

**Isolation of a hydrophilic, antibacterial compound from  
strain *Streptomyces* Tü2401**

**Masterarbeit  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen**

**vorgelegt von  
Philipp Schneider  
Tübingen, September 2016**

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich,

- dass ich diese Arbeit selbst verfasst habe.
- dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt und dass ich alle wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommenen Aussagen als solche gekennzeichnet habe.
- dass die eingereichte Arbeit weder vollständig noch in wesentlichen Teilen Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens gewesen ist.

# **Abstract**

Abstract goes here

# **Danksagung**

I want to thank...

# Contents

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>8</b>
1.1	First part . . . . .	8
<b>2</b>	<b>Methods</b>	<b>13</b>
2.1	Chemicals & Instruments . . . . .	13
2.2	Strain Cultivation . . . . .	14
2.2.1	Batch Fermentation . . . . .	14
2.3	Sample Preparation . . . . .	15
2.3.1	Processing of Fermentation Broth . . . . .	15
2.4	Chromatographic Methods . . . . .	15
2.4.1	Thin Layer Chromatography . . . . .	15
2.4.2	Ion Exchange Chromatography . . . . .	15
2.4.3	Hydrophilic Interaction Chromatography . . . . .	15
2.4.4	High Performance Liquid Chromatography . . . . .	15
2.4.5	Mass Spectrometry . . . . .	15
<b>3</b>	<b>Results &amp; Discussion</b>	<b>17</b>
3.1	Allala . . . . .	17
<b>4</b>	<b>Appendix</b>	<b>19</b>
4.1	HPLC Methods . . . . .	19

# List of Figures

# List of Tables

1.1	Parameters of Merck ZIC-HILIC Column . . . . .	10
2.1	Used laboratory Instruments . . . . .	13
2.2	Components of HPLC systems . . . . .	14
2.3	A test table for HPLC Methods . . . . .	16

# 1 Introduction

## 1.1 First part

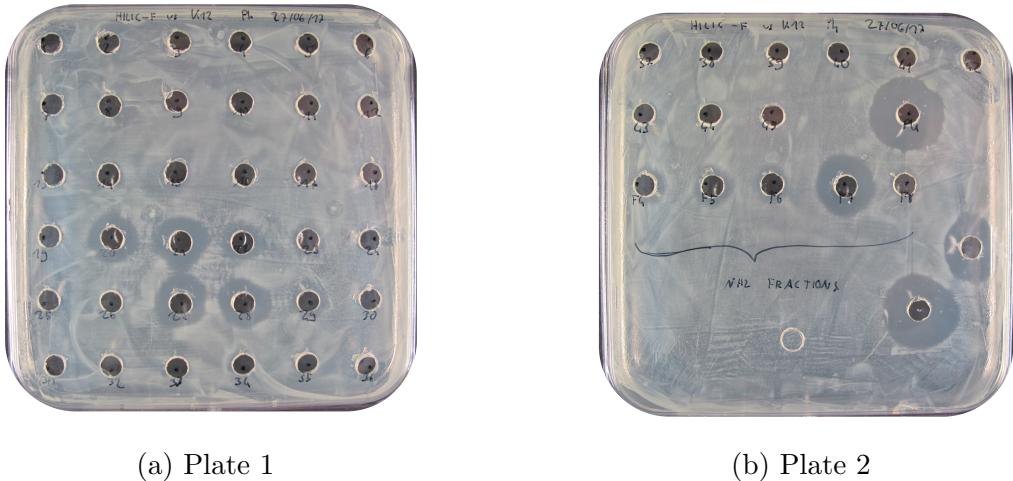
Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Fusce hendrerit efficitur orci id sodales. Nulla euismod sapien at velit efficitur, in interdum nunc pulvinar. Aenean tempor quis enim ut varius. Suspendisse pellentesque tincidunt elit, eget placerat nisl tempus non. Maecenas eget odio est. Maecenas in quam ut felis varius molestie. Donec porta eros nec leo egestas lacinia. Duis venenatis nulla lacus.

