

Band 77 ibvt-Schriftenreihe





Entwicklung kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen auf Basis von Biopolymeren

Christoph Hönnscheidt

Cuvillier-Verlag



ibvt-Schriftenreihe

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig

Herausgegeben von Prof. Dr. Rainer Krull

Band 77

Cuvillier-Verlag Göttingen, Deutschland Herausgeber Prof. Dr. Rainer Krull Institut für Bioverfahrenstechnik TU Braunschweig Gaußstraße 17, 38106 Braunschweig www.ibvt.de

Hinweis: Obgleich alle Anstrengungen unternommen wurden, um richtige und aktuelle Angaben in diesem Werk zum Ausdruck zu bringen, übernehmen weder der Herausgeber, noch der Autor oder andere an der Arbeit beteiligten Personen eine Verantwortung für fehlerhafte Angaben oder deren Folgen. Eventuelle Berichtigungen können erst in der nächsten Auflage berücksichtigt werden.

Bibliographische Informationen der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über *http://dnb.d-nb.de* abrufbar.

1. Aufl. – Göttingen: Cuvillier, 2016

© Cuvillier-Verlag · Göttingen 2016 Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen Telefon: 0551-54724-0 Telefax: 0551-54724-21 www.cuvillier.de

Alle Rechte, auch das der Übersetzung, vorbehalten

Dieses Werk – oder Teile daraus – darf nicht vervielfältigt werden, in Datenbanken gespeichert oder in irgendeiner Form – elektronisch, fotomechanisch, auf Tonträger oder sonst wie – übertragen werden ohne die schriftliche Genehmigung des Verlages.

1. Auflage, 2016 Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 978-3-7369-9260-3 eISBN 978-3-7369-8260-4 ISSN 1431-7230

Entwicklung kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen auf Basis von Biopolymeren

Von der Fakultät für Maschinenbau

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde

eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Christoph Hönnscheidt

aus Saarbrücken

eingereicht am: 12.11.2015 mündliche Prüfung am: 29.01.2016

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr.-Ing. Arno Kwade Gutachter: Prof. Dr. habil. Rainer Krull Prof. Dr. Georg Garnweitner

"Whatever you're thinking and feeling today is creating your future" – unknown author -

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig und wurde im Rahmen der DFG-Forschergruppe FOR 856 *mikroPART - Mikrosysteme für partikuläre Life-Science-Produkte* durchgeführt. Viele Beteiligte haben auf unterschiedlichste Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, denen ich an dieser Stelle dafür danken möchte.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. habil. Rainer Krull danke ich für die Aufgabenstellung und die interdiszipliniären Freiheiten, die er mir während meiner Zeit gegeben hat, eigene Ideen in das Projekt einfließen zu lassen. Stets durch kritische, wie auch fachliche Diskussionen konnten damit die Brücke zur Fragestellung von innovative Wirkstoftransportsystemen geschlagen werden.

Prof. Dr. Georg Garnweitner danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats und Prof. Dr.-Ing. Arno Kwade für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes. Allen Kooperationspartnern der mikroPART-Forschergruppe danke ich für die institutsübergreifende, kollegiale und produktive Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt den Kollegen des Instituts für Chemische und Thermische Verfahrenstechnik und des Instituts für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig.

Besonderen Dank möchte ich auch an die Verantwortlichen aus den anderen Instituten richten, mit denen der Pfad einer interdisziplinären Arbeit geebnet werden konnte. Danke an Prof. Robert Hänsch vom Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig, Prof. Henning Menzel aus dem Institut für Makromolekulare Chemie der TU Braunschweig, Dr. Rebekka Biedendieck aus dem Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig, Prof. Michael Volkert von der University of Massachusetts, Medical School, Worcester, USA und Prof. Argyrios Margaritis von der University of Western Ontario, London, Kanada.



Weiterhin möchte ich mich herzlich bei allen Technischen Angestellten bedanken, die mir mit ihrer Expertise sehr viel geholfen haben. Aufgezählt sind das vom IBVT Yvonne Göcke, Sandra Hübner, Cord Hullmann, Elena Kempf und Detlev Rasch, vom ICTV Sabine Knoblauch und Simone Schulze, vom IFW Peter Pfeiffer sowie von der AG Prof. Rau Wolfgang Grassl.

Danke an alle Kollegen des ibvt für das stets gute Arbeitsklima. Frau Christl Kahmann und ihrer Truppe aus dem Sekretariat danke ich besonders für den reibungslosen Ablauf in der Verwaltung und für alle Hilfestellungen bei bürokratischen Fragen.

Meinem ehemaligen Masterstudenten M.Sc. Dirk Kreyenschulte danke ich für sein außerordentliches Talent, sein großes Engagement, seine Eigeninitiative und seine Kreativität, die er in seine Masterarbeit jeden Tag eingebracht hat.

Meiner Familie, meiner Partnerin und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mich stets in allem unterstützt und mir immer bei schwierigen Entscheidungen zur Seite gestanden haben.

Christoph Hönnscheidt

Braunschweig, im März 2016

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Maschinenbau, vertreten durch den Mentor Prof. Dr. Rainer Krull der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Artikel in Fachzeitschriften

Hoennscheidt, C., Margaritis, A., Krull, R. Novel applications of ubiquinone biopolymer nanocarriers for preventive and regenerative therapeutics: the *Saccharomyces cerevisiae* paradigm. International Journal of Pharmaceutics 478 (2015), 416 - 425, DOI:10.1016/j.ijpharm.2014.11.034.

Hoennscheidt, C., Kreyenschulte, D., Margaritis, A., Krull, R. Production of stable nano-dispersions using esterified y-polyglutamic quinine acid biopolymer. **Biochemical** Engineering Journal 79 (2013). 259 -266. DOI: 10.1016/j.bej.2013.08.004.

Hoennscheidt, C., Krull, R. Biodegradable surfactants for advanced drug delivery strategies. World Academy of Science, Engineering and Technology (WASET), International of Biological, Life Science and Engineering 7(79) (2013), 801-811.

Tagungsbeiträge

Hoennscheidt, C., Krull, R. Development of single- and multiphase microreactors as screening tools for biological processes. Concluding colloquium of the Research Unit 856 mikroPART - Microsystems for Particulate Life Science Products, Braunschweig, Juni 2014 (Poster).

Hoennscheidt, C., Margaritis, A., Krull, R. Drug encapsulation into biodegradable nanoparticle templates. Dechema Himmelfahrtstagung Biomaterials – Made in Bioreactors, Proc., 71 – 72, P23, Radebeul, Mai 2014 (Poster).



Hoennscheidt, C., Krull, R. Modern drug delivery carriers made by applied biotechnology. BRICS forum 2014, Poster 2.06, HZI Braunschweig, März 2014 (Poster).

Hoennscheidt, C., Krull, R. Biodegradable surfactants for advanced drug delivery strategies. International Conference on Biotechnology and Bioengineering ICBB 2013, Stockholm, Sweden, Juli 2013 (Präsentation).

Hoennscheidt, C., Kreyenschulte, D., Margaritis, A., Krull, R. A novel screening system for the study of controlled release of drugs from nanoparticles in microreactors. Vortrags- und Diskussionstagung Biopharmazeutische Produktion, Kurzfassungsband, P 27, 85 – 86, Freiburg, Mai 2012 (Poster).

Kurzfassung

Die großen Fortschritte bei der Erzeugung nanoskaliger Transportsysteme lassen heutzutage eine breite Anwendung bei verschiedenen therapeutischen Fragestellungen zu. Ein besonders vielversprechender Ansatz stellt in diesem Zusammenhang die Entwicklung von maßgeschneiderten Wirkstoffformulierungen dar. Aus einem Entwicklungsprozess gehen nunmehr Wirkstoff-beladene Partikeln mit definierter Oberflächenzusammensetzung hervor, die eine lokale Wirkung an Entzündungsherden entfalten. In dieser Arbeit wurde ein Ansatz zur Entwicklung einer kolloiddispersen Ubichinon-Formulierung verfolgt, bei dem der schlecht wasserlösliche Radikalfänger unter Verwendung von gezielt modifizierten y-PGA-Derivaten in eine geeignete Darreichungsform überführt werden konnte. Das biopolymere Ausgangsmaterial y-PGA wurde aus einem optimierten Batch-Prozess mit dem Stamm Bacillus licheniformis gewonnen. Hier konnten über den phasenabhängigen Verlauf große Mengen an y-PGA in der Kultivierungsbrühe erhalten werden. Aufgereinigtes γ-PGA bildete nunmehr als Schlüsselkomponente das Grundgerüst zur schrittweisen Umwandlung in ein grenzflächenaktives Amphiphil. Mit diesem Ansatz konnten kolloiddisperse Ubichinon-Formulierungen auf Basis einer elektrostatischen sowie sterischen Stabilisierung hergestellt werden. Bei der Charakterisierung der Partikelgrößenverteilung zeigten sich bezüglich der unterschiedlichen Stabilisationsstrategien signifikante Unterschiede im physikochemischen Verhalten unter physiologischen Bedingungen. Auf Basis der antioxidativen Eigenschaften von Ubichinon wurde für in vitro-Untersuchungen ein Kultivierungsprozess mit Saccharomyces cerevisiae N34 entwickelt, mit dem die stressmindernde Wirkung der kolloiddispersen Ubichinon-Formulierungen auf eine gezielt oxidativ gestresste Hefe-Kultur untersucht werden konnte. Im Vergleich zu einer bereits etablierten Polyvinylalkohol-stabilisierten Ubichinon-Formulierung wurde eine signifikante Reduktion von oxidativem Stress im lebenden Organismus erzielt.

Abstract

Latest progress in the manufacture of nano-scaled carrier systems provides diverse applications in the field of therapeutic treatments. A highly promising approach is given by the design of customized drug formulations. The step-wise process forms drug-loaded particles with highly defined surface composition to affect localized drug effects on the site of inflammation. In this work, a design of ubiquinone drug formulations has been developed to overcome the poorly water soluble characteristics of the radical scavenger by bringing the compound into a suitable dosage form. As a special treatment, modified y-PGA-derivatives have been used as highly efficient surfactants. Biopolymeric y-PGA was produced during batch fermentation of Bacillus licheniformis and could be used for a surfactant design as initial material. Over the course of cultivation high amounts of y-PGA could be phasedependently obtained and further isolated. The poly-anionic compound was step-wise modified to receive a surface-active amphiphil. Based on these customized components, colloidal dispersed ubiquinone formulations with different stabilizing strategies have successfully been manufactured. Both formulations showed in light scattering experiments, as expected, different physico-chemical behavior under physiological conditions. In terms of the anti-oxidative characteristics of ubiquinone, further focus was put on potentially stress minoring effects during oxidative stress. Therefore, a cultivation process with the yeast strain Saccharomyces cerevisiae N34 was established to realize *in-vitro* investigations with specifically stressed yeast culture. The results demonstrated a significant reduction of oxidative stress in the presence of ubiquinone formulations next to ubiquinone reference formulation with polyvinyl alcohol as stabilizing agent.

Inhaltsverzeichnis

1	Einle	eitung und Zielsetzung1
2	Aktu	eller Stand der Forschung kolloidaler Wirkstofftransportsysteme5
2	2.1 E	Eigenschaften von kolloiddispersen Materialien5
	2.1.1	Einteilung von dispersen Stoffen5
	2.1.2	Amphiphile Substanzen11
	2.1.3	Grenzflächeneigenschaften partikulärer Einheiten14
	2.1.4	Koagulation im elektrolytischen Umfeld18
	2.1.5	Methoden zur Charakterisierung kolloiddisperser Materialien19
	2.1.6	Klassifikation therapeutisch wirksamer Formulierungen23
	2.1.7	Therapeutische Ansätze mit kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen.24
2	2.2 N	Aaßgeschneiderte Entwicklung von biopolymeren Amphiphilen27
	2.2.1	Biotechnologische Herstellung von γ-PGA mit Bacillus licheniformis27
	2.2.2	Chemische Integration des hydrophoben Effektes in γ-PGA28
	2.2.3	Fluoreszenz-basierte Bestimmung des Kopplungsgrades
	2.2.4	Glykosilierung von Poly(-γ-GA- <i>r</i> -L-TrpE)33
2	2.3 /	n vitro-Untersuchungen mit dem Modellorganismus S. cerevisiae
	2.3.1	Morphologische Formen von S. cerevisiae N34
	2.3.2	Untersuchungen zum Wachstum und Größenverteilung an Hefezellen 38
	2.3.3	Gefahrpotentiale von ROS
	2.3.4	Gezielte Initiierung von oxidativen Stress40
	2.3.5	Nachweis von oxidativem Stress mit S. cerevisiae N3440
3	Mate	erialien und Methoden43
3	3.1 E	Biotechnologische Produktion von γ-PGA43
	3.1.1	Batch-Kultivierung von <i>B. licheniformis</i> 9945A43
	3.1.2	Separation und Aufreinigung von γ-PGA49

XIII

3.2 Cł	nemische Modifikation von γ-PGA52
3.2.1	Einbau der amphiphilen Eigenschaften52
3.2.2	Quantitative Bestimmung des L-TrpE-Anteils über Fluoreszenz52
3.3 Ko	blloiddisperse Materialien
3.3.1	Herstellung kolloiddisperser Ubichinon-Wirkstoffformulierungen53
3.3.2	Quantifizierung von Ubichinon54
3.3.3	Analyse zur statistischen Partikelgrößenverteilung55
3.3.4	Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen56
3.3.5	Stabilitätsstudien der kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen unter physiologischen Bedingungen56
3.4 <i>In</i>	<i>vitro</i> -Untersuchungen
3.4.1	Batch-Kultivierung von S. cerevisiae57
3.4.2	Erweiterung zur sequentiellen Fed Batch-Kultivierung59
3.4.3	Stressinduktion durch Diamid60
3.4.4	ROS-Detektion61
3.4.5	Metabolische Aktivität61
3.4.6	Untersuchung stressmindernder Effekte durch kolloiddisperse Wirkstoffformulierungen62
4 Ergeb	nisse und Diskussionen63
4.1 Mi	krobielle γ-PGA-Produktion63
4.1.1	Batch-Kultivierung von Bacillus licheniformis ATCC 9945A63
4.1.2	γ-PGA-Aufreinigung65
4.1.3	Analytische Bestimmung der molaren Masse von γ-PGA67
4.1.4	Optimierte Prozessführung mittels integrierter Querstromfiltration68
40 M	aßgeschneiderte Entwicklung von biopolymeren Amphiphilen71
4.2 101	
4.2 10	Charakterisierung von γ-PGA72
4.2 Ma 4.2.1 4.2.2	Charakterisierung von γ-PGA72 Chemische Integration des hydrophoben Effektes in γ-PGA75
4.2 Ma 4.2.1 4.2.2 4.2.3	Charakterisierung von γ-PGA72Chemische Integration des hydrophoben Effektes in γ-PGA75Glykosilierung von Poly(-γ-GA- <i>r</i> -L-TrpE)79
4.2 Ma 4.2.1 4.2.2 4.2.3 4.3 Ch	Charakterisierung von γ-PGA

6	Litera	tur	.115
5	Zusan	nmenfassung und Ausblick	.111
	4.4.3	Stressprofil in Anwesenheit kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen	.103
	4.4.2	Nachweis von oxidativem Stress an S. cerevisiae N34	97
	4.4.1	Prozessoptimierung bei der Kultivierung von Hefezellen	94
4	4.4 <i>In</i>	vitro-Untersuchungen an der Hefe S. cerevisiae N34	94
	4.3.4	Stabilität unter physiologischen Bedingungen	90
	4.3.3	REM-Bildanalyse	87
	4.3.2	Oberfläche, Volumen und Wirkstoffbeladung	84

XV

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

	Bedeutung	Einheit
as	Kopfgruppenplatzbedarf	
ATP	Adenosintriphosphat	
BTM	Biotrockenmasse	(mg)
Cmc	critical micelle concentration	(mg L ⁻¹)
Cs	Substrat-Konzentration	(gs L ⁻¹)
СР	Produkt-Konzentration	(g _P L ⁻¹)
CX	Biotrockenmasse-Konzentration	(g _{BTM} L ⁻¹)
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy	
D	Durchmesser	(µm)
d _{Abbe}	Abbe-Durchmesser	(µm)
d _{app}	apparenter Durchmesser	(µm)
d _{Fe}	Feret-Durchmesser	(µm)
D _{H2O}	Diffusionskoeffizient von Partikeln in Wasser	(µm² s⁻¹)
DLS	Dynamische Lichtstreuung	
E	Elementarladung eines Elektrons	(1,602·10 ⁻¹⁹ C)

XVII

 \mathbb{Q}

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
Dann	Desoxyribonukleinsäure	
ds	oberflächengleicher Kugeldurchmesser	(µm)
dv	volumengleicher Kugeldurchmesser	(µm)
EB ₅₀	mittlere effektive Beladung	(mgaktive Substanz gBTM ⁻¹)
EB _{99,5}	Sättigungsbeladung	(mg _{aktive} Substanz gBTM ⁻¹)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid	
FBRM	Focused Beam Reflectance Measurement	
FADH ₂	reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid	
FMNH ₂	reduziertes Flavinmononukleotid	
GFP	Green Fluorescent Protein	
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie	
GSH/ GSSG	Glutathion/Glutathiondisulfid	
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	
He-Ne-Laser	Helium-Neon-Laser	
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance	(-)
HMW	High-Molecular-Weight	(kDa)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	
I	lonenstärke	

XVIII

ls	Streuintensität	
k _В	Boltzmann-Konstante	(1,381·10 ⁻²³ J K ⁻¹)
L	Länge	
LB-Medium	Komplexes Nährmedium	
LCST	Lower Critical Solution Temperature	
LED	Licht-Emittierende Diode	
L-TrpE	L-Tryptophanethylester	
Μ	Molare Masse	(g mol ⁻¹)
ML	Molare Masse des lipophilen Anteils	(g mol ⁻¹)
M _H	Molare Masse des hydrophilen Anteils	(g mol ⁻¹)
mRNA	messenger RNA	
MTP	Mikrotiterplatte	
MWCO	Molecular Weight Cut-Off	(µm; kDa)
N _A	Avogadro-Konstante	(6,022·10 ⁻²³ mol ⁻¹)
NADH/H+	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid	
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat	
NLC	Nanostructured Lipid Carriers	
OD _{450nm}	Optische Dichte bei λ = 450 nm	(-)
OD _{600nm}	Optische Dichte bei λ = 600 nm	(-)

XIX

o/w	Öl-in-Wasser	
OXR1	Oxidationsresistente Gene	
Р	Packungsparameter	(-)
p 20°C	Dampfdruck bei 20 °C	(Pa)
PEG	Polyethylenglykol	
PES	Polyethersulfon	
PEO	Polyethylenoxid	
PLA	Polylaktid	
PLGA	Polylactid-co-Glycolid	
PVA	Polyvinylacetat	
PVOH	Polyvinylalkohol	
Q ₁₀	Ubichinon	
REM	Rasterelektronenmikroskopie	
RI	Brechungsindex	(-)
RNA	Ribonukleinsäure	
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies	
S ₀	Grundzustand	
S ₁	erster angeregter Zustand	
S ₂	zweiter angeregter Zustand	

Sinθ	Numerische Apertur	(-)
SDS	Natriumlaurylsulfat	
SLN	Solid Lipid Nanoparticles	
SOD	Superoxid-Dismutase	
т	Temperatur	(K; °C)
THF	Tetrahydrofuran	
UCST	Upper Critical Solution Temperature	
VS	Volumen	(µm³)
w/o/w	Wasser-in-Öl-in-Wasser	
Y _{P/S}	Ertragskoeffizient	(gProdukt gSubstrat ⁻¹)
Y _{X/S}	Zellertragskoeffizient	(gBTM gSubstrat ⁻¹)
YFP	Yellow Fluorescent Protein	

XXI

Griechische Nomenklatur

	Bedeutung	Einheit
γ-PGA	γ-Polyglutamat	
Σ	Grenzflächenspannung	(N m ⁻¹)
ε٥	Permittivität	(A s V ⁻¹ ·m ⁻¹)
٤r	dielektrische Konstante	(8,854·10 ⁻¹² A s V ⁻¹ ·m ⁻¹)
н	dynamische Viskosität	(Pa s)
Λ	Wellenlänge	(nm)
λ_D	Debye-Länge	(µm)
λ_{Em}	Emissionswellenlänge	(nm)
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge	(nm)
μ_{max}	maximale Wachstumsrate	(h ⁻¹)
φ _{min}	Potentialminimum	
Φ 1,min	erstes Potentialminimum	
Φ 2,min	zweites Potentialminimum	
Ψ_{Wa}	Sphärizität nach Wadell	(-)

XXII

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Wirkstoff-beladenen großen Fortschritte in der Gestaltung von Transportsystemen führen gegenwärtig zu einer bis dato nie erreichten Anwendungsbreite für therapeutische Fragestellungen [1]. Der Ursprung dieser Vehikelsysteme geht dabei auf die Zeit zurück, bei dem schwer wasserlösliche Substanzen dauerhaft in partikuläre Trägersysteme überführt werden sollten, um diese damit zu mobilisieren [2]. Bei Wirkstoffformulierungen mit therapeutischen Anwendungszielen bedeutet eine Mobilisierung des Wirkstoffes gleichermaßen die Erhöhung seiner Bioverfügbarkeit und damit eine signifikante Verbesserung gegenüber der reinen Wirksubstanz. Mit den verfahrenstechnischen Möglichkeiten lassen sich heute nicht nur problemlos kolloiddisperse Systeme herstellen, es kann darüber hinaus auch während des Herstellungsprozesses einen definierten Einfluss auf die Partikelgröße genommen werden [3]. Die Bildung von Partikeln im submikronen Größenbereich stellt hier eine besondere Herausforderung dar. Denn durch den Anstieg des Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses bei kleiner werdenden Partikeln bekommen Grenzflächeneffekte stärkeren Einfluss auf das physikochemische Verhalten. Punktuelle Veränderungen an der Grenzfläche eines Partikels geben hier nun die ausschlaggebende Größe für die Stabilität eines kolloiddispersen Systems vor [4]. Mit der geeigneten Wahl eines funktionalen Oberflächenmoleküls ist es möglich, die Oberflächenbeschaffenheit gezielt anzupassen, so dass langzeitstabile Wirkstoffformulierungen bereitgestellt werden können. Mit Hinblick auf die Anwendbarkeit für therapeutische Zwecke bietet das vielfältige Möglichkeiten zur Gestaltung von kolloiddispersen Materialien als Wirkstoffträgersystem. Der Einbau von Substanzen mit spezifischer Rezeptor-Wechselwirkung bietet darüber hinaus die Möglichkeit, gezielt physiologische Effekte in lebenden Zellen auszulösen [5, 6]. Besonderes Interesse gilt dem selektiven Transport von Wirkstoffträgern an einen definierten Zielort. Der gezielte Transport soll eine unspezifische Verteilung von Partikeln in nicht-betroffenes Gewebe verhindern, was in der Folge die Wirksamkeit der Wirkstoffformulierung am Entzündungsherd stark erhöht und gleichzeitig das Risiko von Nebeneffekten auf ein Minimum reduziert [7-9].



Funktionale Oberflächenmoleküle sind gegenwärtig aus verschiedenen Quellen zugänglich. Es umschreibt eine Stoffgruppe von grenzflächenaktiven Substanzen, die sich vor allem durch ihren amphiphilen Charakter, bedingt durch hydrophile und hydrophobe Anteile, hervorhebt. Sie bilden die Basis zur Stabilisierung kolloiddisperser Materialien. Biopolymere besitzen mit ihren funktionalen Seitengruppen die Flexibilität, gezielt zu solchen Amphiphilen umgewandelt zu werden [10]. Sie weisen darüber hinaus eine hohe Biokompatibilität gegenüber lebenden Zellen aufgrund ihres peptidähnlichen Aufbaus auf. In der industriellen Anwendung hat die biotechnologische Herstellung von biopolymeren Materialien gegenwärtig nur einen geringen Stellenwert. Aus wirtschaftlicher Betrachtung war es lange Zeit schwierig, adäquate Mengen bereitzustellen [11]. Erst seit jüngerer Zeit wird von der Gewinnung quantitativ großer Mengen an funktionalen Biopolymeren über biotechnologische Prozesse berichtet [12]. Hinzu kommt, dass der anschließende Aufreinigungsprozess von Biopolymeren aus einer Kultivierungsbrühe meist einen sehr zeit- und kostenintensiven Aufwand darstellt [13]. Es gibt jedoch Bestrebungen, eine kontinuierliche Separation von biopolymeren Produkten in den Kultivierungsprozess zu integrieren, um den anschließenden Aufarbeitungsschritt damit zu ersetzen. Beispielhaft soll in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf das biotechnologisch zugängliche y-Polyglutamat (y-PGA) als biopolymeres Ausgangsmaterial gelegt werden [14]. Seine funktionalen Carboxylgruppen im polyanionischen Gerüst erlaubt es, das Biopolymer punktuell zu modifizieren [15]. Die gezielte Integration lipophiler Substanzen führt beispielsweise in Folge der hervorgerufenen amphiphilen Eigenschaften zu einer Selbstaggregation des Makromoleküls in wässriger Umgebung [16].

In vitro-Untersuchungen an humanen Zellen stellen bei der Charakterisierung von Wirkstoffformulierungen einen großen zeitlichen Aufwand dar [17]. Besonders während einer Evaluierungsphase, in der kolloiddisperse Wirkstoffformulierungen meist für ein stabiles System iterativ angepasst werden müssen, ist es notwendig, erste Informationen über das Verhalten kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen auf lebende Zellen zu erhalten. Auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse können so Wirkstoffformulierungen angepasst und gezielt weiterentwickelt werden. Um alternativ zeiteinsparende Prozesse zu etablieren, stellt der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* für physiologische Untersuchungen ein geeignetes biologisches System dar. Der eukaryotische Einzeller ähnelt seiner Struktur und seinem Metabolismus stark denen humaner Zellen [18]. Mit einer Generationszeit von

durchschnittlich 90 min kann Probenmaterial für *in vitro*-Untersuchungen innerhalb weniger Stunden zur Verfügung gestellt werden, was die Hefe zu einer potentiellen Alternative für nicht-klinische Voruntersuchungen macht [19]. Als Modell einer derartigen *in vitro*-Untersuchung soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen auf oxidativ gestresste Hefezellen untersucht werden. Metabolisch lässt sich oxidativer Stress auf ein Übermaß an vorliegenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zurückführen [20]. ROS sind freie Radikale, die in Folge einer erhöhten Präsenz in der Zelle unspezifische Schäden verursachen und damit am Ausbruch unterschiedlicher Dysfunktionen beteiligt sein können [21, 22]. Der metabolische Nachweis eines stressmindernden Effektes über extrinsisch zugeführtes Ubichinon scheint hier einen vielversprechenden Ansatz gegenüber ROS darzustellen. Durch seine stark lipophilen Eigenschaften ist es aber notwendig, den Radikalfänger in eine kolloiddisperse Wirkstoffformulierung zu überführen, in der es seine potentiell stressmindernde Wirkung entfalten kann [23].

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit besteht im Einzelnen darin, ein ganzheitliches Abbild von der Wirkung kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen auf lebende Zellen zu schaffen. Dazu müssen fachübergreifende Entwicklungsschritte etabliert und optimiert werden. Zur Bildung funktionaler Amphiphile muss γ-PGA als Ausgangsmaterial in quantitativ hohen Mengen biotechnologisch zur Verfügung gestellt werden. Das impliziert sowohl die Optimierung des Kultivierungsprozesses von *Bacillus licheniformis*, als auch den anschließenden Aufreinigungsprozess. Darüber hinaus interessiert auch eine Kultivierung mit integrierter Produktseparation des Biopolymers während des laufenden Batch-Prozesses. Bei erfolgreicher Umsetzung würde dies den zeit- und kostenaufwändigen Aufreinigungsprozess über die in dieser Arbeit angewandte Kupfer-Komplex-Präzipitation ersetzen.

 γ -PGA bietet durch seine chemische Natur als Poly-Anion die Möglichkeit, gezielt an seinen funktionalen Carboxylgruppen modifiziert zu werden. In einem ersten Schritt müssen zur Schaffung eines grenzflächenaktiven Amphiphils dem Biopolymer daher lipophile Eigenschaften übertragen werden. Der hydrophobe Anteil im Makromolekül führt in der Folge durch Selbstaggregation in wässriger Umgebung zu Assoziationskolloiden. In einem weiteren Schritt soll darüber hinaus eine sterisch abschirmende Komponente an das γ -PGA-Derivat gekoppelt werden, was den Partikeln seine Stabilität unter physiologischen Bedingungen gewährleistet.



Zur Durchführung der *in vitro*-Untersuchungen muss sichergestellt werden, dass die eingesetzten Wirkstoffformulierungen bestimmten Qualitätsmerkmalen entsprechen. Die physiko-chemische Stabilität bildet dafür die wohl wichtigste Voraussetzung. Instabile Wirkstoffformulierungen kollabieren im physiologischen Umfeld, was zu einer starken Reduktion der Bioverfügbarkeit und damit der Wirksamkeit auf lebende Zellen führen kann. Umfassende Untersuchungen physiko-chemischen Hintergrunds müssen eine Stabilität unter den verschiedenen Bedingungen nachweisen.

Mit der Durchführung von reproduzierbaren *in vitro*-Untersuchungen am Hefestamm *S. cerevisiae* können aussagekräftige Informationen über die Wirksamkeit der kolloiddispersen Formulierungen erhalten werden. Um stets gleichbleibenden Bedingungen gerecht zu werden, müssen dazu bestimmte Voraussetzungen geschaffen werden. Die Erweiterung eines Batch-Prozesses zu einem sequentiellen Fed Batch-System scheint für diese Fragestellung eine ideale Lösung zu sein. Damit kann sichergestellt werden, dass bei allen Probennahmen die Hefezellen stets den gleichen Bedingungen unterliegen und somit eine konstante metabolische Aktivität bei *in vitro*-Untersuchungen aufweisen. Daneben müssen Hefezellen bestimmten morphologischen Charakteristika entsprechen, da diese von sehr unterschiedlicher Natur sein können. Unter Verwendung der entwickelten Wirkstoffformulierungen werden im Zuge von *in vitro*-Untersuchungen an einer gezielt oxidativ gestressten Hefe stressmindernde Effekte auf metabolischer Ebene charakterisiert, die das vielversprechende Potential von maßgeschneiderten Wirkstoffformulierungen aufzeigen soll.

2 Aktueller Stand der Forschung kolloidaler Wirkstofftransportsysteme

Gegenwärtig stellt die Entwicklung potentieller Wirkstoffe neue Herausforderungen an die verfahrenstechnische Umsetzung zu geeigneten Darreichungsformen dar. Die zum Teil chemisch maßgeschneiderten sowie pflanzlichen Wirkstoffe können mittlerweile gezielt zur Aktivierung oder Inhibierung bei bestimmten pharmazeutischen Fragestellungen eingesetzt werden [24]. Allerdings stehen demgegenüber oftmals die physiko-chemischen Eigenschaften der Wirksubstanzen. Je komplexer die molekulare Struktur einer aktiven Substanz ist, desto stärker wirken intramolekulare van-der-Waals-Kräfte. Infolgedessen sinkt bei steigendem Einfluss der hydrophoben Anziehungskräfte die Wasserlöslichkeit, die wiederum im direkten Zusammenhang mit einer Reduktion der Bioverfügbarkeit steht [25]. Um dennoch das Potential eines derartigen Wirkstoffes effektiv nutzen zu können, ist in besonderem Maße die Entwicklung zu geeigneten Darreichungsformen erforderlich. Auf Basis der Solubilisierung wie auch der Verkapselung von Wirkstoffen bieten stabilisierte Transportsysteme die Möglichkeit, diese Löslichkeitsbarriere zu überwinden [26, 27]. Die Mobilität eines Wirkstoffträgers befähigt nunmehr die aktive Substanz an den Zielort zu gelangen und dort seine Wirkung zu entfalten [28]. Aufgrund des besonderen Anspruchs an eine pharmaverfahrenstechnische Umsetzung wird der galenischen Weiterentwicklung von Transportsystemen daher eine besondere Schlüsselrolle zugeordnet, auf der im Speziellen in dieser Arbeit eingegangen wird.

2.1 Eigenschaften von kolloiddispersen Materialien

2.1.1 Einteilung von dispersen Stoffen

Aufgrund des vielseitigen Erscheinungsbildes von Partikeln in heterophasigen Systemen ist es zwangsläufig notwendig, diese nach bestimmten Merkmalen voneinander abzugrenzen. Morphologische Unterschiede im Aufbau eines Partikels stellen hier unter Angabe von Äquivalentdurchmessern eine ideale Möglichkeit dar
[29]. Aussagekräftige Informationen sind über den Struktur- und Formfaktor erhältlich. Der Strukturfaktor beschreibt die Partikelgröße durch Angabe des Durchmessers volumengleicher Kugeln (dv) nach Gl. (1), wobei V das Volumen des Partikels ist.

$$d_V = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot V}{\pi}} \tag{1}$$

Der Formfaktor nach Wadell hingegen beschreibt die Sphärizität (Ψ_{Wa}) nach Gl. (2) eines Partikels [29].

$$\Psi_{Wa} = \Psi_{V,S}^2 = \frac{d_V^2 \cdot \pi}{S} = \left(\frac{d_V}{d_S}\right)^2 \le 1$$
 (2)

Die dimensionslose Kennzahl Ψ_{Wa} errechnet sich aus der zweiten Potenz des Quotienten anhand der äquivalenten Durchmesser von volumen- (d_v) und oberflächengleicher Kugel (d_s). Die Größe S stellt dabei die Oberfläche des Partikels dar. Kugelförmige Partikeln besitzen nach dieser Definition einen maximalen Wert von 1. Neben dieser parameterdefinierten Partikeldifferenzierung gibt es darüber hinaus grundsätzlich weitere Möglichkeiten, Partikeln bezüglich ihrer Materialien im Kern und auf der Grenzfläche weiter voneinander zu unterscheiden. Basierend auf der prinzipiellen Gleichheit der in dieser Arbeit eingesetzten organischen Materialien kann aber auf solch eine weitere Abgrenzung verzichtet werden.

Abb. 1 stellt schematisch die Unterscheidung von Partikelmerkmalen dar. Diese beziehen sich auf den Strukturfaktor (d_V) gegenüber dem Formfaktor (Ψ_{Wa}). Partikelgrößen von $d_V < 0,001 \,\mu$ m gehören definitionsgemäß nicht zur Gruppe heterophasiger Systeme. Diese Gruppe wird stattdessen dem Zustand einer echten Lösung zugeordnet. Hier liegt eine homogene Phase eines Stoffgemisches vor. Eine kolloiddisperse Phase kennzeichnet sich durch die Anwesenheit von Partikeln mit einem Partikeldurchmesser von $0,001 \le d_V \le 1,0 \,\mu$ m innerhalb eines mesoskopischen Systems [29]. Aus Abb. 1 lässt sich darüber hinaus erkennen, dass innerhalb dieser Gruppierung eine Vielzahl weiterer Unterteilungen notwendig ist. Die

Kriterien basieren dabei stark auf den zunehmenden Einfluss von Grenzflächeneffekten bei Partikeln mit kleiner werdenden Durchmesser [30]. Der Anstieg von Grenzflächeneffekten ist grundsätzlich auf die Einwirkung verschiedener Kräfte zurückzuführen. Dazu gehören die elektrostatische und Born-Abstoßung sowie die anziehende van-der-Waals-Kraft. Daneben spielt die Debye-Länge durch die Solvatation an der Grenzfläche eine wichtige Rolle. Im Größenbereich von $0,001 \le d_V \le 0,100 \ \mu m$ besitzen diese Kräfte einen besonders großen Einfluss auf das physiko-chemische Verhalten von Partikeln.



Abb. 1. Schematische Unterteilung verschiedener Partikelformen. Aufspaltung über Struktur- (d_v) und Formfaktor (Ψ_{Wa}), wobei p den Packungsparameter beschreibt.

