitzen die Fähigkeit, Sekundärstoffe mit therapeutischem Potential zu produzieren, welche unter terrestrischen Vertretern nicht zu beobachten sind (Abdelmohsen U.R. et al., 2014). Viele andere marine Organismen sind immobile Weichtiere. Somit fehlt ihnen oft eine physikalische Abwehrfunktion. Sie schützen sich chemisch durch die Produktion von Sekundärmetaboliten gegen Angriffe von Feinden aus ihrer Umgebung. Die Substanzen sollen abschreckend, abwehrend oder abtötend wirken (Ebada S. et al., 2008). Derivate aus marinen Mikroorganismen bleiben eine wichtige Quelle für die Entwicklung neuer Arzneistoffe (Jensen P. et al., 2004).

Unter den verschiedenen Gattungen der Aktinobakterien sind *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Marinispora*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces* und *Verrucosipora* die wichtigsten Produzenten von bioaktiven Naturstoffen. Für Sekundärmetaboliten der marinen Aktinobakterien sind antimikrobielle, antikanzerogene, antivirale, insektizide und enzymhemmende Wirkungen nachgewiesen (Manivasagan P. et al., 2014).



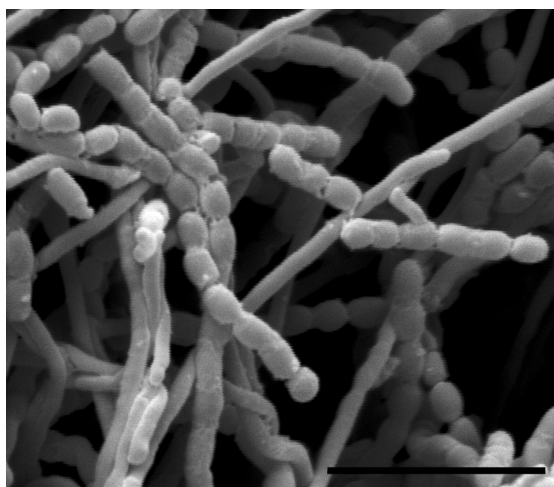
**Abbildung 1:** Anteil der auf Sekundärstoffe untersuchten Arten von Aktinobakterien die mit marinen Organismen assoziiert sind (Valliappan K. et al., 2014).

### 3.2 *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov.

*Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. wurde aus *Hymeniacidon perle* isoliert, einem marinen Schwamm aus dem Dachan Riff in China. Dabei handelt es sich um einen grampositiven, streng aeroben Aktinomyceten. Er bildet grauschwarz verzweigte, nicht-fragmentierte vegetative Hyphen und produziert schwarze Pigmente (Zhang H. et al., 2006; Abdelmohsen U.R. et al., 2014).

Schwämme gehören zu den ältesten vielzelligen Tieren mit Fossilien aus dem Präkambrium, welche tropische Riffe, aber auch die polaren Breiten, die Tiefsee sowie Süßwasserseen und Flüsse bewohnen (Abdelmohsen U.R. et al., 2014). Vielzellige marine Schwämme beherbergen oft dichte und vielfältige mikrobielle Gemeinschaften, welche komplexe Symbiosen repräsentieren. Aktinobakterien werden häufig in Verbindung mit Schwämmen gefunden (Sun W. et al., 2015).

Das Bakterium ist bereits in einer vorangegangenen Dissertation (Lubich A., in Vorbereitung) sowie Diplomarbeiten genauer auf seine Inhaltsstoffe untersucht worden. Es wurden Sekundärmetaboliten aus Extrakten des Bakteriums isoliert und identifiziert. Zu den identifizierten Strukturen zählen 1-Methylthymine, Methylparaben, cyclo(Phe-Pro) und Daidzein (Ayyildiz Y., 2015), sowie N-(2-Phenylacetyl)-phenylalaninmethylester, N-Pyroglutamyl-phenylalaninmethylester und die zyklischen Dipeptide cyclo(D-Pro-L-Tyr), cyclo(D-Pro-L-Leu), cyclo(L-Pro-L-Leu) (Danhel L., 2016).



**Abbildung 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakterienstammes HPA177 T , kultiviert auf Hefextrakt/Malzextrakt für 14 Tage bei 28 °C. Bar, 5 µm (Zhang H. et al., 2006).

### 3.3 Problemstellung und Zielsetzung

Marine Aktinobakterien wurden als potentielle Quelle bioaktiver Substanzen identifiziert. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass sie eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten produzieren (Manivasagan P. et al., 2013).

Es hat sich gezeigt, dass marine Aktinobakterien in der Lage sind, zahlreiche Sekundärmetabolite wie Polyketide, Isoprenoide, Phenazine, Peptide, Indolcarbazole, Sterine und andere Substanzen zu synthetisieren. Diese Verbindungen zeigten antikanzerogene, antimikrobielle, antiparasitäre, neurologische, antioxidative und anti-HIV-Aktivität (Valliappan K. et al., 2014).

Aktinomyceten sind dafür bekannt, aromatische Polyketide des Typ-II Polyketid-Weg als Abwehrstoffe zu erzeugen. Solche aromatische Polyketid-Verbindungen haben ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten und einige Substanzen auch klinische Bedeutung. Anthrazykline und Tetracycline wie Doxorubicin (antineoplastisch) und Tetracyclin (antibiotisch) werden seit Jahrzehnten als Medikamente eingesetzt. Darüber hinaus sind viele dieser Verbindungen vielversprechende Wirkstoffkandidaten (Sun W. et al., 2015).

Bisher wurden einzelne, strukturell neue, aromatische Polyketide aus Schwamm-assoziierten Aktinomyceten wie *Saccharopolyspora* und *Streptomyces*-Stämmen isoliert. Die Produktion von aromatischen Polyketiden ist aber nicht nur auf *Saccharopolyspora* und *Streptomyces* beschränkt (Sun W. et al., 2015).

*Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. wurde aufgrund folgender Kriterien für weitere Untersuchungen herangezogen: (1) die Sekundärmetaboliten wurden bisher kaum untersucht, (2) der Stamm ist nicht pathogen, (3) gut charakterisiert und (4) kommerziell erhältlich (Ayyildiz Y., 2015).

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung neuer Sekundärmetabolite aus *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. und deren Strukturaufklärung.

## 4. MATERIAL

### 4.1 Ausgangsmaterialien

Zur Verfügung standen eine Reihe von Extrakten und Fraktionen (*Tabelle 2*, S.8) von *Actinoalloteichus hymeniacidonis*, die in unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren. Es handelte sich um Y-Medium, C-Medium und G-Medium (*Tabelle 1*). Ziel war, je nach Bedingungen die Produktion möglichst unterschiedlicher Sekundärmetaboliten anzukurbeln.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Medien (Lubich A., in Vorbereitung)

| <b>Y-Medium: 5333</b><br><b>Zusammensetzung (g/l)</b>     | <b>C-Medium: 5321</b><br><b>Zusammensetzung (g/l)</b> | <b>G-Medium: 5288</b><br><b>Zusammensetzung (g/l)</b> |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Hefeextrakt ( <u>Y</u> east) 4,00                         | Pepton 10,00                                          | <u>G</u> lycerol (85%) 17,60                          |
| Lösliche Stärke 15,00                                     | Glucose 20,00                                         | Sojamehl 10,00                                        |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O 1,31 | <u>C</u> aCO <sub>3</sub> 2,00                        | NaCl 5,00                                             |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 1,00               | CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 0,001          | CaCO <sub>3</sub> 1,00                                |
| Wasser 1,00 L                                             | Wasser 1,00 L                                         | CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 0,001          |
|                                                           |                                                       | Wasser 1,00 L                                         |

Der Stamm *Actinoalloteichus hymeniacidonis* wurde von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Dieses Bakterium wurde im Rahmen einer Dissertation (Lubich A., in Vorbereitung) kultiviert. Für jedes Medium wurden jeweils zwölf Kulturen angesetzt. Dazu wurden je 500 ml Medium mit 15 g Amberlite XAD-16 Harz in einem 2 Liter Schikanekolben mit 25 ml einer Flüssigkultur des Bakteriums in Trypticase Soy Broth angeimpft. Bei 250 U/min und 30°C wurden die Kulturen für 20 Tage inkubiert. Das Harz wurde entfernt, mit H<sub>2</sub>O dest. gewaschen, mit 250 ml MeOH über Nacht eluiert und daraus der MeOH-Extrakt gewonnen. Das Harz wurde in einem zweiten Extraktionsschritt mit 250 ml Aceton über Nacht eluiert und daraus der Aceton-Extrakt gewonnen. Das Lösungsmittel wurde nach Abfiltrieren des Harzes unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Das Medium mit den Zellen wurde bei 10.000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen erhalten. Aus den Zellen wurde im weiteren Verlauf der Zellextrakt hergestellt.

Für die Herstellung des Zellextraktes wurden die Zellen des Bakteriums in einem 2 Liter Erlenmeyerkolben mit 1 Liter einer 1:1 Mischung DCM:MeOH versetzt und die Zellen für 15 Minuten mittels Ultraturax aufgebrochen und extrahiert. Anschließend wurde durch einen Faltenfilter filtriert. Der Niederschlag wurde nochmals mit einer Mischung von DCM:MeOH (1:1) versetzt und die Zellen für weitere 15 Minuten am Ultraturax aufgebrochen und extrahiert. Die Mischung wurde erneut über den zuvor verwendeten Faltenfilter filtriert. Beide Filtrate wurden in einem Rundkolben vereinigt und das restliche Filtrat eingedampft.

Die MeOH-Extrakte des C- und G-Mediums wurden während einer Dissertation (Lubich A., in Vorbereitung) über die Flash Chromatographie aufgearbeitet, wobei je drei Fraktionen mit unterschiedlichen MeOH-Konzentrationen (5%, 25% und 100%) gewonnen wurden. Vier dieser Fraktionen (C\_5, C\_100, G\_5, G\_25) wurden im Rahmen der Dissertation behandelt. Zwei der Fraktionen (C\_25, G\_100) wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit behandelt.

Für die vorliegende Arbeit standen ein Zellextrakt, ein MeOH-Extrakt und ein Acetonextrakt aus dem Medium Y, sowie eine MeOH-Fraktion aus dem C-Medium und eine MeOH-Fraktion aus dem G-Medium zur Verfügung (*Tabelle 2*).

**Tabelle 2:** Ausgangsmaterial

| Bezeichnung | Ausgangsmaterial   | Medium | Ausgangsmenge |
|-------------|--------------------|--------|---------------|
| MeOH_Y      | MeOH-Extrakt       | Y      | 8,6 g         |
| Aceton_Y    | Aceton-Extrakt     | Y      | 4,5 g         |
| Z_Y         | Zellextrakt        | Y      | 0,4 g         |
| C_25        | MeOH-Fraktion 25%  | C      | 2,2 g         |
| G_100       | MeOH-Fraktion 100% | G      | 1,7 g         |

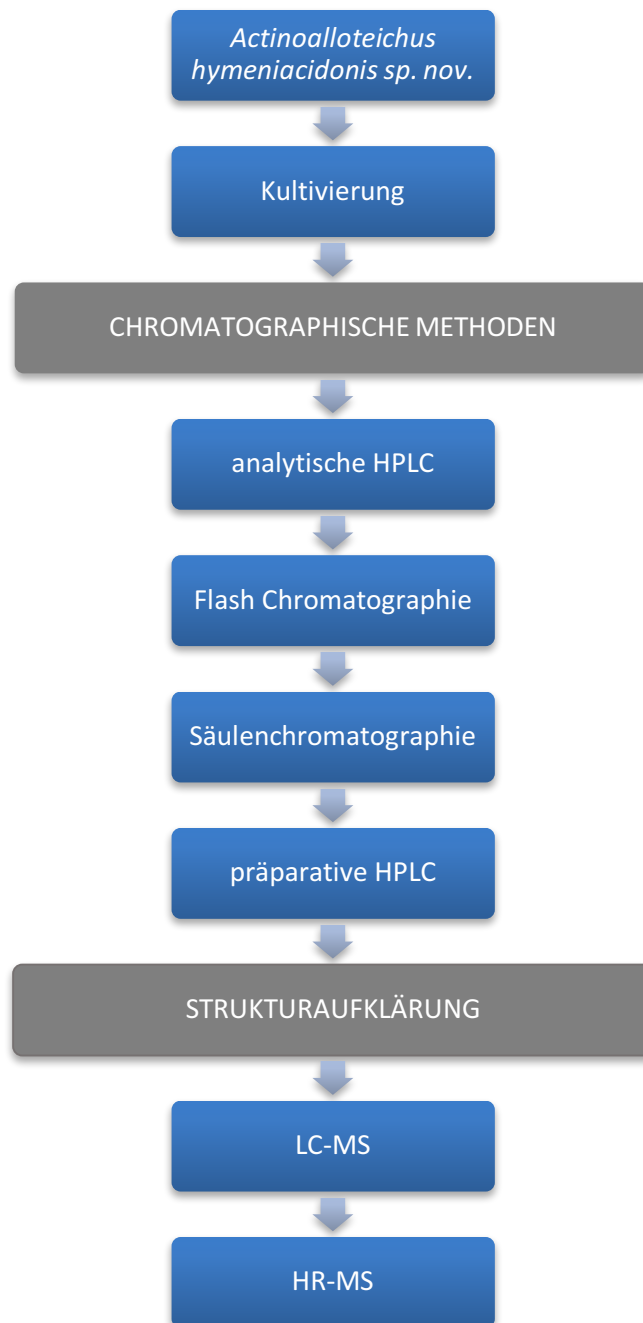
## 4.2 Lösungsmittel und Reagenzien

Die Lösungsmittel H<sub>2</sub>O und Acetonitril, welche als mobile Phase der HPLC dienten, standen in HPLC-Qualität zur Verfügung, ebenso MeOH, welches als mobile Phase der Flash Chromatographie eingesetzt wurde.

Folgende Adsorbentien und Hilfsstoffe wurden eingesetzt: Sephadex® LH 20 (Sigma, Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland), Seesand (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland), Kieselgel 60 silanisiert (Korngröße 0.063 – 0.200 mm, Merck®, Darmstadt, Deutschland).

## 5. METHODEN

Folgende Methoden wurden für die Isolierung und Identifizierung der Sekundärmetaboliten von *Actinoalloteichus hymeniacidonis* aus den Extrakten und Fraktionen herangezogen:



**Abbildung 3:** Verwendete Methoden für die Isolierung und Identifizierung von Substanzen aus *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov.

## 5.1 Chromatographische Methoden

Folgende chromatographischen Methoden wurden für die Isolierung der Substanzen herangezogen:

### 5.1.1 Flash Chromatographie (FC)

Die Auftrennung der Extrakte erfolgte an einer PuriFlash 4250 Anlage (Interchim, Frankreich). Die Fraktionierungen mittels Flash Chromatographie wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 3:** Bedingungen der Flash Chromatographie für den Extrakt MeOH\_Y

|              |                                                                                                           |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mobile Phase | A: H <sub>2</sub> O dest.<br>B: MeOH                                                                      |
| Trennsäule   | PF-DLE/40G PuriFlash Dry Load Column, 75 ml, 27 x 130 mm                                                  |
| Flussrate    | 26 ml/min                                                                                                 |
| Gradient     | 10 min – 20 min 5% MeOH<br>20 min – 30 min 25% MeOH<br>30 min – 40 min 100% MeOH                          |
| Dryload      | Verreibung von 5,5 g Extrakt mit 8,0 g RP-C18 (Kieselgel 60 silanisiert, Korngröße 0,063-0,2 mm (Merck®)) |
| Detektion    | 190 nm, 205 nm, 254 nm, Scan 200-600 nm                                                                   |

Für die Fraktionierung von MeOH\_Y mittels Flash Chromatographie waren drei Durchgänge erforderlich, in denen insgesamt eine Menge von 5,5 g aufgetrennt wurde. Es entstanden drei Fraktionen unterschiedlicher Konzentration:

**Tabelle 4:** Fraktionen von MeOH\_Y

| MeOH-Konzentration | Fraktion | Ausbeute |
|--------------------|----------|----------|
| 5%                 | Y_5      | 3,3 g    |
| 25%                | Y_25     | 1,7 g    |
| 100%               | Y_100    | 2,0 g    |

**Tabelle 5:** Bedingungen der Flash Chromatographie für den Extrakt Aceton\_Y

|                |                                                                                                           |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Trennsäule     | PURIFLASH COLUMN 15 C18 HQ – 55,0 g                                                                       |
| Mobile Phase   | A: H <sub>2</sub> O dest.<br>B: ACN                                                                       |
| Flussrate      | 26 ml/min                                                                                                 |
| Gradient       | 2% - 40% CAN in 38 min                                                                                    |
| Dryload        | Verreibung von 1,8 g Extrakt mit 5,0 g RP-C18 (Kieselgel 60 silanisiert, Korngröße 0,063-0,2 mm (Merck®)) |
| Detektion      | 190 nm, 254 nm, Scan 200-600 nm                                                                           |
| Fraktionsgröße | 13 ml                                                                                                     |

Die gesamte Menge von 1,8 g Aceton\_Y wurde in zwei Durchgängen fraktioniert.

### 5.1.2 Säulenchromatographie (SC)

Die einzelnen Fraktionen der Flash Chromatographie wurden mittels Sephadex® nach dem Prinzip der Size Exclusion Chromatography (SEC) weiter aufgetrennt.

Die Säulen mit 50 cm Höhe und Durchmessern zwischen 0,5 – 2 cm wurden mit im Fließmittel gequollenem Sephadex® befüllt. Hierauf wurde die Probe aufgetragen, mit Seesand bedeckt und die Säule mit H<sub>2</sub>O dest. oder MeOH eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 5 – 7.5 ml, die mit Hilfe eines automatischen Fraktionensammlers aufgefangen wurden. Jede fünfte Fraktion wurde an der HPLC analysiert.

Die Fraktionierungen mittels SC wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 6:** Bedingungen von SC1 und SC2

|                   |                         |
|-------------------|-------------------------|
| Stationäre Phase  | Sephadex® LH20 (Sigma®) |
| Mobile Phase      | H <sub>2</sub> O dest.  |
| Füllhöhe          | 50 cm                   |
| Säulendurchmesser | 2 cm                    |
| Flussrate         | 1,5 ml/min              |
| Fraktionsgröße    | 7,5 ml                  |

Insgesamt waren je zwei Durchgänge notwendig, um die gesamte Menge von 4,0 g der Fraktion Y\_5 und 2,2 g der Fraktion C\_25 (*Tabelle 2, S.8*) aufzutragen. Die Fraktionen wurden in wässriger Lösung aufgetragen.

**Tabelle 7:** Bedingungen von SC3

|                    |                         |
|--------------------|-------------------------|
| Stationäre Phase   | Sephadex® LH20 (Sigma®) |
| Mobile Phase       | H <sub>2</sub> O dest.  |
| Füllhöhe           | 50 cm                   |
| Säulendurchmesser  | 2 cm                    |
| Aufgetragene Menge | 0,81 g                  |
| Flussrate          | 1,5 ml/min              |
| Fraktionsgröße     | 5 ml                    |

**Tabelle 8:** Bedingungen von SC4 und SC5

|                   |                         |
|-------------------|-------------------------|
| Stationäre Phase  | Sephadex® LH20 (Sigma®) |
| Mobile Phase      | MeOH dest.              |
| Füllhöhe          | 50 cm                   |
| Säulendurchmesser | 2 cm                    |
| Flussrate         | 1,5 ml/min              |
| Fraktionsgröße    | 7,5 ml                  |

Insgesamt waren zwei Durchgänge notwendig, um die gesamte Menge von 2,0 g der Fraktion Y\_100 aufzutragen. Von Fraktion G\_100 wurde 1,0 g in einem Durchgang fraktioniert. Die Fraktionen wurden in 1 ml Methanol gelöst und aufgebracht.

