



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 010 527 B4** 2009.06.25

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 010 527.9**
 (22) Anmeldetag: **22.02.2008**
 (43) Offenlegungstag: **02.01.2009**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **25.06.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/02** (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(30) Unionspriorität:

10-2007-0018752 24.02.2007 KR
10-2007-0112892 06.11.2007 KR

(73) Patentinhaber:

**Industry-University Cooperation Foundation
 Sogang University, Seoul, KR; Kookmin
 University Industry Academy Cooperation
 Foundation, Seoul, KR**

(74) Vertreter:

**Grosse, Schumacher, Knauer, von Hirschhausen,
 80335 München**

(72) Erfinder:

**Lee, Jeong-Kug, Seoul, KR; Rhee, Hae-Jin,
 Namyangju-si, Kyonggi, KR; Kim, Eui-Jin, Seoul,
 KR; Sung, Moon-Hee, Yuseong-gu, Daejeon, KR**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:

**WOLFRAM, M.: "Reach-Through Claims" und
 "Reach-Through Licensing" - Wie weit kann
 Patentschutz auf biotechnologische Research
 Tools reichen? Mitt. 2/2003, S. 57-64
 (gutachtlich)**

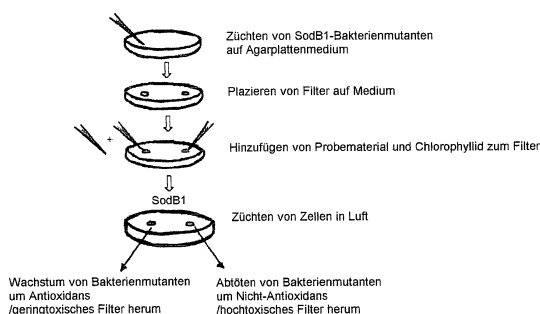
**Datenbank PubMed, Zusammenfassung zu: KIM,
 E.J. u.a.: Superoxide generation by
 chlorophyllide a reductase of Rhodobacter
 sphaeroides, J. Biol. Chem. (15.02.2008,
 elektronisch veröffentlicht
 12.12.2007)283(7)3718-30 [recherchiert am
 28.07. 2008] (gutachtlich)**

**NOMATA, J. u.a.: A second nitrogenase-like
 enzyme for bacteriochlorophyll biosynthesis:
 reconstitution of chlorophyllide a reductase
 with purified X-protein (BchX) and YZ- protein
 (BchY-BchZ) from Rhodobacter capsulatus, J.
 Biol. Chem. (2006)281(21)15021-8**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Screening eines Antioxidans unter Verwendung von Bakterienmutanten und Chlorophyllid**

(57) Hauptanspruch: Verfahren für ein Screening eines Antioxidans unter Verwendung von Bakterienmutanten und Chlorophyllid, beinhaltend:

Züchten von Bakterienmutanten auf einem Agarplattenmedium, wobei die Bakterien eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweisen; Platzieren einer Mehrzahl von Filterscheiben, mit zugesetzten zu screenenden Antioxidans-Kandidatenmaterialien und Chlorophyllid, auf das Agarplattenmedium; und Selektieren der Filterscheiben, bei denen ein Wachstum der Bakterienmutanten beobachtet wird.



Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Screening eines Antioxidans unter Verwendung von Bakterienmutanten und Chlorophyllid. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum mühelosen Screening eines Antioxidans durch Beobachten von Wachstumsprofilen gewisser Bakterienmutanten in Filterscheiben oder Mediumblöcken mit zugesetztem Chlorophyllid, und ein Antioxidans, das einem Screening mittels des Verfahrens unterzogen wird.

Beschreibung der verwandten Technik

[0002] Wie Fachleuten allgemein bekannt ist, weisen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder sauerstofffreie Radikale unerwünschte oxidierende Eigenschaften im Körper auf, durch welche eine derartige molekulare Spezies zu einer Schädigung von Zellmembranen, DNA und verschiedenen Zellstrukturen beiträgt und, entweder direkt oder indirekt, als Krankheitsverursacher verschiedener Krankheiten, wie beispielsweise Krebs, Arteriosklerose, Diabetes, Gehirnschlag, Myokardinfarkt, Hepatitis, Nephritis, atopische Krankheiten, Parkinson'sche Krankheit, und dergleichen, verantwortlich ist. Superoxid ist eine reaktive Sauerstoffspezies und wird dadurch erzeugt, dass molekularer Sauerstoff durch Aufnahme eines zusätzlichen Elektrons zu einem Superoxid-Anion (O^{2-}) reduziert wird, und zwar im Verlauf des Sauerstoff-Stoffwechselprozesses in lebenden Organismen. Superoxid ist äußerst reaktiv, was zu einer irreversiblen Zerstörung von die Organismen bildenden Biomaterialien, wie beispielsweise Nucleinsäuren, Proteinen und Lipiden führt. Insbesondere werden durch Superoxid Fe^{3+} -Ionen zu Fe^{2+} -Ionen reduziert, wenn Fe^{3+} -Ionen vorhanden sind, und die auf diese Weise reduzierten Fe^{2+} -Ionen reagieren mit Wasserstoffperoxid, so dass Hydroxy-Radikale erzeugt werden. Die auf diese Weise erzeugten Hydroxy-Radikale reagieren mit DNA-Molekülen in vivo, was in der Folge bekanntermaßen eine Inhibierung von Stoffwechsel und Homöostase des Organismus bewirkt, beispielsweise eine in vivo Mutagenese, eine Zerstörung der Eisen-Schwefel-(Fe/S)-Zentren von Proteinen, eine Peroxidation von Lipiden, und dergleichen (Imlay, J. A., 2003, Ann. Rev. Microbiol. 57: 395–418).

[0003] Daher wird eine große Wichtigkeit Antioxidansmaterialien beigemessen, die fähig sind, die Zytotoxizität von reaktiven Sauerstoffspezies, einschließlich Superoxid-Anion-Radikalen, zu reduzieren oder fähig sind, die reaktiven Sauerstoffspezies direkt zu inaktivieren, und verschiedene Verfahren für ein Screening gewünschter Antioxidantien wurden entwickelt. Beispielsweise wurden Antioxidantien mittels eines Verfahrens untersucht und entwickelt, das Farb- oder Fluoreszenzänderungen mutmaßlicher Kandidatenmaterialien mittels der in vitro Redoxreaktion ausnützt, mittels eines Verfahrens, das eine DNA-Kettenspaltung ausnützt, oder eines Verfahrens, das Spin-Trap-Agentien nutzt, die fähig sind, mit den reaktiven Sauerstoffspezies spezifisch zu reagieren. Jedoch besteht bei den meisten der Antioxidantien, die mittels dieser Verfahren entwickelt wurden, der Nachteil eingeschränkter Verwendungs- und Anwendungsmöglichkeiten aufgrund geringer Bioverfügbarkeit, die von einer beträchtlichen in vivo Absorption oder einem möglichen Toxizitätsrisiko für die Organismen herrührt. Weiter müssen, da die zuvor erwähnten Verfahren eine in vitro Untersuchung der Antioxidans-Aktivität involvieren, eine in vivo Effizienz, die Sicherheit und die Antioxidans-Spezifität des Antioxidans-Kandidaten durch wiederholte mehrfache Screening-Prozesse überprüft werden.