Vestibulum pretium porta nunc, ut rhoncus massa dapibus at. Duis in velit aliquam, malesuada lectus id, posuere leo. Integer malesuada sem sit amet turpis cursus vestibulum. Fusce nec libero in massa congue volutpat sit amet nec felis. Etiam pellentesque tortor at mattis lacinia. Duis sit amet mollis turpis, nec convallis tortor. Nullam quis quam lacinia, vulputate nisl id, rhoncus mi. Morbi congue, massa et elementum aliquet, odio tellus mollis nulla, eu aliquam risus est et erat. Nunc non leo arcu. Curabitur id congue ligula, sit amet imperdiet quam. Duis cursus urna nec sagittis cursus. In ac consectetur justo. Praesent tortor est, bibendum a porttitor sed, ultricies id dui. Praesent hendrerit nibh in posuere iaculis. Ut sed neque id leo luctus laoreet non ut quam.

Aliquam quis consectetur augue, ac commodo erat. Integer sed sapien nec dui dictum mattis. Duis sapien risus, consectetur vel velit ac, aliquet ultricies nunc. Curabitur sit amet ligula id odio pharetra suscipit et sit amet purus. Maecenas a malesuada nunc. Cras sed libero nisl. Sed gravida sed justo sed pulvinar. Vestibulum a maximus neque. Donec nec leo vel nibh euismod porttitor. Nullam tortor ex, vehicula convallis massa id, pharetra dignissim est. Proin bibendum nunc ut egestas ullamcorper. Nunc et ornare erat. Sed posuere purus non eros rutrum mattis.

Sed elit risus, interdum eget velit et, dignissim blandit nibh. Donec eu purus eu justo convallis accumsan. Etiam commodo venenatis libero, in mattis mauris blandit at. Fusce dignissim cursus massa id maximus. Praesent interdum risus et felis aliquet commodo.

## 1 Introduction



(a) Plate 1

(b) Plate 2

Figure 1.1: Plate assay of HILIC fractions against K12. asdöjj ösdj sdjkfj sfasdö sjjfkdjf lskfjsd öaskjös s djfkds ls s kj sdkjfksjf als slkd s

Duis dapibus sagittis sapien, id vehicula massa consequat a. Aenean sed felis a lectus mollis feugiat. Proin a lorem dictum, tempor augue ut, porttitor erat. Phasellus sed turpis id orci ultrices consequat efficitur et est. Quisque dignissim velit tellus. Duis ut nisi cursus, tincidunt nisi nec, sollicitudin dui. Nulla semper vitae mauris placerat scelerisque. Maecenas euismod a tellus ac pellentesque. Nunc ut justo dolor. Donec posuere sed justo a rhoncus. Nullam ac lacus sodales, bibendum nunc sit amet, tincidunt lorem.

Donec vitae tortor a felis dapibus suscipit ut ut sapien. Cras eleifend purus neque, auctor dui efficitur id. Curabitur convallis in eros vitae venenatis. Cras ligula ligula, vulputate at purus nec, facilisis hendrerit orci. Curabitur tempus ultrices quam, eu volutpat velit dignissim ac. Orci varius natoque penatibus et magnis dis parturient montes, nascetur ridiculus mus. Curabitur eros velit, sodales sed diam quis, imperdiet blandit orci. Sed convallis sollicitudin felis, ut sagittis ante faucibus ut. Pellentesque facilisis, velit nec ultrices pulvinar, turpis velit lacinia purus, non auctor felis dui vel ligula. Nullam nec tempus elit. Donec consectetur turpis erat, in iaculis risus mollis eget. Donec vulputate, eros in tincidunt iaculis, nisl odio hendrerit mauris, sit amet elementum enim mauris a orci. Proin a diam convallis, dapibus metus in, lacinia sem. Cras commodo molestie ipsum quis feugiat.

In lobortis est eu nulla suscipit facilisis. Proin consequat dapibus auctor. Maecenas nisi ante, convallis non dictum nec, auctor a libero. Quisque iaculis tincidunt nisl sit amet

## 1 Introduction

Table 1.1: Parameters of Merck ZIC-HILIC Column

Manufacturer	Line	Type	Dimensions
Merck	SeQuant®	ZIC-HILIC	150 × 4.6 mm
Phenomenex	Luna®	NH2	250 × 4.6 mm
Dr. Maisch	Nucleosil-100	C-18	100 × 2.5 mm

tristique. Suspendisse ultrices tincidunt diam, eget pharetra erat gravida vel. Curabitur sed augue nec mi tempus tempus. Ut viverra lacus nisl, eget tincidunt ipsum iaculis sagittis. Praesent interdum mi quis velit rutrum viverra. Quisque placerat eget magna ut dignissim. Duis finibus malesuada pharetra. Nulla cursus libero a nulla convallis, at iaculis ipsum euismod.