**Tabelle 9:** Bedingungen von SC6

|                    |                         |
|--------------------|-------------------------|
| Stationäre Phase   | Sephadex® LH20 (Sigma®) |
| Mobile Phase       | H <sub>2</sub> O dest.  |
| Füllhöhe           | 50 cm                   |
| Säulendurchmesser  | 1,5 cm                  |
| Aufgetragene Menge | 57,51 mg                |
| Flussrate          | 1,5 ml/min              |
| Fraktionsgröße     | 5 ml                    |

**Tabelle 10:** Bedingungen von SC7 und SC8

|                   |                         |
|-------------------|-------------------------|
| Stationäre Phase  | Sephadex® LH20 (Sigma®) |
| Mobile Phase      | H <sub>2</sub> O dest.  |
| Füllhöhe          | 50 cm                   |
| Säulendurchmesser | 0,5 cm                  |
| Flussrate         | 0,3 ml/min              |
| Fraktionsgröße    | 5 ml                    |

### 5.1.3 Analytische High Performance Liquid Chromatography

**Tabelle 11:** Geräteparameter analytische HPLC

|             |                                                                                                                             |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Entgaser    | Shimadzu DGU-20A <sub>5</sub> prominence degasser                                                                           |
| Pumpe       | Shimadzu LC-20AD prominence liquid chromatograph                                                                            |
| Autosampler | Shimadzu SIL-20AC prominence autosampler                                                                                    |
| Controller  | Shimadzu CBM-20A prominence communication bus module                                                                        |
| Detektoren  | Shimadzu SPD-M20A prominence diode array detector<br>Shimadzu ELSD-LT low temperature evaporative light scattering detector |
| Säulenofen  | Shimadzu CTO-20AC prominence column oven                                                                                    |

Für die Überprüfung der Reinheit der Substanzen wurde die Analyse mittels Charged Aerosol Detector (CAD) herangezogen. Bei ausreichender Reinheit der isolierten Substanzen, konnten diese für weitere Strukturaufklärungsschritte herangezogen werden.

**Tabelle 12:** Geräteparameter analytische HPLC mit Charged Aerosol Detector (CAD)

|             |                                                          |
|-------------|----------------------------------------------------------|
| Pumpe       | UltiMate 3000 RS Pump                                    |
| Autosampler | UltiMate 3000 RS Autosampler                             |
| Controller  | UltiMate 3000                                            |
| Detektoren  | UltiMate 3000 RS Diode Array Detector<br>Corona Ultra RS |
| Ofen        | UltiMate 3000 RS Column Compartment                      |

Für die Analysen wurde jeweils 1 µl der Fraktion mit 19 µl MeOH in einem HPLC-Vial verdünnt.

Die Analysen mittels HPLC wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 13:** Bedingungen der HPLC-Analyse 1

|                   |                                                               |
|-------------------|---------------------------------------------------------------|
| Stationäre Phase  | Synergy 4u Hydro-RP 80A, 150 x 3mm, 4 µm (Phenomenex®)        |
| Mobile Phase      | A: H <sub>2</sub> O dest.<br>B: ACN                           |
| Flussrate         | 0,4 ml/min                                                    |
| PDA               | 190 – 800 nm                                                  |
| Ofentemperatur    | 25°C                                                          |
| Injektionsvolumen | 10 µL                                                         |
| Gradient          | 0% ACN isokratisch für 5 Minuten<br>0-95% ACN in 42,5 Minuten |
| Equilibrierung    | 10 min                                                        |
| Detektion         | 190 nm                                                        |

**Tabelle 14:** Bedingungen der HPLC-Analyse 2

|                   |                                                 |
|-------------------|-------------------------------------------------|
| Stationäre Phase  | LiChrospher 100 RP18, 250 x 4 mm, 5 µm (Merck®) |
| Mobile Phase      | A: H <sub>2</sub> O dest.<br>B: ACN             |
| Flussrate         | 0,4 ml/min                                      |
| PDA               | 190 – 800 nm                                    |
| Ofentemperatur    | 25°C                                            |
| Injektionsvolumen | 10 µl                                           |
| Gradient          | 1% - 60% ACN in 59 Minuten                      |
| Equilibrierung    | 10 min                                          |
| Detektion         | 190 nm                                          |

Diese Methode wurde zur Analyse der Substanzen herangezogen, die mittels präparativer HPLC gesammelt aufgetrennt werden sollten.

### 5.1.4 Preparative High Performance Liquid Chromatography

Die präparative HPLC wurde für die Isolierung der Substanz T (s. Kapitel 6.5.1, S.47) herangezogen.

**Tabelle 15:** Geräteparameter der präparativen HPLC

|              |                                                      |
|--------------|------------------------------------------------------|
| Pumpe        | Shimadzu LC 8A preparative liquid chromatograph      |
| Autoinjector | Shimadzu SIL-AD <sub>VP</sub> auto sampler           |
| Controller   | Shimadzu CBM-20A prominence communication bus module |
| Detektor     | Shimadzu SPD-M20A prominence diode array detector    |

Die Isolierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 16:** Bedingungen der präparativen HPLC

|                     |                                                                              |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Stationäre Phase    | LiChrospher®, 250 x 25 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland)<br>Porengröße 5 µm |
| Mobile Phase        | A: H <sub>2</sub> O dest.<br>B: ACN                                          |
| Flussrate           | 15,5 ml/min                                                                  |
| Ofentemperatur      | 25°C                                                                         |
| Injektionsvolumen   | 100 – 1000 µl                                                                |
| Gradient            | 0 – 59 min: 1% - 60% ACN in 59 Minuten                                       |
| Equilibrierungszeit | 10 min                                                                       |
| Detektion           | 190 nm                                                                       |

Unter diesen Bedingungen wurden die Substanzen Q und R (s. Kapitel 6.4.1, S. 39) aus der Fraktion C\_25QR gesammelt. Es waren insgesamt drei Durchgänge notwendig, um die gesamte Menge von 42,3 mg aufzutrennen.

Für die Isolierung der Substanzen mittels präparativer HPLC musste die Flussrate über den Scale-up-Faktor angepasst werden.

$$f = \left(\frac{d_{prep}}{2}\right)^2 / \left(\frac{d_{analyt}}{2}\right)^2 = \left(\frac{25}{2}\right)^2 / \left(\frac{4}{2}\right)^2 = 39$$

Die Flussrate aus der analytischen HPLC wurde entsprechend dem Faktor f von 0,4 ml/min auf 15,5 ml/min erhöht.

### 5.1.5 Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie wurde für die Untersuchung von Substanz A (s. Kapitel 6.1.1, S. 21) herangezogen. Die Analyse erfolgte an einer GC-2010 Anlage (Shimadzu®).

**Tabelle 17:** Bedingungen der GC

|                    |                                                  |
|--------------------|--------------------------------------------------|
| Starttemperatur    | 50°C                                             |
| Temperaturgradient | 6°C pro min auf 270°C, 10 min bei 270°C isotherm |
| Injektionsvolumen  | 1 µl                                             |

### 5.2 Strukturaufklärung

Folgende Methoden wurden für die Identifizierung der Substanzen herangezogen:

#### 5.2.1 Liquid Chromatography – Massspectrometry (LC-MS)

Die LC-MS wurde herangezogen, um das Fragmentierungsmuster und die molekulare Masse der Substanzen zu ermitteln. Die Ionisation erfolgte über Elektrosprayionisation (EI).

**Tabelle 18:** Geräteparameter der LC-MS

|             |                                                            |
|-------------|------------------------------------------------------------|
| Gerät       | UltiMate 3000 Rapid Separation LC System                   |
| Controller  | UltiMate 3000 Dionex                                       |
| Pumpe       | UltiMate 3000 RS Dionex Pump                               |
| Autosampler | UltiMate 3000 RS Dionex Autosampler                        |
| Ofen        | UltiMate 3000 RS Dionex column compartment                 |
| Detektor    | UltiMate 3000 RS Dionex Dioden Array Detector 190 – 400 nm |

Für die Vermessung der Proben an der LC-MS wurde 1 µl jeder Fraktion entnommen und mit 19 µl MeOH verdünnt.

### 5.2.2 Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

Die Messungen wurden mit dem Massenspektrometer maXis HD ESI-Qq-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) durchgeführt.

Die HR-MS wurde für die Ermittlung der Summenformel, welche über das Programm Bruker Compass Data Analysis 4.2 ermittelt wurde, herangezogen. Dieses Programm basiert auf einer Massengenauigkeit von  $\Delta m/z \leq 2$  ppm und einem Isotopenmustervergleich. Auch das Fragmentierungsmuster wurde analysiert.

**Tabelle 19:** Methodenparameter der HR-MS

|                      |                           |
|----------------------|---------------------------|
| Kapillarspannung     | 2,0 – 4,0 kV              |
| Vernebelungsgas      | 0,4 bar (N <sub>2</sub> ) |
| Trockengasfluss      | 4,0 l/min                 |
| Trockengastemperatur | 200 °C                    |
| Messbereich          | 50 – 1550 m/z             |
| Flussrate der Probe  | 3 µl/min                  |

## 6. ERGEBNISSE

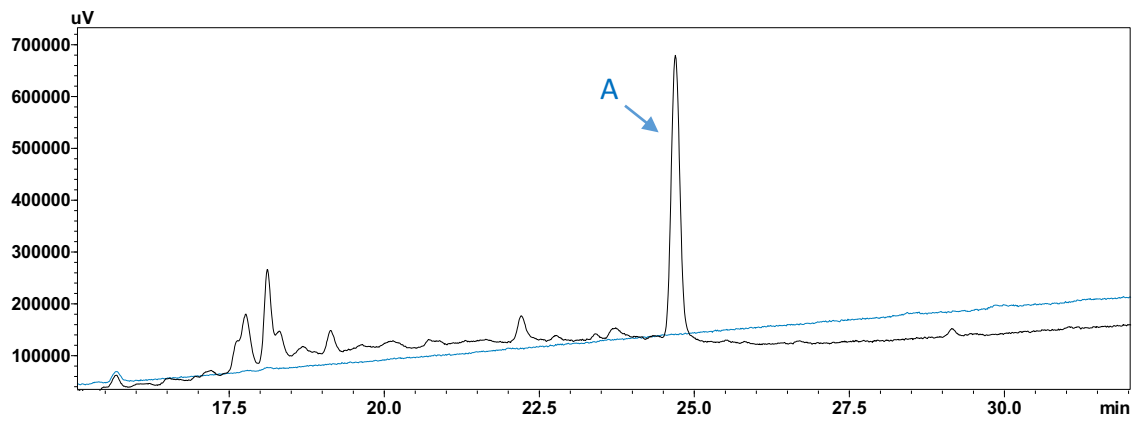
### 6.1 Aufarbeitung des Extraktes MeOH\_Y

MeOH\_Y (8,6 g) wurde mittels Flash Chromatographie (*Tabelle 3*, S.11) in drei Portionen aufgetrennt. Die Inhaltstoffe wurden zunächst mit 5%, anschließend mit 25% und zuletzt mit 100% von der Trennsäule (*Tabelle 3*, S.11) eluiert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurden die Fraktionen Y\_5 (3,3 g), Y\_25 (1,7 g) und Y\_100 (2,0 g) erhalten.

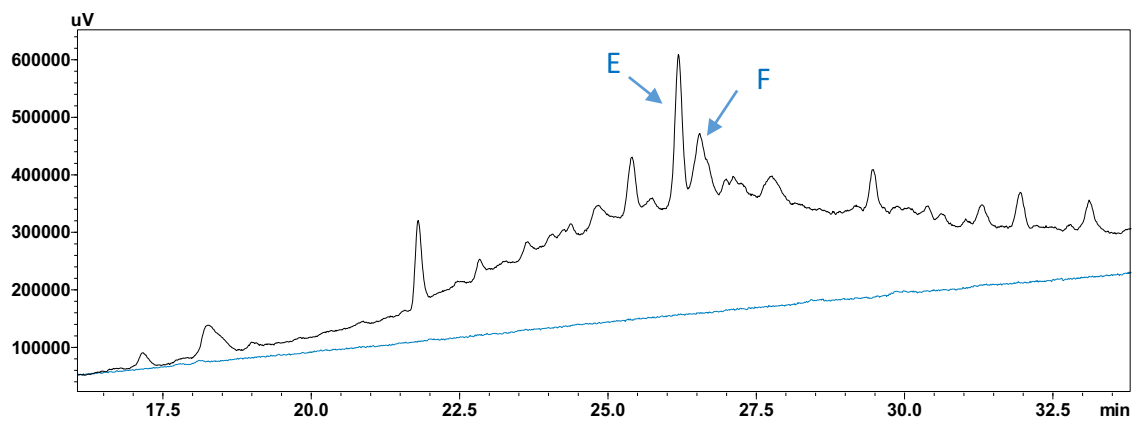
Die Chromatogramme der Fraktionen Y\_5 und Y\_100 zeigten Peaks der Substanzen A (*Abbildung 4*, S.20), E-F (*Abbildung 5*, S.20) und G-J (*Abbildung 6*, S.20). Im Chromatogramm von Y\_25 konnten keine Peaks detektiert werden und daher wurde diese Fraktion nicht zur weiteren Aufarbeitung herangezogen.

**Tabelle 20:** Retentionszeiten, UV-Maxima und UV-Minima der Substanzen A, E und G-J

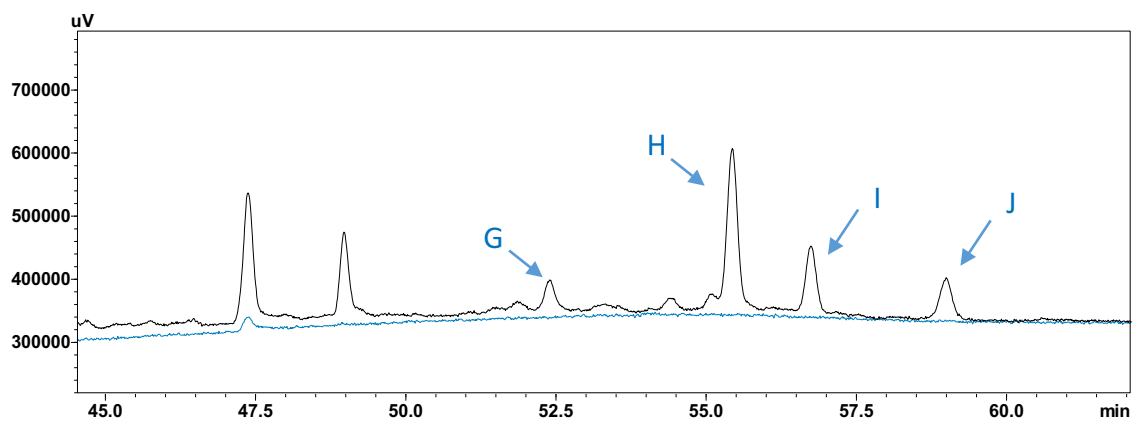
| Substanz | Retentionszeit (min) | UV-Maximum | UV-Minimum |
|----------|----------------------|------------|------------|
| A        | 24,6                 | 258        | 244        |
| E        | 26,2                 | 255        | 226        |
| F        | 26,5                 | < 200      | -          |
| G        | 52,4                 | < 200      | -          |
| H        | 55,4                 | < 200      | -          |
| I        | 56,8                 | < 200      | -          |
| J        | 59,0                 | < 200      | -          |



**Abbildung 4:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion Y\_5 (schwarz) und des Y-Mediums (blau) von 17,5 – 30,0 min bei 190 nm (Tabelle 13, S.15)



**Abbildung 5:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion Y\_100 (schwarz) und des Y-Mediums (blau) von 17,5 – 32,5 min bei 190 nm (Tabelle 13, S.15)



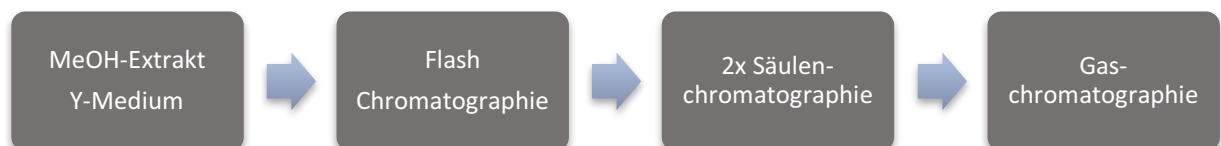
**Abbildung 6:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion Y\_100 (schwarz) und des Y-Mediums (blau) von 45 – 62,5 min bei 190 nm (Tabelle 13, S.15)

### 6.1.1 Isolierung der Substanz A

Die Substanz A konnte über eine HPLC-Analyse in der Fraktion Y\_5 detektiert werden. Aus diesem Grund wurde Y\_5 in weitere Fraktionen aufgetrennt.

Zur weiteren Auftrennung der Fraktion wurde die Säulenchromatographie (SC1) an Sephadex® eingesetzt (*Tabelle 6*, S. 12). Es wurden Fraktionen zu 7,5 ml gesammelt. Diese wurden mittels HPLC (*Tabelle 13*, S.15) analysiert und die Fingerprints der einzelnen Fraktionen verglichen. Die Fraktionen 51-74, die Substanz A enthielten, wurden vereinigt. Eine HPLC-Analyse der vereinigten Fraktionen zeigte, dass Substanz A als „Doppelpeak“ erschien und eine weitere Aufreinigung erforderlich war. Daher wurde eine weitere Säulenchromatographie (SC3) an Sephadex® durchgeführt (*Tabelle 7*, S.13). Bei der Kontrolle dieser Fraktionen konnte die Substanz in keiner detektiert werden. Auch mittels Gaschromatographie (*Tabelle 17*, S.17) war die stark riechende Substanz nicht mehr nachweisbar.

Aufgrund der Flüchtigkeit konnte Substanz A im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden.



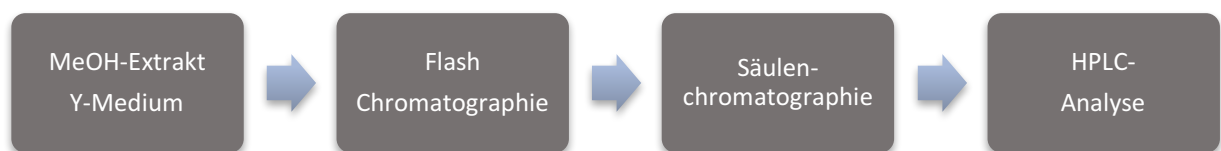
**Abbildung 7:** Schema der Isolierung von Substanz A

### 6.1.2 Isolierung der Substanzen E-F

Die Substanzen E-F konnten in der HPLC-Analyse in der Fraktion Y\_100 detektiert werden. Zur Isolierung der Komponenten wurde Fraktion Y\_100 mittels SC4 weiter aufgetrennt (*Tabelle 8*, S.13).

In der HPLC-Analyse der Fraktion Y\_100 wurde Substanz E bei einer Retentionszeit von 26,2 min (*Abbildung 5*, S.20) mit charakteristischem UV-Spektrum detektiert. Das UV-Spektrum zeigte ein Maximum bei 255 nm und ein Minimum bei 226 nm (siehe Anhang). Es bestand der Verdacht, dass es sich um Methylparaben handeln könnte, denn das UV-Spektrum stimmte mit jenem UV-Spektrum überein, welches bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Ayyildiz Y., 2015) beschrieben worden war.

Substanz F erschien in der HPLC-Analyse bei einer Retentionszeit von 26,5 min (*Abbildung 5*, S.20).



**Abbildung 8:** Schema der Isolierung von Substanz E

### 6.1.3 Identifizierung von Substanz F

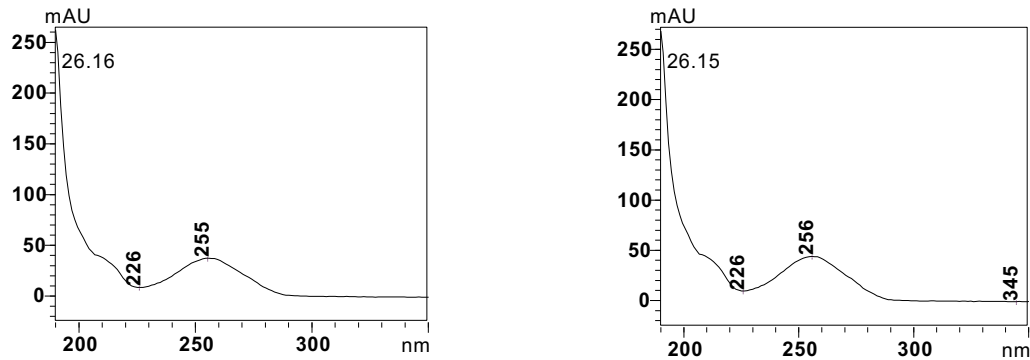
Substanz F konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der zu geringen Menge nicht isoliert und identifiziert werden.