[0004] Trotz hervorragender Biomembrandurchlässigkeit und Bioverfügbarkeit sowie hoher Antioxidans-Aktivität können fettlösliche Antioxidantien schädliche Effekte auf einen Zellkörper bedingen, da sie hauptsächlich in verschiedenen intrazellulären Membranen lokalisiert werden, was es schwierig macht, die Antioxidans-Wirkung beim wässrigen Zielort auszuüben, bei dem reaktive Sauerstoffspezies erzeugt werden. Auch ist es schwierig, die fettlöslichen Antioxidantien, nach Reaktion mit den ROS oder RNS (reaktive Stickstoffspezies) in der Leber in hydrophilere Formen zu metabolisieren, was ein Ausscheiden der hydrophoben chemischen Stoffe aus dem Körper erleichtert. Andererseits bieten wasserlösliche Antioxidantien ein müheloses Ausscheiden der oxidierten Antioxidantien, weisen jedoch geringe Biomembran-Durchlässigkeit auf, wodurch verschiedene Probleme entstehen, die mit Zellmembranschutzeffekten und der Schwierigkeit eines Diffundierens des Antioxidans in intrazelluläre Organellen einhergehen. Daher besteht ein Bedarf nach einer Entwicklung eines amphiphilen Antioxidans, das mühelos in ein gewünschtes Antioxidans-Präparat formuliert werden kann, dadurch dass es sowohl über Wasserlöslichkeit als auch über Fettlöslichkeit verfügt, damit es den gewünschten Einsatz- und Anwendungsmöglichkeiten des Antioxidans genügt.

[0005] Unterdessen bieten Mikroorganismen der Gattung Rhodobacter, bei denen es sich um Photosynthe-

se-Nichtschwefelpurpurbakterien handelt, den Vorteil, dass beispielsweise keine Sauerstoffentwicklung während des Photosyntheseprozesses auftritt, anders als bei Algen- oder Pflanzenphotosynthese, sowie die Fähigkeit zu Wachstum und Proliferation unter verschiedenen Kulturbedingungen, z. B. aeroben Bedingungen, anaeroben dunklen Bedingungen und anaeroben hellen Bedingungen. Insbesondere führen Mitglieder der phototrophen Rhodobacter-Gattung eine Reihe von Zellmembran-assoziierten Elektronentransferprozessen durch Absorption von langwelligem Licht mittels des Bakteriochlorophyll-Pigmente enthaltenen Photosyntheseapparates unter anaeroben Lichtbedingungen aus, was zu einer Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie führt, und die auf diese Weise erzeugte chemische Energie wird als Energie verwendet, die für eine Vielzahl von Zellstoffwechselaktivitäten, beispielsweise Kohlenstoffdioxid-Fixierung, benötigt wird. Bei den Photosynthese-Bakterien ist ein multimeres Protein, bei dem es sich um eines der Enzyme handelt, die als Mediator beim Stoffwechselprozess zur Synthese von Bakteriochlorophyll fungieren, und das durch Expression von drei Genen bchX, bchY und bchZ erzeugt wird, dafür bekannt, dass es Chlorophyllid-reduzierende Aktivitäten aufweist.

[0006] Die koreanische Patentanmeldungspublikation Nr. 2007-59485 A1 offenbart ein multimeres Protein als Superoxid-erzeugendes Enzym, das von Rhodobacter sphaeroides her stammt ist. Gemäß diesem Patent erzeugt das multimeres Protein Superoxide in vivo und in vitro, wenn Chlorophyllid als amphiphiles Substrat vorhanden ist, so dass es möglich ist, Zellen, die das multimeres Protein exprimieren, selektiv abzutöten. Jedoch erwähnt diese Patentpublikation lediglich eine Funktion des multimeren Proteins als Superoxid-erzeugendes Reagens, schlägt jedoch keine Details und Schemata zur praktischen Anwendung eines derartigen Proteins auf ein Antioxidans-Screeningverfahren vor.

INHALT DER ERFINDUNG

[0007] Daher erfolgte die Erfindung in Anbetracht der zuvor erläuterten Probleme, und es ist ein Ziel der Erfindung, ein Verfahren zum Screening eines Antioxidans bereitzustellen, das fähig ist, ein selektives Screening eines amphiphilen Antioxidans in industriellem Maßstab mittels eines einfachen Verfahrens durchzuführen.

[0008] Gemäß einem Aspekt der Erfindung können die zuvor beschriebenen und weitere Ziele durch Bereitstellen eines Verfahrens zum Screening eines Antioxidans unter Verwendung von Bakterienmutanten und Chlorophyllid bewerkstelligt werden, beinhaltend:

Züchten von Bakterienmutanten auf einem Agarplattenmedium, wobei die Bakterien eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweisen;

Platzieren einer Mehrzahl von Filterscheiben, mit zugesetzten zu screenenden Antioxidans-Kandidatenmaterialien und Chlorophyllid, auf das Agarplattenmedium; und

Selektieren der Filterscheiben, bei denen ein Wachstum der Bakterienmutanten beobachtet wird.

[0009] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zum Screening eines Antioxidans unter Verwendung von Bakterienmutanten und Chlorophyllid bereitgestellt, beinhaltend:

Zusetzen von Chlorophyllid zu einem Agarplattenmedium zur Bakterienzucht, und Zerschneiden des Agarplattenmediums in Blockform, um dadurch eine Mehrzahl von zugesetztes Chlorophyllid aufweisenden Mediumblöcken zu erzeugen;

Platzieren einer Mehrzahl von Mediumblöcken auf eine Petrischale zur Bakterienzucht;

einer Mehrzahl der Mediumblöcke werden zu screenende Antioxidans-Kandidatenmaterialien und Bakterienmutanten zugesetzt, die eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweisen; und

Selektieren der Mediumblöcke, bei denen ein Wachstum der Bakterienmutanten beobachtet wird.

[0010] Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die Bakterienmutanten Chlorophyllid-Reduktase exprimieren, das ein multimeres Protein ist, welches eine Erzeugung von Superoxid-Anionen bei Vorhandensein von Sauerstoff herbeiführt.

[0011] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die Bakterienmutanten beispielsweise Rhodobacter sphaeroides, Rhodospirillum rubrum, Rhodopseudomonas palustris, Allochromatium vinosum, Chlorobium tepidum oder Chloroflexus aurantiacus sein.

[0012] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die Bakterienmutanten transformiert sein, um ein Überexprimieren von Chlorophyllid-Reduktase auszuführen, das ein multimeres Protein ist, welches eine Erzeugung von Superoxid-Anionen bei Vorhandensein von Sauerstoff herbeiführt.

[0013] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann das Transformieren der Bakterien, in welche eine Mutation eingebracht werden soll (nachfolgend als "Mutationsziel-Bakterien" bezeichnet) ausgeführt werden durch:

es wird ein erster rekombinanter Vektor, der eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweist, und ein zweiter rekombinanter Expressionsvektor erzeugt, der zum Überexpressieren eines multimeren Proteins fähig ist, das eine Erzeugung von Superoxid-Anionen bei Vorhandensein von Sauerstoff herbeiführt;

es wird ein erster E.-coli-Transformant mit Einfügen des ersten rekombinanten Vektors und ein zweiter E.-coli-Transformant mit Einfügen des zweiten rekombinanten Expressionsvektors erzeugt, und zwar unter Verwendung des ersten rekombinanten Vektors bzw. des zweiten rekombinanten Expressionsvektors; und die ersten und zweiten E.-coli-Transformanten mit den Mutationsziel-Bakterien werden konjugiert, um Bakterienmutanten zu erzeugen.

[0014] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die transformierten Bakterien *Rhodobactersphaeroides* 2.4.1 SodB1 [KCTC 11069BP] sein.

[0015] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erzeugen die Bakterienmutanten bei Vorhandensein von Chlorophyllid unterhalb einer Sauerstoffkonzentration von 1 bis 3% kein Wasserstoffperoxid, und sie können eine Aktivität eines Erzeugens von Superoxid-Anionen aufweisen.

[0016] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann eine Menge an Chlorophyllid, die der Filterscheibe oder dem Agarplattenmedium zugesetzt wird, zwischen 0,1 mM bis 100 mM liegen.

