

Vergleichende Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Chitosanen in Relation zu ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

Dem Promotionsausschuss des Fachbereichs Biologie/Chemie der
Universität Bremen vorgelegt am 20. Januar 2016 von
Dipl. Biol. Nadia Keddig

Komitee:

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Heyser
2. Gutachter: Prof. Dr. Gunter Otto Kirst
1. Prüfer: Prof. Dr. Martin Diekmann
2. Prüfer: Dr. Werner Wosniok



Berichte aus der Biologie

Nadia Keddig

**Vergleichende Untersuchungen zur biologischen
Aktivität von Chitosanen in Relation zu ihren
physikalisch-chemischen Eigenschaften**

D 46 (Diss. Universität Bremen)

Shaker Verlag
Aachen 2017

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Bremen, Univ., Diss., 2016

© Umschlagbild Fotolia
[#89925638 Prawns](http://de.fotolia.com)

Copyright Shaker Verlag 2017
Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-4967-1
ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Erklärung nach § 6 Abschnitt 5 der Promotionsordnung der Universität Bremen für die mathematischen, natur- und ingenieurwissenschaftlichen Fachbereiche vom 14. März 2007

Hiermit erkläre ich, Nadia Keddig, dass ich die vorliegende Doktorarbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

*- das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile -
verkürztes Zitat nach Aristoteles*

Danksagung

Nach vielen Jahren intensiver Arbeit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich in dieser herausfordernden, aber auch ungemein lohnenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben.

Zu besonderem Dank bin ich meinen Professoren, Gutachtern und Prüfern verpflichtet. Allen voran möchte ich meinem Professor und Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Heyser für seine wertvolle Hilfe und Unterstützung herzlich danken. Er hat mich mit seinem unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen stets in neue Sphären gelenkt und stand mir mit seinem großen Fachwissen zur Seite. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die er mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte sowie für die von ihm geschaffene offene Arbeitsatmosphäre und ständige Anregung zur interdisziplinäre Gemeinschaft. In Zusammenarbeit mit unterschiedlichen Arbeitsgruppen innerhalb und außerhalb des UFTs konnte ich weite Teile meiner Arbeiten durchführen, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Ein herzlicher Dank gebührt auch meinem zweiten Gutachter Prof. Dr. Gunter Kirst. Er war einer sachlichen Diskussion gegenüber immer offen und gerne denke ich an die intensiven Beratungsgespräche zurück, die ich als Beisitzer im Rahmen zahlreicher Vordiplomprüfungen mit ihm führen durfte.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem ersten Prüfer Prof. Dr. Martin Diekmann, der mir in meiner gesamten Studienzeit immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand und es versteht, Probleme an der Wurzel zu packen.

Ich danke nicht zuletzt oftmals meinem zweiten Prüfer Dr. Werner Wosniok für die wertvolle langjährige Zusammenarbeit. Unermüdlich haben wir gemeinsam die Ergebnisse biologisch wie statistisch auseinandergenommen, R auf sein ganzes Potential geprüft und Programm um Programm für die Auswertung verfasst.

Neben den Mitgliedern meiner eigenen Arbeitsgruppe, denen mein ausdrücklicher Dank gilt, möchte ich mich auch noch bei dem AK Chitosan, der AG Filser, der AG Jasdorff, der AG Koenig, der AG Rübiger und der AG Thörming sowie bei dem Ausbildungszentrum für Laboranten der Universität Bremen, dem IFAM und der Materialprüfungsanstalt für ihre Unterstützung danken. Ich durfte bei ihnen einen Teile der Untersuchungen für meine Doktorarbeit durchführen, ihre Geräte benutzen und einzelne Mitglieder wie Jürgen Arning, Ulrike Bottin-Weber, Peter Brackmann, Ina Cording, Ingo Grunwald, Klaudia Hettwer,

Jan Küver, Frank Lubisch, Markko Remesch, Ursula Stoll, Ute Uebers und Mirko Weinhold standen mir besonders mit Rat und Tat zur Seite.

