



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Anwendung der Cellobiose Phosphorylase aus *Clostridium thermocellum* zur Herstellung neuer Hilfsstoffe

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Sabine Elvira Bogner
Matrikel-Nummer:	9600721
Studienrichtung:	Pharmazie (A 449)
Betreuer:	O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Wien, im November 2008

Diese Arbeit wurde am Department für Pharmazeutische Technologie & Biopharmazie unter der Betreuung von O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Vierstein, Studienprogrammleiter der Richtung PHARMAZIE und Vorstand des Departments durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein, Studienprogrammleiter der Richtung PHARMAZIE und Vorstand des Departments für Pharmazeutische Technologie & Biopharmazie, für die freundliche Aufnahme und Betreuung recht herzlich bedanken.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Frank Michael Unger, der mir während der Diplomarbeit immer wieder mit guten Ratschlägen zur Seite stand.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. Sharareh Salar-Behzadi, die sich immer sehr um mich bemühte, für die gute Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Mag. Borjana Lubura, die zu diesem Zeitpunkt ihre Dissertation an dem Department für Pharmazeutische Technologie & Biopharmazie begann, Herrn Mag. Yasser Saber und all den anderen KollegINNEN des Departments, deren Ratschläge mir immer weiter geholfen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meiner ehemaligen Chefin der Zielpunkt WarenhandelsgesmbH Frau Elvira Zafer, die mir möglichst freie Hand ließ über die Arbeitszeiteinteilung. So konnte ich trotz meines Arbeitsaufwandes so gut wie möglich meine Termine auf der Universität Wien wahrnehmen.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt all meinen Freunden für ihre liebe Unterstützung und schließlich bedanke ich mich auch noch bei meinem Freund für die mitfühlenden Worte während meiner Studienzeit.

I Einleitung

1. Hilfsstoffe	7
1.1 Allgemeines über Hilfsstoffe in der Pharmazie	7
1.2 Die Bedeutsamkeit neuer Hilfsstoffe	7
2. Clostridium thermocellum	8
2.1 Allgemeines zur Gattung Clostridium	8
2.2 Clostridium thermocellum	9
2.2.1 Cellobiose Phosphorylase	9
3. Ziel der Arbeit	11

II Materialien und Methoden

1. Materialien	12
1.1 Materialienliste	12
1.2 Chemikalienliste	13
1.3 Materialien in der Bakterienzüchtung	14
1.3.1 Cellulose	14
1.3.1.1 Mikrokristalline Cellulose (Avicel®)	14
1.3.2 Cellobiose	15
1.3.3 OXOID Anerogen® und seine Anwendung	15
1.4 Geräteliste	16
2. Methoden	17
2.1 Allgemeine Methoden	17
2.1.1 Vorbereitung glycerinhaltiger Cl.thermocellum für Langzeitlagerung	17
2.1.2 Bakterienzucht	17
2.1.2.1 Herstellung des Nährmediums	17
2.1.2.2 Beimpfung des Nährmediums	18
2.1.2.3 Inkubation	19
2.1.3 Bakterienernte	19
2.1.3.1 Abtrennung des Nährmediums	19
2.1.3.2 Aufbewahrung	19

	Seite
2.1.4 Enzymextraktion	20
2.1.4.1 Aufkonzentrierung des Enzymrohextraktes ..	20
2.2 Optimierung des Wachstums	22
2.2.1 Proteinbestimmung nach der Biuret Methode	23
2.2.1.1 Prinzip der Biuret Methode	23
2.2.1.2 Durchführung	23
2.2.2 Überprüfung des Bestandes von aktivem Enzym im Bakterien – Rohextrakt mittels Dünnschichtchromatographie	
2.2.2.1 Prinzip der Dünnschichtchromatographie	24
2.2.2.2 Durchführung	25
2.3 Bestimmung der Enzymaktivität im Enzymrohextrakt	27
2.3.1 Prinzip des D – Glucose Testkits	27
2.3.2 Durchführung der Bestimmung der Enzymaktivität des Rohextraktes	30
2.4 Gefriertrocknung des Enzymrohextraktes	30
2.4.1 Prinzip der Gefriertrocknung	30
2.4.2 Durchführung der Gefriertrocknung des Enzymrohextraktes	31
2.5 Enzymatische Synthese der 6-Azido-6-desoxy-cellobiose	32

III Ergebnisse und Diskussion

1. Ergebnisse und Diskussion	34
1.1 Optimierung des Wachstums	34
1.2. Bestimmung der Enzymaktivität im Enzymrohextrakt	43
1.3 Gefriertrocknung des Enzymrohextrakt	50
1.4 Enzymatische Synthese der 6-Azido-6-desoxy-cellobiose	51
2. Zusammenfassung	53

	Seite
Literaturverzeichnis	54
Abbildungsverzeichnis	57
Tabellenverzeichnis	59
Anhang	60
Lebenslauf	61

I Einleitung

1. Hilfsstoffe

1.1 Allgemeines über Hilfsstoffe in der Pharmazie

In der pharmazeutischen Technologie sind Hilfsstoffe definiert als Substanzen, die es ermöglichen, Arzneistoffe in eine entsprechende Zubereitungsform zu bringen, bzw. die folgenden Eigenschaften einer Arzneiform zu verbessern:

- Wirkung der Arzneistoffe
- Wirkungsregulierung, z.B. bei Depotarzneiformen
- äußere Eigenschaften
- Haltbarkeit
- Möglichkeit der Entwicklung neuartiger Zubereitungsarten [1]

Anforderungen an Hilfsstoffe:

- pharmakologisch indifferent
- gut verträglich
- mikrobiologische Reinheit
- geruch-, geschmack- und farblos
- einfach herstellbar

und

- keine Chargenvariationen [1,2]

1.2 Die Bedeutsamkeit neuer Hilfsstoffe

Während in der Natur eine Vielzahl saurer Polysaccharide wie Pektine, Alginate oder Xanthane vorkommen, kennt man zur Verwendung in der pharmazeutischen Technologie nur ein basisches Polysaccharid aus natürlichen Quellen: das Chitosan. Chitosan ist ein Aminopolysaccharid, das durch partielle Desacetylierung von Chitin gewonnen wird. Aufgrund der geeigneten Eigenschaften wie Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und physiko - chemische Stabilität ist das Interesse an Chitosan als Hilfsstoff in den letzten Jahren gestiegen [3-13]. Die Anwendung als Hilfsmittel für die Tablettierung wurde von Mir et al. untersucht [14]. Andere Forscher haben die mucoadhäsiven Eigenschaften des Chitosans genutzt um die pulmonare oder verzögerte

Freisetzung von Wirkstoffen mit niedrigerer oraler Bioverfügbarkeit gewährleisten zu können [15,16].

Das Problem sind jedoch die Chargenvariationen, denen das natürlich vorkommende Chitosan unterliegt. Es kann zwar durch alkalische Hydrolyse in technischen Mengen aus Schalentieren gewonnen werden, ist jedoch schwierig zu reinigen und zu verarbeiten. Aus diesem Grund richtet sich das Interesse auf alternative basische Polysaccharide, die durch enzymatische Polymerisation von Mono- oder Disaccharidbausteinen erhalten werden können. 6-Azido-6-desoxy-cellobiose ist ein bedeutsames Disaccharid in der Synthese neuer biomimetischer Aminopolysaccharide. In diesem Zusammenhang gewinnt das Enzym Cellobiose Phosphorylase eine besondere Bedeutung. Es katalysiert die reversible Phosphorylierung von Cellobiose zu α -D-Glucose-1-phosphat und D-Glucose. In Rahmen dieser Diplomarbeit wird die Funktion des Enzyms als Katalysator für die Synthese der 6-Azido-6-desoxy-cellobiose untersucht.

Eine wichtige Quelle für Cellobiose Phosphorylase ist der Proteinkomplex des Bakteriums *Clostridium thermocellum* [17-21].

2. Clostridium thermocellum

2.1 Allgemeines zur Gattung: Clostridium

Clostridien sind grampositive, stäbchenförmige Bakterien aus der Familie der Clostridiaceae, welche anaerob sind, d.h. nur unter Sauerstoffausschluss wachsen. Sie betreiben einen fermentativen Energiestoffwechsel und können hitzefeste Endosporen bilden. Diese Endosporen sind bei vielen Arten außerordentlich hitzeresistent und können in kochendem Wasser (100°C) einige Stunden überleben.

Clostridien bewegen sich, mit Ausnahme von *Cl. perfringens*, aktiv mit peritrich angeordneten Geißeln. Die Bakterien kommen überall vor, das heißt sie sind ubiquitär, besonders in Böden und im Verdauungstrakt von Menschen und Tieren.

Unter dem Aspekt ihrer bevorzugten Energiequelle können Clostridien in drei große Gruppen eingeteilt werden:

- Proteolytische Clostridien: Spaltung von Eiweißen und/oder paarweise Umsetzung von Aminosäuren

- Harnsäure-spaltende Clostridien, z. B. *Clostridium acidurici*
- Saccharolytische Clostridien: Vergärung von Kohlenhydraten (Zucker, Cellulose, Stärke)

Hauptgärungsprodukte der saccharolytischen Clostridien sind Buttersäure, Aceton, Butanol, Kohlenstoffdioxid und molekularer Wasserstoff (H₂).

Die meisten *Clostridium*-Arten verursachen keine Krankheiten, das heißt sie sind apathogen und zum Teil von biotechnischem Nutzen. Einige Arten sind jedoch gefährliche Krankheitserreger, vor allem aufgrund der von ihnen produzierten Toxine [22].

2.2 *Clostridium thermocellum*

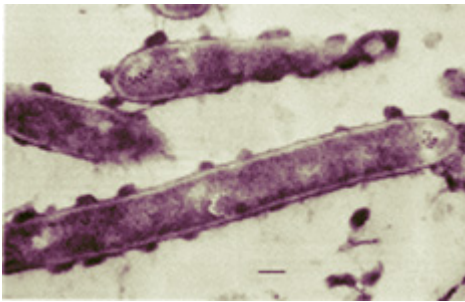


Abb.1 *Clostridium thermocellum*, Foto: Bayer, E. A. and R. L. Lamed

Clostridium thermocellum ist ein anaerober, thermophilier, saccharolytischer Organismus, der Cellulosesubstrate direkt in Ethanol vergären kann. Das Bakterium beinhaltet einen sehr komplizierten Proteinkomplex bestehend aus vielen verschiedenen katalytischen Untereinheiten, zu welchen die Cellobiose Phosphorylase zählt [23].

2.2.1 Cellobiose Phosphorylase

Cellobiose Phosphorylase katalysiert die reversible Phosphorylierung von Cellobiose zu α -D-Glucose-1-Phosphat und D-Glucose. Dies bewirkt eine Umkehrung der anomeren Konfiguration.

Anomere sind im Rahmen der Strukturen von Kohlenhydraten eine besondere Art von Isomeren, die sich nur in der Konfiguration am anomeren Zentrum unterscheiden. Sie können bei Kohlenhydraten und analogen Verbindungen in zyklischen Formen auftreten. Die Konfiguration am anomeren Zentrum wird

durch α und β beschrieben, wobei das α -Anomer jenes Isomer ist, bei dem die absolute Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms der Konfiguration des höchstbezahlten chiralen Zentrums entgegengesetzt ist. Diese Definition gilt sowohl für D- als auch für L-Zucker. Die Hydroxylgruppe des anomeren Zentrums ist in der Fischer-Projektion der D-Kohlenhydrate auf der gleichen Seite der Hauptkette wie die Hydroxylgruppe des Bezugsatoms. Folglich ist bei β -Anomeren die Hydroxylgruppe des Bezugsatoms der D-Kohlenhydrate auf entgegengesetzter Seite der Hauptkette [18].

3. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist einerseits die Gewinnung des Enzyms Cellobiose Phosphorylase aus *Clostridium thermocellum*. Andererseits wird die Funktionsfähigkeit des Enzyms als Katalysator zur Bildung neuer basischer Disaccharide untersucht.

In Rahmen der Enzymgewinnung wird eine Optimierung des Wachstums der Bakterien durchgeführt, was wiederum zu Erhöhung der Enzymausbeute führen soll. Weiters wird die Enzymaktivität des Enzymrohextraktes bestimmt.

II Materialien und Methoden

1. Materialien

1.1 Materialienliste

Anaerobiertöpfe, GasPak System, USA

Clostridium thermocellum, NCIMB, Scotland

D- Glucose Testkits, BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM, Deutschland

OXOID Anerogen[®], England

Parafilm, American Can Company, Greenwich, Ct., USA

Vivaspin, 20 ml Zentrifugalkonzentratoren, VivaScience Sartorius Group,
Deutschland

1.2 Chemikalienliste

- Cellobiose, Merck, Deutschland
- Cellulose (mikrokristalline Cellulose/Avicel) Merck, Deutschland
- D-Glucose, Merck, Deutschland
- Glucose-1-Phosphat, Sigma-Aldrich, Deutschland
- Hefeextrakt, Oxoid, England
- $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (Ammoniumsulfat), Merck, Deutschland
- KH_2PO_4 (Kaliumhydrogenphosphat), Merck, Deutschland
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 * 3 \text{H}_2\text{O}$ (Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat), Merck, Deutschland
- CuSO_4 (Kupfersulfat), Sigma-Aldrich, Deutschland
- $\text{MgCl} * 6 \text{H}_2\text{O}$ (Magnesiumchlorid-hexahydrat), Merck, Deutschland
- CaCl_2 (Calciumchlorid), Merck, Deutschland
- Resazurin 0,2%, ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{NO}_4$), Sigma-Aldrich, Deutschland
- Rinderserumalbumin, Sigma-Aldrich, Deutschland
- $\text{FeSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$ 5% (Eisensulfat-heptahydrat), Sigma-Aldrich, Deutschland

- L-Cystein * HCl (Cystein-hydrochlorid), Merck, Deutschland
- NaHCO_3 (Natriumbicarbonat), Merck, Deutschland
- NaOH (Natriumhydroxid-Plättchen), Merck, Deutschland
- Destilliertes Wasser, Department für Pharmazeutische Technologie & Biopharmazie Wien
- Glycerin, Merck, Deutschland
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 * 2\text{H}_2\text{O}$ (Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat), Riedel de Haën, Deutschland

1.3 Materialien in der Bakterienzüchtung

1.3.1 Cellulose

Die Cellulose (Summenformel: $(C_6H_{10}O_5)_n$), ist der Hauptbestandteil von pflanzlichen Zellwänden und damit die häufigste organische Verbindung der Erde. Sie ist deshalb auch das häufigste Polysaccharid. Sie ist ein unverzweigtes Polysaccharid, das aus mehreren hundert bis zehntausend β -D-Glucose-Molekülen ((1 \rightarrow 4) β -glykosidische Bindung) bzw. Cellobiose-Einheiten besteht.