[0017] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Filterscheibe einen Durchmesser von 5 bis 20 mm und eine Dicke von 0,1 bis 1 mm haben, und der Mediumblock kann einen Durchmesser von 10 bis 30 mm und eine Dicke von 5 bis 15 mm haben.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0018] [Fig. 1](#) ist ein schematisches Prozessdiagramm, das ein Antioxidans-Screeningverfahren unter Verwendung einer Mehrzahl von Filterscheiben mit zugesetztem Chlorophyllid zeigt, als Beispiel eines Verfahrens zum Screening eines Antioxidans gemäß der Erfindung;

[0019] [Fig. 2](#) ist ein schematisches Ablaufdiagramm, das ein Antioxidans-Screeningverfahren unter Verwendung einer Mehrzahl von Mediumblocken darstellt, als weiteres Beispiel eines Antioxidans-Screeningverfahrens gemäß der Erfindung;

[0020] [Fig. 3](#) ist eine Fotografie, welche die Ergebnisse von SDS-PAGE unter Verwendung von 12%igem Polyacrylamid-Gel zeigt, folgend auf eine Purifizierung eines Zielproteins nach einer Expression von BchX-, BchY- und BchZ-Genen in ein rekombinantes Protein mit einem His-Tag in *E. coli*;

[0021] [Fig. 4](#) ist eine Fotografie, welche die Vergleichsergebnisse von Bakterienwachstumsprofilen zeigt, die bei Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein einer Antioxidans-Aktivität in einem Antioxidans-Kandidatenmaterial beobachtet wurden, beim Screening eines Antioxidans unter Verwendung von Mediumblocken gemäß der Erfindung;

[0022] [Fig. 5](#) ist eine Fotografie, welche die Beobachtungsergebnisse für Bakterienwachstumsprofile für einen Vergleich einer Antioxidans-Aktivität eines Antioxidans-Pch212, das gemäß der Erfindung einem Screening unterzogen wurde, mit derjenigen eines herkömmlichen Antioxidans zeigt; und

[0023] [Fig. 6](#) ist ein Graph, der die Bestätigungsergebnisse für eine Antioxidans-Aktivität eines Antioxidans-Pch212 zeigt, das einem Screening gemäß der Erfindung unterzogen wurde, und zwar durch Reduktion von Cytochromen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0024] Nachfolgend wird die Erfindung detailliert beschrieben.

[0025] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum selektiven Screening eines gewünschten Antioxidans aus verschiedenen Kandidatenmaterialien unter Verwendung von Chlorophyllid und Bakterienmutanten, und ein An-

tioxidans, das einem Screening mittels dieses Verfahrens unterzogen wird. Das Antioxidans-Screeningverfahren stellt ein müheloses Screening des gewünschten Antioxidans durch Beobachten von Wachstumsprofilen gewisser Bakterienmutanten in Filterscheiben oder Mediumblöcken dar, denen Chlorophyllid zugesetzt wurde.

[0026] Die Erfindung stellt eine Herstellung der Photosynthese-Bakterienmutanten bereit, die eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweist.

[0027] Bei Bakterien vom Wild-Typ besteht möglicherweise eine Abschwächung der Superoxid-vermittelten Zytotoxizität, bedingt durch die Expression von Superoxiddismutase, welche die erzeugten Superoxid-Anionen in Wasserstoffperoxid umwandelt, hingegen besteht bei den Bakterienmutanten gemäß der Erfindung, im Vergleich zu den Bakterien vom Wild-Typ, bedingt durch eine Suppression einer Superoxiddismutase-Aktivität eine ziemlich signifikante Superoxid-vermittelte Zytotoxizität.

[0028] Daher werden die Bakterienmutanten gemäß der Erfindung aufgrund des Vorhandenseins von Superoxid-Anionen abgetötet, die durch die enzymatische Wirkung des multimeren Proteins auf Chlorophyllid erzeugt werden, hemmen jedoch die Zytotoxizität von Superoxid-Anionen, wenn ein gewisses Kandidatenmaterial, das eine Antioxidans-Aktivität aufweist, in dem zu screenenden Kandidatenmaterialien vorhanden ist. Als Ergebnis können die Bakterienmutanten überleben und wachsen, wodurch ein müheloses Screening von Kandidatenmaterialien ermöglicht wird, die eine Antioxidans-Aktivität aufweisen, und zwar basierend darauf, ob die Bakterienmutanten wachsen, oder nicht.

[0029] Insbesondere beinhaltet das Antioxidans-Screeningverfahren gemäß der Erfindung, dass Bakterienmutanten auf einem Agarplattenmedium gezüchtet werden, wobei die Bakterien eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweisen; eine Mehrzahl von Filterscheiben, mit zugesetzten zu screenenden Antioxidans-Kandidatenmaterialien und Chlorophyllid, auf das Agarplattenmedium platziert werden; und die Filterscheiben, bei denen ein Wachstum der Bakterienmutanten beobachtet wird, selektiert werden.

[0030] [Fig. 1](#) zeigt ein schematisches Ablaufdiagramm für das Antioxidans-Screeningverfahren.

[0031] Beim zuvor erwähnten Verfahren werden eine Mehrzahl von Filterscheiben zum Hinzufügen von Chlorophyllid und Antioxidans-Kandidatenmaterialien verwendet, nach Anlegen einer Zellkultur der Bakterienmutanten.

[0032] Alternativ ist es ebenfalls möglich, dass das Antioxidans-Screeningverfahren durch Vorbereiten von Mediumblöcken mit zugesetztem Chlorophyllid ausgeführt wird, gefolgt von einem Zusetzen der Bakterienmutanten und der Antioxidans-Kandidatenmaterialien. Dieses Antioxidans-Screeningverfahren gemäß der Erfindung beinhaltet, dass einem Agarplattenmedium zur Bakterienzucht Chlorophyllid zugesetzt wird, und das Agarplattenmediums in Blockform zerschnitten wird, um dadurch eine Mehrzahl von zugesetztes Chlorophyllid aufweisenden Mediumblöcken zu erzeugen; eine Mehrzahl von Mediumblöcken auf eine Petrischale zur Bakterienzucht platziert wird; einer Mehrzahl der Mediumblöcke zu screenende Antioxidans-Kandidatenmaterialien und Bakterienmutanten zugesetzt werden, die eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweisen; und die Mediumblöcke selektiert werden, bei denen ein Wachstum der Bakterienmutanten beobachtet wird. [Fig. 2](#) zeigt ein schematisches Ablaufdiagramm für ein derartiges Antioxidans-Screeningverfahren.

[0033] Insbesondere ist das Antioxidans-Screeningverfahren gemäß der Erfindung für ein müheloses Screening eines amphiphilen Antioxidans von Nutzen, das sowohl über Wasserlöslichkeit als auch Fettlöslichkeit verfügt. Das heißt, wenn das Antioxidans-Kandidatenmaterial keine Wasserlöslichkeitseigenschaften aufweist, wird die Löslichkeit des Materials in der Filterscheibe oder dem Mediumblock gesenkt, was zu einer geringen Intrazellular-Diffusion des Antioxidans-Materials führt. Wenn andererseits das Antioxidans-Kandidatenmaterial keine Fettlöslichkeitseigenschaften aufweist, kann dies zu einer Beeinträchtigung der Zellmembrandurchlässigkeit führen, wodurch die intrazelluläre Absorptionsfähigkeit verringert wird, und daher ist es unmöglich, eine Superoxid-vermittelte Toxizität in effektiver Weise zu inhibieren. Daher tragen, gemäß dem Antioxidans-Screeningverfahren der Erfindung, Antioxidans-Kandidatenmaterialien, die amphiphile Antioxidantien sind, zu effektivem Wachstum der Bakterienmutanten bei.