Durch das stetig wachsende Interesse an partikulären Systemen im 20. Jahrhundert ist es zwangsläufig notwendig geworden, aus der Gruppe kolloiddisperser Materialien eine weitere Gruppe für Partikeln innerhalb dieses Größenbereiches zu schaffen. Heute ist diese Gruppe ganz selbstverständlich unter dem Synonym der *Nanopartikeln* bekannt. Ihnen gilt seither ein besonderes Interesse in der Forschung. Nanopartikeln aus anorganischen Materialien können aufgrund ihres großen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses (S/V) völlig unterschiedliche physiko-chemische und spektroskopische Eigenschaften bei abweichenden Partikelgrößen



gleichen Materials aufweisen [31–34]. Beispielhaft seien hier Partikelplasmonen aus reinen Metallen aufgrund ihres hohen Bekanntheitsgrades erwähnt. Solche Partikeln mit hinreichend kleinem Durchmesser besitzen ein Extinktionsmaximum bei einer charakteristischen Plasmonen-Resonanzfreguenz. Die Freguenz ändert sich bei abweichendem Durchmesser des Partikels, was bei einigen metallischen Partikeln zu einer Verlagerung des Maximums in den sichtbaren Wellenlängenbereich zur Folge hat. Daraus resultiert eine charakteristische Farbgebung der Dispersion. Als konkrete Beispiele seien hier Partikelformulierungen aus den Metallen Gold (Au) [35, 36], Silber (Ag) [37] und Kupfer (Cu) [38] genannt. Das Extinktionsmaximum ist darüber hinaus von dessen Form des Primärpartikels abhängig, was die Bedeutsamkeit der Morphologie auf spektroskopische Eigenschaften unterstreicht. Eine Dispersion mit sphärischen Silbernanopartikeln besitzt eine augenscheinlich gelbe Farbe, wohingegen eine Dispersion mit triangulären Silbernanopartikeln blau erscheint [39]. Ein anderes bekanntes und sehr oft umgesetztes nano-basiertes System ist das der Quanten-Dots Nanomaterialien [40. 41]. Diese spielen besonders bei physiologischen Untersuchungen im nanoskopischen Bereich eine wichtige Rolle, die zur Aufklärung von elementaren Prozessen dienen soll [42, 43]. Bei organischen Materialien dieser Größenordnungen spielen besonders die o/w-Mizellen eine bedeutsame kommerzielle Rolle. o/w-Mizellen formen sich bei Anwesenheit von Tensiden mit amphiphilen Eigenschaften [44]. Amphiphile Substanzen sind grenzflächenaktive Moleküle, die eine Tendenz zur Anlagerung an Grenzflächen oder Oberflächen besitzen [45]. Diese wird durch eine Kombination aus hydrophilen sowie hydrophoben Eigenschaften innerhalb eines Moleküls hervorgerufen. In der Folge senken amphiphile Tenside in Lösung die Grenzflächenspannung (σ) bis zur vollständigen Oberflächenbelegung [46]. Der Aufbau eines amphiphilen Tensids kann dabei sehr vielfältig sein. o/w-Mizellen werden in großen Mengen für die Reinigung von Oberflächen und als Zusatz in Shampoos eingesetzt. Strukturell sind Größe und Morphologie das Resultat einer flexibel vorliegenden Dynamik, die durch einen selbstaggregierenden Charakter des amphiphilen Tensids hervorgerufen wird. Der Prozess einer Selbstaggregation setzt bei Überschreitung der kritischen Mizellen-Konzentration (cmc) ein, die stark von der chemischen Natur des Amphiphils abhängt [47]. Oberhalb stofflich charakteristischer Konzentrationen bilden sich Mizellen als neue Phase aus, ohne dass sich das chemische Potential weiter ändert. Bei Erhöhung der Konzentration bleibt somit die Grenzflächenspannung gleich. Sie stellt eine physikalisch messbare, charakteristische Größe dar. Anhand dessen können

Tenside auf ihre Effizienz und Effektivität unterschieden werden. Die Triebkraft einer Selbstaggregation wird ursächlich durch den hydrophoben Effekt in einem hydrophilen Molekül hervorgerufen [48]. Die Bildung von Assoziationskolloiden ist dabei entropisch bevorzugt [49]. Durch die Summe des gesamten Energieeintrags kann so eine langzeitstabile Dispersion ausgebildet werden [50, 51]. Bekannte Beispiele für hochkomplex angeordnete Supramoleküle kleinster Größe finden sich in der Natur in Form von gefalteten Proteinen (Tertiärstrukturen) und Proteinkomplexen (Quartärstrukturen) wieder [52]. Neben den spezifisch kovalenten Querverknüpfungen ist es primär der Anteil hydrophiler und hydrophober Aminosäureseitenketten, der die treibende Kraft für eine selbstaggregierende Faltung darstellt [53]. Bei chemisch zugänglichen Polymeren gehören nanoskalige Gauß-Knäuel wie Polystyrole (Latexkügelchen) [54] oder die Pluronics [55] zu den derzeitig im Fokus der Forschung stehenden Materialien.

Eine Weiterentwicklung der mizellaren Assoziationskolloide stellt die Gruppe der Liposomen dar [56]. Durch ihren komplexeren Aufbau besitzt diese Gruppe von kolloiddispersen Materialien Partikelgrößen in einem Bereich von $0,1 \le d_V < 1,0 \mu m$. Physiko-chemisch bestehen liposomale Formulierungen einer aus grenzflächenaktiven Doppelschichtmembran, arundsätzlich was dem Erscheinungsbild eines w/o/w-Vesikels entspricht [45]. Zur Bildung eines Vesikels müssen einige Bedingungen erfüllt sein, die zu einer bestimmten Krümmung führen. Dabei spielt der sogenannte Packungsparameter (p) nach Gl. (3) eine entscheidende Rolle.

$$p = \frac{v_S}{a_S \cdot L} \tag{3}$$

beschreibt Verhältnis Dieser das aus dem Volumen (V_S) , dem Kopfgruppenplatzbedarf (as) und der Länge (L) eines Amphipihils. Der Wert definiert eine bevorzugte Krümmung der Moleküle an der Grenzfläche. woraus Aggregationsformen vorausgesagt werden können. Tab. 1 zeigt dazu charakteristische Richtwerte auf.



Tab. 1. Beispiele charakteristischer Packungsparameter unterschiedlicher Strukturen.

Kugel	Zylinder	Doppelschichtmembran
p < 0,33	0,33 < p < 0,5	0,5 < p < 1

Durch gezielte Beimischungen bestimmter Substanzen kann so eine festgelegte Struktur in einer Mischung erzeugt werden. Liposomen sind aufgrund ihrer Fähigkeit in Gewebe zu penetrieren in der Forschung von besonderem Interesse [57]. Sie können gezielt als Transportsysteme für pharmazeutisch aktive Wirkstoffe genutzt werden. Der umfassende Einsatz als solches begründet sich aus deren physikochemischen Eigenschaft der Solubilisierung von hydrophilen Wirkstoffen im Kern sowie hydrophoben Wirkstoffen in wässrigen der lipophilen Doppelschichtmembran [58]. Durch Größe und Beschaffenheit der Grenzfläche werden sie oft als Strategiemittel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke [59–61] oder auch zur topischen Zellpenetration des stratum corneums der Haut eingesetzt [62, 63]. Neben den vielversprechenden Potentialen der Liposome begleiten diese Partikeln, jedoch zum Nachteil, eine verstärkte Wahrscheinlichkeit zur Koaleszenz [64]. Diese resultiert aus ihrem strukturell dynamischen Aufbau. Um die Stabilität derartiger Transportsysteme dennoch gewährleisten zu können wurden Alternativen zu den bestehenden kolloiddispersen Systemen weiterentwickelt. Dazu gehören die Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) und die Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) [65]. Diese Gruppe von kolloiddispersen Materialien unterscheidet sich von den Liposomen durch seinen ausschließlich hydrophoben Kern, der entweder in festem oder flüssigem Zustand vorliegen kann, seiner flexiblen und Oberflächenbeschaffenheit, Abb. 2.



Abb. 2. Schematischer Aufbau von SLNs bzw. NLCs. Der hydrophobe Kern (orange) ist umgeben vom grenzflächenaktiven Amphiphil (blau). An den funktionalen Gruppen eines Amphiphils können Komponenten (grün) selektiv gekoppelt werden, die sterisch stabilisierende und/oder penetrierende Eigenschaften besitzen können.

10

Aufgrund der vielversprechenden Merkmale sind für diese Arbeit emulsive NLCs als Basis für kolloiddisperse Vehikelsysteme entwickelt und weiterführend in physiologischen Untersuchungen an lebenden Organismen eingesetzt worden.

Partikelgrößen von $d_V > 1 \ \mu m$ zählen zur vollständigen Diskussion von Abb. 1 zu den grobdispersen Materialien. Diese unterscheiden sich von den kolloiddispersen Materialien durch den stark nachlassenden Grenzflächeneffekt. Zumeist beinhalten diese Suspensionen sedimentierende Partikeln, die für die hier fokussierten Anwendungen durch die verbundene Reduktion der Bioverfügbarkeit nicht von Interesse sind.

2.1.2 Amphiphile Substanzen

Der Einsatz amphiphiler Substanzen spielt für die Bildung von kolloiddispersen Materialien eine elementare Rolle. Ihre gegensätzliche Natur bietet die Voraussetzung, mit Grenzflächen in Wechselwirkung zu treten. Damit ist es möglich, einen wasserunlöslichen Partikelkern gegenüber dem hydrophilen Wasser dauerhaft abzuschirmen, die zum Erhalt eines stabilen Primärpartikels in wässriger Umgebung beitragen [66]. Amphiphile Substanzen können von ihrer Natur her sehr unterschiedlich aufgebaut sein. Monomere Tenside sind bekannte Beispiele dafür [67]. Ihr struktureller Aufbau ist von einem hydrophoben Schwanz mit einem hydrophilen Kopf gekennzeichnet. Aber auch Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) [68-76], Polyethylenoxid (PEO) [77-79], Polylaktid-co-Glycolid (PLGA) [80-87], Polylaktid (PLA) [88, 89] oder Polyvinylalkohol (PVOH) sind bekannt für ihre effektive Nutzung als grenzflächenaktive Amphiphile. Darüber hinaus rücken seit den letzten Jahren weitere hochmolekulare Biopolymere vermehrt in den Fokus, bei denen mittlerweile hohe Produktausbeuten aus biotechnologischen Kultivierungsprozessen generiert werden können. Dazu zählt auch das hier in der Arbeit untersuchte y-Polyglutamat (y-PGA) [10, 63] und dessen Derivate [90]. Biopolymere Materialien vermeiden durch ihren metabolischen Abbau naturgemäß eine langfristige Akkumulation in lebenden Zellen und lösen damit gleichbeutend keine Störung bei Stoffwechselfunktionen aus [91]. Das macht sie zu vielversprechenden Kandidaten im Einsatz von therapeutischen Fragestellungen. Das fermentativ isolierte y-PGA ist strukturell ein poly-anionisches Homopolymer, was selbst noch keine amphiphilen Eigenschaften aufweist. Erst die punktuelle Modifikation an den funktionalen

Carboxylgruppen erzeugt eine amphiphile Charakteristik. Diese sind mittels Kondensationsreaktionen zugänglich und zeigen damit individuelle Möglichkeiten gezielt Amphiphile daraus zu formen [92]. Mit seinen funktionalen auf. Carboxylgruppen besitzt das y-PGA zudem ein stark negatives elektrokinetisches ζ -Potential, was die Penetration in lebende Zellen erleichtert [93].

In der vorliegenden Arbeit werden kolloiddisperse Wirkstoffformulierungen auf Basis y-PGA-Derivaten amphiphilen untersucht. Im Fokus stehen dabei von Untersuchungen zur Aufklärung von physiko-chemischen Eigenschaften der Wirkstoffformulierungen sowie ihre physiologische Wirksamkeit auf lebende Zellen. Um einen Vergleich zu bereits etablierten Systemen herzustellen wird darüber hinaus eine Referenzformulierung mit stabilisierendem Polyvinylalkohol (PVOH) als Amphiphil eingesetzt. Abb. 3 stellt den strukturellen Aufbau des PVOH Mowiol 3-85 und von y-PGA dar.



Mowiol 3-85

γ-PGA

Abb. 3. Struktureller Aufbau des Polyvinylakohols Mowiol 3-85 (I = 88 mol-%; m = 12 mol-%) und von γ-PGA.

PVOH ist kommerziell in unterschiedlichen Qualitätsmerkmalen verfügbar. Neben der variierenden molaren Masse können auf Basis seiner großtechnischen Synthese unterschiedlich stark wasserlösliche Formen hergestellt werden. Primär wird bei der Bildung von PVOH erst ein langkettiges Polyvinylacetat (PVA) aus monomeren Vinylacetat gebildet, bei dem das PVOH im nächsten Schritt durch die Hydrolyse des Acetatesters entsteht [94]. Die Nutzung als grenzflächenaktives Polymer setzt eine teilhydrolisierte Form (Hydrolyse-Grad ≈ 88%) voraus, bei der die hydrophilen Anteile die dipolaren Hydroxylgruppen und die hydrophoben Anteile die verbleibenden Acetatester ausmachen. Das eingesetzte PVOH ist auch unter dem Synonym Mowiol 3-85 bekannt, das aus einer Fraktion mit einer molaren Masse von etwa 12.000 g mol⁻¹ separiert wird.

y-PGA ist ein anionisches Homobiopolymer, das sich aus wiederholenden Einheiten der Aminosäure Glutamat zusammensetzt. Eine besondere Eigenschaft, die das hochmolekulare Biopolymer von anderen Proteinen unterscheidet, ist die Verknüpfung der α-ständigen Aminogruppe mit der funktionalen Carboxylgruppe in γ-Stellung [95]. Der strukturelle Aufbau geht mit veränderten makromolekularen Eigenschaften für das gesamte Konstrukt einher, was es zu einem interessanten Material für kommerzielle Zwecke macht [14]. Erstmals wurde y-PGA im Jahr 1934 als Kapselsubstanz von dem Milzbranderreger Bacillus anthracis isoliert und nachgewiesen [96]. Dieser sekretiert gezielt y-PGA zum Schutz gegen proteolytisch wirksame Enzyme höherer Organismen. Diese können nämlich keine y-ständigen Aminosäurebindungen aufspalten und bleiben somit unwirksam gegenüber der Kapselschicht aus y-PGA [97]. Neben anderen prokaryotischen Organismen sind Bacillus licheniformis und auch Bacillus subtilis die bedeutendsten Stämme zur Herstellung des Biopolymers [15]. Das extrazellulär umschließende Biopolymer bietet den Organismen neben ihrer Schutzfunktion darüber hinaus die Möglichkeit, das y-PGA bei Bedarf wieder als externe Stickstoff- oder Kohlenstoffguelle zu nutzen [97]. Die besonderen makromolekularen Eigenschaften des Biopolymers haben einen signifikanten Einfluss auf die Kultivierungsumgebung, in der es sekretiert wird. Durch seinen poly-anionischen Charakter bildet y-PGA in wässrigem Umfeld stark wechselwirkende Wasserstoffbrückenbindungen aus. Diese haben in der Folge einen direkten Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften einer Kultivierungsbrühe. Durch die ansteigende Viskosität ändern sich signifikant Massen-, Sauerstoff- und Wärmetransfer im Kultivierungsmedium [98]. Im Gegensatz zu Newtonschen Fluiden weist das Makromolekül, ein für Polymere typisches nicht-Newtonsches, pseudoplastisches Fließverhalten auf. Bei steigender Scherrate ändert sich die strukturelle Ordnung der einzelnen Polymerketten. Das makromolekulare Netzwerk aus ionischen Brücken löst sich unter Einfluss einer größer werdenden Scherrate voneinander, so dass sich im Verlauf ein scherverdünnendes rheologisches Fließverhalten ergibt [99].

2.1.3 Grenzflächeneigenschaften partikulärer Einheiten

Zur Veranschaulichung von Stabilisierungseffekten an Partikeln in wässriger Umgebung gibt es zahlreiche Modelle, die dieses Phänomen beschreiben. **Abb. 4** zeigt das Gouy-Chapman-Modell (früher Helmholtz-Modell) [58].



Abb. 4. Darstellung des Gouy-Chapman-Modells zur Beschreibung einer sich ausbildenden elektrochemischen Doppelschicht in wässrigem Umfeld.

Unmittelbar an der Grenzfläche bildet sich nach dem Modell von Helmholtz eine elektrochemische Doppelschicht aus. Das Gouy-Chapman-Modell erweitert darüber hinaus das Modell um weitere unterschiedlich angeordnete Schichten, die sich abhängig von der Debye-Länge λ_D einer partikulären Grenzschicht in wässriger Umgebung ausbilden. λ_D beschreibt die Dicke der elektrochemischen Doppelschicht, die umgekehrt proportional zur Wurzel der Ionenstärke I im Medium ist, GI. (4).

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot k_B \cdot T}{2 \cdot N_A \cdot e^2 \cdot I}} \ [10^{-3} \ \mu m] \tag{4}$$

 ϵ_0 ist die Permittivität, ϵ_r stellt die dielektrische Konstante, k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, N_A die Avogadro-Zahl und e die Elementarladung eines Elektrons dar. In einer salzfreien Umgebung entspricht λ_D der Solvathülle eines Partikels. Die Grenzschicht muss bei sphärischen Partikeln entsprechend als gekrümmte Phasengrenze verstanden werden. Unmittelbar an der Phasengrenze konzentrieren sich bei Verwendung von PVOH als grenzflächenaktive Substanz dipolare Ladungen der Hydroxylgruppen in Richtung der wässrigen Umgebung auf. Entsprechend der lokal aufkonzentrierten Ladungsverteilung ordnen sich gegengeladene Moleküle an diese Grenzschicht (Solvatation). In der Folge führt das zu Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Hydroxylgruppen am PVOH mit den angeordneten Wassermolekülen. Eine Solvathülle baut sich zwangsläufig um die Grenzfläche herum auf und bildet so eine elektrochemische Doppelschicht aus. Die sogenannte Stern-Schicht ist charakteristisch für die starre Anordnung von gegengeladenen Molekülen. Bei Betrachtung des Potentialverlaufs ist zu erkennen, dass dieser innerhalb der starren Anordnung mit fortschreitenden $\lambda_{\rm D}$ linear abnimmt. Bei Überschreiten der materialabhängigen Debye-Länge zur Grenzfläche fällt das Potential beim Übergang der starr angeordneten Molekülschichten in eine diffuse Schicht nur noch asymptotisch ab. Bei Betrachtung sich bewegender Partikeln in Wasser, beispielsweise hervorgerufen durch Brownsche Molekularbewegung, liegen stets Scherkräfte eines bestimmten Potentials vor. Diese sind bei einem charakteristisch materialabhängigen Abstand gleich dem Potential der Stern-Doppelschicht. Das konstante Abscheren durch Partikelbewegung führt an diesem Punkt zu temporär auftretenden Ladungen, die wiederum eine physikalisch messbare Größe darstellen. Dieser Abstand wird als elektrokinetisches Oberflächenpotential (Z-Potential) bezeichnet und kann, wie später beschrieben, zur Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität werden. Die genutzt Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht hat in der Folge der Bestimmung kleiner Partikelgrößen Lichtstreuungsmethoden einen besonderen Einfluss. mit Lichtstreuungsmethoden basieren auf der Ablenkung von elektromagnetischer Strahlung an der Grenzfläche eines Partikels über die Polarisierbarkeit der

Elektronen, dem Brechungsindex (RI). Das bedeutet wiederum für das beschriebene Modell, dass eine Wechselwirkung eines Partikels mit elektromagnetischer Strahlung primär an der Stern-Doppelschicht stattfindet, so dass auf Basis der Lichtstreuungsuntersuchungen Partikelgrößen inklusive ihrer Solvathülle ermittelt werden. Daher werden für alle grundlegenden Größenverteilungen basierend auf dem Prinzip der Lichtstreuung in der Größenordnung von $d_V \le 1,000 \,\mu m$ Partikelgrößen mit einem apparenten Durchmesser angegeben, da hier der Einfluss der Solvathülle auf die Partikelgröße signifikant groß ist.

Mit der in **Abb. 5** gezeigten Darstellung der DLVO-Theorie (nach Derjaguin und Landau, Verwey und Overbeck) wurde ein Modell entwickelt, welches das Anziehungs-/Abstoßungsverhalten eines Partikels gegenüber seiner Umgebung erklärt [58].



Abb. 5. Darstellung der DLVO-Theorie in Wasser nach Derjaguin und Landau, Verwey und Overbeck.

Insgesamt sind es drei Kräfte, die unterschiedlich stark an der Grenzfläche eines Partikels wirken. Eine Kraft, die nur bis zu einer sehr kurzen Distanz reicht, ist die sogenannte Born-Abstoßung. Diese beschreibt die Barriere, welche das Überlappen von Orbitalen einzelner Atome verhindert und damit kovalent binden. Einen bedeutsameren Einfluss auf die Abstoßung an einer Grenzfläche hat die

elektrostatische Abstoßung, stark beeinflusst der ausgebildeten von elektrochemischen Doppelschicht. Eine entgegenwirkende Anziehungskraft stellt die sogenannte van-der-Waals-Anziehung dar. Diese beschreibt im Fall von SLNs/NLCs die Anziehung der hydrophoben Kernkomponenten. Resultierend aus den drei wirkenden Potentialen bildet sich die hellblaue Kurve in der rechts separierten Darstellung aus Abb. 5. Der charakteristische Verlauf gibt einen entscheidenden Hinweis auf das Verhalten der Stabilität kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen wieder. In erster Annäherung an das Partikel liegt ein erstes Potentialminimum $\varphi_{1,min}$ vor. Näheren sich nun zwei Partikeln an, so bleiben beide im Abstand $\varphi_{1,min}$ physisorptiv voneinander entfernt. Dieser Vorgang ist reversibel. Erhöht sich der vorliegende Energiebetrag, so können sich die Partikeln durch Überwindung eines Potentialmaximums bis $\varphi_{1,min}$ annähern. Hier findet eine meist unerwünschte Chemisorption statt, die in einem kolloiddispersen System zu irreversibler Aggregatbildung führt. Emulsive Formulierungen koaleszieren in diesem Fall zu größeren Partikeln. Unter Betrachtung dieser physiko-chemischen Charakteristika bedeutet das für die Gestaltung von kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen die Notwendigkeit zur Schaffung einer Barriere, die am Potentialmaximum groß genug sein muss, um durch extrinsische Energieeinflüsse nicht überschritten zu werden.

Neben diesen wirkenden Kräften spielen für die Stabilität einer kolloiddispersen Wirkstoffformulierung zudem sterische Eigenschaften von grenzflächenaktiven Mediatorkomponenten noch eine besondere Rolle. Diese bauen eine räumliche Barriere um den Kern eines Partikels auf. Im Fall der Auflösung von elektrostatischen Abstoßungskräften, wie es unter physiologischen Bedingungen vorkommt, kann eine Stabilität des kolloiddispersen Systems durch sterische Abschirmung weiterhin gewährleistet werden. Der Aufbau derartiger kolloiddisperser Systeme stellt damit ein wirkungsvolles Instrument für therapeutische Formulierungen dar.

2.1.4 Koagulation im elektrolytischen Umfeld

Bei der therapeutischen Anwendung von kolloiddispersen Materialien erfahren die partikulären Einheiten meist einen Wechsel ihrer Umgebung. Physiologische Lösungen beinhalten neben dem Hauptanteil von Wasser viele Salze, niedermolekulare Substanzen, Peptide, deren Fragmente oder Proteine. Ihre Anwesenheit hat großen Einfluss auf das vorliegende Gleichgewicht von Primärpartikeln und deren Agglomeraten und Aggregaten. **Abb. 6** zeigt das bereits vorgestellte Modell der DVLO-Theorie.



Abb. 6. Darstellung der DLVO-Theorie in physiologischem Umfeld. Durch Salzzusatz wird die Potentialbarriere abgesenkt, was zur direken Chemisorption der Partikelkerne führt.

Im Unterschied zu Abb. 5 soll hier der Einfluss von Salzen auf die Wechselwirkungskräfte aufgezeigt werden. Demnach verringert sich das Potential um die elektrostatische Abstoßung signifikant, was in der Summe der wechselwirkenden Kräfte das Herabsenken des Potentialmaximums bedeutet. Kationen oder Anionen können gleichermaßen als Gegenladungen auf die Grenzschicht wirken und damit die Solvathülle des Partikels auflösen [100]. Bei einem Übermaß an ionischer Stärke im soluten Umfeld kann dies zur vollständigen Auflösung der Solvathülle führen, was wiederum in einer verstärkten Annäherung von

partikulären Einheiten resultiert. Im ungünstigsten Fall führt dies zur Absenkung der Potentialbarriere und damit zur irreversiblen Chemisorption von Partikelkernen. Bedingt durch die hohe Wahrscheinlichkeit, dass NLCs in physiologischen Medien agglomerieren oder aggregieren müssen hier stabilitätsgarantierende Strategien zur Aufrechterhaltung von kolloiddispersen Systemen entwickelt werden.

2.1.5 Methoden zur Charakterisierung kolloiddisperser Materialien

Das komplexe Zusammenspiel vieler physiko-chemischer Parameter hat entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften und die Stabilität eines kolloiddispersen Systems. Diese Komplexität erfordert daher für ein ganzheitliches Abbild derartiger Materialien einen Abgleich aus Informationen unterschiedlicher Nachweismethoden. Im Fokus dieser Arbeit stehen insbesondere analytische Methoden, die Informationen über die statistische Partikelgrößenverteilung eines geben können. Daneben kolloiddispersen Systems werden aber auch Messmethoden verwendet, über die bildanalytische Informationen einzelner Wirkstoffformulierungen erhältlich sind. Mit Hilfe der methodischen Absicherung kann so ein zuverlässiges und holistisches Abbild von den in dieser Arbeit eingesetzten kolloiddispersen Systemen geschaffen werden. Konkrete Elemente für die Ermittlung statistischer Partikelverteilungen von dispersen Materialien sind hier Lichtstreuungsmethoden [101]. Mit einer eigens an die Bedingungen angepasste Präparationsmethode ist es zudem möglich, bildanalytische Informationen über ein Rasterelektronenmikroskop (REM) zu erhalten.

Die Charakterisierung von kolloiddispersen Systemen stellt gegenwärtig noch eine besonders aufwändige Herausforderung an die instrumentelle Analytik dar. Je nach Partikelgrößenverteilung besitzen abweichende Partikelgrößen unterschiedliche Streueigenschaften beim Auftreffen von elektromagnetischer Strahlung. Partikeln einer Größe von $\lambda/20$ stellen ein isotropes Streuzentrum dar [102]. Hier wird elektromagnetische Strahlung winkelunabhängig gleich schwach gestreut. Größere Partikeln hingegen besitzen mehrere Streuzentren gegenüber der elektromagnetischen Strahlung, bei welchen der Einfluss in Folge destruktiver und konstruktiver Interferenzen in einem spezifischen Beugungsmuster resultiert, **Abb. 7**.



Abb. 7. Vergleich der Streulichtverteilung bei Durchstrahlen eines roten Lasers ($\lambda = 633$ nm) durch Dispersionen der Partikelgrößen von d_V = 5 µm (links) und d_V = 0,800 µm (rechts) [103] (mit Genehmigung von Malvern Instruments Ltd.).

Die signifikanten Auswirkungen von unterschiedlichen Partikelgrößen auf die Streuintensitäten erfordern zur Darstellung valider Informationen unterschiedliche mathematische Modelle. Zur Veranschaulichung ist in **Abb. 8** die Streuintensität I gegenüber dem Partikeldurchmesser d_v doppelt logarithmisch aufgetragen.



Abb. 8. Streuintensität I als Funktion der Partikelgröße im Größenbereich von $d_V = 0,001$ und 200 µm für sichtbares Licht der Wellenlänge $\lambda = 633$ nm (He-Ne-Laser). Nachbearbeitung aus [103] (mit Genehmigung von Malvern Instruments Ltd.).

20

Bei Partikeln mit deutlich geringerem Durchmesser dv gegenüber der Wellenlänge ist die Streuintensität I proportional zur sechsten Potenz. In der Folge bedeutet das für Partikeln mit einem Durchmesser von $d_V = 0,050 \ \mu m$ eine 10^6 -fache stärkere Streuintensität gegenüber Partikeln mit einer Größe von $d_V = 0,005 \ \mu m$. Mathematische Modelle nach Rayleigh und Rayleigh-Gans-Debye (RGD) bieten hier eine realistische Abbildung der Partikelgrößen für die bestehenden kolloiddispersen Systeme. Sind Partikeldurchmesser etwa gleich der elektromagnetischen Strahlung, so ist die Streuung an den Partikeln anisotrop. Hier bietet das Mie-Modell eine genaue Bestimmung von Partikelgrößen. Bei Partikelgrößen $d_V \ge 5 \ \mu m$ liegt hingegen wieder ein Zusammenhang der Streuintensität I zur zweiten Potenz gegenüber d_V vor. Zur Auswertung dieser Partikelgrößen wird hier das Fraunhofer-Modell verwendet. **Abb. 9** zeigt den schematischen Aufbau eines lichtstreumessenden Gerätes, das sowohl lichtbeugende wie auch -streuende Informationen aus Dispersionen liefert. Hiermit können Größenbereiche zwischen $d_V = 0,020 - 2000 \ \mu m$ aufgelöst werden.





Die Ermittlung der Partikelgrößenverteilung basiert in seinem Ursprung auf der Brownschen Molekularbewegung disperser Partikeln, was wiederum mit der zeitlichen Änderung der Streuintensitäten zusammenhängt. Über das Prinzip der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) lassen sich so statistisch Informationen über den Diffusionskoeffizienten einer Partikelverteilung ermitteln, der wiederum umgekehrt proportional zum apparenten Partikeldurchmesser d_{app} ist [102], Gl. (5). 2 Aktueller Stand der Forschung kolloidaler Wirkstofftransportsysteme

$$d_{app} = \frac{k_B \cdot T \cdot 10^{12}}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot (D_{H2O} \cdot 10^{-6})}$$
(5)

Hier stellt k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, η die dynamische Viskosität und D_{H2O} den Diffusionskoeffizienten von Partikeln in Wasser dar. Aus den Ergebnissen der Lichtstreuungsuntersuchungen lassen sich eine Reihe wichtiger Informationen erhalten, mit denen man einen umfassenden Einblick in das physikochemische Verhalten einzelner kolloiddisperser Formulierungen in wässriger Umgebung erhalten kann. Anzahl- und volumengewichtete Häufigkeitsverteilungen können dabei effektiv als Instrument für den Nachweis charakteristischer Merkmale genutzt werden. Über eine anzahlgewichtete (q_0)-Häufigkeitsverteilung sind beispielsweise Informationen über die kleinste Fraktion vorhandener Primärpartikeln in disperser Phase erhältlich, wohingegen mit einer volumengewichteten (q_3)-Häufigkeitsverteilung Agglomerate oder Aggregate nachgewiesen werden können.

Für eine visuelle Bewertung von kolloiddispersen Materialien bedarf es zur Charakterisierung besonders anspruchsvoller Bestimmungsmethoden. Kolloiddisperse Einheiten sich nämlich nur schwer über lassen den lichtmikroskopischen Nachweis abbilden. Die Ursache liegt im sogenannten Abbe-Limit, einer natürlichen Auflösungsgrenze, wie Gl. (6) zeigt [104].

$$d_{Abbe} = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin \theta \cdot 10^{-3}} \tag{6}$$

Die maximal wahrnehmbare Größe eines Partikels beträgt beispielhaft für das menschliche Auge bei violettem Licht (λ = 380 nm) nach dem Abbe-Limit mit einer maximalen Apertur von n sin θ = 1,5 (n = Brechungsindex; sin(θ) = Akzeptanzwinkel) einen Durchmesser d_{Abbe} von 0,127 µm. Kolloiddisperse Materialien mit ihrem kleinsten Partikeldurchmesser um $d_V = 0,100 \mu m$ könnten in der Folge mit maximal werden. Dies reicht für eine umfassende 0,79 Bildpunkten abgebildet Charakterisierung einzelner Primärpartikeln nicht aus. Hiermit sind allenfalls größere Agglomerate nachzuweisen. Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Methode ist man dagegen in der Lage, strukturelle Gebilde mit einer Auflösung bis zu

 $d_V = 10^{-4} \mu m$ abzubilden [105]. Dieser Ansatz zur Visualisierung bietet damit eine um den Faktor 1000 höhere Auflösung als die Lichtmikroskopie. Es lassen sich hochaufgelöste Bilder von kolloiddispersen Materialien der Größe $d_V = 0,100 \mu m$ mit etwa 1000 Bildpunkten darstellen.

2.1.6 Klassifikation therapeutisch wirksamer Formulierungen

Mit der Darlegung unterschiedlich vorkommender Spezies an kolloiddispersen Materialien müssen diese im Hinblick auf die Verwendung zu therapeutischen Zwecken bestimmte strategische Anforderungen erfüllen. Die Gruppe der Nanopartikeln (0,001 \leq d_V \leq 0,100 µm) besitzt kleine apparente Partikeldurchmesser mit großer Brownscher Molekularbewegung (Diffusionskoeffizient D_{H2O/20°C} von 4,29 - 429,41 µm² s⁻¹), die tief in Gewebe von lebenden Zellen eindringen können [58]. Jedes Partikel trägt aber nur einen vergleichsweise geringen Anteil an Wirkstoff mit sich, so dass die Wirkung pro Teilchen nur sehr gering ist. Bei der Betrachtung sehr grobdisperser Materialien ($d_V > 1,000 \mu m$) trägt jedes Partikel andererseits eine relativ große Menge an Wirkstoff mit sich, jedoch besitzen sie nur eine geringe Brownsche Molekularbewegung ($D_{H2O/20^{\circ}C} \le 0,43 \,\mu m^2 \, s^{-1}$) und können durch ihre Partikelgröße allenfalls nur über aktive Internalisation die Barriere einer Zellwand überwinden [106]. Um nun einen geeigneten Bereich identifizieren zu können, ist es Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis notwendig, sich das (S/V) über den Größenverlauf der Partikeln genauer zu betrachten. Dies soll modellhaft an einem sphärischen Gebilde veranschaulicht werden. Gl. (7) zeigt, dass bei einer Kugel die Zunahme des Durchmessers d sich umgekehrt proportional auf das S/V-Verhältnis auswirkt.

$$S/_{V}(Kugel) = \frac{\pi \cdot d^{2}}{\frac{1}{6} \cdot \pi \cdot d^{3}} = \frac{6}{d}$$
(7)

Für *Nanopartikeln* bedeutet das S/V-Werte zwischen 60 und 6.000 μ m⁻¹, also eine sehr hohe Grenzflächenaktivität. Bei grob dispersen Materialien werden dagegen nur maximale S/V-Werte von 6 μ m⁻¹ erreicht. Tatsächlich scheint ein S/V-Verhältnis zwischen 6 und 60 μ m⁻¹ der ideale Kompromiss für therapeutisch anwendbare

0/

Partikeln darzustellen. Diese sind auf der einen Seite klein genug, um passiv in Gewebe und Zellen zu penetrieren [106], andererseits führen sie ausreichende Mengen an Wirkstoff mit sich, um eine hohe Wirkung am Entzündungsherd auszulösen. Die Unterteilung hilft bei der Einschätzung der potentiellen Wirksamkeit von Wirkstoffformulierung, da innerhalb jedes kolloiddispersen Systems immer ein Gleichgewicht aus Primärpartikeln und idealerweise Agglomeraten besteht. Eine hochwirksame Formulierung zeichnet sich hauptsächlich durch einen hohen Anteil vorliegender Primärpartikeln aus. Obwohl Agglomerate grobdisperse Kolloide darstellen, können diese trotzdem durch die reversible Abgabe von Primärpartikeln zu einer hohen Wirksamkeit führen, wohingegen grobdisperse Aggregate dazu nicht befähigt sind. Auf Basis der gesteuerten Entwicklung ist es idealerweise möglich, die physiko-chemischen Eigenschaften der Formulierungen von Beginn an gezielt zu beeinflussen, so dass diese eine potentiell hohe Wirksamkeit der Formulierung bereitstellt.

2.1.7 Therapeutische Ansätze mit kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen

Die Weiterentwicklungen Herstellung Wirkstoff-beladenen in der von Transportsystemen und die Aufklärung bestimmter physiko-chemischer sowie physiologischer Mechanismen in den letzten Jahren hat ein stetiges Interesse für innovative Ansatzmöglichkeiten in der Medizin geweckt [107]. Besonders bei noch heute schwer zu therapierenden Krankheitsformen gibt es Bestrebungen, neue Strategien zu entwickeln, um diese zukünftig besser behandeln zu können. Dabei spielt der Einsatz kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen eine besonders vielversprechende Rolle. Wirkstoffe, die in kolloiddispersen Formulierungen bereits integriert werden sind Doxorubicin [108, 109] und Paclitaxel [110–112]. Beide werden als Zytostatika zur Behandlung unterschiedlicher Krebserkrankungen eingesetzt [113]. Neben ihrer erfolgsversprechenden Wirkung besitzen diese Wirksubstanzen aber auch gleichzeitig eine starke Toxizität gegenüber gesunden Zellen. Das macht es zwangsläufig notwendig, Strategien zu einem gezielten Transport der Wirkstoffe zu entwickeln. Mit der Verkapselung in kolloiddisperse Transportsysteme scheint dabei eine wirkungsvolle Lösung gefunden worden zu sein [114]. Die Folgen sind ein signifikant starker Anstieg der Wirksamkeit am Entzündungsherd und die gleichzeitige Reduktion von Nebenwirkungen an gesunden Zellen.

Neben der Entwicklung der kolloiddispersen Zytostatika-Formulierungen gibt es auch ein besonderes Interesse an der Entwicklung von Wirkstoffformulierungen, die gegen metabolische Dysfunktionen eingesetzt werden können [115]. Dysfunktionen entstehen in der Regel durch die Verkettung einzelner Fehlfunktionen, die in ihrer Summe bestimmte Krankheitsformen auslösen können [116–124]. Beispielhaft soll das Phänomen des oxidativen Stresses diskutiert werden. Hier entsteht durch die Verkettung einer ganzen Vielzahl unterschiedlicher Faktoren in einer Zelle ein Übermaß an ROS [125]. Chemisch betrachtet gehören diese zu einer Gruppe hochreaktiver Radikale, die unkontrolliert verschiedene Zellschädigungen in einer lebenden Zelle verursachen können [119]. Andererseits gehören diese freien Radikale aber auch zu den essentiellen Bestandteilen im Stoffwechsel und der Signaltransduktion, weswegen ihnen ein ambivalenter Charakter in lebenden Organismen zugeschrieben werden muss [52]. In der Folge eines Übermaßes an freien Radikalen können sich unterschiedlichste Krankheitsformen entwickeln [126-128]. Es konnte nachgewiesen werden, dass mit der Reduktion von ROS die Wahrscheinlichkeit eines Ausbruchs von Dysfunktionen signifikant reduziert werden kann [129]. Humane Zellen sind im bestimmten metabolischen Rahmen in der Lage, mit Hilfe vorhandener Puffersysteme und Radikalfänger das Übermaß an ROS zu kompensieren [125]. Diese können aber durch unterschiedliche Einflüsse negativ beeinflusst werden. Als besonders vielversprechende Strategie soll in der vorliegenden Arbeit die unterstützende Wirkung von extrinsisch zugeführten Radikalfängern, wie dem Ubichinon, bei Ausbruch von oxidativem Stress eingehend untersucht werden.