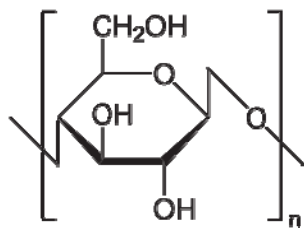


Abb. 2 Celluloseeinheit

Cellulose wird in der Plasmamembran gebildet und vernetzt sich untereinander zu fibrillären Strukturen. Die räumliche Anordnung der Cellulosefibrillen wird durch die Mikrotubuli gesteuert.

Sie ist in Wasser und in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich und kann durch starke Säuren gespalten werden. Mit konzentrierten Säuren bei erhöhter Temperatur kann die Cellulose zu Glucose abgebaut werden [24].

1.3.1.1 Mikrokristalline Cellulose (Avicel®)

Mikrokristalline Cellulose (MCC, MKZ, E 460 i, Avicel®) ist eine weiße, fließende Cellulose in Pulverform mit unterschiedlicher Körnung, die in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie verwendet wird.

MCC dient u. a. als unverdaulicher Ballaststoff für kalorienreduzierte Lebensmittel, als Trennmittel oder als Trägerstoff. Es wird aus verholzten Pflanzenteilen gewonnen. Hierbei wird die Pflanzen-Cellulose mit konz. HCl von nichtkristallinen Celluloseanteilen befreit [25].

1.3.2 Cellobiose

Die Cellobiose ist ein Disaccharid aus zwei Glucosemolekülen, welche β -1,4-glycosidisch miteinander verknüpft sind. Sie entsteht als Verdauungsprodukt der Herbivoren (Pflanzenfresser) aus Cellulose, deren Grundbaustein sie darstellt.

Cellobiose ist ein reduzierender Zucker, der sich leicht in polaren Lösungsmitteln wie Wasser und Ethanol löst. Das Disaccharid entsteht beim Abbau von Cellulose durch Cellulase-Enzyme als Zwischenprodukt und ist auch in verschiedenen Glycosiden enthalten.

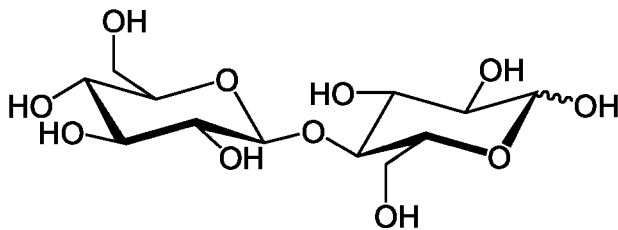


Abb. 3 Cellobiosemolekül

Dem Bakterium *Cl. thermocellum* dient die Cellobiose als Nahrungsquelle. Die meisten Bakterien, Pilze und höheren Lebewesen sind aufgrund fehlender Enzyme nicht in der Lage, Cellobiose in Glucose-Untereinheiten aufzuspalten [26].

1.3.3 OXOID AneroGen[®] Kit und seine Anwendung

Mit dem Oxiod AneroGen Kit können anaerobe Bedingungen zur Anzucht anspruchsvoller Anaerobier erzielt werden. Der AneroGen[®] Kit absorbiert im verschlossenen Anaerobiertopf innerhalb von 30 Minuten den vorhandenen atmosphärischen Sauerstoff unter 1% und entwickelt gleichzeitig Kohlendioxid (9-13%). Es wird bei der chemischen Reaktion kein Wasserstoff freigesetzt und somit kein Katalysator verwendet und die Zugabe von Wasser ist auch nicht notwendig. Ein AneroGen Kit[®] ist für ein Topfvolumen von 3,5 l geeignet.

1.4 Geräteliste

Autoklav des Typs 400, Varioclav, Deutschland

Lyophilisator (BETA 1-8 K), CHRIST, Österreich

Spektralphotometer (U-1100), HITACHI, Japan

Tischzentrifuge, Model Hermie Z 323 K, Deutschland

Trockenschrank, Memmert, Deutschland

Ultraschallwandler, Bandelin –Sonopuls Homogenisatoren HD 70, Deutschland

Zentrifuge Typ RC5C, Sorvall Instruments, USA

2. Methoden

2.1 Allgemeine Methoden

2.1.1 Vorbereitung glycerinhaltiger *Cl. thermocellum* für Langzeitlagerung

Zum Vorbereiten glycerinhaltiger *Cl. thermocellum*-Stämme werden 10 ml einer gezüchteten Bakterienkultur entnommen und abzentrifugiert. Das Präzipitat wird mit dem Phosphatpuffer pH 7,8 gut gewaschen (n=3). Nach jedem Reinigungsvorgang wird das Probenmaterial erneut zentrifugiert.

Das gereinigte Pellet wird danach mit 5,0 ml 20% (w/w) Glycerinlösung und 5,0 ml sterilem Nährmedium vermengt. Diese 10 ml werden aliquot zu je 1,0 ml in Cryoröhrchen übergeführt, welche danach in den Kühlschrank gestellt werden. Nach 30 Minuten Akklimatisierungszeit werden sie zur Langzeitlagerung bei -80°C tiefgefroren.

2.1.2 Bakterienzucht

2.1.2.1 Herstellung des Nährmediums

Nachstehend wird die Zusammensetzung des Nährmediums für *Cl. thermocellum* nach NCIMB beschrieben:

Cellobiose	12,00 g
Cellulose	10,00 g
Hefeextrakt	2,00 g
(NH ₄)SO ₄	1,30 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	2,90 g
MgCl * 6 H ₂ O	1,00 g
CaCl ₂	0,15 g
Resazurin 0,2%	1,00 ml
FeSO ₄ * 7 H ₂ O 5%	25,00 µl
Destilliertes Wasser	1 l

Weitere Anleitung:

- pH-Einstellung auf 7,8 mit NaOH
- Autoklavieren bei 121°C für 15 min
- 5 ml/100 ml Nährlösungszusatz

Nährlösung:

L-Cystein * HCl	0,5g
NaHCO ₃	5,0g
Destilliertes Wasser	50,00ml

Die einzelnen Komponenten werden genau eingewogen und in 1l dest. H₂O gelöst. Die Resazurinlösung (0,2%) dient der Sauerstoffanzeige, welche sich bei Sauerstoffzutritt von beige bis gelb nach violett bis rot verfärbt.

Danach erfolgt die genaue Einstellung auf pH 7,8 mittels NaOH. Wandert der pH-Wert zu weit ins alkalische Milieu, ist eine Gegensteuerung mittels Zitronensäure möglich. Das Nährmedium wird im Autoklaven bei 121°C für 15 min sterilisiert. Anschließend wird die frisch bereitete Nährlösung filtriert und zum abgekühlten Nährmedium gegeben.



Abb. 4 Autoklav

2.1.2.2 Beimpfen des Nährmediums

Der glycerinhaltige tiefgefrorene Bakterienstamm wird bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und mit Vortex resuspendiert. 2 ml/l werden dem Nährmedium zugegeben.

2.1.2.3 Inkubation

Das beimpfte Nährmedium wird unter anaeroben Bedingungen bei $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ für 4 Tage inkubiert. Um den Sauerstoffausschluß zu gewährleisten, wird es zusammen mit einem AneroGen[®] Kit, wie in Kapitel II.1.3.3 geschrieben, in einen Anaerobiotopf gestellt.

Am 4. Tag der Wachstumsperiode wird das Bakterienmaterial geerntet und abzentrifugiert, wodurch es von der Nährlösung getrennt wird.

2.1.3 Bakterienernte

2.1.3.1 Abtrennung des Nährmediums

Die Bakteriensuspension wird in 4°C bei 10 000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Bei 4°C kommt das Bakterienwachstum zum Stillstand und unter weiterem Sauerstoffausschluß bleiben die Clostridien lebensfähig.



Abb. 5 Zentrifugenrotor mit Tuben

Nach dem abgeschlossenen Trennvorgang wird das Präzipitat noch dreimal mit 0,1 M Phosphatpufferlösung pH 7,8 gewaschen und anschließend in 4°C bei 10000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

2.1.3.2 Aufbewahrung

Das gewaschene Zellenmaterial wird gesammelt und zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren bei $- 20^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.1.4 Enzymextraktion

200 g der Pellets werden mit 50 bis 100 ml dest. Wasser, je nach Konsistenz, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und suspendiert. Die Suspension wird 5 mal 20 sec den Ultraschallwellen eines Ultrasonic Stabes (Ultraschallwandler) ausgesetzt (siehe Abb. 7), wodurch die Zellmembranen der Bakterien zerstört werden und die Proteinkomplexe zur weiteren Aufkonzentrierung frei werden.

Abb. 6 und 7 zeigen den Ultraschallwandler und den Vorgang des Verfahrens



Abb. 6 Ultraschallwandler



Abb. 7 Vorgang der Enzymextraktion

Nach der Zellwandzerstörung wird die Suspension erneut bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert um das Zellenmaterial abzutrennen, welches nicht mehr benötigt wird. Das Enzym Cellobiose Phosphorylase befindet sich nun im Überstand, welcher somit Enzymrohextrakt genannt wird.

Zur Kontrolle des Proteingehaltes im Enzymrohextrakt wird die Bestimmung nach der Biuret Methode, siehe Kapitel II.2.2.1.2 durchgeführt.

2.1.4.1 Aufkonzentrierung des Enzymrohextrakts

Der Enzymrohextrakt wird mit Vivaspin 20 ml (Füllvolumen) Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert. Das Füllvolumen beträgt jedoch nur 15 ml um ein besseres Ergebnis während der Zentrifugierung zu erzielen.

Kennzeichnend für Vivaspin 20 sind die vertikal eingebauten Zwillingsmembranen, die Filtrationsgeschwindigkeiten und Aufkonzentrierungen

auf das mehr als 100-fache ermöglichen. Das Restvolumen lässt sich leicht an der seitlich am Konzentrator aufgedruckten Skala ablesen [27].



Abb. 8 VIVASPIN 20-Membranfilter

Der Enzymrohextrakt wird bei 6000 rpm 30 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wird wieder der Proteingehalt nach Biuret bestimmt und zusätzlich wird eine Inkubation mit Cellobiose durchgeführt um den Bestand des aktiven Enzyms mittels Dünnschichtchromatographie nachzuweisen.

Danach wird der aufkonzentrierte Enzymrohextrakt gesammelt und wieder zur weiteren Verarbeitung bei -20°C tiefgefroren.

2.2 Optimierung des Wachstums

Zur Erzielung einer höheren Bakterienausbeute wird zuerst der Einfluss der Zusammensetzung des Nährmediums auf das Wachstum der Bakterien untersucht. Die empfohlene Nährmediumszusammensetzung der Firma NCIMB für *Clostridium thermocellum* (siehe Kapitel II.2.1.2.1) wird anhand des Verhältnisses zwischen Cellobiose und Cellulose variiert. Die Zusammensetzung der anderen Komponenten des Mediums bleibt konstant. Tabelle 1 zeigt die verwendeten Verhältnisse zwischen Cellulose und Cellobiose in Nährmedium.

Probennummer	Cellulose	Cellobiose	Verhältnis	Bemerkungen
A	10,0 g/l	2,0 g/l	5:1	Standardmedium der Firma NCIMB für <i>Cl. thermocellum</i>
B	12,0 g/l	0,0 g/l	1:0	
C	6,0 g/l	6,0 g/l	1:1	
D	3,0 g/l	9,0 g/l	1:3	
E	2,0 g/l	10,0 g/l	1:5	
F	1,0 g/l	11,0 g/l	1:11	
G	0,0 g/l	12,0 g/l	0:1	

Tab. 1 Die variierten Verhältnisse zwischen Cellulose und Cellobiose des Nährmediums für *Cl. thermocellum*

Es werden jeweils 200 ml Nährmedium mit den oben genannten Cellulose: Cellobiose Verhältnissen vorbereitet und bei 121°C für 15 min autoklaviert. Die Nährmedia werden mit 2,0 ml Bakterien beimpft und bei 60°C unter anaeroben Bedingungen gezüchtet. Um das Wachstum der Bakterien zu kontrollieren, wird mit 24-stündigen Intervallen pro Medium 7,0 ml Probe gezogen und der Proteingehalt der Bakterien nach Biuret bestimmt. Weiters wird nach 4 Tagen Züchtung der Gehalt an aktivem Enzym „Cellobiose Phosphorylase“ im Rohextrakt mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

2.2.1 Proteinbestimmung nach der Biuret Methode

2.2.1.1 Prinzip der Biuret Methode

Säureamide, wie z.B. Biuret (Carbamoylharnstoff), Peptide und Proteine bilden mit Kupfer(II)-Salzen in alkalischer Lösung intensiv rotviolett gefärbte, anionische Chelatkomplexe mit Cu^{2+} als Zentralatom und einem Absorptionsmaximum zwischen 540 und 560 nm. Voraussetzung für diese Komplexbildung ist das Vorhandensein von mindestens zwei Säureamidgruppen oder Peptidbindungen. Zahlreiche andere Chelatbildner reagieren ebenfalls mit Cu^{2+} -Ionen, bilden aber blaue Komplexe, deren Farbqualität weitgehend der einer wäßrigen Kupfer(II)-Salzlösung entspricht.

Für die Bestimmung des Gesamtproteins ganzer Zellen wird die Biuretmethode nach Robinson und Hogden (1940), modifiziert von Stickland (1951) bevorzugt. Bei dieser Methode arbeitet man mit einem großen Kupfersulfatüberschuß und ohne Zusatz eines weiteren Chelatbildners. Letzteres hat den Vorteil, dass der Leeransatz fast farblos ist und die Farbintensität des gebildeten Kupfer-Protein-Komplexes über einen relativ weiten Bereich streng proportional zur Proteinkonzentration ist [28].

