



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Einfluss des Polymerisationsgrades und der Struktur  
von Fructanen auf ihre präbiotische Wirksamkeit“

verfasst von

Jacqueline Reiner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

mit betreut von:

MMag. DI. Dr. Monika Müller



## DANKSAGUNG

Allen voran möchte ich o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes und die Aufnahme in das Forschungsteam des Departments für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie danken.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin MMag. DI. Dr. Monika Müller, die mir während der gesamten Diplomarbeitszeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Des Weiteren möchte ich mich bei Univ.-Prof. DI. Dr. Werner Praznik und Dr. Renate Löppert bedanken für die umfangreichen Erklärungen und die zahlreichen Hilfestellungen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie.

Danke Mama, Papa, Vanessa, Oma. Ich liebe euch.

Ihr habt mir nicht nur dieses Studium ermöglicht, sondern mich in jeder Hinsicht unterstützt und gestärkt und nie aufgehört, an mich zu glauben.

Bedanken möchte ich mich auch bei jenen Studienkolleginnen, die im Laufe der Zeit nicht nur zu Freundinnen, sondern viel mehr zu meiner „Pharmilie“ geworden sind. Danke für alles!

Besonderer Dank gilt meiner Mitbewohnerin Lisa, die alle Höhen und Tiefen meines Studiums miterlebt hat und in der gesamten Zeit für mich da gewesen ist.

Ebenso danke ich all jenen FreundInnen aus meiner Kärntner Heimat, die trotz beruflicher und örtlicher Trennung über all die Jahre hinweg wichtiger Teil meines Lebens geblieben sind und mich fortwährend unterstützen.

Abschließend möchte ich Mag. pharm. Wolfgang Haslacher und dem gesamten Team der Perau Apotheke in Villach danken für die Sicherheit, das richtige Studium für mich gewählt zu haben.

Gewidmet W.D.

Für das großartige Lebenswerk.

## **ABRISS**

Fructane sind bekannt für ihre immunmodulierende, präbiotische und antioxidative Wirkung und werden dadurch sowohl im Lebensmittelbereich als auch in pharmazeutischen Produkten eingesetzt. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden ausgewählte Saccharid-Proben unter Berücksichtigung unterschiedlicher Struktur und Herkunft hinsichtlich ihrer präbiotischen Wirksamkeit getestet. Eine Zunahme des Bakterienwachstums wurde turbidimetrisch bestimmt.

Um einen Einfluss unterschiedlicher Polymerisationsgrade (dp) auf die wachstumsfördernde Wirkung zu untersuchen, wurden ein lineares Inulin aus Chicorée (Raftiline) und ein verzweigtes Fructan aus der Agave (Metlin) mittels Größenausschlusschromatographie in 3-5 Fraktionen aufgetrennt und die entsprechenden Wachstumskurven miteinander verglichen. Anhand der Ergebnisse konnte sowohl eine Abhängigkeit der präbiotischen Wirkung vom dp als auch von der Struktur aufgezeigt werden. So ergab sich ein schnelleres Bakterienwachstum mit niedermolekularen Fraktionen als Zuckerquelle, als für jene mit höherem dp.

## **ABSTRACT**

Fructans are known for their immunomodulating, prebiotic and antioxidative effect and are therefore used in food industry as well as in pharmaceuticals. In this thesis selected saccharides were tested on their prebiotic influence dependent on different structure and origin. An increase of bacterial growth was determined by measuring turbidity.

To investigate the influence of different degrees of polymerization (dp) on the growth-promoting effect, one linear inulin from chicory (raftiline) and one branched fructan from agave (metlin) were separated into 3-5 fractions by size exclusion chromatography (SEC) and the corresponding growth curves were compared with each other.

A dependency of the prebiotic effect on dp as well as structure could be shown on the basis of my outcomes. A faster bacterial growth resulted in the presence of low-molecular fractions compared to those with higher dp.

# INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung .....	1
Abriss.....	2
Abstract .....	3
Inhaltsverzeichnis .....	4
1 Einleitung.....	7
1.1 Probiotika .....	7
1.2 Präbiotika .....	8
1.3 Fructane .....	8
1.4 Synbiotika.....	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Herstellung eines MRS (Man-Rogosa-Sharpes) - Mediums.....	12
2.1.1 MRS Medium in einfacher Konzentration mit Glucose (MRS+).....	12
2.1.2 MRS Medium in doppelter Konzentration ohne Glucose (MRS-) .....	13
2.2 Herstellung einer PBS-Cystein-Hydrochlorid Lösung .....	13
2.3 Herstellung 2%-iger Zuckerlösungen .....	14
2.3.1 Verwendete Vergleichssubstanzen.....	15
2.3.2 Verwendete Fructooligo- und Fructopolysaccharide .....	16
2.4 Dünnschichtchromatographie (DC) .....	15
2.5 Löslichkeitsversuche mit einem Aceton-Methanol-Gemisch.....	15
2.6 Analytische Größenausschluss-Chromatographie .....	16
2.7 Auftrennung von Agavenfructan und Chicorée-Inulin unter Verwendung der präparativen SEC .....	17
2.8 Analytische Ionenchromatographie .....	18
2.9 Verwendete Bakterienkulturen (Probiotika) .....	19
2.9.1 Kultivierung der Bakterien.....	19

2.10 Bestimmung der Wachstumskurven mittels Bioscreen-C .....	20
2.10.1 Ermittlung des Einflusses ausgewählter Saccharide auf das Wachstum ausgewählter Probiotika.....	21
2.10.2 Ermittlung des Einflusses unterschiedlicher Glucosekonzentrationen auf das Wachstum ausgewählter Probiotika .....	21
2.10.3 Ermittlung des Einflusses von Chicorée-Inulin und Agavenfructan mit unterschiedlichem dp auf das Wachstum ausgewählter Probiotika .....	21
2.11 Bestimmung der ET <sub>50</sub> Werte [h].....	21
3 Ergebnisse.....	23
3.1 Löslichkeitsversuch .....	23
3.2 Präparative Größenausschluss-Chromatographie .....	23
3.3 Vermessung ausgewählter Proben mit Ionenchromatographie .....	24
3.4 Wachstum der Bakterienstämme unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide .....	27
3.4.1 <i>L. reuteri</i> .....	27
3.4.2 <i>L. acidophilus</i> .....	28
3.4.3 <i>L. rhamnosus GG</i> .....	29
3.4.4 <i>L. paracasei 1</i> .....	30
3.4.5 <i>L. paracasei 2</i> .....	31
3.4.6 <i>L. paracasei 3</i> .....	32
3.4.7 <i>B. animalis</i> .....	33
3.5 Wachstum der Bakterienstämme unter dem Einfluss von Glucose in unterschiedlichen Konzentrationen .....	34
3.6 Wachstum der Bakterienstämme unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan und Chicorée-Inulin .....	39
3.6.1 <i>L. reuteri</i> .....	39
3.6.2 <i>L. acidophilus</i> .....	41
3.6.3 <i>L. rhamnosus GG</i> .....	43
3.6.4 <i>L. paracasei 1</i> .....	45

3.6.5 <i>L. paracasei</i> 2.....	47
3.6.6 <i>L. paracasei</i> 3.....	49
3.6.7 <i>B. animalis</i> .....	51
3.7 Bestimmung der ET <sub>50</sub> Werte [h].....	53
3.8 Bestimmung des Polymerisationsgrades.....	56
3.9 Korrelation der ET <sub>50</sub> Werte mit dem dpn.....	57
4 Diskussion .....	60
5 Zusammenfassung .....	62
6 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	64
7 Literaturverzeichnis .....	67
Lebenslauf.....	70

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Probiotika

Unter dem Begriff Probiotika versteht man nicht pathogene, lebensfähige Mikroorganismen, die in der Lage sind, das Gleichgewicht einer normalen Darmflora günstig zu beeinflussen.<sup>1</sup> Die positive Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt ist wahrscheinlich auf eine pH-Verschiebung im Darmlumen, die Ausscheidung antibiotisch wirkender Substanzen, eine Stimulation des Immunsystems und die Konkurrenz mit pathogenen Mikroorganismen um Nährstoffe zurückzuführen. Zusätzlich zur körpereigenen Mikroflora können diese nutzbringenden Organismen dem Menschen auch über die Nahrung oder über bestimmte Medikamente von außen zugeführt werden.<sup>2</sup> Im Nahrungsmittelbereich finden sich Probiotika vor allem im sogenannten „functional food“. Darunter versteht man Lebensmittel, die nicht allein dem Zweck einer normalen Ernährung dienen, sondern darüber hinaus zu einer Verbesserung des Wohlbefindens und der Gesundheit führen können.<sup>3</sup> In diesem Zusammenhang sind neben den Probiotika noch zwei weitere Hauptgruppen an Inhaltsstoffen zu nennen, die wachsend an Bedeutung in „functional food“ gewinnen: Präbiotika und Antioxidantien.<sup>4</sup>

Therapeutisch eingesetzt werden Probiotika zur symptomatischen Behandlung leichter Durchfallerkrankungen. Verwendet werden vor allem Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* (L.) (Bsp. *L.acidophilus*) und *Bifidobacterium*.<sup>2</sup>

Die *Lactobacillaceae* sind stäbchenförmige, grampositive, fakultativ anaerobe, nicht-sporenbildende Milchsäurebakterien. Diese Gattung umfasst 44 Arten, die sehr häufig antibiotisch wirkende Peptide, sogenannte Bakteriozine, bilden. Aufgrund der Verwendung dieser *Lactobacillus*-Arten als Milchsäurebildner in der Lebensmittelindustrie wird die Bedeutung der in Milchprodukten enthaltenen Bakteriozine intensiv untersucht.<sup>2</sup>

Ebenso wie die *Lactobacillaceae* sind die *Bifidobakterien* grampositive, fakultativ anaerobe, sporenlose Bakterien. Glucose wird durch sie vor allem zu Essigsäure und L(+)-Milchsäure abgebaut.<sup>2</sup>

## 1.2 Präbiotika

Per Definition sind Präbiotika selektiv fermentierte Lebensmittelbestandteile, die sowohl eine Veränderung der Zusammensetzung als auch der Aktivität der gastrointestinalen Mikroflora bewirken.<sup>5</sup> Eine regelmäßige Aufnahme präbiotischer Inhaltsstoffe führt zu einer Verbesserung der Blutwerte, einem verminderten Allergie-Potential, stärkeren Abwehrkräften gegenüber pathogenen gastrointestinalen Keimen und zu einem verbesserten allgemeinen Gesundheitszustand.<sup>4</sup>

Aufgrund dieser gesundheitsfördernden Wirkung werden sie zahlreichen Lebensmitteln („functional food“) zugesetzt, am häufigsten Süßigkeiten, Fruchtzubereitungen, Milch, Joghurt, Frischkäse, Backwaren, Schokolade, Eiscreme und Soßen.<sup>6</sup> In einer neu entwickelten Zartbitterschokolade (DC-1) wurde die Zuckerkomponente durch Inulin ersetzt.<sup>7</sup>

Im Allgemeinen umfasst der Begriff Präbiotika demnach alle nichtverdaulichen Oligosaccharide, die sich positiv auf den Organismus auswirken: Galacto- und Fructooligosaccharide, Inulin, Lactulose und Oligosaccharide aus der menschlichen Milch.<sup>5,8</sup> Die am häufigsten eingesetzten Vertreter sind die sogenannten Fructane.<sup>4</sup>

## 1.3 Fructane

Fructane (Synonym: Fructosane) sind natürlich vorkommende, hochmolekulare Oligo- (FOS) oder –polysaccharide, die aus 2-60 D-Fructoseeinheiten aufgebaut sind und häufig endständig ein Glucosemolekül besitzen.<sup>2</sup>

Es handelt sich dabei um lineare oder verzweigte Polymere, deren Zucker-Bausteine entweder  $\beta$ -2-1-glykosidisch (Inulin-Typ) oder  $\beta$ -2-6-glykosidisch (Levan-Typ) verknüpft sind oder vom Mischtyp sind.<sup>9</sup>

Bedingt durch einen Mangel an hydrolytischen Enzymen, die in der Lage sind  $\beta$ -Bindungen zu spalten, sind diese präbiotischen Fructane im menschlichen Magen unverdaulich. Allerdings ist die Mikroflora im Colon in der Lage diese  $\beta$ -Verknüpfungen mittels bakterieller Enzyme abzubauen. Durch die enzymatische Umwandlung (Fermentation) der Fructane und die Senkung des pH-Wertes kommt es zu Veränderungen im Dickdarm, die das Wachstum nützlicher Bakterien (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) fördern. Es gibt darüber hinaus Hinweise auf einen

möglichen Zusammenhang zwischen der Einnahme von FOS/Inulin und einem reduzierten Risiko eines colorektalen Karzinoms.<sup>4</sup> Ihre Fermentations-Produkte, Buttersäure, Propionsäure, Acetat und kurzkettige Fettsäuren (SCFA), dienen der Energieversorgung der Epithelzellen des Colons und können zur Apoptose von Krebszellen führen.<sup>10,1</sup> Diese antikanzerogene Wirkung und der daraus resultierende potentielle Nutzen zur Prophylaxe eines Colonkarzinoms wurde bis jetzt für den Inulin-Typ nachgewiesen. Bei verzweigten Fructanen ist darüber relativ wenig bekannt.<sup>11</sup>

Des Weiteren sind Fructane in der Lage ROS (reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffspezies) – Level zu erniedrigen und sind somit auch als Antioxidantien wirksam. Diese Eigenschaft ist deshalb von Relevanz, da ein direkter Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Entstehung gastrointestinaler Erkrankungen besteht.<sup>4</sup>

Es ist bekannt, dass das Immunsystem durch die Aufnahme von Fructanen positiv beeinflusst wird.<sup>12</sup> Agavenfructane interagieren mit Probiotika und sind dadurch in der Lage Immunzellen zu aktivieren und selektiv zu differenzieren.<sup>13</sup>

Fructane werden aufgrund ihrer präbiotischen, antioxidativen und immunmodulierenden Wirkung bewusst vielen Nahrungsmitteln zugesetzt, um einen positiven Effekt auf die Gesundheit zu bewirken und Krankheiten vorzubeugen.<sup>4</sup>

Der durchschnittliche Polymerisationsgrad (dp) der Fructooligosaccharide liegt im Bereich 2-20, bei Inulin liegt er deutlich höher (3-60). Für beide Gruppen ist die stimulierende Wirkung auf Milchsäure-produzierenden Bakterien bekannt, wobei für Inulin eine längere Zeitspanne bis zum Eintreten einer signifikanten Wirkung vorliegt. Jene Saccharide mit höherem Polymerisationsgrad zeigen eine stärkere Resistenz gegenüber bakteriellen Enzymen, wodurch die Umwandlung *in vivo* vor allem im distalen Bereich des Colons stattfindet.<sup>10</sup> Dies könnte sich unter anderem darauf zurückführen lassen, dass alle fermentierbaren Saccharide zunächst zu Monosacchariden hydrolysiert werden müssen, bevor sie enzymatisch umgewandelt werden können.<sup>14</sup> Die präbiotische Wirksamkeit hängt neben dem Polymerisationsgrad auch von der durch die Nahrung aufgenommenen Menge an Fructanen ab.<sup>10</sup>

Die Bezeichnung Inulin umfasst die Gruppe der  $\beta$ -2-1-glykosydisch, linear verknüpften Polyfructosane. Als pflanzliches Reservekohlenhydrat kommt Inulin in den Knollen verschiedener Poaceae und Asteraceae vor beispielsweise in der Alantwurzel, Topinambur, Schwarzwurzel und Dahlienknollen. Gewonnen wird es vor allem aus Topinambur, *Helianthus tuberosus* L. (Asteraceae), einer aus Südamerika stammenden Kulturpflanze und aus Chicorée Knollen, *Chichorium intybus* L. (Asteraceae)<sup>4,15</sup> Eingesetzt wird Inulin einerseits im Nahrungsmittelbereich, andererseits kann es auch als Diagnostikum zur Nierenfunktionsprüfung angewendet werden, da es nicht resorbiert und unverändert mit dem Harn ausgeschieden wird (Inulin-Clearance).<sup>1</sup>

Durch eine Senkung der Genexpression bestimmter Leberenzyme, die für die *de novo* Synthese von Lipiden verantwortlich sind, können Fructane vom Inulin-Typ das Lipid-Profil eines Menschen positiv beeinflussen.<sup>16</sup>

Auf die im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendeten Fructane möchte ich an dieser Stelle ebenfalls kurz eingehen.

Dem Inulin aus der Chicorée-Wurzel wird zusätzlich zu den oben angeführten positiven Aspekten, eine präventive Wirkung bezüglich der Entwicklung eines Diabetes mellitus zugeschrieben. So konnte durch die Einnahme Inulin-hältiger Chicoréewurzel-Extrakte eine Senkung des HbA<sub>1c</sub>-Spiegels bewirkt werden.<sup>17</sup>

Agavenfructane sind vom Mischtyp, besitzen also  $\beta$ -2-1- und  $\beta$ -2-6-Verknüpfungen und Verzweigungen. Die mexikanische Agave (*Agave tequilana* Weber, Agavoideae) wird hauptsächlich zur Herstellung alkoholischer Getränke beispielsweise dem Tequila verwendet.<sup>18</sup> Die präbiotische Wirksamkeit von Agavenfructanen wurde in einigen wissenschaftlichen Studien nachgewiesen.<sup>19</sup> Weiters konnte für diese Vertreter auch eine osteoprotektive Wirkung nachgewiesen werden, da eine entsprechende Nahrungsmittelergänzung einen Verlust an Knochenmasse vorbeugen und die Knochenentwicklung verbessern kann.<sup>20</sup>

## **1.4 Synbiotika**

Aufgrund der zahlreichen positiven Einzelwirkungen von Präbiotika und Probiotika spielt der Einsatz von sogenannten Synbiotika eine ebenso wichtige Rolle. Sie enthalten sowohl (eine oder mehrere) präbiotische als auch probiotische Komponenten, um dadurch die gesundheitsfördernden Faktoren zu potenzieren. Synbiotika könnten die Anzahl an Bifidobakterien erhöhen, den Cholesterinspiegel senken, die gastrointestinale Mikroflora normalisieren und das Immunsystem fördern.<sup>21</sup>

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Die Herstellung bzw. Verwendung der angeführten Materialien erfolgte zum Großteil unter sterilen Bedingungen in einem Laminar Air Flow System. Die zubereiteten Lösungen und Medien wurden je nach Menge und Zusammensetzung entweder autoklaviert oder filtriert. Um unterschiedlich konzentrierte Lösungen zu erzeugen, wurde mit sterilem, destilliertem Wasser (Aqua destillata, Aqua dest.) entsprechend verdünnt. Nach der Herstellung wurden sämtliche Lösungen (siehe Kapitel 2.1 bis einschließlich Kapitel 2.3) im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

### 2.1 Herstellung eines MRS (Man - Rogosa - Sharpes) – Mediums

#### 2.1.1 MRS Medium in einfacher Konzentration mit Glucose (MRS+ Medium)

Rezeptur:

Pepton aus Casein	10,0g
Fleischextrakt	8,0g
Hefeextrakt	4,0g
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,0g
TWEEN 80	1,0g
Di-Ammoniumhydrogencitrat	2,0g
Natriumacetat	5,0g
Magnesiumsulfat	0,2g
Cystein – HCl	0,5g
Mangansulfat	0,04g

Für ein MRS Medium in einfacher Konzentration mit Glucose (MRS+) wurden die oben angeführten Substanzen in den angegebenen Mengen eingewogen und in einem Messzylinder in 900ml Aqua dest. unter Rühren gelöst. Die Lösung wurde in ein Autoklaviergefäß überführt und für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem

Abkühlen wurden der Bouillon 100ml einer sterilen 20%-igen Glucose-Lösung (200mg Glucose mit Aqua dest. auf 1000ml aufgefüllt) hinzugefügt.

### **2.1.2 MRS Medium in doppelter Konzentration ohne Zucker (MRS- Medium)**

Die oben angeführten Mengenangaben beziehen sich auf die Zubereitung einer einfach konzentrierten Bouillon (berechnet auf 1000ml Lösung). Für die Herstellung eines MRS Mediums in doppelter Konzentration ohne Glucose (MRS-) wurden die Substanzen der Rezeptur entsprechend eingewogen und in einem Messzylinder mit 500ml Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurden alle Bestandteile unter Rühren gelöst, in ein Autoklaviergefäß überführt und für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

### **2.2 Herstellung einer PBS-Cystein-Hydrochlorid Lösung**

Für das „Waschen“ der Bakterien wurde eine PBS-Cystein-Hydrochlorid Lösung verwendet. Dazu wurden 50ml 10-fach konzentriertes PBS und 50ml 10-fach konzentriertes Cystein-Hydrochlorid (Cystein-HCl) in einem 500ml-Messzylinder mit Aqua dest. aufgefüllt.

Die 10-fach konzentrierte Cystein-HCl-Lösung wurde hergestellt, indem 1g Cystein-HCl in 200ml Aqua dest. gelöst und für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert wurde.

Die 10-fach konzentrierte PBS-Lösung wurde hergestellt, indem 80,06g Natriumchlorid, 14,2g Di-Natriumhydrogenphosphat, 2,46g Kalium-dihydrogenphosphat und 2,01g Kaliumchlorid in einem Messzylinder eingewogen und unter Rühren in 1000ml Aqua dest. gelöst wurden. Die PBS-Lösung wurde anschließend für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

### **2.3 Herstellung 2%-iger Zuckerlösungen**

Für die im Zuge dieser Diplomarbeit durchgeführten Bioscreen-Messungen war es notwendig, 2%-ige Lösungen aller Saccharide herzustellen.

Zunächst erfolgte anhand der Anzahl an Versuchsansätzen und Bakterienstämmen die Berechnung der benötigten Menge an Zuckerlösung bezogen auf ein Well-Füllvolumen von 300µl (150µl Bakteriensuspension + 150µl Zuckerlösung).

So ergab sich für eine Dreifach-Bestimmung mit 7 Bakterienstämmen:

$$3 \cdot 7 \cdot 150 \cdot 0,02 = 0,063\text{g} = 63 \text{ mg} / 3,15\text{ml}$$

Da die Ausbeute der gewonnenen Zuckerfraktionen niedrig war, wurde so wenig wie möglich an Probenmaterial eingesetzt. Das Well-Füllvolumen wurde auf 200 $\mu$ l (100 $\mu$ l Bakterienstock + 50 $\mu$ l Zuckerlösung + 50 $\mu$ l Aqua dest.) und die Zucker-Endkonzentration auf 0,5% reduziert. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

So ergab sich für die Untersuchung mit 7 Bakterienstämmen:

$$2 \cdot 7 \cdot 50 \cdot 0,02 = 14\text{mg} / 0,7\text{ml}$$

Die Saccharide wurden eingewogen und unter Rühren und Erhitzen in Aqua dest. gelöst und nach dem Abkühlen filtriert.

Für die Herstellung einer 2%-igen Glucoselösung wurden 20ml einer 20%-igen Glucoselösung auf 200ml mit Aqua dest. verdünnt.

### 2.3.1 Verwendete Vergleichssubstanzen

Es wurden Galactose, Lactose, Raffinose, Mannose, Maltose, Cellubiose, Fructose, Stachyose, Saccharose und 1-Kestose als Vergleichssubstanzen verwendet.