Mit Ubichinon als körpereigener Radikalfänger liegt eine Substanz vor, mit der ROS-Formen selektiv umgewandelt werden können [130]. Ubichinon ist ein stark lipophiles Molekül, das eine prominente Rolle bei der Zellatmung in humanen Zellen besitzt [18]. Als hauptverantwortliche Komponente im Q-Zyklus (engl. *Quinone cycle*) steuert das transmembrane Ubichinon über Ein-Elektronen-Redoxvorgänge den Aufbau des Protonengradienten im Intermembranraum der Mitochondrien [131]. Dieser Schritt ist essentiell für die Bildung des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP). Aufgrund seines chemischen Aufbaus, **Abb. 10**, besitzt das Ubichinon darüber hinaus die Möglichkeit, reaktive Radikale über die Reduktion zu Ubichinol zu neutralisieren. Diese Eigenschaft macht das Ubichinon zu einem vielversprechenden natürlichem Wirkstoff, der gezielt bei übermäßiger Präsenz von ROS in einer Zelle gegen diese eingesetzt werden kann [131–137].



Abb. 10. Struktureller Aufbau von Ubichinon (Coenzym Q10).

Im Gegensatz dazu ist die Bereitstellung einer wirkungsvollen Darreichungsform von Ubichinon eine besondere Herausforderung. Aufgrund seines langkettigen isoprenoiden Schwanzes ist die Wirkkomponente vollständig unlöslich in Wasser. Um den Wirkstoff aber dennoch in eine bioverfügbare Darreichungsform zu überführen, stellen kolloiddisperse Wirkstoffformulierungen als Transportsysteme ein probates Mittel dar. Als praktikables Verfahren zur Überführung des Ubichinons in eine kolloiddisperse Form hat sich der Prozess einer Hochdruckhomogenisation erwiesen [23]. **Abb. 11** zeigt schematisch den Umsetzungsprozess.



Abb. 11. Schematische Darstellung eines Hochdruckhomogenisationsverfahrens zur Herstellung kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen [138].

Hier wird eine prä-dispergierte Emulsion durch ein Homogenisierventil mit einem Druck von bis zu 2000 bar gepresst. In der Folge der eintretenden Kavitation werden die emulsiven Tröpfchen zu signifikant kleineren Einheiten zerkleinert [139]. Aus dem Umsetzungsprozess mit Ubichinon erhält man schließlich kolloiddisperse Ubichinon-Formulierungen, die die Eigenschaft einer unterkühlten Schmelze besitzen [140].

2.2 Maßgeschneiderte Entwicklung von biopolymeren Amphiphilen

Die grundlegende Voraussetzung für therapeutisch anwendbare Materialien ist stark bestimmt durch deren Biokompatibilität [1]. Basierend auf der proteinähnlichen Spaltung von Säureamid-Bindungen sind daher fermentativ erzeugte und chemisch hergestellte Biopolymere von besonderem Interesse. Zur Gruppe der fermentativ erzeugten Biopolymere gehören insbesondere Chitosan, Alginat und γ -PGA [141–144]. Diese bilden die Grundlage zur Gestaltung von Transportsystemen durch die Verkapselung von Wirkstoffen [142–144]. Besonders γ -PGA mit seinem negativen ζ -Potential besitzt Eigenschaften, die zu einer erhöhten Zellpenetration führen [145]. Mit dem Stamm *Bacillus licheniformis* können quantitativ große Mengen von bis zu 29 g L⁻¹ des hochmolekularen Biopolymers hergestellt werden [15]. Mit der kovalenten Kopplung weiterer Substanzen in das polymere Grundgerüst sind so grenzflächenaktive Amphiphile zugänglich, die in dieser Arbeit wiederum die Basis für die Herstellung von kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen darstellen.

2.2.1 Biotechnologische Herstellung von γ-PGA mit Bacillus licheniformis

B. licheniformis ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes Bakterium. Der Stamm kann für viele biotechnologische Herstellungsprozesse genutzt werden. Neben der Produktion von γ-PGA wird dieser auch zur Herstellung von Proteasen benutzt. Diese werden in der Waschmittelindustrie als Detergentien eingesetzt [146]. Es ist bekannt, dass *Bacillus licheniformis* ATCC9945A bestimmte Enzyme sowie das γ-PGA bei einer Umgebungstemperatur von 37°C selektiv in den extrazellulären Raum sekretiert [147], was während der Prozessführung ideal genutzt werden kann. Somit müssen

Zellen nicht aufgespalten werden, um das Produkt zu isolieren. Darüber hinaus ist in den letzten Jahren vieles zur Optimierung der mikrobiellen γ -PGA-Herstellung unternommen worden [148–150]. Als optimales Kultivierungsmedium hat sich besonders das sogenannte Medium E erwiesen [151]. Dieses Minimalmedium enthält mit den drei Hauptbestandteilen Glycerin (80 g L⁻¹), Citrat (12 g L⁻¹) und L-Glutamat (20 g L⁻¹), inklusive einer festgelegten Zusammensetzung von essentiellen Supplementen, die notwendigen Komponenten zur Glutamat-abhängigen Produktion von γ -PGA [15].

Die anschließende Produktaufreinigung kann für einen biotechnologischen Prozess bis zu 60 % der gesamten Produktionskosten ausmachen [152]. Das liegt an den zum Teil aufwändigen Prozessen, mit denen das Produkt von den restlichen Substanzen separiert werden muss. Daher ist es von besonderer Bedeutung, eine effiziente Aufreinigungsmethode zu entwickeln, mit der ein gualitativ hochwertiges Produkt in großen Mengen isoliert werden kann. Die Effizienz zeichnet sich dabei primär durch die anteilige Rückgewinnung und die Reinheit des Produktes aus. Im Allgemeinen gibt es für die Separation von y-PGA aus einer Kultivierungsbrühe drei unterschiedliche Strategien [142]. Die Fällung des Biopolymers durch Zugabe von Alkohol (Ethanol, Methanol oder Isopropanol) stellt wohl die bekannteste Form dar [13]. Basierend auf dem poly-anionischem Charakter von y-PGA wurden entsprechend Strategien zur Separation aus einer Kultivierungsbrühe entwickelt. Umfangreiche Untersuchungen zeigen den Erfolg durch Ausfällung mittels bestimmter Metall-Kationen. Dazu gehören Cu²⁺, Al³⁺, Cr³⁺ und Fe³⁺ [153]. Sowohl die Optimierungen in der Prozessführung, als auch die Festlegung auf das divalente Kupfer-(II)-Kation als Fällungsmittel führen zu einer nahezu selektiven Ausfällung eines Cu²⁺/y-PGA-Komplexes aus dem Kultivierungsmedium [13]. Daneben wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit eine kontinuierliche Abtrennung von hochmolekularem y-PGA während einer Kultivierung mit der Nutzung von Querstromfiltrationseinheiten realisiert werden kann.

2.2.2 Chemische Integration des hydrophoben Effektes in γ-PGA

Um aus dem isolierten poly-anionischem γ-PGA ein grenzflächenaktives Amphiphil zu formen, muss eine Komponente kovalent in das Grundgerüst integriert werden, die stark lipophile Eigenschaften aufweist. Auf Basis der Nutzung von Komponenten natürlichen Ursprungs bieten sich lipophile Aminosäuren oder deren Derivate wie beispielsweise der L-Tryptophanethylester (L-TrpE) an. Sein aromatisches Indolgerüst kann zur Fluoreszenz angeregt werden, womit quantitative Informationen über den Kopplungsgrad erhalten werden können [154]. Mit dem Kopplungsgrad wiederum lässt sich dem Amphiphil einen charakteristischen HLB-Wert zuordnen [58]. Hierüber lassen sich bestimmte physiko-chemische Merkmale ableiten. Gl. (8) zeigt wie sich der HLB-Wert errechnet.

$$HLB = 20 \cdot \frac{M_H}{M} = 20 \cdot \left(1 - \frac{M_L}{M}\right) \tag{8}$$

Dieser setzt sich aus den molaren Verhältnis der hydrophilen (M_L) und hydrophoben (M_H) Anteile innerhalb eines Amphiphils zusammen [58]. Für die in dieser Arbeit angestrebte Anwendung besitzen die eingesetzten Amphiphile idealerweise Eigenschaften, mit denen vorzugsweise o/w-Emulsionen ausgebildet werden. o/w-Emulgatoren umschließen einen lipophilen Kern und schirmen diesen gegenüber der wässrigen Phase dauerhaft ab. **Tab. 2** zeigt, dass Amphiphile mit einem HLB-Wert von 8 ≤ HLB ≤ 18 diesen Anforderungen entsprechen.

HLB-Wert (-)	Bezeichnung	Charakter
1 - 3	Antischaummittel	Lipophil
3 - 6	w/o-Emulgatoren	Lipophil
8 - 18	o/w-Emulgatoren	Hydrophil

Tab. 2. Differenzierung unterschiedlicher HLB-Werte nach [58].

Über chemische Kondensation mit einem wasserlöslichen Carbodiimid-Crosslinker wie beispielsweise 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) ist es möglich, stöchiometrisch das lipophile Derivat an die funktionalen Carboxylgruppen des γ-PGAs kovalent zu binden [92], **Abb. 12**.



Abb. 12. Darstellung einer Kondensationsreaktion zu einem Säureamid mit dem Crosslinker EDC.

Das daraus gebildete Kammpolymer bildet nunmehr durch den gebildeten amphiphilen Charakter, der zum einen durch das lipophile Aminosäurederivat L-TrpE und zum anderen durch freie Carboxylgruppen hervorgerufen wird, Assoziationskolloide in wässriger Umgebung aus [155], **Abb. 13**.



Abb. 13. Schematisiertes physiko-chemisches Verhalten von Makromolekülen mit amphiphilen Eigenschaften in wässriger Umgebung.

Mit der spontan erzwungenen Selbstaggregation zu Assoziationskolloiden können diese nun effizient eine hydrophobe Komponente wie beispielsweise Ubichinon im Kern verkapseln und dabei gleichzeitig ein stabiles kolloiddisperses System langfristig aufrechterhalten [66, 156, 157].

2.2.3 Fluoreszenz-basierte Bestimmung des Kopplungsgrades

Die Kopplung des Aminosäurederivates L-TrpE besitzt neben seinen stark lipophilen Eigenschaften auch die spektroskopische Fähigkeit, bei einer charakteristischen Anregung mit $\lambda_{Ex} = 285$ nm zu fluoreszieren, was auf das delokalisierte π -Elektronensystem im Indolgerüst zurückzuführen ist [154]. Das fluoreszierende Signal kann hier gezielt zur quantitativen Bestimmung des lipophilen Anteils von L-TrpE im Kammpolymer genutzt werden. Insgesamt hat die Anwendungsbreite der Fluoreszenz innerhalb der letzten Jahre stark an Bedeutung bei der Aufklärung biologischer Fragestellungen gewonnen [158]. Neben der Fluoreszenzspektroskopie und der zeitaufgelösten Fluoreszenz rücken heute verstärkt das Monitoring über Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) und die Aufklärung physiologischer Vorgänge auf molekularer Ebene in den Vordergrund [104, 159–162].

Aufgrund ihrer besonderen Bedeutung soll grundlegend im Folgenden näher auf das Phänomen der Fluoreszenz eingegangen werden. Die Fluoreszenz, die Chemilumineszenz und Phosphoreszenz gehören zu einer Gruppe natürlicher Phänomene, die Bestandteil der übergeordneten Lumineszenz sind. Die Ursache aller lumineszierenden Effekte hat stets gleichen Charakter. Besonders oft treten diese Phänomene bei Molekülen mit delokalisierten π -Elektronensystemen auf. Hier kann elektromagnetische Strahlung mit geringer Energie ein spin-gepaartes Elektron vom energetischen Grundzustand S₀ in einen Zustand höherer Energie S₁ oder S₂ anregen. Jedes Energieniveau besitzt darüber hinaus weitere vibronische Energieniveaus, die von den Elektronen besetzt werden können. Diese sind durch weitere Nummerierungen (n = 0, 1, 2,...) gekennzeichnet. **Abb. 14** zeigt schematisch die elektronischen Übergänge von Absorption und anschließender Emission in einem Jablonski-Diagramm.



Abb. 14. Jablonski-Diagramm zur Darstellung der Übergänge von Valenzelektronen in energetische Anregungszustände [158].

Die Übergänge der Elektronen auf die unterschiedlichen Energieniveaus sind als vertikale Linie gekennzeichnet. Nach dem Franck-Codon-Prinzip finden die elektronischen Übergänge in einem Zeitintervall von 10⁻¹⁵ s statt. Dieser Vorgang ist bedeutend schneller als der einer Kernschwingungsperiode mit 10⁻¹³ s, was auf die geringe Masse der Elektronen zurückgeführt werden kann. In der Folge bleiben die Abstände der Kerne in einem Molekül nahezu gleich, nur der Übergang von Elektronen vom Grundzustand in ein energetisch höheres Niveau kann beobachtet werden. Lumineszierende Anregung ist ausschließlich auf die Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung (Photonen) zurückzuführen. Im Gegensatz dazu ist eine thermische Anregung energetisch zu schwach, um die vibronischen Energieniveaus angeregter Zustände zu erschließen. In der Regel werden durch eine lichtinduzierte Anregung während der Absorption vibronische Energieniveaus ($n \ge 1$) der angeregten Zustände S₁ und S₂ von Elektronen besiedelt. In der Folge einer Gleichgewichtsstabilisation entspannen sich die Elektronen auf die niedrigsten Energieniveaus der angeregten Zustände. Dieser Vorgang wird als innere Umwandlung bezeichnet. Die Dauer beträgt weniger als 10⁻¹² s und ist damit schneller als der der folgenden Emission mit 10⁻⁸ s. Die Absenkung der Energieniveaus des angeregten Zustands auf den Grundzustand erfolgt mit der Abgabe einer elektromagnetischen Strahlung, die um den Anteil des verbrauchten

Energiebetrages innerhalb der vibronischen Übergänge kleiner ist. Dies resultiert in einer Emission geringerer Energie, der Fluoreszenz. Beschrieben wurde dieses Phänomen erstmals 1852 von dem irischen Wissenschaftler Sir George G. Stokes und ist seither als die Stokes-Verschiebung bekannt [158]. Durch das ähnliche Abbild der Energieniveaus und ihrer vibronischen Struktur unterscheiden sich die Spektren von Absorption und Emission in ihrem charakteristischen Abbild nur in ihrem differenziellen Energiebetrag. Das Emissionsspektrum ist zudem unabhängig von der energetischen Anregung, da alle besetzten vibronischen Energieniveaus der angeregten Zustände innerhalb von 10⁻¹² s in das niedrigste Energieniveau übergehen, ehe nach 10⁻⁸ s die Strahlung über Emission wieder abgegeben werden. Diese Eigenschaft wird durch das Gesetz von Kasha beschrieben. Neben der inneren Umwandlung ist auch ein sogenanntes *intersystem crossing* bei der Anregung eines Elektrons im Fluorophor möglich. Dies kennzeichnet die Phosphoreszenz, die hier aber nur der Vollständigkeit halber erwähnt wird, da dieser Effekt im Zusammenhang dieser Arbeit nicht auftritt.

2.2.4 Glykosilierung von Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE)

Nach einer erfolgreichen Umsetzung von γ-PGA zu dem amphiphilen Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE) sollen in dieser Arbeit dem Biopolymer-Derivat weitere Eigenschaften übertragen werden. Im Hinblick auf die Stabilisierung von kolloiddispersen Partikeln unter physiologischen Bedingungen und der Erhöhung einer Penetration lebender Zellen ist der Einbau von Saccharid-basierten Komponenten ein vielversprechender Ansatz [163]. Eine Komponente, die potentiell diese Eigenschaft mit sich bringt, stellt in der vorliegenden Arbeit das tri-aminoglykosidische Kanamycin dar, **Abb. 15**.



Abb. 15. Struktureller Aufbau von Kanamycin.

Durch seinen molekularen Aufbau, bestehend aus drei Aminozuckereinheiten, scheint die Substanz ein geeignetes Agens zur sterischen Abschirmung in einer

 $\langle \! \! \! \! \rangle$

kolloiddispersen Wirkstoffformulierung zu sein. Durch unspezifische Veresterung eines der primären Amine an die funktionalen Carboxylgruppen entsteht via EDC-Kopplung das Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin). Die Aminozuckerbausteine bilden eine starke Solvathülle aus, die zu einer sterischen Stabilisierung der Primärpartikeln führen soll. Der Einbau von Saccharid-basierten Komponenten in das Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE)-Gerüst ist neben der veränderten physiko-chemischen Eigenschaften auch wegen seiner physiologischen Wechselwirkungen auf Zelloberflächen von besonderem Interesse. Glykosilierungsmuster auf Partikeloberflächen können die Aufnahme in lebende Zellen stark erhöhen [163].

2.3 *In vitro*-Untersuchungen mit dem Modellorganismus *S. cerevisiae*

Zur Aufklärung der Wirksamkeit von kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen auf lebende Zellen scheint die Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae für in vitro-Untersuchungen ein geeignetes biologisches System darzustellen [164]. Die starke Ähnlichkeit von Metabolismus und Aufbau gegenüber humanen Zellen bildet dabei eine wesentliche Grundlage. die einen direkten Vergleich aus Untersuchungsergebnissen zulassen [18]. Speziell bei Untersuchungen von oxidativem Stress zeigt die Hefezelle nahezu identische Schutzstrategien auf, wie sie auch bei humanen Zellen zu beobachten sind [165]. Das kann dazu genutzt werden, Voruntersuchungen Wirksamkeit um in nicht-klinischen die einzelner Wirkstoffformulierungen nachzuweisen und gegebenenfalls die Formulierungen in einem iterativen Entwicklungsprozess zu verbessern. Aufgrund der hohen Wachstumsraten und der gleichbleibenden metabolischen Aktivität während einer Kultivierung besitzt die Hefezelle darüber hinaus Eigenschaften, die bioverfahrenstechnisch zur Ermittlung von reproduzierbaren und zuverlässigen Informationen vorteilhaft genutzt werden können [166].

2.3.1 Morphologische Formen von S. cerevisiae N34

Die Vielzahl an morphologischen Formen, die eine Hefezelle annehmen kann, setzt ein grundlegendes Verständnis für dieses biologische System voraus, um gezielt

34

einen bestimmten Typ unter konstanten Kultivierungsbedingungen dauerhaft vorliegen zu haben. Dies wiederum ist Voraussetzung für die Validität und Reproduzierbarkeit des gesamten Screening-Systems bei den angestrebten *in vitro*-Untersuchungen. **Abb. 16** zeigt den grundsätzlichen Ablauf der Zellteilung beim Hefestamm *S. cerevisiae* N34 [18].



Abb. 16. Schematische Abbildung der charakteristischen Teilungsprozesse von S. cerevisiae [18].

Unmittelbar nach der Teilung einer Knospenzelle befindet sich die abgeschnürte Tochterzelle in der Interphase. Hier durchlaufen die Zellen bis zum Einleiten der Mitose einige charakteristische Entwicklungsschritte. Nach Abschnürung einer Tochterzelle beginnt die postmitotische G1-Phase. Die Zelle wächst dabei bis zu einer bestimmten Zellgröße. Der durchschnittliche Feret-Durchmesser d_{Fe} des Stammes *S. cerevisiae* N34 beträgt $5,7 \pm 0,7 \mu$ m und hat ein mittleres Aspekt-Verhältnis von $1,2 \pm 0,2$. Hefezellen sind daher bekannt für ihre leicht ellipsoide Form [167]. Nach Erreichen dieser Größe geht die Zelle in die sogenannte S-Phase über. Diese ist vorwiegend durch die vollständige Replikation der DNA-Bausteine geprägt. Daneben beginnt die Hefezelle eine Knospe an ihrer Zellwand auszubilden, indem ein Chitinring auf der Oberfläche platziert wird und sich daraus die hantelförmige Knospenzelle entwickelt. Über den Verlauf ist ein Wechsel von polarisiertem zu isotropem Knospenzellwachstum zu beobachten, was in der Folge zu etwa gleich großen Zellteilen führt. Im weiteren Verlauf der Interphase, der sogenannten G2-



Phase, findet nochmals eine Prüfung nach Aufteilung der unterschiedlichen Zellkompartimente statt, ehe mit der Mitose, der sogenannten M-Phase, die Zellteilung eingeleitet wird. Nach Teilung der Knospenzelle in Mutter- und Tochterzelle wiederholen sich die Vorgänge zyklisch. Humane Zellen durchlaufen einen kompletten Zyklus in etwa 24 h, der Hefestamm Saccharomyces cerevisiae im Schnitt ungefähr 1,5 h [168]. Abhängig von dem umgebenden Nahrungsangebot kann eine Hefezelle sowohl haploid, als auch diploid vorliegen. Beide Formen sind in der Lage, sich durch wiederholende Zyklen über ein vegetatives Wachstum aber auch über Mitose zu vermehren. Abb. 17 stellt einen ganzheitlichen Zusammenhang der unterschiedlichen Proliferationsvorgänge von S. cerevisiae dar. Diploide Zellen besitzen unter limitierenden Substratbedingungen einen Überlebensmechanismus, bei dem sich eine diploide Zelle über Meiose in eine Spore, dem Ascus, mit vier haploiden Zellen umwandelt. Der Ascus besitzt eine größere Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen als Hefezellen während der stationären Phase. Bei Zufütterung einer Kohlenstoffquelle teilt sich der Ascus in vier haploide Zellen. Diese haploiden Hefezellen mit einfachem Chromosomensatz treten in der Regel in den zwei unterschiedlichen Paarungstypen, dem Typ a und Typ α , auf. Jeder Typ bildet ein eigenes Pheromon, entweder den a- oder α-Faktor, welcher spezifisch auf einen Rezeptor des anderen Paarungstyps bindet. Die Bindung am Rezeptor bewirkt in erster Linie ein Verweilen der Zellen in der G1-Phase, was die Proliferation erst mal einstellt. In der Folge beginnen sich Protuberanzen an den Hefezellen auszubilden und sich gegeneinander auszurichten. Diese besondere Gestalt einer Hefezelle wird als shmoo bezeichnet. Bei ausreichendem Kontakt fangen die Zellen an miteinander zu fusionieren, um wieder eine diploide Hefezelle mit doppeltem Chromosomensatz auszubilden. Somit können bei einer nicht-Kohlenstoff-limitierten Kultivierung von Hefen ausschließlich diploide Zellen im Kultivierungsmedium beobachtet werden, die sich ausschließlich über mitotische Teilung vermehren. Ein weiteres Charakteristikum in der Gestalt von Hefezellen ist die Ausbildung von Pseudohyphen und haploiden Filamenten. Es wird vermutet, dass diese Gestalt die Suche nach Nahrungsguellen außerhalb der residierenden Kolonie erlaubt. Zudem ist die Hefe befähigt Biofilme auszubilden [169]. Hier zeigt sich trotz der vielen Gemeinsamkeiten zu humanen Zellen ein signifikanter Unterschied während der Teilungsprozesse einer Hefezelle. Auf der einen Seite teilen sich humane Zellen gleichermaßen in zwei identische Zellen, bei denen beide anschließend die gleiche metabolische Aktivität aufweisen. Auf der anderen Seite schnürt eine Mutterzelle bei der Hefe während ihres

Lebenszyklus eine weitaus größere Anzahl an Tochterzellen ab, die zu Beginn ihrer G1-Phase eine metabolische Aktivität einer neugeborenen Zelle aufweist [167, 170]. Erst nach einer Abschnürung von über zehn Tochterzellen weisen diese eine geringere metabolische Aktivität auf, die der Mutterzelle entspricht. Dieses Verhalten kann bei *in vitro*-Untersuchung von Wirkstoffen statistisch ausgenutzt werden, da bei der Vermessung einer Kultivierungsbrühe ein Signal von einer großen Vielzahl an Hefezellen aufgenommen werden kann.



Abb. 17. Schematische Darstellung der morphologischen Formen von S. cerevisiae [18].



2.3.2 Untersuchungen zum Wachstum und Größenverteilung an Hefezellen

Inline-Technologien erleichtern die stetige Kontrolle von Zustandsgrößen durch die Bereitstellung einer Echtzeitverfolgung während eines Prozesses. Gleiches gilt für die Überwachung des Hefewachstums in einem Bioreaktor [171]. Als integraler Bestandteil einer partikelmessenden Technologie bietet das sogenannte Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM) die Möglichkeit, in situ-Informationen über die Partikelanzahl sowie die Partikelgrößenverteilung einer Hefekultur in Echtzeit aufzulösen [19]. Das erleichtert den Nachweis konstant vorherrschender die Bedingungen im Bioreaktor. was Technologie damit zu einer Schlüsseltechnologie für Prozessführungen unter stationären Bedingungen macht. Nur die Aufrechterhaltung einer konstanten Biomasse über den gesamten Messverlauf schafft die Voraussetzung zum Erhalt von reproduzierbaren Ergebnissen bei in vitro-Untersuchungen.

Vor Beginn eines Kultivierungsprozesses wird eine FBRM-Sonde in den Bioreaktor eingesetzt. Ein Laserstrahl wird durch einen Strahlteiler geleitet, der auf eine rotierende Optik trifft. Hinter der Optik wird der Laserstrahl dann an einer Linse fokussiert, der in der Folge mit einer Geschwindigkeit von 2 m s⁻¹ kreisförmig rotiert. Trifft der Laserstrahl auf heterogene Materialien wie Hefezellen, so wird dieser reflektiert und nachfolgend mit einem Detektor aufgenommen. Jede Sekunde werden mehr als 10³ partikuläre Sehnenlängen detektiert, aus denen die Anzahl von Partikeln sowie deren Größenverteilung in Echtzeit bestimmt werden kann. Über den Verlauf der Messung lassen sich so zeitabhängige Veränderungen identifizieren. Bei einer Hefezellen im Bioreaktor sind das die Verfolgung Kultivierung von der Wachstumskurve sowie die Bildung von Zellaggregaten unter Kohlenstofflimitierenden Bedingungen. Dieses Prinzip wird gegenwärtig bei Kristallisationsverfahren als Kontrollorgan standardisiert angewandt [172-174]. Bei der Verfolgung von Wachstumsverläufen bei submersen Mikroorganismen allerdings berichten nur wenige wissenschaftliche Arbeiten den Einsatz dieser FBRM-Methode [101].

38

2.3.3 Gefahrpotentiale von ROS

Das Interesse an dem Verständnis um das Altern von Zellen rückt spätestens seit der Zeit, in der Menschen immer älter werden, mehr und mehr in den Fokus der Forschung. Das damit oft in Verbindung gebrachte Auftreten von ROS besitzt dabei eine elementare Bedeutung [133]. Einerseits sind sie integraler Bestandteil der Zellatmung, durch die große Energiemengen in Form von ATP über die Umwandlung von Sauerstoff zu Wasser erzeugt werden. Andererseits treten durch die stufenweise Oxidation des Sauerstoffs zu Wasser reaktive Radikalformen wie das Superoxid-Radikal, das Wasserstoffperoxid und das Hydroxyl-Radikal auf, die bei einer Entkopplung ihrer eigentlichen Funktion zellschädigende wie auch apoptotische Wirkung aufweisen [128]. Zur Verdeutlichung zeigt **Abb. 18** die Redoxpotentiale aller ROS-Formen aufgetragen als Funktion ihrer Halbwertszeit.



Es fällt auf, dass insbesondere die ungeradzahligen Elektronenzustände beim Superoxid- und Hydroxyl-Radikal zu einer vergleichbar starken Reaktivität dieser ROS-Formen führt. Neben den potentiellen Schäden intrinsischer Faktoren können zudem extrinsische Faktoren wie chemische Reagenzien, elektromagnetische



Strahlung oder auch Metalle oxidative Schäden durch ROS um ein Vielfaches verstärken [175]. Aktuelle Untersuchungen berichten sogar von der Korrelation der übermäßigen Bildung von ROS durch metallische Nanopartikel-Formulierungen [127, 176, 177]. Aufgrund des hohen Redoxpotentials der ROS liegt hier der Vergleich nahe, dass diese auch einen direkten Einfluss auf metabolische Stoffwechselwege besitzen und in der Folge die Lebensfähigkeit und -dauer von Zellen negativ beeinträchtigen [178, 179]. Um sich dagegen zu schützen haben eukaryotische Lebewesen unterschiedliche Schutzsysteme gegen den damit in Verbindung gebrachten oxidativen Stress entwickelt [18, 125]. Einer davon umschreibt das Glutathion/Glutathiondisulfid (GSH/ GSSG)-Redox-Puffersystem [180]. Es stellt ein wichtiges Instrument für die kontinuierliche Umwandlung von reaktiven Radikalen in deren nicht-reaktive, vollständig oxidierte Form dar [181, 182]. Das Puffersystem wird darüber hinaus von einer Klasse kleiner Redoxproteine, den Thioredoxinen, unterstützt [134]. Weiterhin sind eukaryotische Zellen in der Lage, Enzyme wie die radikalumwandelnden Superoxid Dismutase (SOD) und die Katalase zu bilden [183].

2.3.4 Gezielte Initiierung von oxidativen Stress

Im Fokus dieser Arbeit steht der Einsatz des Azoesters Diamid, der stellvertretend für die kontrollierte Initiierung von oxidativem Stress steht [178]. Das thiol-oxidierende Agens wird bereits effizient bei vielen unterschiedlichen Organismen zu Untersuchungen von oxidativem Stress eingesetzt [184]. Diamid schaltet die Schutzsysteme des GSH/ GSSG-Puffersystems wie auch die Thioredoxine, durch spezifische Oxidation der Thiol-Gruppen aus. Dies verursacht in der Folge eine intrazelluläre Anreicherung von ROS in der Zelle. Bei Zugabe sehr hoher Diamid-Konzentrationen werden zudem Thiol-Gruppen in Proteinen und Enzymen unspezifisch oxidiert, was in der Folge zum Zelltod führen kann [185].

2.3.5 Nachweis von oxidativem Stress mit S. cerevisiae N34

Zur Betrachtung einer stressmindernden Wirkung von kolloiddispersen Ubichinon-Wirkstoffformulierungen bei oxidativ gestressten Organismen eignet sich der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* N34 [186]. Die chromosomale Modifikation ermöglicht eine Detektion von oxidativen Stress durch eine spezifisch erzeugte Fluoreszenz. Hefezellen besitzen eine Reihe von oxidationsresistenten Proteinen, die

gegenüber quantitativen Mengen von ROS sensitiv sind. Auf ähnliche Weise reagieren humane Zellen [120]. Viele von den oxidationsresistenten Proteinen als Teil der oxidationsresistenten Genfamilie OXR1 werden klassifiziert. Hefemutanten mit einer Deletion des OXR1-Gens zeigen eine erhöhte Sensitivität bei Zugabe von Wasserstoffperoxid [187]. Aufgrund seiner Schlüsselrolle bei oxidativen Stress wurde in den verwendeten Stamm, S. cerevisiae N34, ein GFP-kodierendes Gen in den Promotor des OXR1-Gens integriert, so dass bei seiner Genexpression neben der ROS-umwandelnden Enzyme das grün fluoreszierendes Protein (GFP) gebildet wird [186]. Abb. 19 zeigt den fluoreszierenden Teil des Fluorophors. GFP ist ein 26,9 kDa großes, aus β -Faltblättern aufgebautes β -Fass, das in seinem inneren das Fluorophor positioniert hat [188, 189]. Die chemische Umwandlung, ausgehend von der Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67, bildet während der Faltung ein Über konjugiertes π -Doppelbindungssystem aus. die chemischen Umwandlungsprozesse der Zyklisierung, Eliminierung und der Sauerstoff-basierten Oxidation entsteht ein aktives Fluorophor, welches bei Anregung von blauem Licht grün fluoresziert. GFP besitzt zwei charakteristische Absorptionsmaxima bei einer Anregung von λ_{Ex} = 380 nm und λ_{Ex} = 475 nm [190]. Durch die energetisch starke $\lambda_{\text{Ex}} = 380 \text{ nm}$ Anregung bei beobachtet man ein zeitverändertes Absorptionsspektrum des Proteins, wohingegen dies bei einer Anregung von $\lambda_{Ex} = 475$ nm nicht der Fall ist. Unter diesen Bedingungen bleibt das Fluorophor fotostabil, was das GFP bei dieser Anregungswellenlänge zu einem geeigneten Material für Fluoreszenz-basierte Untersuchungen macht.


Abb. 19. Chemischer Umwandlungsprozess zum Fluorophor in GFP [158].

3 Materialien und Methoden

3.1 Biotechnologische Produktion von γ-PGA

3.1.1 Batch-Kultivierung von B. licheniformis 9945A*

Der Stamm *B. licheniformis* 9945A wurde als gefriergetrocknete Probe von American Type Culture Collection (ATCC) erworben. Zu Beginn wurde der Stamm in einem 50 mL-Schüttelkolben mit 6 mL Medium E reaktiviert. Die Zusammensetzung des Minimalmediums ist in **Tab. 3** aufgelistet [191]. Bei einer Temperatur von 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 200 min⁻¹ wurde das Kultivierungsmedium mit *B. licheniformis* 9945A beimpft und für 24 h in einem Schüttelschrank inkubiert. Bei Erreichen einer Optischen Dichte von $OD_{450nm} = 36,5$ wurde der Ansatz in einen 250 mL-Schüttelkolben mit 50 mL Medium E überführt und unter gleichen Bedingungen für 18,5 h kultiviert. Bei Erreichen von $OD_{450nm} = 15,6$ wurde eine Stammlösung mit je 1 mL Kultivierungsbrühe und Glycerin in jedem Kryo-Röhrchen hergestellt und mit flüssigem Stickstoff auf -196 °C schockgefroren und anschließend zur Lagerung in einem -96 °C Gefrierschrank aufbewahrt.

^{*}Die hier dargestellten Methoden wurden in Zusammenarbeit mit M. Sc. Kreyenschulte und Prof. A. Margaritis im Rahmen der Masterarbeit *Production and purification of* γ *-polyglutamic acid for the preparation of hydrophobically modified nanoparticles* entwickelt [191].

Tab. 3. Zusammensetzung von Medium E (p	эΗ	6,5)
---	----	------

Kohlenstoff-/ Stickstoffquelle	Konzentration (g L ⁻¹)
L-Glutamat	20
Glycerin	80
Tri-natriumcitrat	16
Ammoniumchlorid	7
Supplemente	Konzentration (g L ⁻¹)
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K2HPO4)	0,5
Eisen-(III)-chlorid Hexahydrat (FeCl ₃ · 6 H ₂ O)	0,04
Kalziumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ · 2 H ₂ O)	0,15
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	0,5
Mangansulfat Monohydrat (MnSO ₄ · H ₂ O)	0,1

Batch-Kultivierungen wurden in einem 3 L-Bioreaktor (BioFlo 110 Modular Benchtop Fermentor, New Brunswick Scientific Co., Inc., USA) mit einem Arbeitsvolumen von durchgeführt. Sensoren zur Detektion von pH-Wert 1,4 L und dem Gelöstsauerstoffanteil (Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) waren im Bioreaktor integriert. Zudem waren Sonden zur Messung von Temperatur und zur Überwachung des Füllstandes im Bioreaktor integraler Bestandteil. Bei Überschreiten des Füllstandlevels beispielsweise durch Schaumbildung wurde automatisch ein Antischaummittel (Antifoam B Emulsion, Sigma-Aldrich, USA) hinzugegeben. Zum Erhalt eines ausreichenden Mischens bei 750 min⁻¹ während der Kultivierung wurde ein Strombrecher mit einem zweifachen Sechs-Blatt Rushton-Rührer installiert. Die Luftzufuhr wurde über einen Gasverteiler mit 1 L L⁻¹ min⁻¹ sichergestellt. Die Temperatur wurde konstant mit einer Temperiereinheit auf 37 °C eingestellt. Der pH-Wert wurde konstant auf pH = 6.5 über automatisches Zuführen von Säure $(10 \% (v/v) H_2SO_4)$ oder Base (2 M NaOH) über die Kultivierungsdauer eingehalten.