### 6.1.4 Identifizierung von Substanz E

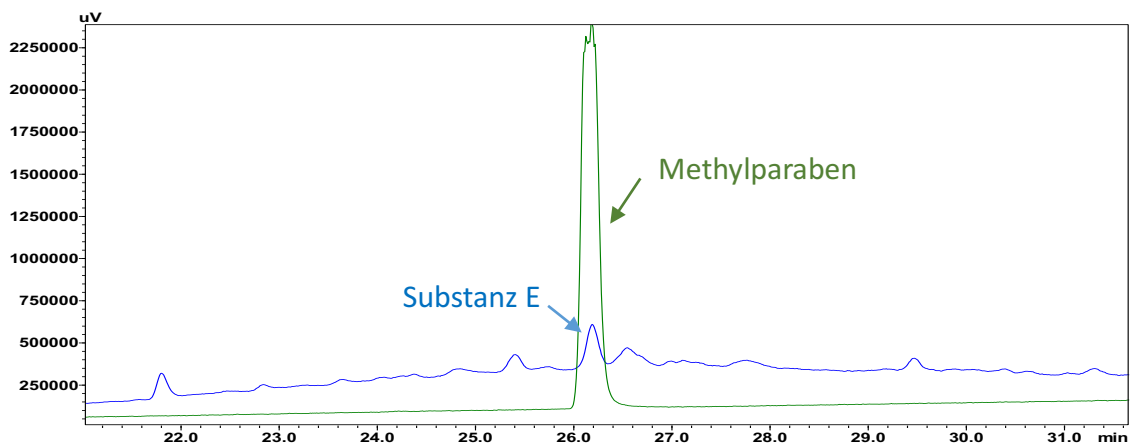
Um zu beweisen, dass es sich bei Substanz E um Methylparaben handelte, wurde Substanz E mit einer authentischen Referenz verglichen. Beide Substanzen wurden mittels HPLC analysiert. Die Retentionszeiten (*Abbildung 10*, S.23) von Substanz E (26,2 min) und

Methylparaben (26,2 min), sowie die UV-Spektren (Abbildung 9) in ihren Maxima und Minima stimmten sehr gut überein.

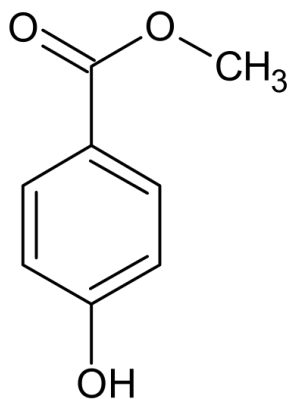
Substanz E konnte als Methylparaben identifiziert werden.



**Abbildung 9:** Vergleich der UV-Spektren von Substanz E (links) und Methylparaben (rechts)



**Abbildung 10:** HPLC-Vergleich der Substanz E und Methylparaben bei 190 nm



**Abbildung 11:** Methylparaben

<https://en.wikipedia.org/wiki/Methylparaben>, abgerufen am 24.08.2016

### 6.1.5 Isolierung der Substanzen G-J

Die Fraktion Y\_100 enthielt neben den Substanzen E und F auch die Substanzen G-J (*Abbildung 6*, S.20). Für eine Isolierung der Substanzen G-J wurde die Fraktion Y\_100 an einer Sephadex® Säule mittels SC4 (*Tabelle 8*, S.13) in zwei Durchgängen aufgetrennt. Mittels HPLC wurden die Fraktionen auf die Substanzen G-J überprüft. Jene Fraktionen mit übereinstimmenden Fingerprints wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

Um die Struktur der Substanzen aufzuklären, wurde die HR-MS herangezogen.



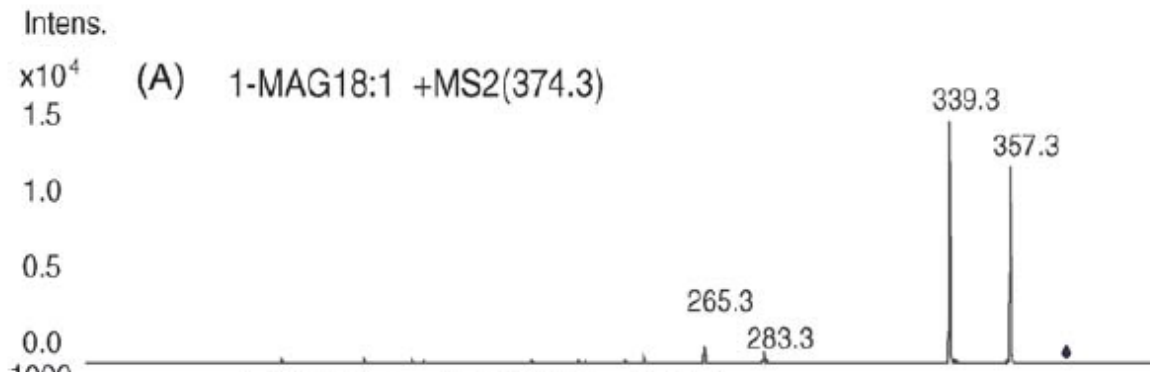
**Abbildung 12:** Schema der Isolierung der Substanzen G-J

### 6.1.6 Identifizierung der Substanzen G-J

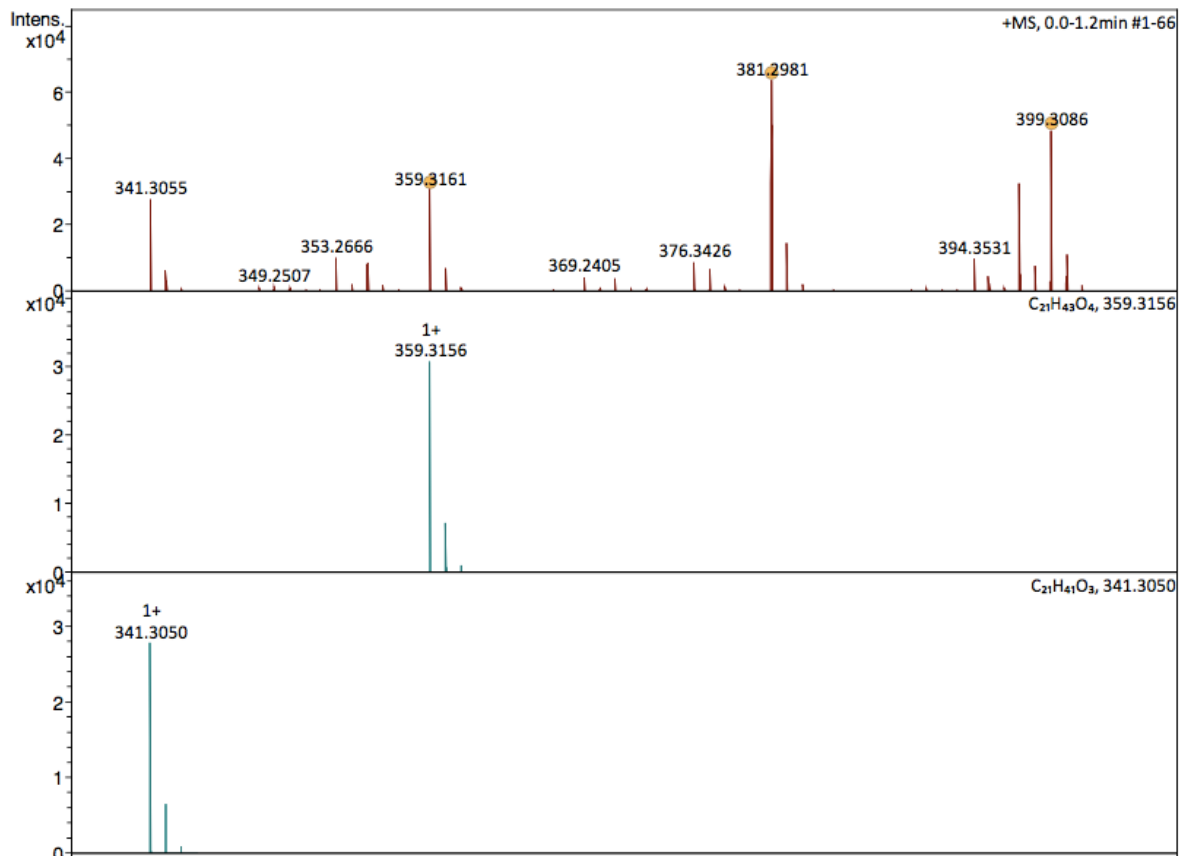
Das Ergebnis der HR-MS-Analyse im Positivionenmodus zeigte für die Substanzen G-J (siehe Anhang) ähnliche Fragmentierungsmuster und Summenformeln. Aufgrund der Fragmentierungsmuster der Substanzen G-J wurde durch Vergleich mit der Literatur geschlossen, dass es sich um gesättigte Monoacylglycerol-Derivate handeln könnte. Aufgrund der untergeordneten Bedeutung von Fettsäuren im Rahmen dieser Arbeit, wurde keine vollständige Strukturaufklärung dieser Substanzen durchgeführt.

**Tabelle 21:** HR-MS Analyse von Substanz G

|           | Substanz G (ungesättigt) | Monoacylglycerol-Derivat (gesättigt)<br>(Kaloa P.J. et al., 2006) |
|-----------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| $[M+H]^+$ | 359,3156                 | 357,3                                                             |
| Fragmente | 353,2666                 | -                                                                 |
|           | 349,2507                 | -                                                                 |
|           | 341,3055                 | 339,3                                                             |



**Abbildung 13:** Massenspektrum gesättigter Monoacylglycerolderivate (1-oleoyl-rac-glycerol) (Kalo P.J. et al., 2006)



**Abbildung 14:** HR-Massenspektrum von Substanz G (protoniert)

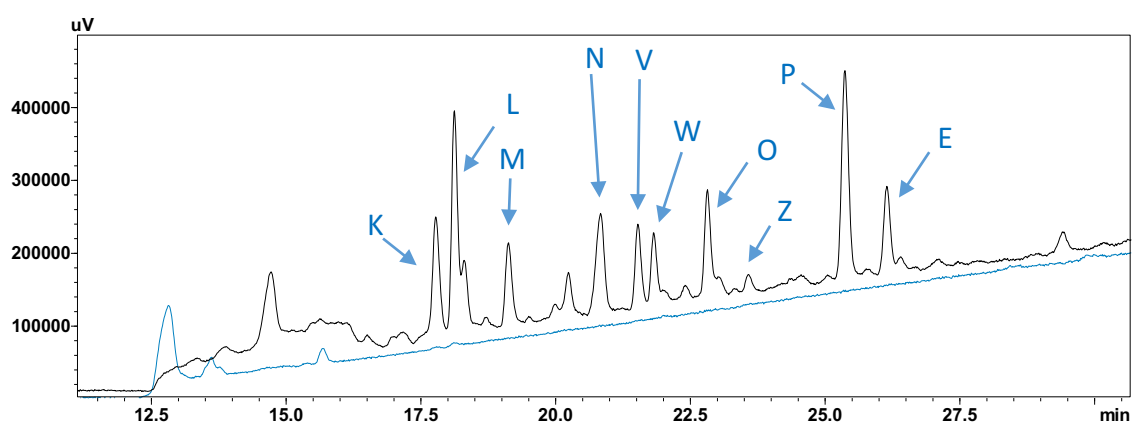
Bei Substanz G handelt es sich um ein ungesättigtes Monoacylglycerol-Derivat, während im Vergleich 1-oleoyl-rac-glycerol gesättigt vorliegt.

## 6.2 Aufarbeitung des Extraktes Aceton\_Y

Der Extrakt wurde für weitere Trennschritte mittels HPLC (*Tabelle 13, S.15*) analysiert. Wie in *Abbildung 15* zu sehen, war die Fraktion komplex zusammengesetzt und enthielt die Substanzen K, L, M, N, O, P, V, W, Y und Z.

**Tabelle 22:** Retentionszeiten, UV-Maxima und UV-Minima im Extrakt Aceton\_Y

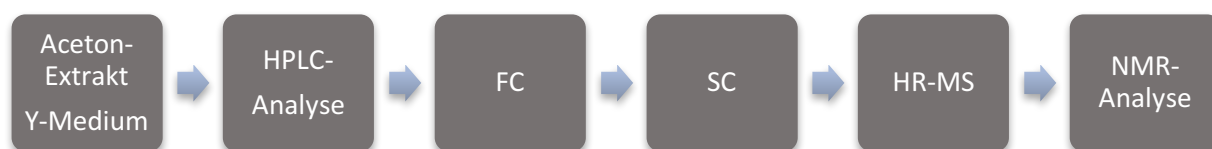
| Substanz | Retentionszeit (min) | UV-Maximum | UV-Minimum |
|----------|----------------------|------------|------------|
| K        | 17,8                 | 275        | 250        |
| L        | 18,1                 | 275        | 247        |
| M        | 19,1                 | 275        | 247        |
| N        | 20,8                 | < 200      | -          |
| O        | 22,8                 | < 200      | -          |
| P        | 25,4                 | 243        | 228        |
| V        | 21,5                 | < 200      | -          |
| W        | 21,8                 | < 200      | -          |
| Y        | 31,9                 | 237/246    | 203/218    |
| Z        | 23,6                 | 257/280    | 208/211    |



**Abbildung 15:** HPLC-Chromatogramm des Aceton-Extraktes (schwarz) und des Y-Mediums (blau) von 12,5 – 27,5 min bei 190 nm (*Tabelle 13, S.15*)

### 6.2.1 Isolierung der Substanzen aus dem Extrakt Aceton\_Y

Die HPLC-Analyse (*Abbildung 15*, S.26) des Extraktes zeigte voneinander gut abgetrennte Peaks, sodass eine Reindarstellung mittels präparativer HPLC möglich schien. Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, dass bei höherer Beladung keine ausreichende Trennung erfolgte. Aus diesem Grund wurde für die weitere Fraktionierung die Flash Chromatographie (*Tabelle 5*, S.12) herangezogen. Es wurden Fraktionen zu 13 ml gesammelt. Fraktionen mit übereinstimmenden Fingerprints wurden vereinigt. Zur Reinheitsprüfung wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt (*Tabelle 13*, S.15). Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und das Gewicht der Substanzen bestimmt.



**Abbildung 16:** Schema der Isolierung von Substanz K-P und V-Z

### 6.2.2 Isolierung von Substanz L

Substanz L wies in der HPLC-Analyse eine Retentionszeit von 18,1 min auf (*Abbildung 15*, S.26). Das zugehörige UV-Spektrum (siehe Anhang) zeigte ein Maximum bei 275 nm und ein Minimum bei 247 nm.

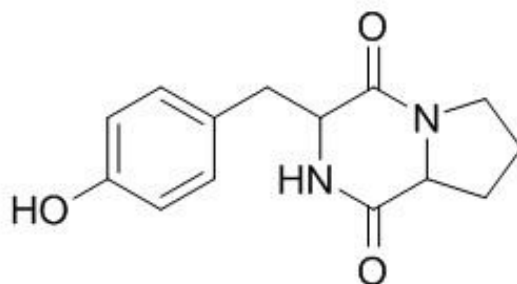
Diese Substanz wurde während einer HPLC-Analyse (*Tabelle 13*, S.15) gesammelt.

### 6.2.3 Identifizierung von Substanz L

Fragmentierungsmuster im HR-MS im Positivionenmodus und Summenformel von Substanz L korrelierten mit Daten für cyclo(Pro-Tyr) in der Literatur. Ein Vergleich von Substanz L mit einer Probe von cyclo(Pro-Tyr) aus einer vorangegangenen Diplomarbeit (Danhel L., 2016), zeigte, dass es sich bei Substanz L um cyclo(Pro-Tyr) handelte. Es stimmten sowohl die Retentionszeit in der HPLC, als auch die UV-Spektren überein. Ebenso waren die

Summenformel  $C_{14}H_{16}N_2O_2$ , die molekulare Masse  $m/z = 261,1234$  und das Fragmentierungsmuster (Tabelle 23) ident.

Substanz L wurde aufgrund der Übereinstimmung mit einer authentischen Referenz als cyclo(Pro-Tyr) identifiziert.

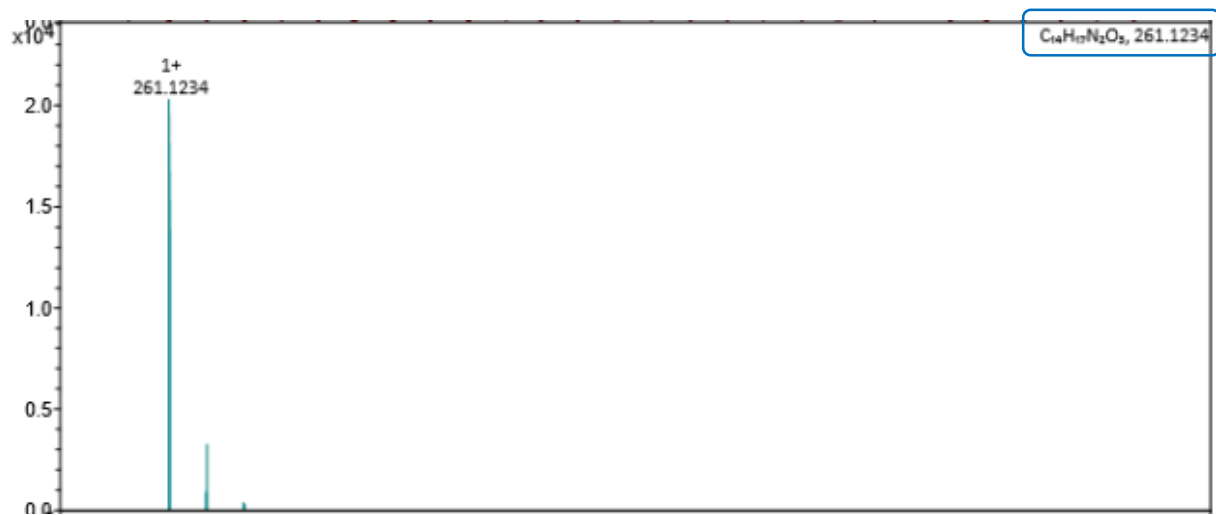


**Abbildung 17:** cyclo(Pro-Tyr)

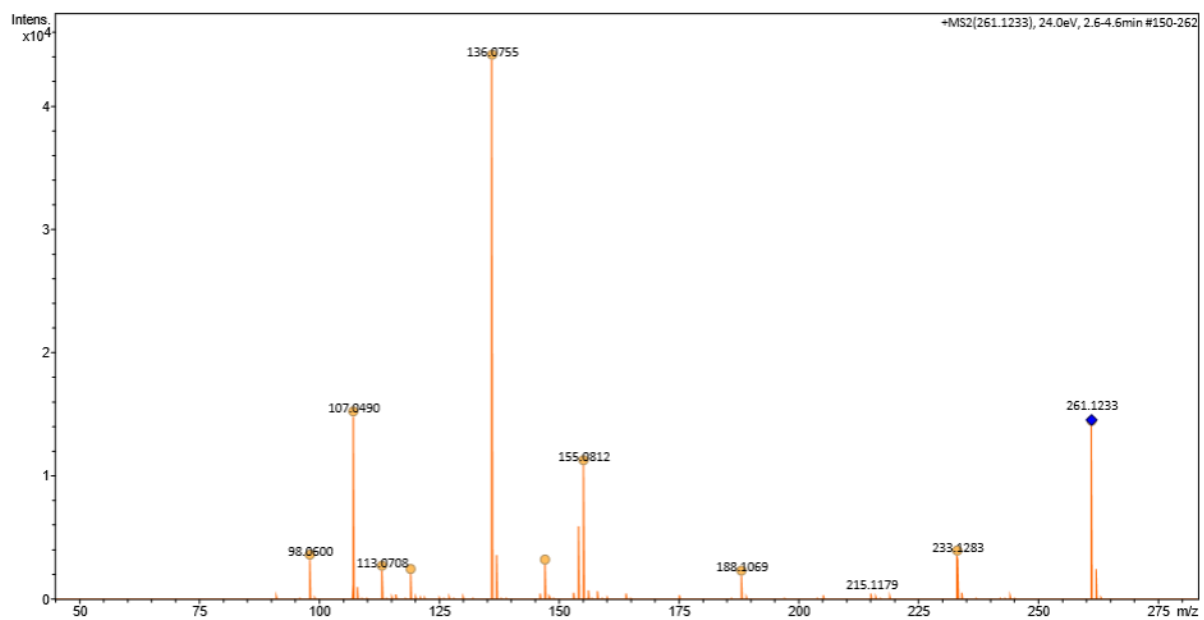
<http://www.chemfaces.com/series/S1310-4.html> abgerufen am 12.12.2016

**Tabelle 23:** HR-MS Analyse von Substanz L

|           | Substanz L | cyclo(Pro-Tyr)<br>(Chen Y.H. et al., 2004) | Cyclo(Pro-Tyr)<br>(Danhel L., 2016) |
|-----------|------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|
| $[M+H]^+$ | 261,1233   | 261                                        | 261,1269                            |
| Fragmente | 233,1283   | 233                                        | 233,1282                            |
|           | -          | 197                                        | -                                   |
|           | 188,1069   | -                                          | 188,1069                            |
|           | 155,0812   | 155                                        | 155,0815                            |
|           | 147,0439   | -                                          | 147,0440                            |
|           | 136,0755   | 136                                        | 136,0758                            |
|           | 119,0490   | -                                          | -                                   |
|           | 113,0708   | -                                          | -                                   |
|           | 107,0490   | 107                                        | 107,0492                            |
|           | 98,0600    | -                                          | -                                   |
|           | -          | 70                                         | 70,0649                             |



**Abbildung 18:** HR-Massenspektrum von Substanz L (protoniert)



**Abbildung 19:** +MS2-Spektrum von Substanz L (Fragmentierung bei 24.0 eV)

#### 6.2.4 Isolierung von Substanz O

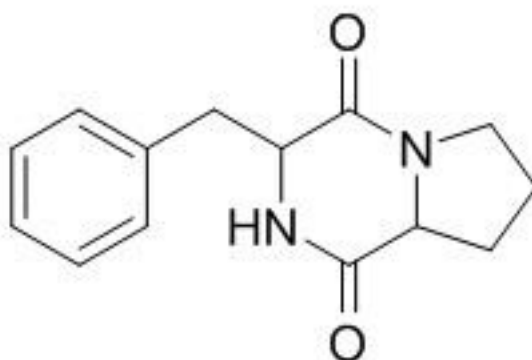
Substanz O war in den Fraktionen 41-43 der Flash Chromatographie enthalten. Die Reinheitsprüfung dieser Fraktion erfolgte mittels Charged Aerosol Detektion.