### 2.3.2 Verwendete Fructooligo- und Fructopolysaccharide

<i>Zuckerform</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Firma</i>
FOS linear	Raftilose	Chicorée	Orafti
FPS linear (Inulin)	Raftiline	Chicorée	Orafti
FOS verzweigt	Metlos	Agave	Nekutli
FPS verzweigt	Metlin	Agave	Nekutli

Tabelle 1: Verwendete Fructooligo- & Fructopolysaccharide (FOS & FPS)

## 2.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden im Rahmen der Löslichkeitsversuche (siehe Kapitel 2.5) und Zuckerauftrennungen (siehe Kapitel 2.7) mehrere dünnschichtchromatographische Untersuchungen durchgeführt.

Als Vergleichslösung diente ein Standard, der je 1mg/ml Glucose, Fructose, Saccharose und 1-Kestose enthielt. Auf die DC-Platte (DC Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Firma Merck) wurden je 3µl der Probelösungen und 1µl des Standards aufgetragen. Die Trennung erfolgte in einem DC-Gefäß mit einem Acetonitril:H<sub>2</sub>O(17:3)-Gemisch als Laufmittel. Dieser Vorgang wurde zwei Mal durchgeführt. Anschließend wurde die DC-Platte wenige Sekunden lang in eine Thymol-Färbelösung (190ml EtOH 96% + 10ml Schwefelsäure 98% + 1g Thymol) getaucht und für 2-5 Minuten bei 100°C im Trockenschrank inkubiert, wodurch die Banden sichtbar gemacht wurden.

## 2.5 Löslichkeitsversuche mit einem Aceton-Methanol-Gemisch

Zielsetzung dieses Versuchs war es, ein geeignetes Lösungsmittel (LM) zu finden, durch das sich die Mono- und Disaccharide der Zuckerproben herauslösen lassen, nicht aber die Oligo- und Polysaccharide.

Es wurden 3 unterschiedliche Lösungsmittelzusammensetzungen getestet:

LM 1	Aceton
LM 2	Aceton:EtOH (80:20)
LM 3	Aceton:EtOH (50:50)

In Glaseprouvetten mit Drehverschluss wurden je 20mg der Probesubstanz eingewogen und mit dem Lösungsmittel versetzt.

Zunächst wurden die LM an Proben mit bekanntem niedrigem dp (durchschnittlicher Polymerisationsgrad) getestet. Fructose (dp=1), Glucose (dp=1), Saccharose (dp=2) und 1-Kestose (dp=3) wurden als Standardsubstanzen gewählt.

Die verwendete Endkonzentration betrug jeweils 1mg/ml. Die Eproutetten wurden luftdicht verschlossen und über Nacht auf den Magnetrührer gestellt. Nach 24 Stunden wurden die Überstände entfernt und die Rückstände in unverschlossenen Eproutetten mit Aceton bei 60°C über Nacht getrocknet.

Anschließend wurde ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt, um eine mögliche Intensitätsabnahme der Banden und somit eine allfällige Reduktion der Zuckermenge sichtbar zu machen.

Die unter Kapitel 2.3.2 angeführten Oligo- und Polysaccharide wurden auf dieselbe Weise aufbereitet. Für die dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen wurden sowohl eine aliquote Menge der Überstände als auch Lösungen (1mg/ml in Aqua dest.) der Trockenrückstände und Originalsubstanzen zum Vorher-Nachher-Vergleich aufgetragen.

## **2.6 Analytische Größenausschluss-Chromatographie**

Zur Überprüfung der DC-Ergebnisse wurde mit ausgewählten Proben, bei denen die Mono- und Disaccharide am besten herausgelöst wurden, eine SEC-Messung (size exclusion chromatographie / Größenausschluss-Chromatographie) durchgeführt. Bei der SEC erfolgt eine Trennung der Moleküle gelöster Substanzen ihrer Größe nach. Dabei werden größere Moleküle (hoher dp) schneller eluiert als kleinere (niedriger dp).

Im Zuge dieser Arbeit wurden 4 aneinander geschlossene Trennsäulen verwendet, die erste und letzte waren mit Toyopearl HW40 gefüllt und die beiden mittleren Säulen waren mit Superose 12 gepackt.

Um den Eluenten herzustellen, wurden 14,61g NaCl und 500mg NaN<sub>3</sub> in einem 5l-Messkolben mit Aqua bidestillata (Aqua bidest.) aufgefüllt. Im Anschluss wurde ein Teil der Lösung in einen geeigneten Behälter überführt und für 2 Stunden auf dem Ultraschallbad entgast.

Je 10mg Probesubstanz (Trockenrückstände und die zugehörigen Original-Substanzen) wurden in je 0,5ml des SEC-Eluenten gelöst und für 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert, bevor die Lösungen eingespritzt werden konnten. Das Injektionsvolumen betrug 100µl. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur und einer Fließgeschwindigkeit von 0,6ml/Minute für eine Dauer von 140 Minuten pro Lauf. Als Detektor diente ein RI 101 Brechungsindex-Detektor. Anschließend wurden die Spektren der Proben mit den Spektren der Originalsubstanzen verglichen.

## 2.7 Auftrennung von Agavenfructan und Chicorée-Inulin unter Verwendung der präparativen SEC

An die präparative SEC wurde ein Autokollektor angeschlossen, um die aufgetrennten Fraktionen zu sammeln. Es wurden 2 aneinander geschlossene Trennsäulen verwendet, die mit Polyacrylamidgel (BioGel® der Firma BioRad) gefüllt waren. Als Eluent wurde Aqua dest. verwendet. Die Trennkapazität der mit Polyacrylamid P2 gepackten Säule umfasst Moleküle der Größenordnung 100-1800 Dalton. Die Polyacrylamid P4-Säule entspricht einer Trennleistung von 800-4000 Dalton.<sup>22</sup>

Zunächst mussten die Einstellungen für den Autokollektor anhand des Volumens der P2- und P4-Säulen und der entsprechenden Flüssigkeitsmenge berechnet werden.

$$V_{P2} = h_{P2}(89\text{cm}) * r_{P2}(1,25)^2 * \pi = 436,87\text{ml}$$

$$V_{P4} = h_{P4}(76\text{cm}) * r_{P2}(1,25)^2 * \pi = \underline{373,06\text{ml}}$$

$$809,93\text{ml} = \text{ca. } 800\text{ml}$$

Etwa 30% der Gesamtmenge entsprechen dem Vorlauf ( $800 * 0,3 = 240\text{ml}$ ).

Die Flussrate wurde mit 0,6ml/Minute festgelegt. Für 800ml ergab sich somit eine Gesamtkollektionszeit von 22 Stunden und eine Vorlauf-Zeit (*wait*) von 400 Minuten. Die Parameter des Fraktionssammlers wurden entsprechend der Berechnung eingestellt (*collection mode* = 0, *wait* = 400, *fraction size* = 20).

Von den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fructanen wurden zwei für die Auftrennung mit der präparativen Größenausschluss-Chromatographie ausgewählt: Das Chicorée-Inulin (Raftiline) und das Agavenfructan (Metlin). 500mg Fructan wurden eingewogen und unter Rühren und Erhitzen in 2ml Aqua dest. vollständig gelöst. Nach dem Abkühlen wurde die Probe aufgetragen.

Die gesammelten Lösungen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht und anhand der unterschiedlichen Banden in 6 (Chicorée-Inulin) bzw. 4 (Agavenfructan) Fraktionen eingeteilt. Die Lösungen mit gleichem dp wurden in Rundkolben vereinigt, über Nacht eingefroren und im Anschluss lyophilisiert. Die Festsubstanzen wurden ausgewogen und sowohl für die Bioscreenmessung als auch für die Ionenchromatographie verwendet.

## 2.8 Analytische Ionenchromatographie

Beim verwendeten System handelte es sich um eine IC-3000 Ionenchromatographie (Dionex, Thermo Scientific) mit elektrochemischem Detektor und dem Datenverarbeitungssystem Chromeleon. Die Carbowac Pa1 (4x250mm) – Säule wurde auf 30°C temperiert. Das Injektionsvolumen betrug 30µl, die Laufzeit wurde mit 80 Minuten (+ 20 Minuten Vorlaufzeit) festgelegt.

Für die Kalibrierung wurde eine Standardlösung (55nmol/ml Glucose, 83nmol/ml Fructose, 146nmol/ml Sucrose) hergestellt. Die benötigten Eluenten wurden ausschließlich mit Aqua bidest. zubereitet, durch einen Nylonfilter filtriert und für 10 Minuten mit Argon entgast.

Folgende Eluenten wurden verwendet:

Eluent A = 0,2molare NaOH-Lösung

Eluent B = 0,1molare NaOH + 0,7molare NaOAc - Lösung

Eluent C = Aqua bidest.

Eluent D = 0,5molare NaOH-Lösung

Es wurde ein Multi-Step-Gradient erstellt:

Retention (min)	Flow (ml/min)	%B	%C	%D
-20	1,0	0,0	50,0	0,0
-10	1,0	0,0	50,0	0,0
-9,9	1,0	3,0	48,5	0,0
5	1,0	3,0	48,5	0,0
70	1,0	70,0	15,0	0,0
70,1	1,0	0,0	60,0	40,0
80	1,0	0,0	60,0	40,0

*Tabelle 2: Gradienten-Einstellung für die Dionex-Messungen*

Die Proben wurden in einer Konzentration von 2mg/ml in Aqua bidest. vorbereitet. Anhand der ionenchromatographischen Messungen konnten über die einzelnen

Datenpunkte zusätzlich die Polymerisationsgrade (dp) der Proben über das CPCwin-Programm ermittelt werden.

## 2.9 Verwendete Bakterienstämme (Probiotika)

Im Rahmen dieser praktischen Diplomarbeit wurden Versuche mit 6 unterschiedlichen *Lactobacillus*-Proben und einer *Bifidobacterium*-Art durchgeführt.

<i>Bakterien-Art</i>	<i>Firma</i>
<i>L. reuteri</i>	BioGaia
<i>L. acidophilus</i>	Hansen
<i>L. rhamnosus GG</i>	
<i>L. paracasei1</i>	Hansen
<i>L. paracasei2</i>	Danone
<i>L. paracasei 3</i>	Yakult
<i>B. animalis</i>	Hansen

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

### 2.9.1 Kultivierung der Bakterien

Die in gefrorenem Zustand gelagerten Bakterienkulturen wurden aufgetaut und für 5 Minuten bei 10000 rpm (revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Bakterienpellet in 5ml MRS+ aufgenommen. Über Nacht wurden die Bakterien unter anaeroben Bedingungen im Inkubator bei 37°C bebrütet.

Nach dieser Erstanzucht wurden die Bakterien für jeden neuen Versuchsansatz tags zuvor in MRS- kultiviert. Dafür wurden 5ml des Mediums mit 1ml der Bakteriensuspension beimpft und über Nacht unter anaeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Es wurde hier das glucosefreie Medium verwendet, um einen möglichen Einfluss auf die Messergebnisse weitgehend ausschließen zu können.

Zwischenzeitlich wurde auch MRS+ zum Kultivieren verwendet, um das Bakterienwachstum hoch zu halten.

## **2.10 Bestimmung der Wachstumskurven mittels Bioscreen-C**

Der Bioscreen C ist ein automatisiertes System zur Aufzeichnung und Darstellung mikrobiologischen Wachstums. Das Bioscreen-C-Messgerät inkubiert, schüttelt und vermisst die durch wachsende Bakterien entstehende Trübung (OD) bei einer bestimmten Wellenlänge (600nm).

Zunächst wurde die  $OD_{600}$  (optische Dichte bei 600nm) der in MRS- angezüchteten Bakteriensuspensionen photometrisch bestimmt. Falls nötig (wenn  $OD_{600} > 1$ ), wurde ein zusätzlicher Verdünnungsschritt eingebaut. Mit Hilfe der gemessenen  $OD_{600}$ -Werte wurden die Mengen an Bakterienkultur und Medium berechnet, die benötigt wurden, um eine  $OD_{600}$  von 0,1 zu erhalten.

Anschließend erfolgte das „Waschen“ der Bakterien. Die ermittelte Menge an Bakteriensuspension wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß pipettiert, mit PBS/Cystein-HCl Lösung auf 1ml aufgefüllt und anschließend für 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Bakterienpellet wurde in 1ml PBS/Cystein-HCl Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt 3x durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in der berechneten Menge an MRS- resuspendiert.

Eine sterile Mikrotiterplatte (Honeycomb) wurde mit der Bakteriensuspension und den Zuckerproben befüllt und im Bioscreengerät bei 37°C 2 Tage lang inkubiert.

Bei einer Wellenlänge von 600nm wurde die OD in den ausgewählten Wells stündlich vermessen. Um zu verhindern, dass sich die Bakterien am Boden absetzen, wurde die Platte vor jeder Messung leicht geschüttelt.

Die Bioscreen-Messungen wurden als Dreifach- bzw. Doppelbestimmung an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Die Mittelwerte der Messwerte wurden berechnet und graphisch als Wachstumskurven in Excel-Diagrammen dargestellt.

### **2.10.1 Ermittlung des Einflusses verschiedener Saccharide auf das Wachstum ausgewählter Probiotika**

Die Füllmenge pro Well wurde auf 300µl Flüssigkeit festgelegt. Um falsch positive Ergebnisse (Wachstumsanstieg durch Verunreinigungen) ausschließen zu können, wurden bei jedem Bioscreen-Versuch je zwei Wells mit MRS- und MRS+ ohne

Zugabe von Bakteriensuspension befüllt. Zeigten die entsprechenden Proben keinen Anstieg der  $OD_{600}$ , konnte gewährleistet werden, dass steril gearbeitet wurde. Des Weiteren wurden für jeden Bakterienstamm Negativkontrollen (MRS- mit Bakterium) und Positivkontrollen (MRS+ mit Bakterium) durchgeführt.

Das Mischungsverhältnis von Bakteriensuspension (in MRS- 2x) und Saccharidlösung betrug 1:1, um eine Zucker-Endkonzentration von 1% und eine  $OD_{600}$  von 0,1 zu erreichen.

### **2.10.2 Ermittlung des Einflusses unterschiedlicher Glucosekonzentrationen auf das Wachstum ausgewählter Probiotika**

Die Füllmenge pro Well wurde auf 300 $\mu$ l Flüssigkeit festgelegt. In diesem Versuchsansatz stellte die Positivkontrolle (MRS+ mit Bakterium) zugleich den 1. Wert für die Glucose-Konzentrationsabstufungen dar. Die Zucker-Endkonzentration hierbei betrug 1%. Insgesamt wurden 4 unterschiedlich konzentrierte Glucoselösungen getestet. Durch Verdünnung einer 2%-igen Lösung mit Aqua dest. resultierten Endkonzentrationen von 0,5%, 0,25% und 0,1%. Die Start- $OD_{600}$  betrug in allen Wells 0,1.

### **2.10.3 Ermittlung des Einflusses von Chicorée-Inulin und Agavenfructan mit unterschiedlichem dp auf das Wachstum ausgewählter Probiotika**

Durch die geringe Menge an Probelösung betrug die Füllmenge pro Well in diesem Fall 200 $\mu$ l und die Zucker-Endkonzentration 0,5%. Es wurden je 100 $\mu$ l Bakteriensuspension mit 50 $\mu$ l 2%-iger Saccharidlösung und 50 $\mu$ l Aqua dest. in ein Well pipettiert. Die Vergleichszucker Glucose, Fructose und 1-Kestose wurden in derselben Konzentration vermessen.

## **2.11 Bestimmung der $ET_{50}$ Werte [h]**

Anhand der Wachstumskurven wurden die zugehörigen  $ET_{50}$  Werte (medium effective time = Zeitpunkt des Erreichens der halbmaximalen  $OD_{600}$ ) mit Hilfe des TableCurve2D-Programms ermittelt.

Zunächst wurden alle Datenpunkte der Excel-Graphen gefittet. Als Beispiel an dieser Stelle, die Wachstumskurve von *L. acidophilus* mit Lactose:

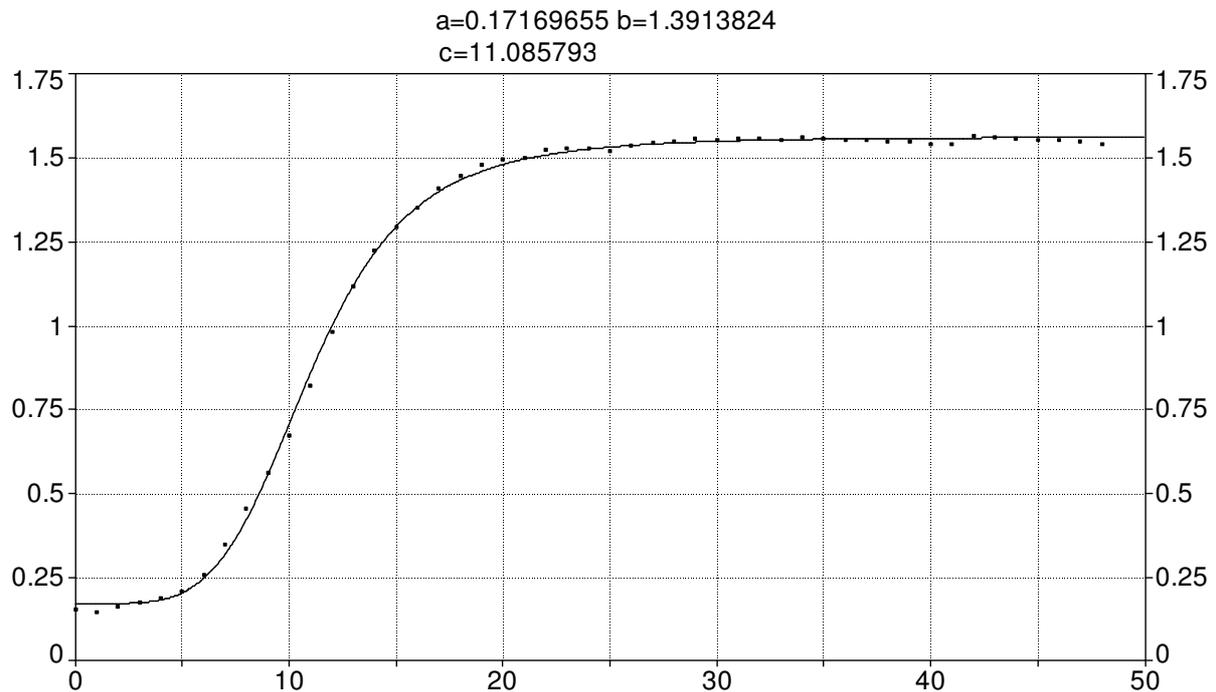


Abb. 1: gefittete Wachstumskurve von *L. acidophilus* mit Lactose (x-Achse: Zeit in Stunden, y-Achse:  $OD_{600}$ )

Die gepunktete Linie stellt die Original-Datenpunkte dar, die durchgehende Kurve zeigt die gefittete Version. Anhand dieser wurden 3 Werte ermittelt: a, b und c.

a ist die Start- $OD_{600}$  zum Zeitpunkt 0.

b ergibt sich aus der Differenz zwischen der Start- $OD_{600}$  und der  $OD_{max}$ .

c entspricht dem Wendepunkt der gefitteten Kurve. Dieser Wert gibt die Zeit an, nach der die halbmaximale  $OD_{600}$  erreicht wird ( $ET_{50}$ ).

Die  $OD_{max}$  berechnet sich folglich aus der Summe a+b (in diesem Beispiel 1,563) und die  $ET_{50}$  entspricht dem Wert c, in dem Fall 11 Stunden.

Diese beiden Faktoren wurden für jede Wachstumskurve aller Bakterienstämme in derselben Weise ermittelt und tabellarisch dargestellt (siehe Kapitel 3.7).

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Löslichkeitsversuch**

Die Trockenrückstände der Proben wurden ausgewogen und lagen in der Regel zwischen 50-90% des Ursprungsgewichts. Es zeigte sich, dass je höher der prozentuelle Anteil des Acetons im Lösungsmittelgemisch war, desto höher war die entsprechende Auswaage und umso weniger Zucker wurde herausgelöst. Lag der Anteil der wässrigen Lösungsmittel-Komponente (Methanol) höher, ergab sich für die Saccharid-Proben eine bessere Löslichkeit.

Anhand der angefertigten DCs, auf welche äquivalente Mengen an Original- und Probesubstanz aufgetragen wurden, ließ sich vor allem unter Verwendung von LM2 und LM3 (siehe Kapitel 2.5) eine Intensitätsabnahme der Banden der Mono-, Di- und Oligosaccharide erkennen. Jene Proben, die besonders im niedermolekularen Bereich schwächere Banden zeigten, wurden ausgewählt und mittels analytischer SEC getestet.

Die aufgenommenen Spektren der Proben wurden mit Spektren der Originalsubstanzen verglichen. Es zeigte sich allerdings, dass durch die Löslichkeitsversuche nicht nur die Mono- und Disaccharide herausgelöst wurden, sondern sich das Spektrum über den gesamten Bereich veränderte.

Für die Zielsetzung dieser Arbeit, eine Abhängigkeit des Bakterienwachstums von einem bestimmten dp der Saccharid-Fractionen aufzuzeigen, konnten diese Proben nicht weiter verwendet werden.

#### **3.2 Präparative Größenausschluss-Chromatographie**

Bei der Auftrennung mit der präparativen Größenausschlusschromatographie wurden pro Lauf 92 Einzelfractionen zu je 12ml mit dem Autokollektor gesammelt. Diese wurden zur Anfertigung von DCs verwendet, um Fractionen gleicher Größe vereinigen zu können. Für das Agavenfructan wurden 4 Bereiche festgelegt, für das Inulin aus Chicorée 6. Nach dem Einfrieren und Trocknen wurden die Ausbeuten bestimmt. Die jeweils niedermolekularste Fraction zeigte die geringste Auswaage (1mg bei 400mg Einwaage, < 0,25%) und konnte für weitere Untersuchungen nicht

verwendet werden. So ergaben sich 3 Fraktionen des Agavenfructans und 5 Fraktionen des Inulins, die auf ihre präbiotische Wirkung getestet wurden.