Bevor eine Kultivierung im Bioreaktor gestartet werden konnte wurde eine aktive Vorkultur von *B. licheniformis* in einem 500 mL-Schüttelkolben herangezogen. Dazu wurden 100 mL frisch autoklaviertes Medium E in dem Schüttelkolben vorgelegt. 250 μ L der Stammlösung wurden nach Auftauen unter sterilen Bedingungen in den Schüttelkolben überführt und für etwa 24 h bei 37 °C und 200 min⁻¹ kultiviert. Sobald die Optische Dichte den Wert OD_{450nm} = 1,75 erreicht hatte, wurden 50 mL der Kultivierungsbrühe als Inokulum in den Bioreaktor zu 1,4 L Medium E gegeben. Regelmäßige Proben von ungefähr 30 bis 40 mL wurden dem Ansatz über die gesamte Dauer der Kultivierung zur weiteren Analyse entnommen.

Um das Zellwachstum von *B. licheniformis* über die Dauer der Kultivierung zu verfolgen wurde die BTM-Konzentration gravimetrisch bestimmt. Dafür wurden 5 mL der Kultivierungsbrühe in einen 50 mL Falkon überführt und mit ungefähr 30 mL deioniserten Wasser verdünnt. Die Lösung wurde anschließend bei 12.100 g und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Abhängig von der Viskosität durch den Gehalt an γ-PGA musste der Vorgang mehrfach wiederholt werden, um Zellen von Polymer zu separieren. Das Pellet wurde nochmals in Wasser gelöst und durch einen vorgewogenen 0,2 μm Cellulose-Nitrat-Membranfilter filtriert. Nach mehrfachem Waschen des Filters mit Wasser (max. 3x) wurden die Zellen sowie der Filter bei 95 °C für 6 bis 10 h in einem Trockenschrank getrocknet. Nach Abkühlen im Exsikkator wurde der mit getrockneten Zellen beladene Filter erneut gewogen. Aus der Differenz der Gesamtund der Filtermasse wurde die BTM-Konzentration in Abhängigkeit des Probevolumens bestimmt. Für jede Probe wurden Duplikate erstellt. **Abb. 20** zeigt die lineare Korrelation der Optischen Dichte zur BTM-Konzentration.

45



Abb. 20. Kalibriergerade zur Bestimmung der BTM-Konzentration aus der optischen Dichte (OD_{450nm}) von *B. licheniformis* 9945A ($R^2 = 0.992$).

Die Konzentrationen der im Kultivierungsmedium vorliegenden Kohlenstoffquellen Glycerin und Citrat wurden chromatografisch über HPLC quantitativ bestimmt. Bei angemessener Verdünnung der mit reinem Wasser gefilterten Proben wurden insgesamt 950 µL in ein HPLC-Vial überführt und in einem HPLC System (Waters Co., Milford, MA, USA) analysiert. Für die Konzentrationsbestimmung wurden für jede Probe Duplikate erstellt und analysiert. **Tab. 4** fasst die technischen Daten für die HPLC zusammen.

46

Tab. 4. Technische Daten des HPLC-Systems (Department of Chemical and Biochemical Engineering, University of Western Ontario, Canada, Labor Prof. Margaritis) [191].

Mobile Phase	Flussrate	Säulentemperatur	Injektionsvolumen	
9 mM Schwefelsäure	0,6 mL min ⁻¹	50 °C	25 μL	
Säule	Aminex HPX-87H (300x7,8 mm)			
Waters 2487 Dual λ Absorbance Detec		tector (λ = 192 nm)		
Detektoren	Waters 410 Differential Refractometer (30°C)			
Pumpe	Waters 1525 Binary HPLC Pump			
Autosampler	Waters 717plus Autosampler			
Degaser	Waters In-Line Degasser			
Software	Waters Breeze Chromatography Software Version 3.20			

Der Gehalt von L-Glutamat wurde über ein kommerziell verfügbares, enzymatisch funktionierendes Analysen Kit (Megazyme L-Glutamic Acid Assay Kit, K-GLUT, Wicklow, Irland) bestimmt.

Die quantitative Bestimmung von γ-PGA erforderte die Entwicklung einer makromolekularen Nachweismethode. Die Gel-Permeations-Chromatografie (GPC) bietet dabei die Möglichkeit Informationen über statistische Größenverteilungen wie auch über deren Konzentrationsgehalt durch Einsatz geeigneter γ-PGA-Konzentrationsstandards zu erhalten. Die Präparation ist ähnlich zu der einer HPLC. Nur die Säule, durch die die Probenmenge fließt, unterscheidet sich von einer HPLC. **Tab. 5** fasst die technischen Daten für die GPC zusammen.



Tab. 5. Technische Daten des GPC-Systems (Department of Chemical and Biochemical Engineering, University of Western Ontario, Canada, Labor Prof. Margaritis) [191].

Mobile Phase	Flussrate	Säulentemperatur	Injektionsvolumen
100 mM Phosphat-Puffer (pH 7,4)	0,8 mL min ⁻¹	30 °C	25 µL
Säule	2 Waters Ultrahydrogel Linear Columns in series (300x7,8 mm)		
Detektor	Waters 410 Differential Refractometer (30°C)		
Pumpe	Waters 1525 Binary HPLC Pump		
Autosampler	Waters 717plus Autosampler		
Degaser	Waters In-Line Degasser		
Software	Waters Breeze Chromatography Software Version 3.20		

Beim Batch-Ansatz mit der kontinuierlichen Separation von γ-PGA wurde das GPC-Equipment zur zeitabhängigen Verfolgung von makromolekularen Bestandteilen verwendet, **Tab. 6**.

Mobile Phase	Flussrate	Säulentemperatur	Injektionsvolumen
Millipore Wasser mit 0,05 wt% Na-Azid	0,5 mL min ⁻¹	40 °C	100 µL
Säule	PSS Suprema columns (10 μm, 0,3 μm Porosität, 300 x 7,8mm)		
Detektor	RI-101 Shodex detector		
Pumpe	LaChroma L-7series, Merck-Hitachi		

Tab. 6. Technische Daten des GPC-Systems [192].

3.1.2 Separation und Aufreinigung von γ-PGA*

Die Separation des Biopolymers aus der Kultivierungsbrühe erfolgte durch gezielte Zugabe einer 1 M Kupfersulfat-Lösung (CuSO₄) [13]. Die spezifische Bildung von wasserunlöslichem Cu²⁺/y-PGA-Komplex und Cu²⁺/Zell-Komplex führte in der Folge zur Präzipitation dieser Verbindungen aus der Kultivierungsbrühe. Restbestandteile, wie organische Säuren, Proteine, Enzyme und Peptide blieben als lösliche Kultivierungsbrühe in der zurück. Nach Abtrennen der Komponente wasserunlöslichen Präzipitate vom Überstand und anschließendem Waschen mit reinem Wasser (max. 3x) wurde das Präzipitat mit einer 0,5 M Na-EDTA Lösung (pH 8,0) re-solubilisiert. Dabei gingen die Cu²⁺-Ionen stabilere Komplexe mit dem EDTA ein, die wiederum wasserlöslich waren. Andererseits blieben Na⁺/y-PGA und re-solubilisierte Zellen als ebenso lösliche bzw. disperse Komponenten zurück. Nach vollständiger Umsetzung wurden die Zellen durch einen 0,45 µm Polyethersulfon (PES)-Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert, bei denen die resolubilisierten Zellen vom Überstand abgetrennt wurden. Die im Filtrat verbliebenen



niedrigmolekularen Restbestandteile und die Cu²⁺/EDTA-Komplexverbindung wurden anschließend über eine Querstromfiltration mit deioniserten Wasser von dem Biopolymer abgetrennt. Für die Umsetzung wurde eine Querstromfiltrationseinheit mit einem *molecular weight cut-off* von MWCO = 50 kDa (Vivaflow, Sartorius, Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Das aufgereinigte Retentat beinhaltete nunmehr polymeres γ -PGA. Zum Abtrennen des Wassers wurde das gelöste γ -PGA bei -20 °C gefroren und anschließend gefriergetrocknet (Freeze Dryer ALPHA 1-4 LD, Martin Christ, München, Deutschland). Es blieb ein farbloser, klebrig kristalliner Feststoff zurück.

Um die Effizienz der Aufreinigung bestimmen zu können war es notwendig, neben der GPC-Analyse, eine Methode zum gravimetrischen Vergleich zu etablieren. Mit der selektiven Präzipitation von γ -PGA in einer 1 M Kupfersulfat-Lösung war es möglich, einen linearen Zusammenhang zwischen dem Cu²⁺/ γ -PGA-Komplex und freiem γ -PGA zu generieren und somit den Gehalt des freien γ -PGAs nach Aufarbeitung gravimetrisch zu bestimmen. **Abb. 21** zeigt die Korrelation zwischen Cu²⁺/ γ -PGA-Komplex und γ -PGA.



Abb. 21. Kalibriergerade zur Bestimmung der γ -PGA-Konzentration aus der Cu²⁺/ γ -PGA-Komplex-Konzentration (R² = 0,997).

Zur Untersuchung der Makromolekülgröße wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt und miteinander verglichen. Hier wurde auf die Bestimmung der Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) mit Lichtstreudetektor zurückgegriffen, **Tab. 7**.

Mobile Phase Injektionsvolumen Flussrate Säulentemperatur Millipore Wasser mit 1.0 mL min⁻¹ 40 °C 100 µL 0,05 wt% Na-Azid PSS Suprema columns Säule (10 μm pre-column, 100 Å 10 μm, 2 x 3000 Å 10 μm) Wyatt Dawn DSP light scattering detector Detektor **BI-101 Shodex detector** Pumpe Merck HITACHI L6000A Software Astra 3.6

Tab. 7. Technische Daten des GPC-Systems zur Molekulargewichtsbestimmung [193].

Weiterhin wurde über SDS-Gelelektrophorese eine Methode zum Vergleich Für die Umsetzung einer SDS-Gelelektrophorese herangezogen. wurden konventionell erhältliche homogene 4 % Tris-Glycin Gele (anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau, Deutschland) verwendet. Als Referenz wurde ein HiMark™ pre-stained high-molecular-weight (HMW) Protein Standard (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit einer 3 %-igen Methylenblau-Lösung angefärbt [194]. Proben wurden zu GPC-Messungen in einem 100 mM Phosphat-Puffer (pH 7,4) gelöst und anschließend in einer GPC-Säule (Ultrahydrogel linear columns in series, 300x7,8 mm, Waters Co., Milford, MA, USA) mit einer Flussrate von 0,8 mL min⁻¹ bei 30 °C aufgetrennt. Fraktionen wurden mit einem differentiellen Refraktometer (Waters Co., Milford, MA, USA) bei 30 °C detektiert. Rückstände von Proteinunreinheiten konnten über einen Bradford Assav quantitativ erfasst werden [195].

3.2 Chemische Modifikation von γ-PGA

3.2.1 Einbau der amphiphilen Eigenschaften

Das Amin des lipophilen Aminosäurederivates L-TrpE (Sigma-Aldrich, Deutschland) sollte im ersten Modifikationsschritt durch Erhalt einer Säureamid-Bindung in statistischen Anteilen an funktionale Carboxylgruppen des biopolymeren y-PGAs gekoppelt werden, um das Kammpolymer Poly(-y-GA-r-L-TrpE) zu erzeugen [196]. Die chemisch betrachtete Kondensationsreaktion konnte mit dem Kopplungsreagens EDC (Sigma-Aldrich, Deutschland) in einer 50 mM NaHCO₃-Lösung über Nacht umgesetzt werden [197, 198]. Nach etwa 12 h bildete sich eine trübe Dispersion. Um das Polymer von den übrigen niedermolekularen Stoffen zu trennen, wurde die Dispersion über eine Querstromfiltrationseinheit mit einem MWCO von 100 kDa (Vivaflow, Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit deionisiertem Wasser aufgereinigt, so dass im Retentat das biopolymere Produkt zurückblieb. Anschließend wurde die aufgereinigte Dispersion bei -20 °C gefroren und danach gefriergetrocknet (Freeze Dryer ALPHA 1-4 LD, Martin Christ, München, Deutschland), so dass ein farblos, kristallines Pulver übrigblieb. Die weiterführende Integration des Kanamycins (Sigma-Aldrich, Deutschland) als sterisch abschirmende Komponente wurde auf gleicher Weise durchgeführt, um das Poly(-y-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin) zu erhalten.

3.2.2 Quantitative Bestimmung des L-TrpE-Anteils über Fluoreszenz

Zur guantitativen Bestimmung des integrierten L-TrpE-Anteils im Polymer Poly(-y-GA-*r*-L-TrpE) wurden fluoreszenzspektroskopische Methoden genutzt. Als Anregungswellenlänge wurde $\lambda_{Ex} = 285$ nm festgelegt, die Emissionswellenlänge bei $\lambda_{\rm Em}$ = 344 nm (Quanta Master 40 fluorescence spectrometer, PTI, Birmingham, USA) [199. 200]. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibriergerade mit dem Aminosäurederivat L-TrpE erstellt, wie Abb. 22 zeigt.



Abb. 22. Kalibriergerade zur Bestimmung der L-TrpE-Konzentration aus Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{Ex} = 285 \text{ nm}, \lambda_{Em} = 344 \text{ nm} (R^2 = 0.995).$

3.3 Kolloiddisperse Materialien

3.3.1 Herstellung kolloiddisperser Ubichinon-Wirkstoffformulierungen**

Für die Herstellung von stabilen kolloiddispersen Formulierungen mit Ubichinon als integrale Wirkkomponente ist es im ersten Schritt notwendig gewesen, eine Prä-Emulsion zu erzeugen. Insgesamt wurden je Wirkstoffformulierung 7,5 bis 30 g L⁻¹ Ubichinon (Coenzym Q₁₀) (Fagron, Barsbüttel, Deutschland) in einem Becherglas auf 85 °C erhitzt. Durch Überschreiten des Schmelzpunktes bei 50 °C ging Ubichinon von seiner festen in eine gelöste, ölige Phase über. Daneben wurde eine wässrige Lösung, die 7,5 Gew. % eines Polymers (PVOH, Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE) oder Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin)) und 2,5 Gew. % Glycerin (Reinighaus Chemie, Essen, Deutschland) beinhaltet, in einem separaten Becherglas ebenso auf 85 °C erwärmt.

^{**}Die hier dargestellten Methoden wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Bunjes (Fr. Joseph, Fr. Gehrmann), Pharmazeutische Technologie, TU Braunschweig erarbeitet.



Anschließend wurden die temperierten Lösungen zusammengegeben und mit einem Ultraturrax (IKA® T25 digital, IKA-Werke, Staufen, Deutschland) bei 16.000 min⁻¹ für 2 min prä-dispergiert, um eine heterogene o/w-Prä-Emulsion zu erhalten. Im nächsten Schritt wurde das Gemisch über ein Hochdruckhomogenisationsverfahren (Panda, Niro Soavi, Parma, Italien) 90 min lang im Kreislauf bei einer konstanten Prozesstemperatur von T ≈ 70 °C feindispers homogenisiert. Nach Abschluss wurde die erhaltene Emulsion in einem Eis-Wasser Gemisch abgeschreckt. Abgefüllte Aliquote zu je 2 bis 3 mL wurden in ein Gefäß überführt und anschließend für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Die apparenten Partikelgrößen wurden anschließend via Lichtstreuungsmethoden (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd.. Worcestershire, UK) bestimmt.

3.3.2 Quantifizierung von Ubichinon

Um den Wirkstoff aus der Formulierung zu extrahieren wurden drei Mal je 100 µL der kolloiddispersen Wirkstoffformulierung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in einem Gefriertrockner (Freeze Dryer ALPHA 1-4 LD, Martin Christ, München, Deutschland) für mindestens 30 min getrocknet. Der Inhalt wurde nach vollständiger Trocknung mit 500 µL Tetrahydrofuran (THF) versetzt und das Ubichinon im Ultraschallbad für fünf Minuten re-solubilisiert. Nach Überführen des gelösten Wirkstoffes in THF wurde dieser Anteil in ein separates Gefäß überführt. Dies wurde insgesamt vier Mal wiederholt, um den gesamten Wirkstoffgehalt von der Probe in das THF zu überführen. Das restliche Polymer/Glycerin-Gemisch verblieb in der Probe in kristallisierter Form, da es in THF nicht löslich war. Insgesamt konnten so je Probe 2 mL THF-Wirkstofflösung erhalten werden. Bedingt durch den hohen Dampfdruck von THF ($p_{20^{\circ}C} = 173 \text{ hPa}$, im Vgl. zu Ethanol mit $p_{20^{\circ}C} = 58 \text{ hPa}$), verdampfte das gesamte THF innerhalb von zwei Tagen. Übrig blieb der reine, extrahierte Wirkstoff Ubichinon. In einer Verdünnungsreihe wurden die Absorptionen der extrahierten Proben anhand des Ubichinon-spezifischen Maximums in THF bei $\lambda = 290$ nm bestimmt. Über eine Kalibriergerade war es möglich, die Ubichinon-Konzentration der einzelnen Proben zu guantifizieren, Abb. 23.





Abb. 23. Kalibrierfunktion zur Ubichinon-Quantifizierung bei einer Absorption von λ = 290 nm (R² = 0,997).

3.3.3 Analyse zur statistischen Partikelgrößenverteilung

Eine methodische Kombination aus Lichtbeugung und -streuung bietet der Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcesterchire, UK) zum Erhalt von statistischen Partikelgrößenverteilungen [75]. Ein Helium-Neon Laser mit λ = 633 nm und eine LED-Lichtquelle mit λ = 470 nm dienen dabei als Strahlenguelle. Das an den Partikeln gestreute Licht wird über eine Vielzahl von Detektoren, verteilt über einen großen Winkelbereich, erfasst. Die obscuration rate ("Verdunkelungsrate") wurde zwischen 5 und 30 % eingestellt, was ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis bei der Bestimmung der Größenverteilung der Proben ergab. Die unterschiedlichen Partikelgrößenverteilungen der einzelnen kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen resultierten aus einem charakteristischen Lichtstreuungsmuster, das mit einer Software in eine Partikelgrößenverteilung auf Basis der Lichtstreuungstheorien umgerechnet wurde (Mastersizer 2000 software, version 5.60, Worcesterchire, UK) [101]. Für eine Messung mit dem Mastersizer 2000 wurden Proben in einem 2 L-Bioreaktor (Applikon, Schiedam, Niederlande) wie folgt präpariert. In 800 mL reinem und staubfreien Wasser wurden je 800 µL der kolloiddispersen Materialien entsprechend einem Verdünnungsfaktors von 1.000 hinzugegeben und bei $300 \pm 2 \text{ min}^{-1}$ mit einem Sechs-Blatt Rushton-Rührer (d = 45 mm) gerührt. Die Verdünnung war notwendig, um bei der Partikelgrößenbestimmung



Mehrfachstreuungen zu vermeiden, da die das Ergebnis erheblich verfälschen würden. Für die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung der Proben wurden diese im Kreislauf durch eine integrierte Durchflusszelle am Mastersizer über eine peristaltische Pumpe (Pro-280 MCP, IDEX Health & Science SA, Glattbrugg, Schweiz) mit scherarmer Förderung (10 mL min⁻¹) befördert. Von jeder Probe wurden Triplikate aufgenommen. Insgesamt wurde über einen Zeitraum von je 12 h eine Partikelgrößenverteilung in 10-minütigem Abstand aufgenommen, so dass pro Wirkstoffformulierung auf Informationen von insgesamt 210 Aufnahmen zurückgegriffen werden konnte. Alle dargestellten Größenverteilungen sind das Resultat aus dem Mittelwert aller Aufnahmen.

3.3.4 Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen

Die partikuläre Beschaffenheit der kolloiddispersen Materialien sowie die lebenden Zellen des Hefestammes *S. cerevisiae* N34 wurden mit einem REM (LEO 1550 – FE Kathode, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen. Verdünnte Proben wurden auf einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Objektträger bei -196 °C schockgefroren. Die kristallisierten Proben wurden anschließend an einem Gefriertrockner (Freeze Dryer ALPHA 1-4 LD, Martin Christ, München, Deutschland) für 30 min getrocknet. Bevor die Proben vermessen werden konnten, mussten diese mit einem dünnen Gold-Film von geringer Ängstrom-Dicke besputtert werden. Die metallische Reflektion der auftreffenden Elektronen bietet eine scharfe Auflösung der nanoskaligen Fragmente geboten.

3.3.5 Stabilitätsstudien der kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen unter physiologischen Bedingungen

Um das Verhalten der kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen unter Bedingungen physiologischen zu untersuchen wurde ein komplexes Kultivierungsmedium verwendet, das auch für die Kultivierung des Hefestammes eingesetzt wurde. Das Wachstumsmedium stellte eine Abwandlung des bekannten LB-Nährmediums dar [201]. Für einen konstant geregelten pH-Wert war es notwendig, zusätzlich das System auf pH 5,5 abzupuffern, da die Hefe mit fortschreitender Kultivierungsdauer organische Säuren bildet und damit den pH-Wert sukzessive absenkt. Der Puffer macht genau zwei Drittel der Gesamtosmolalität aus. Der Rest teilt sich auf die komplexen Bestandteile des Nährmediums sowie Glucose als Kohlenstoffquelle auf. Eine genaue Zusammenstellung ist in **Tab. 8** aufgelistet.

Substanz	Konzentration (g L ⁻¹)	Osmolalität (osmol kg ⁻¹)
Sörensen Puffer (pH 5,5)		
KH₂PO₄:Na₂HPO₄ (≈ 19,5 : 1)	≈ 14,2 : 0,8	0,200
Hefeextrakt:Bacto Pepton (1:1)	5,0 : 5,0	0,050
Glucose	$7,39 \pm 0,02$	0,050

 Tab. 8. Zusammensetzung des Puffer-angepassten LB-Komplexmediums.

Die statistischen Partikelgrößenverteilungen wurden unter Verwendung des beschriebenen Komplexmediums gleichermaßen, wie in Kap. 3.3.3 beschrieben, durchgeführt und ausgewertet.

3.4 In vitro-Untersuchungen

3.4.1 Batch-Kultivierung von S. cerevisiae

Der Hefestamm *S. cerevisiae* N34 wurde als gefriergetrocknete Probe von der Arbeitsgruppe Microbiology and Physiological Systems von Prof. Michael Volkert (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA) zur Verfügung gestellt. Zur Reaktivierung wurde die Probe des Stammes in einem 50 mL-Schüttelkolben mit 6 mL LB-Medium gegeben und anschließend bei 30 °C und 120 min⁻¹ im Schüttelschrank 24 h kultiviert. Bei Erreichen der stationären Phase wurde der gesamte Inhalt an Kultivierungsbrühe in einen 250 mL-Schüttelkolben mit 50 mL LB-Medium überführt und unter gleichen Bedingungen für weitere 12 h kultiviert. Bei wiederholtem Erreichen der stationären Wachstumsphase wurde die



Kultivierungsbrühe mit gleichen Volumina von reinem Glycerin versetzt, 2 mL des Gemisches in Kryo-Röhrchen abgefüllt und umgehend mit flüssigem Stickstoff auf -196 °C schockgefroren. Diese wurden anschließend zur Lagerung bei -96 °C im Gefrierschrank gelagert.

Vorbereitend zu einer Batch-Kultivierung wurde nach Auftauen der gesamte Kryo-Röhrchen-Inhalt in einen 1 L-Schüttelkolben mit 150 mL des Puffer-angepassten LB-Komplexmediums gegeben und für je 36 h bei 30 °C und 120 min⁻¹ im Schüttelschrank kultiviert. 100 mL der Kultivierungsbrühe wurden zur Inokulation in einen 2 L-Bioreaktor (Applikon, Schiedam, Niederlande) überführt. In diesem wurden insgesamt 700 mL des Puffer-angepassten LB-Komplexmediums vorgelegt und auf 30 °C vortemperiert. Das Arbeitsvolumen betrug nach Inokulation insgesamt 800 mL. Die Temperatur wurde konstant bei 30 ± 0,5 °C gehalten. Die Rührzahl betrug konstant 300 ± 2 min⁻¹. Es wurde mit einem Sechs-Blatt-Rührer (Rushton Turbine, d = 45 mm) gerührt. Die Kultivierung wurde bei Erreichen der stationären Phase für weitere 12 h fortgeführt, um das Verhalten der Hefezellen anhand der Optischen Dichte (OD_{600nm}) und der phasenabhängigen Bildung an Nebenprodukten zu untersuchen.

Die BTM-Konzentration wurde über eine gravimetrische Korrelation mit der Optischen Dichte ermittelt. Dazu wurden je 10 mL der Kultivierungsbrühe filtriert, mit Wasser mehrfach gewaschen (max. 3x) und anschließend für 24 h im Trockenschrank bei 85 °C getrocknet. Die Korrelationsgerade ist in **Abb. 24** abgebildet.



Abb. 24. Kalibriergerade zur Bestimmung der BTM-Konzentration aus der Optischen Dichte (OD_{600nm}) von *S. cerevisiae* N34 ($R^2 = 0.978$).

Nebenprodukte wie organische Säuren oder Polyole wurden mittels standardisierter HPLC-Methoden aus [202] quantitativ nachgewiesen.

3.4.2 Erweiterung zur sequentiellen Fed Batch-Kultivierung

Die Methodenoptimierung zu einer sequentiellen Fed Batch-Kultivierung wurde unter Verwendung des Hefestammes S. cerevisiae N34 in einem 2 L-Bioreaktor (Applikon, Schiedam, Niederlande) angepasst [186]. Das Arbeitsvolumen betrug 750 bis 800 mL bei konstanter Temperatur von 30 ± 0,5 °C und einer Rührzahl von $300 \pm 2 \text{ min}^{-1}$, gerührt mit einem Sechs-Blatt-Rührer (Rushton Turbine, d = 45 mm). Durch den Ausschluss einer Begasung konnte über den zeitlichen Wachstumsverlauf eine sauerstofffreie Umgebung geschaffen werden, die die Hefe zu einem Wechsel zur anaeroben Atmung gezwungen hat. Die Zellkultur ist in dem bereits beschriebenen Puffer-angepassten Komplexmedium aus Kap. 3.4.1 kultiviert worden. Das Komplexmedium wurde permanent zur Kultivierungsbrühe mit einer Fördermenge von 0,83 mL min⁻¹ bis zu einem maximalen Arbeitsvolumen von 800 mL hinzugegeben. Bei Erreichen dieses Volumens wurde der Kultivierungsbrühe 50 mL Probe entnommen, welche im Weiteren für in vitro-Untersuchungen genutzt werden konnten. Mit dem Ansatz einer seguentiellen Fed Batch-Kultivierung konnte eine optimale Prozesskontrolle über den Verlauf einer Kultivierung durch ihre Reproduzierbarkeit sichergestellt werden. Die Menge der Probe, die

Medienzusammensetzung und die BTM-Konzentration wurden über den gesamten Kultivierungszeitraum konstant gehalten. **Tab. 9** zeigt eine Zusammenfassung betriebsbedingter Parameter wie sie nach Beginn der konstanten Bedingungen im sequentiellen Fed Batch-Prozess in der Kultivierungsbrühe vorliegen. Hier bestätigt sich, dass keine kohlenstofflimitierten Bedingungen im Bioreaktor vorherrschen. Stoffwechselabhängige Abbauprodukte sind neben dem Polyol Glycerin die organischen Säuren Formiat, Succinat und α-Ketoglutarat, die ebenfalls über den gesamten Zeitraum in diesem Verhältnis in der Kultivierungsbrühe vorliegen.

BTM- Konzentration (g L ⁻¹)	Spez. Wachstumsrate, µ (h ⁻¹)	рН (-)	Osmolalität (osmol kg ⁻¹)
$1,56 \pm 0,06$	6,3 - 6,7·10 ⁻²	$5,50 \pm 0,03$	0,304 ± 0,002
Zucker/-alkohole	Konzentration (mg L ⁻¹)	Organische Säuren	Konzentration (mg L ⁻¹)
Glucose	$19,53 \pm 7,40$	Formiat	23,85 ± 1,69
Glycerin	$57,98 \pm 6,03$	Succinat	472,93 ± 31,90
		α-Ketoglutarat	$5,08 \pm 0,28$

 Tab. 9. Auflistung konstanter Größen während der sequentiellen Fed Batch-Kultivierung.

3.4.3 Stressinduktion durch Diamid

50 mL Probe aus der Kultivierungsbrühe der sequentiellen Fed Batch-Kultivierung, Kap. 3.4.2, wurden u. a. zur Aufklärung der gezielten Initiierung von oxidativem Stress mit dem Azoester Diamid (Sigma Aldrich, Deutschland) verwendet. Für die Umsetzung wurden je 10 μL an Diamid mit spezifischen Stressbeladungen von 0,1 bis 1,000 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ in einem Well einer Mikrotiterplatte (MTP) (Sigma Aldrich, Deutschland) vorgelegt. Dazu wurden je 90 μL einer mit Komplexmedium verdünnten Kultivierungsbrühe hinzugegeben. In gleicher Weise wurde als Negativ-Kontrolle ein Teil der verdünnten Kultivierungsbrühe als Filtrat ohne Hefezellen eingesetzt. Im Weiteren wurde der stressinduzierte Kultivierungsansatz mit einem Fluoreszenz-Spektrometer (FluoroSkan Ascent, Thermo Scientific, Waltham, USA) über einen Zeitraum von 6 h verfolgt. Die Aktivität der Probe wurde in diesem Zuge jede Minute mit einer Anregung bei $\lambda_{Ex} = 485$ nm und einer Emission bei $\lambda_{Em} = 538$ nm auf Basis der Fluoreszenz bestimmt.

3.4.4 ROS-Detektion

Der endogene ROS-Gehalt konnte über eine chemilumineszente Reaktion detektiert werden [68]. 2 mL einer 0,1 M NaOH-Lösung, die 1 g L⁻¹ Luminol (Sigma Aldrich, Deutschland) beinhaltete, wurde in eine Küvette (Sigma-Aldrich, Deutschland) gegeben. 200 µL eines Gemisches aus 10 µL einer 100 µg L⁻¹ Fe²⁺-Lösung und 190 µL Kultivierungsbrühe wurden in die 2 mL Luminol-Lösung gegeben und die Intensität bei einer Emissionswellenlänge bei $\lambda_{Em} = 420$ nm (Quanta Master 40 fluorescence spectrometer, PTI, Birmingham, USA) verfolgt. Als Vergleich wurde der ROS-Gehalt von Proben aus der Kultivierungsbrühe mit und ohne spezifischer Stressbeladung von 200 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ bestimmt und miteinander verglichen.

3.4.5 Metabolische Aktivität

Neben der fluoreszierenden Stressantwort wurde gleichzeitig die metabolische Aktivität der stressinduzierten Hefezellen bestimmt. Die metabolische Aktivität ist dabei stark abhängig von den Eigenschaften seiner Umgebung während einer Kultivierung. Ein osmolales Nährmedium von 0,3 osmol kg⁻¹ ist optimal für das Wachstum eines Hefestammes, hier S. cerevisiae N34. Die Anzucht und das Kultivieren unter diesen isotonischen Bedingungen führen zu einem grundsätzlich geringen metabolischen Stresspegel des Organismus. Osmolale Nährmedien mit 0,3 osmol kg⁻¹ stellen gleichermaßen optimale physiologische Bedingungen für humane Zellen dar. Für die Untersuchung der metabolischen Aktivität wurde der Farbstoff Resazurin (Alamar blue) verwendet. Dieser ist als vielseitig einsetzbarer Indikator für Studien an Vorgängen der Zellproliferation und Zytotoxizität ein sehr gebräuchliches Mittel [203]. Resazurin ist ein nicht-toxischer Redox-Indikator, dessen Umsetzung sowohl über Fluoreszenz-, als auch Absorptionsmessungen verfolgt werden kann. Das bei pH 5,5 blaue, nicht-fluoreszierende Agens wird chemisch in ein pink-fluoreszierendes Molekül, dem Resofurin, umgewandelt. Die Reduktion findet innerhalb der mitochondrialen Elektronentransportkette statt [204]. Resazurin selbst wirkt als ein Elektronenakzeptor zwischen dem finalen Reduktionsschritt zu



Sauerstoff durch Cytochrom a₃. Dabei beeinträchtigt es nicht die respiratorische Kette. Dank seines positiven Redoxpotentials von $E_0 = +0,380$ V, verglichen zu den Kofaktoren FMNH₂ ($E_0 = -0,210$ V), FADH₂ ($E_0 = -0,220$ V), NADH/H⁺ ($E_0 = -0,320$ V), NADPH ($E_0 = -0,324$ V) und den unterschiedlichen Cytochromen ($E_0 = 0,290$ to 0,080 V), bedingt die Umsetzung zum Resofurin keinen zusätzlichen Energieeintrag [205]. Nach bereits beschriebener Präparation aus Kap. 3.4.3 wurden nach 1,5 h Inkubation zu den spezifisch stressinduzierten Hefezellen 10 µL einer 1 g L⁻¹ Resazurin-Lösung (Sigma Aldrich, Deutschland) in den MTP-Ansatz gegeben. Die Umsetzung des Resazurins wurde mit einem Fluoreszenz-Spektrometer (FluoroSkan Ascent, Thermo Scientific, Waltham, USA) bei einer Anregung von $\lambda_{Ex} = 544$ nm und einer Emissionswellenlänge bei $\lambda_{Em} = 620$ nm über den Verlauf von einer Stunde verfolgt [205].

3.4.6 Untersuchung stressmindernder Effekte durch kolloiddisperse Wirkstoffformulierungen

Die Untersuchungen potentiell stressmindernder Effekte der kolloiddispersen Ubichinon-Wirkstoffformulierungen wurden ähnlich zu denen aus Kap. 3.4.3 durchgeführt. Hier wurde auf das stressinduzierte biologische System in den MTPs 10 μ L der kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen vorgelegt und mit 90 μ L der verdünnten Kultivierungsbrühe 15 min lang bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Wirkstoff-beladenen Proben mit 10 μ L einer spezifischen Stressbeladung von 150 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ beimpft und anschließend Fluoreszenz-basierend verfolgt.

4 Ergebnisse und Diskussionen

4.1 Mikrobielle γ-PGA-Produktion

4.1.1 Batch-Kultivierung von Bacillus licheniformis ATCC 9945A***

Abb. 25 fasst die Ergebnisse aus den Untersuchungen einer Batch-Kultivierung mit B. licheniformis ATCC 9945A zusammen. Hier lässt sich über den gesamten Kultivierungsverlauf unter den vorherrschenden Bedingungen ein charakteristisch diauxisches Wachstumsprofil beobachten. Nach einer 6-stündigen Adaptationsphase steigt die BTM-Konzentration mit einer spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{max} = 0,13 h^{-1}$ an. Nach 21 h wird das weitere Biomassewachstum durch eine Sauerstofflimitation unterbrochen, Abb. 25 (A). Erst nach insgesamt zwei weiteren Stunden beginnt wieder exponentielles Wachstum mit $\mu_{max} = 0.32 \text{ h}^{-1}$ in der Kultivierungsbrühe. In der Folge hält das Wachstum bis zum vollständigen Verbrauch aller Kohlenstoffquellen nach etwa 57 h Kultivierungsdauer an, Abb. 25 (B). Mit dem Übergang der Batch-Kultur in die stationäre Phase zeigt sich bei gleichzeitiger Betrachtung der y-PGA-Konzentration, dass diese bis zu diesem Zeitpunkt einen von $c_{P} = 29 g_{y-PGA} L^{-1}$ erreicht hat, maximalen Wert Abb. 25 (A). Der Ertragskoeffizient ist während dieser Kultivierungsdauer entsprechend hoch bei einem Wert von $Y_{P/S} = 1,44 g_{y-PGA} g_{Glu}^{-1}$, wohingegen der Zellertragskoeffizient mit $Y_{X/S} = 0,19 g_{BTM} g^{-1}$ nur gering ausfällt. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer verändern sich diese Werte allerdings wieder, was auf die kohlenstofflimitierten Kultivierungsbedingungen zurückzuführen ist. B. licheniformis ist hier gezwungen, einen metabolischen Wechsel vorzunehmen, der es ihm ermöglicht, unter den veränderten Bedingungen sich weiterhin selbst zu reproduzieren bzw. weiter zu wachsen. Die Adaptation hält während einer kurzen Phase von etwa 10 h an, bei der

^{***}Die hier gezeigten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit M. Sc. Kreyenschulte und Prof. A. Margaritis im Rahmen der Masterarbeit *Production and purification of \gamma-polyglutamic acid for the preparation of hydrophobically modified nanoparticles* erstellt [191].

eine reduzierte Stoffwechselaktivität zu beobachten ist. Die Stoffwechselaktivität kann hier direkt über den Anstieg des Gelöstsauerstoffanteils in der Kultivierungsbrühe verfolgt werden. Nach einer Kultivierungsdauer von etwa 57 h ist zu beobachten, dass der Gelöstsauerstoffanteil in der Kultivierungsbrühe auf ein Maximum von insgesamt 60 % angestiegen ist.



Abb. 25. Kultivierung von *B. licheniformis* 9945A. (A) BTM-Konzentration, Gelöstsauerstoffanteil und γ-PGA-Konzentration, (B) Konzentrationsprofil der drei Kohlenstoffquellen Citrat, Glycerin und L-Glutamat über die Kultivierungsdauer [191].