Die CAD-Analyse ergab keine ausreichende Reinheit der Substanz und daher wurde die Fraktion weiter aufgearbeitet. Die Probe wurde an einer Sephadex® Säule mittels SC8 aufgetrennt (*Tabelle 10*, S.14). Jede fünfte Fraktion wurde mittels HPLC analysiert und die Fraktionen 36-39 die Substanz O enthielten, vereinigt. Die Ausbeute betrug 2,7 mg.

#### 6.2.5 Identifizierung von Substanz O

Für die Identifizierung wurde Substanz O mittels HR-MS analysiert. Die Substanz wurde mit einer Flussrate von 3 µl/min direkt in die ESI-Quelle injiziert und im Positivionenmodus vermessen.

Durch Analyse mittels HR-MS und Vergleich der Daten, wie Fragmentierungsmuster, molekulare Masse und Summenformel, mit bereits bekannten Daten aus der Literatur (*Tabelle 24*, S.31), konnte Substanz O als cyclo(Phe-Pro) identifiziert werden. Diese Substanz war bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Ayyildiz Y., 2015) aus *Actinoalloteichus hymeniacidonis* isoliert worden.

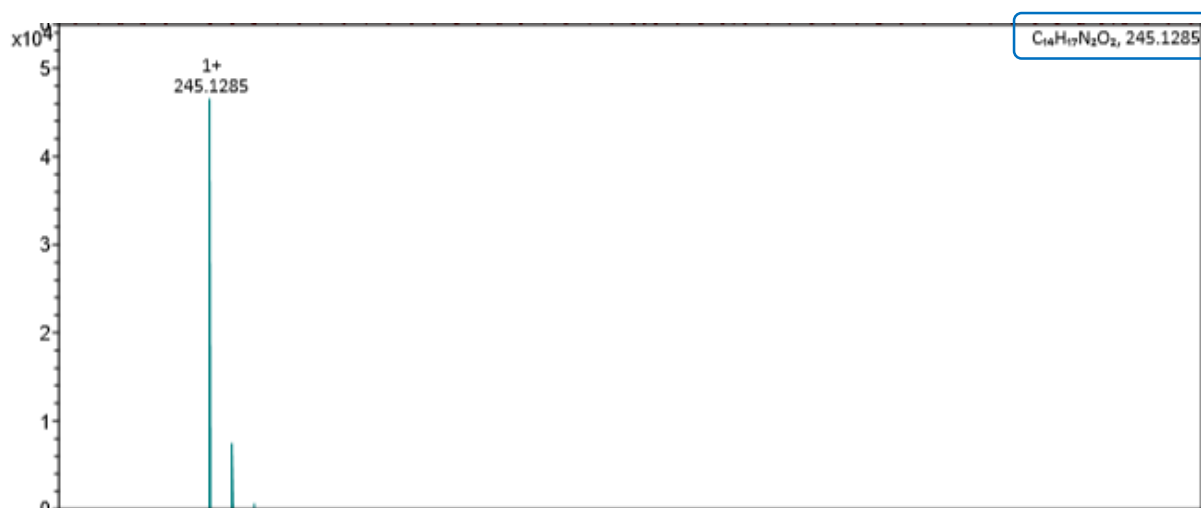


**Abbildung 20:** cyclo(Phe-Pro)

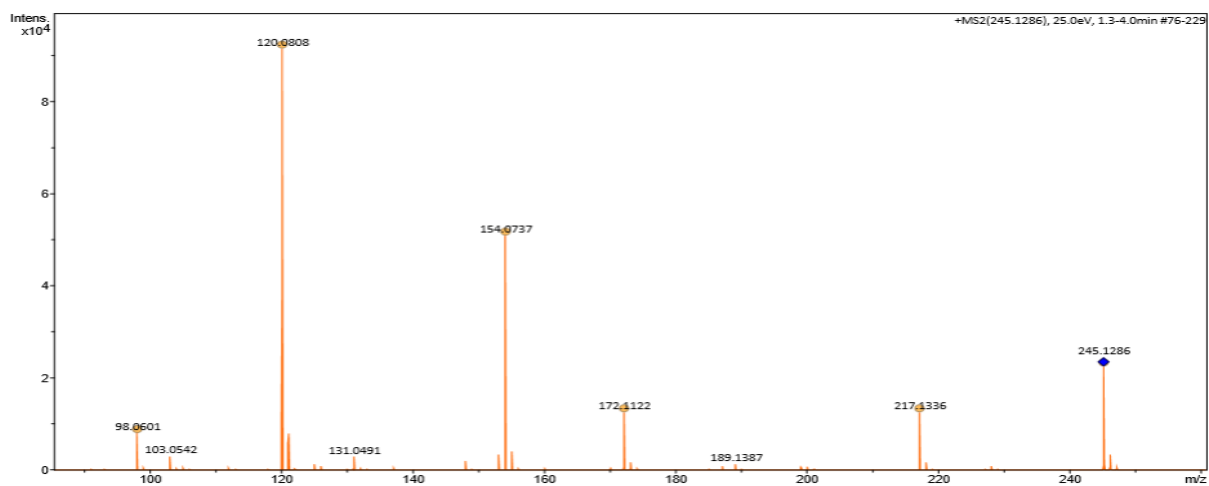
<http://www.chemfaces.com/series/S1310-4.html> abgerufen am 12.12.2016

**Tabelle 24:** HR-MS Analyse von Substanz O

|           | Substanz O | cyclo(Phe-Pro)<br>(Xing J. et al., 2008) | cyclo(Phe-Pro)<br>(Stark T. et al., 2005) |
|-----------|------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| $[M+H]^+$ | 245,1286   | 245                                      | 245                                       |
| Fragmente | 217,1336   | 217                                      | 217                                       |
|           | 172,1122   | 172                                      | 172                                       |
|           | 154,0737   | 154                                      | 154                                       |
|           | 120,0808   | 120                                      | 120                                       |
|           | 98,0601    | 98                                       | 98                                        |



**Abbildung 21:** HR-Massenspektrum von Substanz O (protoniert)



**Abbildung 22:** +MS2-Spektrum von Substanz O (Fragmentierung bei 25.0 eV)

### 6.2.6 Isolierung von Substanz W

Substanz W war in der Fraktion 39 der Flash Chromatographie enthalten. Die Reinheitsprüfung dieser Fraktion erfolgte mittels Charged Aerosol Detektion. Die CAD-Analyse ergab eine ausreichende Reinheit der Fraktion, die daher für weitere Analysen mittels HR-MS herangezogen werden konnte. Für die Vermessung wurde die Fraktion mit einer Flussrate von 3 µl/min direkt in die ESI-Quelle injiziert und die Probe im Positivionenmodus vermessen.

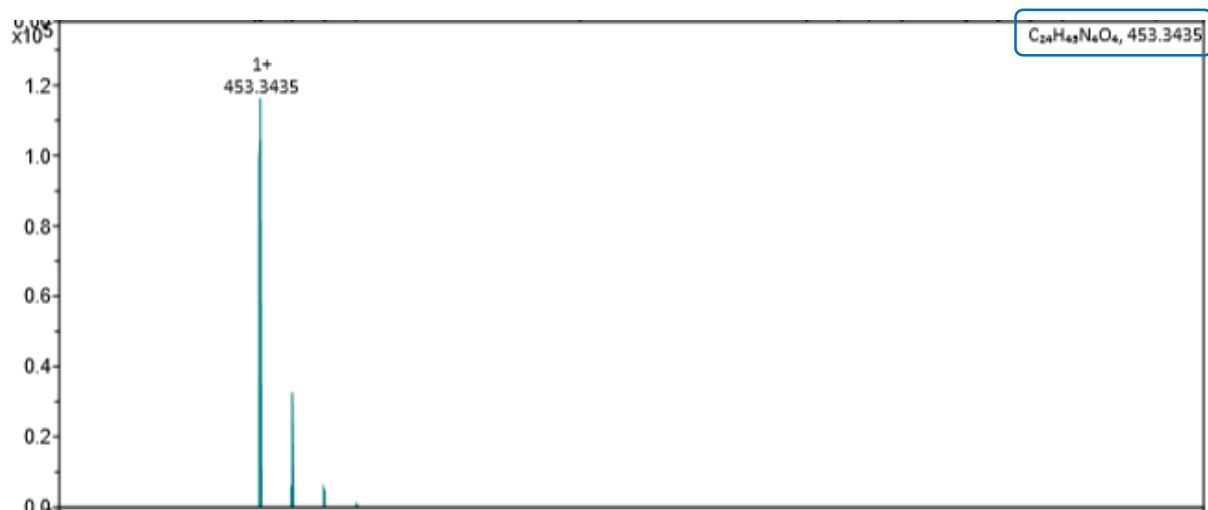
### 6.2.7 Identifizierung von Substanz W

Das Fragmentierungsmuster (*Tabelle 25*), die molekulare Masse  $m/z = 453,3429$  sowie die Summenformel  $C_{24}H_{44}N_4O_4$  von Substanz W ergaben im Vergleich mit der Literatur, dass es sich bei dieser Substanz möglicherweise um ein Polyamid aus 4 e-Caprolactamen handelte.

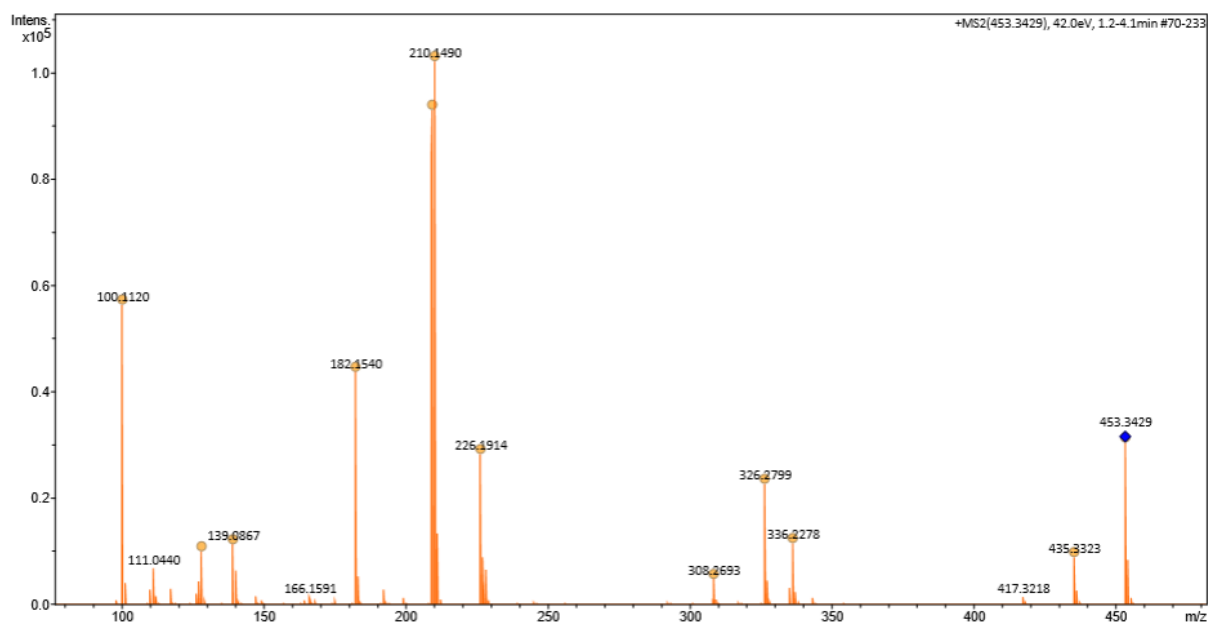
Der Vergleich des MS-Spektrum des zyklischen Dimer von Polyamid 66 aus der Literatur mit jenem von Substanz W zeigte, dass die Fragmentierungsmuster (*Tabelle 25*) übereinstimmten. Es besteht daher die Annahme, dass es sich bei Substanz W möglicherweise um ein Polyamid aus 4 e-Caprolactamen handelte.

**Tabelle 25:** HR-MS Analyse von Substanz W

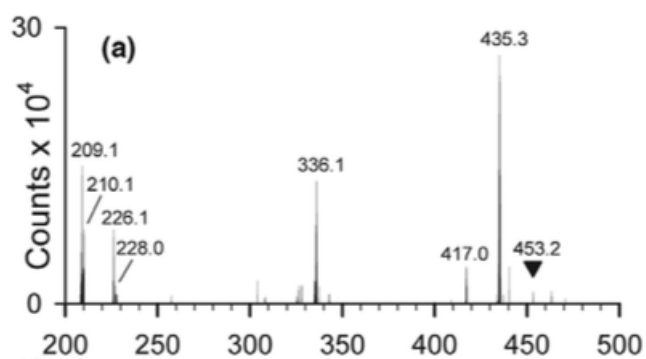
|           | Substanz W | Cyclisches Dimer von Polyamid 66<br>(Tran J. et al., 2006) |
|-----------|------------|------------------------------------------------------------|
| $[M+H]^+$ | 453,3429   | 453,2                                                      |
| Fragmente | 435,3323   | 435,3                                                      |
|           | 417,3218   | 417,0                                                      |
|           | 336,2278   | 336,1                                                      |
|           | 326,2799   | -                                                          |
|           | 308,2693   | -                                                          |
|           | 226,1914   | 226,1                                                      |
|           | 210,1490   | 210,1                                                      |
|           | 209,1650   | 209,1                                                      |



**Abbildung 23:** HR-Massenspektrum von Substanz W (protoniert)



**Abbildung 24:** +MS2-Spektrum von Substanz W (Fragmentierung bei 42.0 eV)



**Abbildung 25:** Massenspektrum eines zyklischen Dimer von Polyamid 66 (Tran J. et al., 2006)

### 6.2.8 Isolierung und Identifizierung der Substanzen K, M, N, P, V, Y und Z

Die Fraktionen der Flash Chromatographie (s. Kapitel 5.2, S.17) wurden entsprechend ähnlicher Fingerprints vereinigt. Die daraus resultierenden Fraktionen wurden mittels CAD überprüft. Die Fraktionen der Substanzen K, M, N, P, Q, V, Y und Z lagen nicht in ausreichender Reinheit zur Strukturaufklärung vor und konnten auch nicht weiter aufgearbeitet werden, da die Mengen für weitere Aufarbeitungsschritte nicht ausreichten.

**Tabelle 26:** Ausbeuten der Substanzen K, M, N, P, V, Y und Z nach Fraktionierung mittels FC

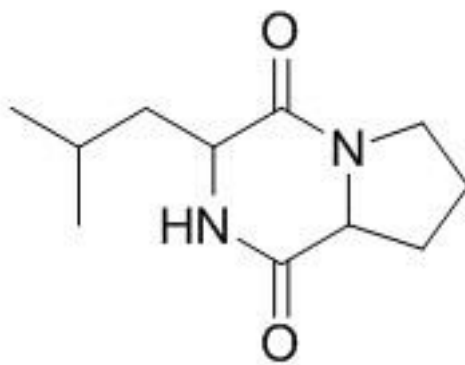
| Substanz | Ausbeute |
|----------|----------|
| K        | 3,5 mg   |
| M        | 2,1 mg   |
| N        | 4,7 mg   |
| P        | 2,8 mg   |
| V        | 10,4 mg  |
| Y        | 2,6 mg   |
| Z        | 4,2 mg   |

Lediglich Substanz N konnte aufgrund des UV-Spektrum (siehe Anhang) und der Retentionszeit (*Abbildung 27*, S.35) identifiziert werden. Das UV-Spektrum von Substanz N sowie die Retentionszeit von 20,8 min korrelierte mit dem UV-Spektrum und der Retentionszeit von Substanz Q<sup>1</sup> aus der Fraktion C\_25QR. Eine HPLC-Analyse beider Substanzen zeigte eine eindeutige Übereinstimmung. Es ist naheliegend, dass die Substanz sowohl im MeOH-Extrakt als auch im Aceton-Extrakt vorkommt. Einerseits handelte es sich um das selbe Bakterium, welches diese Substanz produzierte, andererseits wurden die Amberlite XAD-16-Säckchen zunächst mit MeOH und anschließend mit Aceton über Nacht eluiert.

Substanz N konnte als cyclo(Pro-Leu/Ile) identifiziert werden.

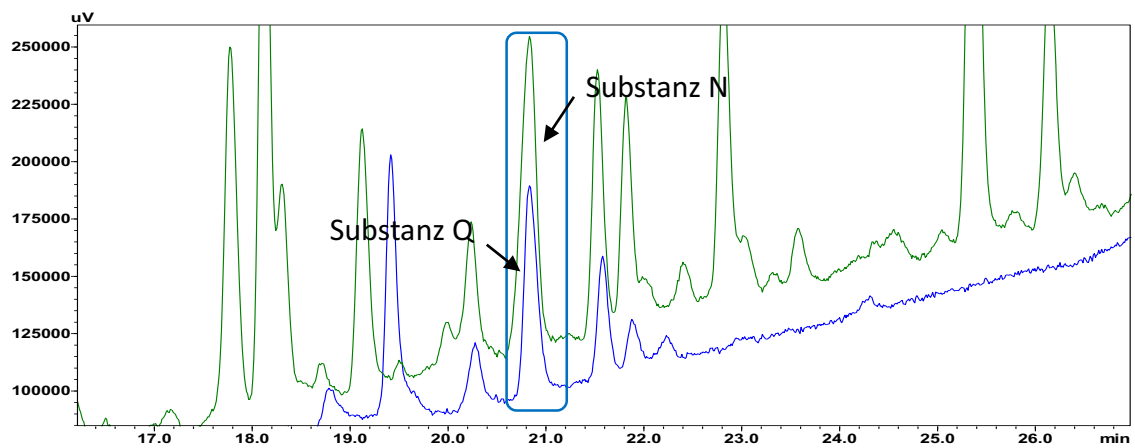
---

<sup>1</sup> Die Aufarbeitung von Substanz Q wird im Kapitel 6.4.1, S.39 näher beschrieben.