### 3.3 Vermessung ausgewählter Proben mit Ionenchromatographie

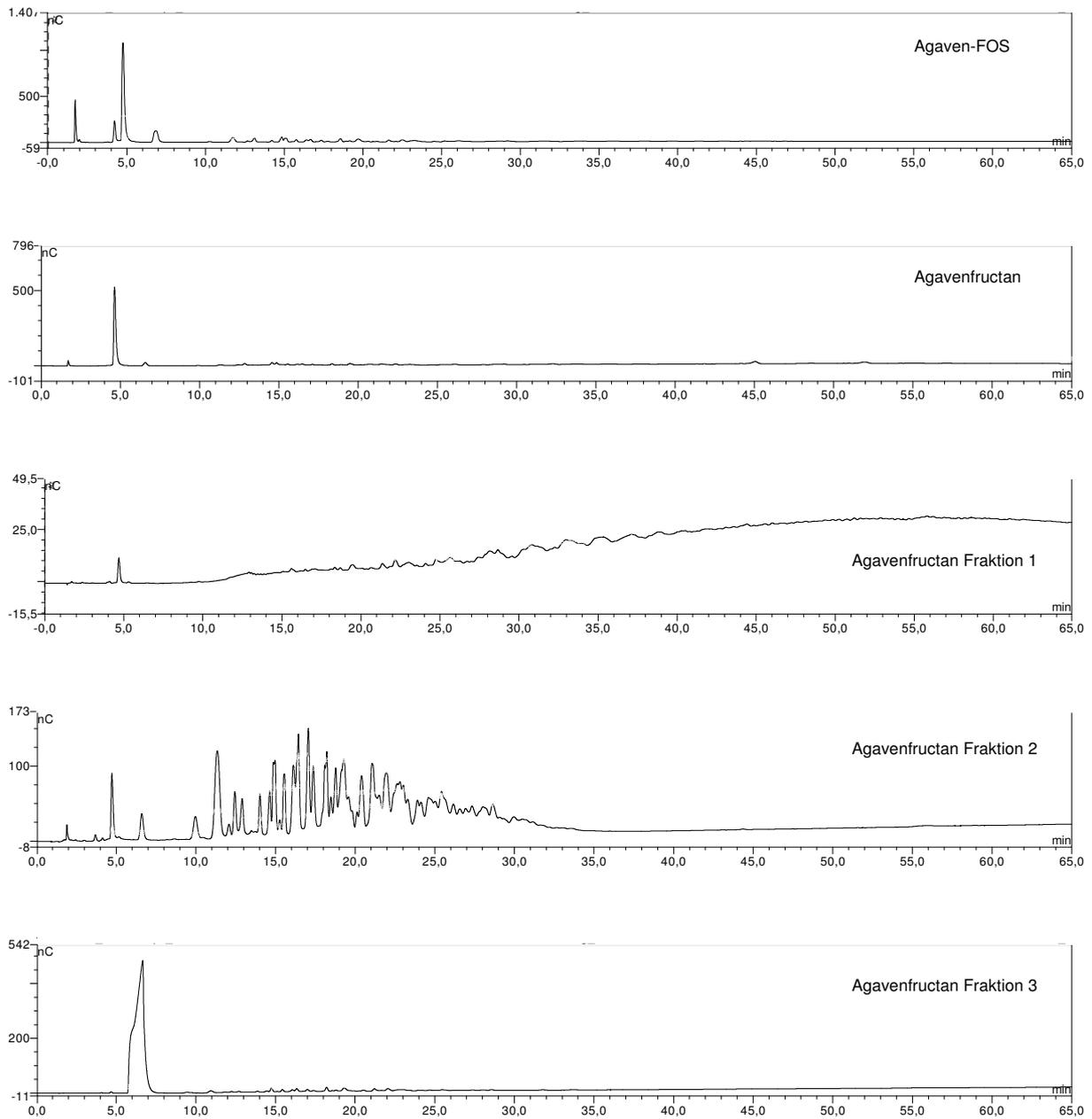
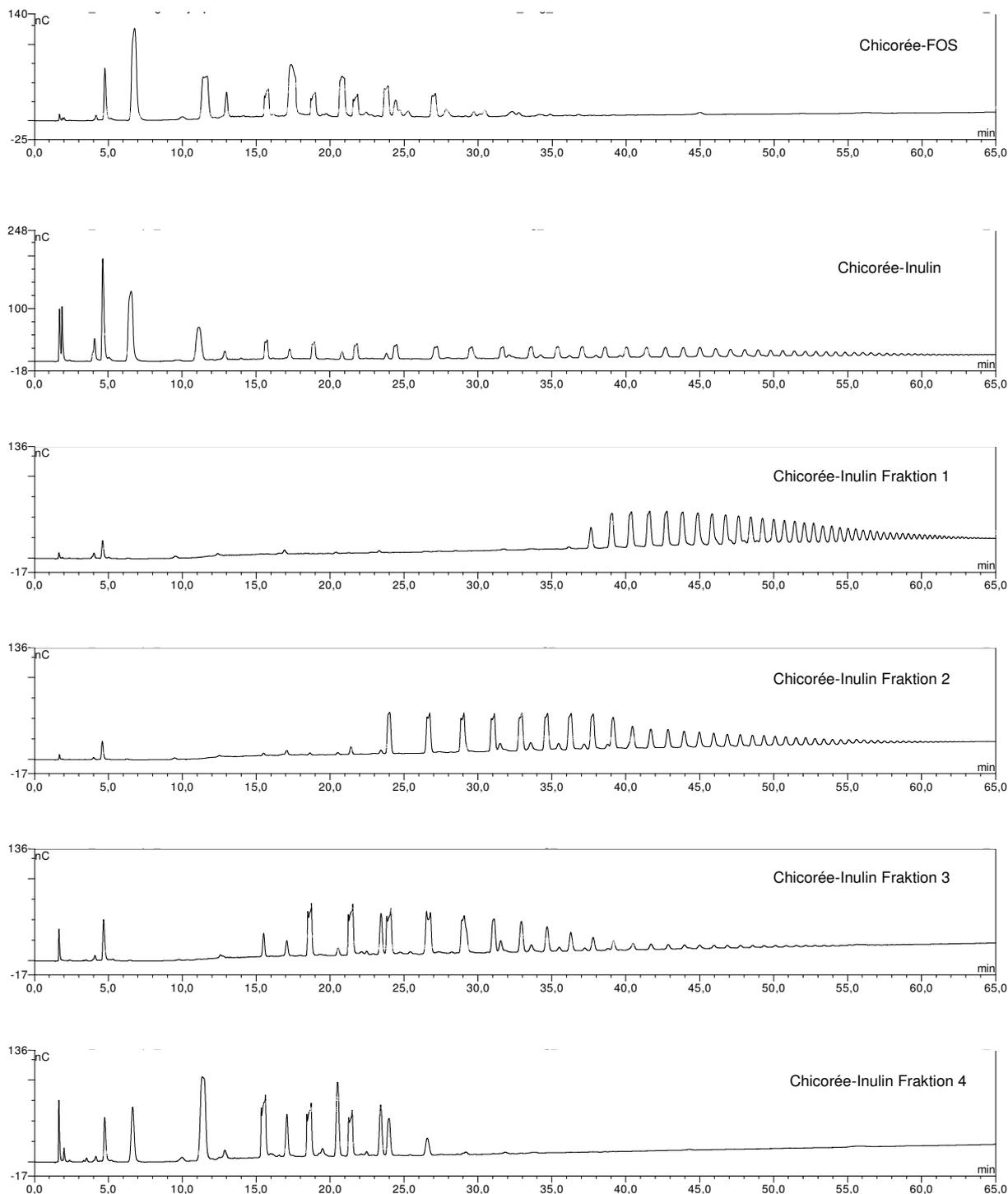


Abb. 2: Ionenchromatographische Messung ausgewählter Saccharid-Proben (x-Achse: Zeit in Minuten, y-Achse: nC)



Fortsetzung der Abb. 2

Bei den aufgetrennten Fructanen lässt sich in beiden Fällen eine deutlich sichtbare Verschiebung der Spektren erkennen. So liegen die Peaks der Fraktion 1 sehr weit rechts im höhermolekularen Bereich, wohingegen mit steigender Fraktionszahl die Peaks weiter in den niedermolekularen Bereich wandern.

Die Ergebnisse der Ionenchromatographie bestätigten somit in weitaus präziserer Weise die vorangegangenen dünnschichtchromatographischen Analysen. Darüber hinaus konnte anhand der gewonnenen Datenpunkte der durchschnittliche Polymerisationsgrad der einzelnen Fraktionen über das CPCwin-System ermittelt werden (siehe Kapitel 3.8).

Es wurden sowohl Spektren der gewonnenen Fraktionen von Agavenfructan und Chicorée-Inulin aufgenommen als auch Spektren aller unter Kapitel 2.3.2 angeführten Saccharide.

So ergaben sich für das Agavenfructan 4 Spektren (Originalsubstanz und Fraktion 1-3), für Inulin aus Chicorée 5 Spektren (Originalsubstanz und Fraktion 1-4), und je 1 Spektrum für die Fructooligosaccharide aus Agave und Chicorée. Eine Vermessung von Fraktion 5 des Chicorée-Inulins war nicht möglich, da nicht ausreichend Material zur Verfügung stand. Aus den zuvor angefertigten Dünnschichtchromatogrammen ließ sich jedoch darauf schließen, dass diese Fraktion hauptsächlich aus 2-fach und 3-fach Zuckern bestand.

### 3.4 Wachstum der Bakterienstämme unter Einfluss ausgewählter Saccharide

#### 3.4.1 *Lactobacillus reuteri*

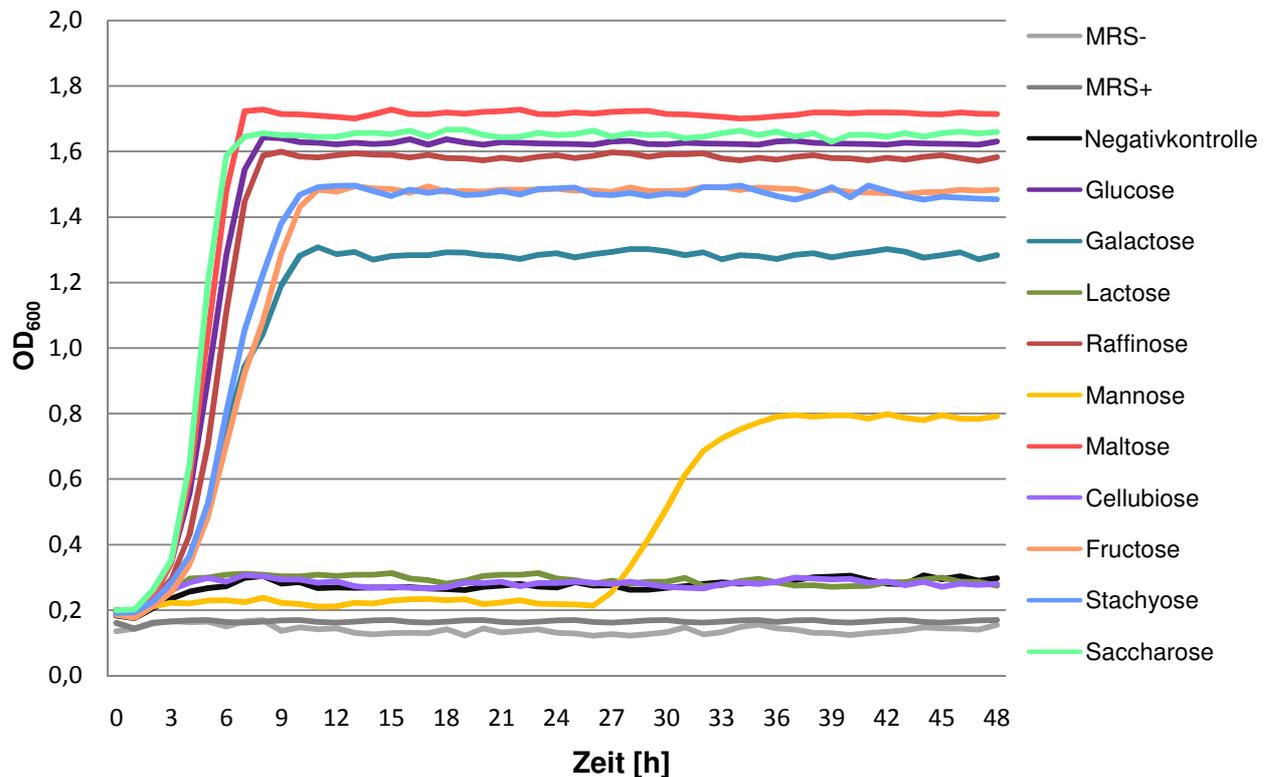


Abb.3: Wachstumskurven von *L. reuteri* unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, bewirken Glucose, Galactose, Raffinose, Maltose, Fructose, Stachyose und Saccharose ein sehr gutes Wachstum des *L. reuteri*. Mannose zeigt erst nach ca. 28h einen Einfluss auf das Bakterienwachstum und erreicht auf Höhe einer OD<sub>600</sub> von 0,8 ein Plateau. Das Wachstum in Gegenwart von Cellubiose und Lactose entspricht der Negativkontrolle. Daraus lässt sich schließen, dass diese beiden Zucker keinen präbiotischen Effekt auf *L. reuteri* besitzen, da sich ihr Einfluss auf die Bakterien nicht von einer saccharidfreien MRS- Zugabe unterscheidet. MRS- und MRS+ bewirken keine Trübungszunahme, was zeigt, dass steril gearbeitet wurde.

### 3.4.2 *Lactobacillus acidophilus*

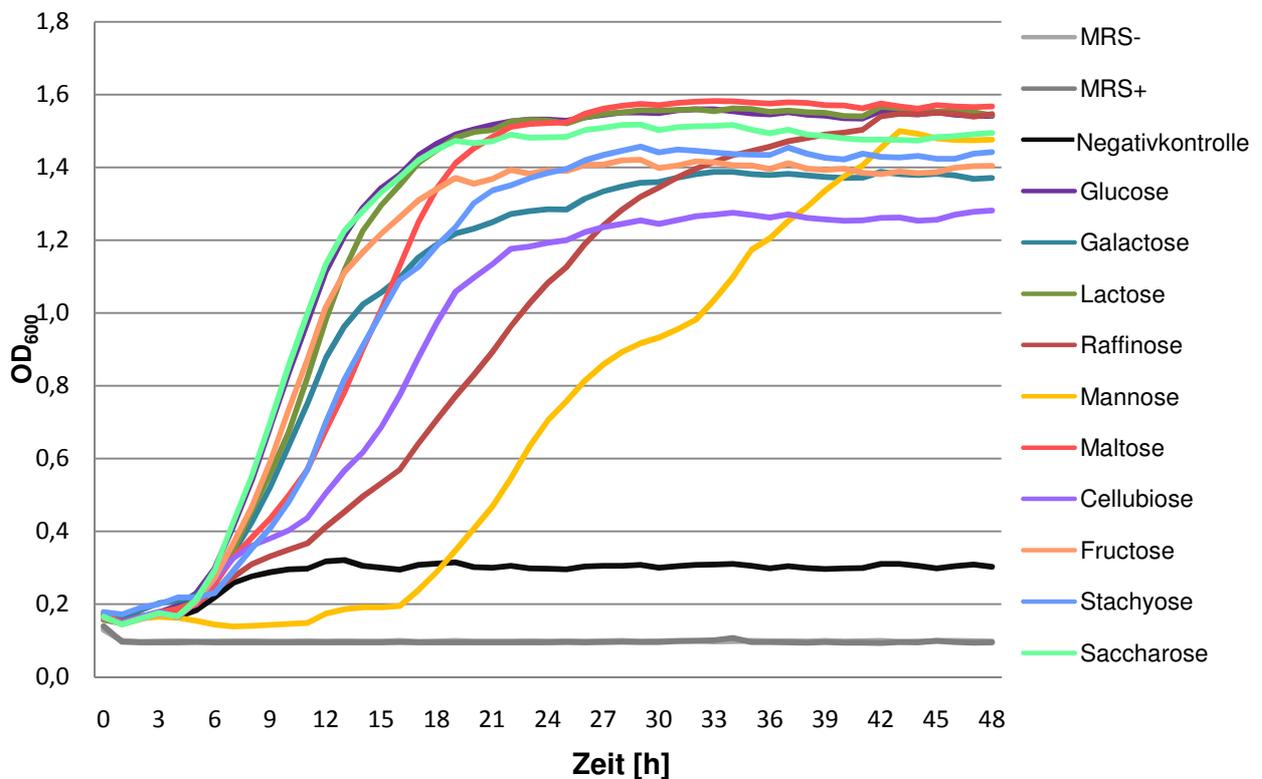


Abb.4: Wachstumskurven von *L. acidophilus* unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose

*L. acidophilus* zeigt unter dem Einfluss aller getesteten Saccharid-Proben einen starken Wachstumsanstieg. Dennoch unterscheiden sich die Kurven im Zeitpunkt ihres Anstiegs und in ihren ET<sub>50</sub> Werten zum Teil stark. Glucose, Saccharose, Lactose und Fructose bewirken das schnellste Wachstum, gefolgt von Galactose, Stachyose, Maltose, Cellubiose und Raffinose. Die längste Verzögerung ist bei Mannose erkennbar.

### 3.4.3 *Lactobacillus rhamnosus* GG

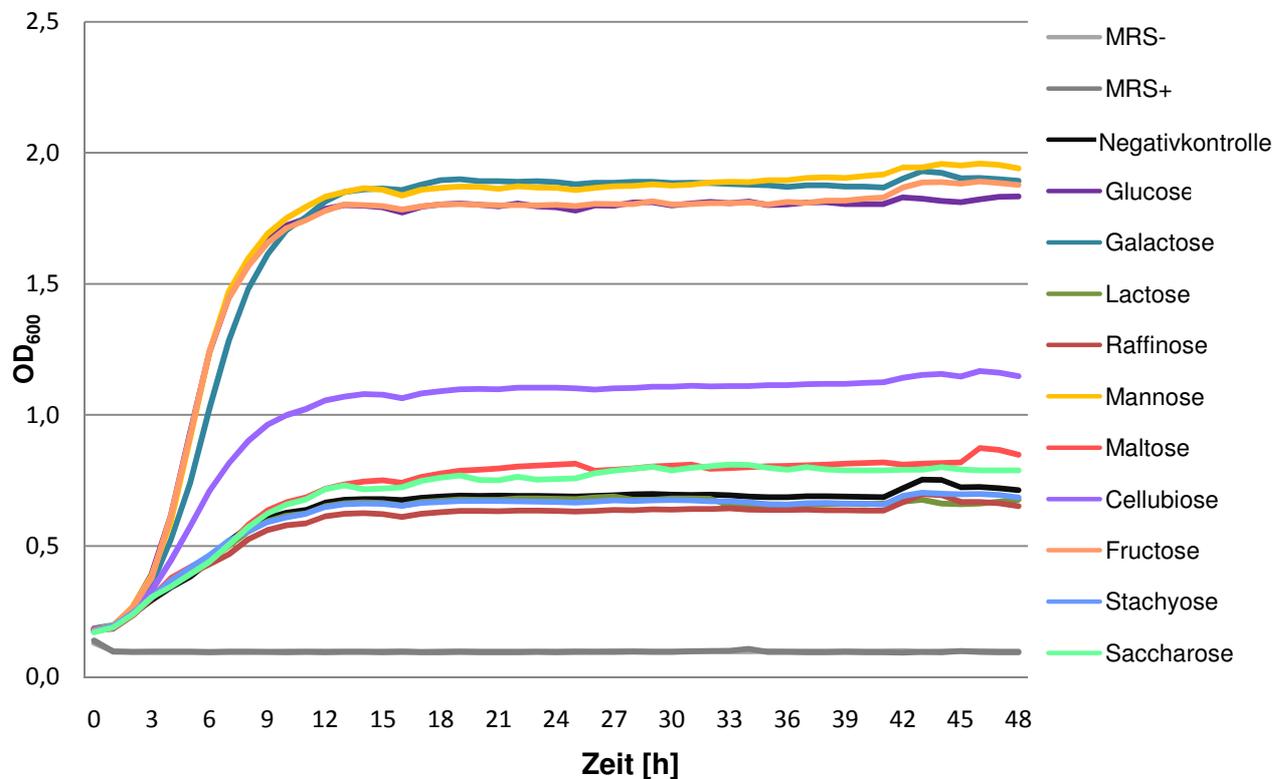


Abb.5: Wachstumskurven von *L. rhamnosus* GG unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, zeigt sich in Gegenwart von Galactose, Mannose und Fructose ein ähnliches Wachstum wie mit Glucose. Mit Cellubiose erreicht das Bakterienwachstum zumindest die halbmaximale Glucose-OD<sub>600</sub>. Bei Lactose, Raffinose, Maltose, Stachyose und Saccharose liegt der Anstieg der OD<sub>600</sub> im Bereich der Negativkontrolle. Diese Zucker besitzen demnach keinen wachstumsfördernden Effekt auf die Bakterien, da sie denselben Anstieg bewirken wie das glucosefreie Medium alleine.

### 3.4.4 *Lactobacillus paracasei* 1

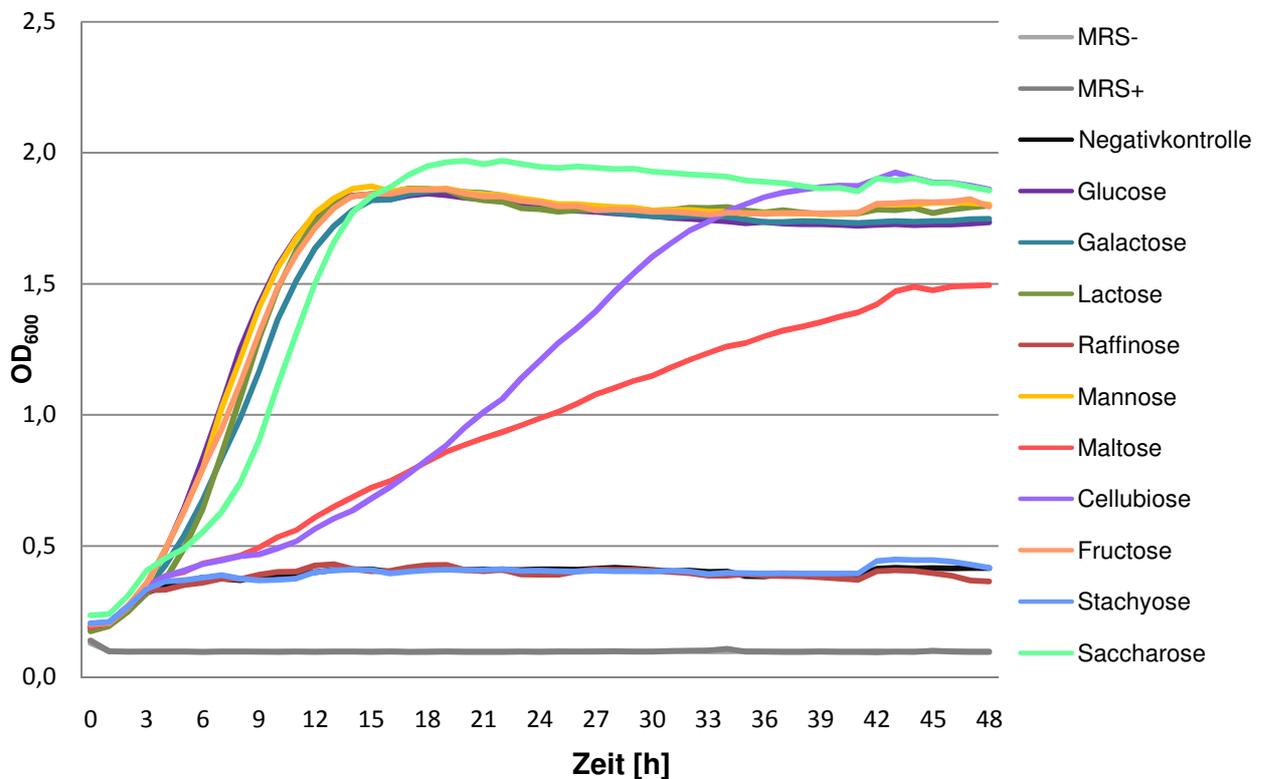


Abb.6: Wachstumskurven von *L. paracasei* 1 unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose

*L. paracasei* 1 zeigt mit Glucose, Galactose, Lactose, Mannose, Fructose und Saccharose das höchste Wachstum. Maltose und Cellubiose lässt die Kurven im Vergleich langsamer und weniger steil ansteigen, sie erreichen aber schlussendlich ebenfalls einen signifikanten Anstieg. Stachyose und Raffinose zeigen hier keine nennenswerte präbiotische Wirkung.