2.2.1.2 Durchführung

Die oben genannten Proben 1-7 werden zentrifugiert. Das Zellmaterial (Sediment) wird in einem Reagenzglas auf 2,0 ml dest. Wasser versetzt und durch Vortex resuspendiert. Zwei Zentrifugenröhrchen gefüllt mit jeweils 2,0 ml dest. Wasser werden für den Reagenzienleerwert vorbereitet.

In jedes Röhrchen werden nun 1,0 ml 3 M NaOH pipettiert. Gut verschlossen werden sie für 5 min in ein Wasserbad (100 ± 2 °C) gestellt. Anschließend werden sie in kaltem Wasser rasch abgekühlt. Nach Zugabe von 1,0 ml 2,5%iger Kupfersulfatlösung in jedes Röhrchen werden die Proben gut verschlossen und kräftig geschüttelt.

Die Ansätze werden 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dieser Reaktionszeit werden die Tuben in einer Tischzentrifuge 10 min bei 4°C und 6000 rpm zentrifugiert. Der Rückstand bestehend aus dem ausgefallenen hellblauen, flockigen Kupfer(II)-hydroxid und etwaigen unlöslichen Zellbestandteilen wird entfernt. Die Extinktion des klaren Überstands wird in einem Spektrophotometer bei 546 nm gegen den Leeransatz gemessen [28].

Erstellen der Eichkurve:

80,0 mg Rinderserumalbumin werden in 20,0 ml dest. Wasser gelöst. Genau abgemessene Mengen der Albuminlösung werden gemäß folgendem Schema in leere Zentrifugenröhrchen pipettiert, jeweils 2 Röhrchen pro Proteinkonzentration. Mit destilliertem Wasser wird auf genau 2,0 ml aufgefüllt.

Albuminlösung (ml)	0,2	0,5	1,0	1,5	2
dest. Wasser (ml)	1,8	1,5	1,0	0,5	0
mg Protein/2 ml	0,8	2,0	4,0	6,0	8,0

Tab. 2 Verdünnungsreihe für die Erstellung der Eichkurve für Proteingehaltbestimmung mittels Biuret Methode

Mit den Albuminansätzen wird in derselben Weise wie mit den Probenansätzen die Proteinbestimmung durchgeführt [28].

2.2.2 Überprüfung des Bestands vom aktiven Enzym im Bakterien-Rohextrakt mittels Dünnschichtchromatographie

2.2.2.1 Prinzip der Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatografie (DC) dient zur Trennung sowie zur qualitativen und quantitativen Analyse von Substanzen. Als stationäre Phase dienen Feststoffe oder an Feststoffe adsorbierte Flüssigkeiten, als mobile Phase werden Flüssigkeiten verwendet. Die Trennung erfolgt je nach stationärer Phase durch Adsorption oder Verteilung. Die stationäre Phase (Sorbens) wird als dünne Schicht auf einen Träger aufgebracht (Dünnschichtplatten, Standart: 5x10 cm). Als Plattengrund (Träger) werden Glasplatten oder Folien angeboten. Als Schichtmaterial für die stationäre Phase bei der Dünnschichtchromatographie werden hauptsächlich Aluminiumoxid und Kieselgel verwendet. Die zu untersuchende Substanz wird als Lösung auf eine Zone am unteren Rand der Platte aufgetragen (Start, Startpunkte) und die Platte in einen Trog (Entwicklungskammer) gestellt, der die mobile Phase (Fließmittel) enthält. Die DC-Platte wird im Allgemeinen nach dem aufsteigenden Verfahren entwickelt, das heißt die DC-Platte wird so in die Entwicklungskammer gestellt, dass das Lösungsmittel die DC-Schicht unterhalb der Startlinie benetzt. Das Lösungsmittel

steigt auf Grund von Kapillarkräften und transportiert das zu trennende Stoffgemisch.

Nach der Entwicklung wird die DC-Platte aus der Kammer genommen, getrocknet und die getrennten Substanzen nachgewiesen (detektiert). Zum Detektieren wird die DC-Platte mit einem geeigneten Sprühreagenz besprüht. Das Sprühen sollte unter einem gut ziehenden Abzug zum Abführen der giftigen oder aggressiven Reagenznebel und Lösungsmitteldämpfe erfolgen. Nach dem Aufbringen des Sprühreagenzes wird das Chromatogramm auf einer Heizplatte erhitzt, um die Reaktion zu beschleunigen. Nach dem Sichtbarmachen ist es sinnvoll, die Flecken sofort zu kennzeichnen, denn sie können verblassen oder ihre Farbe verändern [29,30]. Danach wird die DC mit Hilfe des R_F -Wertes ausgewertet.

$$R_f = \frac{S}{L} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Wobei:

S= Abstand Startlinie – Substanzfleck

L= Abstand Startlinie – Laufmittelfront

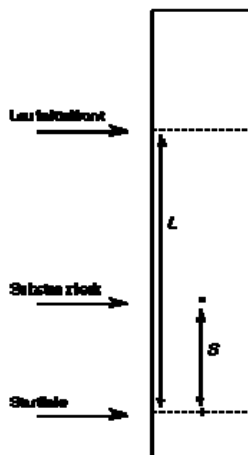
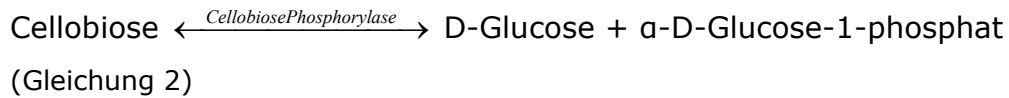


Abb. 9 Schematische Darstellung einer DC-Platte

2.2.2.2 Durchführung

Nach 4-tägiger Züchtung und Ernte der Bakterien in oben genannten Nährmedia werden 2,0 ml des Enzymrohextraktes mit 1,2 ml 0,1 M Cellobioselösung in 0,8 ml Phosphatpuffer (pH 7,2±0,2) inkubiert. Nach einer Bebrütungszeit von 12h bei 37°C wird die Suspension mittels Dünnschichtchromatographie anhand der

folgenden Reaktion nach D-Glucose und α -D-Glucose-1-phosphat qualitativ untersucht:



Für die Untersuchung der Rückreaktion werden 2,0 ml Rohextrakt mit 1,2 ml 0,076 M α -D-Glucose-1-Phosphatlösung und 0,8 ml 0,1 M D-Glucoselösung in 4,0 ml Tris-Puffer (pH $7,2 \pm 0,2$) bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach der erfolgten Bebrütungszeit von 12h wird der Bestand der Cellobiose mittels Dünnschichtchromatographie identifiziert.

Die Rückreaktion wird im Tris-Puffer (pH $7,2 \pm 0,2$) durchgeführt um die zusätzliche Phosphatzufuhr zu vermeiden. Das Enzym Cellobiose Phosphorylase soll mit der α -D-Glucose-1-phosphatlösung reagieren und nicht mit dem Phosphatpuffer. Daraus resultiert die enzymatische Synthese der Cellobiose.

Standardlösungen für die Dünnschichtchromatographie - Hinreaktion

0,1 M Cellobiose	0,342 g/10ml H ₂ O
Phosphat-Puffer pH 7,2	(3,65gNaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O + 13,63gNa ₂ HPO ₄ *2H ₂ O)/l

Standardlösungen für die Dünnschichtchromatographie – Rückreaktion

0,1 M D-Glucose	0,198 g/10ml
0,076 M α -D-Glucose-1-phosphat	0,286 g/10ml
Tris-Puffer pH 7,2	1,20 g/10ml

Fließmittelverhältnis

1-Propanol 99,5% : dest. Wasser = 17 : 3

Sprühreagenz

Anisaldehyd-Reagenz R1 nach EuAB 5.8:

Anisaldehyd	10 ml
Ethanol 96% [v/v]	90 ml
Konz. H ₂ SO ₄	10 ml

Da die Anwendung des modifizierten Nährmediums mit dem Verhältnis 1:1 zwischen Cellobiose und Cellulose den höchsten Proteingehalt der Bakterienzucht geliefert hat, wird dieses Nährmedium für weitere Versuche verwendet.

2.3 Bestimmung der Enzymaktivität im Enzymrohextrakt

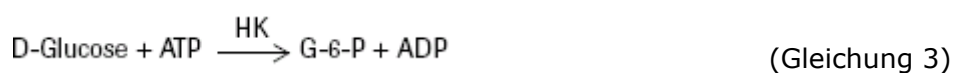
Der Begriff Enzymaktivität (U) bezeichnet die Menge des Enzyms, die 1 μmol Substrat pro Minute umsetzt.

Die Anzahl der Einheiten (U) des Enzyms pro mg des Proteins werden als spezifische Aktivität des Enzyms bezeichnet.

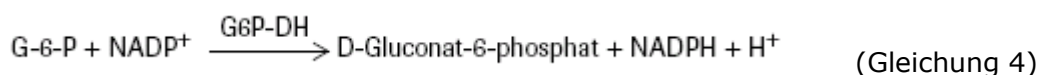
Um die Enzymaktivität bzw. spezifische Aktivität des Enzyms im Rohextrakt zu bestimmen, wird das Enzymrohextrakt mit Cellobiose inkubiert und die Menge an umgesetzter Glucose bestimmt. Die Bestimmung wird mittels eines D-Glucose Testkits durchgeführt.

2.3.1 Prinzip des D-Glucose Testkits

D-Glucose wird durch das Enzym Hexokinase (HK) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) phosphoryliert.



In Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wird G-6-P von Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert. Es entsteht reduziertes Nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat (NADPH).



Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Glucose-Menge äquivalent. NADPH ist somit die Messgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 340/365 nm bestimmt.

Inhalt der Testkombination:

- Drei Flaschen der Nr.1 mit je ca. 7,2 g Pulvergemisch, zusammengesetzt aus Triethanolamin-Puffer, pH ca. 7,6; NADP, ca. 110 mg; ATP, ca. 260 mg und Magnesiumsulfat
- Drei Flaschen der Nr.2 mit je ca. 1,1 ml Suspension, zusammengesetzt aus Hexokinase, ca. 320 U; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, ca.160 U
- Flasche Nr.3 mit D-Glucose-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle

Herstellung der Lösungen:

- Der Inhalt einer Flasche Nr.1 wird mit 45 ml bidest. Wasser gelöst
- Der Inhalt einer Flasche 2 wird unverdünnt verwendet

Stabilität der Reagenzien:

Der Inhalt der Flaschen 1 ist stabil bei 2-8°. Die Lösung 1 ist bei 2-8°C 4 Wochen, bei -15 bis -25°C 2 Monate haltbar und vor Gebrauch muss sie auf 20-25°C gebracht werden. Der Inhalt der Flaschen 2 ist stabil bei 2-8°C.

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: 340 nm

Glasküvette: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 3,020 ml

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser

in Küvette pipettieren	LW	Probe
Lösung Nr.1	0,500 ml	0,500 ml
Probelösung	0	0,050 ml
bidest. Wasser	1,000 ml	0,800 ml

Tab. 3 Der Pipettiervorgang der Probenvorbereitung für die Glucosebestimmung

Danach wird die Gesamtlösung gut durchgemischt und nach ca. 3 min werden die Extinktionen der Lösungen gemessen (E1).

Die enzymatische Reaktion startet durch die Zugabe der Suspension Nr.2. Es werden hier für 0,020 ml dazugegeben, wieder gemischt und der Stillstand der Reaktion abgewartet (ca. 10-15 min). Danach werden wieder die Extinktionen der Lösungen gemessen (E2).

Falls die Reaktion nach 15 min nicht zum Stillstand gekommen ist, die Extinktionen weiter in bestimmter min-Abständen messen, bis eine konstante Extinktionszunahme erreicht wird.

Wurden bei E2 konstante Extinktionszunahmen festgestellt, werden die Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von Suspension 2 (HK/G6P-DH) extrapoliert.

Für den Leerwert und Probe werden nun die Extinktionsdifferenzen (E2-E1) berechnet, indem die Extinktionsdifferenz des Leerwerts von der Extinktionsdifferenz der Probe abgezogen wird.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Berechnung:

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]} \quad (\text{Gleichung 6})$$

V ... Testvolumen [ml]

v ... Probevolumen [ml]

MG ... Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d ... Schichtdicke [cm]

e ... Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm = 6,3 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

Hieraus ergibt sich als Konzentration für D-Glucose:

$$c = \frac{3,020 \times 180,16}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{D-Glucose}} = \frac{5,441}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{D-Glucose}} \text{ [g D-Glucose/l Probelösung]} \quad (\text{Gleichung 7})$$

Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

2.3.2 Durchführung der Bestimmung der Enzymaktivität des Rohextraktes

Das Enzymrohextrakt wird wie im Kapitel II.2.1.4 beschrieben vorbereitet und der Proteingehalt mittels Biuret Methode bestimmt. Anschließend werden 3 ml des Rohextraktes mit 1,2 ml 0,1 M Cellobiose-Lösung in 2,8 ml Phosphat - Puffer pH 7,2 inkubiert. In Intervallen von 15 Minuten werden 50 µl Probe gezogen und wie in Tabelle 3 beschrieben vorbereitet, spektralphotometrisch vermessen und die umgesetzte Glucose bestimmt. Parallel wird die Umsetzung der Cellobiose zu Glucose-1-Phosphat und D-Glucose mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen.

2.4 Gefriertrocknung des Enzymrohextrakts

2.4.1 Prinzip der Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung, auch als Lyophilisation oder Sublimationstrocknung bezeichnet, ist ein Verfahren zur schonenden Trocknung durch geringere Trocknungstemperaturen hochwertiger Produkte darunter Proteine. Bei der Gefriertrocknung sublimieren die Eiskristalle direkt ohne den Übergang in den flüssigen Zustand.