Idealerweise geht dieser Zeitpunkt mit der gleichzeitig vorherrschenden maximalen γ -PGA-Konzentration von $c_P = 29 g_{\gamma}$ -PGA L⁻¹ in der Kultivierungsbrühe einher, was die Verfolgung des Gelöstsauerstoffanteils darüber hinaus zu einem direkten Indikator bei der Bestimmung der maximalen γ -PGA-Konzentration während der Batch-Kultivierung macht. Nach Abschluss der Adaptationsphase bei etwa 57 h Kultivierungsdauer ist in der Folge wieder eine erhöhte Stoffwechselaktivität auf Basis des sinkenden Gelöstsauerstoffanteils in der Kultivierungsbrühe zu beobachten. Die BTM-Konzentration von $c_X = 4 g_{BTM} L^{-1}$ bleibt allerdings für weitere 25 h konstant gleich, bevor eine zweite exponentielle Wachstumsphase einsetzt. Zu Beginn der erhöhten Stoffwechselaktivität lässt sich nun eine Reduktion der γ -PGA-

64

Konzentration in der Kultivierungsbrühe feststellen. Die stetige Abnahme der γ -PGA-Konzentration kann hier auf die metabolische Anpassung von *B. licheniformis* zurückgeführt werden, mit dem der Stamm nun befähigt ist, das gebildete Biopolymer enzymatisch mit der γ -Glutamyl-Hydrolase in seine monomeren Bestandteile zu spalten, um diese als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für seinen Stoffwechsel verwenden zu können [142, 206, 207]. Die unspezifische Spaltung der γ -PGA-Ketten führt zu einer undefinierten Kettenlängenverteilung des Biopolymers. Die Verteilung der makromolekularen γ -PGA-Kettenlängen im Endprodukt spielt jedoch für die weitere Entwicklung von kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen eine elementare Rolle und sollte im Produkt möglichst gleichverteilt sein. Daher muss vor dem Einsetzen dieses Abbauprozesses die Kultivierung abgebrochen werden.

4.1.2 γ-PGA-Aufreinigung

Abb. 26 zeigt die Ergebnisse der phasenabhängigen Ausbeuten von γ-PGA während der Batch-Kultivierung von B. licheniformis. Mit dem starken Anstieg der apparenten Viskosität lässt sich zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase nach 30 h Kultivierungsdauer zunächst nur eine reduzierte y-PGA-Ausbeute von etwa 70 % nach der Aufreinigung beobachten. Die niedrigen Erträge setzen sich bis zum Erreichen der maximalen apparenten Viskosität mit 190 mPa s nach 37 h Kultivierungsdauer fort, bei der mit nur 54 % am wenigsten y-PGA mit der Aufreinigung zurückgewonnen werden kann. Erst mit der darauffolgenden Viskositätsabnahme nach 40 h steigt die y-PGA-Ausbeute signifikant auf mehr als 95 % an. Während dieses Zeitraumes setzt in der Kultivierung der Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase ein, bei dem nach etwa 55 h eine maximale y-PGA-Konzentration von $c_P = 29 g_{y-PGA} L^{-1}$ in der Kultivierungsbrühe vorliegt. Hier ist die γ-PGA-Ausbeute mit 88 % signifikant hoch. Basierend auf diesen Erkenntnissen lässt sich unter Berücksichtigung der Kohlenstoff-Konzentration zu Beginn der Kultivierung ein idealer Zeitraum für die Ernte der Kultivierungsbrühe festlegen, mit der ein hoher Ertrag von y-PGA aus der Kultivierung erzielt werden kann. Der optimale Zeitpunkt liegt bei der Batch-Kultivierung von B. licheniformis zwischen 46 und 55 h nach der Inokulation. Eine Aufreinigung nach Abbruch einer Kultivierungsdauer von 62 h liefert mit 95 % zwar einen ähnlich hohen Wert für die Biopolymer-Ausbeute, dennoch setzt hier bereits der enzymatische Abbau ein [97, 206, 207].



Abb. 26. Phasenabgängige γ-PGA-Ausbeute nach Kupferpräzipitat-Fällung, γ-PGA-Konzentration und apparente Viskosität mit *B. licheniformis* 9945A [191].

Neben der vollständigen Ausfällung von γ -PGA ist es bei biotechnologisch hergestellten Produkten zudem wichtig, eine vollständige Zellabtrennung von *B. licheniformis* nach dem Aufreinigungsprozess zu gewährleisten. Mit der Zugabe von Kupfersulfat in die erntereife Kultivierungsbrühe fallen neben wasserunlöslichen Cu²⁺/ γ -PGA-Komplexen auch Komplexe aus, die sich aus Cu²⁺ mit *B. licheniformis*-Zellen und Proteinen zusammensetzen. Durch eine prozessintegrierte Filtration mit PES-Filtern (Porenweite 0,45 µm) unmittelbar nach der EDTA-basierten Re-Solubilisation konnte gezeigt werden, dass die Zellkonzentration mit dem Prozessschritt auf insgesamt 8,6 mg L⁻¹ reduziert werden konnte. Das entspricht 0,02 % an Produktverunreinigung mit *B. licheniformis*-Zellen im Endprodukt. Der Proteingehalt wurde quantitativ über einen Bradford-Assay bestimmt und betrug 3 %, so dass die absolute Reinheit des aufgereinigten γ -PGA 96,98 % beträgt.

4.1.3 Analytische Bestimmung der molaren Masse von γ-PGA

Abb. 27 zeigt die Ergebnisse aus einer elektrophoretischen Auftrennung von isoliertem γ -PGA-Produkt mittels SDS-Gelelektrophorese. Hier dienen Ergebnisse aus einer separaten chromatografischen GPC-Auftrennung, mit der die exakte molare Masse von γ -PGA bestimmt werden konnte, zum direkten Vergleich der beiden Methoden.



Abb. 27. SDS-Gel von aufgereingtem γ -PGA (links) sowie die größenabhängigen Häufigkeitsverteilungen aus SDS-Gelektrophorese und GPC (rechts). Bahn M repräsentiert den Marker für hochmolekulare Proteine (117 – 460 kDa), die Bahnen 1 - 4 zeigen die Häufigkeitsverteilungen des aufgereinigten γ -PGA in unterschiedlichen Konzentrationen (in g L⁻¹), Bahn 1: 0,5; Bahn 2: 0,4; Bahn 3: 0,3; Bahn 4: 0,2. Bahn 5 zeigt die Häufigkeitsverteilung aus einer GPC-Untersuchung [12].

In **Abb. 27 (links)** ist ein SDS-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung dargestellt, bei dem die verschiedenen Bahnen mit unterschiedlichen γ-PGA-Konzentrationen



beladen und anschließend aufgetrennt wurden. Zum optischen Nachweis mussten sowohl y-PGA wie auch Proteinmarker angefärbt werden. Bei den y-PGA-Proben handelt es sich um das aufgereinigte Produkt, das nach einer Kultivierungsdauer von 57 h geerntet und anschließend nach beschriebener Methode (Kap. 4.1.2) aufgereinigt wurde. Die Bahnen 1-4 wurden mit dem Biopolymer in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,2 und 0,5 g L⁻¹ beladen. Nach dem Anfärben zeigt sich bei hohen Konzentrationen eine ausgeprägte bimodale Größenverteilung mit unterschiedlichen molaren Massen. Eine hochpolymere Fraktion besitzt eine Kettenlängenverteilung im nicht-linearen Bereich mit einer molaren Masse von mehr als 460 kDa. Eine weitere polymere Fraktion dagegen weist eine Kettenlängenverteilung im linearen Bereich zwischen 171 und 460 kDa mit einer mittleren molaren Masse von 255 kDa auf. Aus einem Vergleich der erhaltenen Information über die mittlere molare Masse geht hervor, dass diese mit der aus einer chromatografischen GPC-Auftrennung separaten miteinander korreliert. Abb. 27 (rechts, Bahn 5 (GPC)). Über die GPC-Methode ist es möglich, eine absolute Größenverteilung mittels statischer Lichtstreuung (SLS) zu bestimmen, die für das aufgereinigte v-PGA eine mittlere molare Masse von 266 kDa aufzeigt und damit nur geringfügig von dem Resultat aus der elektrophoretischen Auftrennung abweicht.

4.1.4 Optimierte Prozessführung mittels integrierter Querstromfiltration

Mit der Batch-Kultivierung von *B. licheniformis* (Kap. 4.1.1) konnte gezeigt werden, dass eine γ -PGA-Konzentration von bis zu 29 g_Y-PGA L⁻¹ gebildet werden kann. An diesem Punkt wurde ein Ertragskoeffizient von Y_{P/S} = 1,44 g_Y-PGA g_{Glu}-¹ bestimmt. Mit dem Aufreinigungsprozess über eine Kupfersulfat-Präzipitation konnten in der Folge aus dem Batch-Ansatz etwa 90 % γ -PGA mit einer Reinheit von 96,68 % isoliert werden. Trotz der hohen γ -PGA-Ausbeute steht der Aufreinigung jedoch ein großer präparativer, zeitlicher und materieller Aufwand gegenüber, der zwangsläufig alternative Ansätze zur Verbesserung erfordert. Ein möglicher Ansatz stellt in dieser Arbeit die Kultivierung von *B. licheniformis* mit der kontinuierlichen Abtrennung des Biopolymers aus der Kultivierungsbrühe dar. **Abb. 28** zeigt eine schematische Darstellung der Anlagekonfiguration.

4 Ergebnisse und Diskussionen



Abb. 28. Schematische Darstellung einer Batch-Kultivierung von *B. licheniformis* mit integrierter Querstromfiltration zur Zellabtrennung aus dem Kultivierungsmedium (1 L-Kultivierungsreaktor) sowie zur Aufkonzentrierung von hochmolekularem γ -PGA in einem separaten 3,7 L-Konzentrationsreaktor.

modifizierten Batch-Ansatz wurde B. licheniformis In dem in einem Kultivierungsreaktor (1 L-Bioreaktor) mit dem aus Kap. 3.1.1 festgelegten Betriebsparametern kultiviert. Dabei wurde das Kultivierungsmedium während des Kultivierungsprozesses kontinuierlich über einen Konzentrationsreaktor (3,7 L-Bioreaktor) im Kreislauf gefördert, um v-PGA schrittweise vom Kultivierungsmedium zu separieren und gleichermaßen im Konzentrationsreaktor aufzukonzentrieren. Der Volumenstrom betrug durchschnittlich 50 mL min⁻¹, mit dem ein vollständiger Volumenaustausch des Kultivierungsmediums von maximal zehn Minuten im Kultivierungsreaktor gewährleistet werden konnte. In einem ersten Separationsschritt wurde die Kultivierungsbrühe durch eine Querstromfiltrationseinheit mit einer Trenngrenze von 0,1 µm befördert, womit das Kultivierungsmedium von den Bakterienzellen getrennt und in den Konzentrationsreaktor überführt wurde. Das Retentat wurde mit den Bakterienzellen in den Kultivierungsreaktor zurückgeführt. In einem nächsten Separationsschritt Auftrennung des Kultivierungsmediums stellte die durch eine Querstromfiltrationseinheit mit einer Trenngrenze von 100 kDa sicher, dass bei der Rückführung des Kultivierungsmediums vom Konzentrationsin den Kultivierungsreaktor makromolekulare Bestandteile (\geq 100 kDa), wie das y-PGA, im Konzentrationsreaktor zurückgehalten wurden, so dass sich das gebildete y-PGA hier über den Verlauf der Kultivierung anreichern konnte.



Abb. 29. (A) Chromatografische GPC-Auftrennung des Kultivierungsmediums, (B) nach der Aufreinigung sowie nach (C) Auftrennung einer Vergleichsprobe aus isoliertem γ-PGA.

B. licheniformis 9945A zeigte während der Kultivierung einen charakteristischen Wachstumsverlauf, der dem des Batch-Prozesses aus Kap. 4.1.1 entsprach. Mit Erreichen eines maximalen Anteils von 50 % an Gelöstsauerstoff wurde mit Einsetzen der stationären Phase die Kultivierung nach 36 h abgestoppt. Im Gegensatz zur Batch-Kultivierung aus Kap. 4.1.1 zeigte sich aber, dass bis zum Abbruch der Kultivierung noch keine Kohlenstofflimitierung eingetreten war. Die Citrat-Konzentration ist während des gesamten Kultivierungsverlaufes von $c_{S,0} = 11 g_{Cit} L^{-1}$ auf nur etwa 5 $g_{Cit} L^{-1}$ gesunken. Ebenso wurden die beiden weiteren Kohlenstoffquellen, Glycerin und Glutamat, nur unvollständig umgesetzt. **Abb. 29 (A)**

zeigt das Ergebnis aus der chromatografischen GPC-Auftrennung des zellfreien Kultivierungsmediums im Konzentrationsreaktor nach 36 h.

Mit der Nutzung eines polymeren Pullulans als Referenzsubstanz konnte hier ein äquivalenter Größenvergleich der vorliegenden Makromoleküle in der Probe hergestellt werden. Bei Abbruch der Kultivierung waren insgesamt drei makromolekulare Bestandteile ($M_{ag} \ge 10^3$ g mol⁻¹) zu beobachten. Nach der Aufreinigung, die im Wesentlichen aus dem Austausch des Kultivierungsmediums durch deionisertes Wasser bestand, ist in Abb. 29 (B) zu erkennen, dass nur noch eine hochmolekulare Substanz mit einer äguivalenten mittleren molaren Masse von 5,9·10⁵ g mol⁻¹ im Retentat übriggeblieben ist, wohingegen alle restlichen Bestandteile mit dem Filtrat vollständig ausgewaschen wurden. Über einen Vergleich der GPC-Auftrennung des aufgereinigten v-PGA aus Kap. 4.1.2 zeigt sich in Abb. 29 (C), dass der verbliebene Peak dem des y-PGA mit absoluter mittlerer molarer Masse von 266 kDa zuzuordnen ist. Bei Betrachtung der Polymergrößenverteilung fällt auf, dass es zwischen den beiden v-PGA-Produkten Unterschiede in der Kettenlängenverteilung gibt. Das isolierte v-PGA aus der Batch-Kultivierung, Abb. 29 (C), weist eine äquivalente mittlere molare Masse von $6,95 \cdot 10^5 \pm 4,11 \cdot 10^5$ g mol⁻¹ auf, das γ -PGA aus der modifizierten Batch-Kultivierung, Abb. 29 (B) besitzt dagegen eine geringere äquivalente mittlere molare Masse von nur $4,96\cdot10^5 \pm 1,68\cdot10^5$ g mol⁻¹. Mit der modifizierten Batch-Prozessführung kann somit eine Verbesserung der Polymerqualität nachgewiesen werden. Neben der Verbesserung der Polymerqualität fällt aber gleichermaßen auf, dass die quantitative Ausbeute der y-PGA-Konzentration nach Abbruch der Kultivierung mit 0,048 g_{V-PGA} L⁻¹ nur gering ist. Das kann auf die unvollständige Umsetzung der Kohlenstoffquellen bis zum Abbruch der Kultivierung zurückgeführt werden.

4.2 Maßgeschneiderte Entwicklung von biopolymeren Amphiphilen

Nach Optimierung der Kultivierungs- und Aufreinigungsprozesse zur Herstellung von γ-PGA sollen nunmehr die physiko-chemischen Eigenschaften des erzeugten Biopolymers charakterisiert und gezielt für die Nutzung als grenzflächenaktive



Komponente weiterentwickelt werden. Mit der Kopplung ausgewählter Komponenten können so in weiteren Schritten selbstaggregierende und sterisch stabilisierende Effekte in das anionische γ-PGA-Gerüst chemisch integriert werden, um den Zugang zu einem grenzflächenaktiven Amphiphil zu ermöglichen.

4.2.1 Charakterisierung von γ-PGA

Abb. 30 (A) zeigt das physiko-chemische Verhalten von y-PGA in deionisiertem Wasser anhand seiner (q₃)-Häufigkeitsverteilung. Es fällt auf, dass hier ein dynamischer Wechsel von verschiedenen makromolekularen Formen über den Verlauf der Lichtstreuungsuntersuchungen vorherrscht. Gestreckte Polymerketten mit grobdisperser Verteilung bilden den überwiegenden Anteil in wässriger mittleren Partikeldurchmesser Umgebung mit einem apparenten von 111,607 ± 24,287 µm. Weniger stark ausgeprägt liegen hingegen Gauß-Knäuel mit einem mittleren apparenten Partikeldurchmesser von 0,319 ± 0,017 µm vor. Die REM-Aufnahme aus Abb. 30 (B) zeigt gefriergetrocknetes y-PGA bei 500-facher Vergrößerung. Hier ist deutlich eine kristalline Struktur zu erkennen, die übergeordnet ein vernetztes Gerüst formt. Die gesamte Polymermatrix gleicht einer käfigartigen Struktur mit scharfen Kanten. Am linken Rand, unmittelbar an der SiO₂-Grenzfläche des Objektträgers, lassen sich feine Fasern erkennen (i). Insgesamt ist der stark kantige Charakter von y-PGA auf den hohen Gehalt an Carboxylgruppen innerhalb der Polymerketten zurückzuführen. Als Folge seiner starken ionischen Wechselwirkungen kristallisiert das y-PGA daher in dieser käfigartigen kristallinen Form.





Abb. 30. (A) Volumengewichtete (q₃)-Häufigkeitsverteilung von makromolekularem γ -PGA in Wasser. (B) REM-Aufnahme einer gefriergetrockneten Probe mit (i) feinen Fasern von γ -PGA nach Isolation aus einer *B. licheniformis*-Kultivierung bei 500-facher Vergrößerung.

Abb. 31 zeigt einen Vergleich des anionischen γ -PGA zu einem amphiphilen PVOH anhand der volumengewichteten (q₃)-Häufigkeitsverteilungen.

73



Abb. 31. Vergleich der volumengewichteten (q₃)-Häufigkeitsverteilungen von biopolymeren γ-PGA (blau) und PVOH (orange).

Da das PVOH bereits als grenzflächenaktiver Stabilisator in kolloiddispersen Formulierungen Verwendung findet [36, 208], soll es hier als maßgebende Referenz, stellvertretend für ein Amphiphil, zum physiko-chemischen Vergleich mit y-PGA herangezogen werden. Im Gegensatz zum Biopolymer, welches unspezifisch seine Konformation über den Verlauf beliebig ändert, zeigt sich beim PVOH nur eine bestimmte morphologische Ausprägung. Hier formen sich die Polymerketten in wässriger Umgebung zu Assoziationskolloiden, was hauptsächlich auf die amphiphilen Eigenschaften des PVOH zurückzuführen ist. Der wasserunlösliche Anteil aus Acetatestern orientiert sich aufgrund seiner stark ausgeprägten van-der-Waals-Kräfte zueinander, wohingegen der wasserlösliche Anteil an der Grenzfläche die heterogene Phase gegenüber dem dipolaren Wasser darstellt. Diese Konstellation verleiht dem PVOH seine filmbildenden Eigenschaften an Oberflächen. Darüber hinaus kann PVOH zur Ausbildung einer dispersen Phase aus Assoziationskolloiden genutzt werden, wie es in Abb. 30 dargestellt ist. Die flexible Nutzung des Materials bietet für die Entwicklung von Wirkstoffformulierungen Wirksubstanzen. optimale Bedingungen zur Verkapselung von Die Assoziationskolloide des hier eingesetzten PVOH besitzen einen mittleren apparenten Partikeldurchmesser von 0,386 ± 0,021 µm. Für das y-PGA gilt gleichermaßen, dass erst mit der Bereitstellung eines amphiphilen Charakters die Voraussetzungen geschaffen werden, dem Biopolymer grenzflächenaktive Eigenschaften zu übertragen. Dieser Ansatz wird in der Folge durch die punktuelle Modifikation an dem Biopolymergerüst verfolgt.

4.2.2 Chemische Integration des hydrophoben Effektes in γ-PGA

Mit der Erkenntnis einer physiko-chemisch vorliegenden Dynamik von γ-PGA in wässriger Umgebung soll nun in einem ersten Schritt ein amphiphiler Charakter durch die gezielte Integration einer hydrophoben Komponente in das biopolymere Gerüst erzeugt werden, aus dem sich eine disperse Phase in Wasser ausbilden kann. Der Einbau des Aminosäure-Derivates L-TrpE in das polymere Gerüst stellt bei der Umsetzung eine wichtige Rolle dar. Die stark hydrophobe Komponente überträgt dem Poly-Anion neben seinem bisher ausschließlich ionisch wechselwirkenden Charakter zusätzlich nun einen hydrophoben Charakter, den das Makromolekül in der Folge zu einem selbstaggregierenden Assoziationskolloid in wässriger Umgebung macht. Die Integration wird chemisch über eine EDC-Kopplung realisiert, aus der das amphiphile Kammpolymer Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE) hervorgeht, wie es in **Abb. 32** schematisch dargestellt ist.



Abb. 32. Schematische EDC-Kopplung von anionischem γ-PGA mit hydrophoben L-TrpE zum amphiphilen Kammpolymer Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE).

Bei der Erzeugung grenzflächenaktiver Polymere ist es von Beginn an notwendig, eine stöchiometrische Menge an L-TrpE festzulegen, aus dem ein Biopolymer-



Derivat mit einem HLB-Wert zwischen 12 und 16 gebildet werden kann. Das entspricht einem molaren Kopplungsgrad von L-TrpE an γ-PGA zwischen 20 und 40 %. Eine quantitative Bestimmung kann hier idealerweise über die fluoreszierenden Eigenschaften des Indolgerüsts im L-TrpE erfolgen, um anschließend dem Biopolymer-Derivat seinen konkreten HLB-Wert zuzuordnen. **Abb. 33** zeigt das Anregungs- und Emissionsspektrum von L-TrpE.



Abb. 33. Absorptions-/ Emissionspektrum von L-TrpE mit maximaler Anregungswellenlänge bei $\lambda_{Ex} = 285$ nm (blau) und maximaler Emission bei $\lambda_{Em} = 344$ nm (grün).

Bei einer lichtinduzierten Anregung mit λ_{Ex} = 285 nm und einer Emissionsdetektion von $\lambda_{Em} = 344$ nm ist ein spezifisches Fluoreszenzsignal des Indolgerüsts nachzuweisen [158]. Mit der Festlegung der Messbedingungen lassen sich so gezielt Informationen aus Fluoreszenz-basierten Vergleichsmessungen ermitteln. Für das Poly(-y-GA-*r*-L-TrpE) zeigt sich aus den Untersuchungen eine Kopplung von etwa 30 % der funktionalen Carboxylgruppen. Das entspricht einem HLB-Wert von 14. Dieser Wert liegt inmitten des Bereiches für grenzflächenaktive Stoffe mit bevorzugt o/w-ausbildenden Eigenschaften (HLB = 12 - 16),eine was optimale Ausgangssituation für die Umsetzung zu kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen in Wasser bietet. Aus den Emissionsspektren in Abb. 34 lassen sich die signifikanten Unterschiede von y-PGA und Poly(-y-GA-r-L-TrpE) beobachten.





Abb. 34. Emissionsspektren von γ -PGA (blau, $\lambda_{\text{Em,max}} = \lambda_{\text{Ex,max}} = 285 \text{ nm}$) und Poly(- γ -GA-*r*-L-TrpE) (rot, $\lambda_{\text{Em,max}} = 285 \text{ nm}$, 344 nm) bei einer Anregung von $\lambda_{\text{Ex}} = 285 \text{ nm}$.

Die Emissionsspektren zeigen dabei charakteristische Maxima für beide Materialien bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Em} = 285$ nm. Dies ist das Resultat aus der isotropen Rayleigh-Streuung bei der lichtinduzierten Anregung der Proben mit $\lambda_{Ex} = 285$ nm [209]. Darüber hinaus zeigt das Poly(- γ -GA-*r*-L-TrpE) ein weiteres charakteristisches Emissionsmaximum bei $\lambda_{Em} = 344$ nm. Dieser Peak ist auf die spezifische Emission des Indolgerüsts aus dem L-TrpE zurückzuführen. Beim γ -PGA hingegen ist dieser Peak nicht zu beobachten. Der fluoreszierende Nachweis bestätigt somit die erfolgreiche Integration des Aminosäure-Derivates L-TrpE in das Gerüst von γ -PGA.

Die physiko-chemische Betrachtung von γ -PGA hat gezeigt, dass die morphologische Konformation des Makromoleküls in wässrigem Medium einer dynamischen Natur zugrunde liegt. Die Überwindung der energetischen Barriere von einem Gauß-Knäuel zu gestreckten Polymerketten wird durch den ausschließlich poly-anionischen Charakter kinetisch begünstigt. Das physiko-chemische Verhalten des Kammpolymers Poly(- γ -GA-*r*-L-TrpE) hingegen zeigt in **Abb. 35 (A)** in der volumengewichteten (q₃)-Häufigkeitsverteilung ein verändertes Bild.


Abb. 35. (A) Volumengewichtete (q₃)-Häufigkeitsverteilung von Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE) in deionisiertem Wasser. (B) REM-Aufnahme einer gefriergetrockneten Probe mit (j) kristallinem Charakter und (k) Assoziationskolloiden bei 25.000-facher Vergrößerung.

Hier lässt sich ausschließlich eine morphologische Ausprägung aus Assoziationskolloiden beobachten. Der mittlere apparente Partikeldurchmesser besitzt einen Wert von 0,249 ± 0,012 µm. Während der Messungen konnte zu keinem Zeitpunkt eine andere morphologische Form beobachtet werden, womit sich auch physiko-chemischer Betrachtung erfolgreiche Integration mittels die des

78

hydrophoben Aminosäure-Derivates in das poly-anionische Gerüst bestätigen lässt. Das selbstaggregierende Biopolymer-Derivat bildet so nun die Grundlage für die erfolgreiche Verkapselung einer Wirksubstanz. **Abb. 35 (B)** zeigt eine REM-Aufnahme aus einer gefriergetrockneten Probe mit Poly(- γ -GA-*r*-L-TrpE) bei 25.000-facher Vergrößerung. Entgegen der stark kristallinen Auskristallisation von γ -PGA in Abb. 30 (B) weist das Poly(- γ -GA-*r*-L-TrpE) ein verändertes Kristallisationsverhalten auf. Neben den kristallinen Kanten (j) treten bei diesem Biopolymer-Derivat vermehrt Fragmente von Assoziationskolloiden auf (k), was das Resultat seiner nunmehr amphiphilen Eigenschaften ist.

4.2.3 Glykosilierung von Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE)

Nach der Umsetzung von γ-PGA zum Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE) sollte nun im nächsten Schritt eine weitere Komponente zur sterischen Stabilisierung gezielt in das amphiphile Kammpolymer integriert werden. **Abb. 36** zeigt die schematische Umsetzung über eine EDC-Kopplung zu Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin).



Abb. 36. Schematische Umsetzung von amphiphilen Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE) zu Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin) mit zusätzlichen sterisch stabilisierenden Eigenschaften (blau: γ-PGA-Carboxylgruppen, rot: L-TrpE, grün: Kanamycin).

Abb. 37 (A) zeigt die volumengewichtete (q_3)-Häufigkeitsverteilung des Poly(- γ -GA*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin) in deionisiertem Wasser.



Abb. 37. (A) Volumengewichtete (q₃)-Häufigkeitsverteilung von Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin) in deionisiertem Wasser. (B) REM-Aufnahme einer gefriergetrockneten Probe mit (I) kristallinem Charakter und (m) Assoziationskolloiden bei 5.000-facher Vergrößerung.

Der mittlere apparente Partikeldurchmesser beträgt hier $0,354 \pm 0,022 \mu m$ und ist damit etwas größer als der des zuvor betrachteten Poly(- γ -GA-*r*-L-TrpE). Der Anstieg des Partikeldurchmessers ist dabei ein physiko-chemisches Indiz für den Einbau von Kanamycin in das Biopolymer-Derivat. Aufgrund seines hydrophilen Charakters orientiert sich das Tri-Aminoglykosid zwangsläufig an der heterogenen Grenzfläche des Assoziationskolloids in Richtung des dipolaren Wassers. An den Amin- und Hydroxylgruppen bildet sich in der Folge eine außerordentlich stabile Solvathülle aus. Auf Basis von Lichtstreuungsuntersuchungen führt die Vergrößerung der Solvathülle zu einem Anstieg des mittleren apparenten Partikeldurchmessers von Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin) gegenüber Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE). **Abb. 37 (B)** zeigt eine REM-Aufnahme des gefriergetrockneten Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin) bei 5.000facher Vergrößerung. Hier setzt sich die Abnahme der Kristallinität bei gleichzeitiger Zunahme der strukturellen Komplexität der Biopolymer-Derivate zu Fragmenten aus Assoziationskolloiden fort. Lokal lassen sich an verschiedenen Orten **(I, m)** die unterschiedlichen Charakteristika beobachten.

4.3 Charakterisierung kolloiddisperser Ubichinon Wirkstoffformulierungen

4.3.1 Partikelgrößenverteilung

Abb. 38 stellt die unterschiedlichen Häufigkeitsverteilungen der in dieser Arbeit verwendeten PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung in deionisiertem Wasser dar. Aus der (q₀)-Häufigkeitsverteilung lassen sich Primärpartikeln mit einem mittleren apparenten Partikeldurchmesser von $0,097 \pm 0,005 \mu m$ beobachten. Darüber hinaus zeigt sich bei Betrachtung der (q₃)-Häufigkeitsverteilung eine bimodale Verteilung innerhalb der dispersen Phase. bei der Primärpartikeln mit ihren Partikelagglomeraten oder -aggregaten im Gleichgewicht stehen. Die kolloiddisperse mittleren Partikeldurchmesser Fraktion besitzt einen apparenten von $0,203 \pm 0,022 \mu m$, wohingegen die grobdisperse Fraktion einen mittleren apparenten Partikeldurchmesser von $1,527 \pm 0,048 \,\mu m$ aufweist. Anhand der beiden Häufigkeitsverteilungen lassen sich deutlich die Auswirkungen des komplexen Zusammenspiels physiko-chemischer Eigenschaften in einer dispersen Phase aufzeigen. Auf der einen Seite führt die starke Hydrophobizität des Ubichinons aufgrund seiner starken van-der-Waals-Wechselwirkung zu verstärkter Annäherung einzelner Partikeln. Das oberflächenaktive PVOH verhindert auf der anderen Seite die Koaleszenz (chemisorptive Annäherung) der emulsiven Kernkomponenten, so dass eine disperse Phase dauerhaft aufrechterhalten werden kann. Mit dem Einfluss des elektrokinetischen ζ-Potentials liegt darüber hinaus ein weiterer physikochemischer Faktor vor, der ebenso einen signifikanten Einfluss auf die Stabilität einer dispersen Phase hat. Bei der PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung liegt das ζ -Potential in deionisierten Wasser bei -6,3 ± 6,2 mV.



Abb. 38. Anzahl- (q₀, blau) und volumengewichtete (q₃, rot) Häufigkeitsverteilung der PVOH/Ubichinon-Wirkstoffformulierung in deionisiertem Wasser.

Abb. 39 zeigt die Ergebnisse aus den Lichtstreuungsmessungen einer Poly(-y-GA-r-L-TrpE)-stabilisierten kolloiddispersen Ubichinon-Wirkstoffformulierung in deionisiertem Wasser. Diese Formulierung beinhaltet das aus dem y-PGA gebildete amphiphile Poly(-y-GA-r-L-TrpE) als grenzflächenaktive Komponente und ersetzt damit das PVOH aus der Referenzformulierung. Die anzahlgewichtete (q₀)-Häufigkeitsverteilung zeigt auch hier eine Engverteilung von Primärpartikelgrößen mit einem mittleren apparenten Partikeldurchmesser von 0,104 ± 0,006 µm. Selbst die volumengewichtete (q₃)-Häufigkeitsverteilung hat mit der bimodalen Verteilung einen sehr ähnlichen Charakter zur bereits betrachteten Größenverteilung der Referenzformulierung. Die kolloiddisperse Fraktion besitzt einen mittleren apparenten Partikeldurchmesser von 0,250 ± 0,026 µm, während die grobdisperse Fraktion einen mittleren apparenten Partikeldurchmesser von 1,639 ± 0,037 µm aufweist. Im Unterschied zur Referenzformulierung basiert allerdings hier die Aufrechterhaltung der dispersen Phase hauptsächlich auf der elektrostatischen Abstoßung kolloiddisperser Teilchen, die durch die freien Carboxylgruppen auf der Oberfläche jeder partikulären Einheit erzeugt wird. In der Konsequenz führt das zu einem stark negativen ζ -Potential von -60,6 ± 4,9 mV. Aus einem Vergleich mit der zuvor diskutierten Referenzformulierung deutet sich an, dass der bimodale Charakter der kolloiddispersen Ubichinon-Formulierungen grundsätzlich auf die starken vander-Waals-Wechselwirkungen des Ubichinons im Partikelkern und weniger auf Grenzflächeneffekte zurückzuführen sind.



Abb. 39. Anzahl- (q_0 , blau) und volumengewichtete (q_3 , rot) Häufigkeitsverteilung der Poly(- γ -GA-r-L-TrpE)- stabilisierten Ubichinon-Wirkstoffformulierung in deionisiertem Wasser.

Abb. 40 zeigt die Häufigkeitsverteilungen der Poly(-y-GA-r-L-TrpE-r-Kanamycin)stabilisierten Wirkstoffformulierung. Der mittlere apparente Partikeldurchmesser liegt bei $0,101 \pm 0,005 \,\mu m.$ Mit dem Vergleich zu den bisher betrachteten Wirkstoffformulierungen fällt auf, dass alle (q₀)-Häufigkeitsverteilungen eine große Ähnlichkeit besitzen. Die mittleren apparenten Partikeldurchmesser weichen nur geringfügig voneinander ab. Auf Basis der unterschiedlich eingesetzten Komponenten bei jeder Wirkstoffformulierung ist der Einfluss auf die Bildung der aber nicht kleinsten partikulären Einheiten auf die Zusammensetzung zurückzuführen. Eher scheint der durchschnittlich gebildete mittlere apparente Partikeldurchmesser das Resultat aus dem jeweils gleichen Energieeintrag während des Umsetzungsprozesses über die Hochdruckhomogenisation zu sein [3].



Abb. 40. Anzahl- (q₀, blau) und volumengewichtete (q₃, rot) Häufigkeitsverteilung der Poly(-γ-GA-r-L-TrpE-*r*-Kanamycin)-stabilisierten Ubichinon-Wirkstoffformulierung in deionisiertem Wasser.

Ganz gegensätzlich verhält sich die Wirkstoffformulierung bei Betrachtung der (q₃)-Häufigkeitsverteilung. Hier lässt sich eine ausschließlich monomodale Verteilung mit einem mittleren apparenten Partikeldurchmesser von 0,192 ± 0,010 µm beobachten. Die Integration des Kanamycins verhindert in der Formulierung offensichtlich die sterische Annäherung von partikulären Einheiten. In der Folge verlagert sich das Gleichgewicht hin zu einer kolloiddispersen Phase, so dass diese den Hauptbestandteil dieser Formulierung ausmacht. Neben der sterischen Abschirmung besitzt die Formulierung ein stark negatives elektrokinetisches ζ-Potential von -51,0 ± 5,2 mV, was zusätzlich zur Stabilität der kolloiddispersen Phase beiträgt. Durch die weitere Kopplung des Kanamycins an die freien Carboxylgruppen des γ-PGA-Derivates ist das elektrokinetische ζ-Potential entsprechend um den Betrag des Kopplungsgrades niedriger. Die geschaffenen Voraussetzungen eines stabilen physiko-chemischen Systems bieten nunmehr eine optimale Plattform für Untersuchungen an lebenden Zellen.

4.3.2 Oberfläche, Volumen und Wirkstoffbeladung

Die Wahrscheinlichkeit eines verkapselten Wirkstoffes in lebende Zellen zu gelangen und dort seine Wirkung zu entfalten ist primär von den physiko-chemischen Eigenschaften seines Transportsystems abhängig. Maßgeblichen Einfluss haben die physiko-chemischen Parameter Partikelgröße, Oberflächenbeschaffenheit/-ladung und Partikelform [106]. Darüber hinaus ist die Partikelbeladung mit dem Wirkstoff ein wichtiger Faktor, der die Wirksamkeit einer kolloiddispersen Formulierung erheblich beeinflusst. In **Tab. 10** sind die einzelnen Charakteristika der hier eingesetzten Wirkstoffformulierungen zusammengefasst.

Tab. 10. Oberflächencharakteristika und Wirkstoffbeladung der in dieser Arbeit eingesetzten Formulierungen.

Wirkstoff	Ubichinon			
Stabilisator	PVOH	Poly(-γ-GA- <i>r</i> -L- TrpE)	Poly(-γ-GA- <i>r</i> -L- TrpE- <i>r</i> -Kanamycin)	
mittlerer apparenter Partikeldurchmesser (µm)				
mean _{50,0}	$0,097 \pm 0,005$	0,104 ± 0,006	0,101 ± 0,005	
mean _{50,3} (1. Fraktion, ≤ 1 μm) (2. Fraktion, ≥ 1 μm)	0,203 ± 0,022 1,527 ± 0,048	0,250 ± 0,026 1,639 ± 0,037	0,192 ± 0,010	
Oberfläche (µm² Partikel ⁻¹)	2,84·10 ⁻²	3,40·10 ⁻²	3,20·10 ⁻²	
Volumen (µm ³ Partikel ⁻¹)	4,78·10 ⁻⁴	5,89·10 ⁻⁴	5,39·10 ⁻⁴	
S/V-Verhältnis (µm⁻¹)	61,86	57,69	59,41	
Partikelkonzentration (mL ⁻¹)	1,52·10 ¹⁹	4,95·10 ¹⁹	2,80·10 ¹⁹	
ζ-Potential (mV)	- 6,3 ± 6,2	- 60,6 ± 4,9	- 51,0 ± 5,2	

Mit den aus Kap. 4.2.4 gewonnenen Erkenntnissen über die Partikelgrößenverteilung lassen sich Informationen über das S/V-Verhältnis sowie über die Anzahl von Wirkstoffpartikeln pro Volumen erhalten. Bei den hier betrachteten Wirkstoffformulierungen ergibt sich jeweils ein S/V-Verhältnis mit einem Wert von



etwa 60 µm⁻¹. Nach größenbasierter Einordnung aus Kap. 2.1.6 besitzen die unterschiedlichen Wirkstoffformulierungen Primärpartikeln mit kolloiddispersen Eigenschaften, die potentiell über passive Transportwege in lebende Zellen penetrieren können [106, 210–214].