[0034] Die Bakterienmutanten der Erfindung können fähig sein, Chlorophyllid-Reduktase zu exprimieren, bei der es sich um ein multimeres Protein handelt, das eine Erzeugung von Superoxid-Anionen bei Vorhandensein

von Sauerstoff induziert. Spezielle Beispiele von Bakterienmutanten beinhalten, jedoch ohne Einschränkung auf diese, Photosynthese-Bakterien, wie beispielsweise *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Allochrocatium vinosum*, *Chlorobium tepidum* und *Chloroflexus auranticus*.

[0035] Sogar wenn die Bakterienmutanten der Erfindung nicht fähig sind, die Chlorophyllid-Reduktase zu exprimieren, können sie so transformiert werden, dass sie Chlorophyllid-Reduktase exprimieren. Derartige Bakterien sind in der koreanischen Patentanmeldungspublikation Nr. 2007-59485 A1 offenbart, und zwar durch Transformation der Bakterien mit einem rekombinanten Expressionsvektor, der bchX-(SEQ ID NO: 1), bchY-(SEQ ID NO: 2) und bchZ-(SEQ ID NO: 3)-Gene, einen rrnB-Promotor und ein N-terminales His-Tag enthält. Das auf diese Weise exprimierte multimere Protein fungiert als Reduktase, die Chlorophyllid als Substrat verwendet und dadurch Superoxid-Anionen erzeugt.

[0036] Eine Transformation von Bakterienmutanten kann dadurch ausgeführt werden, dass ein erster rekombinanter Vektor, der eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweist, und ein zweiter rekombinanter Expressionsvektor erzeugt wird, der zum Exprimieren eines multimeren Proteins fähig ist, das eine Erzeugung von Superoxid-Anionen bei Vorhandensein von Sauerstoff herbeiführt; ein erster E.-coli-Transformant mit Einfügen des ersten rekombinanten Vektors und ein zweiter E.-coli-Transformant mit Einfügen des zweiten rekombinanten Expressionsvektors erzeugt wird, und zwar unter Verwendung des ersten rekombinanten Vektors bzw. des zweiten rekombinanten Expressionsvektors; und die ersten und zweiten E.-coli-Transformanten mit den Mutationsziel-Bakterien konjugiert werden, um Bakterienmutanten zu erzeugen.

[0037] Beispielsweise wählten die Erfinder *Rhodobacter sphaeroides* als Mutationsziel-Bakterien und erzeugten einen rekombinanten Vektor zur Disruption eines Superoxiddismutase-Gens. Dann wurde E. coli mit dem auf diese Weise erzeugten rekombinanten Vektor transformiert, um dadurch E.-coli-Transformanten zu erzeugen. Zum Schluss wurden Bakterienmutanten durch Konjugieren des E.-coli-Transformanten mit *Rhodobacter sphaeroides* erzeugt. Die auf diese Weise hergestellten Bakterienmutanten sind SodB1-Varianten, die eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität aufweisen, während sie fähig sind, das Chlorophyllid-reduzierende multimere Protein zu exprimieren, und diese wurden als *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 SodB1 bezeichnet und unter der Hinterlegungsnummer KCTC 11069BP am 12. Februar 2007 hinterlegt.

[0038] Die gemäß der Erfindung hergestellten Bakterienmutanten exprimieren das multimere Protein, und das auf diese Weise exprimierte multimere Protein kann eine Aktivität zum Erzeugen von Superoxid-Anionen aufweisen, hingegen erzeugt es bei einer Sauerstoffkonzentration von 1 bis 3% kein Wasserstoffperoxid, da das multimere Protein Chlorophyllid reduziert. Herkömmliche Superoxid-erzeugende Materialien, wie beispielsweise Methylviologen, Plumbagin, Menadion und dergleichen, erzeugen Wasserstoffperoxid sowie Superoxid als entstehende Produkte. Jedoch weist das entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verschiedene Probleme auf. Beispielsweise führt die Reaktion von H_2O_2 mit Eisenionen (Fe^{2+}) zur Erzeugung von Hydroxy-Radikalen, was demzufolge eine "fatty"-Degeneration oder eine DNA-Variation zur Folge hat. Weiter können aufgrund hoher Zellmembrandurchlässigkeit und relativer Stabilität die zuvor erwähnten Superoxid-erzeugenden Materialien nachteilige Nebeneffekte auf normale Zellen abgesehen von den Zielzellen aufweisen, bei denen Wasserstoffperoxid erzeugt wurde. Aus diesen Gründen war es erforderlich, Wasserstoffperoxid mittels einer separaten Katalase-Behandlung zu entfernen. Jedoch weist das multimere Protein, das durch die erfindungsgemäß hergestellten Bakterienmutanten exprimiert wird, die Fähigkeit auf, Superoxid-Anionen ohne Entwicklung von Wasserstoffperoxid zu erzeugen, und daher ist es möglich, beim Stand der Technik bestehende Einschränkungen und Probleme zu überwinden.

[0039] Beim Antioxidans-Screeningverfahren der Erfindung kann eine Menge des Chlorophyllids, das der Filterscheibe oder dem Agarplattenmedium zugesetzt ist, zwischen 0,1 mM bis 100 mM liegen. Wenn der Gehalt an Chlorophyllid unterhalb 0,1 mM liegt, ist die Empfindlichkeit gering. Falls andererseits der Gehalt an Chlorophyllid oberhalb 100 mM liegt, kann dies eine unerwünschte Zytotoxizität zur Folge haben.

[0040] Die Größe der Filterscheibe oder des zugesetzten Chlorophyllid aufweisenden Mediumblocks, der/die auf das Agarplattenmedium oder die Petrischale platziert werden, kann in Abhängigkeit von den Anzahlen des Screeningziel-Kandidatenmaterials variieren oder Einfachheit und Zweckmäßigkeit einer visuellen Beobachtung berücksichtigen. Beispielsweise kann die Filterscheibe einen Durchmesser von 5 bis 20 mm und eine Dicke von 0,1 bis 1 mm aufweisen, und der Mediumblock kann einen Durchmesser von 10 bis 30 mm und eine Dicke von 5 bis 15 mm haben.

[0041] Beispielsweise weist, wie in den folgenden Beispielen demonstriert werden wird, Pch212 von den An-

tioxidantien, die mittels des Screeningverfahrens der Erfindung einem Screening unterzogen werden, amphiphile Eigenschaften auf, und dieses weist daher hervorragende Löslichkeit sowohl in DMSO (Dimethylsulfoxid) als auch in wasserlöslichen Puffern auf. Weiter weist, wie aus den Beobachtungsergebnissen des bakteriellen Wachstums von [Fig. 4](#) zu ersehen, Pch212 eine ausgezeichnete Antioxidans-Aktivität auf, im Vergleich zu einem herkömmlichen Antioxidans, fettlöslichem Quercetin oder fettlöslichem Tocopherol.

[0042] Zusammenfassend ermöglicht die Erfindung ein müheloses und selektives Screening eines amphiphilen Antioxidans in industriellem Maßstab durch Beobachten von Wachstumsprofilen von Bakterienmutanten mittels einer Verwendung von Bakterienmutanten und Chlorophyllid.

BEISPIELE

[0043] Nachfolgend wird die Erfindung detaillierter mit Bezug auf die folgenden Beispiele beschrieben. Diese Beispiele sind lediglich zur Illustrierung der Erfindung vorgesehen und verstehen sich als nicht einschränkend für Schutzzumfang und Gedanken der Erfindung.

