

2. Material und Methoden

2.1 Probengewinnung *Taxus baccata*

Sämtliches Pflanzenmaterial der Art *Taxus baccata* wurde im botanischen Garten der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gesammelt. Das Pflanzenmaterial der tropischen Arten *Alstonia scholaris* und *Melia azedarach* stammt aus den Forschungsaufenthalten an der Airlangga Universität Surabaya, Indonesien im Februar 2005 und Mai 2006. Die aus dem Botanischen Garten der Airlangga Universität erhaltenen Proben wurden zum Teil vor Ort am Institut für Pharmakognosie und Pharmazeutische Biologie bearbeitet, um endophytische Pilze zu isolieren, zum anderen auch zum Zwecke der molekularbiologischen Untersuchung an das Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verbracht.

2.2 Isolierung der endophytischen Pilze aus den Wirtspflanzen

Von dem gesammelten Pflanzenmaterial wurden 4-5 cm lange Stücke abgeteilt. Diese wurden 5 min lang in 3% NaOCl-Lösung und anschließend 2 min lang in 70% (v/v) Ethanol untergetaucht um eine Oberflächensterilisierung zu erzielen. Die geeigneten Zeiten wurden in Vorexperimenten ermittelt. Eine zu kurze Einwirkungszeit würde keine sichere Keimabtötung bewirken, während eine zu lange Einwirkungszeit zu einem zu tiefen Vordringen der Desinfektionsmittel und somit zum Zerstören der endophytischen Pilze führen kann, insbesondere bei nicht verholzten Pflanzenteilen wie Blättern.

Die Probe wurde nach Entnahme aus dem Ethanol zunächst in einer geöffneten Petrischale trocknen gelassen. Sobald nach optischer Beurteilung keine adhärente Flüssigkeit mehr festzustellen war, wurde die Oberfläche der Probe mit einem in einer

Petrischale befindlichen Malzextraktagarmedium in Kontakt gebracht, um möglicherweise noch vorhandene anhaftende Kontaminationen nachzuweisen. Im Falle einer positiven Kontrolle wurden die erhaltenen Stämme verworfen, um nur endophytische Pilze zu berücksichtigen. Danach wurde die Probe mit sterilem Skalpell und Pinzette in kleine Stücke zerteilt, die auf vorbereitete Medien aufgelegt wurden. Zur Isolierung der Endophyten wurden neben Malzextraktagarmedien auch solche verwendet, die mit lyophilisiertem und pulverisiertem Material der Wirtspflanze angereichert waren. Der Zusatz von Wirtspflanzenmaterial erfolgte, um das Wachstum auch solcher Pilze zu ermöglichen, die von Inhaltsstoffen ihrer Wirtspflanze abhängig sind. Alle zur Isolierung verwendeten Medien enthielten zusätzlich das Antibiotikum Chloramphenicol, um bakterielle Kontaminationen auszuschließen. Die Petrischalen wurden mit Parafilm versiegelt und bei 20° C (im Falle von *Taxus baccata*) bzw. 30 – 32° C (im Falle von *Alstonia scholaris* und *Melia azedarach*) inkubiert. Sobald Pilzwachstum zu beobachten war – dies dauerte zwischen zwei und fünf Tagen – wurden die Kulturen auf neue Medien überimpft. Dieser Vorgang mußte teilweise mehrfach wiederholt werden, um einen nach visueller Beurteilung reinen Stamm zu erhalten.

Medium zur Isolierung von Endophyten

Lyophilisiertes Pflanzenmaterial oder

Malzextrakt	15.0 g
Agar-Agar	15.0 g
Chloramphenicol	0.2 g
Gereinigtes Wasser	ad 1000.0 mL

Das Medium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert und noch heiß in Petrischalen ausgegossen.

2.3 300 mL Flüssigstandkulturen

In je einen 1000 mL Weithals-Erlenmeyerkolben wurden 300 mL Wickerham-Flüssigmedium gefüllt. Nach der Entnahme aus dem Autoklaven erfolgte die Inokulation mit Segmenten, die aus dem bewachsenen Festmedium herausgeschnitten wurden. Die Standkulturen wurden – abhängig vom Wachstum der Pilze - nach zwei bis vier Wochen extrahiert oder als Inokulum für weitere Flüssigkulturen verwendet. Zu letztgenanntem Zweck wurde der Inhalt des Kulturgefäßes in ein sterilisiertes Becherglas überführt und mit dem Ultraturrax zerkleinert.