Curabitur euismod ante sed libero pretium bibendum. Nunc vestibulum est non finibus pellentesque. Etiam nec elit in nulla mollis placerat. Nullam sit amet vehicula leo, finibus semper ante. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia Curae; Curabitur nulla erat, consequat vel dolor luctus, tristique ultrices velit. Integer consequat justo iaculis tortor semper, vitae bibendum velit commodo. Proin in molestie odio. Cras eget justo urna. Etiam porttitor, quam ac consectetur sodales, ante sem dictum magna, id ullamcorper orci nunc at sem. In hac habitasse platea dictumst. Mauris sed justo eu ante facilisis tincidunt. Sed placerat velit et risus congue volutpat a sed ipsum. Aliquam fermentum nulla congue dui imperdiet, quis accumsan magna posuere. Vivamus laoreet arcu ut felis blandit imperdiet.

Etiam egestas magna a odio tincidunt venenatis. Nullam fermentum nisl et est fringilla ullamcorper. Duis vulputate condimentum enim vel pulvinar. Mauris tristique id mi sit amet molestie. Ut auctor et diam ac egestas. Sed augue tellus, vestibulum id massa in, maximus eleifend tellus. Nullam laoreet ex vitae gravida tempus. Fusce tempus pretium quam pulvinar commodo. Nulla lobortis iaculis placerat. Pellentesque arcu purus, ornare id mollis at, sollicitudin non elit. Suspendisse rutrum mi a neque dictum eleifend at sed lorem. Aenean ornare at sem ac cursus. Vivamus sit amet ante luctus orci venenatis imperdiet eu vitae enim. Curabitur varius fermentum dui, sed lacinia nulla euismod eu.

Suspendisse euismod id velit vitae hendrerit. Vestibulum vel lectus sit amet ante iaculis euismod. Vestibulum ullamcorper quis neque id varius. Quisque eget ipsum arcu. Integer et nisi eu ante ultrices semper id vel metus. In hac habitasse platea dictumst. Fusce eu leo euismod, consectetur augue aliquam, egestas risus. Ut vel aliquam dui. Aliquam ullamcorper felis ligula, quis semper arcu semper sit amet.

## 1 Introduction

Duis interdum pulvinar lacus. Suspendisse eget tellus eget urna fermentum porttitor et non massa. Cras euismod suscipit massa quis fringilla. Ut dictum aliquet est. Nunc ac tincidunt tortor, id molestie turpis. Sed tristique, metus sed hendrerit porttitor, lorem nibh molestie lacus, vel scelerisque nibh dolor finibus lorem. Donec suscipit nunc arcu, et ultricies sem consequat vitae. Sed purus ipsum, hendrerit non odio ut, rhoncus aliquam ligula. Sed dui neque, rhoncus nec maximus a, auctor et lectus.

Donec et sollicitudin sem. Aenean aliquet magna sed nisi tristique, sit amet rhoncus elit consequat. Nam euismod enim quam, non placerat eros ultricies eu. Vivamus luctus ultricies neque vitae ornare. Aliquam turpis magna, cursus vel ornare at, egestas vel metus. Vivamus et eros iaculis massa blandit egestas et eu ante. Mauris non aliquam ipsum, eget fringilla velit. Nullam molestie erat velit, nec consequat risus varius in. Pellentesque euismod arcu et lectus aliquam, eu dapibus metus dapibus.

Vestibulum et vulputate risus. Curabitur volutpat arcu eget nunc elementum, a porta sem iaculis. Nunc in leo non dolor dignissim consectetur. Mauris dignissim scelerisque diam, non posuere sem vulputate non. Nullam sagittis condimentum sapien pellentesque gravida. Nam dignissim sapien at nibh faucibus maximus in ac est. Ut id lobortis tortor, in tristique nunc. Proin id odio urna. In leo mi, scelerisque nec ligula in, scelerisque mattis massa. Pellentesque porttitor feugiat nisl tincidunt porta. Fusce sagittis vehicula neque, in bibendum lorem aliquet ut. Sed mollis in risus quis pharetra. Maecenas vulputate sed dolor ac pellentesque. Vivamus vel tincidunt ligula, sed facilisis eros. Duis vulputate tortor ut nibh efficitur, at ullamcorper elit ultricies.