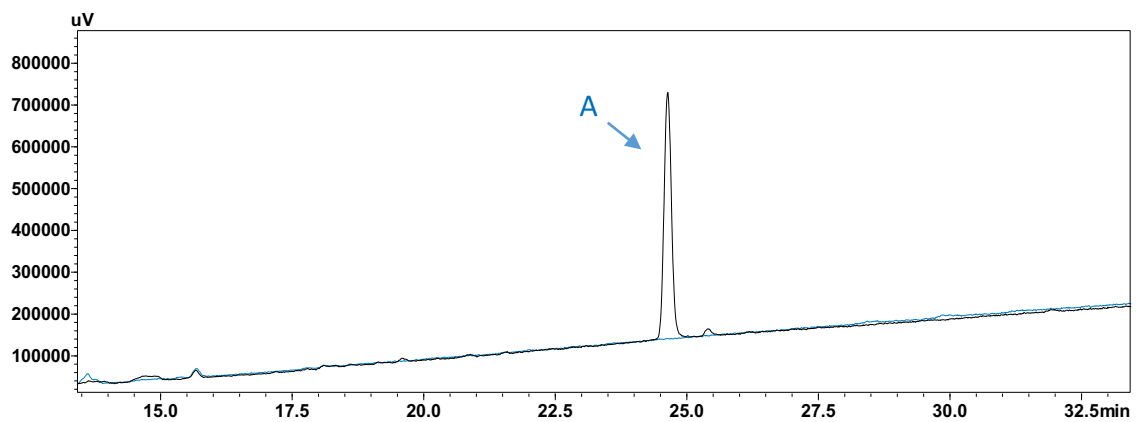
**Abbildung 26:** cyclo(Pro-Leu)

<http://www.chemfaces.com/natural/Cyclo-Pro-Leu--CFN90281.html>, abgerufen am 24.08.2016



**Abbildung 27:** Vergleich der Retentionszeiten von Substanz Q (MeOH-Extrakt Medium C) und Substanz N bei 190 nm (Aceton-Extrakt Medium Y)

### 6.3 Aufarbeitung des Extraktes Z\_Y



**Abbildung 28:** HPLC-Chromatogramm von Z\_Y (schwarz) und des Y-Mediums (blau) von 15,0 – 32,5 min bei 190 nm (Tabelle 13, S.19)

Der Zellextrakt wurde mittels HPLC analysiert. Diese Analyse zeigte eine Hauptkomponente bei einer Retentionszeit von 24,7 min (*Abbildung 28*), die auf Substanz A hinwies. Die Retentionszeit und das UV-Spektrum des Peaks stimmten mit Substanz A aus der Fraktion Y\_5 (*Abbildung 4*, S.20) überein.

Ebenso wie Substanz A aus dem Extrakt MeOH\_Y war die Substanz flüchtig und konnte nicht identifiziert werden.

## 6.4 Aufarbeitung von Fraktion C\_25

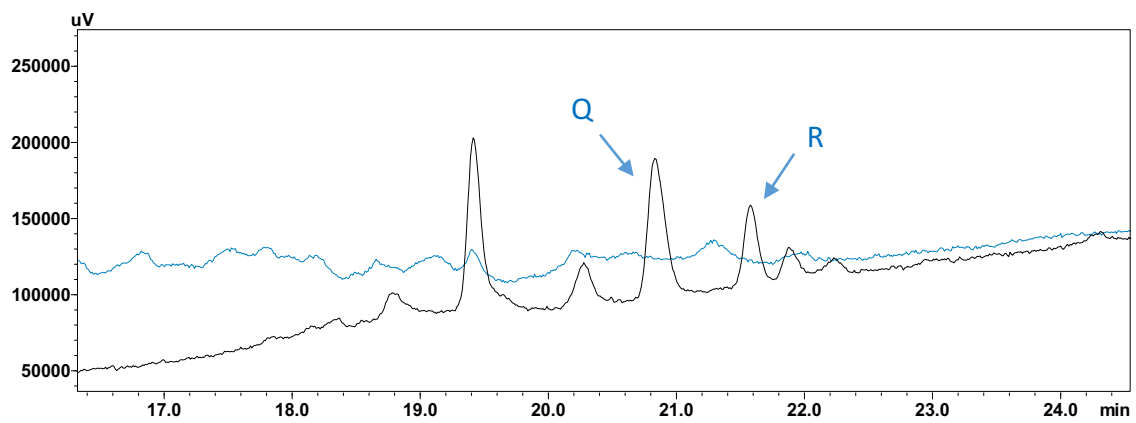
In einer vorangegangenen Dissertation (Lubich A., in Vorbereitung) wurde der Extrakt MeOH\_C bereits mittels Flash Chromatographie (*Tabelle 3*, S.11) fraktioniert. Dabei wurde der Extrakt aus dem C-Medium mit unterschiedlichen MeOH-Konzentrationen eluiert. Es entstanden die Fraktionen C\_5 (4,6 g), C\_25 (2,2 g) und C\_100 (1,5 g). Die Fraktionen C\_5 und C\_100 wurden im Rahmen der Dissertation behandelt, während die Fraktion C\_25 im Rahmen dieser Arbeit aufgearbeitet wurde.

In der HPLC-Analyse Fraktion C\_25 wurden die Substanzen Q, R, S1 und S2 detektiert. Diese stammten nicht aus dem Medium und schienen in größeren Mengen vorhanden zu sein.

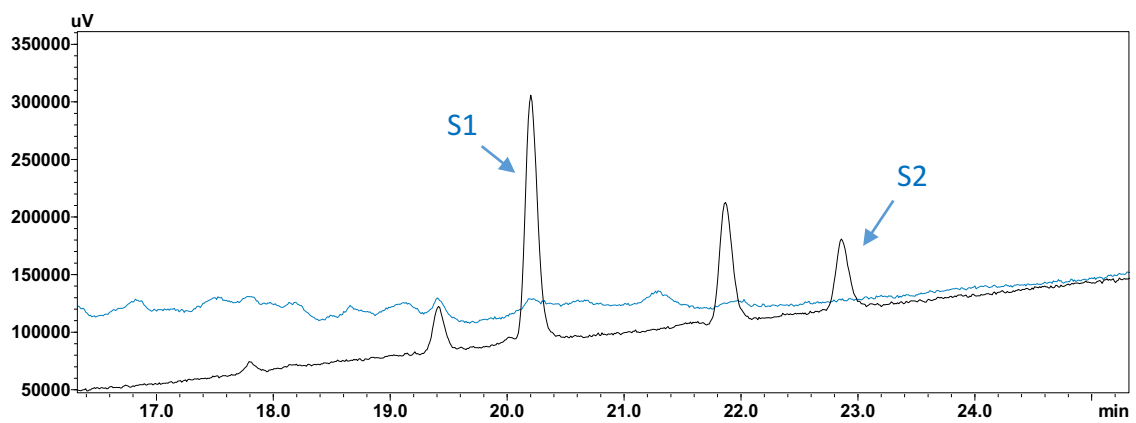
**Tabelle 27:** Retentionszeiten, UV-Maxima und UV-Minima der Substanzen Q, R, S1 und S2

| Substanz | Retentionszeit (min) | UV-Maximum | UV-Minimum |
|----------|----------------------|------------|------------|
| Q        | 20,8                 | 264        | 253        |
| R        | 21,9                 | < 200      | -          |
| S1       | 20,2                 | < 200      | -          |
| S2       | 22,9                 | 263        | 251        |

Für die weitere Aufarbeitung wurde Fraktion C\_25 mittels Säulenchromatographie (SC2) an Sephadex® LH20 (*Tabelle 6*, S.12) fraktioniert. Fraktionen zu jeweils 7,5 ml wurden gesammelt und jede fünfte Fraktion mittels HPLC analysiert. Die Fraktionen 27-32 enthielten die Substanzen S1 und S2 und die Fraktionen 20-24 enthielten die Substanzen Q und R. Die jeweiligen Fraktionen wurden zu den Sammelfraktionen C\_25QR (*Abbildung 29*, S.38) und C\_25S1S2 (*Abbildung 30*, S.38) vereinigt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Ausbeute der Fraktion C\_25S1S2 betrug 19,7 mg und die Ausbeute der Fraktion C\_25QR 57,5 mg.



**Abbildung 29:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion C\_25QR (schwarz) und des C-Mediums (blau) von 17,0 – 24,0 min bei 190 nm (Tabelle 13, S.15)



**Abbildung 30:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion C\_25S1S2 (schwarz) und des C-Mediums (blau) von 17,0 – 24,0 min bei 190 nm (Tabelle 13, S.15)

### 6.4.1 Isolierung der Substanzen Q und R

Die Fraktion C\_25QR wurde zur Anreicherung von Q und R ein weiteres Mal an einer Sephadex® Säule mittels SC6 (*Tabelle 9*, S.13) fraktioniert. Fraktionen zu jeweils 5,0 ml wurden gesammelt und in den Fraktion 27-33 wurden die Substanzen Q und R detektiert. Die Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Ausbeute von Fraktion QR betrug 42,3 mg.

Um die Substanzen Q und R mittels präparativer HPLC zu isolieren, wurde Fraktion QR in drei Durchgängen aufgetrennt. Die Ausbeute von Substanz Q betrug 10,7 mg und die Ausbeute von Substanz R betrug 2,8 mg.

Für weitere Analyseschritte musste die Reinheit der beiden Substanzen mittels CAD überprüft werden.

Die CAD-Analyse ergab für Substanz Q eine nicht ausreichende Reinheit. Aus diesem Grund wurde die Fraktion ein weiteres Mal mittels Säulenchromatographie (SC7) an Sephadex® LH20 (*Tabelle 10*, S.14) aufgetrennt. Nach Analyse mittels HPLC wurden die Fraktionen 21-24 vereinigt. Die Ausbeute betrug 4,4 mg.

Nach erneuter Analyse mittels CAD wurde eine ausreichende Reinheit von Substanz Q für die Strukturaufklärung festgestellt.

Die Identifizierung von Substanz Q erfolgte mittels HR-MS. Eine Lösung (s. *Kapitel 5.2.2*, S.18) der Substanz wurde mit einer Flussrate von 3 µl/min direkt in die ESI-Quelle injiziert und die Probe im Positivionenmodus vermessen.

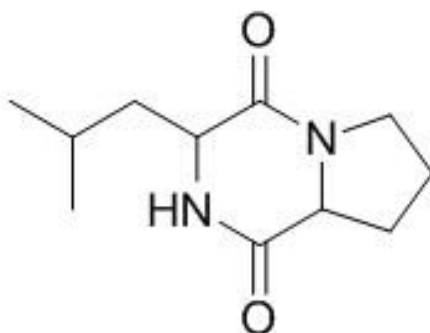


**Abbildung 31:** Schema der Isolierung von Substanz Q

### 6.4.2 Identifizierung von Substanz Q

Mittels der HR-MS-Analyse wurde das Fragmentierungsmuster, die molekulare Masse und die Summenformel für Substanz Q ermittelt.

Fragmentierungsmuster, die molekulare Masse  $m/z = 211.1443$  und die Summenformel  $C_{11}H_{18}N_2O_2$  von Substanz Q korrelierten mit Daten für cyclo(Pro-Leu/Ile) aus der Literatur.

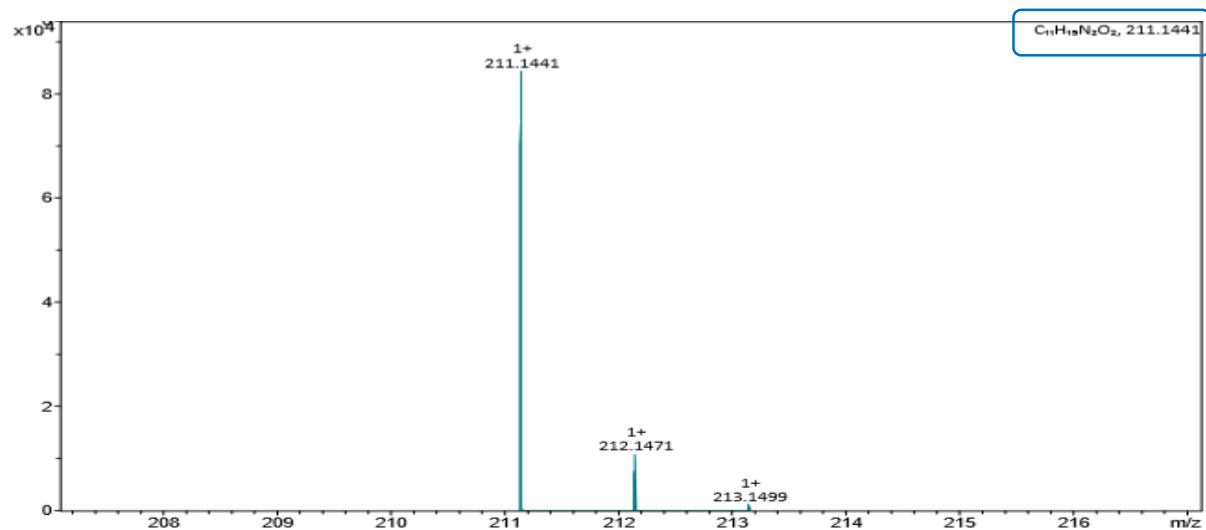


**Abbildung 32:** cyclo(Pro-Leu)

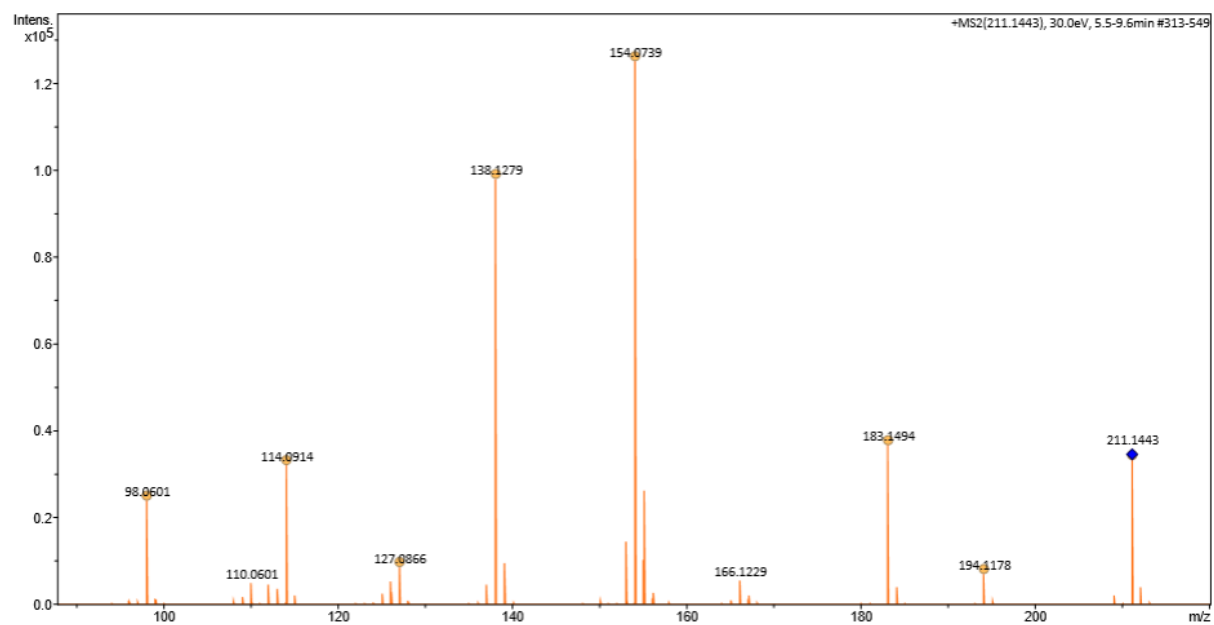
<http://www.chemfaces.com/natural/Cyclo-Pro-Leu--CFN90281.html> abgerufen am 05.08.2016

**Tabelle 28:** HR-MS Analyse von Substanz Q

|           | Substanz Q | cyclo(Pro-Ile/Leu)<br>(Xing J. et al., 2008) | Cyclo(Pro-Ile/Leu)<br>(Stark T. et al., 2005) |
|-----------|------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| $[M+H]^+$ | 211,1443   | 211                                          | 211                                           |
| Fragmente | 194,1178   | -                                            | -                                             |
|           | 183,1494   | 183                                          | 183                                           |
|           | 154,0739   | 154                                          | 155                                           |
|           | 138,1279   | 138                                          | 138                                           |
|           | 127,0866   | -                                            | -                                             |
|           | 114,0914   | 114                                          | -                                             |
|           | 98,0601    | 98                                           | 98                                            |



**Abbildung 33:** HR-Massenspektrum von Substanz Q (protoniert)



**Abbildung 34:** +MS2-Spektrum von Substanz Q (Fragmentierung bei 30.0 eV)

### 6.4.3 Identifizierung von Substanz R

Die CAD-Analyse der Fraktion von Substanz R zeigte keine ausreichende Reinheit für eine Strukturaufklärung mittels HR-MS und NMR. Für eine weitere Aufarbeitung war nicht ausreichend Substanz vorhanden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass Substanz R aus dem Extrakt MeOH\_C und Substanz V des Extraktes Aceton\_Y die selbe Substanz darstellten. Die Retentionszeiten und UV-Spektren (siehe Anhang) stimmten überein. Allerdings konnten die Substanzen nicht identifiziert werden, aufgrund der nicht ausreichenden Zeit im Rahmen dieser Arbeit.

### 6.4.4 Isolierung der Substanzen S1 und S2

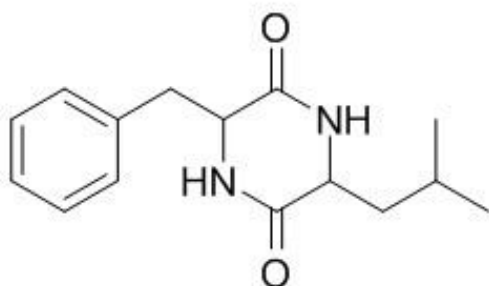
Die Ausbeute von Fraktion C\_25S1S2 (*Abbildung 30*, S.38) betrug 16,9 mg. Die Fraktion wurde im Positiv- und Negativionenmodus an der LC-MS vermessen. Für Substanz S1 wurde im Positivionenmodus die molekulare Masse  $m/z = 261$ , sowie das Fragmentierungsmuster (*Tabelle 29*, S. 44) ermittelt. Für Substanz S2 wurde im Positivionenmodus die molekulare Masse  $m/z = 245$ , sowie das Fragmentierungsmuster (*Tabelle 30*, S.45) ermittelt.



**Abbildung 35:** Schema der Isolierung der Substanzen S1 und S2

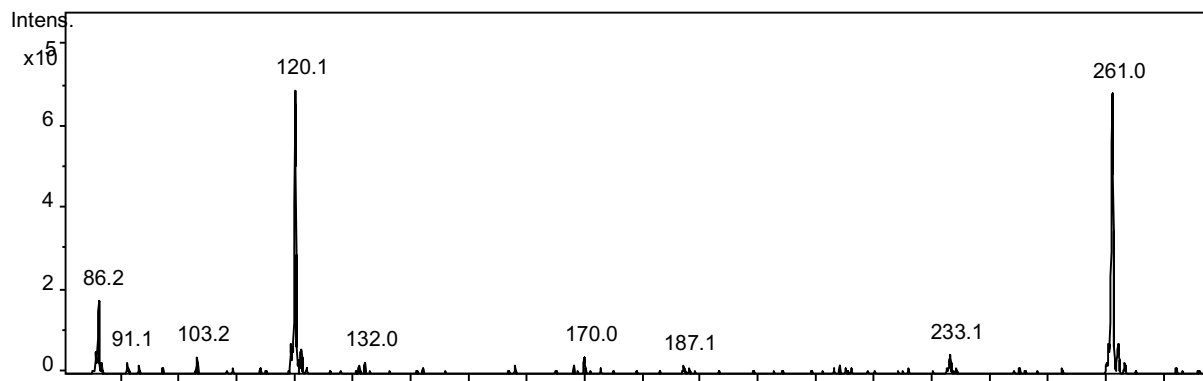
#### 6.4.5 Identifizierung von Substanz S1

Die Daten der LC-MS (*Abbildung 37*) von Substanz S1 korrelierten mit bereits bekannten Daten aus der Literatur. Die molekulare Masse, sowie das Fragmentierungsmuster stimmten mit den Daten von cyclo(Phe-Leu/Ile) überein, womit Substanz S1 als cyclo(Phe-Leu/Ile) identifiziert wurde.