Die Präsenz von Partikelagglomeraten bzw. der -aggregaten spielt für die Wirkstofffreisetzung eine besondere Rolle. Grobdisperse Partikelformen sind zwar von ihrer Beschaffenheit nicht als Transportsystem von Wirkstoffen in lebende Zellen geeignet, dennoch setzen Wirkstoff-beladene Agglomerate durch die reversible Abgabe einzelner Primärpartikeln den Wirkstoff nachhaltig frei. Im Gegensatz dazu sinkt die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes in Aggregaten drastisch. Ein Nachweis zur Unterscheidung der beiden Partikelformen ist hier nur indirekt über das physikochemische Verhalten unter physiologischen Bedingungen sowie über die Bestimmung der Wirksamkeit möglich. Neben der Partikelgröße beeinflusst auch die Oberflächencharakteristik einer partikulären Einheit (un-)spezifische Wechselwirkungen. Polare und apolare Ladungen bestimmter Stoffgruppen bilden eine heterogene Grenzfläche eines Partikels zu seiner wässrigen Umgebung aus. der hier verwendeten PVOH-Referenzformulierung wurde Auf Basis ein grenzflächenaktives Polymer eingesetzt, das vor allem durch seine dipolaren Hydroxylgruppen die Barriere der heterogenen Grenzschicht zum Wasser hin bildet. Die Ladung bzw. das elektrokinetische ζ-Potential der PVOH-stabilisierten Partikeln ist entsprechend seiner chemischen Natur mit -6.3 ± 6.2 mV nur sehr gering. Die große Abweichung des Wertes deutet an, dass das elektrokinetische Potential sich insgesamt stets gegen Null hin orientiert. Eine elektrostatische Stabilisierung in der Referenzformulierung ist somit weitestgehend ausgeschlossen. Zwangsläufig muss von einer sterischen Stabilisierung ausgegangen werden. Bei Betrachtung der Biopolymer-basierten Formulierungen verhält sich der physiko-chemische Charakter grundsätzlich verschieden. Bedingt durch den stark abweichenden Aufbau von Poly(-y-GA-r-L-TrpE) lässt sich in der Wirkstoffformulierung ein stark negatives ζ -Potential nachweisen. Dies ist mit einem Wert von -60,6 ± 4,9 mV im Vergleich zur PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung um den Faktor zehn geringer. Als ausschlaggebende Größe für den Unterschied sind hier die an der Grenzfläche vorhandenen Carboxylgruppen des Biopolymer-Derivates, die in der Folge ihrer starken Elektronegativität zu einer ebenso starken elektrostatischen Abstoßung von Partikeln führt. Eine reine elektrostatische Stabilisierung bringt allerdings unter physiologischen Bedingungen gewisse Risiken mit sich. Nach Hofmeister [100] ist

86

anzunehmen, dass die elektrostatische Stabilität in Anwesenheit von Salzen stark beeinträchtigt wird, so dass sich eine Solvathülle unter den Umgebungsbedingungen auflösen kann [58]. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese ab einer Osmolalität von 0,02 osmol kg⁻¹ praktisch nicht mehr vorliegt. Im Fall der vollständigen Auflösung einer Solvathülle würde dies in einer rein elektrostatisch stabilisierten Formulierung die Wahrscheinlichkeit einer irreversiblen Chemisorption signifikant erhöhen, was weiterführend zu einer vollständigen Aggregation von Primärpartikeln führt. Mit Hinblick auf eine effektive Nutzung der Wirkstoffformulierungen unter solchen Umgebungsbedingungen reicht eine elektrostatische Abschirmung daher nicht aus [58]. Mit der Kopplung von Kanamycin an das amphiphile Biopolymer Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE) wurde mit Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin) ein γ-PGA-Derivat geschaffen, das der Wirkstoffformulierung zusätzlich sterisch stabilisierende Eigenschaften verleiht.

Nach der Bereitstellung einer stabilen kolloiddispersen Formulierung ist es nunmehr notwendig, die Freisetzungsmechanismen der vorliegenden Wirkstoffe optimal einzusetzen. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Möglichkeiten wie die Freisetzung von Wirkstoffen kinetisch ablaufen kann. Basierend auf dem Löslichkeitsprodukt des Wirkstoffes wird dieser in wässrigem Medium zu jeder Zeit zu einem gewissen Prozentsatz gelöst vorliegen. Durch den stetigen Abbau des gelösten Wirkstoffes verlagert sich der Konzentrationsgradient kontinuierlich von nicht-gelöstem zu gelöstem Wirkstoff, so dass sich nach und nach die partikulären Einheiten auflösen und der Wirkstoff freigesetzt wird. In einem weiteren kiss-and-run-Mechanismus wird die stoffliche Übertragung eines hydrophoben Wirkstoffes beim Aufeinandertreffen auf die hydrophoben Kompartimente einer Zelle beschrieben [215]. Dieser Mechanismus tritt insbesondere bei nahezu allen wasserunlöslichen Wirkstoffen ein, die entgegen ihrer geringen Bioverfügbarkeit dennoch ihre Wirkung als solches entfalten können. Ubichinon gehört durch seine chemische Natur tendenziell zu dieser Gruppe von Wirkstoffen.

4.3.3 REM-Bildanalyse

Zur vollständigen Bewertung der hier verwendeten kolloiddispersen Materialien müssen diese neben der statistischen Partikelgrößenverteilung auch visuell abgebildet werden. Da Ubichinon emulsiv als unterkühlte Schmelze in



kolloiddispersen Systemen vorliegt [216], war es notwendig, eine angepasste Präparationsmethode zu entwickeln. Die Formulierungen wurden zunächst schockgefroren, um thermische Umwandlungsprozesse der partikulären Einheiten zu verhindern. Mit dem vollständigen Entfernen des restlichen Wassers durch Gefriertrocknung war es möglich, ein reales Abbild der Proben aufzunehmen. Abb. 41 (A) zeigt eine REM-Aufnahme der PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung mit 15.000-facher Vergrößerung. Lange Fäden zeigen eine polymere PVOH-Matrix, die sich durch den filmbildenden Charakter des Polymers ausbilden [217]. Entlang der PVOH-Fäden sind sphärische Kugeln (n) und Plättchen (o) aus Ubichinon zu beobachten. Die Plättchen stellen eine Nebenerscheinung der Probenpräparation dar, die durch die kinetisch-bedingte Dauer des Gefriervorgangs erzeugt werden. Nach bildanalytischer Auswertung lassen sich Primärpartikeln mit einem Feret-Durchmesser zwischen 0,090 und 1,060 µm beobachten, was gut mit den Ergebnissen aus der statistischen Partikelgrößenverteilung aus Kap. 4.2.4 übereinstimmt. Abb. 41 (B) zeigt eine REM-Aufnahme der Poly(-y-GA-r-L-TrpE)basierten Wirkstoffformulierung. Die kolloiddispersen Ubichinon-Partikeln weisen einen Größenbereich zwischen 0,090 und 0,500 µm auf. Besonders auffällig **PVOH-basierten** Referenzformulierung gegenüber der ist hier das Kristallisationsverhalten der biopolymeren Komponente. Während sich bei der Präparation mit PVOH eine filmbildende Polymermatrix ausbildet, sind bei der Poly(y-GA-*r*-L-TrpE)/Ubichinon-Formulierung ausschließlich Kolloide (p) zu beobachten, was dem Kristallisationsverhalten des reinen Biopolymer-Derivates aus Kap. 4.2.2 sehr ähnelt. Während des Gefrierprozesses scheinen hier die Kristallisationseigenschaften des Biopolymer-Derivates die von Ubichinon zu überlagern, was in einer REM-Aufnahme zu einem grundsätzlich unterschiedlichen Aussehen gegenüber der PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung führt. Für die Poly(-y-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin)-basierte Ubichinon-Formulierung zeiat sich entsprechend in Abb. 41 (C) eine ähnliche Morphologie sowie ein ähnliches Kristallisationsverhalten zur Poly(-y-GA-*r*-L-TrpE)/Ubichinon-Formulierung. Hier erstreckt sich eine Partikelgrößenverteilung zwischen 0,090 und 0,210 µm.





Abb. 41. REM-Aufnahme einer gefriergetrockneten Ubichinon-Wirkstoffformulierung mit (A) PVOH als Stabilisator mit (n) Kugeln und (o) Plättchen (15.000-fache Vergrößerung), (B) Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE) als Stabilisator mit (p) Kolloiden (30.000-fache Vergrößerung), (C) Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin) als Stabilisator (40.000-fache Vergrößerung).



4.3.4 Stabilität unter physiologischen Bedingungen

Die Stabilität von kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen bildet ein wichtiges Kriterium für den Einsatz bei therapeutischen Fragestellungen. Aufgrund seiner besonderen Rolle ist dieses Thema deshalb ein viel diskutierter Bestandteil in den Kolloidwissenschaften [218–220]. Oftmals wird allerdings die Tatsache außer Acht gelassen, dass kolloiddisperse Wirkstoffformulierungen bei Anwendung an lebenden Zellen physiologischen Bedingungen ausgesetzt sind, die nicht denen unmittelbar nach Herstellung und Lagerung entsprechen. Ein physiologisches oder auch isotonisches Umfeld ist sowohl geprägt von der Anwesenheit kosmotroper wie auch chaotroper Salze und anderer Agentien. Im Zusammenspiel bewirken diese Medienkomponenten bei einer kolloiddispersen Formulierung eine Neuausrichtung des vorliegenden Gleichgewichtes aus Primärpartikeln und deren Agglomeraten bzw. Aggregaten. In Komplexmedien, wie sie hier in dieser Arbeit betrachtet werden, kann es auch zu unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen Komponenten, wie beispielsweise Proteinen, Enzymen und Oligopeptiden/-nukleotiden, kommen. Im ungünstigsten Fall führt das zu einer Sedimentation des Wirkstoffes, was in der Folge die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffformulierung signifikant reduziert. Dies hätte wiederum direkten Einfluss auf die Wirksamkeit bei physiologischen Untersuchungen. Um das Risiko im Vorfeld minimieren oder gar ausschließen zu sollen hier neben den Stabilitätsstudien der kolloiddispersen können. Wirkstoffformulierungen in deionisierten Wasser auch Stabilitäten der Formulierungen unter physiologischen Bedingungen in einem LB-Komplexmedium untersucht werden. Für alle folgenden physiologischen Stabilitätsstudien an den kolloiddispersen Wirkstoffformulierungen wurde das Puffer-angepasste LB-Komplexmedium (vgl. Kap. 4.3.1, Tab. 8), das auch für die Kultivierung der Hefezellen verwendet wurde, eingesetzt. Die Osmolalität des Komplexmediums entspricht mit 0,3 osmol kg⁻¹ der einer isotonischen 0,9 %-igen NaCl-Lösung. Neben den Salzen beinhaltet das LB-Komplexmedium darüber hinaus Hefeextrakt und Bacto-Pepton. Da sich unter diesen Bedingungen die elektrostatische Abstoßung bei den partikulären Einheiten vollständig auflöst, muss sich zwangsläufig das Gleichgewicht zwischen Primärpartikeln und Agglomeraten in den Formulierungen neu einstellen. Als maßgebende Parameter zur Bewertung der kolloiddispersen Stabilität wird die Partikelgrößenveränderung in der volumengewichteten (g₃)-Häufigkeitsverteilung verfolgt.

Abb. 42 stellt den Vergleich der (q₃)-Häufigkeitsverteilungen der PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung in deionisiertem Wasser und in LB-Komplexmedium dar.



Abb. 42. Vergleich der volumengewichteten (q₃)-Häufigkeitsverteilung der PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung in reinem Wasser (blau) mit der in LB-Komplexmedium (orange).

Hier ist beobachten. dass tatsächlich eine Neuordnung der zu Partikelgrößenverteilung eintritt. Die in reinem Wasser bimodale Verteilung wechselt im LB-Komplexmedium zu einer monomodalen Partikelgrößenverteilung. In der Folge ändert sich der mittlere apparente Partikeldurchmesser von 0,203 ± 0,022 µm in deionsiertem Wasser zu 0,435 ± 0,023 µm im LB-Komplexmedium. Grundsätzlich kann bei der Beobachtung eines Wechsels von einer bi- zu einer monomodalen Größenverteilung davon ausgegangen werden, dass Agglomerate bei der Neuordnung beteiligt sein müssen. Das schließt in gleichem Maße die Anwesenheit PVOH/Ubichinon-Aggregaten in der dispersen Phase aus. Die von Referenzformulierung stellt mit seinem physiko-chemischen Verhalten unter physiologischen Bedingungen daher ein geeignetes kolloiddisperses System dar, bei dem eine Reduktion der Bioverfügbarkeit auszuschließen ist.



Abb. 43 zeigt den Vergleich aus den (q₃)-Häufigkeitsverteilungen der Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE)/Ubichinon-Wirkstoffformulierung in deionisiertem Wasser und im LB-Komplexmedium.



Abb. 43. Vergleich der volumengewichteten (q₃)-Häufigkeitsverteilung von Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE)/Ubichinon-Wirkstoffformulierung in reinem Wasser (blau) mit der in LB-Komplexmedium (orange).

Hier ist ein Wechsel der Partikelgrößen von einer engen bimodalen Verteilung zu einer breiten Größenverteilung zu beobachten. Unter physiologischen Bedingungen liegen nun grobdisperse Partikelgrößen von bis zu $d_V = 100 \,\mu m$ vor, was grundsätzlich durch den ausschließlich elektrostatisch stabilisierenden Charakter der Poly(- γ -GA-*r*-L-TrpE)-basierten Wirkstoffformulierung zu erklären ist. Die stabilisierende Solvathülle um die ionischen Carboxylgruppen löst sich bei Anstieg der Osmolalität auf, was im Folgenden zur Bildung verschieden großer Agglomerate führt. Der mittlere apparente Partikeldurchmesser steigt im LB-Komplexmedium auf insgesamt 3,628 ± 0,764 µm an.

Das physiko-chemische Verhalten der weiterentwickelten Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin)/Ubichinon-Wirkstoffformulierung zeigt **Abb. 44**.



Abb. 44. Vergleich der volumengewichteten (q₃)-Häufigkeitsverteilung der Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin)/Ubichinon-Wirkstoffformulierung in reinem Wasser (blau) mit der in LB-Komplexmedium (orange).

Hier lässt sich unter physiologischen Bedingungen eine Verlagerung der monomodalen Partikelgrößenverteilung in deionisiertem Wasser hin zu einer schwach ausgeprägten bimodalen Verteilung im LB-Komplexmedium erkennen. Große Agglomerate mit einem mittleren apparenten Partikeldurchmesser von 15,465 \pm 0,136 µm machen aber insgesamt nur etwa 1 % des volumengewichteten Gesamtanteils aus. Der Hauptbestandteil weist eine Verteilung mit einem mittleren apparenten Partikeldurchmesser von 0,364 \pm 0,028 µm auf. Die Verlagerung zu größeren Agglomeraten ist bei Betrachtung nur gering, was auf den sterisch abschirmenden Einfluss des Kanamycins in dem γ -PGA-Derivat zurückzuführen ist. Damit zeigt sich durch die punktuelle Modifikation an dem Biopolymer-Derivat eine Verbesserung der stabilisierenden Eigenschaften unter Einwirkung von äußeren Einflüssen. Die Wirksamkeit kann bei dieser Wirkstoffformulierung als grundsätzlich unverändert betrachtet werden, da stets ein stabiles kolloiddisperses System vorliegt.



4.4 In vitro-Untersuchungen an der Hefe S. cerevisiae N34

4.4.1 Prozessoptimierung bei der Kultivierung von Hefezellen

Die morphologische Vielfältigkeit einer Hefekultur während ihrer Kultivierung setzt von Beginn an eine Festlegung einer optimalen Glucose-Konzentration voraus [18]. Als Kohlenstoffquelle hat das Monosaccharid unmittelbaren Einfluss auf die BTM-Konzentration und damit gleichermaßen auf die morphologische Zellverteilung innerhalb einer Kultivierungsbrühe. Zur Durchführung physiologischer Untersuchungen muss grundlegend sichergestellt werden, dass jede Zelle in der Kultivierungsbrühe zu gleichen Teilen mit Wirkstoffpartikeln beladen werden kann. Das ist nicht möglich, sobald der volumengewichtete Anteil an kubischen Zellaggregaten, $n \ge 5$ Hefezellen, signifikant groß ist. Eine gleichmäßige Beladung von Wirkstoffpartikeln an Hefezellen wäre unter diesen Umständen nicht gewährleistet. Als Folge stark abweichender Ergebnisse könnten bei den Untersuchungen keine reproduzierbaren Informationen erhalten werden. Anders verhält es sich bei der Ausbildung von Hefezellen als Primärzelle, Knospenzelle und planare Pakete. Diese morphologischen Formen gewährleisten durch ihre zugängliche Zelloberfläche im umgebenden Raum eine gleichmäßige Wirkstoffversorgung. Nach umfassenden Untersuchungen hat sich gezeigt, dass eine Glucose-Konzentration von $c_s = 7,39 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ im Nährmedium optimale Bedingungen für die weiteren in vitro-Untersuchungen bietet. Tab. 11 fasst die Ergebnisse aus einem Vergleich unterschiedlicher Glucose-Konzentrationen zusammen.

Prozessparameter	$c_{s} = 7,4 \text{ g L}^{-1}$ $c_{X} = 1,6 \text{ g L}^{-1}$ $Y_{X/S} = 0,22 \text{ g}_{BTM} \text{ gs}^{-1}$	$c_{s} = 10 \text{ g L}^{-1}$ $c_{x} = 2,2 \text{ g L}^{-1}$ $Y_{x/s} = 0,22 \text{ g}_{BTM} \text{ gs}^{-1}$
Morphologieform	q₃ (%)	q ₃ (%)
Primärzellen (n = 1)	37,6	31,8
Knospenzellen (<i>budding cells</i> , n = 2)	53,4	41,0
planare Pakete (n = 3-4)	7,6	15,4
kubische Pakete (n ≥ 5)	1,4	11,8

Tab. 11. Substrat-/ Biomasseabhängige Morphologieverteilung bei sequentieller Fed Batch-Kultivierung von *S. cerevisiae* N34 [19].

L.

Kubische Zellaggregate treten unter den Bedingungen zu einem volumengewichteten Anteil von nur 1,4 % auf, während der Gesamtanteil der gewünschten Morphologieformen entsprechend 98,6 % ausmacht. Allerdings, schon bei geringer Erhöhung der Glucose-Konzentration auf $c_s = 10$ g L⁻¹, zeigt sich bei direktem Vergleich eine signifikante Verlagerung zu unerwünschten kubischen Zellaggregaten von bis zu 11,8 %, so dass nur noch 88,2 % der präferierten Morphologieform aussagekräftige Informationen liefern würden. In einem sequentiellen Fed Batch-Prozess, wie er in dieser Arbeit verwendet wird, führt die Glucose-Konzentration von $c_s = 7,4$ g L⁻¹ während der Kultivierung zu einer konstanten BTM-Konzentration von $c_x = 1,56 \pm 0,06$ g L⁻¹. Die spezifische Wachstumsrate μ liegt nach Erreichen der stationären Phase in der Kultivierung zwischen 6,3 und 6,7·10⁻² h⁻¹.

Zum Nachweis konstant vorherrschender Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor wurde mit Hilfe einer FBRM-Sonde eine Methode zur inline-Charakterisierung der Zellpopulation entwickelt. Eine Vergleichsstudie soll dabei aufzeigen, dass der Informationsgehalt dieses Messprinzips gegenüber etablierten Methoden zuverlässig ist. **Abb. 45** zeigt dazu einen direkten Vergleich aus den Ergebnissen einer anzahlgewichteten Größenverteilung von Hefezellen mit FBRM, Lichtstreuung und optischer Bildanalyse unter konstanten Kultivierungsbedingungen.



Abb. 45. Vergleich der anzahlgewichteten (q₀)-Häufigkeitsverteilungen von *S. cerevisiae* N34-Zellen mit unterschiedlichen Methoden: FBRM (weiss), Lichtstreuung (schwarz) und optische Bildanalyse mittels mikroskopischer Aufnahmen (rot) [19].

Der direkte Vergleich zeigt bei allen Messergebnissen eine ähnliche Größenverteilung mit geringfügigen Unterschieden, die zwangsläufig auf die unterschiedlichen Präparationstechniken zurückzuführen sind. Die Ergebnisse mit den Lichtstreuungsuntersuchungen zeigen eine Zellgrößenverteilung der Hefe mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 4,37 ± 0,97 µm. Das Messprinzip basiert dabei grundsätzlich auf der Messung einer unendlich verdünnten Probe, womit Störeffekte durch Mehrfachstreuung bei zu großer Zell-/Partikeldichte ausgeschlossen werden sollen. Als unmittelbare Folge der starken Verdünnung, die je nach Material den Faktor 10³ bis 10⁹ betragen kann, lösen sich Zellaggregate aus der Kultivierungsbrühe auf. Zudem wird nur ein Bruchteil der gesamten Menge in der Kultivierungsbrühe untersucht, was keinen statistischen Informationsgehalt über den Zustand im Bioreaktor liefert. Die Methode eignet sich daher zur Identifikation der elementaren Größen einer Hefezelle als Primärzelle. Mit einer bildanalytischen Auswertung von mikroskopischen Aufnahmen lässt sich ein mittlerer

Partikeldurchmesser von $4,85 \pm 1,00 \,\mu\text{m}$ beobachten. Die Informationen beziehen sich hier auf die Auszählung von mehr als 5,0.10³ Hefezellen. Mit Hilfe dieses Messprinzips lassen sich neben der Größenverteilung detaillierte Informationen über Form und Anteile unterschiedlicher Morphologien aus der Kultivierungsbrühe ermitteln, wie u.a. in Tab 11 aufgelistet ist. Allerdings ist es auch hier durch die Vermessung von vergleichsweise geringen Mengen einer Kultivierungsbrühe nicht möglich, eine Größenverteilung mit statistischer Sicherheit zu erhalten. Bei der Echtzeitverfolgung mittels FBRM zeigt sich nach 20-stündiger Bestimmung ein mittlerer Zelldurchmesser von 7,95 ± 0,84 µm. Mit dieser Messmethode kann im Unterschied zu den anderen beiden Messmethoden ein ganzheitlicher Eindruck der Größenverteilung von Hefezellen in der Kultivierungsbrühe erhalten werden. Als integraler Bestandteil misst die FBRM-Sonde in Echtzeit gleichzeitig die Veränderungen von Zellzahl und Zellgrößenverteilung, was die bisher nur betrachteten gualitativen Informationen um den guantitativen Gehalt einer Zellpopulation gegenüber den anderen beiden Methoden erweitert. Die breite Zellgrößenverteilung ergibt sich aus der ellipsoiden Form der Hefe, die bei S. cerevisiae N34 ein durchschnittliches Aspektverhältnis von etwa 1,2 hat. Mit der Verfolgung von gleichbleibender Zellzahl und -größenverteilung im Bioreaktor können so konstante Bedingungen festgestellt werden. Damit stellt eine FBRM-basierte Messmethode ein geeignetes Werkzeug zur Überwachung der morphologischen Gleichgewichtszustände der Hefezellen während einer seguentiellen Fed Batch-Kultivierung dar. Mit Hilfe dieser Informationen lassen sich so optimale Bedingungen für weitere Untersuchungen einstellen und verfolgen.

4.4.2 Nachweis von oxidativem Stress an S. cerevisiae N34

Nach Festlegung der Rahmenbedingungen während der Hefekultivierung muss nun ein System zur quantitativen Bestimmung von oxidativem Stress in Organismen bereitgestellt werden. Dabei scheint der genetisch modifizierte Hefestamm *S. cerevisiae* N34 für diese Fragestellung ein geeigneter eukaryotischer Organismus zu sein. Durch seine spezifische Genmodifikation exprimiert *S. cerevisiae* N34 bei einem Übermaß an ROS selektiv das fluoreszierende Protein GFP [221]. Mit dem fluoreszierenden Signal liegt eine physikalisch messbare Größe vor, die im Folgenden zum qualitativen wie auch quantitativen Nachweis von induziertem Stress genutzt werden kann.



Für einen selektiven Nachweis von GFP nach Stressinduktion muss zunächst sichergestellt werden, dass das erfasste Signal ausschließlich auf das exprimierte Protein zurückzuführen ist. Detaillierte Informationen des Fluoreszenzverhaltens sich einer Fluoreszenzmessung bei unterschiedlichen ergeben aus Anregungswellenlängen. Der Wellenlängenbereich des Anregungsspektrums λ_{Ex} wurde auf 350 bis 550 nm festgelegt. Die Emissionwellenlänge λ_{Em} wurde gleichfalls im Bereich zwischen 350 und 560 nm aufgenommen. In diesem Bereich zeigen sich relevanten Fluoreszenzsignale und potentielle Störfaktoren. alle Bei der Stressinduktion von S. cerevisiae N34 mit einer spezifischen Diamid-Beladung von 200 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ lässt sich ein großer fluoreszierender Bereich bei einer Anregung λ_{Ex} zwischen 350 und 450 nm mit charakteristischer Emissionsbreite λ_{Em} zwischen 375 und 525 nm beobachten. Hier kann, wie in [222] bereits diskutiert, der Anstieg des NADH/H⁺-Gehaltes durch oxidativen Stress beobachtet werden. Daneben zeigt sich ein weiteres charakteristisches Fluoreszenzsignal bei Anregung λ_{Ex} von 475 nm und Emission λ_{Em} zwischen 505 und 520 nm. Abb. 46 (A) stellt dieses Signal gegen ein Fluoreszenzsignal eines konventionellen GFP-Proteins [223] nach gleicher Anregungswellenlänge λ_{Ex} bei 475 nm dar.



Abb. 46. (A) Vergleich der Emissionsspektren (Anregung $\lambda_{Ex} = 475$ nm) einer GFP-Referenz mit dem GFP aus der Hefe *S. cerevisiae* N34, (B) CLSM-Abbildungen der gleichen Proben während der Kultivierung im

Bioreaktor sowie (C) nach zweistündiger Stressinduktion mit einer spezifischen Diamid-Beladung von 200 mg_{Diamid} g_{BTM⁻¹}.

Aus dem Vergleich der beiden Fluoreszenzverläufe geht hervor, dass es sich hierbei, aufgrund der stark ähnelnden Charakteristika, um das von S. cerevisiae N34 gebildete GFP handelt. Jedoch gibt es bei genauer Betrachtung geringe charakteristische Unterschiede. Das Fluoreszenzmaximum des von der Hefe generierten GFP liegt beispielsweise bei einer Emission $\lambda_{Em,max}$ von 520 nm, während das Fluoreszenzmaximum der Referenz bei einer Emissionswellenlänge $\lambda_{Em,max}$ von 505 nm liegt. Hier tritt somit eine Verschiebung des Peakmaximums um 15 nm auf. Weiterhin fällt die durch S. cerevisiae N34 generierte Fluoreszenz nach Überschreiten des Maximums zu größer werdenden Wellenlängen langsamer ab, als es bei der GFP-Referenz zu beobachten ist. Dieser Verlauf ähnelt eher der Charakteristik eines gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) mit $\lambda_{Em,max}$ = 527 nm [190]. Bei einem YFP ist der Energiebetrag zur Anregung geringer, da das Fluorophor mit einer weiteren Komponente, meist Tyrosin, in Wechselwirkung tritt und damit das konjugierte π -Elektronensystem erweitert. Wegen dieses fluoreszierenden Verhaltens muss im Weiteren mindestens von einer abgewandelten Form des GFPs ausgegangen werden, die von der Hefe S. cerevisiae N34 unter oxidativem Stress gebildet wird. Trotz des Unterschiedes lässt sich dennoch der fluoreszierende Peak selektiv dem stressinduziertem Hefe-GFP zuordnen und schließt den weiteren Einfluss anderer Faktoren aus. Somit ist sichergestellt, dass das Fluoreszenzsignal eindeutig auf die Expression des Hefe-spezifischen GFPs zurückzuführen ist. Abb. 46 (B) und (C) zeigen entsprechend der CLSM-Aufnahmen den Anstieg einer Fluoreszenz nach Stressinduktion. Die nicht-stressinduzierte Kontrolle aus einer Kultivierung im Bioreaktor zeigt in Abb. 46 (B) eine kaum wahrnehmbare Fluoreszenz. Scheinbar fluoreszierende Bildpunkte gehen als Hintergrundrauschen bei den Bildaufnahmen unter. Anders ist es bei der Probe, die in Abb. 46 (C) dargestellt ist. Nach Probenahme wurde die BTM-Konzentration fotometrisch bestimmt und anschließend die Hefezellen mit einer spezifischen Diamid-Beladung von 200 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ gestresst. Nach einer Inkubationsdauer von etwa zwei Stunden wurden die Proben mittels CLSM visualisiert. Hier ist im Unterschied zur ungestressten Kontrolle bei allen Hefezellen ein lokaler, ausschließlich intrazellulärer Fluoreszenz-Spot zu erkennen, was das Resultat der selektiven Expression von GFP nach Stressinduktion ist. S. cerevisiae N34 entspricht somit den Anforderungen, die für die folgenden physiologischen Untersuchungen unter definierten oxidativen

Stressbedingungen benötigt werden. Diamid stellt mit diesem Ergebnis einen geeigneten Stressinduktor dar, mit dem auf indirekten metabolischen Weg ein definierter oxidativer Stress in der Hefezelle ausgelöst werden kann [178].

Zur vollständigen Absicherung aller Informationen aus den physiologischen Untersuchungen war es weiterhin notwendig, einen direkten Nachweis für einen oxidativen Stress zu erbringen. Da die Messung des GFP-Fluoreszenzsignals nur eine Folgeerscheinung der ROS-Induktion darstellt, muss auch der direkte Nachweis von ROS in der Hefezelle nachgewiesen werden. Um nun eine ROS-Konzentration während einer definierten oxidativen Stressbeladung bestimmen zu können, wurden im Nachfolgenden quantitative Untersuchungen basierend auf der chemilumineszierenden Umsetzung von ROS mit Luminol durchgeführt.



Abb. 47. ROS-Gehalt (Säulendiagramm) und GFP-Expression (Streudiagramm) von *S. cerevisiae* N34 über eine Einwirkdauer von 6 h nach Stressinduktion mit einer spezifischen Diamid-Beladung von 200 mg_{Diamid} g_{BTM⁻} ¹ (rot) sowie der ungestressten Kontrolle (grün) [19].

Abb. 47 zeigt die Entwicklung der chemilumineszierenden Antwort von *S. cerevisiae* N34 sowie die GFP-Expression über eine Einwirkdauer von 6 h nach Stressinduktion mit einer spezifischen Diamid-Beladung von 200 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹. Im Verlauf der Einwirkdauer ist sowohl ein signifikanter Anstieg der Chemilumineszenz

100

4 Ergebnisse und Diskussionen

bei nicht-belasteter Kontrolle, als auch bei der stressinduzierten Probe zu verzeichnen. Bedingt durch die Überführung der anaeroben Kultivierungsbrühe vom Bioreaktor in eine aerobe Mikrotiterplatten (MTP)-Umgebung findet zwangsläufig ein Wechsel zu aeroben Umgebungsbedingungen statt. Dieser Wechsel bewirkt die Aufnahme von Luftsauerstoff in die Kultivierungsbrühe und damit einen Wechsel von anaerober zu aerober Atmung. Aerobe Atmung impliziert im gleichen Sinne die Bildung von ROS, was sich durch den Anstieg der Chemilumineszenz in der Kontrolle nachweisen lässt. Im weiteren Verlauf des Stressexperiments ist nach etwa 1,5 h im Kontrollansatz kein ROS-Gehalt mehr nachzuweisen. Diese Beobachtung korreliert mit der guantitativen Expression von GFP über den zeitlichen Verlauf des Experiments. Nach einer Adaptationsphase von etwa 15 min steigt die Fluoreszenz linear in direktem Verhältnis zur gebildeten Menge an GFP-OXR1 mRNA-Transkripten an. Abhängig von der Stressintensität stellt sich die Stärke des Fluoreszenzsignals weiterführend auf ein bestimmtes Konzentrationslevel ein. Der lineare Bereich kennzeichnet die Intensität des vorherrschenden Stresses in der Hefekultur. Ein repräsentativer Verlauf wird bei der stressinduzierten Probe mit einer spezifischen Diamid-Beladung von 200 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ beobachtet. Hier wird stets ein höherer ROS-Gehalt über die gesamte Einwirkdauer beobachtet. Das Maximum anwesender ROS-Moleküle liegt nach 1 h vor, was eng mit der gesteigerten GFP-Expression verknüpft ist. Das Glutathion im GSH/ GSSG-Puffersystem wird durch den verstärkten Verbrauch vollständig oxidiert, so dass das Puffersystem in den Hefezellen unwirksam wird.

Basierend auf diesem Nachweis von oxidativ-induziertem Stress in S. cerevisiae N34 fluoreszenzmethodische Ansatz nunmehr für kann der physiologische Untersuchungen eingesetzt werden. Das Fluoreszenzsignal gilt es somit quantitativ zu bestimmen, mit dem in der Folge das mittlere Ausmaß des oxidativen Stresses ermittelt werden kann [224]. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist in seinem Ursprung auf die zeitabhängige Gesamtanzahl von OXR1 mRNA-Transkripten und deren Halbwertszeit zurückzuführen [225, 226]. Abhängig von der stressinduzierten Transkription und dem gleichzeitigem Abbau von mRNA-Transkripten nach einer Reaktion erster Ordnung, ist bei der Fluoreszenzaufnahme ein sigmoidaler Kurvenverlauf zu erwarten [227]. Der lineare Fluoreszenzverlauf inmitten der sigmoidalen Kurve wird dabei als charakteristischer Wert für die Intensität des oxidativen Stresses herangezogen und spiegelt demnach die Stärke der Stressantwort wider. Um ein ausreichend hohes Maß an oxidativen Stress an der

Hefe auszulösen, bedarf es zunächst der Aufnahme eines Stressprofils, bei dem unterschiedliche spezifische Stressbeladungen an der Hefe untersucht werden. **Abb. 48** fasst die Ergebnisse aus dem Stressverhalten der Hefe mit unterschiedlichen spezifischen Stressbeladungen zusammen.



Abb. 48. Oxidative Stressinduktion durch Diamid auf *S. cerevisiae* N34. Es wird die höchste Fluoreszenzbildung während 6-stündiger Diamid-Einwirkung sowie die metabolische Aktivität als spezifische NADH/H⁺-Konzentration der Hefezellen dargestellt [19].

Eine Sättigung des linearen Anstiegs (EB_{99,5}) stellt sich hier bei etwa 3,80 FU h⁻¹ mit einer spezifischen Stressbeladung von 435 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ ein. Die mittlere effektive Beladung (EB₅₀) beträgt 77,5 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹. Aus den Messergebnissen zeigt sich, dass der Azoester bis zur maximalen spezifischen Stressbeladung als inhibierendes Agens auf die Hefezellen wirkt. Eine spezifische Stressbeladung über das Maximum hinaus resultiert gegenläufig in einer geringeren Stressantwort. Hier wirkt das Diamid bei Überschreiten der spezifischen Stressbeladung von EB_{99,5} \geq 435 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ toxisch auf den Hefestamm. Neben der Oxidation der Thiol-Gruppen des GSH/ GSSG-Redoxpuffersystems werden bei großem Diamid-Überschuss zudem Thiol-Gruppen wichtiger Enzyme und Proteine in der Hefe oxidiert, was einen

102

unmittelbaren Einfluss auf die metabolische Aktivität der Hefezellen hat. Die metabolische Aktivität ergibt sich dabei auf molekularer Ebene aus der Summe der vorliegenden Kofaktoren NADH/H⁺, NADPH, FMNH₂, FADH₂ und Cytochrome in einer Hefezelle. Vereinfachend wird im Nachfolgenden die spezifische metabolische Aktivität durch die Bestimmung der Hauptkomponente NADH/H⁺ guantifiziert [228]. Die verbleibenden Kofaktoren können aufgrund ihrer vergleichbar geringen Zellkonzentration und ihres ebenso geringen Redoxpotentials vernachlässigt werden. Für die ungestressten Hefezellen aus der sequentiellen Fed-Batch Kultivierung wurde eine spezifische NADH/H⁺-Konzentration von 3.0 ± 0.15 mM g_{BTM}⁻¹ bestimmt. Die metabolische Aktivität sinkt bei steigender spezifischer Diamid-Beladung sigmoidal bis zu einer maximalen spezifischen Stressbeladung von 1.000 mg_{Diamid} g_{BTM⁻¹} auf $0,34 \pm 0,01$ mM g_{BTM}⁻¹ und beträgt damit nur noch etwa 11 % der einer ungestressten Hefezelle. Ferner ist bei der Betrachtung der spezifischen metabolischen Aktivität wie auch der GFP-Expression kein signifikantes Signal bei einer spezifischen Stressbeladung von mehr als 1.000 mg_{Diamid} g_{BTM⁻¹} nachzuweisen. Das unterstreicht den toxischen Charakter des Diamids auf die Hefezellen unter diesen Bedingungen.