Donec nec malesuada ante, at mollis lectus. Vivamus maximus elementum dolor ac varius. Donec efficitur mollis laoreet. Maecenas commodo lectus at leo rhoncus, sed egestas justo congue. Proin quis volutpat nulla. Morbi feugiat dictum lacus vitae convallis. Sed sed sapien vel nunc consectetur congue.

Nam ultrices eros vel porta iaculis. Quisque lacus nibh, egestas at lacus at, efficitur vehicula est. Mauris eu lorem sit amet orci volutpat posuere. Nullam sed leo non ante posuere varius. Morbi pulvinar venenatis urna ut gravida. Donec aliquet nec magna ut sollicitudin. Pellentesque fringilla est vitae congue dictum. Vivamus et libero tortor. Ut pellentesque vitae turpis eleifend ultricies.

In hac habitasse platea dictumst. Donec elementum nisl eu ullamcorper accumsan. Vivamus maximus tempor lorem eu posuere. Nulla nec ullamcorper massa. Aliquam in ex vitae nulla blandit dignissim. Ut luctus fringilla lorem, nec imperdiet libero malesuada nec. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis

## *1 Introduction*

egestas. Nunc dictum arcu non sapien interdum sollicitudin non id leo.

Mauris condimentum lorem vel mi ultrices, eu condimentum neque rutrum. Duis vestibulum eros nec bibendum venenatis. Proin hendrerit elit nisi, sit amet porta lorem lacinia ut. Curabitur vel lacus vulputate, iaculis mi id, fringilla diam. Sed ultricies leo metus, nec porttitor magna posuere et. Duis id leo nec mauris posuere pharetra vel eget quam. Sed vitae sem blandit, tincidunt velit et, auctor lectus. Proin laoreet at felis vitae dignissim. Praesent vitae aliquet lectus. Praesent congue non turpis sit amet venenatis. Vestibulum sit amet nibh in felis dapibus laoreet. Donec sed justo sit amet dolor cursus molestie.

Duis hendrerit mauris sed nulla commodo, sodales iaculis mi tristique. Donec quis sagittis lorem, nec ultrices mauris. Praesent ornare in quam vel suscipit. Donec sed justo diam. Vivamus iaculis euismod est ac euismod. Sed dictum neque ac varius viverra. Fusce purus dui, cursus sit amet molestie condimentum, malesuada a ligula. Morbi eu convallis neque. Donec ligula nibh, semper non interdum non, lacinia quis dolor. Nam hendrerit quam vel consectetur facilisis. Morbi finibus, arcu vitae vulputate cursus, justo mi condimentum.

Test mit  $\mu$

# 2 Methods

## 2.1 Chemicals & Instruments

### Chemicals

The used instruments are listed in table 2.1.

Table 2.1: Used laboratory Instruments

Instrument	Model	Manufacturer
Centrifuges	Megafuge 1.0 (R)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany
	Centrifuge 5417 C	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
	RC6 Plus Centrifuge	Sorvall Ltd., Delaware, USA
Lyophilizator	LyoVac GT2	Leybold GmbH, Cologne, Germany
Spectrophotometer	BioMate 3S	Thermo Fisher, Waltham, USA
Rotary Evaporator	Hei-Vap Precision	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany
	Rotavapor RE + PC 3001 VARIO Pump	Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland + vacu- brand GmbH, Essen, Germany

High performance liquid chromatography (HPLC) systems were manufactured by

## 2 Methods

AgilentThe components of the HPLC systems are listed in Table 2.2.