### 3.4.5 *Lactobacillus paracasei* 2

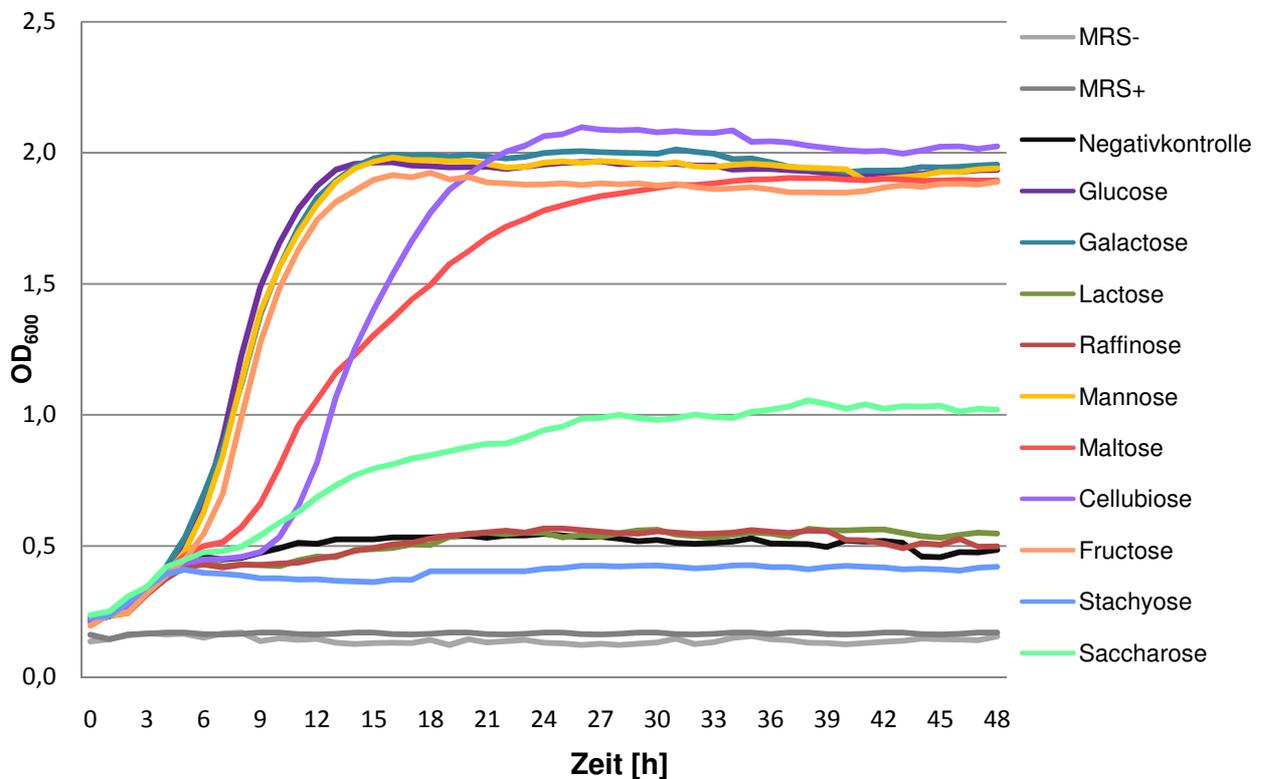


Abb.7: Wachstumskurven von *L. paracasei* 2 unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose

Wie sich anhand der Wachstumskurven erkennen lässt, bewirken Glucose, Galactose, Mannose und Fructose sehr schnell die maximalen OD<sub>600</sub>-Werte für *L. paracasei* 2, die sich mit den genannten Zuckern in etwa derselben Größenordnung befinden. Cellubiose und Maltose ergeben ebenfalls ein Wachstum mit vergleichbaren OD<sub>max</sub>-Werten. Diese beiden Proben führen allerdings erst 4-7h später zu einem Wachstumsanstieg. Unter dem Einfluss von Saccharose wird auf Höhe der halbmaximalen Glucose-OD ein Plateau erreicht. *L. paracasei* 2 wächst mit Saccharose im Vergleich zu den vorher genannten Zuckern deutlich schlechter. Raffinose, Lactose und Stachyose bewirken keinen signifikanten Wachstumsanstieg.

### 3.4.6 *Lactobacillus paracasei* 3

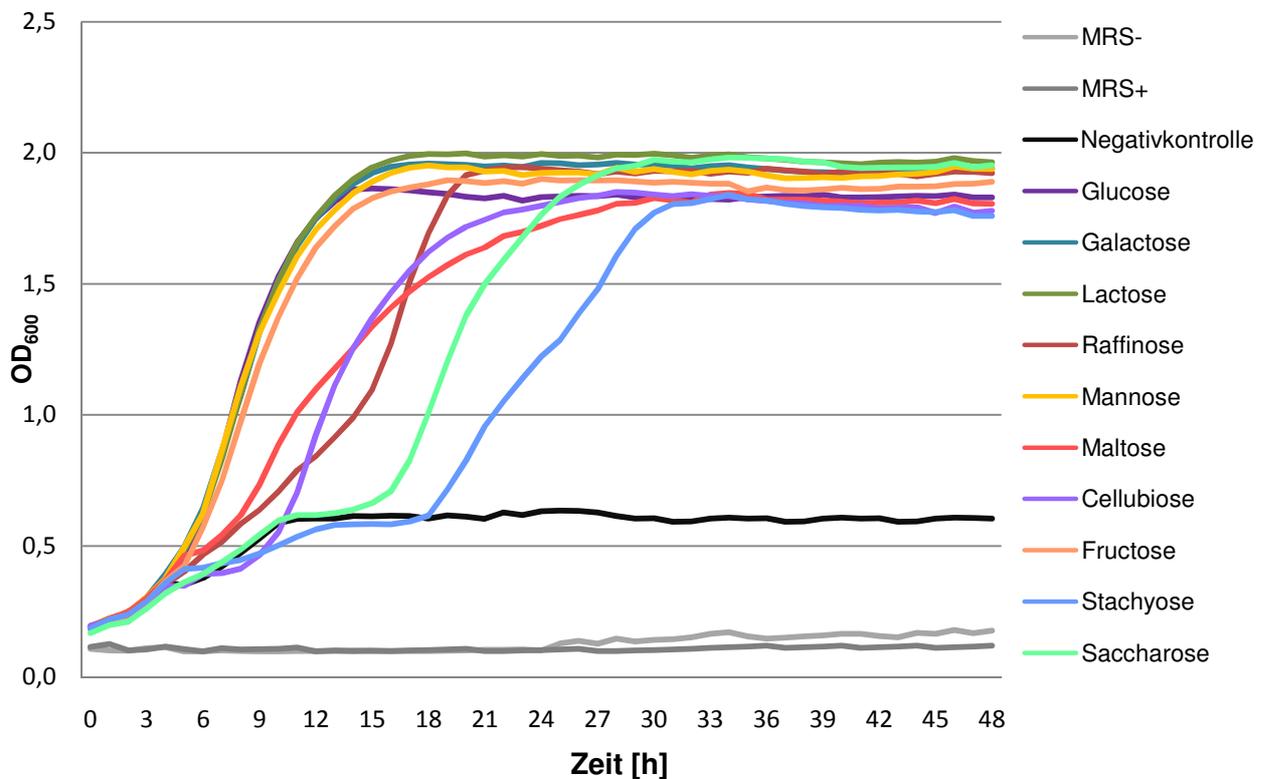


Abb.8: Wachstumskurven von *L. paracasei* 3 unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose

Ähnlich den Wachstumskurven des *L. acidophilus* entsprechen auch bei *L. paracasei* 3 die maximalen OD<sub>600</sub>-Werte mit allen getesteten Sacchariden in etwa dem OD<sub>max</sub>-Wert mit Glucose, allerdings zeigen sie sehr unterschiedliche ET<sub>50</sub>-Werte. Unter dem Einfluss von Glucose, Lactose, Mannose und Fructose setzt der Wachstumsanstieg schnell ein. Maltose lässt das Bakterienwachstum leicht verzögert ansteigen, gefolgt von Raffinose, Cellubiose, Saccharose und Stachyose.

### 3.4.7 *Bifidobacterium animalis*

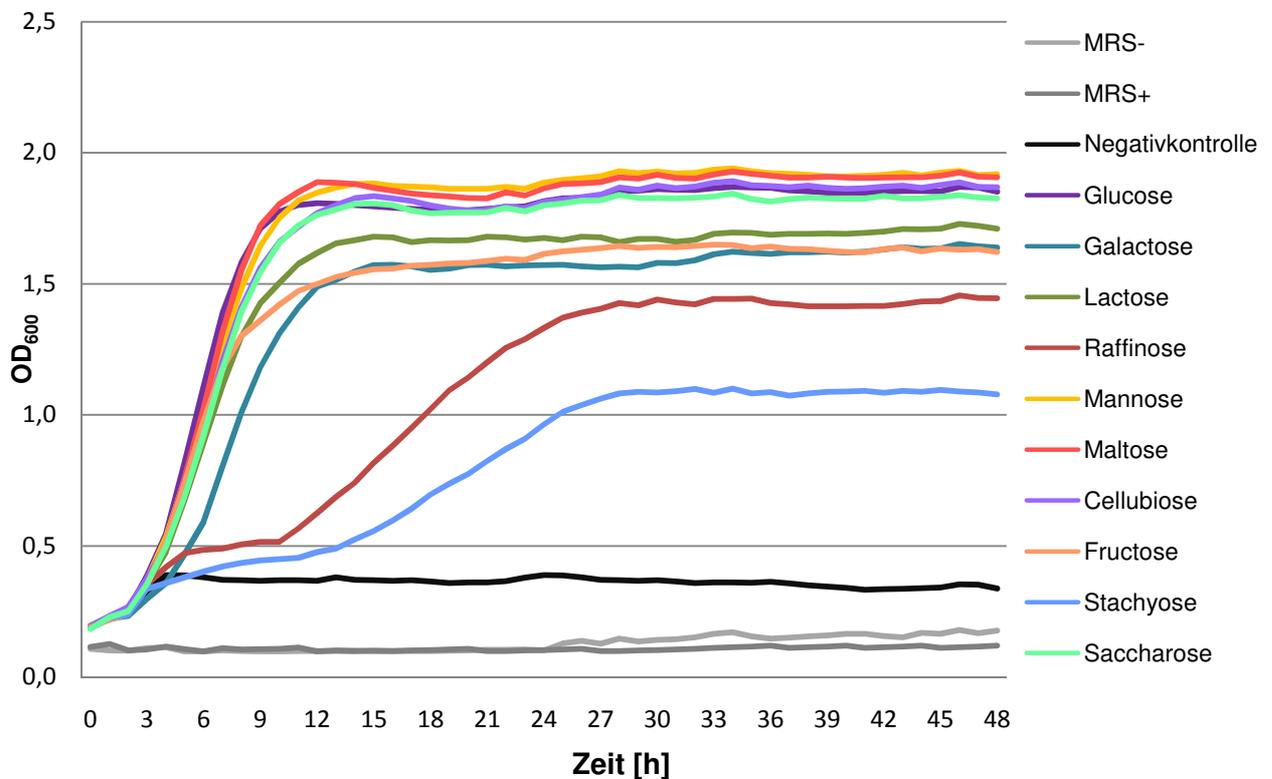


Abb.9: Wachstumskurven von *Bifidobacterium animalis* unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich ist, bewirken Glucose, Galactose, Lactose, Mannose, Maltose, Cellubiose und Saccharose - verglichen mit der Negativkontrolle - einen signifikanten Anstieg. Raffinose und Stachyose führen ebenfalls zu einem signifikanten, wenn auch verzögerten und etwas weniger starken Wachstumsanstieg.

### 3.5 Wachstum der Bakterienstämme unter dem Einfluss von Glucose in unterschiedlichen Konzentrationen

Aufgrund der geringen Ausbeute der Fructan-Auftrennungen galt es eine Möglichkeit zu finden, den Zuckerlösungs-Verbrauch möglichst gering zu halten. Da ein bestimmtes Füllvolumen der Honeycomb-Wells nicht unterschritten werden sollte (Mindestmenge 200µl) und eine Bioscreen-Einfachbestimmung nicht aussagekräftig gewesen wäre, musste die Konzentration der Zuckerlösungen angepasst werden. Um zu testen, welche Prozentigkeit sich dafür eignen könnte, wurde Glucose als Referenzsubstanz ausgewählt. Es wurden Lösungen zwischen 0,1 und 1% hinsichtlich ihres Einflusses auf die  $OD_{max}$ -Werte von 7 Bakterienstämmen untersucht.

Alle Lösungen, einschließlich jenen, die zehnfach verdünnt vorlagen (0,1%), zeigten gegenüber der Negativkontrolle eine signifikante Wirkung auf das bakterielle Wachstum. Da man von dem Ergebnis des präbiotisch stark wirksamen Monosaccharids nicht direkt auf andere Saccharidproben schließen konnte, wurde sicherheitshalber für die aufgetrennten Fructan-Fractionen eine End-Konzentration von 0,5% gewählt.

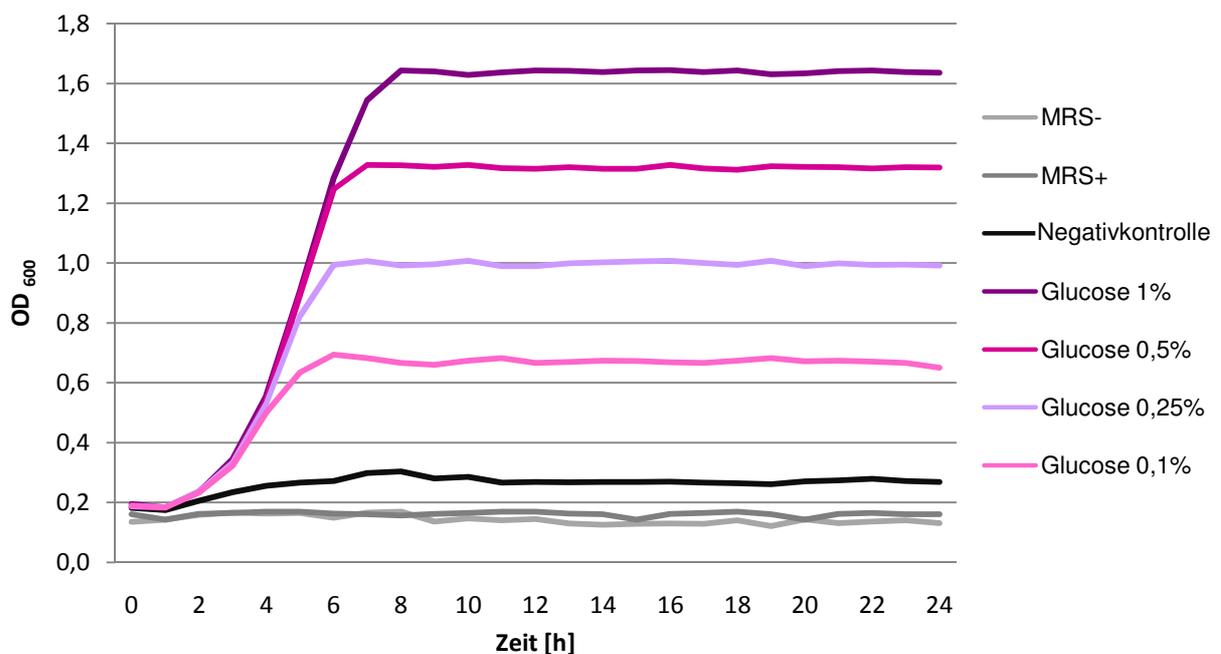


Abb.10: Wachstumskurven von *L. reuteri* unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen

Anhand von Abbildung 10 lässt sich eine für alle getesteten Bakterienstämme gültige Aussage treffen: Die Wachstumskurven von Glucose ergeben für niedrigere Konzentrationen geringere maximale OD<sub>600</sub>-Werte (Glucose 1% > Glucose 0,5% > Glucose 0,25% > 0,1%). Die Wachstumskurven aller Lösungen liegen dennoch signifikant über der Negativkontrolle.

Die ET<sub>50</sub> Werte (siehe Kapitel 3.7) innerhalb eines Bakterienstamms unterscheiden sich nur minimal voneinander. Vergleicht man die Bakterienstämme miteinander lassen sich sowohl anhand der Graphen als auch anhand der ET<sub>50</sub> Werte Unterschiede erkennen. So steigen die Kurven bei *L. reuteri*, *L. paracasei 1* und *L. paracasei 3* am schnellsten an (Abb. 8, 11 & 13), gefolgt von *L. rhamnosus GG* und *B. animalis* (Abb. 10 & 14). Bei *L. paracasei 2* und *L. acidophilus* setzt das Wachstum im Vergleich um 2-3h verzögert ein (Abb. 12 & 9).

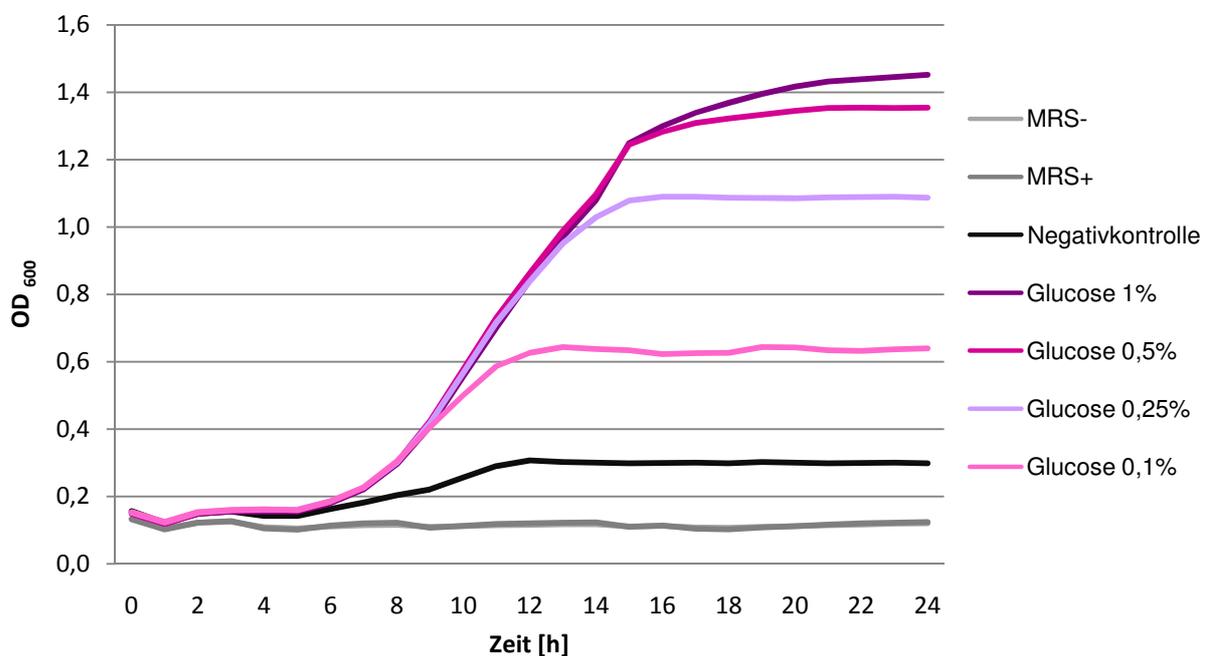


Abb.11: Wachstumskurven von *L. acidophilus* unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen

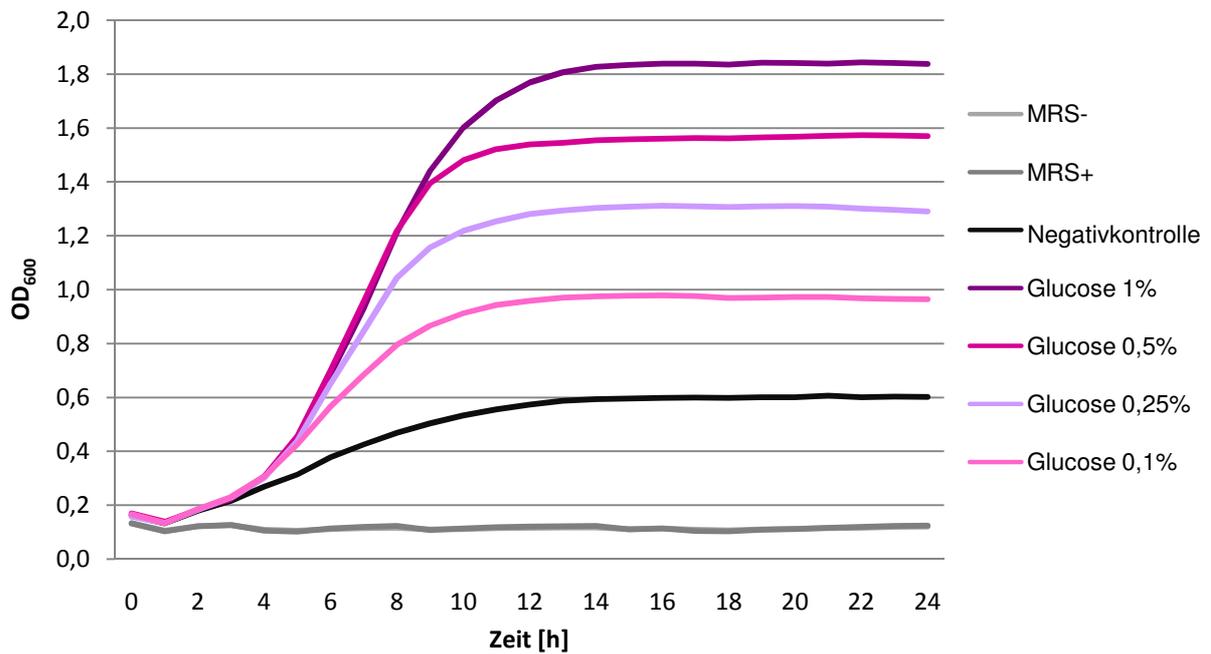


Abb.12: Wachstumskurven von *L. rhamnosus* GG unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen

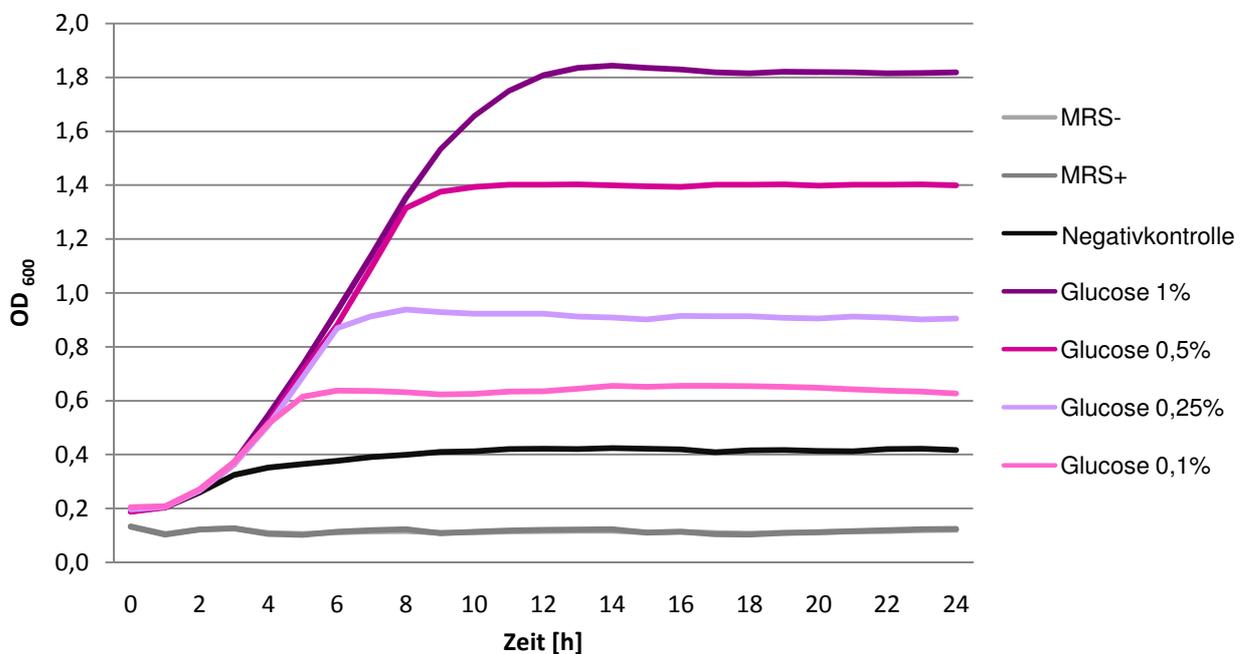


Abb.13: Wachstumskurven von *L. paracasei* 1 unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen

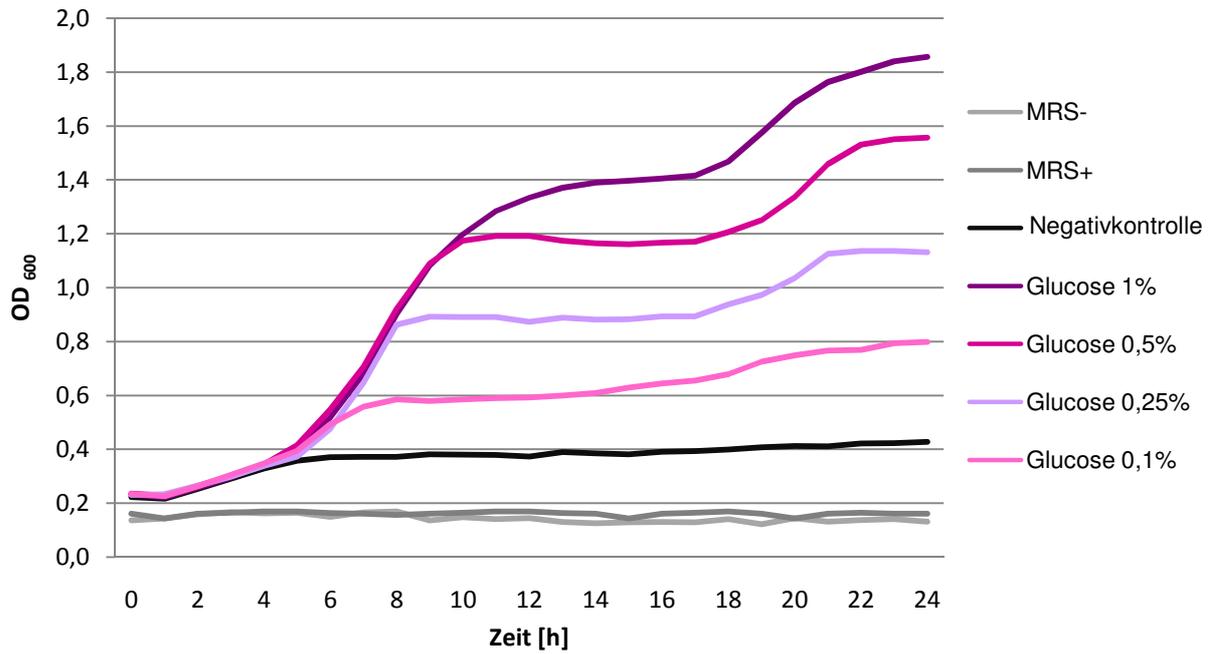


Abb.14: Wachstumskurven von *L. paracasei* 2 unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen

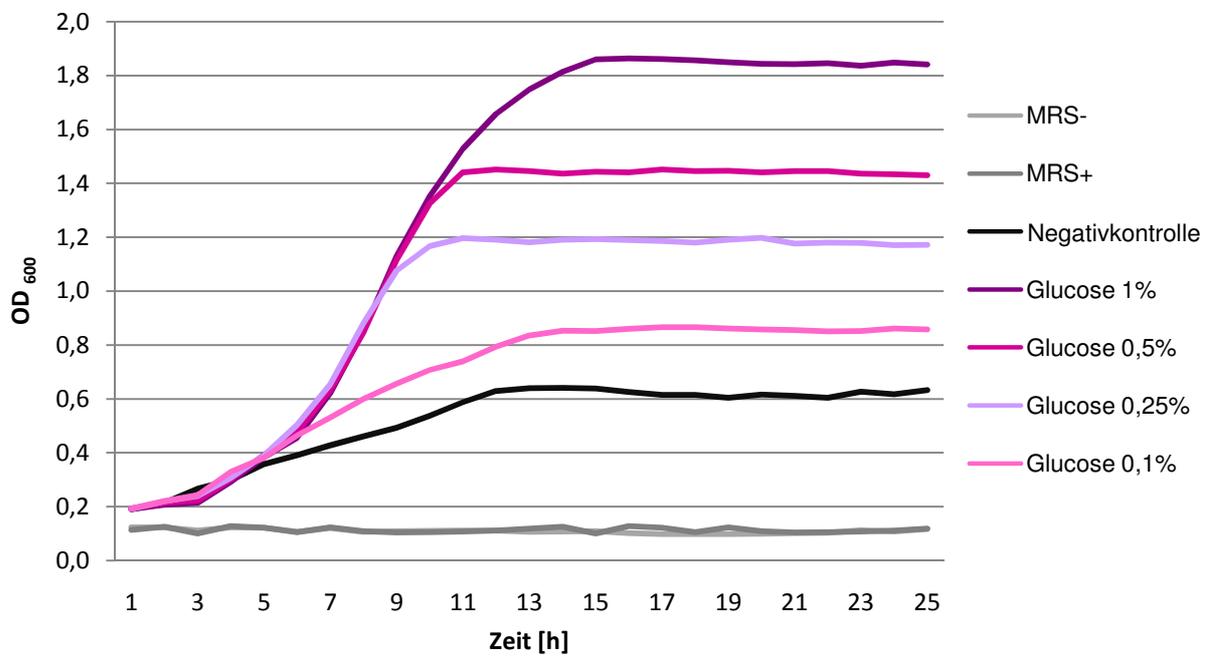


Abb.15: Wachstumskurven von *L. paracasei* 3 unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen

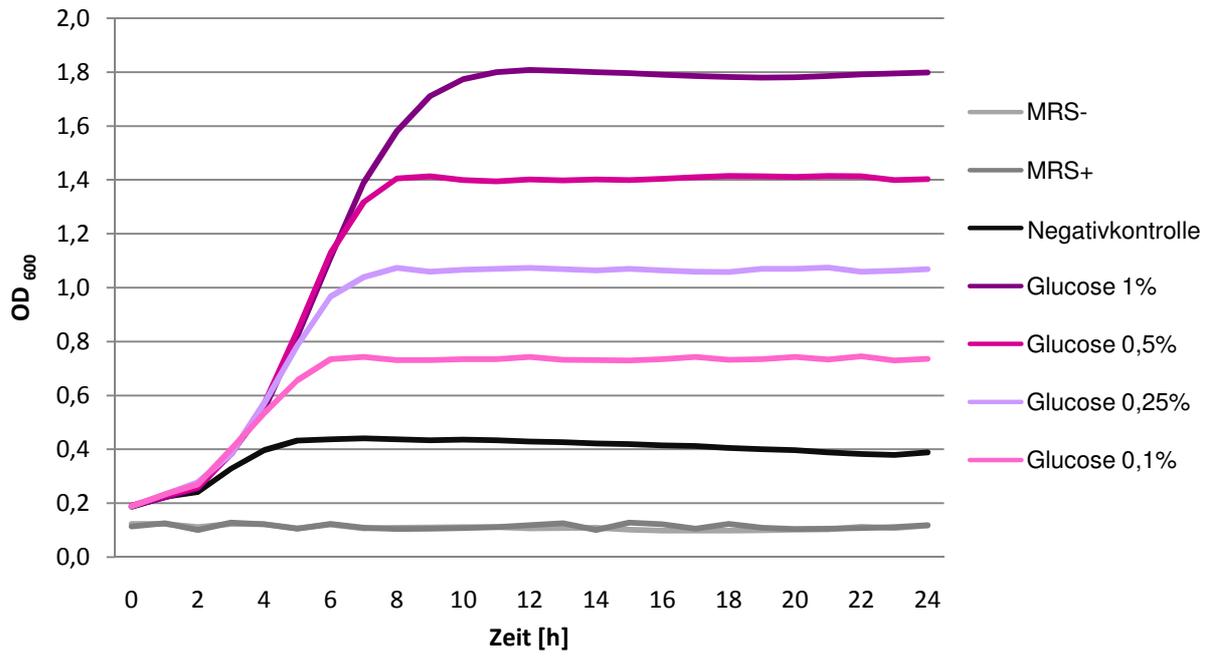


Abb. 16: Wachstumskurven von *B. animalis* unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen

### 3.6 Wachstum der Bakterienstämme unter dem Einfluss der aufgetrennten Fraktionen von Agavenfructan und Chicorée-Inulin

#### 3.6.1 *Lactobacillus reuteri*

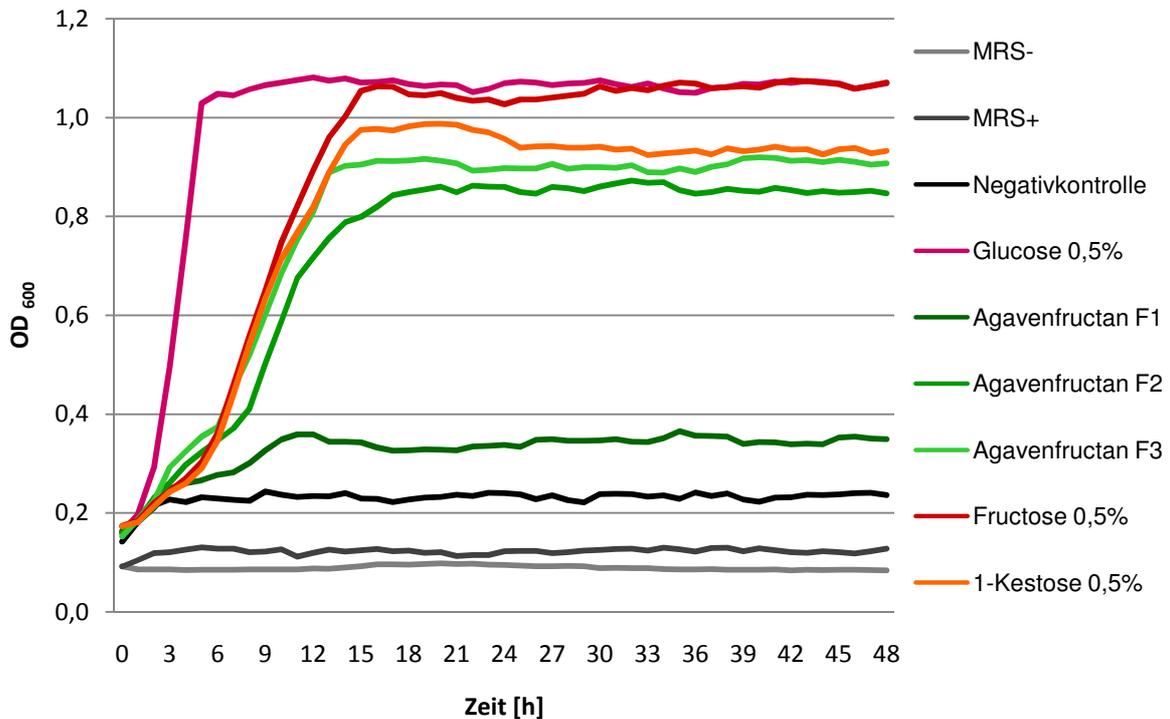


Abb.17: Wachstumskurven von *L. reuteri* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose

*L. reuteri* wächst sehr gut mit den niedermolekularen Fraktionen 3 und 2 von Agavenfructan. Auch das Wachstum mit der höhermolekularen Fraktion 1 liegt zumindest leicht über der Negativkontrolle. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die präbiotische Wirkung dieses Fructans auf *L. reuteri* vom Polymerisationsgrad der einzelnen Agavenfructan-Fraktionen abhängig ist: Je niedermolekularer die Fraktion, desto besser das Wachstum. Als Vergleichssubstanzen wurden Glucose, Fructose (2 Monosaccharid-Proben mit einem  $dp=1$ ) und 1-Kestose (ein  $\beta$ -2-1-verknüpftes lineares Fructan; eine Triose mit  $dp=3$ ) verwendet. Unter dem Einfluss von Glucose zeigte sich das schnellste und höchste Wachstum, gefolgt von Fructose und 1-Kestose. Alle 3 ergaben eine höhere OD<sub>600</sub> verglichen mit den aufgetrennten Agavenfructan-Proben.

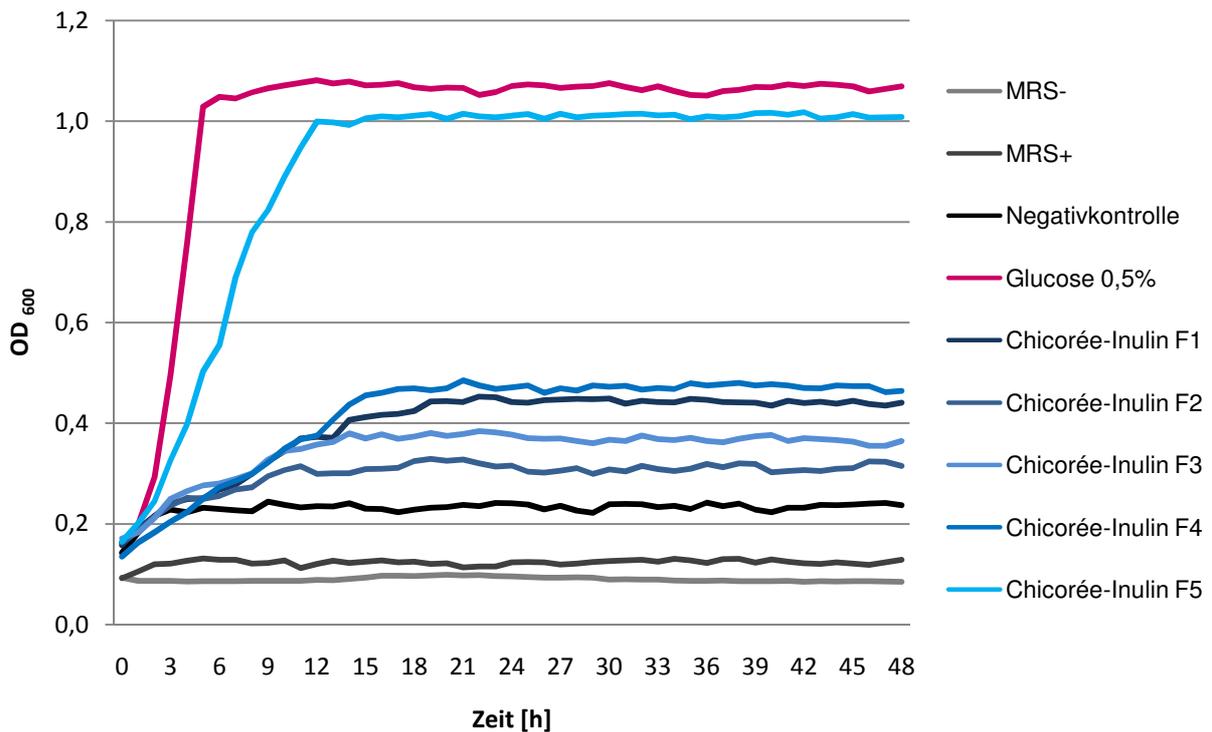


Abb. 18: Wachstumskurven von *L. reuteri* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose

Wie in Abbildung 18 erkennbar ist, wächst *L. reuteri* am besten mit Glucose und Fraktion 5 (niedermolekular) des Chicorée-Inulins. Die Fraktionen 1-4 zeigen zwar gegenüber der Negativkontrolle ebenfalls einen leichten Wachstumsanstieg, allerdings wird durch keine dieser Proben die halbmaximale OD<sub>600</sub> von Glucose erreicht.

### 3.6.2 *Lactobacillus acidophilus*

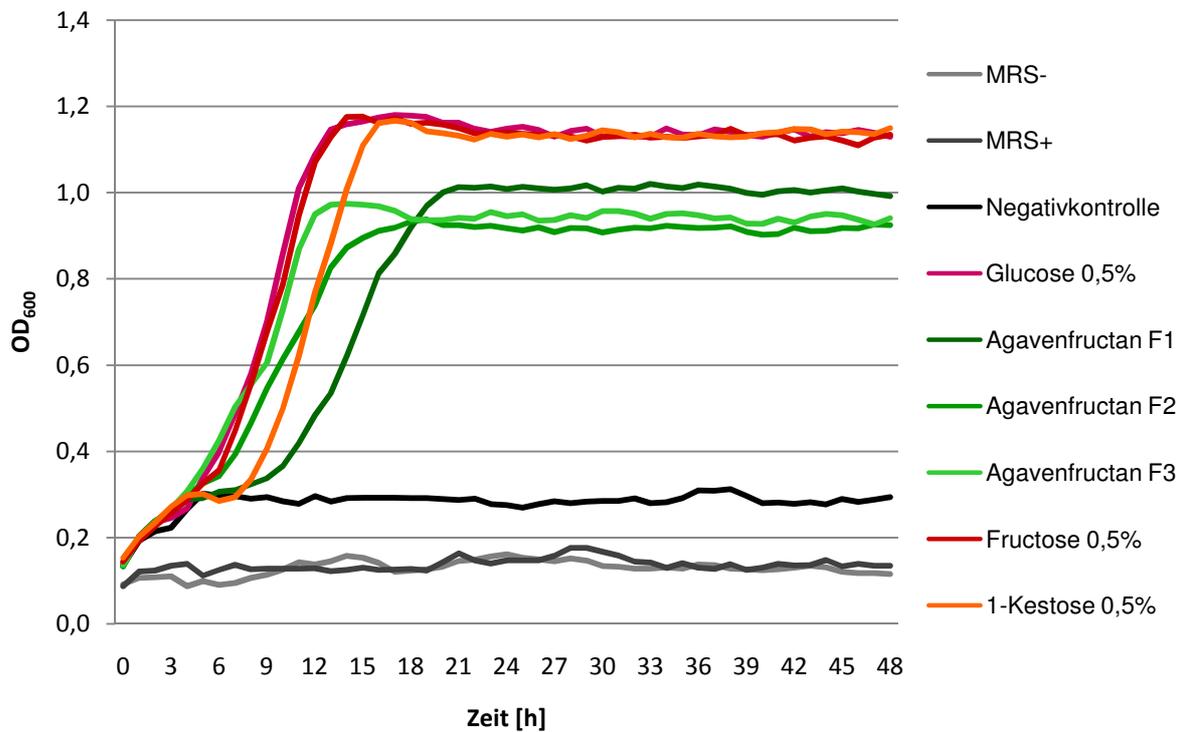


Abb. 19: Wachstumskurven von *L. acidophilus* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose

*L. acidophilus* zeigt mit allen Agavenfructan-Fraktionen einen signifikanten Wachstumsanstieg. Anhand der Graphen erkennt man deutlich, dass das Bakterienwachstum unter dem Einfluss der niedermolekularen Fraktion 3 am schnellsten einsetzt, gefolgt von Fraktion 2 und zuletzt Fraktion 1.

Glucose und Fructose bewirken Wachstumskurven, die sich in ihrem Anstiegszeitpunkt und ihrer OD<sub>max</sub> nur minimal voneinander zu unterscheiden. Die 1-Kestose bewirkt mit zeitlicher Verzögerung dieselbe OD<sub>max</sub> wie die Monosaccharid-Proben.

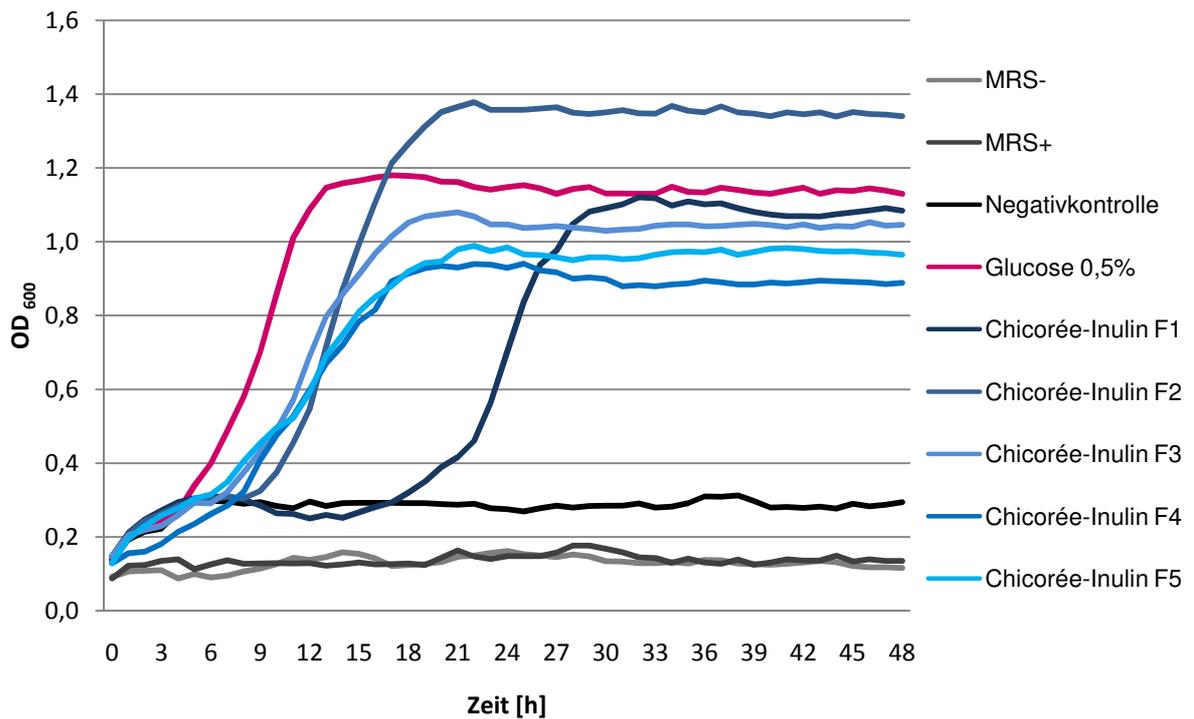


Abb. 20: Wachstumskurven von *L. acidophilus* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose

Anhand der Abbildung 20 lässt sich ein signifikantes Wachstum mit allen 5 Fraktionen des Chicorée-Inulins erkennen. Zeitpunkt des Wachstumsanstiegs, Steilheit der Kurve und Erreichen des Plateaus unterscheiden sich hierbei jedoch sehr stark voneinander. So steigt die Wachstumskurve unter Einfluss von Fraktion 5 als erstes an und mit Fraktion 1 als letztes. Fraktion 1 bewirkt erst nach 22 Stunden ein Bakterienwachstum.