4.4.3 Stressprofil in Anwesenheit kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen

Nachdem nun alle notwendigen Voraussetzungen für die physiologischen Untersuchungen geschaffen worden sind, soll nun das Antwortverhalten der unterschiedlicher Wirkstoffformulierungen Hefezellen bei Einwirkung und -beladungen untersucht werden. Besonderes Interesse gilt hier dem Nachweis einer stressmindernden Wirkung von Ubichinon im oxidativ gestressten Modellorganismus S. cerevisiae N34. Abb. 49 zeigt eine REM-Aufnahme einer Probe, in der lebende Hefezellen mit der PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung in Kontakt gebracht wurden. In der REM-Aufnahme ist zu beobachten, dass die Zellen von großen Mengen des filmbildenden PVOH umgeben sind. Entlang der auskristallisierten PVOH-Fasern zeigen sich gelegentlich kolloiddisperse Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 0,070 µm. Bezugnehmend auf die Ergebnisse aus den Lichtstreuungsmessungen in Kap. 4.2.4 mit etwa 0,097 µm stimmen diese gut mit den beobachteten Partikelgrößen überein. Die Differenz im Partikeldurchmesser lässt sich aus dem Verlust der Solvathülle um die Partikeln nach der Gefriertrocknung erklären. Der größte Anteil an Ubichinon-Partikeln ist in die Matrix eingebettet und



liegt somit in Abb. 49 nicht sichtbar im grenzflächenaktiven PVOH vor. Es ist auch hier zu vermuten, dass PVOH aufgrund seiner filmbildenden Charakteristik neben der Stabilisierung von kolloiddispersen Materialien darüber hinaus eine signifikante Schlüsselrolle in der Aufnahme der stabilisierten Partikeln durch lebende Zellen besitzt [229].



Abb. 49. REM-Aufnahme einer gefriergetrockneten Probe von *S. cerevisiae* N34 Knospenzellen (blau) in Anwesenheit der PVOH-basierten Referenzformulierung (gelb) bei 30.000-facher Vergrößerung [19].

Nach der erfolgreichen Methodenentwicklung zur gezielten Stressinduktion aus Kap. 4.3.2 muss diese nun angepasst werden, um daran die potentiell stressmindernde Wirkung kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen untersuchen zu können. **Abb. 50** stellt die Ergebnisse der mit einer Diamid-gestressten Hefe in Abhängigkeit unterschiedlicher spezifischer Wirkstoffbeladungen mit PVOH-basierter Referenzformulierung dar.





Abb. 50. Stressantwort und spezifische metabolische Aktivität von *S. cerevisiae* N34 als Funktion der spezifischen Wirkstoffbeladung der kolloiddispersen PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung nach Stressinduktion mit 150 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ [19].

Oxidativer Stress wurde bei allen Untersuchungen mit einer spezifischen Diamid-Beladung von 150 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ ausgelöst. Diese spezifische Stressbeladung entspricht etwa dem doppelten EB₅₀-Wert von 77,5 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹ aus Abb. 48 und wurde für alle weiteren physiologischen Untersuchungen eingesetzt. Auf Basis dieser spezifischen Stressbeladung ist sichergestellt, dass das Diamid in seiner Funktion ausschließlich inhibierend auf die Hefezellen wirkt. In einem Bereich einer spezifischen Wirkstoffbeladung zwischen 0,1 bis 1.850 mg_{Q10} g_{BTM}⁻¹ zeigt die GFP-basierende Stressantwort einen sigmoidal abfallenden Verlauf. Bis zu einer spezifischen Wirkstoffbeladung von ca. 10 mg_{Q10} g_{BTM⁻¹} sind keine signifikanten stressmindernden Effekte zu beobachten. Erst bei höheren spezifischen Wirkstoffbeladungen sinkt die Stressantwort unter den Wert der Diamid-gestressten Kontrolle. Die mittlere effektive Wirkstoffbeladung beträgt hier 165,04 mgQ10 gBTM⁻¹, die Sättigungsbeladung liegt entsprechend des Verlaufs bei 1.640 mgQ10 gBTM⁻¹. Es bildet sich somit ein typisches Bild einer Dosis-Wirkungs-Kurve aus [52]. Dies zeigt sich durch den sättigenden Verlauf der konzentrationslimitierten Verwendbarkeit der

PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung. Die stressmindernde Wirksamkeit ergibt sich aus der Gesamtreduktion des oxidativen Stresses, die bei etwa 10 % liegt. Weiterhin kann aezeiat werden. dass die kolloiddisperse PVOH-Referenzformulierung unmittelbar keinen Einfluss auf die spezifische metabolische Aktivität der Hefezellen aufweist. Der Wert bleibt im gesamten Bereich der getesteten spezifischen Wirkstoffbeladungen konstant bei 2,72 ± 0,20 mM g_{BTM}⁻¹. Nachweislich ist somit der oxidative Stress ausschließlich auf das anwesende Diamid zurückzuführen, wohingegen die eingesetzte Wirkstoffformulierung keine toxische Wirkung auf die Hefezellen besitzt.

Abb. 51 zeigt den konzentrationsabhängigen Einfluss der Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE)basierten Ubichinon-Wirkstoffformulierung auf gestresste Hefezellen.



Abb. 51. Stressantwort und spezifische metabolische Aktivität von *S. cerevisiae* N34 als Funktion der spezifischen Wirkstoffbeladung der kolloiddispersen Poly(- γ -GA-*r*-L-TrpE)/Ubichinon-Wirkstoffformulierung nach Stressinduktion mit 150 mg_{Diamid} g_{BTM}⁻¹.

Die Untersuchungen zum Stressverhalten der Zellen wurden mit spezifischen Wirkstoffbeladungen von 50 bis 7.500 mg_{Q10} g_{BTM}^{-1} durchgeführt. Hier lässt sich

106

formell eine mittlere effektive Beladung von 2.240 mg_{Q10} g_{BTM}⁻¹ und eine Sättigungsbeladung mit 7.160 mg_{Q10} g_{BTM}⁻¹ ermitteln. Die stressmindernde Wirksamkeit liegt bei der Sättigungsbeladung bei fast 37 %. Damit wird eine Reduktion des oxidativen Stresses von mehr als 25 % im Vergleich zur PVOH-basierten Referenzformulierung erzielt, jedoch bei ungleich höheren spezifischen Wirkstoffbeladungen. Es fällt auf, dass bei spezifischen Wirkstoffbeladungen von > 670 mg_{Q10} g_{BTM}⁻¹ eine Minderung der spezifischen metabolischen Aktivität von etwa 20 % zu beobachten ist. Es stellt sich ein Mittelwert der spezifischen NADH/H⁺-Konzentration von 4,44 ± 0,57 mM g_{BTM}⁻¹ eine.

Abb. 52 stellt die Ergebnisse aus dem Stressverhalten der Hefezellen in Anwesenheit der Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin)-basierten Ubichinon-Wirkstoffformulierung dar.



Abb. 52. Stressantwort und spezifische metabolische Aktivität von *S. cerevisiae* N34 als Funktion der spezifischen Wirkstoffbeladung der kolloiddispersen Poly(-γ-GA-*r*-L-TrpE-*r*-Kanamycin)/Ubichinon-Wirkstoffformulierung nach Stressinduktion mit 150 mg_{Diamid} g_{BTM}-¹.



Die mittlere effektive Beladung liegt hier bei 1.210 mg_{Q10} g_{BTM}^{-1} . Die Sättigungsbeladung ist entsprechend 3.660 mg_{Q10} g_{BTM}⁻¹. Die stressmindernde Wirksamkeit von fast 35 % spiegelt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen vergleichbar maximalen Grenzwert wider, was ebenso bei der Poly(-y-GA-r-L-TrpE)basierten Wirkstoffformulierung festzustellen war. Allerdings werden hier für die maximal erfasste Stressminderung nur etwa die Hälfte der spezifischen Wirkstoffbeladung benötigt, was in der Konsequenz eine signifikante Steigerung der Effektivität durch die punktuelle Modifikation am grenzflächenaktiven Biopolymer-Derivat darstellt. Die spezifische metabolische Aktivität schwankt allerdings stark um den Mittelwert von 3,61 \pm 0,68 mM g_{BTM}⁻¹ und lässt daher keinen eindeutigen Trend des Einflusses der Wirkstoffformulierung auf die Aktivität der Hefezellen erkennen.

Die *in vitro*-Untersuchungen demonstrieren eindeutig die potentielle Reduktion des Diamid-induzierten oxidativen Stresses auf die Hefezellen durch die unterschiedlichen Wirkstoffformulierungen. Bei einem direkten Vergleich der einzelnen Wirkstoffformulierungen fallen darüber hinaus signifikante Unterschiede im Wirkverhalten gegenüber der Hefe auf. **Tab. 12** fasst die charakteristischen Parameter zusammen, mit denen das Wirkpotential bewertet werden kann. Dazu gehören die stressmindernde Wirksamkeit, die Sättigungsbeladung, die mittlere effektive Wirkstoffbeladung sowie die spezifische metabolische Aktivität.

Wirkstoff	Ubichinon		
Stabilisator	PVOH	Poly(-γ-GA- <i>r</i> -L- TrpE)	Poly(-γ-GA- <i>r</i> -L- TrpE- <i>r</i> - Kanamycin)
stressmindernde Wirksamkeit (%)	10,2	36,8	34,5
Sättigungsbeladung (EB _{99,5}) (mg _{Q10} gвтм ⁻¹)	1.640	7.160	3.660
mittlere effektive Beladung (EB ₅₀) (mgq10 gвтм ⁻¹)	170	2.240	1.210
spezifische metabolische Aktivität (mM _{NADH/H+} g _{втм⁻¹)}	2,72 ± 0,20	4,44 ± 0,57	3,61 ± 0,68

Tab. 12. Zusammenfassung der wichtigsten charakteristischen Daten aus den *in vitro*-Untersuchungen mit *S. cerevisiae* N34.

ī.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei allen Wirkstoffformulierungen eine Stressminderung erfolgt. Die Biopolymer-basierten Wirkstoffformulierungen heben sich dabei nochmals von der PVOH-basierten Referenzformulierung mit einer durchschnittlich 3,5-fach erhöhten Wirksamkeit in der ROS-Reduktion ab. Durch die hohen spezifischen Wirkstoffbeladungen in den physiologischen Untersuchungen muss auch der potentielle Einfluss der Formulierungen auf die metabolische Aktivität der Hefezellen verfolgt werden. Die PVOH-basierte Wirkstoffformulierung zeigt während der Untersuchungen keine Veränderung, während bei den Biopolymer-basierten Wirkstoffformulierungen eine Streuung bei hohen spezifischen Wirkstoffbeladungen nachgewiesen werden kann. Insgesamt betrachtet deuten sich wirkungsspezifische Verbesserungen bei den punktuell modifizierten Wirkstoffformulierungen an. Die Ergebnisse unterstreichen die elementare Bedeutung von Ansätzen mit funktionalen Biopolymeren für die Entwicklung hochspezifisch wirkender Formulierungen.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden. Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch. 2

5 Zusammenfassung und Ausblick

Eine Vielzahl moderner Wirkstoffe besitzt durch ihren komplexen Aufbau nur eine schlechte Löslichkeit in Wasser, womit sie in ihrer reinen Form für therapeutische Fragestellungen nur schwer anzuwenden sind. Die Verkapselung wasserunlöslicher Wirksubstanzen stellt in kolloiddisperse Formulierungen dabei eine vielversprechende Möglichkeit dar. mit der die Bioverfügbarkeit dieser Wirksubstanzen durch Mobilisierung signifikant erhöht werden kann. Mit dem Einbau in nanoskalige Partikeln stellt der dominierende Einfluss von Grenzflächeneffekten dabei ganz neue Anforderungen an die Entwicklung solcher Systeme. Mit der Nutzung funktionaler Amphiphile gibt es vielversprechende Ansätze, die neben der Langzeitstabilität einer dispersen Phase gezielt Partikeln an die Entzündungsherde adressieren können. Auf Basis einer Entwicklung kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen genießen biotechnologisch hergestellte Biopolymere gegenwärtig ein besonderes Interesse. Ihre Funktionalität bietet die Möglichkeit, gezielt Modifikationen umzusetzen, mit denen grenzflächenaktive Amphiphile erzeugt werden können. Mit der Bereitstellung individuell zusammengestellter Wirkstoffformulierungen steht damit ein Werkzeug zur Verfügung, das eine breite Anwendung für therapeutische Fragestellungen bietet.

Das Ziel dieser Arbeit bestand aus der Entwicklung und Optimierung von Methoden, Mechanismen die zur Aufklärung grundlegender kolloiddisperser Wirkstoffformulierungen auf oxidativ gestresste Hefezellen dienen. Dabei bildete zu Beginn die biotechnologische Bereitstellung von v-PGA als Ausgangskomponente die primäre Aufgabe. Durch die Optimierung eines Batch-Prozesses mit B. licheniformis konnte das Biopolymer in großen Mengen biotechnologisch hergestellt werden. Über den Kultivierungsprozess wurde ein Titer von insgesamt 29 g L⁻¹ y-PGA erreicht. Mit dem anschließenden Aufreinigungsprozess konnten fast 90 % y-PGA aus der Kultivierungsbrühe erhalten werden, das eine Reinheit von insgesamt 96,7 % besitzt. Eine weitere Optimierung stellte der Versuch einer kontinuierlichen Abtrennung des Biopolymers während des Batch-Prozesses dar, was den ursprünglichen Aufreinigungsschritt der Cu²⁺/γ-PGA-Komplex-Präzipitation überflüssig machen sollte. Aufgrund des unterschiedlichen Produktionsverhaltens während der Kultivierung konnten aber nur geringe Mengen an y-PGA separiert

 \bigtriangledown

werden. Bei der qualitativen Untersuchung zeigte sich allerdings eine Verbesserung der Polymerqualität aufgrund einer engeren Verteilung der γ-PGA-Kettenlängen.

In weiteren Schritten konnte das aufgereinigte v-PGA punktuell mit L-TrpE und Kanamycin modifiziert werden, um daraus ein maßgeschneidertes Amphiphil zu erzeugen. Der physiko-chemische Vergleich des reinen v-PGA mit amphiphilen PVOH zeigte den Bedarf zur chemischen Modifikation von y-PGA auf, um es zu einem grenzflächenaktiven Amphiphil zu formen. Der Einbau von hydrophoben L-TrpE in v-PGA führte in der Folge zu einem selbstaggregierenden Charakter des gebildeten Kammpolymers Poly(-y-GA-r-L-TrpE). Über die fluoreszierenden Eigenschaften des Indolgerüsts aus dem L-TrpE war es möglich, den Kopplungsgrad im Poly(-y-GA-r-L-TrpE) quantitativ zu ermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass etwa 30 % der freien Carboxylgruppen kovalent mit dem L-TrpE verestert wurden, was einem HLB-Wert von 14 in dem Biopolymer-Derivat erzeugte. In einem weiteren Schritt wurde die Saccharid-basierte Komponente, das Kanamycin, in das y-PGA-Derivat eingebaut. Das daraus gebildete Poly(-y-GA-r-L-TrpE-r-Kanamycin) formte mit seinem Tri-Aminoglykosid eine stark ausgeprägte Solvathülle um das Assoziationskolloid aus. Somit konnte nachweislich gezeigt werden, dass die punktuelle Übertragung von unterschiedlichen Eigenschaften in das anionische Biopolymergerüst umgesetzt wurde, mit der nunmehr maßgeschneiderte Formulierungen gestaltet werden können.

Nach der Umsetzung zu kolloiddispersen Ubichinon-Wirkstoffformulierungen wurden diese auf ihre physiko-chemischen Qualitätsmerkmale untersucht. Hierzu war es notwendig, das Verhalten in Wasser sowie unter physiologischen Bedingungen aufzuklären. Auffälliges Merkmal aller Wirkstoffformulierungen waren ihre sehr ähnlichen Primärpartikelgrößen, die während des Umsetzungsprozesses mittels Hochdruckhomogenisation gebildet wurden. Der Energieeintrag konnte hier als ausschlaggebende Größe für die Erzeugung der kleinsten partikulären Einheiten Primärpartikelgrößen identifiziert werden. Die der drei erzeugten Wirkstoffformulierungen variierten in direktem Vergleich nur weniger als 3,5 %, was gleichermaßen ein ähnliches Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis der Formulierungen untereinander zur Folge hatte. Ganz anders hingegen waren die Eigenschaften auf den Partikeloberflächen, die durch die verschiedenen Amphiphile hervorgerufen wurden. Das PVOH beispielsweise weist auf der Grenzfläche eines Partikels mit einem ζ -Potential von -6,3 ± 6,2 mV fast ladungsneutrale Eigenschaften auf. Hier

112

tragen sterisch stabilisierende Effekte der Hydroxylgruppen zur dauerhaften Stabilisierung bei. Die v-PGA-Derivate hingegen waren mit elektrokinetischen ζ -Potentialen von -60,6 ± 4,9 und -51,0 ± 5,2 mV sehr stark negativ geladen. Hier zeigte sich unter physiologischen Bedingungen, dass die Poly(-y-GA-*r*-L-TrpE)/Ubichinon-Wirkstoffformulierung auf Basis der elektrostatischen Stabilisierung von Primärpartikeln stark zur Agglomeration neigt. Im Gegensatz dazu konnte bei der Poly(-y-GA-r-L-TrpE-r-Kanamycin)/Ubichinon-Wirkstoffformulierung kein signifikanter Unterschied beim Wechsel seiner Umgebung beobachtet werden, was die sterische Stabilisierung durch das Kanamycin unterstreicht.

Physiologische Untersuchungen an Hefezellen zeigten auf, dass der Azoester Diamid im eukaryotischen Organismus gezielt oxidativen Stress auslöst. Dies konnte über die Bildung von ROS bestätigt werden. Die Stressprofile mit spezifischen Diamid-Beladungen wurden für alle drei Wirkstoffformulierungen untersucht. Es konnte gezeigt Wirkstoffformulierungen werden. dass alle eingesetzten eine stressmindernde Wirkung auf oxidativ gestresste Hefezellen besitzen. Speziell die grenzflächenaktiven v-PGA-Derivat-Formulierungen zeigten im Vergleich zur PVOH/Ubichinon-Referenzformulierung eine Steigerung der Wirksamkeit um etwa 25 %. Damit konnte erfolgreich eine signifikante Steigerung der Wirksamkeit von Wirkstoffformulierungen auf Hefezellen durch eine punktuelle Anpassung aufgezeigt werden.
Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden. Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

6 Literatur

- [1] Müller, R. H., Mäder, K. and Gohla, S. (2000) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 161–177.
- [2] Knapp, L. F. (1921) The solubility of small particles and the stability of colloids. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 17, 457–465.
- [3] Finke, J. H. H., Schur, J., Richter, C., Gothsch, T., Kwade, A., Büttgenbach, S. and Müller-Goymann, C. C. (2012) The influence of customized geometries and process parameters on nanoemulsion and solid lipid nanoparticle production in microsystems. Chem. Eng. J. 209, 126–137.
- [4] Lin, C. A. J., Sperling, R., Li, J. K., Yang, T. Y., Li, P. Y., Zanella, M., Chang,
 W. H. and Parak, W. J. (2008) Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization. Small 4, 334–341.
- [5] Steichen, S. D., Caldorera-Moore, M. and Peppas, N. (2012) A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. Eur. J. Pharm. Sci. 48, 416–427.
- [6] Kasuya, T. and Kuroda, S. (2009) Nanoparticles for human liver-specific drug and gene delivery systems: *in vitro* and *in vivo* advances. Expert Opin. Drug Deliv. 6, 39–52.
- [7] Hughes, G. (2005) Nanostructure-mediated drug delivery. Nanomedicine 1, 22–30.
- [8] Santos-Magalhães, N. S. and Mosqueira, V. C. F. (2010) Nanotechnology applied to the treatment of malaria. Adv. Drug Deliv. Rev. 62, 560–75.



- [9] Valerii, M. C., Benaglia, M., Caggiano, C., Papi, A., Strillacci, A., Lazzarini, G., Campieri, M., Gionchetti, P., Rizzello, F. and Spisni, E. (2012) Drug delivery by polymeric micelles: an *in vitro* and *in vivo* study to deliver lipophilic substances to colonocytes and selectively target inflamed colon. Nanomedicine 9, 675-685.
- [10] Hudson, D. and Margaritis, A. (2012) Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals. Crit. Rev. Biotech. 34, 161–179.
- [11] Plank, J. (2004) Applications of biopolymers and other biotechnological products in building materials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66, 1–9.
- [12] Hoennscheidt, C., Kreyenschulte, D., Margaritis, A. and Krull, R. (2013) Production of stable quinine nanodispersions using esterified, γ-polyglutamic acid biopolymer. Biochem. Eng. J. 79, 259–266.
- [13] Manocha, B. and Margaritis, A. (2010) A novel method for the selective recovery and purification of γ-polyglutamic acid from *Bacillus licheniformis* fermentation broth. Biotechnol. Prog. 26, 734–742.
- [14] Bajaj, I. and Singhal, R. (2011) Poly (glutamic acid) An emerging biopolymer of commercial interest. Bioresour. Technol. 102, 5551–5561.
- [15] Buescher, J. M. and Margaritis, A. (2007) Microbial biosynthesis of polyglutamic acid biopolymer and applications in the biopharmaceutical, biomedical and food industries. Crit. Rev. Biotech. 27, 1–19.
- [16] Stang, P. J. and Olenyuk, B. (1997) Self-Assembly, Symmetry and Molecular Architecture: Coordination as the Motif in the Rational Design of Supramolecular Metallacyclic Polygons and Polyhedra. Acc. Chem. Res. 30, 502–518.
- [17] Monteiro-Riviere, N. a, Inman, O. and Zhang, L. W. (2009) Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. Toxicol. Appl. Pharmacol. 234, 222–35.
- [18] Dickinson, R. J. and Schweizer, M. (2004) The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae* 2nd ed., CRC press.

- [19] Hoennscheidt, C., Margaritis, A. and Krull, R. (2015) Novel applications of ubiquinone biopolymer nanocarriers for preventive and regenerative therapeutics: The Saccharomyces cerevisiae paradigm. Int. J. Pharm. 478, 416–425.
- [20] Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. and Lleonart, M. E. (2013) Oxidative stress and cancer: An overview. Ageing Res. Rev. 12, 376–390.
- [21] Brown, D., Sabbah, H. N. and Shaikh, S. R. (2013) Mitochondrial inner membrane lipids and proteins as targets for decreasing cardiac ischemia/reperfusion injury. Pharmacol. Ther. 140, 258–266.
- [22] Chaturvedi, R. K. and Beal, M. F. (2008) Mitochondrial approaches for neuroprotection. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1147, 395–412.
- [23] Stojkovic, M., Westesen, K., Zakhartchenko, V., Stojkovic, P., Boxhammer, K. and Wolf, E. (1999) Coenzyme Q₁₀ in Submicron-Sized Dispersion Improves Development, Hatching, Cell Proliferation, and Adenosine Triphosphate Content of *In Vitro*-Produced Bovine Embryos. Biol. Reprod. 547, 541–547.
- [24] Van Dijk, M., Rijkers, D. T. S., Liskamp, R. M. J., Van Nostrum, C. F. and Hennink, W. E. (2009) Synthesis and applications of biomedical and pharmaceutical polymers via click chemistry methodologies. Bioconjug. Chem. 20, 2001–2016.
- [25] Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J. and Vadhanam, M. V. (2013) Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. Cancer Lett. 334, 133–141.
- [26] Harde, H., Das, M. and Jain, S. (2011) Solid lipid nanoparticles: an oral bioavailability enhancer vehicle. Expert Opin. Drug Deliv. 8, 1407–24.
- [27] Seguin, J., Brullé, L., Boyer, R., Lu, Y. M., Ramos Romano, M., Touil, Y. S., Scherman, D., Bessodes, M., Mignet, N. and Chabot, G. G. (2013) Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy. Int J Pharm. 444, 146–154.



- [28] Brigger, I., Dubernet, C. and Couvreur, P. (2012) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Adv. Drug Deliv. Rev. 64, 24–36.
- [29] Stieß, M. (2009) Mechanische Verfahrenstechnik- Partikeltechnologie 1 3rd Ed., Springer, Berlin.
- [30] Hofmann, T. (2004) Die Welt der vernachlässigten Dimensionen: Kolloide. Chem. unserer Zeit 38, 24–35.
- [31] Pellegrino, T., Manna, L., Kudera, S., Liedl, T., Koktysh, D., Rogach, A. L., Keller, S., R\u00e4dler, J., Natile, G. and Parak, W. J. (2004) Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: A general route to water soluble nanocrystals. Nano Lett. 4, 703–707.
- [32] Chen, Y., Lian, G., Liao, C., Wang, W., Zeng, L., Qian, C., Huang, K. and Shuai, X. (2013) Characterization of polyethylene glycol-grafted polyethylenimine and superparamagnetic iron oxide nanoparticles (PEG-g-PEI-SPION) as an MRIvisible vector for siRNA delivery in gastric cancer *in vitro* and *in vivo*. J. Gastroenterol. 48, 809–821.
- [33] Liao, Z., Wang, H., Wang, X., Wang, C., Hu, X., Cao, X. and Chang, J. (2010) Biocompatible surfactin-stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging. Coll. Surf. A 370, 1–5.
- [34] Sulek, S., Mammadov, B., Mahcicek, D. I., Sozeri, H., Atalar, E., Tekinay, A. B. and Guler, M. O. (2011) Peptide functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents. J. Mater. Chem. 21, 15157–15162.
- [35] Ramamurthy, C. H., Padma, M., Samadanam, I. D. M., Mareeswaran, R., Suyavaran, A., Kumar, M. S., Premkumar, K. and Thirunavukkarasu, C. (2013) The extra cellular synthesis of gold and silver nanoparticles and their free radical scavenging and antibacterial properties. Colloids Surf B Biointerfaces 102, 808–815.

- [36] Gupta, A., Avci, P., Sadasivam, M., Chandran, R., Parizotto, N., Vecchio, D., de Melo, W. C. M. a, Dai, T., Chiang, L. Y. and Hamblin, M. R. (2012) Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. Biotechnol. Adv. 31, 607–631.
- [37] Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. and Boritz, C. (2007) Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. J. Chem. Educ. 84, 322–325.
- [38] Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P. and Mukherji, S. (2008) Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomater. 4, 707–716.
- [39] Kelly, J. M., Keegan, G. and Brennan-Fournet, M. E. (2012) Triangular silver nanoparticles: Their preparation, functionalisation and properties. Acta Phys. Pol. A 122, 337–345.
- [40] Ruan, G., Agrawal, A., Marcus, A. I. and Nie, S. (2007) Imaging and tracking of tat peptide-conjugated quantum dots in living cells: new insights into nanoparticle uptake, intracellular transport, and vesicle shedding. J. Am. Chem. Soc. 129, 14759–14766.
- [41] Yoo, J., Kambara, T., Gonda, K. and Higuchi, H. (2008) Intracellular imaging of targeted proteins labeled with quantum dots. Exp. Cell. Res 314, 3563–3569.
- [42] Chen, M.-L., He, Y.-J., Chen, X.-W. and Wang, J.-H. (2012) Quantum dots conjugated with Fe₃O₄-filled carbon nanotubes for cancer-targeted imaging and magnetically guided drug delivery. Langmuir 28, 16469–16476.
- [43] Jin, Z. and Hildebrandt, N. (2012) Semiconductor quantum dots for *in vitro* diagnostics and cellular imaging. Trends Biotechnol. 30, 394–403.
- [44] Sainsbury, F., Zeng, B. and Middelberg, A. P. (2014) Towards designer nanoemulsions for precision delivery of therapeutics. Curr. Opin. Chem. Eng. 4, 11–17.



- [45] Antonietti, M. and Förster, S. (2003) Vesicles and Liposomes: A Self-Assembly Principle Beyond Lipids. Adv. Mater. 15, 1323–1333.
- [46] Torchilin, V. P. (2001) Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. J. Control. Release 73, 137–172.
- [47] Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Fehér, P., Kiss, T., Veszelka, S., Deli, M., Vecsernyés, M. and Bácskay, I. (2012) Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. Eur. J. Pharm. Sci. 47, 564–573.
- [48] Bury, K. and Neugebauer, D. (2013) Novel self-assembly graft copolymers as carriers for anti-inflammatory drug delivery. Int. J. Pharm. 460, 150–157.
- [49] Grzelczak, M., Vermant, J., Furst, E. M. and Liz-Marzán, L. M. (2010) Directed self-assembly of nanoparticles. ACS Nano 4, 3591–3605.
- [50] Oerlemans, C., Bult, W., Bos, M., Storm, G., Nijsen, J. F. W. and Hennink, W.
 E. (2010) Polymeric micelles in anticancer therapy: Targeting, imaging and triggered release. Pharm. Res. 27, 2569–2589.
- [51] Wang, D., Duan, H. and Möhwald, H. (2005) The water/oil interface: the emerging horizon for self-assembly of nanoparticles. Soft Matter 1, 412–416.
- [52] Voet, D. and Voet, J. G. (2011) Biochemistry 4th ed., Wiley, Weinheim.
- [53] Hartgerink, J. D., Beniash, E. and Stupp, S. I. (2002) Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. PNAS 99, 5133–5138.
- [54] Xiang, S. D., Wilson, K., Day, S., Fuchsberger, M. and Plebanski, M. (2013) Methods of effective conjugation of antigens to nanoparticles as noninflammatory vaccine carriers. Methods 60, 232–241.

- [55] Torcello-Gómez, A., Wulff-Pérez, M., Gálvez-Ruiz, M. J., Martín-Rodríguez, A., Cabrerizo-Vílchez, M. and Maldonado-Valderrama, J. (2014) Block copolymers at interfaces: Interactions with physiological media. Adv. Colloid Interface Sci. 206, 414–427.
- [56] Pinto-Alphandary, H., Andremont, A. and Couvreur, P. (2000) Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: Research and applications. Int. J. Antimicrob. Agents 13, 155–168.
- [57] Solomon, M., Shah, A. and D'Souza, G. G. M. (2012) In Vitro assessment of the utility of stearyl triphenyl phosphonium modified liposomes in overcoming the resistance of ovarian carcinoma Ovcar-3 cells to paclitaxel. Mitochondrion 13, 464-472.
- [58] Lagaly, G., Schulz, O. and Zimehl, R. (1997) Dispersionen und Emulsionen, Steinkopf, Darmstadt.
- [59] Kreuter, J. (2001) Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. Adv. Drug Deliv. Rev. 47, 65–81.
- [60] Roney, C., Kulkarni, P., Arora, V., Antich, P., Bonte, F., Wu, A., Mallikarjuana, N. N., Manohar, S., Liang, H.-F., Kulkarni, A. R. (2005) Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. J. Control. Release 108, 193–214.
- [61] Kreuter, J. (2012) Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. Adv. Drug Deliv. Rev. 64, 213–222.
- [62] Lademann, J., Richter, H., Golz, K., Zastrow, L., Sterry, W. and Patzelt, A. (2008) Influence of microparticles on the homogeneity of distribution of topically applied substances. Skin Pharmacol. Physiol. 21, 274–282.
- [63] Lerch, S., Dass, M., Musyanovych, A., Landfester, K. and Mailänder, V. (2013)
 Polymeric nanoparticles of different sizes overcome the cell membrane barrier.
 Eur. J. Pharm. Biopharm. 84, 265–274.



- [64] Bunjes, H. (2010) Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. J. Pharm. Pharmacol. 62, 1637–1645.
- [65] Pardeike, J., Hommoss, A. and Müller, R. H. (2009) Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. Int. J. Pharm. 366, 170–184.
- [66] Schulz, S. G., Kuhn, H., Schmid, G., Mund, C. and Venzmer, J. (2004) Phase behavior of amphiphilic polymers: A dissipative particles dynamics study. Colloid Polym. Sci. 283, 284–290.
- [67] Hackett, M. J., Zaro, J. L., Shen, W.-C., Guley, P. C. and Cho, M. J. (2012) Fatty acids as therapeutic auxiliaries for oral and parenteral formulations. Adv. Drug Deliv. Rev. 65, 1331–1339.
- [68] Gruber, J., Fong, S., Chen, C.-B., Yoong, S., Pastorin, G., Schaffer, S., Cheah, I. and Halliwell, B. (2013) Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. Biotechnol. Adv. 31, 563–592.
- [69] Farokhzad, O. C. and Langer, R. (2009) Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. J. Am. Chem. Soc. 3, 16–20.
- [70] Un, K., Sakai-Kato, K., Oshima, Y., Kawanishi, T. and Okuda, H. (2012) Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes. Biomaterials 33, 8131–8141.
- [71] Hirsjärvi, S., Dufort, S., Gravier, J., Texier, I., Yan, Q., Bibette, J., Sancey, L., Josserand, V., Passirani, C., Benoit, J.-P. (2012) Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the *in vitro* reactivity and *in vivo* biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. Nanomedicine 9, 375–387.
- [72] Wang, Y., Zhang, L., Wang, Q. and Zhang, D. (2013) Stability issue of nanosuspensions in drug delivery. J. Control. Release. 172, 1126–1141.

- [73] Otsuka, H., Nagasaki, Y. and Kataoka, K. (2003) PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 403–419.
- [74] Li, W., Zhan, P., De Clercq, E., Lou, H. and Liu, X. (2012) Current drug research on PEGylation with small molecular agents. Prog. Polym. Sci. 38, 421–444.
- [75] Chapman, S., Dobrovolskaia, M., Farahani, K., Goodwin, A., Joshi, A., Lee, H., Meade, T., Pomper, M., Ptak, K., Rao, J. (2013) Nanoparticles for cancer imaging: The good, the bad, and the promise. Nano Today 8, 454-460.
- [76] Zhang, Y., Wang, Z. and Gemeinhart, R. (2013) Progress in MicroRNA Delivery. J. Control. Release 172, 962–974.
- [77] Livney, Y. D. and Assaraf, Y. G. (2013) Rationally designed nanovehicles to overcome cancer chemoresistance. Adv. Drug Deliv. Rev. 65, 1716–1730.
- [78] Campoccia, D., Montanaro, L. and Arciola, C. R. (2013) A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. Biomaterials 34, 8533–8554.
- [79] Yang, M., Wada, M., Zhang, M., Kostarelos, K., Yuge, R., Iijima, S., Masuda, M. and Yudasaka, M. (2013) A high poly(ethylene glycol) density on graphene nanomaterials reduces the detachment of lipid-poly(ethylene glycol) and macrophage uptake. Acta Biomater., Acta Materialia Inc. 9, 4744–4753.
- [80] Wang, G., Yu, B., Wu, Y., Huang, B., Yuan, Y. and Liu, C. (2013) Controlled preparation and antitumor efficacy of vitamin E TPGS-functionalized PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel. Int. J. Pharm. 446, 24–33.
- [81] Tao, W., Zeng, X., Liu, T., Wang, Z., Xiong, Q., Ouyang, C., Huang, L. and Mei, L. (2013) Docetaxel-loaded nanoparticles based on star-shaped mannitol-core PLGA-TPGS diblock copolymer for breast cancer therapy. Acta Biomater., Acta Materialia Inc. 9, 8910–8920.



- [82] Reix, N., Parat, A., Seyfritz, E., Van der Werf, R., Epure, V., Ebel, N., Danicher, L., Marchioni, E., Jeandidier, N., Pinget, M. (2012) *In vitro* uptake evaluation in Caco-2 cells and *in vivo* results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles. Int. J. Pharm. 437, 213–220.
- [83] Park, J. S., Yang, H. N., Jeon, S. Y., Woo, D. G., Kim, M. S. and Park, K.-H. (2012) The use of anti-COX2 siRNA coated onto PLGA nanoparticles loading dexamethasone in the treatment of rheumatoid arthritis. Biomaterials 33, 8600–8612.
- [84] Zakeri-Milani, P., Loveymi, B. D., Jelvehgari, M. and Valizadeh, H. (2012) The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. Coll. Surf. B 103C, 174–181.
- [85] Kumar, A., Wonganan, P., Sandoval, M. a, Li, X., Zhu, S. and Cui, Z. (2012) Microneedle-mediated transcutaneous immunization with plasmid DNA coated on cationic PLGA nanoparticles. J. Control. Release 163, 230–239.
- [86] How, C. W., Abdullah, R., Manickam, S. and Rosli, R. (2013) Tamoxifen-loaded Nanostructured Lipid Carrier as a Drug Delivery System: Characterization, Stability Assessment and Cytotoxicity. Colloids Surf. 112, 393–399.
- [87] Mazzaferro, S., Bouchemal, K. and Ponchel, G. (2013) Oral delivery of anticancer drugs III: formulation using drug delivery systems. Drug Discov. Today 18, 99–104.
- [88] Torchilin, V. P. (2012) Multifunctional nanocarriers. Adv. Drug Deliv. Rev. 58, 1532–1555.
- [89] Balasubramanian, V., Onaca, O., Enea, R., Hughes, D. W. and Palivan, C. G. (2010) Protein delivery: from conventional drug delivery carriers to polymeric nanoreactors. Expert Opin. Drug Deliv. 7, 63–78.
- [90] Akagi, T., Kaneko, T., Kida, T. and Akashi, M. (2005) Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly(gamma-glutamic acid) with I-phenylalanine as a protein carrier. J. Control. Release 108, 226–236.