Beispiel 1: Herstellung von Bakterienmutanten

1.1 Herstellung von Bakterienmutanten, die multimeres Protein exprimieren

[0044] Eine Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde für eine Fusion eines His-Tag oder eines Strep-Tag mit N-Termini von bchX-(SEQ ID NO: 1), bchY-(SEQ ID NO: 2) und bchZ-(SEQ ID NO: 3)-Genen durchgeführt. Forward-Primer wurden bei einem Translations-Initiations-Kodon (ATG) modifiziert. Zu diesem Zweck wurden Primer von SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 6 erzeugt und für bchX-, bchY- bzw. bchZ-Gene verwendet. Backward-Primer wurden so erzeugt, dass sie HindIII-Erkennungsorte aufwiesen. Zu diesem Zweck wurden Primer von SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 und SEQ ID NO: 9 erzeugt und für bchX-, bchY- bzw. bchZ-Gene verwendet. In der nachstehenden Tabelle 1 unterstrichen dargestellte Stellen repräsentieren Basensequenzen, die optional modifiziert wurden, um Restriktionsenzym-Erkennungsorte zu erzeugen, und Basensequenzen, die durch dicke schwarze Linien repräsentiert sind, sind Erkennungssequenzen entsprechender Restriktionsenzyme.

Tabelle 1

SEQ ID NO:	Primer	Sequenzen (5' → 3')	Anmerkungen
4	Forward-Primer	CACCGG <u>GAT</u> CCCG- GATGCA	BamHI Erkennungssequenz
5	Forward-Primer	GGCAGGAG <u>GAT</u> CCGC- CAGACC	BamHI Erkennungssequenz
6	Forward-Primer	GATCT <u>AGAT</u> CTCGTG- CAG	BglII Erkennungssequenz
7	Backward-Primer	CGCGCGA <u>AAGCTT</u> TTC- GAGA	HindIII Erkennungssequenz
8	Backward-Primer	TGTCATA <u>AAGCTT</u> G- CACGA	HindIII Erkennungssequenz
9	Backward-Primer	CGGA <u>AAGCTT</u> CGCT- CATTG	HindIII Erkennungssequenz

[0045] Für bchX- und bchY-Gene wurden PCR-Produkte, die mit diesen Primern erzeugt wurden, mit BamHI

und HindIII geschnitten und in einen pRSET-C-Vektor (Invitrogen) ligiert, dessen BamHI- und HindIII-Erkennungsorte geschnitten wurden, wodurch pRSET-HisX- bzw. pRSET-HisY-Vektoren hergestellt wurden. Es wurde eine Schneiden, um DNA-Fragmente zu erhalten, unter Verwendung des entsprechenden Restriktionsenzym (Restriktionsendonuclease, TAKARA, Japan), und eine Ligation von DNA-Fragmenten unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (TAKARA, Japan) ausgeführt. Weiter wurde das PCR-Amplifikationsprodukt des bchZ-Gens mit BglII und HindIII verdaut und in BamHI- und HindIII-Orte eines pRSET-C-Vektors kloniert, wodurch ein pRSET-HisZ-Vektor hergestellt wird. Unter Verwendung des XbaI-Ortes, der sich 142 bp upstream vom BamHI-Ort des pRSET-C-Vektors befindet, wurde jedes XbaI-HindIII-Fragment aus pRSET-HisX-, pRSET-HisY- und pRSET-HisZ-Vektoren erzielt. Das auf diese Weise erzielte Restriktionsfragment wurde in einen Vektor kloniert, der einen rrnB-Promotor von Rhodobacter sphaeroides in einem pRK415-Vektor enthält, wodurch pRK-HisX-, pRK-HisY- bzw. pRK-HisZ-Vektoren hergestellt werden. Diese Vektoren sind gestaltet, um die Gene, die ein gewünschtes Protein codieren, das ein His-Tag fusioniert mit dessen N-Terminus enthält, gesteuert durch den rrnB-Promotor (SEQ ID NO: 10) zu exprimieren, und ein gewünschtes Protein zu exprimieren, das ein His-Tag enthält, das mit dessen N-Terminus fusioniert ist. Jedes dieser Vektorkonstrukte wurde in den E.-coli-Stamm S17-1 transformiert, und dann durch einen Konjugationsprozess in Rhodobacter sphaeroides hinein mobilisiert. Um gewünschte Transformanten zu erhalten, wurden transformierte E.-coli-Zellen mit ergänzend zugesetztem Tetrazyklin als antibiotischer Marker, der zum Selektieren des Vektor-Plasmids fähig ist, auf ein Sistro-Minimalmedium aufgebracht, und Antibiotika-resistente Bakterienstämme wurden dann herausgeholt. Eine Expression von BchX-, BchY- und BchZ-Proteinen wurde durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen His-Tags bestätigt.

[0046] Um die Expression der gewünschten Proteine zu bestätigen, wurden BchX-(SEQ ID NO: 11), BchY-(SEQ ID NO: 12) und BchZ-(SEQ ID NO: 13)-Proteine in diesen Bakterientransformantenstämmen überexprimiert, gefolgt von einem Separieren der Proteine. Einzelne Bakterienstämme, die pRK-HisX-, pRK-HisY- und pRK-HisZ-Vektorkonstrukte enthielten, wurden anaerob in einer 1-Liter-Kulturmediumflasche, die mit einem Deckel aus Butyl-Synthesekautschuk verschlossen war, gezüchtet und mit Stickstoffgas gespült. Die Abtrennung von Proteinen wurde in einer anaeroben Kammer ausgeführt (Modell 10, COY, Grass Lake, MI), die 5% Wasserstoff, 5% Kohlendioxid und 90% Stickstoff enthielt. Um wasserlösliche überexprimierte Proteine zu erhalten, die in gezüchteten Zellen vorhanden sind, wurde eine Zellruptur unter Verwendung eines Ultraschallgerätes (Sonifier 250, Branson, Schweden) bei einer Temperatur von 4°C 10 min lang ausgeführt, und die entstehenden Zell-Lysate wurden bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert, um dadurch eine wasserlösliche Cytosolfraktion zu erhalten, die dann einer Proteinabtrennung unter Verwendung von Nickelaffinitätschromatographie (QiaGen) gemäß den Herstelleranweisungen unterzogen wurde. Zu diesem Zweck wurde die Cytosolfraktion an ein Nickelharz gebunden. Durch die kompetitive Affinität der einzelnen Proteine zu Imidazol wurden BchX-, BchY- und BchZ-Proteine erhalten. Zum Eluieren der Proteine wurden 50 mM eines Natrium-dihydrogenphosphat-(NaH₂PO₄)-Puffers (pH 7,9) verwendet, der 150 mM Imidazol und 300 mM Natriumchlorid enthielt. Eine Bestätigung der einzelnen Proteine wurde durch eine Elektrophorese mittels 12%igem-Polyacrylamidgel ausgeführt. Als Ergebnis wurde eine Expression der Proteine BchX, BchY und BchZ als Proteinbänder von 40 kDa, 58 kDa bzw. 57 kDa bestätigt ([Fig. 3](#)).

[0047] [Fig. 3](#) ist eine Fotografie, die Protein-Elektrophorese-(SDS-PAGE)-Muster auf einem 12%-Polyacrylamid-Gel zeigt, nach Separieren von BchX-, BchY- und BchZ-Proteinen aus Rhodobacter-sphaeroides-Kulturfraktionen. Jeder der Streifen repräsentiert abgetrennte Proteine (BchX, BchY und BchZ). Um Größen einzelner Proteine zu bestätigen, wurden auch Standardmolekulargewicht aufweisende Proteine einer Elektrophorese unterzogen.