Während der ganzen Zeit waren meine Familie und Freunde für mich da. Sie waren mir ein Rückhalt und haben mir auch in schwierigen Phasen Mut gemacht.

Thorsten danke ich für seine Ausdauer, Ruhe und Geduld, und seine Fähigkeit, mich immer wieder aufzumuntern

Summary

Chitosans are a diverse group of biopolymers, which are widely used in different fields of application for years. They are appreciated and used especially because of their antimicrobial effects combined with their biocompatible properties. However, details of the correlation between their physical-chemical characteristics and biological effects (e.g. antimicrobial effect) have not been fully understood yet.

In the following thesis the antimicrobial properties were examined with mold fungi as well as with gram-positive and gram-negative bacteria. Furthermore, the biocompatibility was proven with a plant assay and the physical-chemical properties of chitosan were systematically investigated.

The results of the investigations on mold fungi and bacteria allow the conclusion that chitosan has no antifungal capacities. Furthermore the mold fungi are able to use the chitosan as carbon resource. Certainly, chitosans operated as an inhibitor to the group of bacteria. They acted biostatical and bactericide, which led to a structural membrane damage of *E. coli*. However, there was no indication of a different effect on gram-positive bacteria compared to gram-negative bacteria. The effect of chitosans is presumably more affected by bacteria and their adaptation to the environment rather than by the composition of the membrane structure. It was shown that the marine gram-negative bacteria *V. fischeri* was less affected in the occurrence of luminescent than the bacteria *E. coli* (gram-negative) and *B. subtilis* (gram-positive) in their dehydrogenase activity. The biocompatibility is guaranteed unrestricted as long as the pH is neutral to alkaline. Chitosans will form micelles or aggregates under these pH conditions, which significantly reduces their bioavailability. Effects in eukaryotic test systems under acetic pH conditions demonstrated, that the chitosan significantly disturbed the growth of the plant *L. minor*. Additionally, no growth recovery was observed even several weeks after the treatment.

No influence of the molecular weight of the Chitosans on inhibition effects could be found for the correlation of the physical-chemical properties with all EC values over all experiments. On the other hand it could be shown that the degree of acetylation (and additionally combined with the amount of acetylated units) and the pattern of acetylation might influence the impact of chitosan on biological effects. A low degree of acetylation or a low-numbered pattern of

acetylation inhibited the growth of bacteria most clearly, whereas a high degree of acetylation or a high-numbered pattern of acetylation inhibited the growth of *L. minor* most effectively. Complete biocompatibility can probably be achieved by adaption of these characteristics of chitosan.

Zusammenfassung

Chitosane stellen eine sehr variable Gruppe von Polymeren dar, die seit Jahren nahezu universell in diversen Anwendungsgebieten eingesetzt werden. Vornehmlich werden sie aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung und ihrer gleichzeitig biokompatiblen Eigenschaften geschätzt und verwendet. Eine genaue Zuordnung der physikalisch-chemischen Parameter der Chitosane zu den jeweiligen Effekten, wie z.B. antimikrobielle Wirkung, war bislang nicht möglich.

In dieser Arbeit wurden die antimikrobiellen Eigenschaften an verschiedenen Schimmelpilzen, sowie grampositiven und gramnegativen Bakterien, untersucht. Außerdem wurde die Biokompatibilität an Pflanzen erforscht und eine systematische Analyse der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Chitosane durchgeführt.