Für die Extraktion wurde der Inhalt des Kolbens mit 400 mL EtOAc überschichtet und mit dem Ultraturrax zerkleinert. Das erhaltene Gemisch wurde anschließend filtriert. Das mittels Scheidetrichter von der organischen Phase abgetrennte Flüssigmedium wurde noch zweimal mit EtOAc ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt, in 300 mL 90% (v/v) Methanol aufgenommen und zur Entfernung unpolarer Begleitstoffe gegen 300 mL Cyclohexan

ausgeschüttelt. Zur weiteren Bearbeitung wurde der Ethylacetatextrakt erneut eingeeengt und in Methanol aufgenommen.

Wickerham-Medium für Flüssigkulturen

Hefeextrakt	3.0 g
Malzextrakt	3.0 g
Pepton	5.0 g
Glucose	20.0 g
Gereinigtes Wasser	ad 1000.0 mL

Das Medium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert .

2.4 15 L Flüssigkultur

Der Fermenter wurde aus seinen Einzelteilen zusammengesetzt und bestand im wesentlichen aus einem aufrecht stehenden Glaszylinder, der mittels zweier, durch sechs außenliegende Gewindestangen fixierter Stahlplatten verschlossen war. Die Deckelplatte enthielt zahlreiche Durchführungen, darunter eine fast bis zum Boden reichende Belüftungsringleitung, ein Steigrohr, Temperierungsschleife sowie weitere Anschlüsse für Abluft und zur Inokulation. Der 20 L fassende Behälter wurde mit 15 L Wickerham-Flüssigmedium sowie 20 mL Siliconöl zur Schaumvermeidung gefüllt, alle Öffnungen verschlossen und zum Druckausgleich ein Sterilfilter am Abluftstutzen angeschlossen. Zur Sterilisation wurde der Behälter mittels Seilwinde in den Autoklaven verbracht. Das Erreichen der notwendigen Temperatur auch im Inneren des Zylinders

wurde mit einem in die Temperierungsschleife herabgelassenen Temperaturfühler der Steuerungselektronik sichergestellt. Nach 24 h war das Medium auf Zimmertemperatur abgekühlt und konnte angeimpft werden. Zu diesem Zweck wurde über den Abluftfilter reduzierter Druck (500 mbar) angelegt, um das Inokulum über ein steriles Schlauchsystem in den Behälter zu saugen. Während der Fermentierung wurde ein Luftstrom von 60 NL / h (Normliter pro Stunde) eingeleitet. Zur Kontrolle des Fermentationsvorganges wurde die Abluft des Fermenters 2 mal wöchentlich auf CO₂ untersucht. Sobald ein einminütiges Durchströmen einer mit Kalkwasser gefüllten Waschflasche nicht mehr zur deutlichen Trübung führte, wurde der wesentliche Verbrauch des Mediums angenommen und die Fermentierung beendet.

Aufgrund der großen Menge an Kulturbrühe wurde diese innerhalb des Fermenters extrahiert. Das mittels einer Pumpe in das Belüftungsringrohr gedrückte EtOAc formte beim Austritt kleine Tröpfchen, die aufgrund des Dichteunterschieds nach oben stiegen. Die große Oberfläche der Tröpfchen begünstigte die Extraktion, die in etwa einer Gegenstrom-Flüssig-Flüssig-Verteilung entsprach. Da immer neues Lösungsmittel eingesetzt wurde, war eine erschöpfende Extraktion zu erwarten. Insgesamt wurden 60 L EtOAc durch den Fermenter geleitet. Die Ethylacetatphase wurde knapp unter dem Flüssigkeitsspiegel entnommen und eingeeengt. Hierzu wurde ein Rotationsverdampfer mit einer kontinuierlichen Zuführung ausgestattet, hierdurch konnten je Arbeitsgang 2 L EtOAc eingeeengt werden, ohne die Apparatur öffnen zu müssen. Das abdestillierte Lösungsmittel wurde erneut eingesetzt, so daß insgesamt nicht mehr als 10 L EtOAc verbraucht wurden. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt, in 1000 mL 90 % (v/v) Methanol aufgenommen und zur

