

Metabolic Profiling von Fermentationsprodukten des *Escherichia coli* Stamms L1000

Lanshoeft Christian

Molecular Life Sciences, Chemie

Laves Arzneimittel GmbH, 6247 Schötz

KURZZUSAMMENFASSUNG

Ein qualitatives *Metabolic Profiling* des *Escherichia coli* Stamms L1000 bei aerober und anaerober Fermentation wurde mittels UPLC-QTOF-MS durchgeführt. Es wurden neben den bekannten Endprodukten der gemischten Säuregärung weitere organische Säuren intra- und extrazellulär gefunden. Es gibt Hinweise darauf, dass Pimelinsäure oder 7-Oxo-8-aminopelargonsäure, beides Metaboliten des Biotin-Stoffwechsels, in den Fermentationsprozessen beinhaltet sind.

EINLEITUNG

Kommensale *E.coli* synthetisieren Metabolite, die am Darmpithel positive Signale erzeugen. Dies führt zur Ausbildung einer gesunden Schleimhaut. Schleimhautstörungen können zu gravierenden Krankheitsbildern wie *Colitis Ulcerosa* oder *Morbus Crohn* führen [1]. Die genaue Kenntnis der Metaboliten klärt Interaktionen und den Wirkungsmechanismus dieser Mikroorganismen auf. Letzteres ist wiederum Voraussetzung für Produktoptimierung (*Metabolic Engineering*). Fakultativ anaerobe *E.coli*

können verschiedene Stoffwechselwege eingehen. Unter anaeroben Bedingungen ist es meist die gemischte Säuregärung. Durch vorherige Analysen wurde festgestellt, dass ein gewisser Anteil an Kohlenstoff in der theoretischen Gesamtbilanz fehlt. Deshalb sollte ein qualitatives *Metabolic Profiling* an verschiedenen Fermentationsprozessen des probiotischen *E.coli* L1000 durchgeführt werden, um aufzuklären, ob und welche Metaboliten, insbesondere organische Säuren, noch vorhanden sind.

RESULTATE

Neben den bekannten Endprodukten Succinat und Lactat konnten durch den erarbeiteten Workflow, der in Abb. 1 ersichtlich ist, weitere Säuren identifiziert werden. Acetat und Formiat konnten nicht mittels UPLC-QTOF-MS analysiert werden, weshalb die Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR) als zweite Analysemethoden eingesetzt wurde. Weitere Säuren sind zum

Beispiel: Äpfelsäure, die in allen Fermentationsprozessen detektiert wurde oder Nikotinsäure, die ausschliesslich intrazellulär in der aeroben Fermentation gefunden wurde. Es gibt Hinweise darauf, dass sich Metaboliten aus dem Biotinstoffwechsel in der Fermentation befinden und sekretiert werden. Die Verbindung $C_9H_{17}NO_3$ weist auf 7-Oxo-8-aminopelargonsäure hin, was in Abb. 2 dargestellt ist.

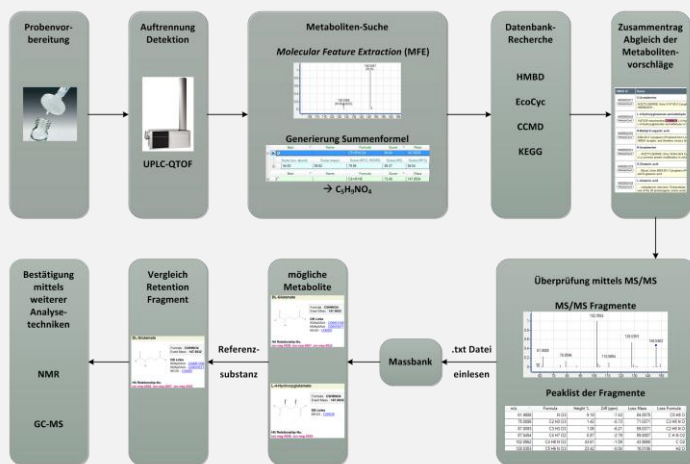
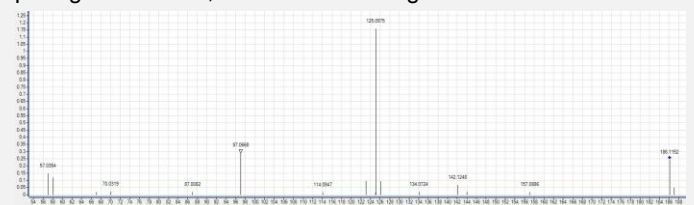


Abb. 1: Erarbeiteter und angewandter Workflow zum *Metabolic Profiling*



m/z	Ionenformel	Intensität [%]	Differenz [ppm]	vorgeschlagene Fragmente
57.0354	C_3H_5O	6.65	-14.10	
58.0309	C_2H_4NO	5.34	-12.46	
97.0668	C_6H_9O	13.29	-9.13	
125.0975	$C_8H_{13}O$	57.35	-2.21	
142.1248	$C_8H_{16}NO$	3.01	-7.51	
186.1152	[M-H]	13.27	-	

Abb. 2: MS/MS Fragmente der Verbindung $C_9H_{17}NO_3$

SCHLUSSFOLGERUNG

Da Summenformeln mit geringer Abweichung und hohen Scores generiert wurden, kann daraus geschlossen werden, dass die entwickelte UPLC-QTOF-MS Methode zur Analyse organischer Säuren in Fermentationsprodukten für das *Metabolic Pro-*

filling geeignet ist. Es wurde festgestellt, dass weitere Säuren neben den Endprodukten der gemischten Säuregärung in der Fermentation vorhanden sind. Es gibt Hinweise auf Metaboliten aus dem Biotin- und Porphyrin Stoffwechsel, die jedoch noch vollständig identifiziert werden müssen.

REFERENZEN

[1] Jacobi C. A.; Malfertheiner P., *Digestive Diseases*, 29, 6, 600-607, 2009

Begleitdozent: Prof. Dr. Götz Schlotterbeck

Experte: Dr. Markus Ehrat

Industrievertreter: Dr. Hans-Dieter Grimmecke