### 3.6.3 *Lactobacillus rhamnosus* GG

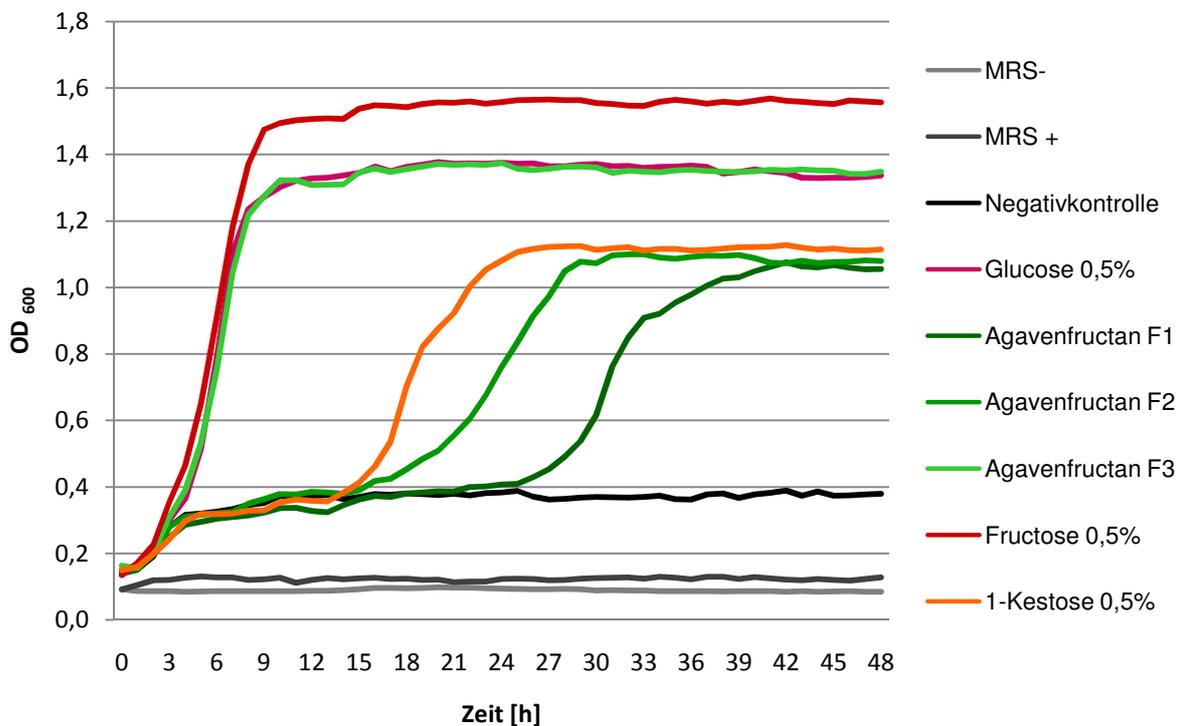


Abb. 21: Wachstumskurven von *L. rhamnosus* GG unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose

Die Wachstumskurve des Bakterienstamms mit Fraktion 3 des Agavenfructans ist graphisch gesehen beinahe deckungsgleich mit der Positivkontrolle. Fraktion 2 bewirkt nach 24 Stunden ein Maximum, Fraktion 1 noch später. Zunächst bildet sich ein Plateau auf Höhe der Negativkontrolle (ebenso bei 1-Kestose), bis das Wachstum einsetzt.

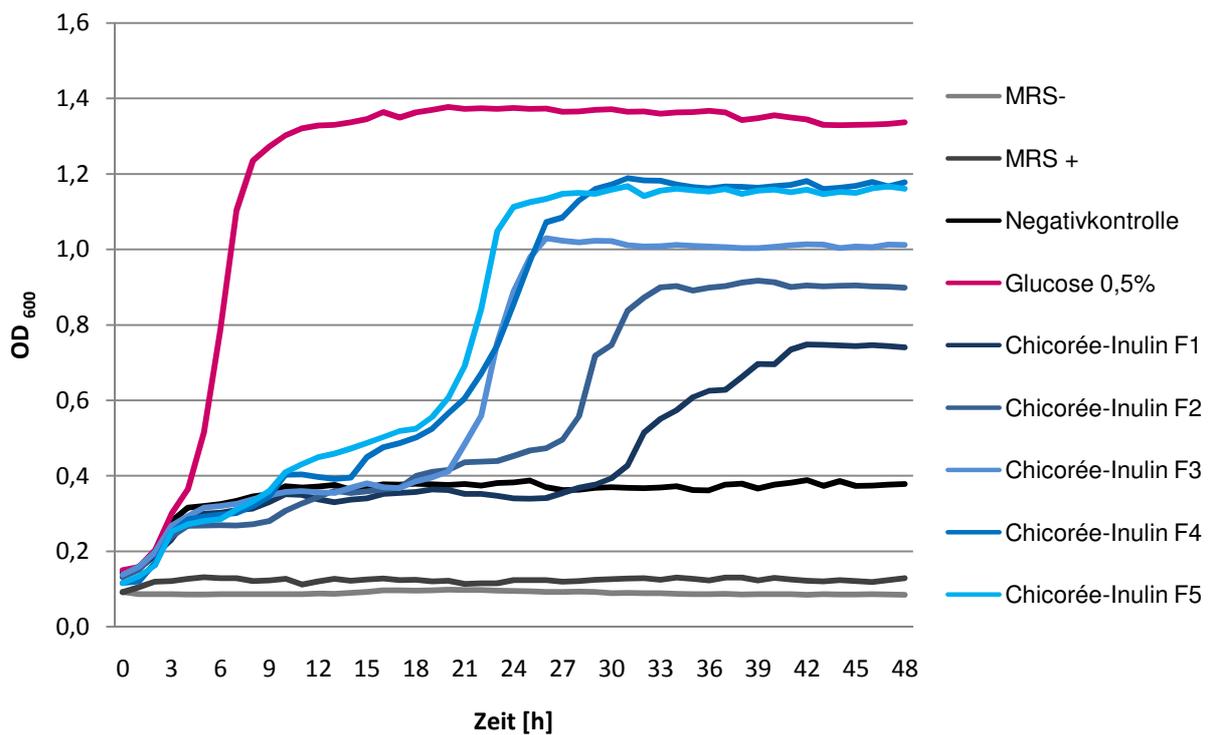


Abb. 22: Wachstumskurven von *L. rhamnosus* GG unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose

Alle Fraktionen von Inulin zeigen einen stark verzögerten Wachstumsanstieg verglichen mit Glucose. Der Zeitpunkt des Anstiegs korreliert mit der Größe der Fraktionen. So steigt die niedermolekulare Fraktion 5 am schnellsten, gefolgt von Fraktion 4, 3, 2, 1. Entsprechend dieser Reihenfolge nehmen die OD<sub>max</sub>-Werte ebenfalls ab.

### 3.6.4 *Lactobacillus paracasei* 1

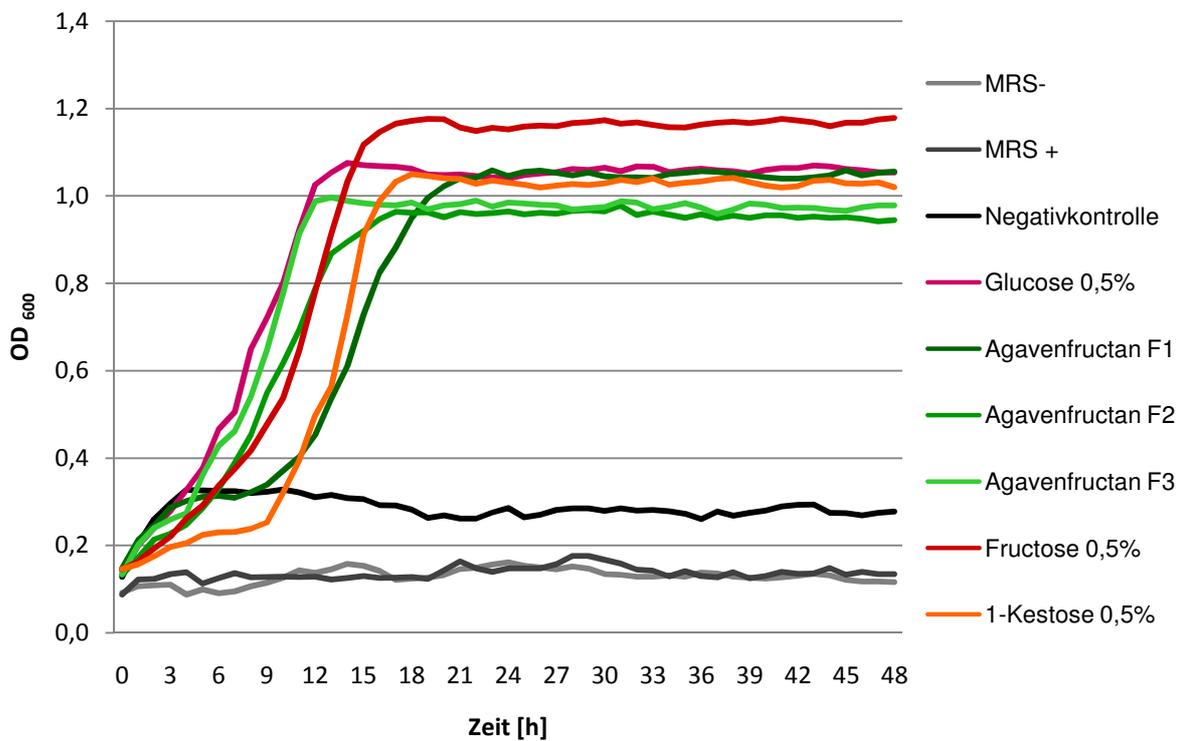


Abb. 23: Wachstumskurven von *L. paracasei* 1 unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose

Vergleichbar mit den Wachstumskurven des *L. acidophilus* zeigt sich für *L. paracasei* 1 ein sehr ähnliches Bild: Agavenfructan F1 (höhermolekular) bewirkt das späteste Wachstum, jedoch die höchste OD<sub>max</sub>. Anhand der Graphen sieht man, dass die Wachstumskurven unter dem Einfluss der niedermolekularen Agavenfructan-Fraktion 3 am schnellsten ansteigen, gefolgt von Fraktion 2 und Fraktion 1. Alle Fraktionen bewirken eine Glucose-ähnliche OD<sub>max</sub>.

Glucose, Fructose und 1-Kestose steigen in dieser Reihenfolge an und erzielen alle einen signifikanten Wachstumsanstieg. Die höchste OD<sub>max</sub> erreicht *L. paracasei* 1 hierbei mit Fructose.

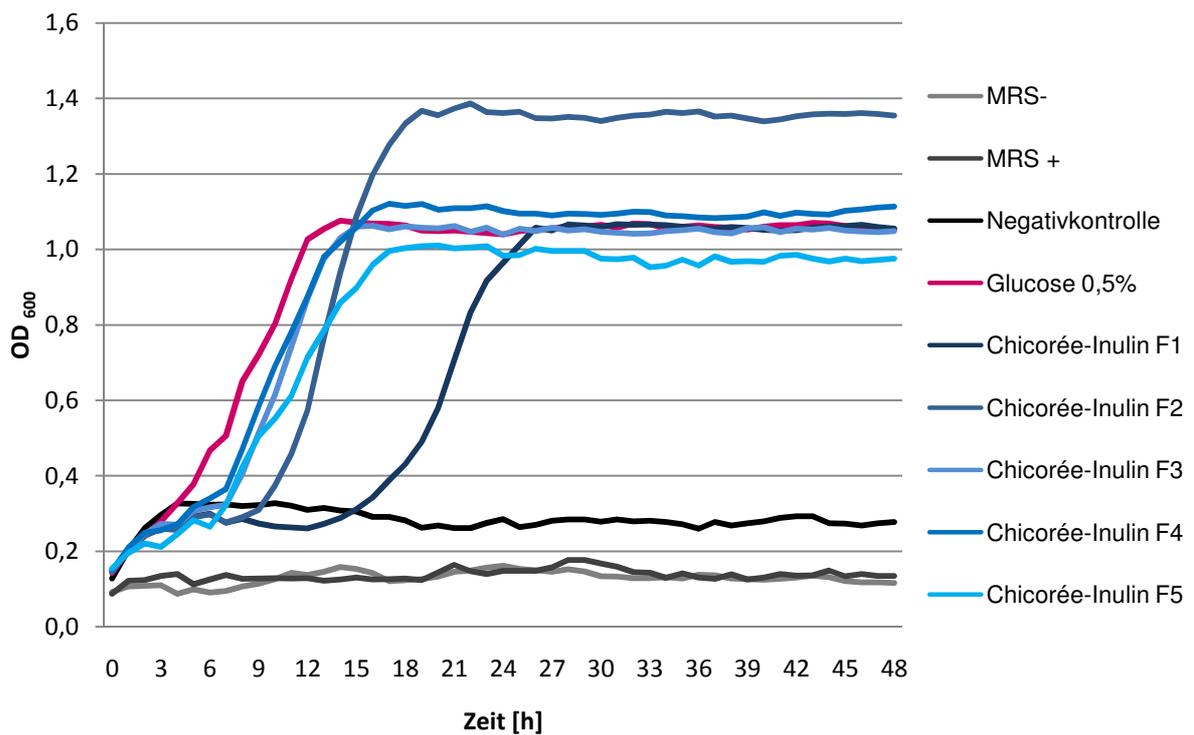


Abb. 24: Wachstumskurven von *L. paracasei* 1 unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose

Wie aus Abbildung 24 ersichtlich ist, bewirken alle Fraktionen des Chicorée-Inulins ein sehr gutes Wachstum. Chicorée-Inulin F4 erreicht nach Glucose den schnellsten Wachstumsanstieg, dicht gefolgt von Fraktion 3 und 5. Etwas verzögert zeigt sich der Anstieg mit Fraktion 2. Mit deutlichem zeitlichem Abstand bewirkt zuletzt auch der wachstumsfördernde Einfluss der Fraktion 1 eine der Glucose entsprechende  $OD_{max}$ . Die hier bildlich dargestellte Reihenfolge  $F4=F3>F5>F2>F1$  entspricht auf den ersten Blick nicht der gewünschten linearen Korrelation zwischen  $d_p$  und dem Wachstumsanstieg. Durch Ermittlung der  $ET_{50}$  Werte lässt sich jedoch eine etwas konkretere Aussage treffen (siehe 3.7). Außerdem liegen die Zeitpunkte des Anstiegs mit F3-F5 sehr knapp beieinander.

### 3.6.5 *Lactobacillus paracasei* 2

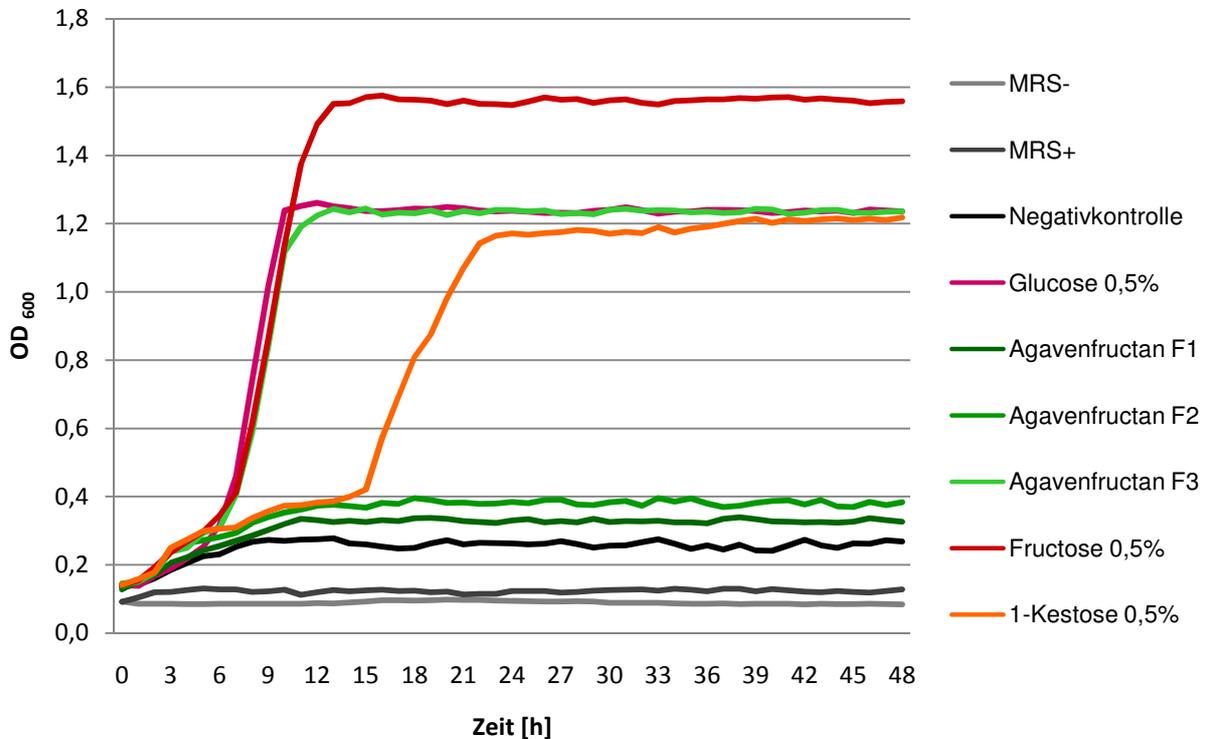


Abb. 25: Wachstumskurven von *L. paracasei* 2 unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose

*L. paracasei* 2 wächst lediglich mit der niedermolekularen Fraktion 3 signifikant an. Agavenfructan F2 und Agavenfructan F1 bewirken ebenfalls ein Wachstum, welches jedoch nur leicht über der Negativkontrolle liegt.

Glucose lässt das Bakterienwachstum am schnellsten ansteigen, dicht gefolgt von Fructose und Agavenfructan F3. 1-Kestose zeigt mit einer Verzögerung von etwa 10h ebenfalls eine starke Wachstumszunahme.

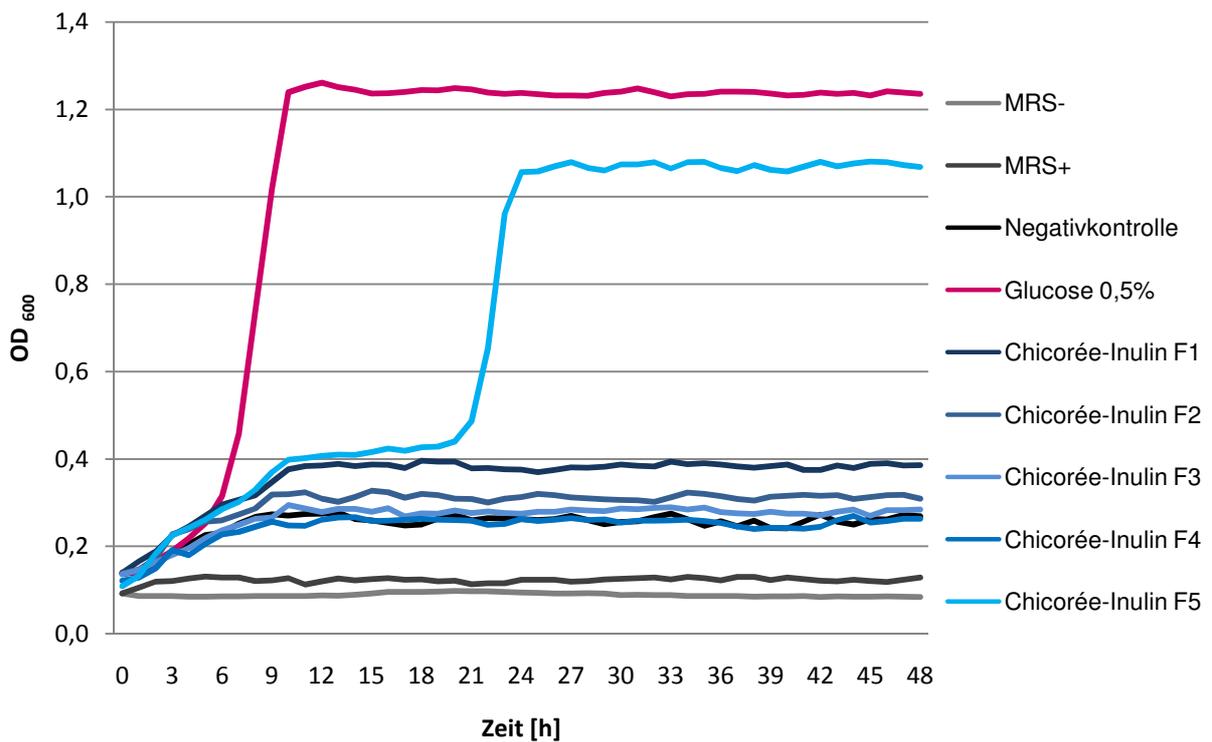


Abb. 26: Wachstumskurven von *L. paracasei* 2 unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose

Ähnlich den Bioscreen-Ergebnissen mit den aufgetrennten Fraktionen des Agavenfructans, zeigt *L. paracasei* 2 auch bei Chicorée-Inulin ausschließlich mit der niedermolekularsten Fraktion (F5) ein signifikantes Wachstum. Die Fraktionen 1-4 bewirken zwar einen leichten Anstieg, jedoch liegen die Kurven nur leicht über der Negativkontrolle und erreichen somit zu keinem Zeitpunkt die halbmaximale Glucose-OD. Für eine Korrelation mit den dp-Werten konnten für diesen Bakterienstamm nicht ausreichend viele  $ET_{50}$  Werte ermittelt werden.