[0048] Diese bchX-, bchY- und bchZ-Gene wurden auf einen einzigen Vektor positioniert, und der entstehende Plasmidvektor wurde durch einen Konjugationsprozess mobilisiert, was demzufolge zu einer Expression aller Proteine BchX, BchY und BchZ führt. Als Ergebnis wurden gewünschte transformierte Bakterienmutanten hergestellt, die konstitutiv bedingt zum Expressieren von Chlorophyllid-Reduktase fähig sind.

1.2 Herstellung einer SodB1-Variante

[0049] Unter Verwendung der Bakterienmutanten, die in Absatz 1.1 von Beispiel 1 hergestellt wurden, wurden SodB1-Bakterienvarianten, die eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität aufgrund eines Inkorporierens einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweisen, unter Verwendung des folgenden Verfahrens erzeugt.

[0050] Ein für Eisen-Superoxiddismutase-(Fe-SOD) codierendes sodB-Gen wurde durch Induzieren einer homologen Rekombination eines pLO1-Suizidvektors abgetrennt. Ein Transkriptions-/Translations-Terminator,

der ein Streptomycin-/Spectinomycin-Resistenzgen enthielt, wurde in einen Stul-Ort des *sodB*-Gens eingefügt, und die entstehende Genstruktur wurde in einen Suizidvektor kloniert, um dadurch einen pLO1-B1-Vektor zu erzeugen. Bei homologer Rekombination unter Verwendung des entstehenden pLO1-B1-Vektorkonstrukts wurden Kolonien mit homologer Doppel-Crossover-Rekombination selektiert, die lediglich gegen Streptomycin und Spectinomycin eine Antibiotikaresistenz aufweisen, aufgrund des Vorhandenseins des Streptomycin-/Spectinomycin-Resistenzgens in der Mitte des Gens, und zeigten keine Vektor-vermittelte Kanamycin-Resistenz, und *sodB1*-Defekt aufweisende Mutantenstämme wurden herausgeholt.

[0051] Die *SodB1*-Variante, die das multimere Protein exprimiert, d. h. *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 *SodB1*, wurde bei KTCC unter der Hinterlegungsnummer KTCT 11069BP am 12. Februar 2007 hinterlegt.

Beispiel 2: Isolation von Chlorophyllid

[0052] Um Chlorophyllid zu isolieren, das ein Substrat für das multimere Protein ist, welches von Bakterienmutanten von Beispiel 1 exprimiert wird, wurde das *bchZ*-Gen von *Rhodobacter sphaeroides* durch Induzieren einer homologen Rekombination abgetrennt. Um einen Mutanten mit *bchZ*-Defekt zu erzeugen, wurde Restriktionsendonuclease *Bam*HI verwendet, welche den *Bam*HI-Restriktionsort, der im *bchZ*-Gen vorhanden ist, erkennt und schneidet. Zu diesem Zweck wurde *Rhodobacter sphaeroides* mit *Ball* und *Pst*I verdaut, um einen *bchZ*-Genbereich zu erzielen, und dann wurde ein Transkriptions-/Translations-Terminator, der ein Kanamycin-Resistenzgen enthielt, in den *Bam*HI-Bereich des *bchZ*-Gens eingefügt. Das entstehende Genkonstrukt wurde in einen Suizidvektor pSUP202 kloniert, um einen pSUP-BZ-Vektor zu erzeugen. Bei homologer Rekombination unter Verwendung des entstehenden pSUP-BZ-Vektors wurden Kolonien mit homologem Doppel-Crossover-Rekombinationsereignis selektiert, die lediglich gegen Kanamycin eine Antibiotikaresistenz aufweisen, aufgrund des Vorhandenseins des Kanamycin-Resistenzgens in der Mitte des Gens, und die keine Vektor-vermittelte Tetracyclin-Resistenz zeigten, und einen *bchZ*-Defekt aufweisende Mutantenstämme wurden herausgeholt. Wenn man diese unter anaeroben dunklen Bedingungen unter Verwendung von Dimethylsulfoxid als finalem Elektronenakzeptor der Elektronentransferkette züchtete, wiesen die einen *bchZ*-Defekt aufweisenden Mutantenstämme eine Akkumulation von grünem Chlorophyllid im Kulturmedium auf. Bei Messung des Chlorophyllid unter Verwendung eines Spektrophotometers (UV-2550, Shimadzu, Japan) wurden die gleichen Absorptionsergebnisse bei einer Wellenlänge von 663 nm wie zuvor bei herkömmlicher Technik erzielt. Um im Kulturmedium akkumuliertes Chlorophyllid abzutrennen, wurde das Medium mit Diethylether extrahiert, über Stickstoff getrocknet und in Dimethylsulfoxid zur Verwendung in einer darauffolgenden Reaktion gelöst.

Beispiel 3: Screening von Antioxidantien

[0053] Wie in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) dargestellt, wurde ein Agarplattenmedium hergestellt, dem Chlorophyllid (0,1 bis 100 mM) zugesetzt wurde, dieses in sehr dünne Mediublöcke zerteilt und dann auf eine unbehandelte Agarplatte platziert. Als Nächstes wurden diesen Mediublöcken eine Antioxidansprobe und *SodB1*-Bakterienmutanten zugesetzt, oder andernfalls wurde Chlorophyllid (0,1 bis 100 mM) direkt den Filterscheiben zugesetzt, zu denen dann eine gewünschte Konzentration eines Antioxidans-Kandidatenmaterials hinzugefügt wurde. Danach wurden die multimere Protein exprimierenden *SodB1*-Bakterienmutanten, z. B. *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 *SodB1* [KCTC 11069BP] auf ein Sistrom-Minimalmedium aufgebracht [20 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 3,8 mM Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 34 mM Bernsteinsäure, 0,59 mM L-Glutaminsäure, 0,30 mM L-Asparaginsäure, 8,5 mM Natriumchlorid, 1,05 mM Nitrilotriessigsäure, 1,2 mM Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,23 mM Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 25 μM Eisensulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,16 μM Ammoniummolybdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 4,7 μM EDTA, 38 μM Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 9,1 μM Mangansulfat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 1,6 μM Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0,85 μM Kobalt(II)nitrat ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 1,8 μM Borsäure (H_3BO_3), 8,1 μM Nicotinsäure, 1,5 μM Thiamin-hydrochlorid, und 41 nM Biotin] (Sistrom, W. R., 1962, J. Gen. Microbiol. 28: 607–616).

[0054] Als Ergebnis erfolgte, wenn es eine Antioxidans-Aktivität in dem zu screenenden Antioxidans-Kandidatenmaterial gab, ein Wachstum von Zellen lediglich auf den Mediublöcken oder um die Filterscheiben herum, und somit wurden rote Bakterien beobachtet. Wenn es keine Antioxidans-Aktivität im Antioxidans-Kandidatenmaterial gab, wurden alle Zellen abgetötet, und es wurde kein Wachstum von roten Zellen beobachtet. Weiter erfolgte, wenn das das Screening-Ziel darstellende Antioxidans-Kandidatenmaterial die Antioxidans-Aktivität aufwies, ein Wachstum von Zellen auch um die Filterscheiben herum, und daher wurden rote Bakterien beobachtet. Wenn andererseits das Antioxidans-Kandidatenmaterial keine Antioxidans-Aktivität aufwies, wurden die Zellen um die Filterscheiben herum abgetötet ([Fig. 4](#)).

[0055] Die Zellkulturen zahlreicher Bakterien wurden mit Ethanol, Methanol, Diethylether, Aceton bzw. Chloroform extrahiert, und die entstehenden Extrakte wurden über Stickstoff getrocknet. Antioxidans-Aktivitäten der auf diese Weise erhaltenen Extrakte wurden wie zuvor beschrieben untersucht, und ein starkes Antioxidans wurde als Pch212 bezeichnet. Um die Antioxidans-Aktivität von Pch212 mit derjenigen eines herkömmlichen Antioxidans zu vergleichen, wurde Pch212 in geeigneter Konzentration in Ethanol oder einem Dimethylsulfoxid-Lösungsmittel gelöst, um dadurch die Antioxidans-Aktivität des Zielmaterials zu untersuchen. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse sind in [Fig. 5](#) dargestellt.

