



Moritz Arnold (Autor)

**CD-aktive Metabolite aus Streptomyceten sowie
Untersuchung der Biosyntheseleistungen des
Mensacarcin-Bildners *Streptomyces* sp. Gö C4/4**

Moritz Arnold

**CD-aktive Metabolite aus Streptomyceten
sowie
Untersuchung der Biosyntheseleistungen des
Mensacarcin-Bildners *Streptomyces* sp. Gö C4/4**



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3656>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

II. Durchführung eines modifizierten CD-Screenings

1. Zur CD-Spektroskopie

Unter Circular dichroismus (CD) versteht man die unterschiedliche Absorption von links und rechts circular polarisiertem Licht. Die Absorptionsbanden, welche positiv und negativ sein können, werden als Cotton-Effekte bezeichnet. Die CD-Spektroskopie ist eine chiroptische Methode, d.h. sie liefert für zwei Enantiomere jeweils Messwerte entgegengesetzten Vorzeichens. Deswegen wird sie zur Bestimmung von relativen und absoluten Konfigurationen von Molekülen und zur Konformationsanalyse von Biopolymeren genutzt³⁵. Zur Ableitung der Stereochemie benutzt man empirische oder semi-empirische Methoden³⁶ wie Helizitätsregeln oder Sektorregeln, z.B. die Oktandenregel für Ketone. Die CD-Spektren einiger Moleküle können ab initio berechnet werden³⁷. Die Exciton-Chiralitäts-Methode (ECCD) nach Nakanishi³⁸ ist eine nicht empirische Methode, die oft zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von Naturstoffen verwendet wird.

2. CD-Screening

2.1. Kultivierung der Stämme und Generierung der Extrakte

2.1.1. Herkunft der K-Stämme

Die K-Stämme (Kilimanjaro-Stämme) sind aus Erdproben isoliert worden, die in Tansania (Mramba Forest Reservat; Kilimanjaro-Nationalpark, Mwanga-Distrikt) in einer Höhe von 820 m über NN gesammelt worden waren. Die Bodenprobe der K21-Stämme stammt aus der Nähe des Baumes *Vepris glomerata* (Rutacea), die der K22- und K23-Stämme aus der Nähe des Baumes *Maerua angolensis* (Capparidaceae).

2.1.2. Kultivierung der K-Stämme

Die Kultivierung der K-Stämme erfolgte in 300 ml Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen. Die Kolben wurden mit 50 ml Nährmedium gefüllt, autoklaviert und mit ca. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte angeimpft. Man ließ 72 h bei 28 °C und 180 rpm kultivieren. Jeder Stamm wurde in den Nährmedien SM, M2 und Haferkleie fermentiert.

2.1.3. Generierung der Extrakte

Die Kulturbrühe wurde über Celite filtriert. Das Mycel wurde mit Aceton extrahiert, das Kulturfiltrat an Amberlite® XAD-2 absorbiert und mit Methanol eluiert.

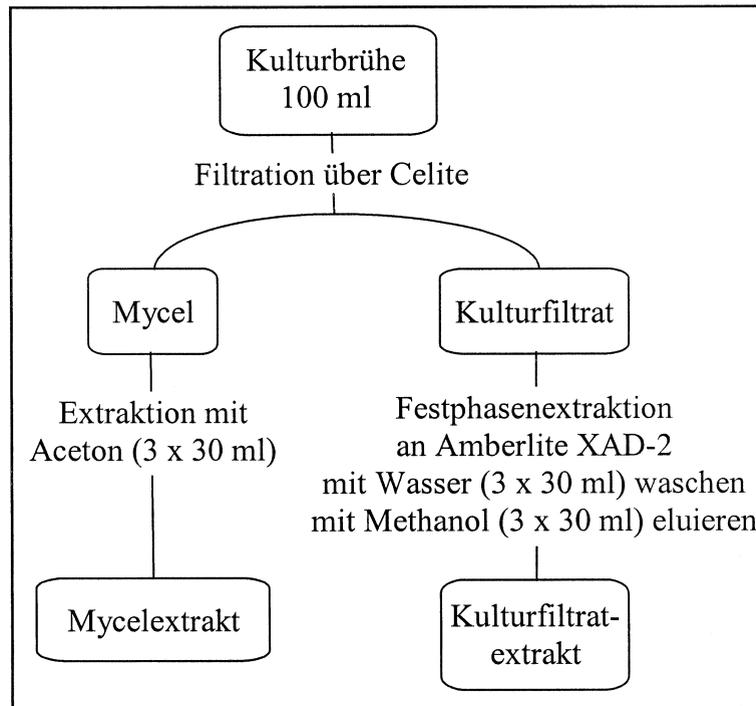


Abbildung 1: Aufarbeitung der Kulturbrühen nach der Festphasen-Extraktionsmethode

2.2. Probenvorbereitung und Vermessung

Die Extrakte wurden in 1 ml Methanol/Wasser (9:1) gelöst, filtriert und die optische Dichte der Probe am UV-Spektrometer im Bereich von 230-300 nm durch Verdünnen auf 3.0 eingestellt. Die so vorbereitete Probe wurde dann im CD-Spektralpolarimeter von 210-400 nm vermessen.