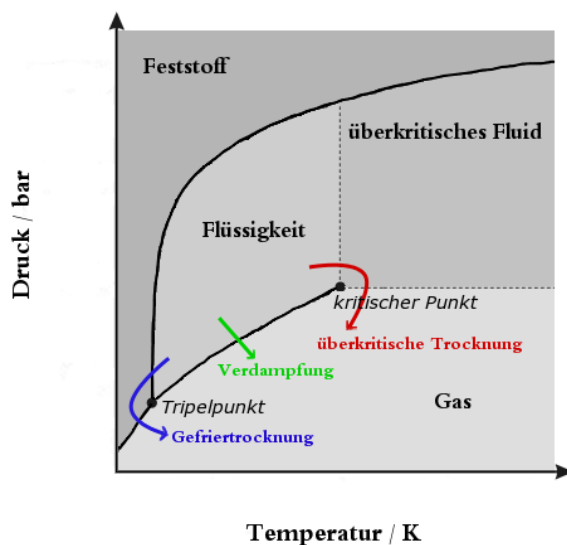


Abb. 10 Diagramm zur Veranschaulichung verschiedener Trocknungsprozesse

Eine Gefriertrocknungsanlage besteht aus zwei Kammern, die durch eine Klappe getrennt sind. Die tiefgefrorene Probe wird in der ersten Kammer auf einer beheiz- oder kühlbaren Stellfläche (Horden) gestellt. In der zweiten Kammer ist eine Rohrschlange eingebaut, die von einer kalten Sole oder einem Kältemittel durchströmt wird. Eine Vakuumpumpe evakuiert zuerst das System. Im weiteren Verlauf des Trocknungsprozesses besteht die Atmosphäre in den Kammern fast ausschließlich aus Wasserdampf, der sich als Eis auf den kalten Rohrschlangen des Kondensators niederschlägt. Der Druck in den Kammern entspricht dann dem Satttdampfdruck von Wasser bei der Kondensatortemperatur. Die Produktkammer wird im weiteren Prozessverlauf erwärmt um die Restfeuchtigkeit aus dem Produkt zu sublimieren. Für die Kühlung wird entweder ein Kälte­träger (z.B. Silikonöl) eingesetzt oder es erfolgt die direkte Beaufschlagung mit einem Kältemittel (typische KM sind Stickstoff oder Kohlenstoffdioxid). Die Temperaturen des Kondensators liegen typischerweise bei -60 °C bis -80 °C . Der Kondensator kann durch Wasserdampf abgetaut werden, nachdem die Verbindungsklappe geschlossen wurde. Die Gefriertrocknung ist ein Batchprozess, da die Produkte chargenweise getrocknet werden [32].



Abb. 11 Beispiel einer Vakuumsgefriertrocknungsanlage

2.4.2 Durchführung der Gefriertrocknung des Enzymrohextraktes

Da der Proteingehalt des Enzymrohextraktes bei der Lagerung in Raumtemperatur (25 °C) nicht nachweisbar ist, sowie bei 5 °C nach 4 Tagen extrem gesunken ist wird das Enzymrohextrakt gefriergetrocknet und bei 5 °C gelagert.

Der Vorgang ist folgender: Das aufkonzentrierte Rohextrakt wird zu aliquoten Teilen (10 ml) in Petrischalen aus Plastik übergeführt, mit Parafilm[®] verschlossen und tiefgefroren.

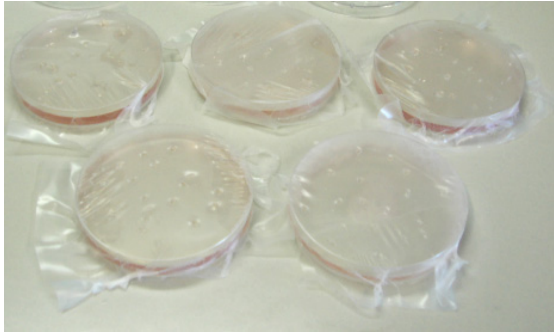


Abb. 12 Enzymrohextrakt in Petrischalen

Das tiefgefrorene Rohextrakt wird sodann in die Gefriertrocknungsanlage gegeben und für eine Dauer von 24-36 Stunden lyophilisiert. Das fertige Lyophilisat wird danach gekühlt bei +5°C aufbewahrt.

In Abständen von 30, 60 und 90 Tagen werden aliquote Mengen eingewogen, in dest. Wasser gelöst und deren Proteingehalt bestimmt.

2.5 Enzymatische Synthese der 6-Azido-6-desoxy-cellobiose

6-Azido-6-desoxy-cellobiose wird durch die Koppelung von Glucose-1-Phosphat mit 6-Azido-6-desoxy-Glucose gewonnen.

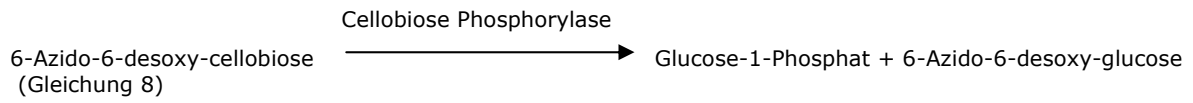
Um fest zu stellen, ob Cellobiose Phosphorylase die Reaktion katalysiert, wird das Enzymrohextrakt mit in folgender Tabelle (4) angeführten Reaktionspartnern enzymatisch 37°C für 12 Stunden inkubiert. Die Hin- und Rückreaktion werden dünnschichtchromatographisch nachgewiesen.

Substanz	Hinreaktion	Rückreaktion
0,1 M Cellobiose	1,2 ml	
Phosphatpuffer pH 7,2	0,8 ml	
Enzymrohextrakt	2,0 ml	2,0 ml
TRIS-Puffer pH 7,2		4,0 ml
0,076 M Glucose-1-P		1,2 ml
0,1 M Glucose-6-N3		0,8 ml

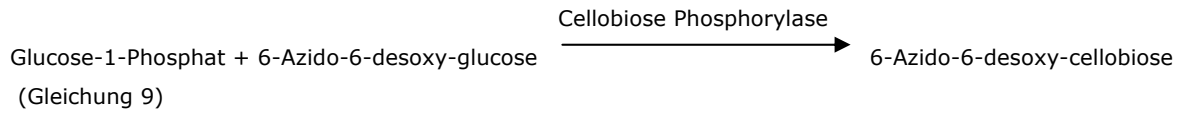
Tab. 4 Substanzangaben der Hin- und Rückreaktion

Reaktionsablauf:

- Hinreaktion:



- Rückreaktion:



III Ergebnisse und Diskussion

1. Ergebnisse und Diskussion

1.1 Optimierung des Wachstums

Wie im Kapitel II.2.2 beschrieben, werden die Verhältnisse der Nährmedia - Komponenten Cellulose und Cellobiose zur Optimierung der Wachstumsausbeute variiert.

Abbildungen 13-19 zeigen die Ausbeuten an, bezogen auf die Chargen A-G, nach 1, 2 und 3 Tagen.

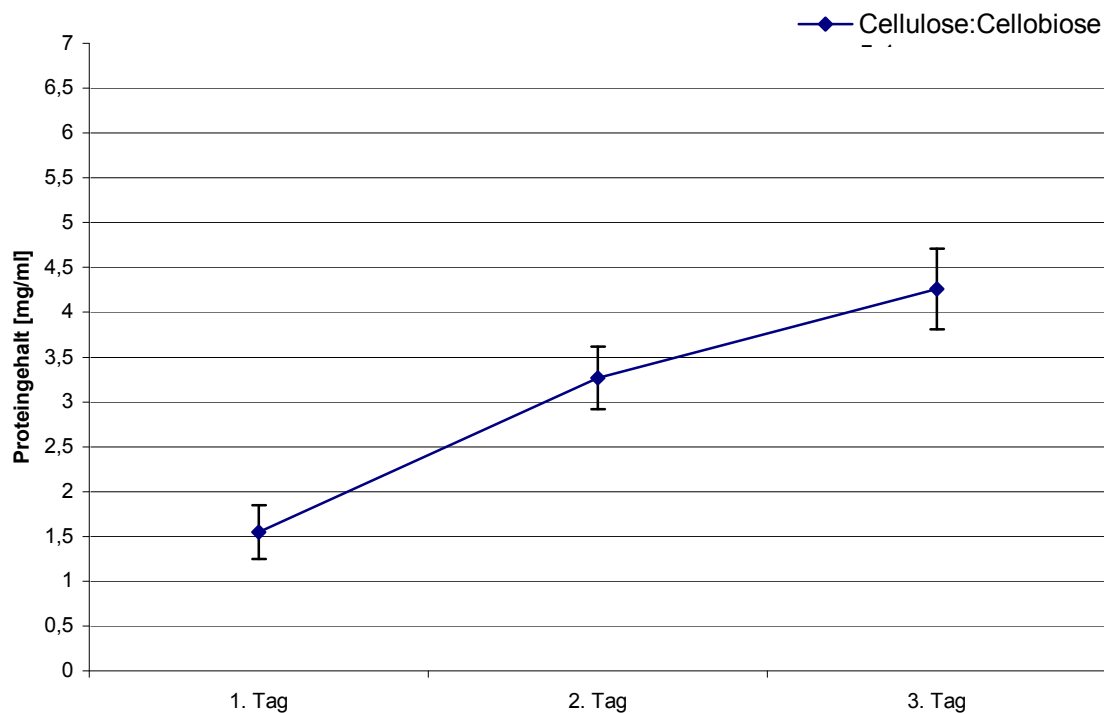


Abb. 13 Proteingehalt der Charge A, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 5:1

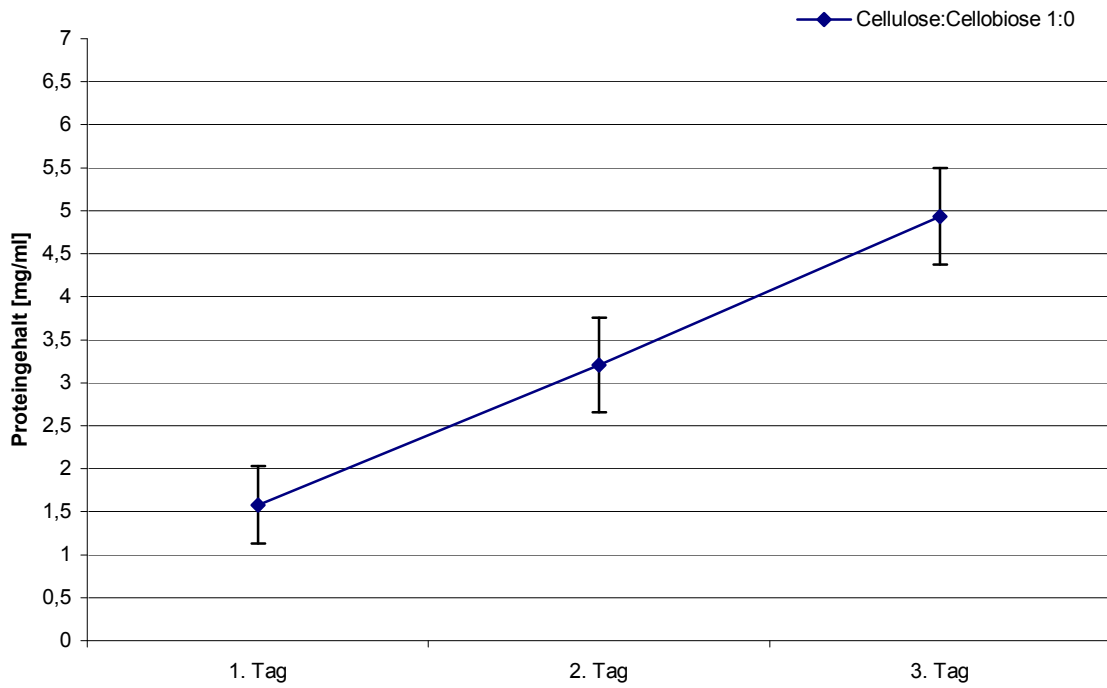


Abb. 14 Proteingehalt der Charge B, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 1:0

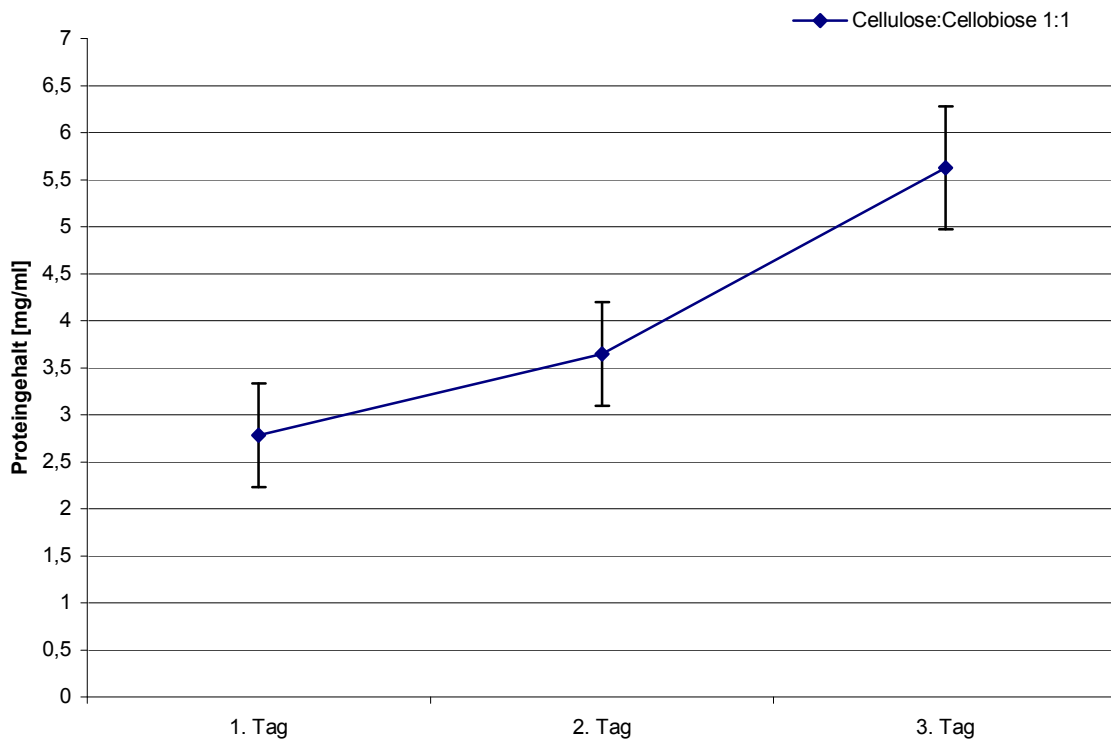


Abb. 15 Proteingehalt der Charge C, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 1:1