### 3.6.6 *Lactobacillus paracasei* 3

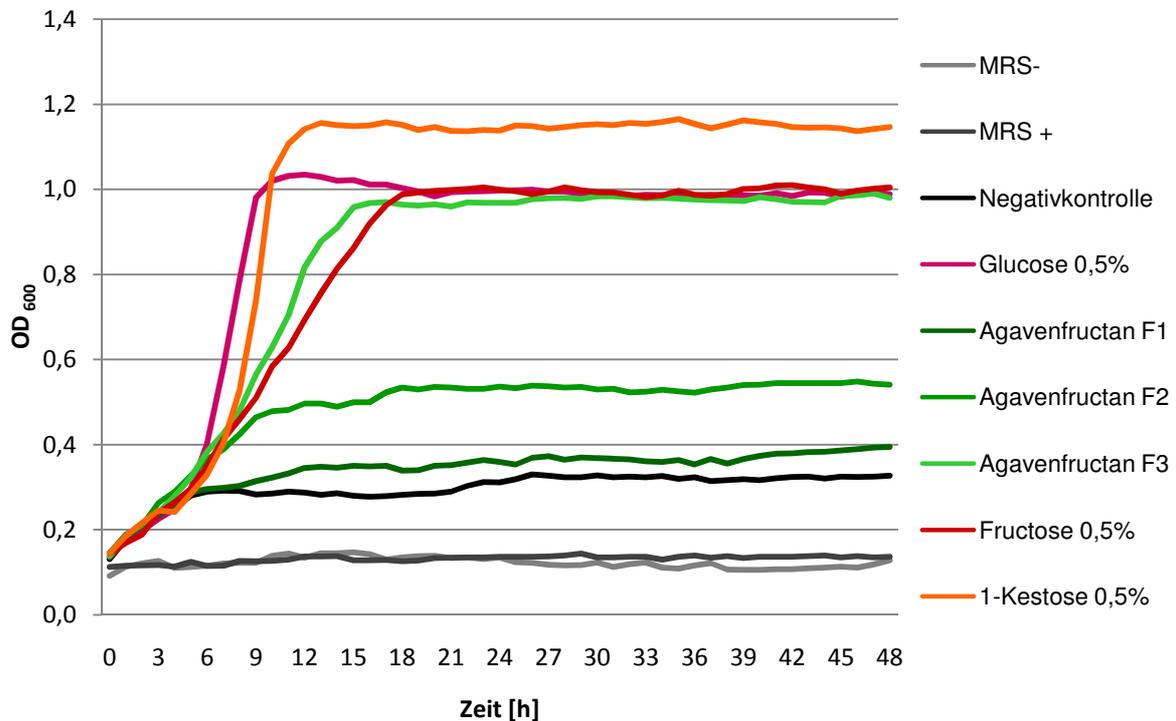


Abb. 27: Wachstumskurven von *L. paracasei* 3 unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose

Alle Agavenfructan-Fraktionen führen zu einem Wachstumsanstieg. Die Reihenfolge des Anstiegs und der  $OD_{max}$ -Werte ergibt:  $F3 > F2 > F1$  und bestätigt für *L. paracasei* 3, dass die niedermolekularen Fraktionen verglichen mit höhermolekularen Fraktionen ein stärkeres und schnelleres bakterielles Wachstum bewirken. Der Wachstumsanstieg ( $OD_{max}$ ) mit F2 und F1 ist für eine Korrelation und Signifikanz dennoch zu gering.

Durch Zugabe der Vergleichssubstanzen Glucose und Fructose erreicht *L. paracasei* 3 bei derselben  $OD_{max}$  ein Plateau, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten. 1-Kestose führt zum höchsten Wachstumsanstieg und liegt zeitlich gesehen zwischen Glucose (am schnellsten) und Fructose (zuletzt).

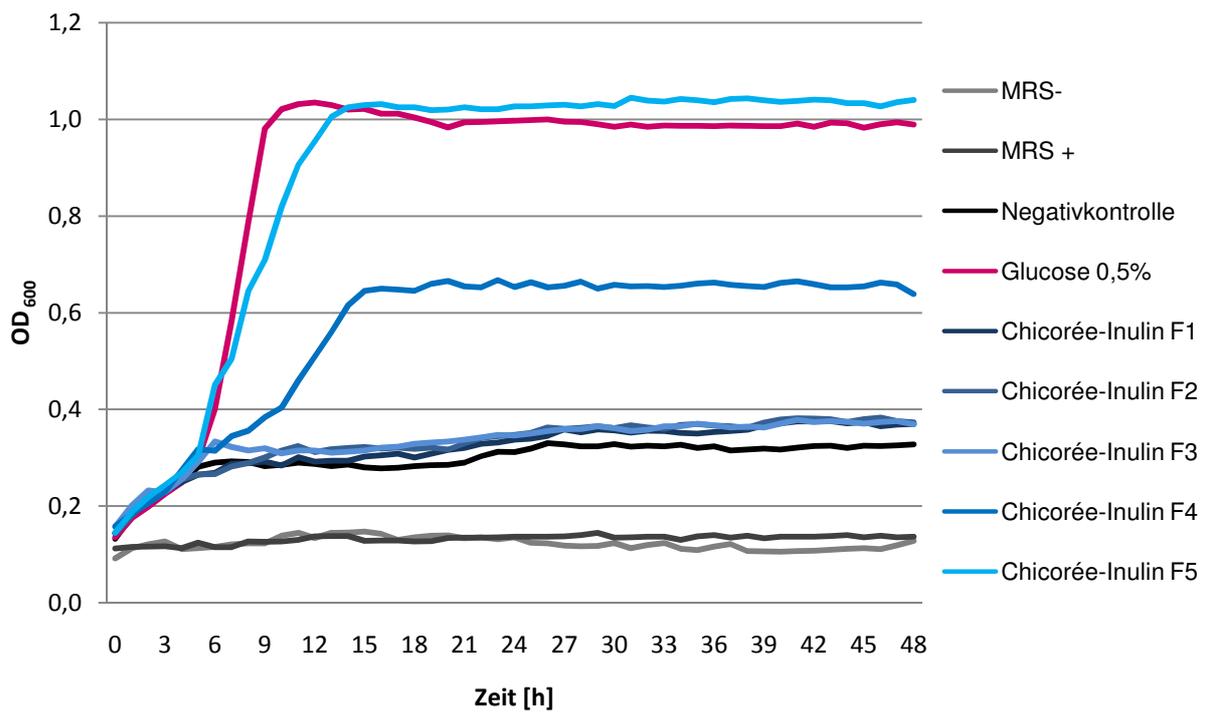


Abb. 28: Wachstumskurven von *L. paracasei* 3 unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose

*L. paracasei* 3 erzielt mit Glucose und Chicorée-Inulin F5 ein sehr gutes Wachstum. Fraktion 4 bewirkt ebenfalls einen signifikanten Anstieg, jedoch später und schwächer als Fraktion 5.

### 3.6.7 *Bifidobacterium animalis*

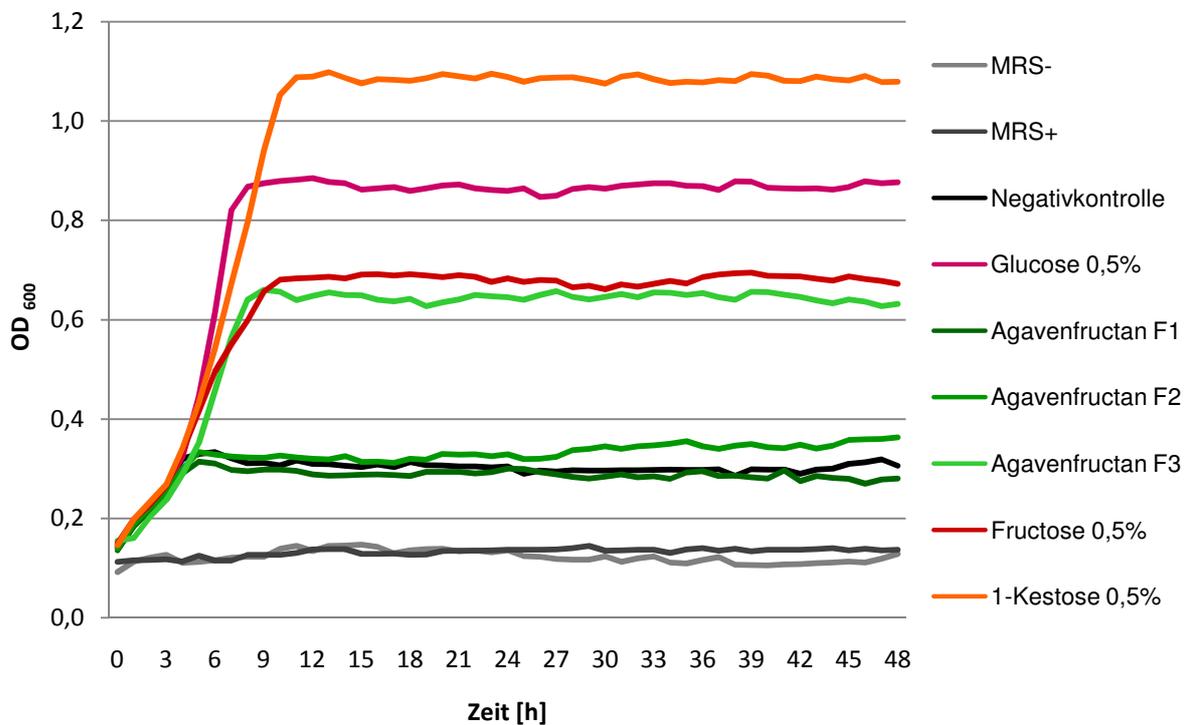


Abb. 29: Wachstumskurven von *B. animalis* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich, bewirkt die niedermolekulare Fraktion 3 einen signifikanten Wachstumsanstieg. Die Wachstumskurven des Bakterienstamms mit Agavenfructan F2 und F1 liegen auf Höhe der Negativkontrolle.

*B. animalis* verhält sich mit Glucose, Fructose und 1-Kestose ähnlich wie *L. paracasei* 3: Glucose bewirkt das schnellste Wachstum, gefolgt von 1-Kestose und Fructose.

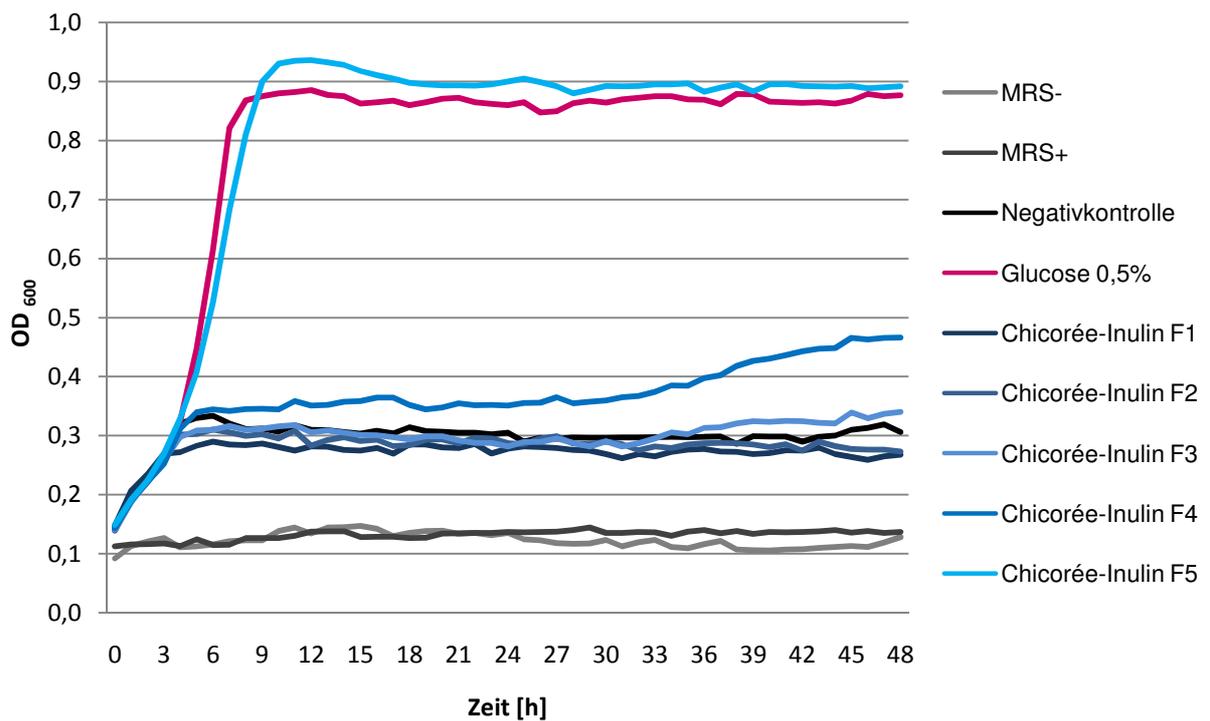


Abb. 30: Wachstumskurven von *B. animalis* unter dem Einfluss von 5 unterschiedlichen Chicorée-Inulin-Fractionen im Vergleich zu Glucose

*B. animalis* zeigt mit F5 des Chicorée-Inulins und Glucose einen sehr guten Wachstumsanstieg. F4 bewirkt einen relativ späten und schwachen Anstieg. Die Fraktionen 3-1 erzielen kein höheres Wachstum als die Negativkontrolle.

### 3.7 Bestimmung der ET<sub>50</sub> Werte [h]

	<i>L. reuteri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>L. paracasei</i>		
					1	2	3
Galactose	6	11	6	7	8	8	8
Lactose	-	11	5	6	8	-	8
Raffinose	5	21	5	16	-	-	14
Mannose	30	29	5	6	7	8	8
Maltose	5	14	6	6	17	13	12
Cellubiose	-	15	6	6	24	14	13
Fructose	7	10	5	6	7	8	8
Stachyose	6	13	5	18	9	-	23
Saccharose	4	10	6	6	10	12	19

Tabelle 4: ET<sub>50</sub> Werte ausgewählter Probiotika mit verschiedenen Sacchariden

	<i>L. reuteri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>L. paracasei</i>		
					1	2	3
Galactose	1,63	1,39	1,90	1,61	1,79	1,98	1,96
Lactose	-	1,56	0,68	1,70	1,80	-	1,99
Raffinose	1,59	1,65	0,64	1,47	-	-	1,96
Mannose	0,79	1,70	1,90	1,92	1,82	1,96	1,94
Maltose	1,72	1,60	0,83	1,90	-	1,95	1,87
Cellubiose	-	1,29	1,13	1,86	2,10	2,06	1,82
Fructose	1,49	1,41	1,83	1,63	1,81	1,88	1,89
Stachyose	1,48	1,46	0,68	1,12	-	-	1,84
Saccharose	1,66	1,51	0,80	1,82	1,92	1,98	1,99

Tabelle 5: OD<sub>max</sub>-Werte ausgewählter Probiotika mit verschiedenen Sacchariden

Für *L. paracasei* 3., *L. rhamnosus*, *B. animalis* und *L. acidophilus* wurde durch alle Vergleichszucker ein signifikanter Wachstumsanstieg bewirkt, was eine Bestimmung der ET<sub>50</sub> Werte ermöglichte. Bei *L. paracasei* 1 und *L. paracasei* 2 zeigte Raffinose keine wachstumsfördernde Wirkung. Lactose wurde ebenfalls von 2 Bakterienstämmen (*L. paracasei* 2 und *L. reuteri*) nicht verwertet.

Die höchsten  $OD_{max}$ -Werte ( $> 2,00$ ) dieser Versuchsreihe wurden durch Zugabe von Cellubiose zu *L. paracasei 1* und *L. paracasei 2* erreicht (siehe Tabelle 5). Jedoch lagen die  $ET_{50}$  Werte dieser Probiotika mit Cellubiose bei 24 bzw. 14 Stunden (siehe Tabelle 4). Ein Wachstumsanstieg wurde im Vergleich zu den anderen Zuckerstandards demzufolge relativ spät bewirkt.

	<i>L. reuteri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>L. paracasei</i>		
					1	2	3
Galactose	6	11	5	8	8	8	8
Lactose	-	11	-	6	7	-	8
Raffinose	5	20	-	19	-	-	15
Mannose	-	26	5	6	7	8	8
Maltose	4	13	-	6	25	13	12
Cellubiose	-	16	8	6	21	13	13
Fructose	6	10	5	6	7	8	8
Stachyose	6	13	-	-	-	-	22
Saccharose	4	9	-	6	9	-	19

Tabelle 6: Zeitpunkt des Erreichens der halbmaximalen  $OD_{600}$  von Glucose

	<i>L. reuteri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>L. paracasei</i>		
					1	2	3
Glucose 1%	7	5	12	6	10	6	8
Glucose 0,5%	7	5	11	5	8	5	7
Glucose 0,25%	6	4	10	4	7	4	6
Glucose 0,1%	6	4	9	3	8	3	6

Tabelle 7:  $ET_{50}$  Werte ausgewählter Probiotika mit Glucose-Lösungen unterschiedlicher Konzentration

	<i>L. reuteri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>L. paracasei</i>		
					1	2	3
Glucose 1%	1,87	1,65	1,49	1,81	1,96	1,86	1,88
Glucose 0,5%	1,58	1,33	1,39	1,42	1,46	1,42	1,46
Glucose 0,25%	1,32	1,00	1,11	1,07	1,08	0,92	1,20
Glucose 0,1%	0,99	0,68	0,64	0,74	0,82	0,64	0,89

Tabelle 8:  $OD_{max}$ -Werte ausgewählter Probiotika mit Glucose-Lösungen unterschiedlicher Konzentration

Die verschiedenen Konzentrationen der Glucose-Lösungen bewirkten keine signifikanten Unterschiede im Zeitpunkt des Wachstumsanstiegs der Bakterienstämme (siehe Tabelle 7). Im Gegensatz dazu waren die OD<sub>max</sub>-Werte stark abhängig von der eingesetzten Menge an Glucose. Die Probiotika erzielten unter Zugabe einer höherprozentigen Lösung ein stärkeres Wachstum. Für alle getesteten Bakterienstämme ergab sich eine Abstufung der OD<sub>max</sub>-Werte entsprechend der Konzentration der Saccharid-Lösungen: Glucose 1% > Glucose 0,5% > Glucose 0,25% > Glucose 0,1 % (siehe Tabelle 8).

	<i>L. reuteri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>L. paracasei</i>		
					1	2	3
Agavenfructan F1	-	14	30	-	14	-	-
Agavenfructan F2	9	9	23	-	9	-	-
Agavenfructan F3	8	8	6	9	8	8	5
Chicorée- Inulin F1	-	24	33	-	20	-	-
Chicorée- Inulin F2	-	14	27	-	13	-	-
Chicorée- Inulin F3	-	11	22	-	10	-	-
Chicorée- Inulin F4	-	11	22	-	10	-	-
Chicorée- Inulin F5	7	11	20	8	10	22	6

Tabelle 9: ET<sub>50</sub> Werte ausgewählter Probiotika mit Fraktionen von Agavenfructan und Chicorée-Inulin

	<i>L. reuteri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>L. paracasei</i>		
					1	2	3
Agavenfructan F1	-	1,02	1,08	-	1,06	-	-
Agavenfructan F2	0,86	0,93	1,10	-	0,96	-	-
Agavenfructan F3	0,91	0,95	1,36	0,99	0,98	1,24	0,65
Chicorée- Inulin F1	-	1,10	0,76	-	1,067	-	-
Chicorée- Inulin F2	-	1,36	0,94	-	1,36	-	-
Chicorée- Inulin F3	-	1,05	1,02	-	1,06	-	-
Chicorée- Inulin F4	-	0,91	1,20	-	1,11	-	-
Chicorée- Inulin F5	1,02	0,98	1,18	1,04	0,99	1,07	0,90

Tabelle 10: OD<sub>max</sub>-Werte ausgewählter Probiotika mit Fraktionen von Agavenfructan und Chicorée-Inulin

	<i>L. reuteri</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>L. paracasei</i>		
					1	2	3
Agavenfructan F1	-	14	31	-	14	-	-
Agavenfructan F2	8	11	24	-	10	-	-
Agavenfructan F3	7	9	6	9	9	8	5
Chicorée- Inulin F1	-	23	-	-	20	-	-
Chicorée- Inulin F2	-	12	30	-	12	-	-
Chicorée- Inulin F3	-	12	23	-	10	-	-
Chicorée- Inulin F4	-	13	23	13	9	-	42
Chicorée- Inulin F5	4	13	21	7	11	22	5

Tabelle 11: Zeitpunkt des Erreichens der halbmaximalen OD<sub>600</sub> von Glucose

Die Zeit, nach der die halbmaximale OD<sub>600</sub> erreicht wurde, war bei allen Bakterienstämmen mit Glucose am geringsten und lag zwischen 3 und 9 Stunden, dicht gefolgt von Fructose mit 5-11 Stunden. Für 3 Bakterienstämme (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG und *L. paracasei* 1) konnte der ET<sub>50</sub> Wert für alle Fraktionen bestimmt werden (siehe Tabelle 9).

Die übrigen Probiotika zeigten lediglich mit den niedermolekularsten Fraktionen ein signifikantes Wachstum. Fraktionen mit hohem dp bewirkten keinen oder einen sehr geringen Anstieg. Je niedriger der Polymerisationsgrad einer Fraktion war, desto kleiner war der entsprechende ET<sub>50</sub> Wert und desto schneller wurde die halbmaximale Glucose-OD erreicht (siehe Tabelle 10).

### 3.8 Bestimmung des Polymerisationsgrades

Für alle im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendeten Fructooligo- und Fructopolysaccharide wurde der durchschnittliche Polymerisationsgrad (dp) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse der ionenchromatographischen Messungen über das CPCwin-Programm ausgewertet.

Per Definition unterscheidet man hierbei zwischen dpn und dpw. Unter dpw versteht man den gewichteten Durchschnittswert (weight average) und unter dpn das Zahlenmittel (number average).<sup>23</sup>

	dpw	dpn
Agaven-FOS	9	6
Agavenfructan	22	10
Agavenfructan F1	14	11
Agavenfructan F2	6	5
Agavenfructan F3	2	2
Chicorée-FOS	7	5
Chicorée-Inulin	16	7
Chicorée-Inulin F1	34	19
Chicorée-Inulin F2	20	12
Chicorée-Inulin F3	12	8
Chicorée-Inulin F4	8	5
Chicorée-Inulin F5	3	2

Tabelle 12: dpw und dpn Werte ausgewählter Proben

Der dp der Agavenfructan-Fractionen nahm erkennbar von Fraktion zu Fraktion ab (F1 > F2 > F3). Ebenso wurde bei den Inulin-Fractionen eine Abnahme des durchschnittlichen Polymerisationsgrads (F1 > F2 > F3 > F4 > F5) aufgezeigt.

Die Berechnungen bestätigten und bezifferten somit die, durch die Dionex-Spektren graphisch sichtbar gemachten Veränderungen der Peak-Profile.

### 3.9 Korrelation der ET<sub>50</sub> Werte mit dem dpn

Für die Bakterienstämme *L. acidophilus*, *L. rhamnosus GG* und *L. paracasei 1* konnten ausreichend ET<sub>50</sub> Werte ermittelt werden, um sie mit den dpn Werten korrelieren zu können. Voraussetzung für eine Korrelation war neben den ET<sub>50</sub> Werten auch das Erreichen der halbmaximalen Glucose-OD.

Das Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup> wurde für alle Datenpunkte des Agavenfructans und Chicorée-Inulins bestimmt und lag bei allen Trendlinien über 0,83.

Aus diesen Korrelationen lässt sich ein dpn-abhängiger Einfluss auf das bakterielle Wachstum nachweisen.