Aus den Untersuchungen an Bakterien und Schimmelpilzen ging hervor, dass keine fungiziden Eigenschaften der Chitosane festgestellt werden konnten. Vielmehr stellte sich heraus, dass die untersuchten Pilze die verwendeten Chitosane als Kohlenstoffquelle verwenden konnten. In der Gruppe der Bakterien erwies sich Chitosan hingegen als sehr effektiv und wirkte sowohl bakteriostatisch als auch bakterizid, was zur Zerstörung der Membranstruktur von *E. coli* führte. Eine differenzierte Wirkung auf grampositive und gramnegative Bakterien konnte bei direktem Vergleich nicht bestätigt werden. Die Wirkung der Chitosane ist daher nicht auf die Zellwandbeschaffenheit zurückzuführen, sondern scheint eher durch die Bakterien selbst und ihre Anpassung an ihre individuellen Lebensbedingungen bestimmt zu werden. So zeigte sich, dass das marine gramnegative Bakterium *V. fischeri* in seiner Leuchtleistung durch Chitosane weit weniger beeinträchtigt wurde als *E. coli* oder *B. subtilis* in ihrer Dehydrogenaseaktivität. Die Biokompatibilität ist hingegen uneingeschränkt gewährleistet, solange der pH-Wert sich im neutralen oder basischen Bereich befindet. Unter diesen pH-Bedingungen kommt es zur Mizellbildung und Aggregation der Chitosane, so dass ihre Bioverfügbarkeit stark eingeschränkt ist. In Studien zum Einsatz von Chitosanen in eukaryotischen Testsystemen mit niedrigeren pH-Werten (unterhalb des neutralen Bereichs), zeigte sich jedoch, dass es auch dort zu Wachstumsstörungen kommen kann. Das Wachstum von *L. minor* wird empfindlich durch Chitosan beeinträchtigt, welches sich auch nach mehrwöchigen Experimenten nicht wieder normalisiert.

Im Zusammenhang mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften über alle Experimente konnte kein Einfluss des Molekulargewichts auf inhibierende Effekte nachgewiesen werden. In den Korrelationsberechnungen zeigte sich jedoch, dass der Acetylierungsgrad (auch zusammen mit dem Anteil an acetylierten Einheiten) oder das Acetylierungsmuster einen Einfluss haben könnten. Die Bakterien wurden überwiegend durch einen niedrigen Acetylierungsgrad oder ein geringes Acetylierungsmuster inhibiert, wohingegen *L. minor* am stärksten durch Chitosane mit einem hohen Acetylierungsgrad oder Acetylierungsmuster inhibiert wurde. Biokompatibilität kann somit möglicherweise durch Anpassung dieser Parameter uneingeschränkt erzeugt werden.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	1
Summary	3
Zusammenfassung	5
Inhaltsverzeichnis.....	7
Abkürzungen und Konventionen	9
1 Einleitung	11
1.1 Strukturelle Unterschiede von Chitin und Chitosan	12
1.2 Physikalisch-chemische Parameter natürlicher Polymere	17
1.2.1 Molekulargewicht.....	19
1.2.2 Polydispersität	20
1.2.3 Polymerisationsgrad	20
1.2.4 Acetylierungsgrad	20
1.2.5 Substitutionsmuster	21
1.2.6 Konformation	21
1.2.7 Synthetische Chitosane	22
1.2.8 pH-Wert.....	22
1.3 Natürliche Ressourcen des α - und β -Chitins.....	23
1.4 Herstellung von Chitosan aus Chitin	24
1.5 Biokompatibilität und Biodegradation von Chitosan	26
1.6 Wirkung und wirkungsbezogene Anwendungsgebiete von Chitosan	27
1.6.1 Bindungskapazitäten	28
1.6.2 Kurative Effekte	29
1.7 Interaktion mit Zielorganismen	29
1.7.1 Pilze.....	30
1.7.2 Bakterien	32
1.7.3 Höhere Organismen.....	35
1.8 Zielsetzung und Fragestellung.....	37
2 Material und Methoden	39
2.1 Versuchsdesign.....	39
2.2 Medien und Puffer	41
2.3 Chitosane	42
2.3.1 Verifizierung der Eigenschaften der Chitosane	43
2.3.2 Lagerung und Sterilisation von Chitosanen	43
2.3.3 Konzentrierung der Essigsäure.....	44
2.3.4 Präparation der Testsubstanzen	45
2.3.5 Gaschromatographischer Nachweis der Essigsäurekonzentration	46
2.4 Organismen und Zelllinien	46
2.4.1 Anzucht der Organismen.....	47
2.4.2 Einsatz der Organismen	48
2.5 Untersuchung biologischer Effekten verschiedener Chitosane	49
2.5.1 Hemmung der Sporenkeimung und des Pilzwachstums	49
2.5.2 Inhibition der Koloniebildung von <i>Escherichia coli</i>	49
2.5.3 Bakterieller Proliferationsassay mit <i>Escherichia coli</i>	50
2.5.4 TEM Aufnahmen dotierter <i>Escherichia coli</i> -Bakterien	51
2.5.5 Beeinträchtigung der Dehydrogenaseaktivität von Bakterien.....	54
2.5.6 Beeinträchtigung der Lumineszenz bei <i>Vibrio fischeri</i>	56
2.5.7 Wachstum der Frondfläche von <i>Lemna minor</i>	57
2.5.8 Viabilität der Zelllinie Hep G2 im LDH-Test.....	58
2.6 Statistische Auswertung	59