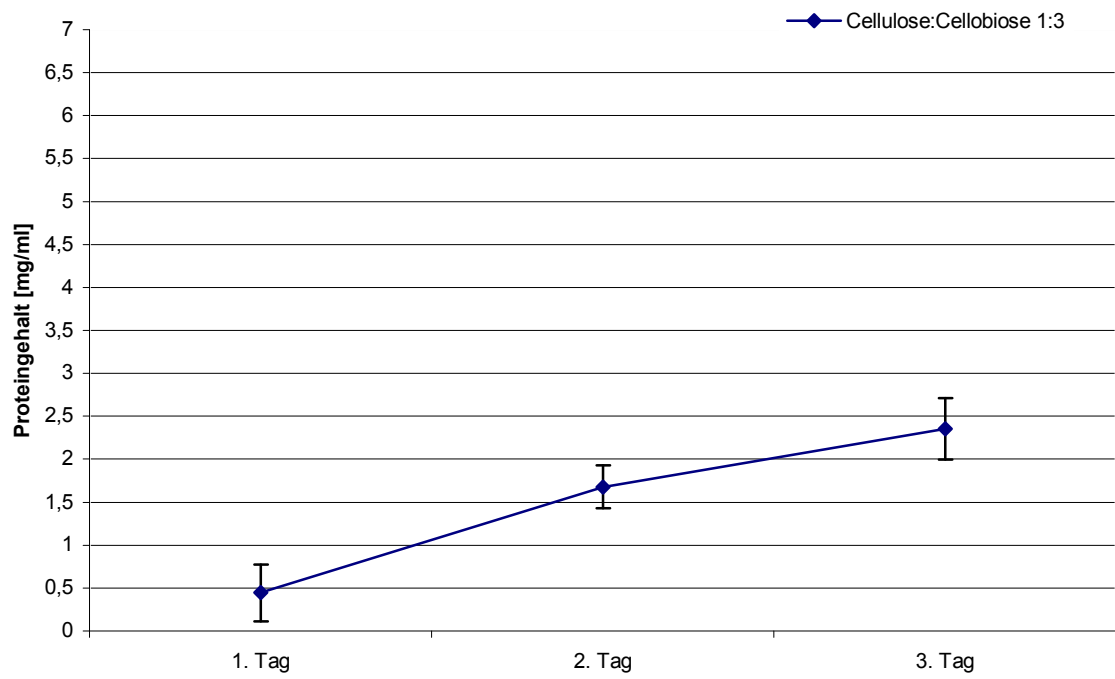


Abb. 16 Proteingehalt der Charge D, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 1:3

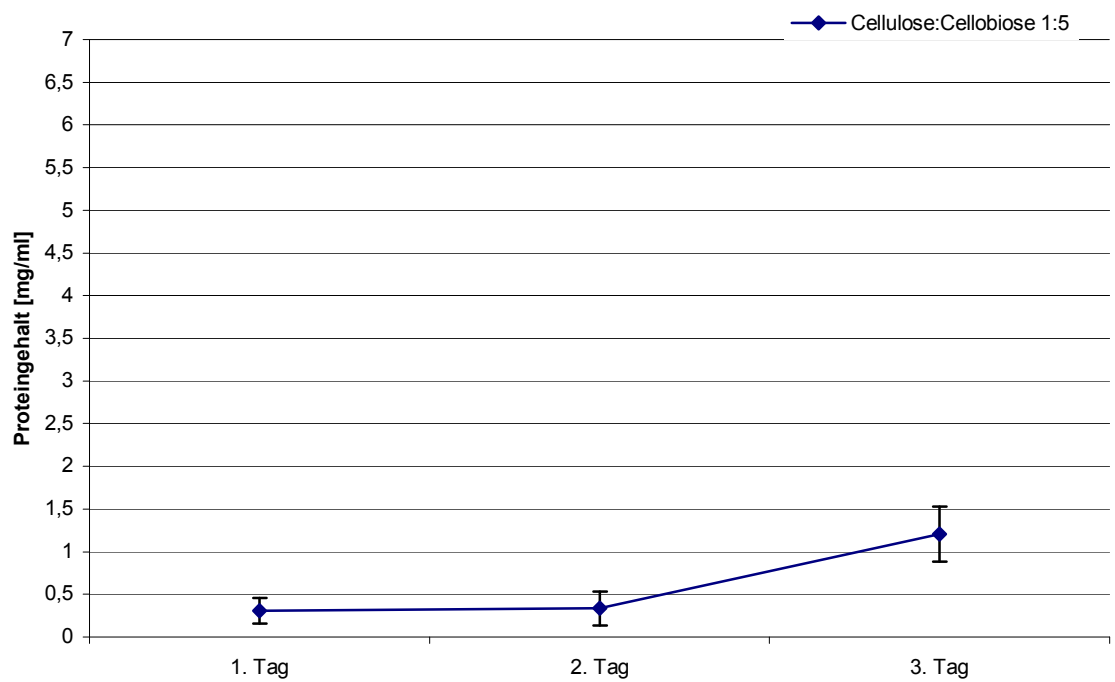


Abb. 17 Proteingehalt der Charge E, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 1:5

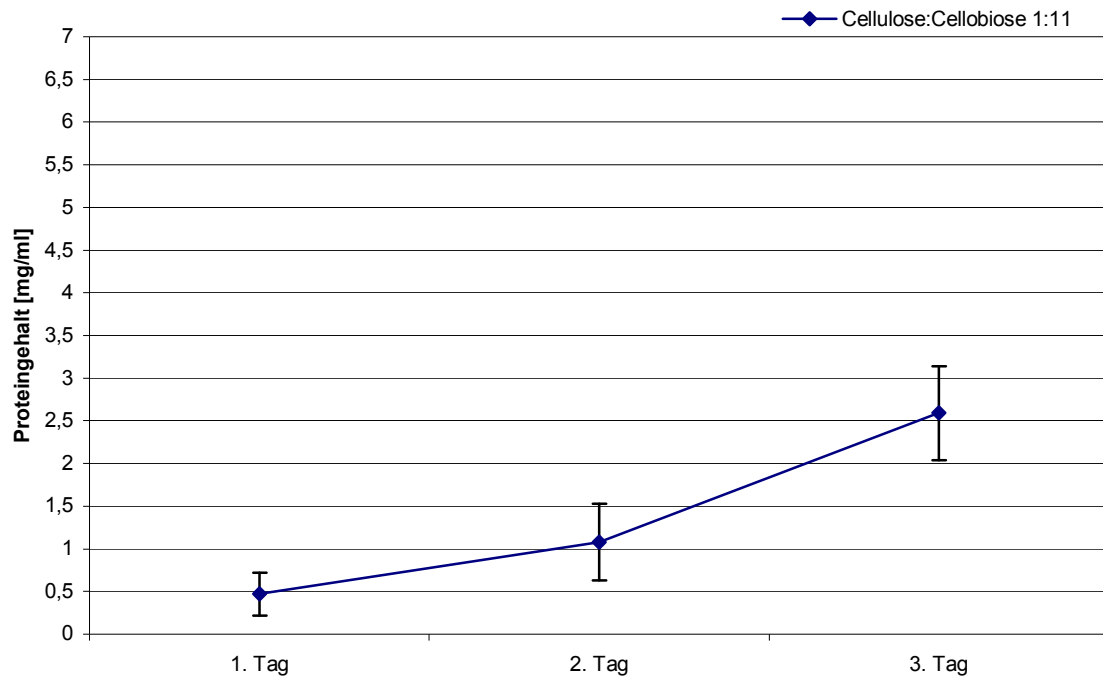


Abb. 18 Proteingehalt der Charge F, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 1:11

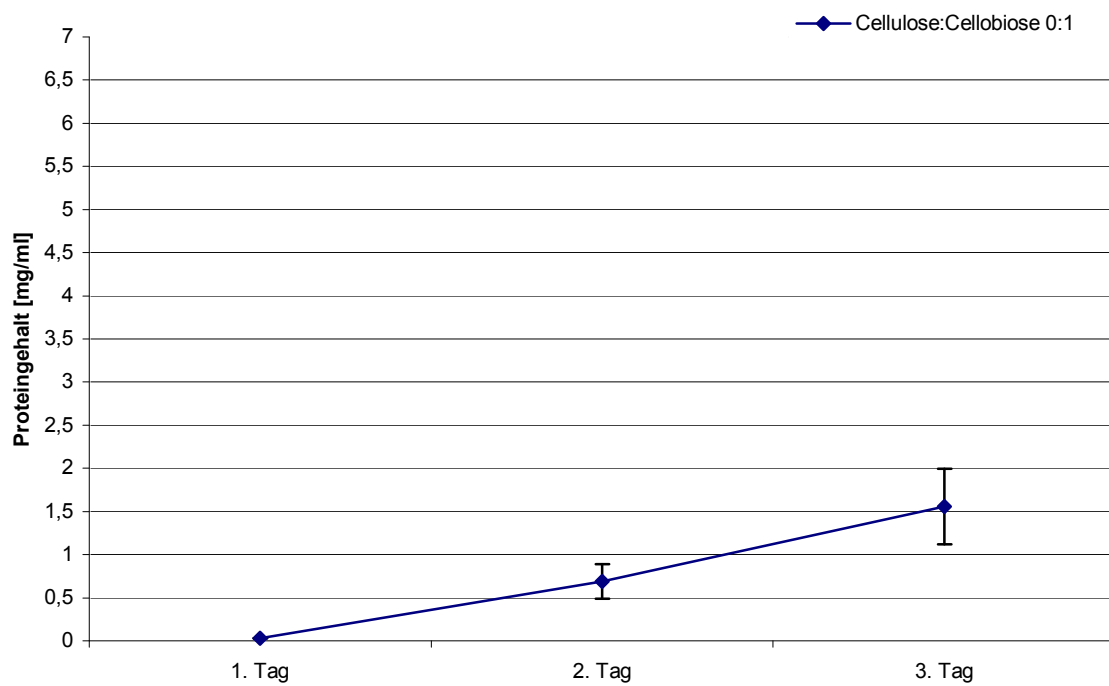


Abb. 19 Proteingehalt der Charge G, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 0:1

Wie in der Abbildung 15 zu erkennen ist, beinhaltet die Probe C (Cellulose:Cellulose 1:1) den höchsten Proteingehalt an allen drei aufeinander folgenden Tagen.

Die Probe E (Cellulose:Cellulose 0:5) hingegen zeigt den niedrigsten Proteingehalt am 3. Tag.

Interessant ist der gerade Anstieg des Proteingehaltes in der Abbildung 14 mit einem Verhältnis von Cellulose zu Cellulose 1:0 im Nährmedium.

Folgende Tabelle zeigt die einzelnen Proteingehalte der Proben A-G aufgelistet in mg/ml von den Messungen am ersten, zweiten und dritten Züchtungstag.

Charge	Cellulose:Cellulose	Proteingehalt mg/ml		
		1. Tag	2. Tag	3. Tag
A	05:01	1,55	3,27	4,26
B	01:00	1,58	3,21	4,93
C	01:01	2,78	3,60	5,63
D	01:03	0,45	1,68	2,35
E	01:05	0,31	0,33	1,21
F	01:11	0,47	1,08	2,59
G	00:01	0,03	0,69	1,56

Tab. 5 Proteingehalt (mg/ml) der Proben A bis G mit den verschiedenen Verhältnissen von Cellulose zu Cellulose

Die folgenden Graphen sollen die unterschiedlichen Proteingehalte noch deutlicher veranschaulichen. Wie zu erkennen ist, ist der Unterschied zwischen dem Proteingehalt der Proben 2 und 3 ab zweiten Tag der Züchtung nicht mehr signifikant. (Cellulose:Cellulose 1:0 bzw. 1:1).

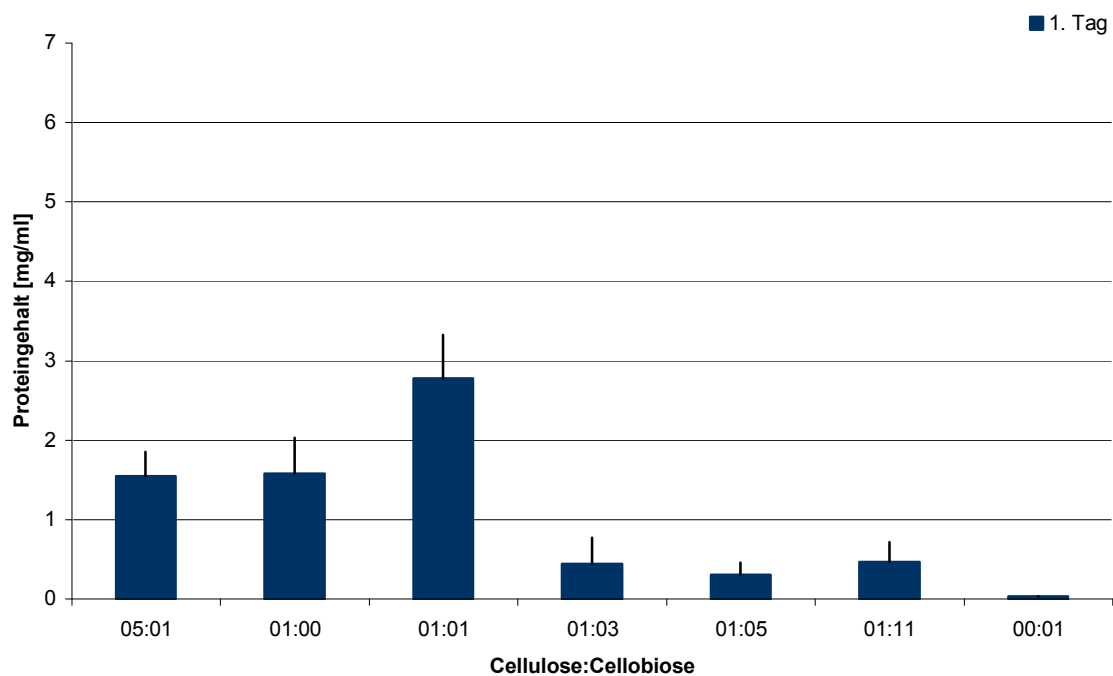


Abb. 20 Proteingehalt des Inkubationsmediums unterschiedlicher Verhältnisse von Cellulose zu Cellulose am ersten Tag