2.3. Messergebnisse und Stammauswahl

Es wurden 192 Extrakte von 32 Stämmen im CD-Screening untersucht. 50 Extrakte von 20 Stämmen zeigten CD-Aktivität. Bei der Stammauswahl wurden zwei Kriterien berücksichtigt: Es sollten möglichst viele Absorptionsbanden auftreten, wobei besonders auf bisignate Signale geachtet wurde, und die Cotton-Effekte sollten möglichst intensiv sein.

Stamm	Medium	Extrakt	Cotton-Effekte [nm (ΔA)]	Bemerkung
K21/2	SM	My	281 (-39.2), 313 (22.6)	bisignat, intensiv
K21/5	SM	Kf	235 (6.1), 268 (-4.0)	bisignat
K22/1	SM	Kf	230 (+62.0), 312 (-12.4)	bisignat, intensiv
K22/8	SM	Kf	225 (16.0), 232 (16.9), 268 (-6.0),	bisignat
K23/4	Ha	My	233 (8.0), 249 (2.9), 280 (-22.9), 314 (14.7)	bisignat
K23/6	Ha	My	263 (1.6), 274 (3.7), 285 (5.5), 357 (1.6), 376 (2.2)	viele Cotton-Effekte
K23/7	Ha	My	241 (6.0), 320 (-4.7), 334 (-5.7), 353 (-4.8)	viele Cotton-Effekte
K23/10	Ha	Kf	253 (12.2), 269 (-18.6)	bisignat

Tabelle 1: Im CD-Screening ausgewählte Stämme mit Angabe der Extrakte, Cotton-Effekte und Bemerkungen zum CD-Spektrum

Die Ergebnisse des Stammes K21/2 konnten nicht reproduziert werden. Die Absorptionsbanden der Extrakte der Stämme K23/6 und K23/7 sind charakteristisch für Polyene³⁹. Da die Extrakte von Polyenproduzenten im UV-Spektrum die gleichen Absorptionsbanden zeigen und auch im biologischen Screening sehr auffällig sind, wurden diese Stämme bei der Bearbeitung zurückgestellt. Die Stämme K21/5 und K23/4 wurden zur Bearbeitung ausgewählt, da die Extrakte intensive bisignate Cotton-Effekte zeigten.

3. Isolierung und Charakterisierung der Substanzen aus dem CD-Screening

Die Kultivierung der ausgewählten Stämme erfolgte im 1 L-Maßstab unter den Standardbedingungen. Die Extrakte wurden mit Ethylacetat generiert. Man chromatographierte Rohprodukte an Kieselgel und überprüfte die Fraktionen auf CD-Aktivität. Fraktionen gleicher CD-Aktivität wurden vereinigt und an Sephadex LH-20 chromatographiert bis ein Reinstoff vorlag.

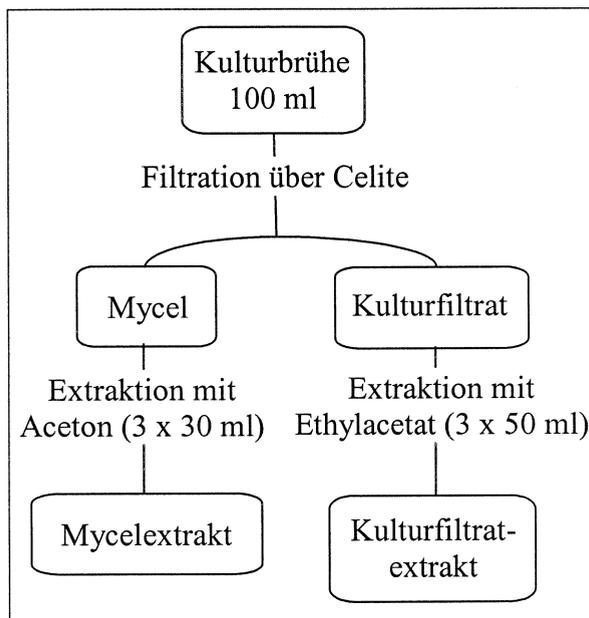


Abbildung 2: Aufarbeitungsschema der Ethylacetat-Extraktionsmethode

3.1. Streptazolin (6) aus dem Stamm K21/5

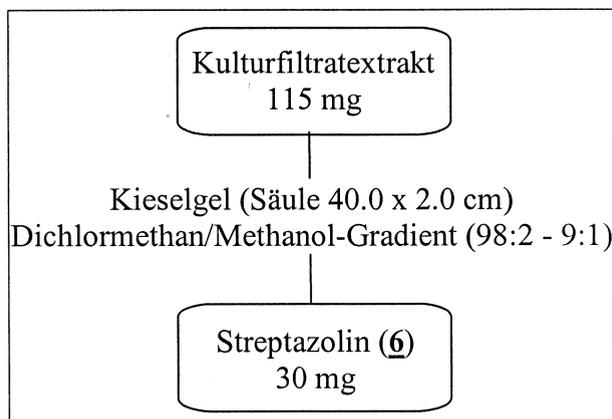


Abbildung 3: Isolierung von Streptazolin (6)

Der Stamm K21/5 wurde unter Standardbedingungen im 1 L-Maßstab kultiviert. Durch Extraktion des Kulturfiltrats mit Ethylacetat erhielt man 115 mg Extrakt. Dieser wurde durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol-Gradient, 98:2 – 5:1; Säule 40.0 × 2.0 cm) gereinigt und man erhielt 30 mg/L Streptazolin (6) als farbloses Öl.