2.6.1	Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen	60
2.6.2	Konfidenzintervalle	62
2.6.3	Korrelationen	62
2.6.4	Lineares Gemischte-Effekte-Modell	62
3	Ergebnisse	65
3.1	Eigenschaften der Chitosane	65
3.1.1	Auswirkungen von Lagerung und Sterilisation	65
3.1.2	Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften	70
3.2	Chitosan als Oberflächenbehandlung	74
3.2.1	Chitosan-induzierte Hemmung der Sporenkeimung und des Pilzwachstums ...	74
3.2.2	Inhibition der Koloniebildung von <i>Escherichia coli</i> auf Agaroseplatten	76
3.3	Antibakterielle Wirkung gelöster Chitosane	76
3.3.1	Einfluss auf die Proliferation von <i>Escherichia coli</i>	77
3.3.2	TEM Aufnahmen chitosanbehandelter <i>Escherichia coli</i> Bakterien	83
3.3.3	Effekt auf die Dehydrogenaseaktivität von <i>Escherichia coli</i>	87
3.3.4	Effekt auf die Dehydrogenaseaktivität von <i>Bacillus subtilis</i>	91
3.3.5	Beeinträchtigung der Lumineszenz bei <i>Vibrio fischeri</i>	94
3.3.6	Zusammenfassung der Wirksamkeit der Chitosane auf Mikroorganismen	97
3.4	Wirkung gelöster Chitosane auf eukaryotische Testsysteme	101
3.4.1	Einfluss auf die Arealdominanz von <i>Lemna minor</i>	101
3.4.2	Flächenwachstum von <i>Lemna minor</i> im <i>repeat dose</i> Experiment	105
3.4.3	Viabilität der Zelllinie Hep G2 im LDH-Test	110
4	Diskussion	115
4.1	Einflussnahme durch physikalisch-chemische Eigenschaften	115
4.1.1	Lagerung als beeinflussender Faktor	117
4.1.2	Sterilisation als beeinflussender Faktor	119
4.1.3	Einfluss des Schwermetallgehalts der Chitosane	120
4.2	Antimikrobielle Eigenschaften von Chitosanen bei Oberflächenbewuchs	121
4.2.1	Effekte auf Schimmelpilze	122
4.2.2	Effekte auf <i>Escherichia coli</i>	125
4.3	Antibakterielle Wirkung gelöster Chitosane	127
4.3.1	Wirkung auf gramnegative Bakterien	127
4.3.2	Wirkung auf grampositive Bakterien	143
4.3.3	Zusammenfassende Betrachtung der Mikroorganismen	145
4.4	Biokompatibilität gelöster Chitosane	152
4.4.1	Wirkung der Chitosane auf <i>Lemna minor</i>	152
4.4.2	Wirkung von Chitosan auf Hepatozyten unter neutralen pH-Konditionen	159
4.5	Antimikrobielle Wirkung versus Biokompatibilität der Chitosane	161
4.5.1	Methodische Aspekte	161
4.5.2	Bioverfügbarkeit im biologischen System	162
4.5.3	Vergleichende Wirkung von Chitosanen auf Pro- und Eukaryoten	163
4.6	Fazit und Ausblick	165
5	Literatur	167
	Herstellerangaben	181
	Abbildungsverzeichnis	185
	Tabellenverzeichnis	187
	Anhang	189