[0056] Wie in [Fig. 5](#) dargestellt, wies eine negative Kontrollgruppe, z. B. Ethanol oder Dimethylsulfoxid, kein Zellwachstum auf, hingegen zeigte fettlösliches Quercetin oder fettlösliches Tocopherol, die starke Antioxidans-Aktivität aufweisen, ein partielles Zellwachstum. Pch212 zeigte die effektivste Zelltod-Verhinderung. Weiter zeigte, wenn Pch212 in DMSO und einem wasserlöslichem Puffer gelöst wurde, um die amphiphile Eigenschaften von Pch212 zu bestätigen, Pch212 hervorragende Löslichkeit in beiden Lösungsmitteln.

Beispiel 4: Antioxidans-Effekte von Pch212 auf Superoxid-Anionen

[0057] Die Antioxidans-Aktivität des Antioxidans Pch212, das einem Screening mittels des amphiphilen Antioxidans-Screeningverfahrens unterzogen wurde, wurde durch Cytochrom-Reduktion bestätigt. Die Cytochrom-Reduktion wurde mittels Modifikation eines herkömmlichen Verfahrens ausgeführt (McCord und Fridovich, 1969, J. Biol. Chem. 244: 6049–6055).

[0058] Zur Analyse wurde ein Reaktionspuffer [50 mM Kaliumphosphat (pH 7,4)] erzeugt. Der Puffer, 100 mM Xanthin, 0,004 U Xanthinoxidase und ein Antioxidans Pch212, das in Beispiel 3 einem Screening unterzogen wurde, wurden in eine 5-mL-Glasflasche eingebracht, die dann mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen wurde und mit Luft gespült wurde. 20 μM Cytochrom c wurde zugesetzt, und ein Grad einer Reduktion von Cytochrom c wurde mittels einer vergrößerten Absorptionseigenschaft bei 550 nm gemessen und unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in einen numerischen Wert umgewandelt. Dabei wurde die Einfang-Aktivität von Superoxid-Anionen anhand der Differenz des Grades der Reduktion von Cytochrom c bestätigt ([Fig. 6](#)).

[0059] Wie aus der vorhergehenden Beschreibung klar hervorgeht, ist die Erfindung für ein Screening von gering-toxischen und effektiven Antioxidantien, sowie für deren Kommerzialisierung anwendbar, wobei diese in verschiedenen Nahrungsmittel- und Kosmetik-Zusatzstoffen sowie therapeutischen Arzneimitteln zu verwenden sind.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.

Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren für ein Screening eines Antioxidans unter Verwendung von Bakterienmutanten und Chlorophyllid, beinhaltend:

Züchten von Bakterienmutanten auf einem Agarplattenmedium, wobei die Bakterien eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweisen;

Platzieren einer Mehrzahl von Filterscheiben, mit zugesetzten zu screenenden Antioxidans-Kandidatenmaterialien und Chlorophyllid, auf das Agarplattenmedium; und

Selektieren der Filterscheiben, bei denen ein Wachstum der Bakterienmutanten beobachtet wird.

2. Verfahren zum Screening eines Antioxidans unter Verwendung von Bakterienmutanten und Chlorophyllid, beinhaltend:

Zusetzen von Chlorophyllid zu einem Agarplattenmedium zur Bakterienzucht, und Zerschneiden des Agarplattenmediums in Blockform, um dadurch eine Mehrzahl von zugesetztes Chlorophyllid aufweisenden Mediumblöcken zu erzeugen;

Platzieren einer Mehrzahl von Mediumblöcken auf eine Petrischale zur Bakterienzucht;

einer Mehrzahl der Mediumblöcke werden zu screenende Antioxidans-Kandidatenmaterialien und Bakterienmutanten zugesetzt, die eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweisen; und

Selektieren der Mediumblöcke, bei denen ein Wachstum der Bakterienmutanten beobachtet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Bakterienmutanten Chlorophyllid-Reduktase exprimieren.

4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Bakterienmutanten beispielsweise *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Allochromatium vinosum*, *Chlorobium tepidum* oder *Chloroflexus aurantiacus* sind.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Bakterienmutanten transformiert sind, um ein Überexprimieren von Chlorophyllid-Reduktase auszuführen.

6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem das Transformieren der Mutationsziel-Bakterien ausgeführt wird durch:

es wird ein erster rekombinanter Vektor, der eine inhibierte Superoxiddismutase-Aktivität durch Inkorporieren einer Mutation in eine Superoxiddismutase codierende Gensequenz aufweist, und ein zweiter rekombinanter Expressionsvektor erzeugt, der zum Überexprimieren von Chlorophyllid-Reduktase fähig ist;

es wird ein erster E.-coli-Transformant mit Einfügen des ersten rekombinanten Vektors und ein zweiter E.-coli-Transformant mit Einfügen des zweiten rekombinanten Expressionsvektors erzeugt, und zwar unter Verwendung des ersten rekombinanten Vektors bzw. des zweiten rekombinanten Expressionsvektors; und die ersten und zweiten E.-coli-Transformanten mit den Mutationsziel-Bakterien werden konjugiert, um Bakterienmutanten zu erzeugen.

7. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die transformierten Bakterien *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 SodB1 [KCTC 11069BP] sind.

8. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Bakterienmutanten bei Vorhandensein von Chlorophyllid unterhalb einer Sauerstoffkonzentration von 1 bis 3% kein Wasserstoffperoxid erzeugen, und sie eine Aktivität eines Erzeugens von Superoxid-Anionen aufweisen.

9. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem eine Menge an Chlorophyllid, die der Filterscheibe oder dem Agarplattenmedium zugesetzt wird, zwischen 0,1 mM bis 100 mM liegt.

10. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Filterscheibe einen Durchmesser von 5 bis 20 mm und eine Dicke von 0,1 bis 1 mm hat, und der Mediumblock einen Durchmesser von 10 bis 30 mm und eine Dicke von 5 bis 15 mm hat.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