**Abbildung 36:** cyclo(Phe-Leu)

<http://www.chemfaces.com/natural/Cyclo-Phe-Leu--CFN90273.html> abgerufen am 05.08.2016



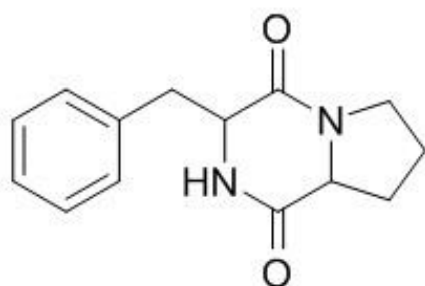
**Abbildung 37:** Massenspektrum der Substanz S1

**Tabelle 29:** MS Analyse von Substanz S1

|           | <b>Substanz S1</b> | <b>cyclo(Phe-Leu/Ile)</b><br>(Xing J. et al., 2008) | <b>Cyclo(Phe-Leu/Ile)</b><br>(Stark T. et al., 2005) |
|-----------|--------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| $[M+H]^+$ | 261,1              | 261                                                 | 261                                                  |
| Fragmente | 233,1              | 233                                                 | 233                                                  |
|           | -                  | 216                                                 | 216                                                  |
|           | 187,1              | 188                                                 | 188                                                  |
|           | 170,0              | 170                                                 | 170                                                  |
|           | 120,1              | 120                                                 | 120                                                  |
|           | -                  | 114                                                 | 114                                                  |
|           | 86,2               | 86                                                  | 86                                                   |

#### 6.4.6 Identifizierung von Substanz S2

Die erhaltenen Daten korrelierten mit den Daten von Substanz O, die bereits aus dem Extrakt Aceton\_Y isoliert wurde. Der Vergleich der Retentionszeiten, sowie das Fragmentierungsmuster, UV-Spektren und molekulare Massen zeigten eine Übereinstimmung der beiden Substanzen. Substanz S2 wurde aufgrund dieser Erkenntnisse als cyclo(Phe-Pro) identifiziert.

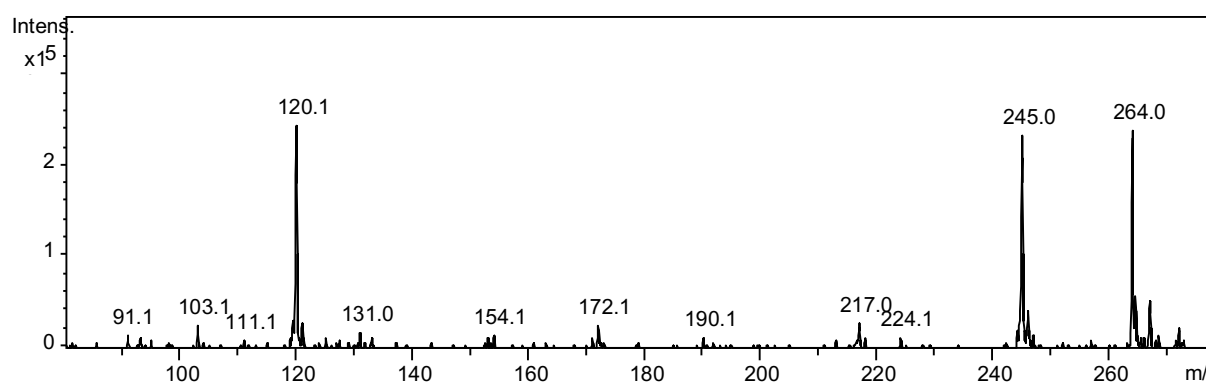


**Abbildung 38:** cyclo(Phe-Pro)

<http://www.chemfaces.com/series/S1310-4.html> abgerufen am 12.12.2016

**Tabelle 30:** MS Analyse von Substanz S2

|           | Substanz S2 | cyclo(Phe-Pro)<br>(Xing J. et al., 2008) | cyclo(Phe-Pro)<br>(Stark T. et al., 2005) |
|-----------|-------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| $[M+H]^+$ | 245,1       | 245                                      | 245                                       |
| Fragmente | 217,0       | 217                                      | 217                                       |
|           | 172,1       | 172                                      | 172                                       |
|           | 154,1       | 154                                      | 154                                       |
|           | 120,1       | 120                                      | 120                                       |

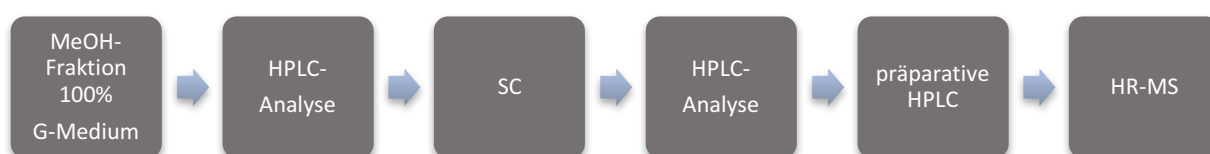


**Abbildung 39:** Massenspektrum der Substanz S2

## 6.5 Aufarbeitung von Fraktion G\_100

In einer vorangegangenen Dissertation (Lubich A., in Vorbereitung) war der Extrakt MeOH\_G bereits über die Flash Chromatographie (*Tabelle 3*, S.11) fraktioniert worden. Man erhielt die Fraktionen G\_5 (4,8 g), G\_25 (1,0 g) und G\_100 (1,7 g). Die Fraktionen G\_5 und G\_25 wurden im Rahmen der Dissertation behandelt, während die Fraktion G\_100 im Rahmen dieser Arbeit weiter fraktioniert.

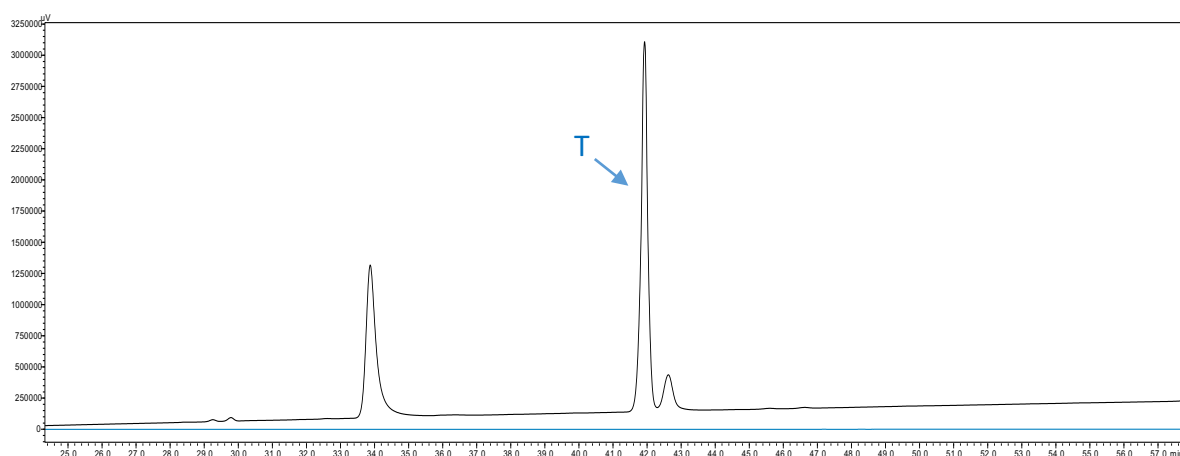
Die HPLC-Analyse von Fraktion G\_100 zeigte eine Hauptkomponente.



**Abbildung 40:** Schema der Isolierung von Substanz T

**Tabelle 31:** Retentionszeit, UV-Maximum und UV-Minimum der Substanz T

| Substanz | Retentionszeit (min) | UV-Maximum | UV-Minimum |
|----------|----------------------|------------|------------|
| T        | 27,0                 | 249        | 221        |



**Abbildung 41:** HPLC-Chromatogramm der Fraktion G\_100 (schwarz) und des G-Mediums (blau) von 25,0 – 57,0 min bei 190 nm (*Tabelle 13*, S.15)

### 6.5.1 Isolierung der Substanz T

Die Fraktion G\_100 wurde mittels Säulenchromatographie (SC5) an Sephadex® LH20 (*Tabelle 8, S.13*) fraktioniert. Fraktionen zu jeweils 7,5 ml wurden gesammelt und jede fünfte Fraktion mittels HPLC analysiert. Die Fraktionen 40-48, die Substanz T enthielten, wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Ausbeute der Fraktion betrug 132,7 mg.

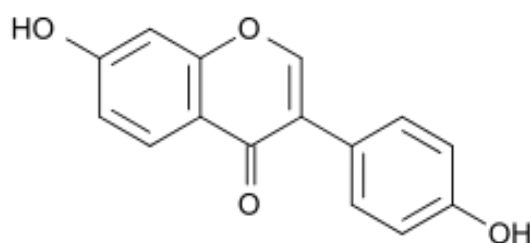
Die Fraktion G\_100T wurde in drei Portionen mittels präparativer HPLC aufgetrennt. Die Ausbeute von Substanz T betrug 1,8 mg.

Für die Identifizierung wurde Substanz T mittels HR-MS analysiert.

### 6.5.2 Identifizierung von Substanz T

Durch die Analyse mittels HR-MS wurde das Fragmentierungsmuster, die molekulare Masse von  $m/z = 255,0650$  und die Summenformel  $C_{15}H_9O_4$  ermittelt. Der Vergleich dieser Daten mit bereits bekannten Daten aus der Literatur (*Tabelle 32, S.48*) zeigte, dass es sich bei Substanz T um Daidzein handeln musste. Daidzein war bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Ayyildiz Y., 2015) aus *Actinoalloteichus hymeniacidonis* isoliert und identifiziert worden.

Es konnte durch Vergleich der HPLC-Chromatogramme gezeigt werden, dass es sich bei Daidzein um ein Produkt aus dem Medium handelte.

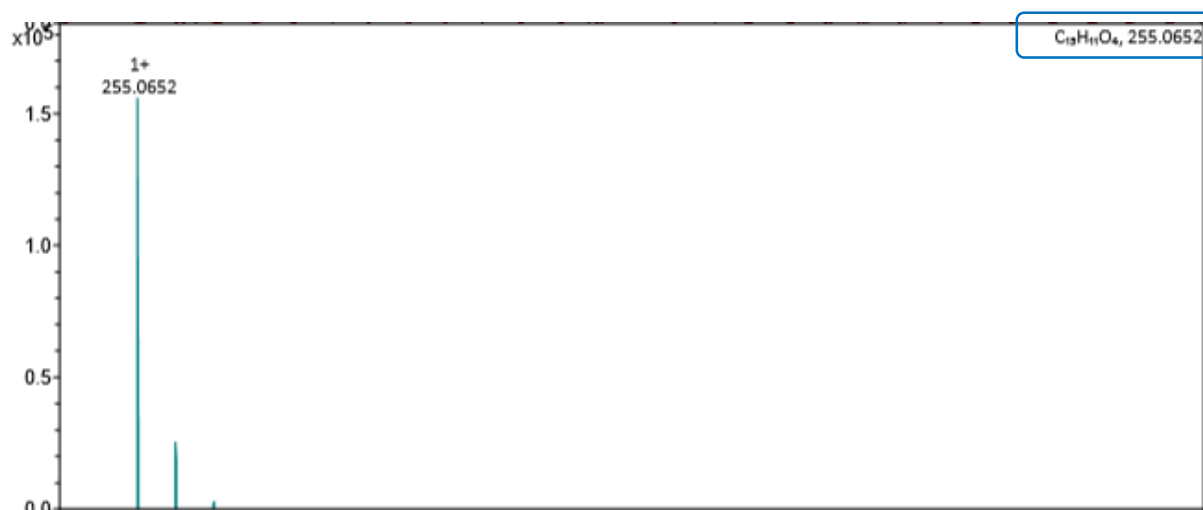


**Abbildung 42:** Daidzein

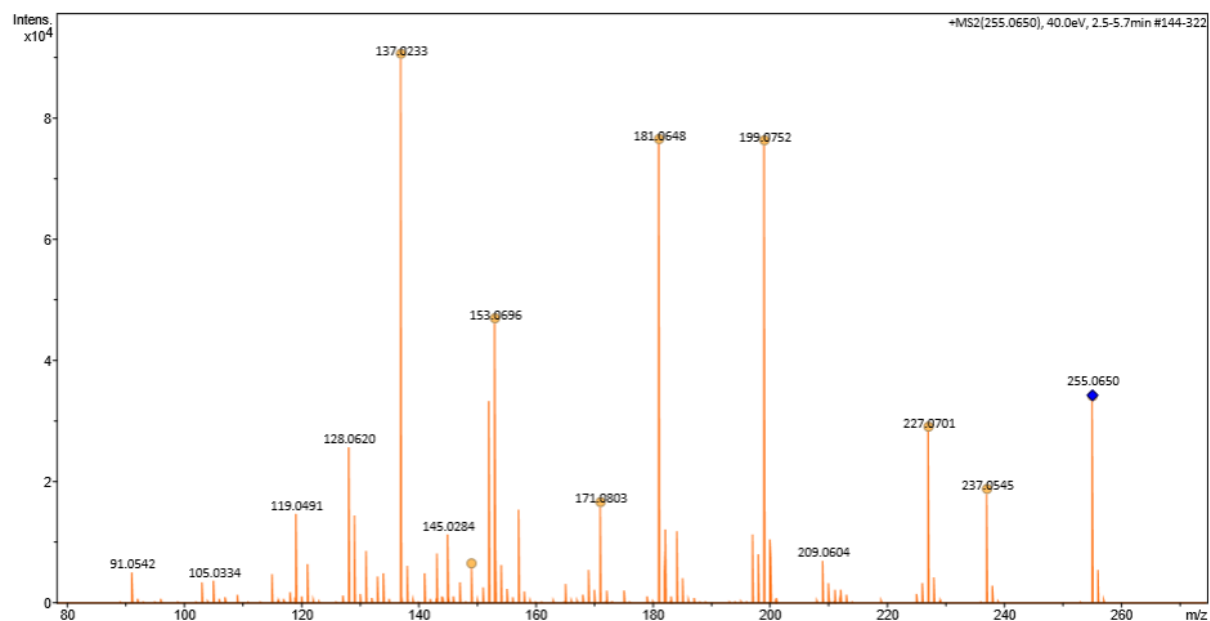
<https://de.wikipedia.org/wiki/Daidzein> abgerufen am 05.08.2016

**Tabelle 32:** HR-MS Analyse von Substanz T

|           | Substanz T | Daidzein<br>(Ayyildiz Y., 2015) |
|-----------|------------|---------------------------------|
| $[M+H]^+$ | 255,0650   | 255,0648                        |
| Fragmente | 237,0545   | 237,0542                        |
|           | 227,0701   | 227,0699                        |
|           | -          | 209,0605                        |
|           | 199,0752   | 199,0750                        |
|           | 181,0648   | 181,0645                        |
|           | 171,0803   | 171,0801                        |
|           | 153,0696   | 153,0695                        |
|           | 149,0232   | -                               |
|           | -          | 145,0281                        |
|           | 137,0233   | 137,0231                        |
|           | 128,0620   | 128,0681                        |
|           | 119,0491   | 119,0489                        |
|           | 105,0334   | 105,0333                        |
|           | 91,0542    | 91,0542                         |

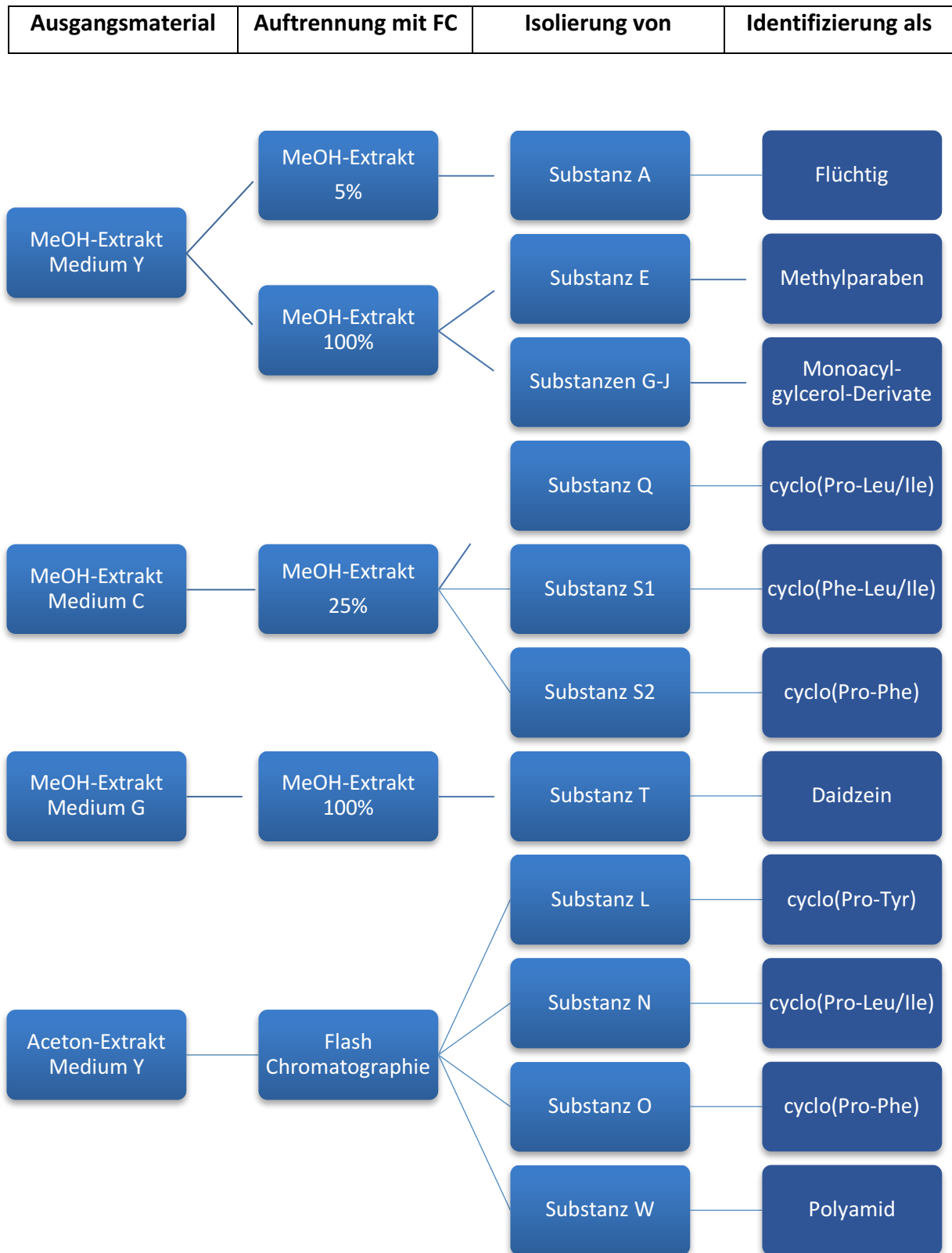


**Abbildung 43:** HR-Massenspektrum von Substanz T (protoniert)



**Abbildung 44:** +MS2-Spektrum von Substanz T (Fragmentierung bei 40.0 eV)

## 6.6 Übersicht der isolierten und identifizierten Substanzen aus den Extrakten



**Abbildung 45:** Übersicht der isolierten Substanzen

## 7. DISKUSSION

Marine Aktinobakterien sind in der Lage, zahlreiche Sekundärstoffe wie Polyketide, Isoprenoide, Phenazine, Indolcarbazole, Sterine und andere Stoffe zu synthetisieren. Diese Verbindungen zeigten antikanzerogene, antimikrobielle, antiparasitäre, neurologische, antioxidative und anti-HIV-Aktivität (Valliappan K. et al., 2014).

Unter den verschiedenen Gattungen der Aktinobakterien sind *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Marinispora*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces* und *Verrucosipora* die wichtigsten Produzenten von bioaktiven Naturstoffen. Vor allem in der Gattung *Streptomyces* ist eine große Zahl an bioaktiven Naturstoffen nachgewiesen (Manivasagan P. et al., 2014).

*Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. ist ein aus einem marinem Schwamm isolierter Mikroorganismus der Gattung *Actinomycetales* (Zhang H. et al., 2006). Die Sekundärmetaboliten von *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. sind bisher noch kaum untersucht.

Diese Arbeit setzte sich mit der Isolierung und Identifizierung der Sekundärmetaboliten von *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov. auseinander. Dazu wurden MeOH- und Aceton-Extrakte aus *Actinoalloteichus hymeniacidonis*, der in unterschiedliche Medien kultiviert wurde, untersucht und die Substanzen Daidzein, Methylparaben, ein Polyamid aus 4-Caprolactamen und die zyklischen Dipeptide cyclo(Pro-Leu/Ile), cyclo(Phe-Leu/Ile), cyclo(Pro-Phe) und cyclo(Pro-Tyr) identifiziert.

Diketopiperazine (DKPs) sind zyklische Dipeptide bestehend aus zwei Aminosäuren die durch zyklische Dehydration entstanden sind (Xing J. et al., 2008). DKPs wurden bereits aus Mikroorganismen und Schwämmen sowie aus einer Vielzahl an Geweben und Körperflüssigkeiten isoliert. Diese heterozyklischen Verbindungen zeigen pharmakologische Wirkungen in verschiedenen Organismen. DKPs besitzen antimikrobielle, antitumorale, antimutagene und antivirale Eigenschaften. Zudem scheinen sie eine wichtige Rolle als chemische Mediatoren in bakteriellen „Quorum-sensing“ und Signalwegen zu spielen (Furtado N. et al., 2007).