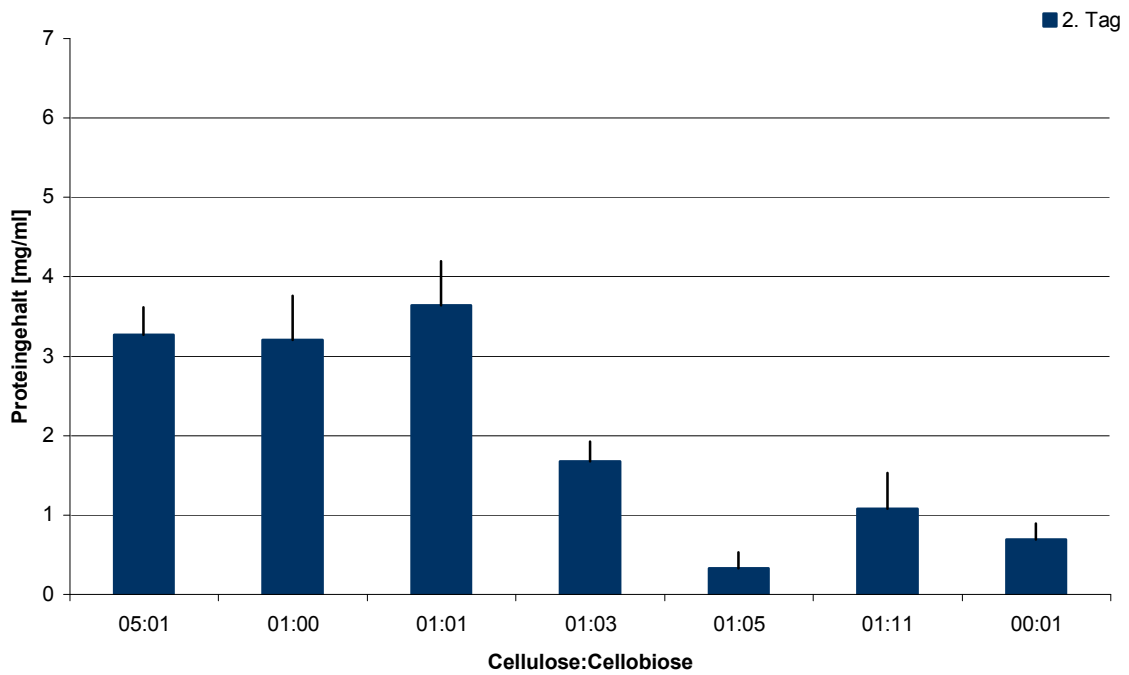


Abb. 21 Proteingehalt des Inkubationsmediums unterschiedlicher Verhältnisse von Cellulose zu Cellulose am zweiten Tag

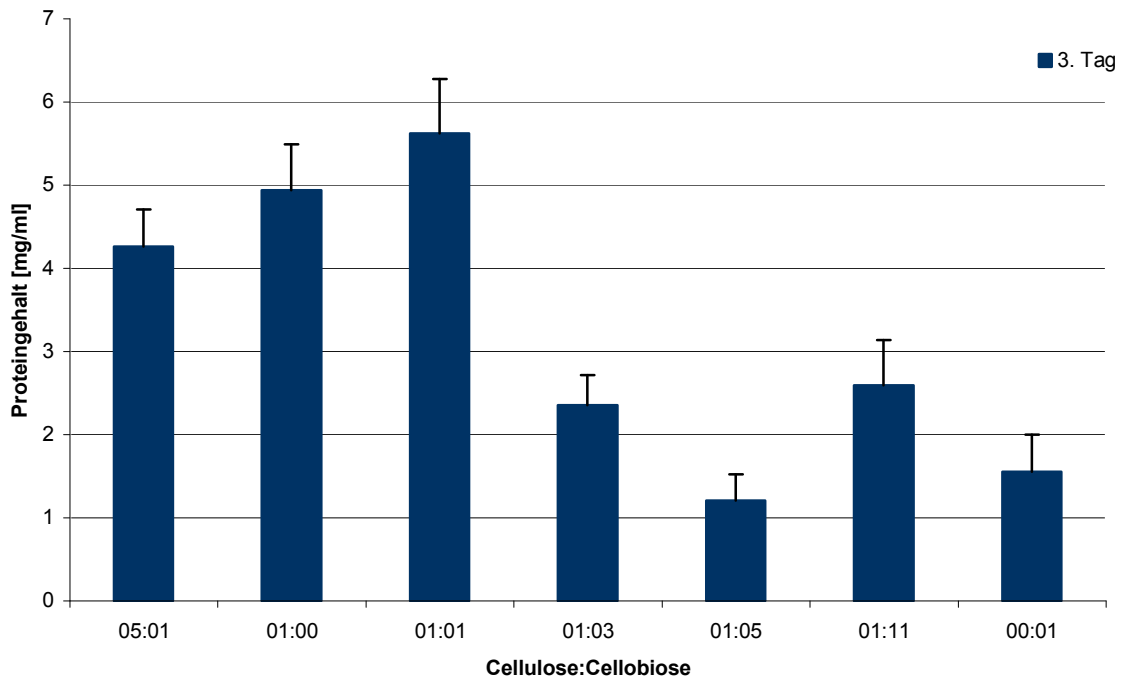


Abb. 22 Proteingehalt des Inkubationsmediums unterschiedlicher Verhältnisse von Cellulose zu Cellulose am dritten Tag

Anhand der Abbildungen 20 bis 22 ist deutlich zu erkennen, dass die Verhältnisse Cellulose:Cellulose = 1:1 und 1:0 (Proben B und C) im Nährmedium, den höchsten Proteingehalt an allen drei Messungstagen aufweisen.

Der Vergleich des Proteingehalts Proben A-G zeigt die Bedeutung der Cellulose für das Wachstum der Bakterien. Während das Verhältnis Cellulose:Cellulose = 1:5 zu einem deutlich niedrigeren Proteingehalt führt, ermöglicht das Verhältnis 5:1 (vorgeschlagen von NCIMB) eine 3,5 fache Erhöhung des Proteingehalts. Allerdings ist der Proteingehalt der Probe C (Cellulose:Cellulose 1:1) an allen drei aufeinander folgenden Tagen höher als der anderer Proben. Obwohl der Unterschied des Proteingehalts in der Probe B und C nicht signifikant ist, wird für weitere Untersuchungen das Nährmedium mit dem Verhältnis Cellulose:Cellulose 1:1 verwendet.

Abbildung 23 zeigt die DC - Platte zur Identifizierung der erfolgten Spaltungsreaktion von Cellobiose der Proben A bis G. Trotz der unterschiedlichen Proteingehalte ist das aktive Enzym in allen Proben nachweisbar.

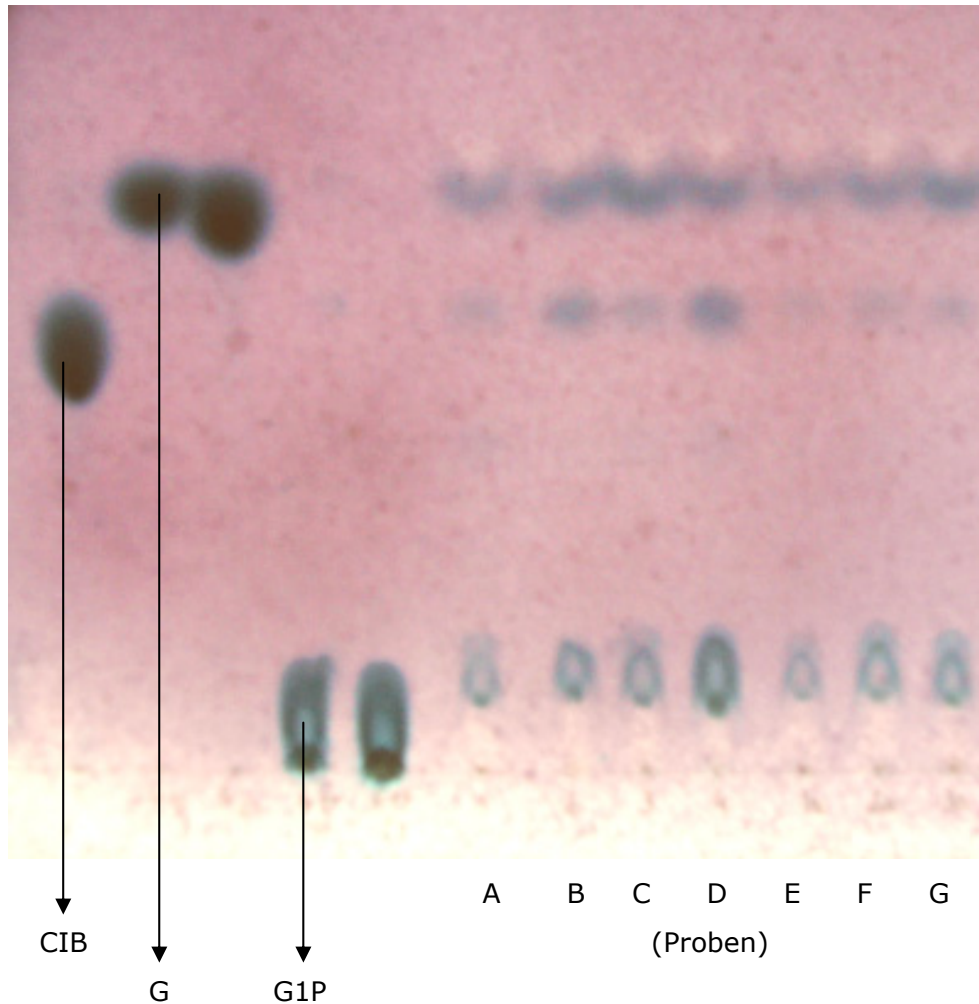


Abb. 23 Das Chromatogramm zur Identifizierung der erfolgten Spaltungsreaktion von Cellobiose der Proben A bis G

CIB ... Standard 0,1 M Cellobiose

G ... Standard 0,1 M D - Glucose

G1P ... Standard 0,076 M Glucose-1-Phosphat

1.2 Bestimmung der Enzymaktivität im Enzymrohextrakt

Um die Enzymaktivität des Rohextrakts zu bestimmen, wird die Umsetzung der Cellobiose zur D-Glucose und Glucose-1-Phosphat durchgeführt (siehe Kapitel II.2.2.2). Es werden 3 verschiedene Chargen bearbeitet, die nachstehend als Proben H bis J angeführt sind.

In Intervallen von 15 Minuten werden 50 µl Probe gezogen und die umgesetzte Glucose wird bestimmt. Gleichzeitig wird die Umsetzung mittels Dünnschichtchromatographie identifiziert. Die Bestimmung wird bis zum Erlangen einer konstanten Konzentration der D-Glucose durchgeführt (240-300 Minuten). Zusätzlich wird der Proteingehalt der Proben H-J mittels Biuret Methode ermittelt (Tabelle 9).

Folgende Tabellen 6 bis 8 zeigen den Glucosegehalt der inkubierten Proben H-J.

Zeit (min)	Glucose (g/l)
30	0,078
45	0,124
60	0,152
75	0,187
90	0,192
105	0,250
120	0,288
135	0,310
150	0,332
165	0,376
180	0,396
195	0,416
210	0,481
225	0,463
240	0,510
* 255	0,530

Tab. 6 Glucosegehalt der inkubierten Probe H

Zeit (min)	Glucose in g/l
30	0,124
45	0,144
60	0,198
75	0,250
90	0,261
105	0,296
120	0,356
135	0,388
150	0,383
165	0,395
180	0,414
195	0,417
210	0,451
225	0,472
240	0,474
* 255	0,524

Tab. 7 Glucosegehalt der inkubierten Probe I

Zeit (min)	Glucose in g/l
30	0,111
45	0,159
60	0,205
75	0,265
90	0,312
105	0,339
120	0,377
135	0,491
150	0,517
165	0,552
180	0,683
195	0,719
210	0,757
225	0,761
240	0,772
255	0,800
270	0,839
285	0,893
300	0,986
* 315	0,935

Tab. 8 Glucosegehalt der inkubierten Probe J

* Ab diesen Werten in den Tabellen 6, 7 und 8 ist eine konstante Extinktionszunahme nicht mehr messbar. Die Extinktionen weisen zu starke Abweichungen auf und können für die Bestimmung der Enzymaktivität nicht mehr herangezogen werden.

Probe	Proteingehalt (mg/ml)
H	4,0 ($\pm 0,35$)
I	6,0 ($\pm 0,5$)
J	5,0 ($\pm 0,5$)

Tab. 9 Proteingehalt des Enzymrohextrakt der Proben H-J

Die umgesetzte Menge an der D-Glucose in der inkubierten Probe H beträgt $2,5 \times 10^{-3}$ g/l pro Minute. Die Konzentration der D-Glucose steigt kontinuierlich bis 240 Minuten nach erfolgter Inkubation. Der Proteingehalt im Rohextrakt trägt einen Wert von 4,0 mg/ml (siehe Tabelle 6 und 8).

Der D-Glucoseumsatz in den Proben I und J ist in der Höhe von 3×10^{-3} , wobei die Proteingehalte der zwei Proben die Werte von 6,0 beziehungsweise 5,0 mg/ml besitzen (siehe Tabellen 6, 7 und 8).

Die Enzymaktivität (U) wird angegeben in μmol an umgesetzter D-Glucose pro Minute. Sie beträgt für die Proben H-J, 0,417U, 0,5U beziehungsweise 0,52U. Die spezifische Aktivität des Enzyms wird wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Enzymaktivität (U)}}{\text{Proteingehalt (mg)}} = \text{spezifische Aktivität}$$

(Gleichung 10)

Tabelle 10 zeigt die Enzymaktivität des Rohextraktes sowie die spezifische Aktivität des Enzyms.

Probe	Enzymaktivität (U)	spezifische Aktivität (U/mg)
H	0,417	0,104
I	0,5	0,08
J	0,52	0,104
Mittelwert		X=0,096 ($\pm 0,014$)

Tab. 10 Die Enzymaktivität sowie die spezifische Aktivität der Proben H-J

Die spezifische Aktivität der Cellobiose Phosphorylase im Rohextrakt beträgt 0,096 U/mg.