Entfernung unpolarer Begleitstoffe gegen 1000 mL Cyclohexan ausgeschüttelt. Dabei wurde aus der Cyclohexanphase auch das zuvor als Antischaummittel zugegebene Siliconöl erhalten. Der Ethylacetatextrakt wurde der weiteren Aufarbeitung unterzogen.

2.5 Reis- und Weizenkultur

Zur Anlage der Reis- und Weizenkulturen wurden 100 Gramm handelsüblicher Basmati-Reis oder Weizen (Reformhausware) gewaschen und zusammen mit 100 mL H₂O in einen 1000 mL Weithals-Erlenmeyerkolben gegeben. Nach erfolgter Sterilisierung wurde mit einem aus dem Agarmedium ausgeschnittenen Segment inokuliert. Die Fermentation wurde nach etwa 4 Wochen beendet, wenn das gesamte Medium visuell wahrnehmbar durchdrungen war. Zur Extraktion wurde mit 400 mL EtOAc überschichtet, das Medium mit einem Spatel zunächst grob, dann mit dem Ultraturrax weiter zerkleinert. Die Extraktion wurde noch zwei Mal wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Entfernung polarer Begleitstoffe mit 500 mL Wasser gewaschen und dann eingeeengt.

2.5a Aufbewahrung der Stämme

Die isolierten Pilzstämme mußten vor Austrocknung und Kontamination geschützt kühl gelagert werden. Als besonders geeignet und platzsparend erwiesen sich 15 mL Probenröhrchen, die nach dem ErsthHersteller als Falcon-Tubes bezeichnet werden. In jedes Röhrchen wurden 4 mL des Festmediums eingefüllt und das verschlossene Röhrchen zum Erkalten schräg gelagert. Nach dem Animpfen wurden die Röhrchen in geeigneten Ständern im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.6 Untersuchungen auf biologische Aktivität

Extrakte, Fraktionen und Reinstoffe wurden mit den Testorganismen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* sowie *Cladosporium cucumerinum* und *Cladosporium herbarum* auf ihre biologische Aktivität untersucht. Dabei wurde *B. subtilis* stellvertretend für grampositive, *E. coli* für gramnegative Bakterien und *S. cerevisiae* für Hefen gewählt. *Cladosporium* spp. repräsentieren phytopathogene Pilzarten. Zum Test wurden Petrischalen mit für den jeweiligen Organismus geeigneten Medien vorbereitet, eine Suspension des Testorganismus zum Animpfen aufgebracht und auf der Oberfläche verteilt. Die Teststämme wurden zur Vorbereitung eines Testansatzes von ihrer Kultur in der Petrischale auf ein semi-flüssiges Medium überimpft, welches nach ausreichendem Wachstum mittels Ultraturrax suspendiert wurde. Je Testplatte wurden für Bakterien 400 µL, Hefe 200 µL und Pilze 10 mL aliquotiert. Soweit nicht im Einzelfall anders erforderlich, wurden Extrakte und Fraktionen zu einer Konzentration von 25 mg/mL in Methanol gelöst, bei Reinstoffen 5 mg/mL gewählt. Volumetrisch mit 100 µg Reinstoff beziehungsweise 500 µg Extrakt beladene Testplättchen mit einem Durchmesser von 5 mm wurden zu je acht Plättchen pro Petrischale kreisförmig auf der Oberfläche des beimpften Mediums aufgelegt. Pilze wurden bei 27 °C für 7 Tage inkubiert, Bakterien bei 37 °C und Hefen bei 27 °C für jeweils 24 Stunden. Danach wurde der Hemmhof um die substanzbeladenen Plättchen bestimmt, in dem kein Wachstum des Testorganismus stattfand. Der Test wurde durch Gentamicin, Penicillin G, Streptomycin und Nystatin Positiv sowie durch das Lösungsmittel Negativ kontrolliert.