Cyclo(Phe-Pro), cyclo(Pro-Tyr) und cyclo(Pro-Leu) wurden bereits in vorangegangenen Diplomarbeiten (Ayyildiz Y., 2015; Danhel L., 2016) für *Actinoalloteichus hymeniacidonis* beschrieben. Cyclo(Phe-Leu/Ile) konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal aus *Actinoalloteichus hymeniacidonis* beschrieben werden.

Trotz unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen produzierte das Bakterium gleiche Substanzen. Je nach Stress, durch unterschiedliche Zusammensetzung oder Konzentration der Komponenten im Medium, wurden die Substanzen in größeren oder kleineren Mengen vom Bakterium produziert werden.

Cyclo(Phe-Pro) besitzt antimikrobielle Aktivität gegen Vancomycin-resistente *Enterococce*n, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* und *Saccharomyces cerevisiae* (Rhee K.-H. et al., 2001).

Daidzein konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit isoliert und identifiziert werden. Bei Daidzein handelte es sich um ein Produkt aus dem Medium. Medium G, in dem der Extrakt kultiviert wurde, enthielt Sojamehl. Das Bakterium verwendet während der Kultivierung geeignete Zuckerquellen zur Ernährung. Daidzein wurde offensichtlich während der Kultivierung durch Hydrolyse aus Daidzein im Sojamehl gebildet und nicht von dem Bakterium selbst produziert.

Methylparaben war bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Ayyildiz Y., 2015) aus *Actinoalloteichus hymeniacidonis* beschrieben worden und konnte in der vorliegenden Diplomarbeit in *Actinoalloteichus hymeniacidonis* bestätigt werden. Die Kultivierungsbedingungen der beiden Extrakte, aus denen die Substanzen isoliert wurden, unterschieden sich nur geringfügig.

Das Polyamid aus 4 e-Caprolactamen wurde offensichtlich ebenfalls nicht vom Bakterium selbst produziert, sondern ist wahrscheinlich ein Produkt aus einem Kabelbinder, der während der Kultivierung für den Verschluss der Harzsäckchen verwendet worden war.

Substanz F konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der geringen Menge nicht isoliert und identifiziert werden. Durch Ansetzen größerer Mengen der Kulturen oder indem man den Bakterien mehr Stressfaktoren zufügt, könnte man die Ausbeute von Substanz F erhöhen und dadurch isolieren.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

**Abdelmohsen U. R., Bayera K., Hentschela U.** (2014) Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, 31, 381-399

**Ayyildiz Y.** (2015) Chemische Untersuchungen von *Actinoalloteichus hymeniacidonis*. Diplomarbeit, Universität Wien

**Chen Y.H., Liou S.E., Chen C.C.** (2004) Two-step mass spectrometric approach for the identification of diketopiperazines in chicken essence. *Eur. Food Res. Technol.*, 218(6), 589-597

**Danhel L.** (2016) Einfluss von Valproat zur Induktion von Sekundärstoffen in *Actinoalloteichus hymeniacidonis*. Diplomarbeit, Universität Wien

**Ebada S., Edrada R., Lin W., Proksch P.** (2008) Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*, 3(12), 1820-1831

**Furtado N. A. J. C., Vesseccchi R., Tomaz J. C., Galembeck S. E., Bastos J. K., Lopes N. P., Crotti A. E. M.** (2007) Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *J. Mass. Spectrom.*, 42, 1279-1286

**Jensen P. R., Mincer T. J., Williams P. G., Fenical W.** (2004) Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87, 43–48

**Kaloe P.J., Ollilainen V., Rochaa J.M., Malcatab F.X.** (2006) Identification of molecular species of simple lipids by normal phase liquid chromatography–positive electrospray tandem mass spectrometry, and application of developed methods in comprehensive analysis of low erucic acid rapeseed oil lipids. *Int. J. of Mass Spectrom.*, 254, 106–121

**Lubich A.** (2017) Dissertation, in Vorbereitung, Universität Wien

**Manivasagan P., Kang K., Sivakumar K., Li-Chan E. C. Y., Oh H., Kim S.** (2014) Marine actinobacteria: An important source of bioactive natural products. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 38(1), 172-188

**Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K., Kim S.** (2013) Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiol. Res.*, 168(6), 311-332

**Rhee K.-H., Choi K., Kim C., Kim C.-H.** (2001) Identification of *Streptomyces* sp. AMLK-355 producing antibiotic substance inhibitory to vancomycin-resistant enterococci. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 11(3), 469-474

**Stark T., Hofmann T.** (2005) Structures, Sensory Activity, and Dose/Response Functions of 2,5-Diketopiperazines in Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7222-7231

**Subramani R. and Aalbersberg W.** (2012) Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.*, 167(10), 571-580

**Sun W., Zhang F., He L., Karthik L., Li Z.** (2015) Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity, and potetial for aromatic polyketides discovery. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1048

**Tran J.C., Doucette A. A.** (2006) Cyclic Polyamide Oligomers Extracted from Nylon 66 Membrane Filter Disks as a Source of Contamination in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 17, 652–656

**Valliappan K., Sun W., Li Z.** (2014) Marine actinobacteria associates with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(17), 7365-7377

**Xing J., Yang Z., Lv B., Xiang L.** (2008) Rapid screening for cyclo-dopa and diketopiperazine alkaloids in crude extracts of *Portulaca oleracea* L. using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 1415-1422

**Zhang H., Zheng W, Huang J, Luo H., Jin Y., Zhang W., Liu Z., Huang Y.** (2006) *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov., an actinomycete isolated from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56(10), 2309-2312

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Anteil der auf Sekundärstoffe untersuchten Arten von Aktinobakterien die mit marinen Organismen assoziiert sind (Valliappan K. et al., 2014). .... | 4  |
| <b>Abbildung 2:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakterienstammes HPA177 T. ....                                                                              | 5  |
| <b>Abbildung 3:</b> Verwendete Methoden für die Isolierung und Identifizierung von Substanzen aus <i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i> sp. nov. ....                | 10 |
| <b>Abbildung 4:</b> HPLC-Chromatogramm der Fraktion Y_5 (schwarz) und des Y-Mediums (blau) von 17,5 – 30,0 min bei 190 nm ....                                         | 20 |
| <b>Abbildung 5:</b> HPLC-Chromatogramm der Fraktion Y_100 (schwarz) und des Y-Mediums (blau) von 17,5 – 32,5 min bei 190 nm ....                                       | 20 |
| <b>Abbildung 6:</b> HPLC-Chromatogramm der Fraktion Y_100 (schwarz) und des Y-Mediums (blau) von 45 – 62,5 min bei 190 nm ....                                         | 20 |
| <b>Abbildung 7:</b> Schema der Isolierung von Substanz A ....                                                                                                          | 21 |
| <b>Abbildung 8:</b> Schema der Isolierung von Substanz E ....                                                                                                          | 22 |
| <b>Abbildung 9:</b> Vergleich der UV-Spektren von Substanz E und Methylparaben ....                                                                                    | 23 |
| <b>Abbildung 10:</b> HPLC-Vergleich der Substanz E und Methylparaben bei 190 nm ....                                                                                   | 23 |
| <b>Abbildung 11:</b> Methylparaben ....                                                                                                                                | 23 |
| <b>Abbildung 12:</b> Schema der Isolierung der Substanzen G-J. ....                                                                                                    | 24 |
| <b>Abbildung 13:</b> Massenspektrum gesättigter Monoacylglycerolderivate ....                                                                                          | 25 |
| <b>Abbildung 14:</b> HR-Massenspektrum von Substanz G (protoniert) ....                                                                                                | 25 |
| <b>Abbildung 15:</b> HPLC-Chromatogramm des Aceton-Extraktes (schwarz) und des Y-Mediums (blau) von 12,5 – 27,5 min bei 190 nm. ....                                   | 26 |
| <b>Abbildung 16:</b> Schema der Isolierung von Substanz K-P und V-Z ....                                                                                               | 27 |
| <b>Abbildung 17:</b> cyclo(Pro-Tyr) ....                                                                                                                               | 28 |
| <b>Abbildung 18:</b> HR-Massenspektrum von Substanz L (protoniert) ....                                                                                                | 29 |
| <b>Abbildung 19:</b> +MS2-Spektrum von Substanz L (Fragmentierung bei 24.0 eV) ....                                                                                    | 29 |
| <b>Abbildung 20:</b> cyclo(Phe-Pro) ....                                                                                                                               | 30 |
| <b>Abbildung 21:</b> HR-Massenspektrum von Substanz O (protoniert) ....                                                                                                | 31 |
| <b>Abbildung 22:</b> +MS2-Spektrum von Substanz O (Fragmentierung bei 25.0 eV) ....                                                                                    | 31 |
| <b>Abbildung 23:</b> HR-Massenspektrum von Substanz W (protoniert) ....                                                                                                | 33 |
| <b>Abbildung 24:</b> +MS2-Spektrum von Substanz W (Fragmentierung bei 42.0 eV) ....                                                                                    | 33 |

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 25:</b> Massenspektrum eines zyklischen Dimer von Polyamid 66 .....                                                                     | 33 |
| <b>Abbildung 26:</b> cyclo(Pro-Leu).....                                                                                                             | 35 |
| <b>Abbildung 27:</b> Vergleich der Retentionszeiten von Substanz Q (MeOH-Extrakt Medium C) und Substanz N bei 190 nm (Aceton-Extrakt Medium Y) ..... | 35 |
| <b>Abbildung 28:</b> HPLC-Chromatogramm von Z_Y (schwarz) und des Y-Mediums (blau) von 15,0 – 32,5 min bei 190 nm.....                               | 36 |
| <b>Abbildung 29:</b> HPLC-Chromatogramm der Fraktion C_25QR (schwarz) und des C-Mediums (blau) von 17,0 – 24,0 min bei 190 nm.....                   | 38 |
| <b>Abbildung 30:</b> HPLC-Chromatogramm der Fraktion C_25S1S2 (schwarz) und des C-Mediums (blau) von 17,0 – 24,0 min bei 190 nm.....                 | 38 |
| <b>Abbildung 31:</b> Schema der Isolierung von Substanz Q .....                                                                                      | 39 |
| <b>Abbildung 32:</b> cyclo(Pro-Leu).....                                                                                                             | 40 |
| <b>Abbildung 33:</b> HR-Massenspektrum von Substanz Q (protoniert) .....                                                                             | 41 |
| <b>Abbildung 34:</b> +MS2-Spektrum von Substanz Q (Fragmentierung bei 30.0 eV) .....                                                                 | 41 |
| <b>Abbildung 35:</b> Schema der Isolierung der Substanzen S1 und S2 .....                                                                            | 42 |
| <b>Abbildung 36:</b> cyclo(Phe-Leu) .....                                                                                                            | 43 |
| <b>Abbildung 37:</b> Massenspektrum der Substanz S1.....                                                                                             | 43 |
| <b>Abbildung 38:</b> cyclo(Phe-Pro) .....                                                                                                            | 44 |
| <b>Abbildung 39:</b> Massenspektrum der Substanz S2.....                                                                                             | 45 |
| <b>Abbildung 40:</b> Schema der Isolierung von Substanz T .....                                                                                      | 46 |
| <b>Abbildung 41:</b> HPLC-Chromatogramm der Fraktion G_100 (schwarz) und des G-Mediums (blau) von 25,0 – 57,0 min bei 190 nm.....                    | 46 |
| <b>Abbildung 42:</b> Daidzein .....                                                                                                                  | 47 |
| <b>Abbildung 43:</b> HR-Massenspektrum von Substanz T (protoniert) .....                                                                             | 48 |
| <b>Abbildung 44:</b> +MS2-Spektrum von Substanz T (Fragmentierung bei 40.0 eV).....                                                                  | 49 |
| <b>Abbildung 45:</b> Übersicht der isolierten Substanzen.....                                                                                        | 50 |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Zusammensetzung der Medien (Lubich A., in Vorbereitung).....                    | 7  |
| <b>Tabelle 2:</b> Ausgangsmaterial .....                                                          | 8  |
| <b>Tabelle 3:</b> Bedingungen der Flash Chromatographie für den Extrakt MeOH_Y.....               | 11 |
| <b>Tabelle 4:</b> Fraktionen von MeOH_Y .....                                                     | 11 |
| <b>Tabelle 5:</b> Bedingungen der Flash Chromatographie für den Extrakt Aceton_Y.....             | 12 |
| <b>Tabelle 6:</b> Bedingungen von SC1 und SC2 .....                                               | 12 |
| <b>Tabelle 7:</b> Bedingungen von SC3.....                                                        | 13 |
| <b>Tabelle 8:</b> Bedingungen von SC4 und SC5.....                                                | 13 |
| <b>Tabelle 9:</b> Bedingungen von SC6.....                                                        | 13 |
| <b>Tabelle 10:</b> Bedingungen von SC7, SC8 und SC9 .....                                         | 14 |
| <b>Tabelle 11:</b> Geräteparameter analytische HPLC .....                                         | 14 |
| <b>Tabelle 12:</b> Geräteparameter analytische HPLC mit Charged Aerosol Detector (CAD) .....      | 14 |
| <b>Tabelle 13:</b> Bedingungen der HPLC-Analyse 1 .....                                           | 15 |
| <b>Tabelle 14:</b> Bedingungen der HPLC-Analyse 2 .....                                           | 15 |
| <b>Tabelle 15:</b> Geräteparameter der präparativen HPLC .....                                    | 16 |
| <b>Tabelle 16:</b> Bedingungen der präparativen HPLC .....                                        | 16 |
| <b>Tabelle 17:</b> Bedingungen der GC.....                                                        | 17 |
| <b>Tabelle 18:</b> Geräteparameter der LC-MS .....                                                | 17 |
| <b>Tabelle 19:</b> Methodenparameter der HR-MS .....                                              | 18 |
| <b>Tabelle 20:</b> Retentionszeiten, UV-Maxima und UV-Minima der Substanzen A, E und G-J .....    | 19 |
| <b>Tabelle 21:</b> HR-MS Analyse von Substanz G.....                                              | 24 |
| <b>Tabelle 22:</b> Retentionszeiten, UV-Maxima und UV-Minima im Extrakt Aceton_Y.....             | 26 |
| <b>Tabelle 23:</b> HR-MS Analyse von Substanz L .....                                             | 28 |
| <b>Tabelle 24:</b> HR-MS Analyse von Substanz O.....                                              | 31 |
| <b>Tabelle 25:</b> HR-MS Analyse von Substanz W.....                                              | 32 |
| <b>Tabelle 26:</b> Ausbeuten der Substanzen K, M, N, P, V, Y und Z nach Fraktionierung m. FC..... | 34 |
| <b>Tabelle 27:</b> Retentionszeiten, UV-Maxima und UV-Minima der Substanzen Q, R, S1 und S2 ..... | 37 |
| <b>Tabelle 28:</b> HR-MS Analyse von Substanz Q .....                                             | 40 |
| <b>Tabelle 29:</b> MS Analyse von Substanz S1 .....                                               | 44 |
| <b>Tabelle 30:</b> MS Analyse von Substanz S2 .....                                               | 45 |

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabelle 31:</b> Retentionszeit, UV-Maximum und UV-Minimum der Substanz T ..... | 46 |
| <b>Tabelle 32:</b> HR-MS Analyse von Substanz T .....                             | 48 |

## Anhang

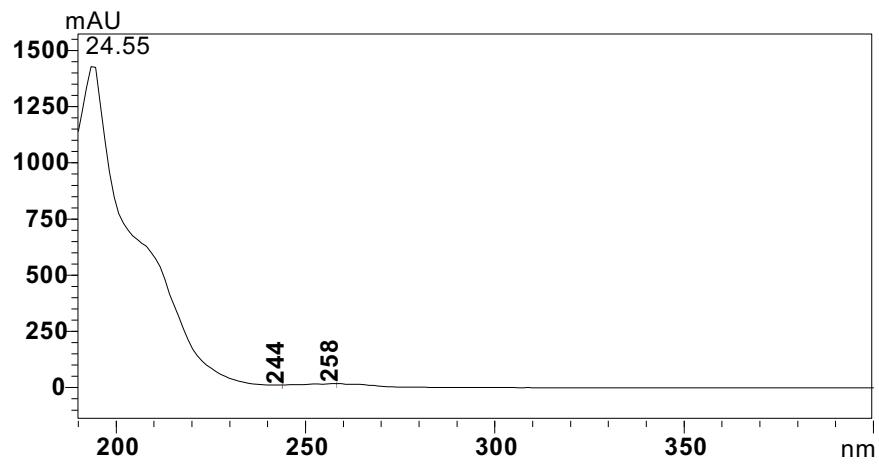


Abbildung I: UV-Spektrum von Substanz A

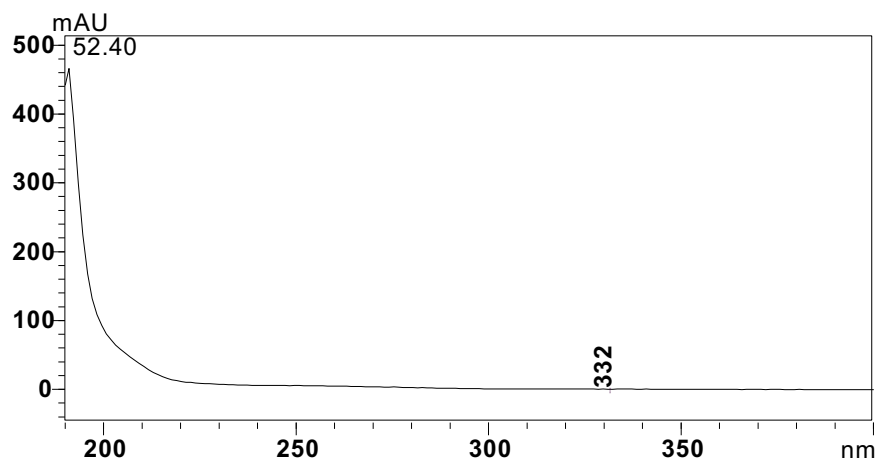


Abbildung II: UV-Spektrum von Substanz G

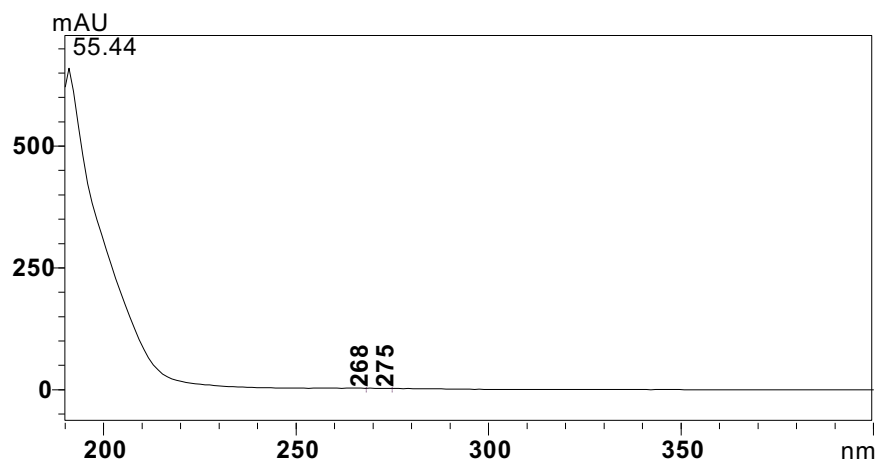
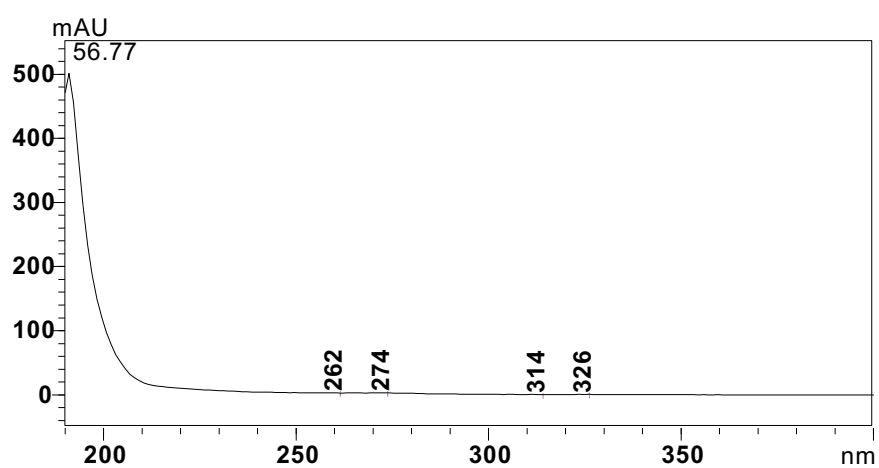
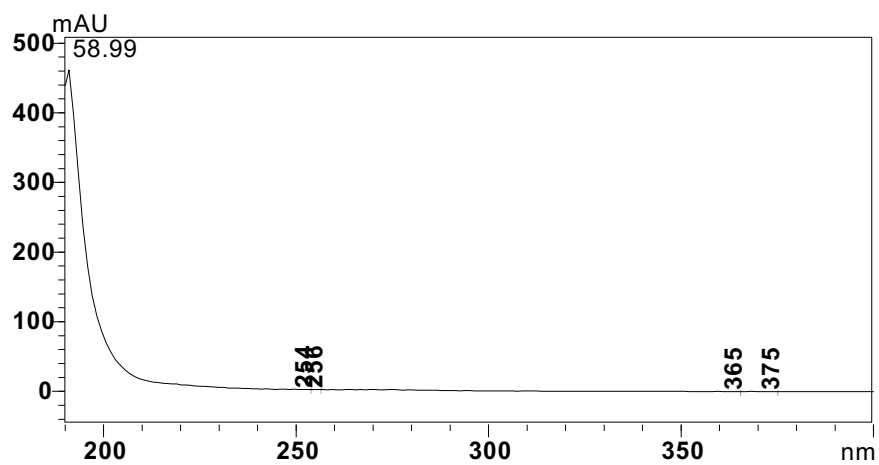