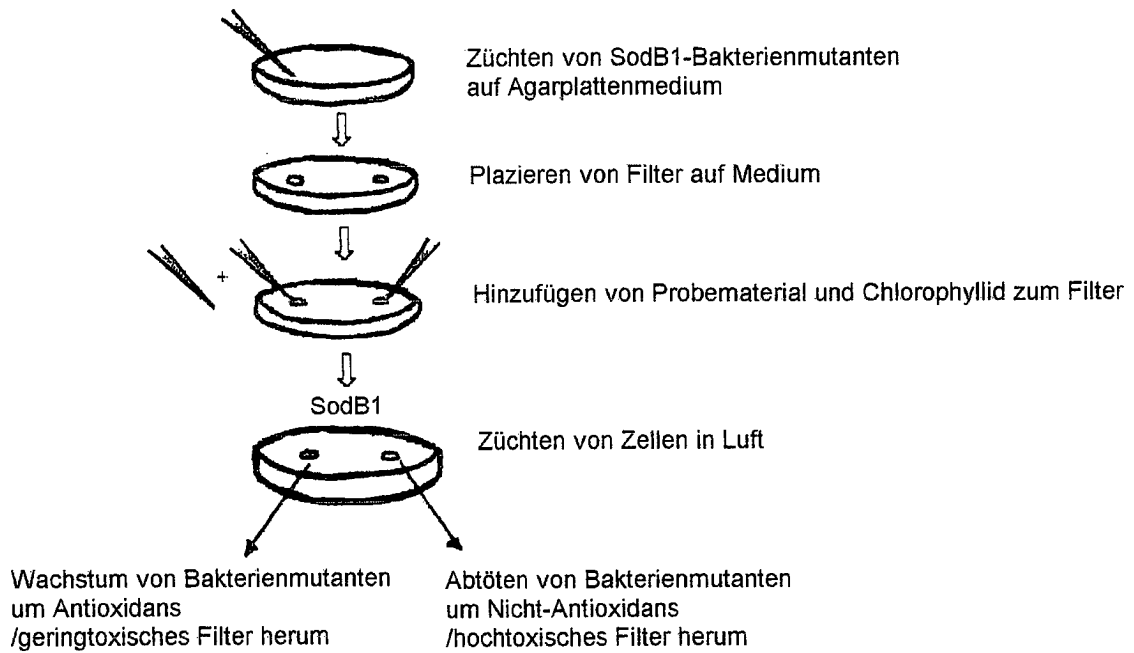


Fig. 2

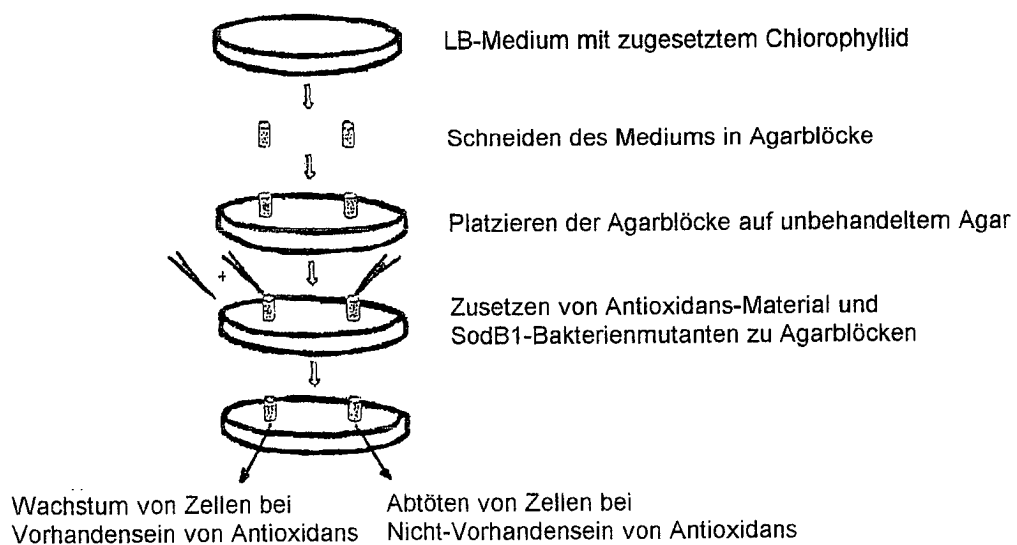


Fig. 3

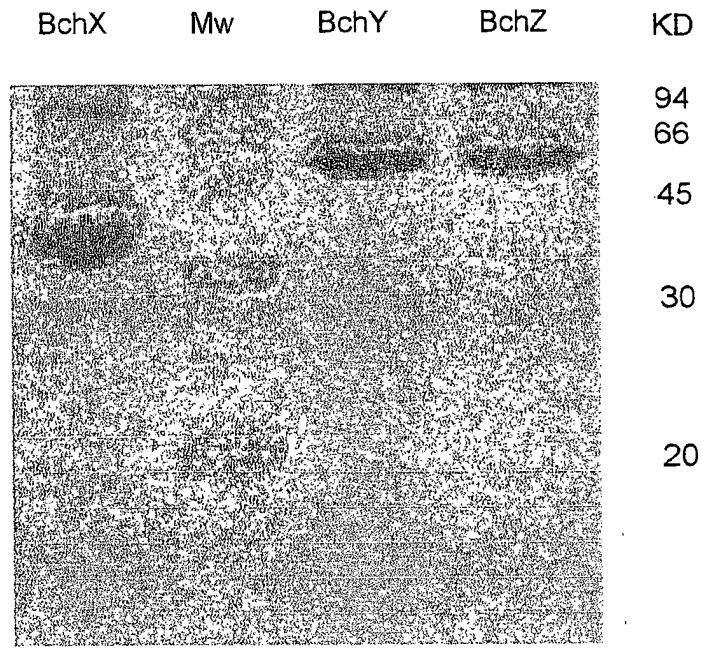


Fig. 4

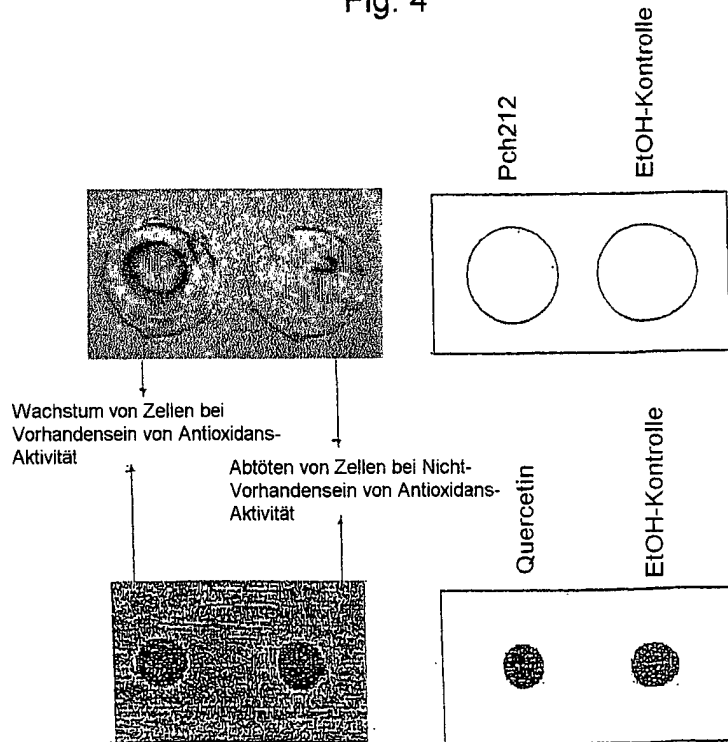


Fig. 5

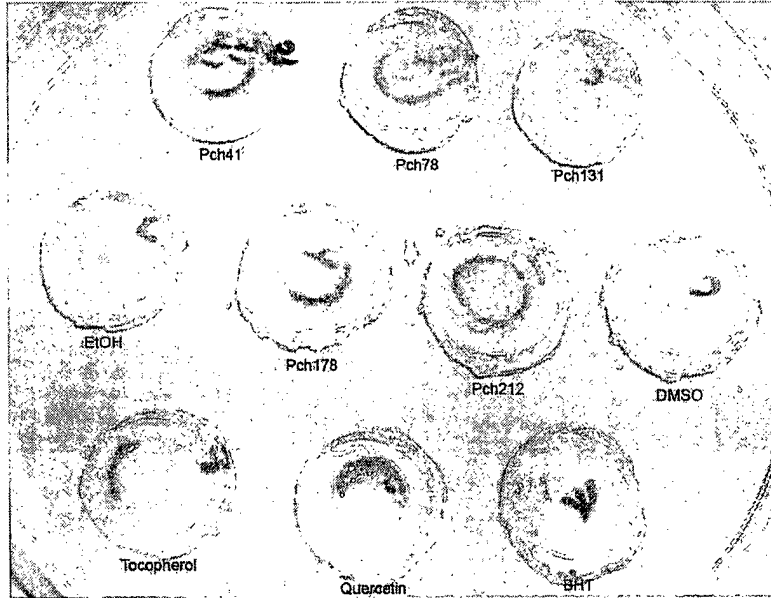


Fig. 6