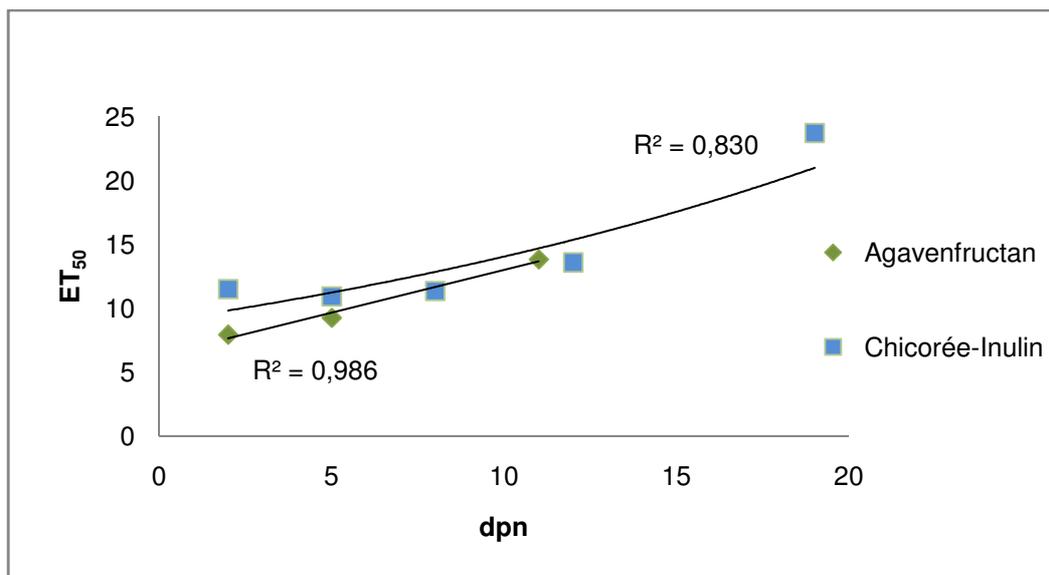


Abb. 31: Korrelation  $dpn:ET_{50}$  von *L. acidophilus*

*L. acidophilus* wächst mit Agavenfructan schneller, als mit Chicorée-Inulin. Die Trendlinie für Agavenfructan ist linear und ergibt ein Bestimmtheitsmaß von 0,986. Dieser ausgezeichnete  $R^2$ -Wert wäre jedoch aussagekräftiger, wenn für das entsprechende Fructan mehr als drei Datenpunkte vorliegen würden. Anhand der angefertigten DCs (siehe Kapitel 2.4 und Kapitel 2.6) konnten allerdings nicht mehr als 4 Bereiche festgelegt werden. Eventuell wäre durch die Verwendung eines alternativen Laufmittels bei den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen eine bessere Auftrennung der Banden und somit eine genauere Aufteilung der Fraktionen möglich gewesen.

Für Inulin wurde eine exponentielle Trendlinie gewählt. Die  $ET_{50}$  Werte unterscheiden sich zwischen  $dpn$  0 und 12 kaum von einander.

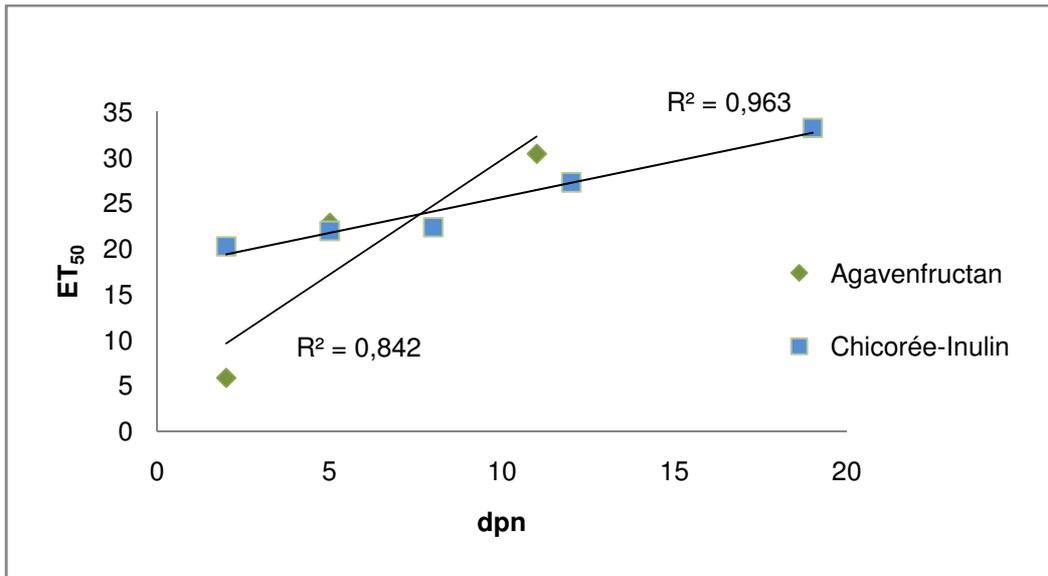


Abb. 32: Korrelation dpm:ET<sub>50</sub> für *L. rhamnosus* GG

Bei *L. rhamnosus* zeigt sich ebenfalls ein schnelleres Wachstum für das Agavenfructan, allerdings nur im niedermolekularen Bereich, da die lineare Trendlinie steiler verläuft. In diesem Fall ergibt sich jedoch für das Inulin aus Chicorée ein besserer R<sup>2</sup>-Wert. Die ET<sub>50</sub> Werte liegen im Vergleich zu den beiden anderen Bakterienstämmen deutlich höher (> 20h).

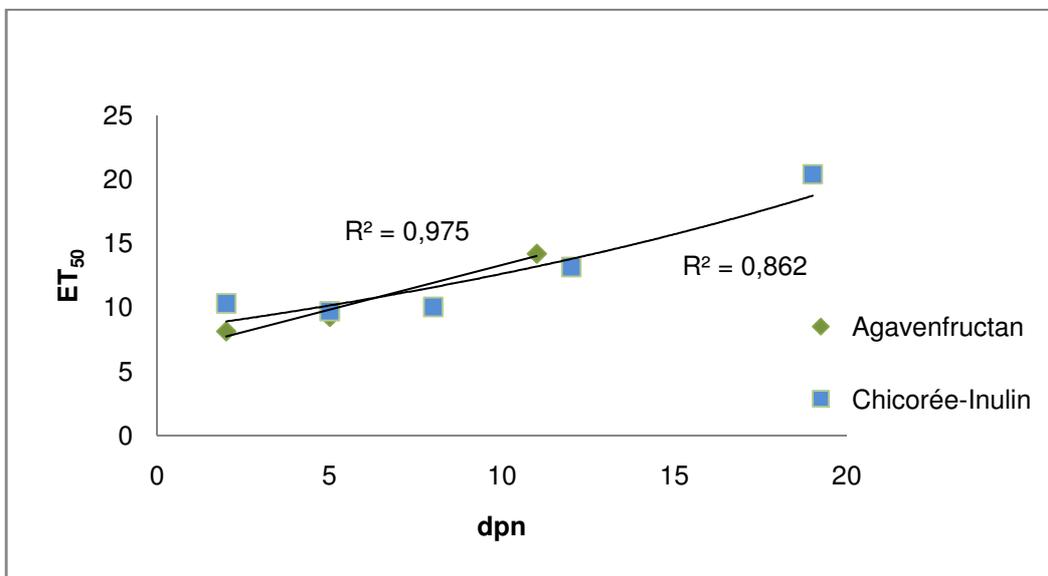


Abb. 33: Korrelation dpm:ET<sub>50</sub> für *L. paracasei* 1

*L. paracasei* 1 zeigt mit dem Fructan aus Agave eine lineare Trendlinie mit sehr gutem Bestimmtheitsmaß. Die ET<sub>50</sub> Werte des Chicorée-Inulins liegen bis dpm 8 in etwa auf derselben Höhe und steigen dann an. Daher wurde für Chicorée-Inulin eine

exponentielle Trendlinie gewählt. Dieser Bakterienstamm wächst mit Agavenfructan und Inulin relativ gleich schnell.

*B. animalis* zeigt nur mit den niedermolekularsten Fraktionen ein signifikantes Wachstum, *L. paracasei 2* und *L. paracasei 3* kann die Fructane mit höherem dpn kaum verwerten. *L. reuteri* wächst mit dem Agavenfructan deutlich besser, als mit Inulin aus Chicorée.

Dennoch konnten für diese Bakterienstämme aufgrund zu geringer Wachstumsanstiege nicht ausreichend  $ET_{50}$  Werte für eine Korrelation ermittelt werden.

## 4 DISKUSSION

Fructane verfügen über eine signifikante präbiotische Wirkung, die sich bei allen sieben getesteten Bakterienstämmen zeigte. Das Wachstum der Bakterien und die steigende Zellzahl führten zu einer Zunahme der Trübung. Basierend auf turbidimetrischen Messungen konnte das bakterielle Wachstum quantifiziert und anschließend graphisch dargestellt werden. Anhand dieser Wachstumskurven war es möglich, den Einfluss der Saccharide zu veranschaulichen und zu interpretieren.

Die Zuckerstandards Glucose, Galactose, Fructose und 1-Kestose zeigten bei allen getesteten Bakterienstämmen einen signifikanten Effekt. Lactose, Stachyose und Saccharose bewirkten bei manchen Stämmen eine  $OD_{max}$  auf Höhe der Positivkontrolle (Lactose Bsp. *L. paracasei* 1; Stachyose Bsp. *L. acidophilus*; Saccharose Bsp. *L. paracasei* 1), bei anderen zeigten sie jedoch keinen Unterschied zur Negativkontrolle (Lactose Bsp. *L. reuteri*; Stachyose Bsp. *L. paracasei* 1; Saccharose Bsp. *L. rhamnosus*). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese Zucker nicht von allen Bakterienstämmen verwertet werden können.

Der Einfluss des Polymerisationsgrades auf die wachstumsfördernde Wirkung war stark vom verwendeten Bakterienstamm abhängig. Die probiotischen Stämme wuchsen sowohl mit den Fraktionen des linearen Chicorée-Inulins als auch mit den verzweigten Agavenfructan-Fraktionen. *B. animalis* und *L. paracasei* 2 konnten lediglich die niedermolekularen Fructane verwerten, wohingegen andere Bakterienstämme (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG und *L. paracasei* 1) mit allen Fraktionen einen signifikanten Wachstumsanstieg erzielten.

Die Resultate dieser Diplomarbeit bestätigen die Ergebnisse einer früheren Studie, bei der ebenfalls ein dp-abhängiger Einfluss auf das bakterielle Wachstum untersucht und nachgewiesen wurde.<sup>18</sup> Manche der getesteten Probiotika wuchsen unabhängig vom Polymerisationsgrad, andere ausschließlich mit niedermolekularen Fraktionen und wiederum andere zwar mit allen Fructanen, jedoch deutlich besser mit solchen von niedrigem dp.<sup>18</sup> Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser früheren Studie gab es unter den in dieser Arbeit getesteten Bakterienstämmen keinen, der Fructane allgemein nicht verwerten konnte.

Die Fraktion 5 des Chicorée-Inulins bewirkte bei *L. paracasei 3* und *L. reuteri* einen langsameren Wachstumsanstieg als die Positivkontrolle (Glucose), jedoch einen schnelleren Anstieg als die Vergleichssubstanz Fructose. Daraus lässt sich möglicherweise schließen, dass diese Fraktion Glucose enthält und die beiden genannten Bakterienstämme diese deutlich besser verwerten können als Fructose.

Die  $ET_{50}$  Werte wurden für die Probiotika unter Zugabe der Vergleichszucker, der unterschiedlich konzentrierten Glucoselösungen und der aufgetrennten Fructane bestimmt. Bei den Zuckerstandards konnten alle  $ET_{50}$  Werte für *L. paracasei 3*, *L. rhamnosus*, *B. animalis* und *L. acidophilus* bestimmt werden. Bei *L. paracasei 1*, *L. paracasei 2* und *L. reuteri* fehlten aufgrund des zu geringen Wachstumsanstiegs jeweils 1 bis 3 Werte (siehe Tabelle 4). Glucose bewirkte trotz unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb eines Bakterienstamms kaum Abweichungen im Zeitpunkt des Anstiegs der entsprechenden Wachstumskurve.

Die  $ET_{50}$  Werte, die durch Agavenfructan und Chicorée-Inulin erreicht wurden, konnten lediglich für 3 Bakterienstämme vollständig bestimmt werden (siehe Tabelle 9).

Eine Kombination von Fructanen mit niedrigem und hohem dp könnte einen schnell und langwirksamen präbiotischen Effekt ermöglichen. Untersuchungen dahingehend wären denkbar, indem man Fructanen von sehr hohem dp unter Zugabe einer minimalen Menge von Fructanen mit niedrigem dp oder einer Monosacharidlösung als „Starthilfe“ an ausgewählten probiotischen Stämmen testet.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Alle im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit verwendeten Fructane zeigten eine signifikante präbiotische Wirksamkeit auf die getesteten Bakterienstämme. Je nach verwendetem Probiotikum, der Fructan-Art und dem Polymerisationsgrad zeigten sich anhand der Wachstumskurven individuelle Unterschiede.

Die Saccharid-Standards bewirkten zum Großteil ein sehr gutes Wachstum. Die Wachstumskurven, die aus der Zugabe unterschiedlich konzentrierter Glucoselösungen entstanden sind, zeigten das zu erwartende Ergebnis einer  $OD_{max}$ -Abnahme bei sinkendem Glucosegehalt.

Durch die Auftrennung der Saccharide und die Korrelation des  $d_{pn}$  mit dem  $ET_{50}$  Wert konnte gezeigt werden, dass probiotische Stämme besser auf niedermolekulare Fraktionen ansprechen als auf jene mit hohem  $d_{pn}$ . Manche Bakterienstämme konnten mit höhermolekularen Fraktionen keinen Wachstumsanstieg erzielen oder wuchsen deutlich verzögert und schwächer an.

In der Regel bewirkte Agavenfructan, verglichen mit Inulin, ein schnelleres Wachstum. So ergab sich nicht nur eine Abhängigkeit der präbiotischen Wirkung vom Polymerisationsgrad, sondern auch von der Struktur. Aus den Verzweigungen des Agavenfructans resultieren eine kompaktere Konformation und eine bessere Löslichkeit, die für die Verwertung durch Bakterien vorteilhaft sein könnten.

Um hierfür eine allgemein gültige Aussage treffen zu können, sollten in diese Richtung noch weitere Fructane unterschiedlicher Struktur aufgetrennt und untersucht werden. Für eine Korrelation wäre eine größere Anzahl an Fraktionen von Vorteil, wodurch mehr Datenpunkte gewonnen werden könnten.

## 6 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Tabelle 1: Verwendete Fructooligo- & Fructopolysaccharide (FOS & FPS)
- Tabelle 2: Gradienten-Einstellung für die Dionex-Messungen
- Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme
- Tabelle 4: ET<sub>50</sub> Werte ausgewählter Probiotika mit verschiedenen Saccharide
- Tabelle 5: OD<sub>max</sub>-Werte ausgewählter Probiotika mit verschiedenen Saccharide
- Tabelle 6: Zeitpunkt des Erreichens der halbmaximalen OD<sub>600</sub> von Glucose
- Tabelle 7: ET<sub>50</sub> Werte ausgewählter Probiotika mit Glucose-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen
- Tabelle 8: OD<sub>max</sub>-Werte ausgewählter Probiotika mit Glucose-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen
- Tabelle 9: ET<sub>50</sub> Werte ausgewählter Probiotika mit den Fraktionen von Agavenfructan und Chicorée-Inulin
- Tabelle 10: OD<sub>max</sub>-Werte ausgewählter Probiotika mit den Fraktionen von Agavenfructan und Chicorée-Inulin
- Tabelle 11: Zeitpunkt des Erreichens der halbmaximalen OD<sub>600</sub> von Glucose
- Tabelle 12: dpw und dpn Werte ausgewählter Proben
- Abb. 1: Gefittete Wachstumskurve von *L. acidophilus* mit Lactose (x-Achse: Zeit in Stunden, y-Achse: OD<sub>600</sub>)
- Abb. 2: Ionenchromatographische Messung ausgewählter Saccharid-Proben (x-Achse: Zeit in Minuten, y-Achse: nC)
- Abb. 3: Wachstumskurven von *L. reuteri* unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose
- Abb. 4: Wachstumskurven von *L. acidophilus* unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose
- Abb. 5: Wachstumskurven von *L. rhamnosus* GG unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose
- Abb. 6: Wachstumskurven von *L. paracasei* 1 unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose

- Abb. 7: Wachstumskurven von *L. paracasei 2* unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose
- Abb. 8: Wachstumskurven von *L. paracasei 3* unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose
- Abb. 9: Wachstumskurven von *B. animalis* unter dem Einfluss ausgewählter Saccharide im Vergleich zu Glucose
- Abb. 10: Wachstumskurven von *L. reuteri* unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 11: Wachstumskurven von *L. acidophilus* unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 12: Wachstumskurven von *L. rhamnosus GG* unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 13: Wachstumskurven von *L. paracasei 1* unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 14: Wachstumskurven von *L. paracasei 2* unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 15: Wachstumskurven von *L. paracasei 3* unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 16: Wachstumskurven von *B. animalis* unter dem Einfluss von Glucose in 4 verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 17: Wachstumskurven von *L. reuteri* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose
- Abb. 18: Wachstumskurven von *L. reuteri* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose
- Abb. 19: Wachstumskurven von *L. acidophilus* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose
- Abb. 20: Wachstumskurven von *L. acidophilus* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose

- Abb.21: Wachstumskurven von *L. rhamnosus GG* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose
- Abb. 22: Wachstumskurven von *L. rhamnosus GG* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose
- Abb. 23: Wachstumskurven von *L. paracasei 1* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose
- Abb. 24: Wachstumskurven von *L. paracasei 1* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose
- Abb. 25: Wachstumskurven von *L. paracasei 2* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose
- Abb. 26: Wachstumskurven von *L. paracasei 2* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose
- Abb. 27: Wachstumskurven von *L. paracasei 3* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose
- Abb. 28: Wachstumskurven von *L. paracasei 3* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose
- Abb. 29: Wachstumskurven von *B. animalis* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Agavenfructan im Vergleich zu Glucose, Fructose und 1-Kestose
- Abb. 30: Wachstumskurven von *B. animalis* unter dem Einfluss aufgetrennter Fraktionen von Chicorée-Inulin im Vergleich zu Glucose
- Abb. 31: Korrelation  $\text{dpn:ET}_{50}$  von *L. acidophilus*
- Abb. 32: Korrelation  $\text{dpn:ET}_{50}$  für *L. rhamnosus GG*
- Abb. 33: Korrelation  $\text{dpn:ET}_{50}$  für *L. paracasei 1*

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

---

- 1 Ammon H.P.T. (2010) *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch* 10. Auflage, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/New York
- 2 Teuscher E., Melzing M.F., Lindequist U. (2012) *Biogene Arzneimittel, Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; S. 717-718
- 3 Teuscher E., Melzing M.F., Lindequist U. (2012) *Biogene Arzneimittel, Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; S. 36
- 4 Peshev D., Van den Ende W. (2014), Fructans: Prebioics and immunomodulators. *Journal of functional foods*, 8:348
- 5 Roberfroid M., Gibson, G. (1995) *Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics*. *Journal of Nutrition*, 125:1401-12.
- 6 Kaur N., Gupta A.K. (2002) *Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition*. *Journal of Biosciences*, 27(7):703-14
- 7 Norhayati H., Rasma S.I., Mohd K.A. (2013) *Effect of storage conditions on quality of prebiotic dark chocolate*. *Malaysian Journal of Nutrition*,19(1):111-9
- 8 Corzo N., Azpiroz F., Calvo M.A., Leis R. Lombó f., Mateos-Aparicio I., Plou F.J. (2015) *Prebiotics: concept, properties and beneficial effects*. *Nutrición Hospitalaria*, 31 Suppl 1:99-118
- 9 Roberfroid M. and Delzenne N. (1998), *Dietary modulation of human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*. *Annual Review of Nutrition*,18:117-143
- 10 Van de Wiele T., Bonn N., Possemiers S., Jacobs H.,Verstraete W. (2007) *Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects*. *Journal of Applied Microbiology*, 102:452-60

- 
- 11 Allsopp P., Possemiers S, Campbell D., Oyarzabal I. S., Gill C., Rowland I. (2013) *An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from Agave angustifolia and associated anticancer activity*. *Anaerobe*, 22:38-4
- 12 Vogt L., Meyer D., Pullens G., Faas M., Smelt M., Venema K., Ramasamy U., Schols, H.A., De Vos P. (2015) *Immunological properties of inulin-type fructans*. *Food Science and Nutrition*, 55:414-436
- 13 Moreno-Vilet L., Garcia-Hernandez M.H., Delgado-Portales R.E., Corral-Fernandez N.E., Cortez-Espinosa N., Ruiz-Cabrera M.A., Portales-Perez D.P. (2014) *In vitro assessment of agave fructans (Agave salmiana) as prebiotics and immune system*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63:181-7
- 14 Ito H., Takemura N., Sonoyama K., Kawagishi H., Topping D. L., Conlon M. A., Morita T. (2011) *Degree of polymerization of inulin-type fructans differentially affects number of lactic acid bacteria, intestinal immune functions, and immunoglobulin A secretion in rat cecum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:5771-8
- 15 Teuscher E., Melzing M.F., Lindequist U. (2012) *Biogene Arzneimittel, Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie*, 115
- 16 Reis S.A., Conceicao L.L., Rosa D.D., Dias M.M. (2014) *Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile*. *Nutrición Hospitalaria*, 31(2):528-34
- 17 Nishimura M., Ogiwara T., Kanayama T., Kitagawa K, Nishimura H., Nishihira J. (2015) *Effects of the extract from roasted chicory (Cichorium intybus L.) root containing inulin-type fructans on blood glucose, lipid metabolism and fecal properties*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 20;5(3):161-7

- 
- 18 Velázquez-Martínez J.R., González-Cervantes R.M., Hernández-Gallegos M.A., Mendiola R.C., Aparicio, A., Ocampo M.L. (2014) *Prebiotic potencial of agave angustifolia haw fructans with different degrees of polymerisation*. *Molecules*, 19:12660-75
  - 19 Gomez E., Tuohy K.M., Gibson G.R., Klinder A., Costabile A. (2009) *In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans*. *Journal of Applied Microbiology*, 108;2114-21
  - 20 Garcia-Vieyra M.I., Del Real A., Lopez M.G. (2014) *Agave fructans: their effect on mineral absorption and bone mineral content*. *Journal of Medicinal Food*, 17(11):1247-55
  - 21 Fleisch A.G., Poziomyck A.K., Damin D.C. (2014) *The therapeutic use of symbiotics*. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 27(3):206-9
  - 22 <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT-174B.pdf>
  - 23 [http://www.nature.com/gt/journal/v11/n19/fig\\_tab/3302312t4.html](http://www.nature.com/gt/journal/v11/n19/fig_tab/3302312t4.html)

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Jacqueline Reiner  
geboren am: 21.05.1991  
Geburtsort: Villach  
Staatsbürgerschaft: Österreich  
Eltern: Brigitte Reiner und Walter Reiner  
Geschwister: Vanessa Reiner

### SCHULISCHE AUSBILDUNG

1997 - 2001 Volksschule Khevenhüllerschule/Villach  
2001 - 2009 BG/BRG St. Martin/Villach  
2009 - 2016 Diplomstudium Pharmazie/Universität Wien  
Diplomarbeit: November 2014 – Juni 2015

### TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

September 2010 Ferialpraktikum „Obere Apotheke“, Villach  
August 2011, 2012, 2013, 2014 Ferialpraktikum „Perau Apotheke“, Villach  
März 2013 - Juni 2014 Tutorium an der Universität Wien  
(Department für Pharmakognosie)  
August & September 2015 Ferialpraktikum Novartis Pharma GmbH