Abkürzungen und Konventionen

0.5	Alle Dezimalzahlen werden in dieser Arbeit nach dem amerikanischen System mit Punkt angegeben
1:2	Verhältnisangaben entsprechen durchgehend dem chemischen Standard (d.h. ein Verhältnis 1:2 entspricht einem Teil der Komponente A auf insgesamt 2 Teile Gesamtlösung. Somit enthält die Gesamtlösung zusätzlich einen Teil Komponente B)
¹³ C-NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Spektroskopie der Kohlenstoffisotops ¹³ C
¹ H-NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Spektroskopie der Wasserstoffisotops ¹ H
A	acetylierte Einheit, Kurzform bei Angabe der Primärstruktur
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5-triphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BN	Brown Norway, Inzuchtrattenstamm
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
C-6	Kohlenstoffatom an Position 6 (Zahl variiert)
CAMHB	<i>cation-adjusted Muller Hinton II broth</i>
CFU	<i>colony-forming unit</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	<i>Descriptions of fungi and bacteria</i>
COS	Chitosan-Oligosaccharide
D	deacetylierte Einheit, Kurzform bei Angabe der Primärstruktur
D.E.R. 736	Dipropylenglycoldiglycidylether
D _A	<i>degree of acetylation</i>
DD	<i>degree of de-acetylation</i>
DMAE	Dimethylaminoethanol
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
D _P	<i>degree of polymerisation</i>
DSM	Enumeration der DSMZ für Mikroorganismen und Medien
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC _{xx}	<i>Effect concentration</i> (bei einem Effekt von xx %)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Titriplex III
ERL 4206	Vinylcyclohexendiepoxyd
F _A	<i>fraction of acetylation</i>
FDA	US Food and Drug Administration
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GPC/SEC	<i>Gel Permeation Chromatography/Size Exclusion Chromatography</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
ID	Innendurchmesser
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
LD ₅₀	mittlere letale Dosis (Effekt bei 50 %)
LDH	Laktatdehydrogenase
<i>L. minor</i>	<i>Lemna minor</i>
LOEC	<i>lowest observed effect concentration</i>
M	Molar

MDO	membran derived oligosaccharides
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
M-H	Mark-Houwink-Strukturplot
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
M_N	<i>number averaged molecular weight</i>
M_W	<i>weight averaged molecular weight</i> , Molekulargewicht
N.A.	<i>not available</i> , nicht verfügbar
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NH ₂ -	Aminogruppe
NOEC	<i>no observed effect concentration</i>
NSA	Nonenylsuccininanhydrit
OD	optische Dichte (gilt als Synonym für die Absorption)
OD _x	optische Dichte bei x Nanometern
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OM	äußere Membran gram-negativer Bakterien
P _A	<i>pattern of acetylation</i>
PD	Polydispersität
pK-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstante K
pKa	Säurekonstante
R _h	hydrodynamischer Radius
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SL	Stammlösungen
TEA	Triethanolaminhydrochlorid
TEA	Triethanolaminpuffer
Tris	Trizma [®] base
UBA	Umweltbundesamt
VdW	Verfahrenstechnik der Wertstoffrückgewinnung
<i>V. fischeri</i>	<i>Vibrio fischeri</i> (neu klassifiziert als <i>Aliivibrio fischeri</i>)
WST-1 Reagenz	4-[3-(4-Jodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzol-Disulfonat
η	intrinsische Viskosität
RSD	relative Standardabweichung
H ₂ O	Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
HCl	Salzsäure
HAc	Essigsäure
\bar{x}_M	Mittelwert