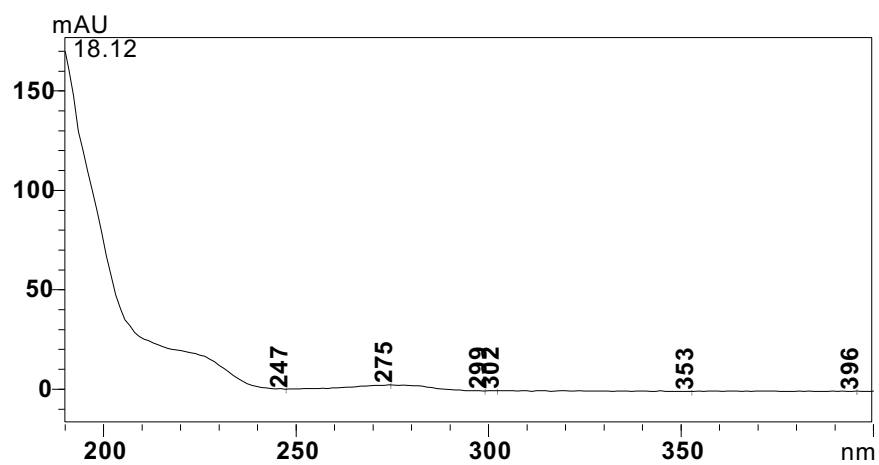
Abbildung III: UV-Spektrum von Substanz H



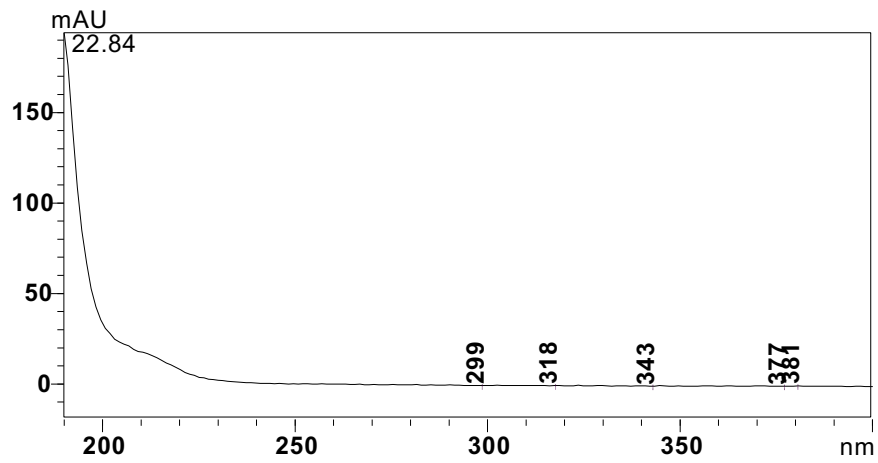
**Abbildung IV: UV-Spektrum von Substanz I**



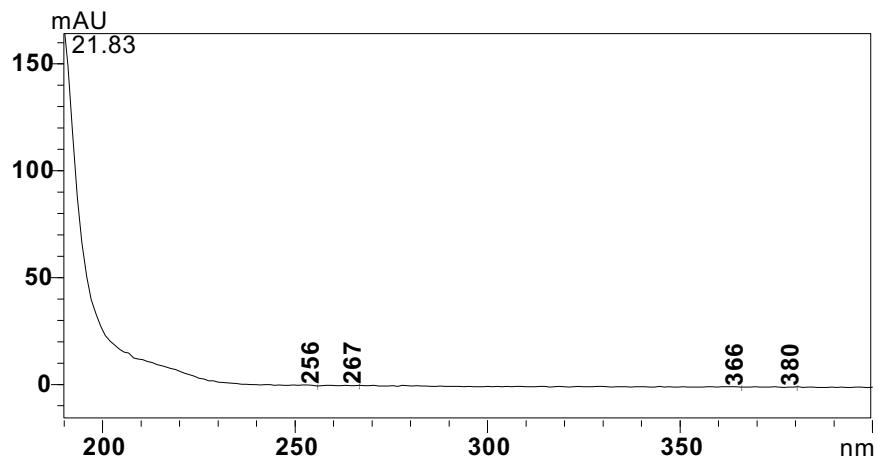
**Abbildung V: UV-Spektrum von Substanz J**



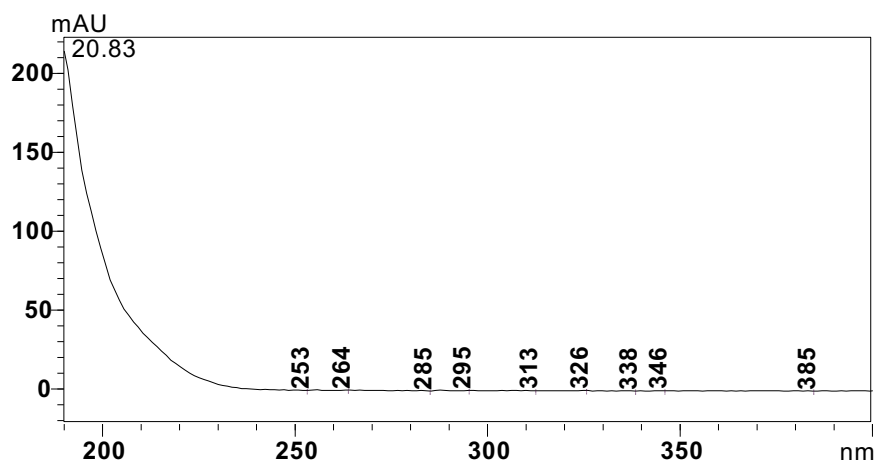
**Abbildung VI: UV-Spektrum von Substanz L**



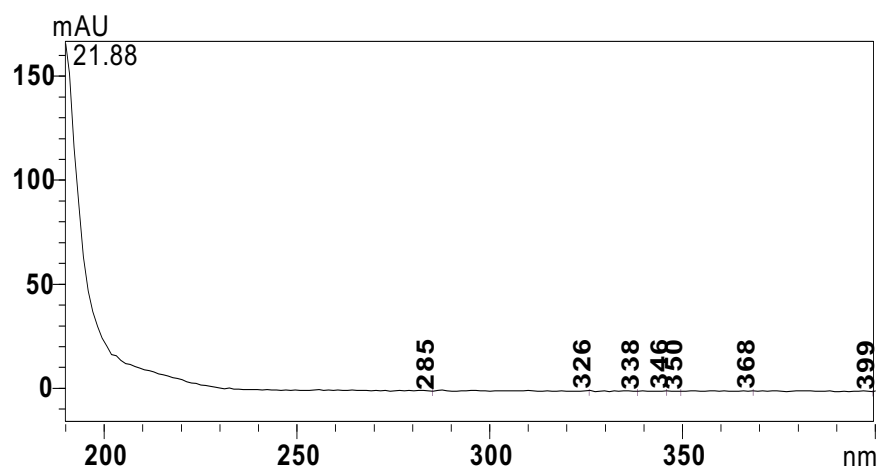
**Abbildung VII: UV-Spektrum von Substanz O**



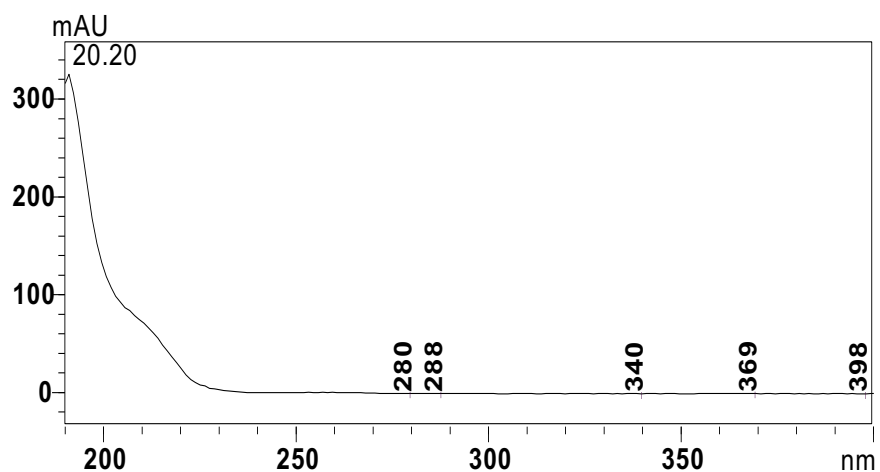
**Abbildung VIII: UV-Spektrum von Substanz W**



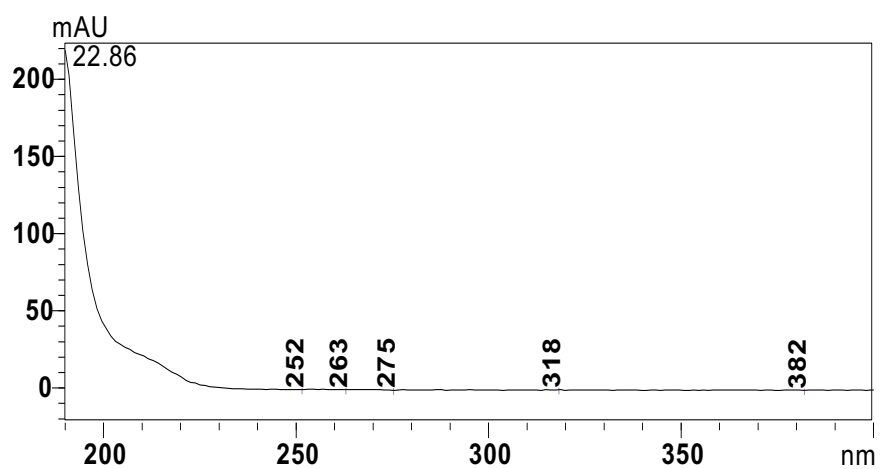
**Abbildung IX: UV-Spektrum von Substanz Q**



**Abbildung X:** UV-Spektrum von Substanz R



**Abbildung XI:** UV-Spektrum von Substanz S1



**Abbildung XII:** UV-Spektrum von Substanz S2

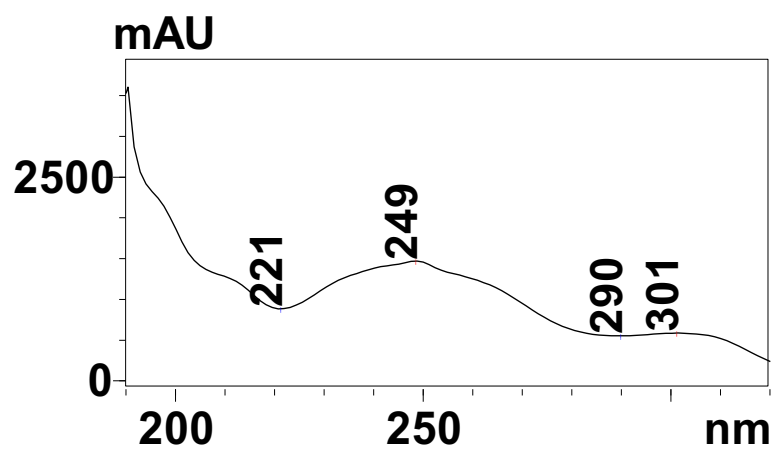


Abbildung XIII: UV-Spektrum der Substanz T

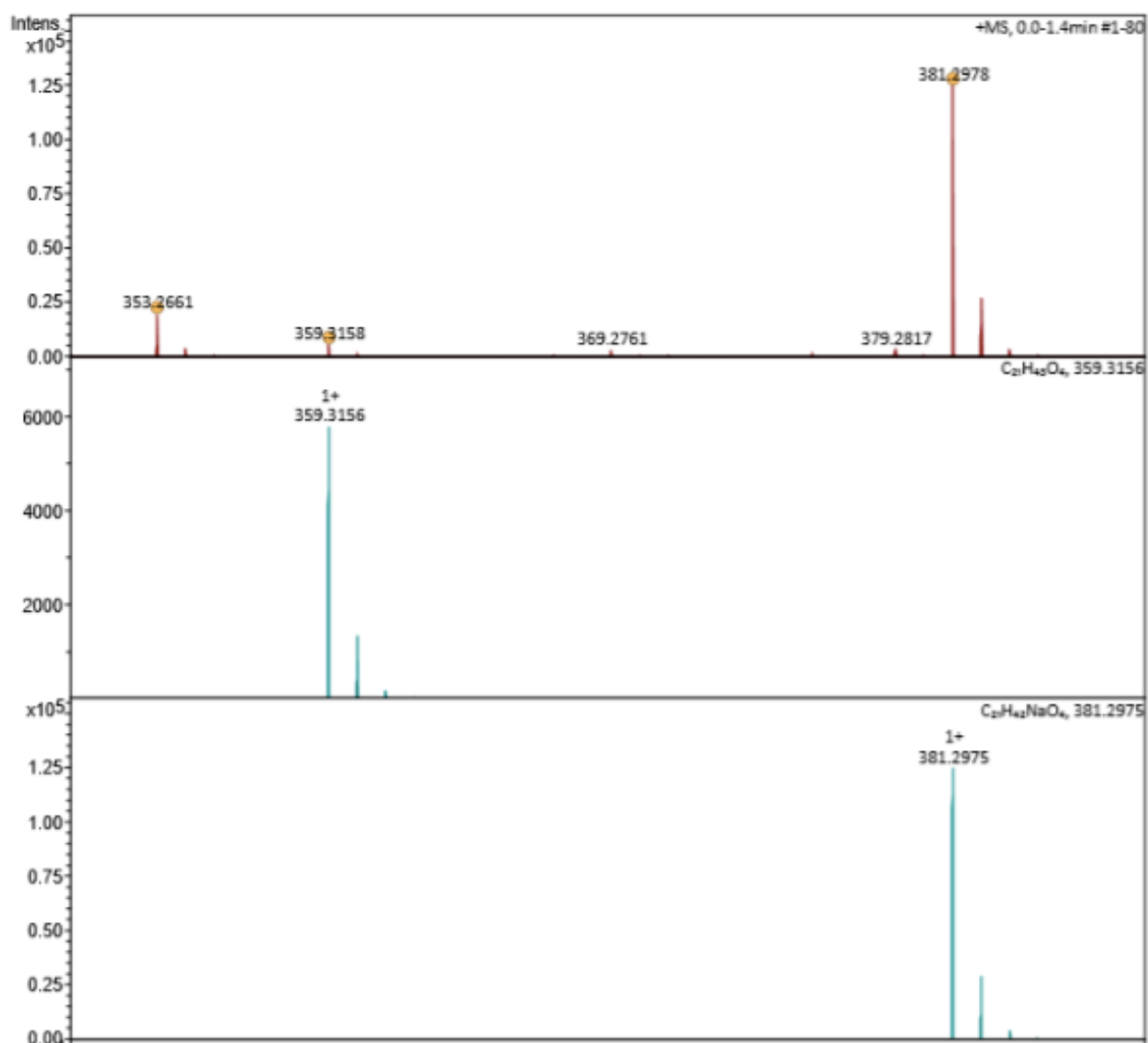
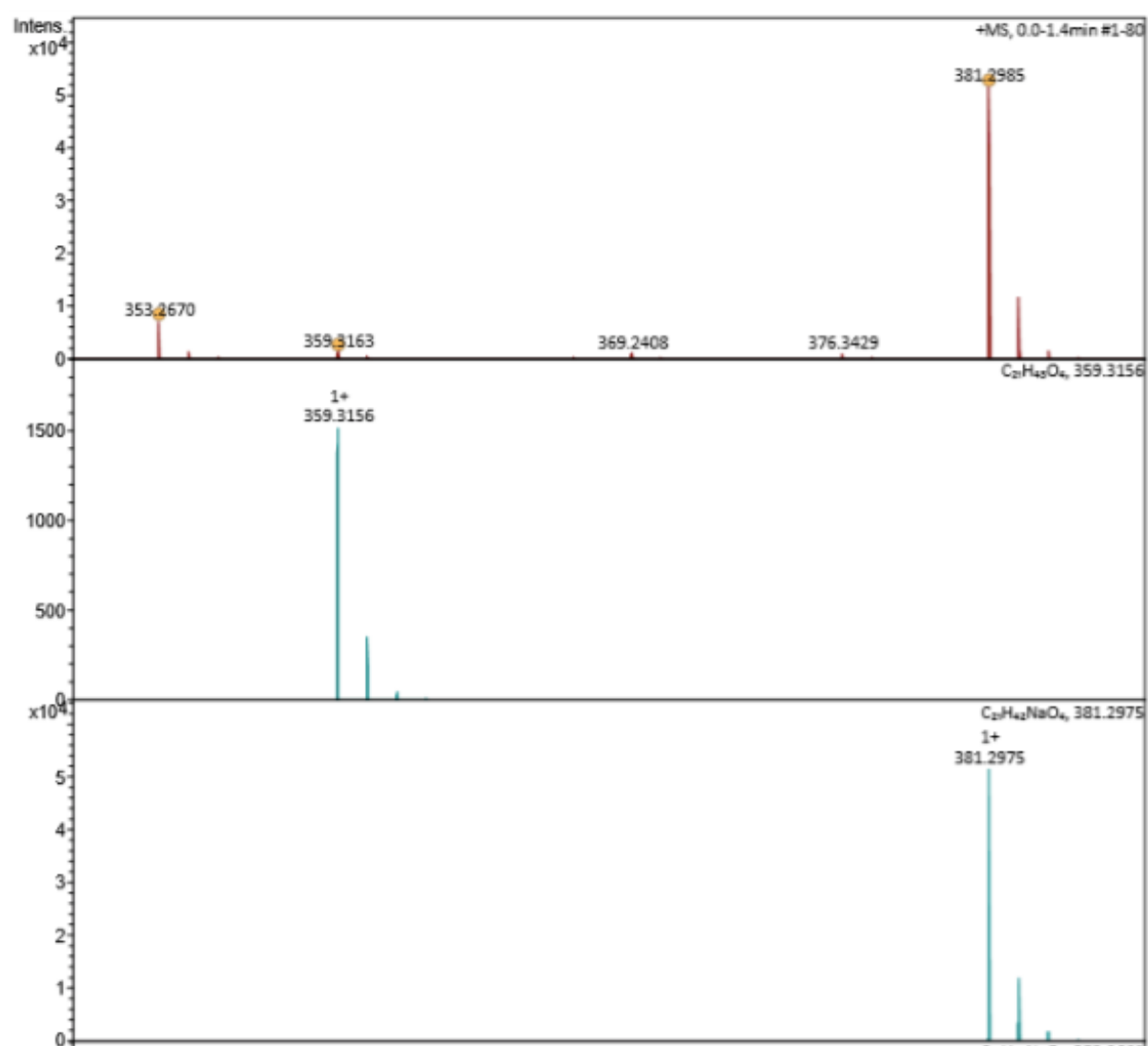


Abbildung XIV: HR-MS-Daten von Substanz H



**Abbildung XV:** HR-MS-Daten von Substanz I