Sasaki et al. extrahierten die Cellobiose Phosphorylase aus *Cellvibrio gilvus*. Die spezifische Aktivität deren Enzymrohextraktes wurde anhand des umgesetzten Glucose-1-Phosphats bestimmt und betrug ebenso 0,1 U/mg [33].

Die Spaltungsreaktion der Cellobiose ist in den Chromatogrammen 24 und 25 der inkubierten Proben H-J deutlich zu erkennen.

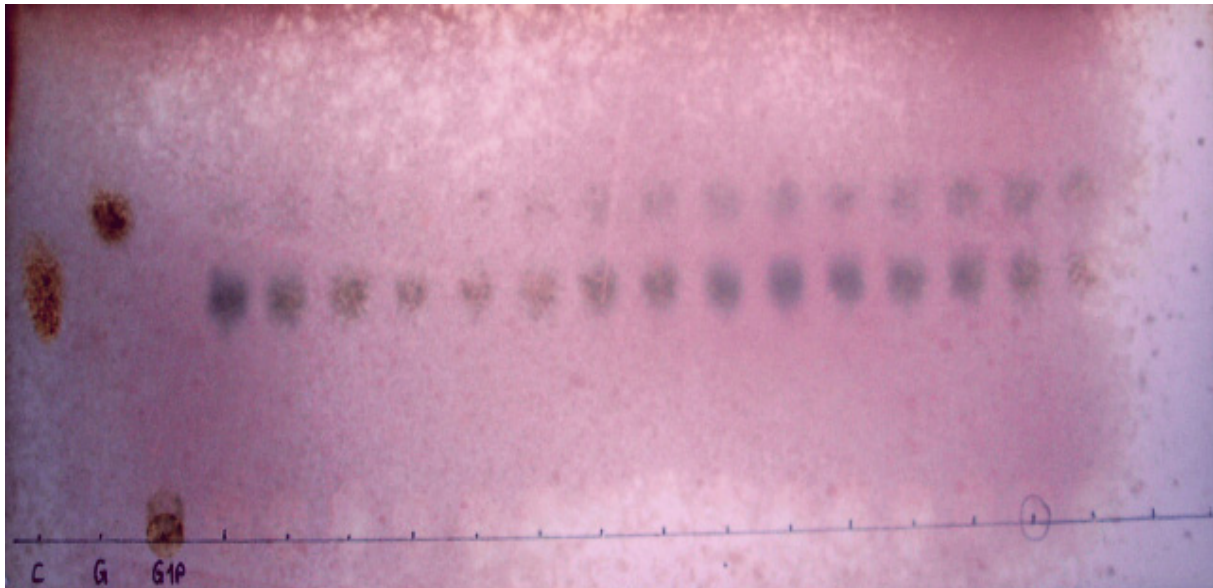
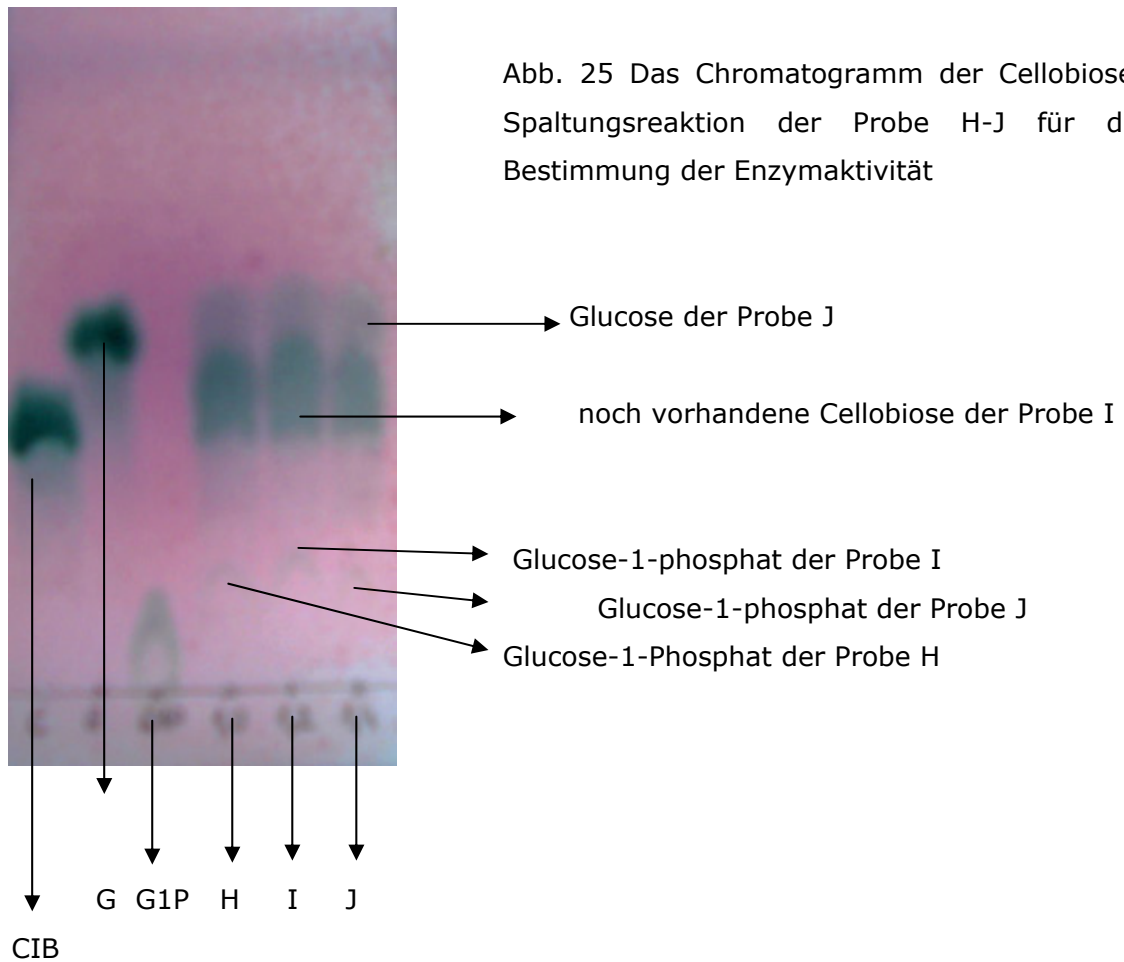


Abb. 24 Das Chromatogramm der Cellobiose-Spaltungsreaktion der Probe H für die Bestimmung der Enzymaktivität in 15-minütigen Intervallen

- C ... Standard 0,1 M Cellobiose
- G ... Standard 0,1 M D - Glucose
- G1P ... Standard 0,076 M Glucose-1-Phosphat



- CIB ... Standard 0,1 M Cellobiose
- G ... Standard 0,1 M D-Glucose
- G1P ... Standard 0,076 M Glucose-1-Phosphat

1.3 Gefriertrocknung des Enzymrohextraktes

Während der Proteingehalt des Rohextraktes nach 4 Tagen Lagerung sowohl in Raumtemperatur (25°C) als auch in 5°C nicht mehr nachweisbar ist, liefert die Bestimmung des Proteingehalts des Lyophilisates stabile Werte.

Wie von der Tabelle 11 abzulesen ist, bleibt der Proteingehalt während 90 Tagen Lagerung konstant.

Lagerzeit	Proteingehalt % (w/w)
Tag 0	20,01 ($\pm 2,6$)
Tag 30	16,48 ($\pm 4,7$)
Tag 60	16,27 ($\pm 0,9$)
Tag 90	16,56 ($\pm 1,7$)

Tab. 11 Der Proteingehalt des Lyophilisats während 90 Tagen Lagerung bei 5°C

In der Abbildung 26 sind die Ergebnisse aus der Tabelle 11 graphisch dargestellt.

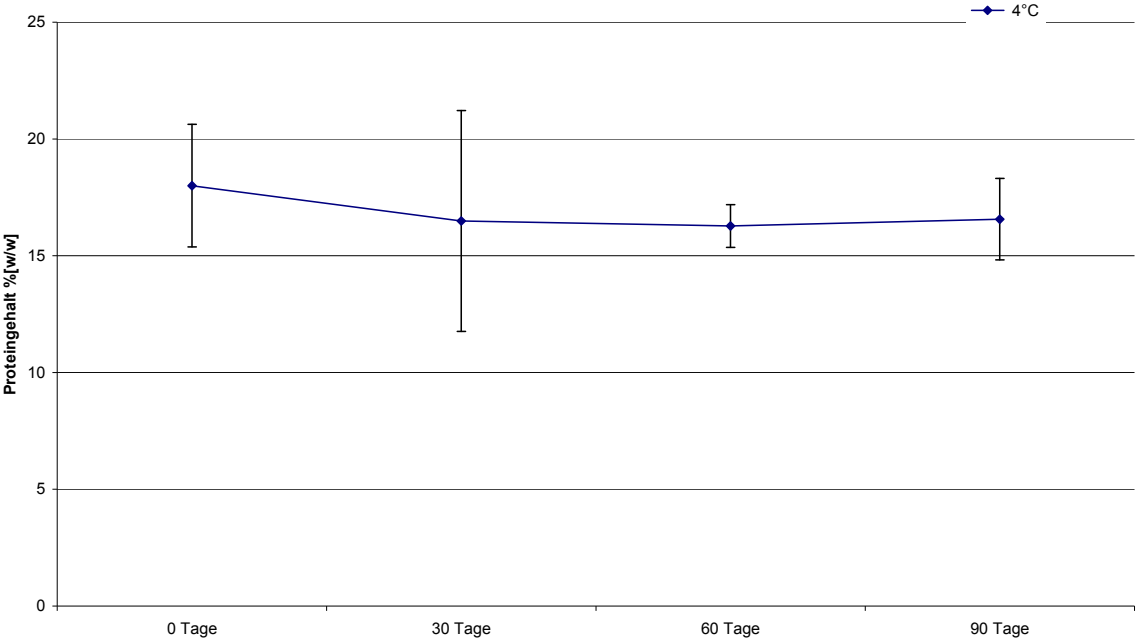
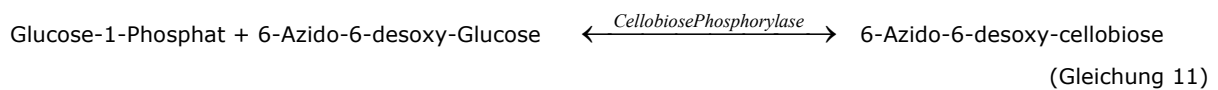


Abb. 26 Graphische Darstellung des Proteingehalts des Lyophilisats während der 90 Tagen Lagerung in 5°C

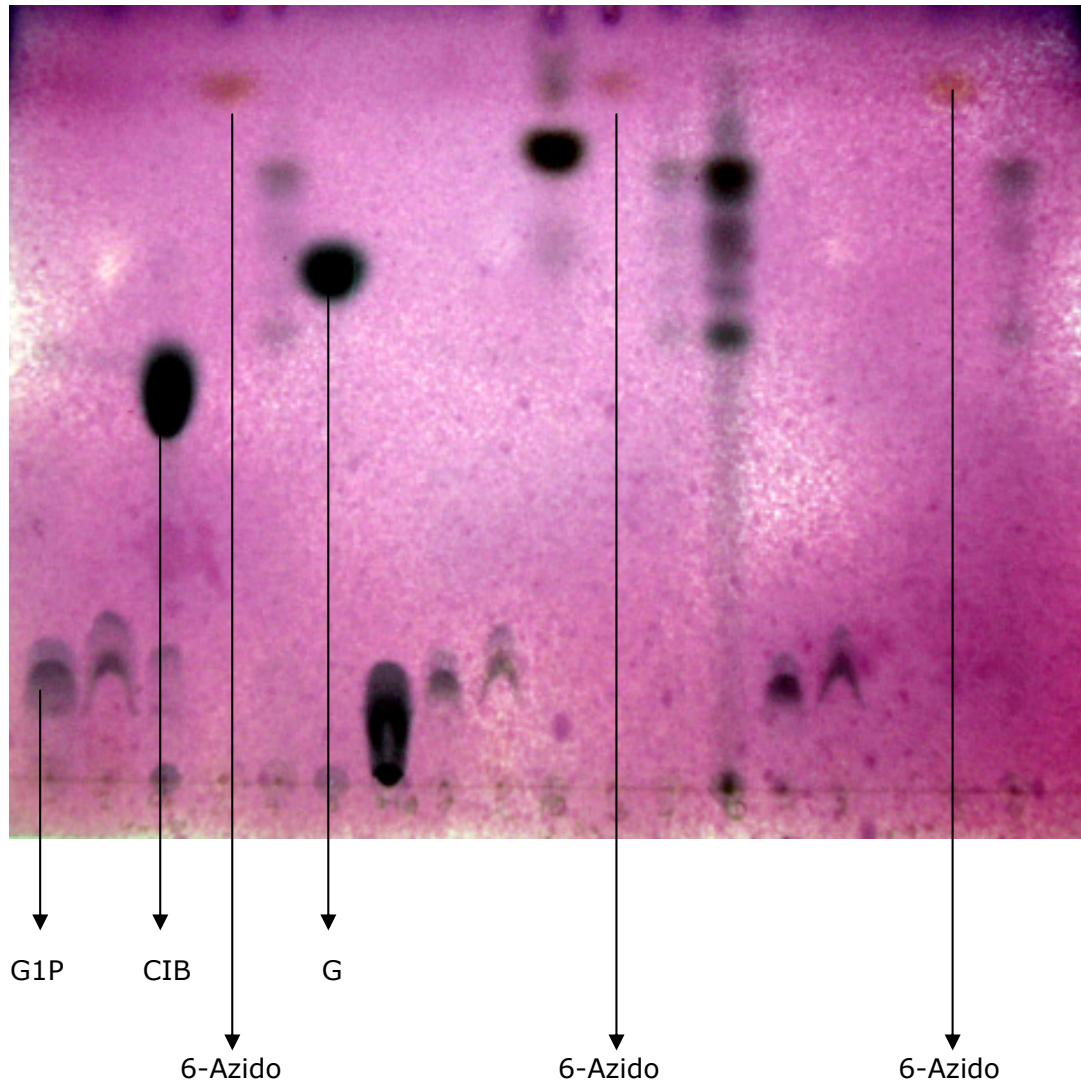
1.4 Enzymatische Synthese der 6-Azido-6-desoxy-cellobiose

Beim Disaccharid 6-Azido-6-desoxy-cellobiose ist die Hydroxylgruppe in Position 6 der Cellobiose durch eine Azidgruppe substituiert. Die chemische Synthese dieser Verbindung erfordert mehrere Schritte. Jedoch ist es uns gelungen die enzymatische Synthese in einem Durchgang durchzuführen:



Wie im Kapitel II.2.5 beschrieben, werden die Hin- und Rückreaktion durch den Ansatz der Cellobiose Phosphorylase durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung 27 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der gebildeten Substanzen. Wie aus dem Chromatogramm ersichtlich ist, weist der Substanzfleck der Azid-Verbindung eine deutlich bräunliche Farbe auf.