Table 2.2: Components of HPLC systems

	<b>Component</b>	<b>Description</b>
Agilent 1100 Series	G1322A	Degasser
	G1311A	Quaternary Pump
	G1313A	Autosampler
	G1316A	Column Compartment
	G1315B	Diode Array Detector
Agilent 1200 Series	G1379B	Degasser
	G1312A	Binary Pump
	G1367B	Autosampler
	G1330B	Thermostat
	G1316A	Column Compartment
	G1315B	Diode Array Detector
Agilent 1260 Infinity	G4225A	Degasser
	G1312C	Binary Pump
	G1329B	Autosampler
	G1330B	Thermostat
	G1316A	Column Compartment
	G1315D	Diode Array Detector

## 2.2 Strain Cultivation

### 2.2.1 Batch Fermentation

The strain Tü2401 was cultivated at a ten-litre scale in a continuous stirred tank bioreactor. 500 ml of pre-culture were grown in five 500 ml round flasks containing 100 ml of NL 410 medium without CaCO<sub>3</sub>. The pre-cultures were inoculated from stored ISP-agar plates and grown for 72 h at 27 °C. The pre-cultures were pooled and used to inoculate 9.5 l of NL OM medium for fermentation. The temperature was kept at 27 °C with an airflow of 5 l/min and a rotor speed of 200 rpm. Control samples of 15 ml were taken throughout the process at regular intervals. Fermentation was stopped after 125 h and the culture

## *2 Methods*

broth was harvested. Further processing is described in 2.3.1.

### **2.3 Sample Preparation**

#### **2.3.1 Processing of Fermentation Broth**

The harvested fermentation broth was supplemented with diatomaceous earth and filtered through Pall T 1500 filter plates (relative retention range 10 - 30  $\mu\text{m}$ ). The remaining filter cake was discarded and the filtrate transferred to a stirring bucket. Two liters of ethyl acetate were added to the filtrate and stirred for 30 min. After completed phase-separation, the organic phase was collected and the aqueous phase reused for further extraction. The process was repeated five times.

### **2.4 Chromatographic Methods**

#### **2.4.1 Thin Layer Chromatography**

#### **2.4.2 Ion Exchange Chromatography**

#### **2.4.3 Hydrophilic Interaction Chromatography**

Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) was performed with a 4,6 x 250 mm ZIC-HILIC Column (Merck). It features zwitterionic, functional groups on poly(etherether ketone) (PEEK) material. 10 mM Ammonium acetate in Milli-Q H<sub>2</sub>O was used as solvent A, while Acetonitrile comprised solvent B. Detailed method descriptions regarding solvent composition, flow and duration are listed in the appendix.

#### **2.4.4 High Performance Liquid Chromatography**

#### **2.4.5 Mass Spectrometry**

A test table should be here

## *2 Methods*

Table 2.3: A test table for HPLC Methods

	<b>Component</b>	<b>Description</b>
HPLC Parameters	System	
	Column	
	Injection volume	50 µL
	Flow	
	Temperature	
	Solvents	Solvent A: H <sub>2</sub> O Solvent B: Acetonitrile
	Method	Isocratic, 80 % B 60 min
MS Parameters	Capillary Voltage	3500 V
	Temperature	350 °C
	Target Mass	250 m/z

# 3 Results & Discussion

## 3.1 Allala

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Fusce hendrerit efficitur orci id sodales. Nulla euismod sapien at velit efficitur, in interdum nunc pulvinar. Aenean tempor quis enim ut varius. Suspendisse pellentesque tincidunt elit, eget placerat nisl tempus non. Maecenas eget odio est. Maecenas in quam ut felis varius figure 3.1 molestie. Donec porta eros nec leo egestas lacinia. Duis venenatis nulla lacus.



Figure 3.1: Bioassay with fractions against *E. coli* K12

Vestibulum pretium porta nunc, ut rhoncus massa dapibus at. Duis in velit aliquam, malesuada lectus id, posuere leo. Integer malesuada sem sit amet turpis cursus vestibulum. Fusce nec libero in massa congue volutpat sit amet nec felis. Etiam pellentesque tortor at mattis lacinia. Duis sit amet mollis turpis, nec convallis tortor. Nullam quis quam lacinia, vulputate nisl id, rhoncus mi. Morbi congue, massa et elementum aliquet, odio

### *3 Results & Discussion*

tellus mollis nulla, eu aliquam risus est et erat. Nunc non leo arcu. Curabitur id congue ligula, sit amet imperdiet quam. Duis cursus urna nec sagittis cursus. In ac consectetur justo. Praesent tortor est, bibendum a porttitor sed, ultricies id dui. Praesent hendrerit nibh in posuere iaculis. Ut sed neque id leo luctus laoreet non ut quam.

# **4 Appendix**

## **4.1 HPLC Methods**