- [91] Marchenko, I., Yashchenok, A., Borodina, T., Bukreeva, T., Konrad, M., Möhwald, H. and Skirtach, A. (2012) Controlled enzyme-catalyzed degradation of polymeric capsules templated on CaCO₃: influence of the number of LbL layers, conditions of degradation, and disassembly of multicompartments. J. Control. Release 162, 599–605.
- [92] Mailänder, V. and Landfester, K. (2009) Interaction of nanoparticles with cells. Biomacromolecules 10, 2379–2400.
- [93] He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C. and Yin, C. (2010) Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. Biomaterials 31, 3657–3666.
- [94] Peixoto, L. S., Silva, F. M., Niemeyer, M. a L., Espinosa, G., Melo, P., Nele, M. and Pinto, J. C. (2006) Synthesis of poly(vinyl alcohol) and/or poly(vinyl acetate) particles with spherical morphology and core-shell structure and its use in vascular embolization. Macromol. Symp. 243, 190–199.
- [95] Richard, A. and Margaritis, A. (2001) Poly(glutamic acid) for biomedical applications. Crit. Rev. Biotech. 21, 219–232.
- [96] Ivánovics, G. and Bruckner, V. (1937) Über die chemische Natur der immunspezifischen Kapselsubstanz der Milzbrandbazillen. Naturwissenschaften 25, 250.
- [97] Rehm, B. H. (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nat. Rev. Microbiol. 8, 578–592.
- [98] Richard, A. and Margaritis, A. (2003) Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Bioeng. 82, 299–305.
- [99] Seviour, R. J., McNeil, B., Fazenda, M. L. and Harvey, L. M. (2011) Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. Crit. Rev. Biotech. 31, 170–185.



- [100] Zhang, Y. and Cremer, P. S. (2006) Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. Curr. Opin. Chem. Biol. 10, 658–663.
- [101] Wucherpfennig, T., Schilling, J., Sieblitz, D., Pump, M., Schütte, K., Wittmann, C. and Krull, R. (2012) Improved assessment of aggregate size in Taxus plant cell suspension cultures using laser diffraction. Eng. Life Sci. 12, 595–602.
- [102] Schärtl, W. (2007) Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions, Springer, Berlin.
- [103] Malvern Instruments. (2014) Präsentation: Grundprinzipien der Laserbeugung und der Mie- und Fraunhofer-Streuung.
- [104] Reymann, J., Baddeley, D., Gunkel, M., Lemmer, P., Stadter, W., Jegou, T., Rippe, K., Cremer, C. and Birk, U. (2008) High-precision structural analysis of subnuclear complexes in fixed and live cells via spatially modulated illumination (SMI) microscopy. Chromosome Res. 16, 367–82.
- [105] von Ardenne, M. (1938) Das Elektronen-Rastermikroskop. Theoretische Grundlagen. Zeitschrift für Phys. 109, 553–572.
- [106] Mitragotri, S. and Lahann, J. (2012) Materials for drug delivery: Innovative solutions to address complex biological hurdles. Adv. Mater. 24, 3717–3723.
- [107] Davis, M. E., Chen, Z. G. and Shin, D. M. (2008) Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. Nat. Rev. Drug Discov. 7, 771–82.
- [108] Manocha, B. and Margaritis, A. (2010) Controlled Release of Doxorubicin from Doxorubicin/γ-Polyglutamic Acid Ionic Complex. J. Nanomat. 2010, 9.
- [109] Hellmers, F., Ferguson, P., Koropatnick, J., Krull, R. and Margaritis, A. (2013) Characterization and *in vitro* cytotoxicity of doxorubicin-loaded γ-polyglutamic acid-chitosan composite nanoparticles. Biochem. Eng. J. 75, 72–78.

- [110] Herbst, R. S., Giaccone, G., Schiller, J. H., Natale, R. B., Miller, V., Manegold, C., Scagliotti, G., Rosell, R., Oliff, I., Reeves, J. (2004) Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-Intact 2. J. Clin. Oncol. 22, 785–794.
- [111] Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilenbaum, R. and Johnson, D. H. (2006) Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N. Engl. J. Med. 355, 2542–2550.
- [112] Mohanraj, V. J. and Chen, Y. (2006) Nanoparticles A Review. Trop. J. Pharm. Res. 5, 561–573.
- [113] Hadinoto, K., Sundaresan, A. and Cheow, W. S. (2013) Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles as a New Generation Therapeutic Delivery Platform: A Review. Eur. J. Pharm. Biopharm. 85, 427–443.
- [114] Mussi, S. V., Silva, R. C., Oliveira, M. C. De, Lucci, C. M., Azevedo, R. B. De and Ferreira, L. A. M. (2013) New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. Eur. J. Pharm. Sci. 48, 282–290.
- [115] Chen, M.-C., Mi, F.-L., Liao, Z.-X., Hsiao, C.-W., Sonaje, K., Chung, M.-F., Hsu, L.-W. and Sung, H.-W. (2013) Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules. Adv Drug Deliv Rev. 65, 865–879.
- [116] Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1998) Mitochondrial Aging: Open Questions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 854, 118–127.
- [117] Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7915–7922.
- [118] Smeyne, M. and Smeyne, R. J. (2013) Glutathione Metabolism and Parkinson's Disease. Free Radic. Biol. Med. 62, 13–25.



- [119] Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact. 160, 1–40.
- [120] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 44–84.
- [121] Wells, P. G., McCallum, G. P., Chen, C. S., Henderson, J. T., Lee, C. J. J., Perstin, J., Preston, T. J., Wiley, M. J. and Wong, A. W. (2009) Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. Toxicol. Sci. 108, 4–18.
- [122] Cheresh, P., Kim, S.-J., Tulasiram, S. and Kamp, D. W. (2012) Oxidative stress and pulmonary fibrosis. Biochim. Biophys. Acta 1832, 1028–1040.
- [123] Cho, C.-H. and Lee, H.-J. (2013) Oxidative stress and tardive dyskinesia: Pharmacogenetic evidence. Prog. Neuro-Psychoph. 46, 207–213.
- [124] Pimentel, C., Batista-Nascimento, L., Rodrigues-Pousada, C. and Menezes, R. (2012) Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast Saccharomyces cerevisiae. Oxid. Med. Cell Longev. 2012, 9.
- [125] Hohmann, S. and Mager, W. H. (2003) Yeast stress responses, Springer, Berlin.
- [126] Navarro, A. and Boveris, A. (2007) The mitochondrial energy transduction system and the aging process. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 292, C670–C686.
- [127] Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J. (2005) Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environ. Heal. Perspect. 113, 823–839.
- [128] Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82, 47–95.
- [129] Galle, J., Quaschning, T., Seibold, S. and Wanner, C. (2003) Endothelial dysfunction and inflammation: what is the link? Kidney Int. Suppl. 63, S45–S49.

- [130] Papucci, L., Schiavone, N., Witort, E., Donnini, M., Lapucci, A., Tempestini, A., Formigli, L., Zecchi-Orlandini, S., Orlandini, G., Carella, G. (2003) Coenzyme Q₁₀ prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. J. Biol. Chem. 278, 28220–28228.
- [131] Aguilaniu, H., Durieux, J. and Dillin, A. (2005) Metabolism, ubiquinone synthesis, and longevity. Genes Dev. 19, 2399–2406.
- [132] Ernster, L. and Dallner, G. (1995) Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. Biochim. Biophys. Acta 1271, 195–204.
- [133] Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55, 373–399.
- [134] Nordberg, J. and Arnér, E. S. J. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic. Biol. Med. 31, 1287–1312.
- [135] Lenaz, G. (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. Biochim. Biophys. Acta 1366, 53–67.
- [136] Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408, 239–247.
- [137] Wood, P. M. (1988) The potential diagram for oxygen at pH 7. Biochem. J. 253, 287–289.
- [138] Schultz, S., Wagner, G. and Ulrich, J. (2002) Hochdruckhomogenisation als ein Verfahrenzur Emulsionsherstellung. Chemie Ingenieur Technik 74, 901-909.
- [139] Akoh, C. C. and Min, D. B. (2008) Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Third Edition 3rd ed., CRC Press.
- [140] Siekmann, B. and Westesen, K. (1995) Preparation and Physicochemical Characterization of Aqueous Dispersions of Coenzyme Q₁₀ Nanoparticles. Pharm. Res. 12, 201–208.



- [141] Katas, H., Hussain, Z. and Ling, T. C. (2012) Chitosan Nanoparticles as a Percutaneous Drug Delivery System for Hydrocortisone. J. Nanomat. 2012, 1–11.
- [142] Kreyenschulte, D., Krull, R. and Margaritis, A. (2014) Recent Advances in Microbial Biopolymer Production and Purification. Crit Rev Biotechnol. 34, 1–15.
- [143] Lin, Y.-H., Mi, F.-L., Chen, C.-T., Chang, W.-C., Peng, S.-F., Liang, H.-F. and Sung, H.-W. (2007) Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. Biomacromolecules 8, 146–152.
- [144] Tønnesen, H. H. and Karlsen, J. (2002) Alginate in drug delivery systems. Drug Dev. Ind. Pharm. 28, 621–630.
- [145] Manconi, M., Caddeo, C., Sinico, C., Valenti, D., Mostallino, M. C., Biggio, G. and Fadda, A. M. (2011) Ex vivo skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vesicle-skin interaction. Eur. J. Pharm. Biopharm. 78, 27–35.
- [146] Hadj-Ali, N. El, Agrebi, R., Ghorbel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S. and Nasri, M. (2007) Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. Enzym. Microb. Technol. 40, 515–523.
- [147] Ashiuchi, M. (2013) Microbial production and chemical transformation of polyy-glutamate. Microb. Biotechnol. 6, 664–674.
- [148] Birrer, G. a, Cromwick, a M. and Gross, R. (1994) Gamma-poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies. Int. J. Biol. Macromol. 16, 265–275.
- [149] Du, G., Yang, G., Qu, Y., Chen, J. and Lun, S. (2005) Effects of glycerol on the production of poly(γ-glutamic acid) by *Bacillus licheniformis*. Process Biochem. 40, 2143–2147.

- [150] Yoon, S. H., Do, J. H., Lee, S. Y. and Chang, H. N. (2000) Production of polyγ-glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. Biotechnol. Lett. 22, 585–588.
- [151] Leonard, C. G., Housewright, R. D. and Thorne, C. B. (1958) Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 76, 499–503.
- [152] Reif, O. and Scheper, T. (2006) Angewandte Mikrobiologie. Antranikian Angew. Mikrobiol., Springer, Berlin.
- [153] McLean, R. J., Beauchemin, D., Clapham, L. and Beveridge, T. J. (1990) Metal-Binding Characteristics of the Gamma-Glutamyl Capsular Polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3671–3677.
- [154] Lakowitz, J. R., Johnson, M. L., Wiczk, W., Bhat, A. and Steiner, R. F. (1987) Resolution of a distribution of distances by fluorescence energy transfer and frequency-domain fluorometry. Chem. Phys. Lett. 138, 587–593.
- [155] Elias, H.-G. (2001) Makromoleküle Band 2, Physikalische Strukturen und Eigenschaften, Wiley-VCH.
- [156] Groot, R. D., Madden, T. J. and Tildesley, D. J. (1999) On the role of hydrodynamic interactions in block copolymer microphase separation. J. Chem. Phys. 110, 9739–9749.
- [157] Guo, H. and Kremer, K. (2003) Molecular dynamics simulation of the phase behavior of lamellar amphiphilic model systems. J. Chem. Phys. 119, 9308–9320.
- [158] Lakowitz, J. R. (1999) Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, Berlin.
- [159] Baddeley, D., Batram, C., Weiland, Y., Cremer, C. and Birk, U. J. (2007) Nanostructure analysis using spatially modulated illumination microscopy. Nat. Protoc. 2, 2640–2646.



- [160] Best, G., Amberger, R., Baddeley, D., Ach, T., Dithmar, S., Heintzmann, R. and Cremer, C. (2011) Structured illumination microscopy of autofluorescent aggregations in human tissue. Micron 42, 330–335.
- [161] Gunkel, M., Erdel, F., Rippe, K., Lemmer, P., Kaufmann, R., Hörmann, C., Amberger, R. and Cremer, C. (2009) Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. Biotechnol. J. 4, 927–38.
- [162] Kaufmann, R., Müller, P., Hildenbrand, G., Hausmann, M. and Cremer, C. (2011) Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy. J. Microsc. 242, 46–54.
- [163] Pino, C. J., Gutterman, J. U., Vonwil, D., Mitragotri, S. and Shastri, V. P. (2012) Glycosylation facilitates transdermal transport of macromolecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 109, 21283–21288.
- [164] Graw, J. (2010) Genetik 5th ed., Springer, Berlin.
- [165] Jamieson, D. J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14, 1511–1527.
- [166] Wu, M. J., O'Doherty, P. J., Murphy, P. a, Lyons, V., Christophersen, M., Rogers, P. J., Bailey, T. D. and Higgins, V. J. (2011) Different Reactive Oxygen Species Lead to Distinct Changes of Cellular Metal Ions in the Eukaryotic Model Organism Saccharomyces cerevisiae. Int. J. Mol. Sci. 12, 8119–32.
- [167] Jazwinski, S. M. (1993) The genetics of aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetica 91, 35–51.
- [168] Cooper, G. M. and Hausman, R. E. (2013) The cell a molecular approach 6th ed., Sinauer Associates.
- [169] Reynolds, T. B. and Fink, G. R. (2001) Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. Science 291, 878–881.
- [170] Kennedy, B. K., Austriaco, N. R. and Guarente, L. (1994) Daughter cells of Saccharomyces cerevisiae from old mothers display a reduced life span. J. Cell. Biol. 127, 1985–1993.

- [171] Pearson, A. P., Glennon, B. and Kieran, P. M. (2004) Monitoring of cell growth using the focused beam reflectance method. J. Chem. Technol. Biotechnol. 79, 1142–1147.
- [172] Czapla, F., Kail, N., Öncül, A., Lorenz, H., Briesen, H. and Seidel-Morgenstern, A. (2010) Application of a recent FBRM-probe model to quantify preferential crystallization of dl-threonine. Chem. Eng. Res. Des., Institution of Chemical Engineers 88, 1494–1504.
- [173] Li, H., Kawajiri, Y., Grover, M. and Rousseau, R. W. (2014) Application of an empirical FBRM model to estimate crystal size distributions in batch crystallization. Cryst. Growth Des. 14, 607–616.
- [174] Leyssens, T., Baudry, C. and Hernandez, M. L. E. (2011) Optimization of a crystallization by online FBRM analysis of needle-shaped crystals. Org. Process Res. Dev. 15, 413–426.
- [175] Stohs, S. J. and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic. Biol. Med. 18, 321–336.
- [176] Bhattacharya, K., Naha, P. C., Naydenova, I., Mintova, S. and Byrne, H. J. (2012) Reactive oxygen species mediated DNA damage in human lung alveolar epithelial (A549) cells from exposure to non-cytotoxic MFI-type zeolite nanoparticles. Toxicol. Lett. 215, 151–160.
- [177] Yu, K.-N., Yoon, T.-J., Minai-Tehrani, A., Kim, J.-E., Park, S. J., Jeong, M. S., Ha, S.-W., Lee, J.-K., Kim, J. S. and Cho, M.-H. (2013) Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. Toxicol. Vitr. 27, 1187–1195.
- [178] Kosower, N. and Kosower, E. M. (1970) Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 1967–1970.
- [179] Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Albert, M., Kaplowitz, N. and Fernandez-Checa, J.
 C. (1995) Role of Oxidative Stress Generated from the Mitochondrial Electron Transport Chain and Mitochondrial Glutathione Status in Loss of Mitochondrial



Function and Activation of Transcription Factor Nuclear Factor-KB: Studies with Isolated Mitochondria and Rat. Mol. Pharmacol. 48, 825–834.

- [180] Muthu, R., Thangavel, P., Selvaraj, N., Ramalingam, R. and Vaiyapuri, M. (2012) Synergistic and individual effects of umbelliferone with 5-flurouracil on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against 1, 2dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. Biomed. Prev. Nutr., 1–9.
- [181] Höhn, A., König, J. and Grune, T. (2013) Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. J. Proteomics 92, 132–159.
- [182] Schafer, F. Q. and Buettner, G. R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radic. Biol. Med. 30, 1191–1212.
- [183] Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7, 405–410.
- [184] Ueno, M., Masutani, H., Arai, R. J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J. and Nikaido, T. (1999) Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. J. Biol. Chem. 274, 35809–15.
- [185] Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J. Biol. Chem. 272, 20313–20316.
- [186] Elliott, N. A. and Volkert, M. R. (2004) Stress Induction and Mitochondrial Localization of Oxr1 Proteins in Yeast and Humans. Mol. Cell. Biol. 24, 3180–3187.
- [187] Volkert, M. R., Elliott, N. and Housman, D. E. (2000) Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 14530–14535.
- [188] Ormö, M., Cubitt, B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. and Remington, S. J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. Science 273, 1392–1395.

- [189] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker gene expression. Science 263, 802–805.
- [190] Patterson, G., Day, R. N. and Piston, D. (2001) Fluorescent protein spectra. J. Cell Sci. 114, 837–838.
- [191] Kreyenschulte, D. (2012) Production and purification of gamma-polyglutamic acid for the preparation of hydrophobically modified nanoparticles, Masterarbeit, TU Braunschweig.
- [192] Rau, U., Kuenz, A., Wray, V., Nimtz, M., Wrenger, J. and Cicek, H. (2009) Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by Trametes (Coriolus) versicolor ATCC 200801. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81, 827–837.
- [193] Wöhl-Bruhn, S., Bertz, A., Kuntsche, J., Menzel, H. and Bunjes, H. (2013) Variations in polyethylene glycol brands and their influence on the preparation process of hydrogel microspheres. Eur. J. Pharm. Biopharm. 85, 1215–1218.
- [194] Kambourova, M., Tangney, M. and Fergus, G. (2001) Regulation of Polyglutamic Acid Synthesis by Glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1004–1007.
- [195] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- [196] Williams, A. and Ibrahim, I. T. (1981) Carbodiimide chemistry: recent advances. Chem. Rev. 81, 589–636.
- [197] Nakajima, N. and Ikada, Y. (1995) Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. Bioconjugate Chem. 6, 123–130.
- [198] Wrobel, N., Schinkinger, M. and Mirsky, V. M. (2002) A novel ultraviolet assay for testing side reactions of carbodiimides. Anal. Biochem. 305, 135–138.



- [199] Bergmann, S., David, F., Clark, W., Wittmann, C. and Krull, R. (2013) Membrane fluidity of halophilic ectoine-secreting bacteria related to osmotic and thermal treatment. Bioprocess Biosyst. Eng. 36, 1829–1841.
- [200] Bergmann, S., David, F., Franco-Lara, E., Wittmann, C. and Krull, R. (2013) Ectoine production by *Alkalibacillus haloalkaliphilus* – bioprocess development using response surface methodology and model-driven strategies. Eng. Life Sci. 13, 399–407.
- [201] Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 62, 293–300.
- [202] Rodrigues, A. L., Trachtmann, N., Becker, J., Lohanatha, A. F., Blotenberg, J., Bolten, C. J., Korneli, C., de Souza Lima, A. O., Porto, L. M., Sprenger, G. (2013) Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. Metab. Eng. 20, 29–41.
- [203] Debaun, R. M. and Stevens, G. De. (1950) On the Mechanism of Enzyme Action. XLIV. Codetermination of Resazurin and Resorufin in Enzymatic Dehydrogenation Experiments. Arch. Biochem. Biophys. 31, 300–308.
- [204] Nakayama, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P. and Parandoosh, Z. (1997) Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. J. Immunol. Meth 204, 205–208.
- [205] Wucherpfennig, T., Schulz, A., Pimentel, J. A., Corkidi, G., Sieblitz, D., Pump, M., Gorr, G., Schütte, K., Wittmann, C. and Krull, R. (2014) Viability characterization of *Taxus chinensis* plant cell suspension cultures by rapid colorimetric- and image analysis-based techniques. Bioprocess Biosyst. Eng. 1799–1808.
- [206] King, E. C., Blacker, J. and Bugg, T. D. (2000) Enzymatic breakdown of polygamma-D-glutamic acid in *Bacillus licheniformis*: identification of a polyglutamyl gamma-hydrolase enzyme. Biomacromolecules 1, 75–83.

- [207] Kimura, K., Tran, L.-S. P., Uchida, I. and Itoh, Y. (2004) Characterization of Bacillus subtilis gamma-glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly-gamma-glutamate. Microbiology 150, 4115–4123.
- [208] Croisier, F. and Jérôme, C. (2013) Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. Eur. Polym. J. 49, 780–792.
- [209] Eilers, P. H. C. and Kroonenberg, P. M. (2014) Modeling and correction of Raman and Rayleigh scatter in fluorescence landscapes. Chemom. Intell. Lab. 130, 1–5.
- [210] Chan, J. M., Zhang, L., Yuet, K. P., Liao, G., Rhee, J.-W., Langer, R. and Farokhzad, O. C. (2009) PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. Biomaterials 30, 1627–1634.
- [211] Blasi, P., Schoubben, A., Romano, G. V., Giovagnoli, S., Di Michele, A. and Ricci, M. (2013) Lipid nanoparticles for brain targeting II. Technological characterization. Colloids Surf. B. Biointerfaces 110C, 130–137.
- [212] Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Vicente, A. and Quintas, M. C. (2013) Transport mechanism of macromolecules on hydrophilic bio-polymeric matrices – Diffusion of protein-based compounds from chitosan films. J. Food Eng. 116, 633–638.
- [213] Ferreira, J., Cemlyn-Jones, J. and Robalo Cordeiro, C. (2013) Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. Rev. Port. Pneumol., Sociedade Portuguesa de Pneumologia 19, 28–37.
- [214] Monduzzi, M., Lampis, S., Murgia, S. and Salis, A. (2013) From Self-Assembly Fundamental Knowledge to Nanomedicine Developments. Adv. Colloid Interface Sci. 205, 48-67.
- [215] Hofmann, D., Messerschmidt, C., Bannwarth, M. B., Landfester, K. and Mailänder, V. (2014) Drug delivery without nanoparticle uptake: delivery by a kiss-and-run mechanism on the cell membrane. Chem. Commun. 50, 1369–1371.



- [216] Rosenblatt, K. M. and Bunjes, H. (2009) Poly(vinyl alcohol) as Emulsifier Stabilizes Solid Triglyceride Drug Carrier Nanoparticles in the alphamodification. Mol. Pharm. 6, 105–120.
- [217] Gimenez, V., Mantecon, A., Ronda, J. C. and Cadiz, V. (1997) Poly(vinyl alcohol) Modified with Carboxylic Acid Anhydrides: Crosslinking Through Carboxylic Groups. J. Appl. Polym. Sci. 65, 1643–1651.
- [218] Chaturvedi, K., Ganguly, K., Kulkarni, A. R., Kulkarni, V. H., Nadagouda, M. N., Rudzinski, W. E. and Aminabhavi, T. M. (2011) Cyclodextrin-based siRNA delivery nanocarriers: a state-of-the-art review. Expert Opin. Drug Deliv. 8, 1455–1468.
- [219] Mahmoudi, M., Meng, J., Xue, X., Liang, X. J., Rahman, M., Pfeiffer, C., Hartmann, R., Gil, P. R., Pelaz, B., Parak, W. J. (2013) Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes. Biotechnol. 32, 679-692.
- [220] Sharma, P. and Garg, S. (2010) Pure drug and polymer based nanotechnologies for the improved solubility, stability, bioavailability and targeting of anti-HIV drugs. Adv. Drug Deliv. Rev. 62, 491–502.
- [221] Durand, M., Kolpak, A., Farrell, T., Elliott, N., Shao, W., Brown, M. and Volkert, M. R. (2007) The OXR domain defines a conserved family of eukaryotic oxidation resistance proteins. BMC Cell Biol. 8, 13.
- [222] Blinova, K., Carroll, S., Bose, S., Smirnov, A. V., Harvey, J. J., Knutson, J. R. and Balaban, R. S. (2005) Distribution of mitochondrial NADH fluorescence lifetimes: Steady-state kinetics of matrix NADH interactions. Biochemistry 44, 2585–2594.
- [223] Biedendieck, R. (2006) *Bacillus megaterium*: Versatile Tools for Production, Secretion and Purification of Recombinant Proteins.
- [224] Vandenbroucke, K., Robbens, S., Vandepoele, K., Inzé, D., Van de Peer, Y. and Van Breusegem, F. (2008) Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: a comparative analysis. Mol. Biol. Evol. 25, 507–516.

- [225] Cacace, F., Paci, P., Cusimano, V., Germani, A. and Farina, L. (2012) Stochastic modeling of expression kinetics identifies messenger half-lives and reveals sequential waves of co-ordinated transcription and decay. PLoS Comput. Biol. 8, e1002772.
- [226] Moreno, N., Pe, E., Alepuz, P. and Romero-santacreu, L. (2009) Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA 15, 1110–1120.
- [227] Golding, I., Paulsson, J., Zawilski, S. M. and Cox, E. C. (2005) Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. Cell 123, 1025–36.
- [228] Sporty, J. L., Kabir, M., Turteltaub, K. W., Ognibene, T. and Bench, G. (2009) NIH Public Access 31, 3202–3211.
- [229] Koutsopoulos, S. (2012) Molecular fabrications of smart nanobiomaterials and applications in personalized medicine. Adv. Drug Deliv. Rev. 64, 1459–76.



- Band 1 Sunder, Matthias: Oxidation grundwasserrelevanter Spurenverunreinigungen mit Ozon und Wasserstoffperoxid im Rohrreaktor. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-00-4
- **Band 2** Pack, Hubertus: Schwermetalle in Abwasserströmen: Biosorption und Auswirkung auf eine schadstoffabbauende Bakterienkultur. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-01-2
- Band 3 Brüggenthies, Antje: Biologische Reinigung EDTA-haltiger Abwässer. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-02-0
- **Band 4** Liebelt, Uwe: Anaerobe Teilstrombehandlung von Restflotten der Reaktivfärberei. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-03-9
- Band 5 Mann, Volker G.: Optimierung und Scale up eines Suspensionsreaktorverfahrens zur biologischen Reinigung feinkörniger, kontaminierter Böden. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-04-7
- Band 6 Boll Marco: Einsatz von Fuzzy-Control zur Regelung verfahrenstechnischer Prozesse. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-06-3
- Band 7 Büscher, Klaus: Bestimmung von mechanischen Beanspruchungen in Zweiphasenreaktoren. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-07-1
- Band 8 Burghardt, Rudolf: Alkalische Hydrolyse Charakterisierung und Anwendung einer Aufschlußmethode für industrielle Belebtschlämme. 1998. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-13-6
- **Band 9 Hemmi, Martin**: Biologisch-chemische Behandlung von Färbereiabwässern in einem Sequencing Batch Process. 1999. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-14-4
- **Band 10** Dziallas, Holger: Lokale Phasengehalte in zwei- und dreiphasig betriebenen Blasensäulenreaktoren. 2000. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-15-2
- Band 11 Scheminski, Anke: Teiloxidation von Faulschlämmen mit Ozon. 2001. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-16-0
- **Band 12** Mahnke, Eike Ulf: Fluiddynamisch induzierte Partikelbeanspruchung in pneumatisch gerührten Mehrphasenreaktoren. 2002. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-17-9
- **Band 13** Michele, Volker: CDF modeling and measurement of liquid flow structure and phase holdup in two- and three-phase bubble columns. 2002. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-18-7
- **Band 14** Wäsche, Stefan: Einfluss der Wachstumsbedingungen auf Stoffübergang und Struktur von Biofilmsystemen. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-19-5
- Band 15 Krull Rainer: Produktionsintegrierte Behandlung industrieller Abwässer zur Schließung von Stoffkreisläuren. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-20-9



- Band 16 Otto, Peter: Entwicklung eines chemisch-biologischen Verfahrens zur Reinigung EDTA enthaltender Abwässer. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-21-7
- **Band 17** Horn, Harald: Modellierung von Stoffumsatz und Stofftransport in Biofilmsystemen. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-22-5
- Band 18 Mora Naranjo, Nelson: Analyse und Modellierung anaerober Abbauprozesse in Deponien. 2004. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-23-3
- Band 19 Döpkens, Eckart: Abwasserbehandlung und Prozesswasserrecycling in der Textilindustrie. 2004. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-24-1
- Band 20 Haarstrick, Andreas: Modellierung millieugesteuerter biologischer Abbauprozesse in heterogenen problembelasteten Systemen. 2005. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-27-6
- **Band 21 Baaß, Anne-Christina**: Mikrobieller Abbau der Polyaminopolycarbonsäuren Propylendiamintetraacetat (PDTA) und Diethylentriaminpentaacetat (DTPA). 2004. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-26-8
- Band 22 Staudt, Christian: Entwicklung der Struktur von Biofilmen. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-28-4
- Band 23 Pilz, Roman Daniel: Partikelbeanspruchung in mehrphasig betriebenen Airlift-Reaktoren. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-29-2
- **Band 24** Schallenberg, Jörg: Modellierung von zwei- und dreiphasigen Strömungen in Blasensäulenreaktoren. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-30-6
- Band 25 Enß, Jan Hendrik: Einfluss der Viskosität auf Blasensäulenströmungen. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-31-4
- **Band 26** Kelly, Sven: Fluiddynamischer Einfluss auf die Morphogenese von Biopellets filamentöser Pilze. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-32-2
- **Band 27** Grimm, Luis Hermann: Sporenaggregationsmodell für die submerse Kultivierung koagulativer Myzelbildner. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-33-0
- Band 28 León Ohl, Andrés: Wechselwirkungen von Stofftransport und Wachstum in Biofilsystemen. 2007. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-34-9
- **Band 29** Emmler, Markus: Freisetzung von Glucoamylase in Kultivierungen mit Aspergillus niger. 2007. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-35-7
- **Band 30** Leonhäuser, Johannes: Biotechnologische Verfahren zur Reinigung von quecksilberhaltigem Abwasser. 2007. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-36-5
- **Band 31** Jungebloud, Anke: Untersuchung der Genexpression in *Aspergillus niger* mittels Echtzeit-PCR. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-37-2
- Band 32 Hille, Andrea: Stofftransport und Stoffumsatz in filamentösen Pilzpellets. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-38-9



- **Band 33** Fürch, Tobias: Metabolic characterization of recombinant protein production in *Bacillus megaterium*. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-39-6
- Band 34 Grote, Andreas Georg: Datenbanksysteme und bioinformatische Werkzeuge zur Optimierung biotechnologischer Prozesse mit Pilzen. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-40-120
- **Band 35** Möhle, Roland Bernhard: An Analytic-Synthetic Approach Combining Mathematical Modeling and Experiments – Towards an Understanding of Biofilm Systems. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-41-9
- **Band 36 Reichel, Thomas**: Modelle für die Beschreibung das Emissionsverhaltens von Siedlungsabfällen. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-42-6
- **Band 37** Schultheiss, Ellen: Charakterisierung des Exopolysaccharids PS-EDIV von Sphingomonas pituitosa. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-43-3
- **Band 38** Dreger, Michael Andreas: Produktion und Aufarbeitung des Exopolysaccharids PS-EDIV aus *Sphingomonas pituitosa*. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-44-0
- **Band 39** Wiebels, Cornelia: A Novel Bubble Size Measuring Technique for High Bubble Density Flows. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-45-7
- Band 40 Bohle, Kathrin: Morphologie- und produktionsrelevante Gen- und Proteinexpression in submersen Kultivierungen von *Aspergillus niger*. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-46-2
- **Band 41** Fallet, Claas: Reaktionstechnische Untersuchungen der mikrobiellen Stressantwort und ihrer biotechnologischen Anwendungen. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-47-1
- **Band 42** Vetter, Andreas: Sequential Co-simulation as Method to Couple CFD and Biological Growth in a Yeast. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-48-8
- Band 43 Jung, Thomas: Einsatz chemischer Oxidationsverfahren zur Behandlung industrieller Abwässer. 2010. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-49-5
- **Band 45** Herrmann, Tim: Transport von Proteinen in Partikeln der Hydrophoben Interaktions Chromatographie. 2010. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-51-8
- Band 46 Becker, Judith: Systems Metabolic Engineering of Corynebacterium glutamicum towards improved Lysine Production. 2010. Cuvillier-Verlage · Göttingen, ISBN 978-3-86955-426-6
- **Band 47** Melzer, Guido: Metabolic Network Analysis of the Cell Factory *Aspergillus niger*. 2010. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-456-3
- **Band 48** Bolten J., Christoph: Bio-based Production of L-Methionine in *Corynebacterium* glutamicum. 2010. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-486-0



- **Band 49** Lüders, Svenja: Prozess- und Proteomanalyse gestresster Mikroorganismen. 2010. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-435-8
- **Band 50** Wittmann, Christoph: Entwicklung und Einsatz neuer Tools zur metabolischen Netzwerkanalyse des industriellen Aminosäure-Produzenten *Corynebacterium glutamicum*. 2010. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-445-7
- **Band 51** Edlich, Astrid: Entwicklung eines Mikroreaktors als Screening-Instrument für biologische Prozesse. 2010. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-470-9
- **Band 52** Hage, Kerstin: Bioprozessoptimierung und Metabolomanalyse zur Proteinproduktion in *Bacillus licheniformis.* 2010. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-578-2
- Band 53 Kiep, Katina Andrea: Einfluss von Kultivierungsparametern auf die Morphologie und Produktbildung von Aspergillus niger. 2010. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955- 632-1
- **Band 54** Fischer, Nicole: Experimental investigations on the influence of physico-chemical parameters on anaerobic degradation in MBT residual waste. 2011. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-679-6
- Band 55 Schädel, Friederike: Stressantwort von Mikroorganismen. 2011. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-746-5
- Band 56 Wichter, Johannes: Untersuchung der L-Cystein-Biosynthese in *Escherichia coli* mit Techniken der Metabolom- und ¹³C-Stoffflussanalyse. 2011. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-750-2
- Band 57 Knappik, Irena Isabell: Charakterisierung der biologischen und chemischen Reaktionsprozesse in Siedlungsabfällen. 2011. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3- 86955-760-1
- **Band 58 Driouch, Habib**: Systems biotechnology of recombinant protein production in *Aspergillus niger*. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-808-0
- **Band 59** Gehder, Matthias: Development and Validation of Indicators for the Production and Quality of Seed Cultures. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-847-9
- **Band 60** Sommer, Becky: Methodenentwicklung zur Charakterisierung sporenbildender Pilz-Seedingkulturen. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-851-6
- Band 61 Dohnt, Katrin: Charakterisierung von *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen in einem *in vitro*-Harnwegskathetersystem. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-852-3
- Band 62 Greis, Tillman: Modelling the risk of chlorinated hydrocarbons in urban groundwater. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-970-4
- **Band 63 David, Florian:** Holistic bioprocess engineering of antibody fragment secreting *Bacillus megaterium.* 2012. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-95404-115-2



- Band 64 Palme, Wiebke: Taxonomische Einordnung des Polyaminopolycarbonsäureabbauenden Stammes BNC1 und Untersuchungen zum Abbau von 1,3 Propylendiamintetraacetat. 2012. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-95404-158-9
- **Band 65** Lin, Pey-Jin: Effect of fluid dynamics on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. 2012. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-95404-181-7
- Band 66 Kind, Stefanie: Synthetic Metabolic Engineering of Corynebacterium glutamicum for Biobased Production of 1,5-Diaminopentane. 2012. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3- 95404-264-7
- Band 67 Wilk, Franziska: Charakterisierung von Stoffströmen vorbehandelter Siedlungsabfälle in Deponiebioreaktoren. 2012. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-95404-281-4
- **Band 68** Korneli, Claudia: Target-oriented Bioprocess Optimization for Recombinant Protein Production in *Bacillus megaterium*. 2012. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-95404-289-0
- Band 69 Eslahpazir Esfandabadi, Manely: Target-oriented Bioprocess Optimization for Recombinant Protein Production in *Bacillus megaterium*. 2012. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-95404-289-0
- **Band 70** Wucherpfennig, Thomas: Cellular morphology : a novel process parameter for the cultivation of eukaryotic cells. 2013. Cuvillier-Verlage Göttingen, ISBN: 978-3-95404-456-6
- Band 71 Buschke, Nele: From Waste to Value Bio-Nylon Monomers from Renewables using Corynebacterium glutamicum. 2013. Cuvillier-Verlage Göttingen, ISBN: 978-3-95404-457-3
- Band 72 Bergmann, Sven: Ectoine production by halotolerant microorganisms Process optimization and characterization of cellular state. 2013. Cuvillier-Verlage Göttingen, ISBN: 978-3-95404-556-3
- **Band 73** Hellriegel, Jan: Engineering a Biofilm Imitating Physico-Chemical Properties to Improve Mechanical Characterization. 2014. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-95404-753-6
- Band 74 Berger, Antje: Metabolische Netzwerkanalyse uropathogener *Pseudomonas* aeruginosa-Isolate. 2014. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-95404-762-8
- Band 75 Peterat, Gena: Prozesstechnik und reaktionskinetische Analysen in einem mehrphasigen Mikrobioreaktorsystem. 2014. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-95404-887-8

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden. Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden. Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.