Abb. 27 Das Chromatogramm der Detektion der 6-Azido-6-desoxy-cellobiose



- CIB ... Standard 0,1 M Cellobiose
- G ... Standard 0,1 M D-Glucose
- G1P ... Standard 0,076 M Glucose-1-Phosphat
- 6-Azido ... gebildete Substanz 6-Azido-6-desoxy-cellobiose

2. Zusammenfassung

Da das natürlich vorkommende Chitosan schwierig zu reinigen ist und gewissen Chargenvariationen unterliegt, richtet sich das Interesse auf alternative basische Polysaccharide, die durch enzymatische Polymerisation von Mono- oder Disaccharidbausteinen erhalten werden können. 6-Azido-6-desoxy-cellobiose ist ein bedeutsames Disaccharid in der Synthese neuer biomimetischer Aminopolysaccharide.

Cellobiose Phosphorylase aus *Cl. thermocellum* katalysiert die Koppelung vom Glucose-1-Phosphat mit D-Glucose zur Cellobiose. Das Ziel dieser Diplomarbeit war die enzymatische Gewinnung der 6-Azido-6-desoxy-cellobiose mittels der Cellobiose Phosphorylase. Während die chemische Herstellung mehrere Reaktionsschritte erfordert, bietet die enzymatische Synthese hier eine Erleichterung, da sie in einem Schritt erfolgt.

In Rahmen dieser Diplomarbeit wurde das Enzym von *Cl. thermocellum* gewonnen. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde dessen Nährmedium optimiert und das Rohextrakt aufkonzentriert. Einen Beweis für die Aktivität des Enzyms lieferte der Nachweis mittels der Dünnschichtchromatographie. Ein einfaches und schnelles Prinzip zur Identifizierung, das präzise durchzuführen ist. Die Enzymaktivität des Rohextraktes wurde mit Hilfe der D-Glucose-Bestimmung ermittelt und wieder mittels DC nachgewiesen. Cellobiose Phosphorylase katalysiert die Reaktion zwischen Glucose-1-Phosphat und 6-Azid-6-desoxy-glucose. Die Entstehung der 6-Azido-6-desoxy-cellobiose wurde erfolgreich durch Dünnschichtchromatographie identifiziert.

Literaturverzeichnis

- [1] Voigt, R., 2006. Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf, 10. Auflage, Deutsche Apotheker Verlag, Stuttgart
- [2] Bauer, K.H., Frömming, K.H., Führer, C., 1997. 2006 Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, 8. Auflage, Govi-Verlag Frankfurt
- [3] Palmberger, T. F., Hombach, J., Bernkop-Schnürch A., 2008. Thiolated chitosan: Development and in vitro evaluation of an oral delivery system for acyclovir, *Int. J. Pharm.* 348, 54-60
- [4] Nunthanid, J., Huanbutta, K., Luangtana-anan, M., Sriamornsak, P., Limmatvapirat, S., Puttipatkhachorn, S., 2008. Development of time-, pH-, and enzyme-controlled colonic drug delivery using spray-dried chitosan acetate and hydroxypropyl methylcellulose, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 253-259
- [5] Liu, H., Yang, X.G., Nie, S.F., Wei, L.L., Zhou, L.L., Liu, H., Tang, R., Pan, W.S., 2007. Chitosan-based controlled porosity osmotic pump for colon-specific delivery system: Screening of formulation variables and in vitro investigation, *Int. J. Pharm.* 332, 115-124
- [6] Nunthanid, J., Laungtana-anan M., Sriamornsak P., Limmatvapirat, S., Puttipatkhachorn, S., Lim, L.Y., Khor, E., 2004. Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets, *J. Controlled Rel.* 99, 15-26
- [7] Le Tien, C., Lacroix, M., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.A., 2003. N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release, *J. Controlled Rel.* 93, 1-13
- [8] Säkkinen, M., Marvola, J., Kanerva, H., Lindevall, K., Ahonen, A., Marvola, M., 2006. Are chitosan formulations mucoadhesive in the human small intestine?: An evaluation based on gamma scintigraphy, *Int. J. Pharm.* 307, 285-291
- [9] Säkkinen, M., Linna, A., Ojala, S., Jürjenson, H., Veski, P., Marvola M., 2003. In vivo evaluation of matrix granules containing microcrystalline chitosan as a gel-forming excipient, *Int. J. Pharm.* 250, 227-237
- [10] Rege, P.R., Shukla, D.J., Block, L.H., 2003. Chitinosan-drug complexes: effect of electrolyte on naproxen release in vitro, *Int. J. Pharm.* 250, 259-272
- [11] Santos, H., Veiga, F., Pina, M., Podczec, F., Sousa, J., 2002. Physical properties of chitosan pellets produced by extrusion-spheronisation: influence of formulation variables, *Int. J. Pharm.* 246, 153-169
- [12] Sabnis, S., Block, L.H., 2000. Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems: I. Molecular modifications, *Int. J. Biol. Macromol.* 27 181-186.

- [13] Rege, P.R., Shukla, D.J., Block L.H., 1999. Chitinosans as tableting excipients for modified release delivery systems, *Int. J. Pharm.* 181, 49-60
- [14] Mir, V.G., Heinämäki, J., Antikainen, O., Bilbao Revoredo, O., Colarte, A.I., Nieto, O.M., Yliruusi, J., 2008. Direct compression properties of chitin and chitosan, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 964-968
- [15] Grenha, A., Seijo, B., Remuñán-López, C., 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 25, 427-437
- [16] Säkkinen, M., Tuononen, T., Jürjenson, H., Veski, P, Marvola, M., 2003. Evaluation of microcrystalline chitosans for gastro-retentive drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 19, 345-353
- [17] Sih, C.J., McBee R.H., 1955. A cellobiose Phosphorylase in *Clostridium thermocellum*. *Proc. Montana Acad. Sci.*, 15, 21-22
- [18] Alexander, J.K., 1961. Characteristics of Cellobiose Phosphorylase, *J. Bacteriol.* 81, 903-910
- [19] Ohdan, K., Fujii, K., Yanase, M., Takaha, T., Kuriki, T., 2007. Phosphorylase coupling as a tool to convert cellobiose into amylose, *J. Biotechnol.* 127, 496-502
- [20] Hong, J., Wang, Y., Ye, X., Zhang, Y.-H.P., 2008. Simple protein purification through affinity adsorption on regenerated amorphous cellulose followed by intein self-cleavage, *J. Chromatography A*, 1194, 150-154
- [21] Tanaka, K., Kawaguchi, T., Imada, Y., Ooi, T., Arai, M., 1995. Purification and properties of Cellobiose Phosphorylase from *Clostridium thermocellum*, *J. Ferm. Bioeng.* 79, 212-216
- [22] http://de.wikipedia.org/wiki/Clostridien#cite_ref-0
- [23] Lamed, R., Bayer, E.A., 1988. The cellulosome of *Clostridium thermocellum*, *Adv. Appl. Microbiol.* 33, 1-46
- [24] http://de.wikipedia.org/wiki/Cellulose#cite_ref-1
- [25] Glandorf, Kuhnert, Lück, 1991. *Handbuch Lebensmittelzusatzstoffe*. Behr's Verlag
- [26] R. Erdmann, *Biochemie / Mikrobiologie. Praktikumsscript in der Ruhr-Universität Bochum*
- [27] VIVASCIENCE Sartorius Group, *Vivaspin 6 and 20 ml, Broschüre*, 2006
- [28] Bast, E., 1999. *Mikrobiologische Methoden, Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

- [29] Bauer, K., Gros, L., Sauer, W., 1989. Dünnschichtchromatographie-Eine Einführung. Dr. Alfred Hüthig Verlag GmbH
- [30] Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G.G., 2001. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 3. Auflage
- [31] BOEHRINGER MANNHEIM/ R-BIOPHARM, D-Glucose UV-Test, Broschüre, 2006.
- [32] <http://de.wikipedia.org/wiki/Gefriertrocknung>
- [33] Sasaki, T., Tanaka, T., Nakagawa, S., Kainuma, K., 1983. Purification and properties of Cellvibrio gilvus cellobiose phosphorylase, Biochem. J. 209, 803-807

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

Abbildungsverzeichnis

Seite

Abb. 1 Cl. thermocellum	9
Abb. 2 Celluloseeinheit	14
Abb. 3 Cellobiosemolekül	15
Abb. 4 Autoklav	18
Abb. 5 Zentrifugenrotor mit Tuben	19
Abb. 6 und 7 Ultraschallwandler und Vorgang des Verfahrens	20
Abb. 8 VIVASPIN 20 Membranfilter	21
Abb. 9 Schematische Darstellung einer DC – Platte	25
Abb.10 Diagramm zur Veranschaulichung verschiedener Trocknungsverfahren	30
Abb. 11 Beispiel einer Vakuumsgefriertrocknungsanlage	31
Abb. 12 Enzymrohextrakt in Petrischalen	32
Abb. 13 Proteingehalt der Charge Nr. 1, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 5:1	34
Abb. 14 Proteingehalt der Charge Nr. 2, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 1:0	35
Abb. 15 Proteingehalt der Charge Nr. 3, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 1:1	35
Abb. 16 Proteingehalt der Charge Nr. 4, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 1:3	35
Abb. 17 Proteingehalt der Charge Nr. 5, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 1:5	36
Abb. 18 Proteingehalt der Charge Nr. 6, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 1:11	36
Abb. 19 Proteingehalt der Charge Nr. 7, Verhältnis von Cellulose zu Cellobiose beträgt 0:1	37
Abb. 20 Proteingehalt des Inkubationsmediums unterschiedlicher Verhältnisse von Cellulose zu Cellobiose am ersten Tag	37
Abb. 21 Proteingehalt des Inkubationsmediums unterschiedlicher Verhältnisse von Cellulose zu Cellobiose am zweiten Tag	39
Abb. 22 Proteingehalt der verschiedenen Verhältnisse von Cellulose zu Cellobiose am dritten Tag	40
Abb. 23 Das Chromatogramm zur Identifizierung der erfolgten Spaltungsreaktion von Cellobiose der Proben A bis G	42

Abb. 24 Das Chromatogramm der Cellobiose-Spaltungsreaktion der Probe H für die Bestimmung der Enzymaktivität in 15-minütigen Intervallen48

Abb. 25 Das Chromatogramm der Cellobiose-Spaltungsreaktion der Proben H-J für die Bestimmung der Enzymaktivität49

Abb. 26 Graphische Darstellung des Proteingehalts des Lyophilisats während der 90 Tagen Lagerung in 5°C51

Abb. 27 Das Chromatogramm der Detektion der 6-Azido-6-desoxy-cellobiose ..52

Tabellenverzeichnis

Seite

Tab. 1 Die variierten Verhältnisse zwischen Cellulose und Cellobiose des Nährmediums für <i>Cl. thermocellum</i>	22
Tab. 2 Verdünnungsreihe der Biuret Methode	24
Tab. 3 Der Pipettiervorgang der Probenvorbereitung für die Glucose – Bestimmung	28
Tab. 4 Substanzangaben der Hin- und Rückreaktion	32
Tab. 5 Proteingehalt (mg/ml) der Probennummern A bis G mit den verschiedenen Verhältnissen von Cellulose zu Cellobiose	38
Tab. 6 Glucosegehalt der inkubierten Probe H	44
Tab. 7 Glucosegehalt der inkubierten Probe I	45
Tab. 8 Glucosegehalt der inkubierten Probe J	46
Tab. 9 Proteingehalt des Enzymrohextraktes der Proben H-J	47
Tab. 10 Die Enzymaktivität sowie die spezifische Aktivität der Proben H-J.....	48
Tab. 11 Der Proteingehalt des Lyophilisats während 90 Tagen Lagerung bei 5°C	50

Anhang

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bidest.	bidestilliert
dest.	destilliert
CIB	Cellobiose
DC	Dünnschichtchromatographie
E	Extinktion
G-1-P	D-Glucose-1-Phosphat
G-6-P	D-Glucose-6-Phosphat
G6P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
HK	Hexokinase
KM	Kältemittel
konz.	konzentriert
M	Molarität
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	Nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Nr.	Nummer
Tab.	Tabelle
U	Enzymaktivität ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sabine Elvira Bogner
Geboren am: 23.10.1978 in Wr.Neustadt, Niederösterreich
Eltern: geschieden
Mutter: Margarete Bogner, geb. Hoffmann
(Pensionistin), ledig
Vater: Leopold Bogner (Pensionist), verheiratet

Schulische Ausbildung:

1984 - 1988 Volksschule Neudörfel im Burgenland
1988 - 1996 BRG Wr.Neustadt, Niederösterreich
Juni 1996 Reifeprüfung
Oktober 1996 Beginn des Diplomstudiums Pharmazie an der Universität Wien
Oktober 1998 Beginn des Diplomstudiums Chemie an der Universität Wien
November 2001 Abbruch des Diplomstudiums Chemie
November 2001 - März 2002 Unterbrechung des Diplomstudiums Pharmazie
Februar 2006 - Oktober 2006 Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie & Biopharmazie Wien bei Prof. Viernstein

Außerordentliche Tätigkeiten:

- Beschäftigungen während meiner Studienzeit
Februar 2000 - Juli 2006 Filialleiterstellvertretung bei der Fa. Zielpunkt
Warenhandels-gesmbH, Filiale Gonzagagasse
Sept. 2003 - fortwährend Angestellte mit 6/10 in der Birkenapotheke
1230, Khemetergasse 8
- zweimalige Tätigkeit als Tutorin am Department für Pharmazeutische Technologie & Biopharmazie („Grundpraktikum aus Pharmazeutischer Technologie“)