



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Glykolytische Aktivität ausgewählter probiotisch
wirksamer Bakterienstämme“

verfasst von / submitted by

Tanja Szabo

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

O. Univ. Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

MMag. DI Dr. Monika Müller

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein bedanken, der mir die Möglichkeit geboten hat, meine Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie durchzuführen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mitbetreuerin, MMag. DI Dr. Monika Müller, die mich mit ihrer fachlichen Kompetenz über den gesamten Zeitraum der Durchführung meiner Arbeit unterstützt hat.

Die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft des gesamten Teams haben mir den Einstieg erleichtert und meine Zeit während der Diplomarbeit sehr angenehm gestaltet.

Josepha möchte ich für die Zeit danken, die sie mir auf der Suche nach falsch gesetzten Beistrichen geopfert hat.

Danke an Denise und Irene für ihre langjährige, innige Freundschaft und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Johannes möchte ich für seine Geduld, mit der er sich all meinen Sorgen gewidmet hat, und für seinen Rückhalt danken.

Meiner Mutter Martina, die ich schmerzlich vermisse, gilt mein größter Dank. Sie hat mir nicht nur alles Nötige mitgegeben, um meinen Weg zu gehen, sondern mir auch durch ihre Stärke, ihren Fleiß und ihre Fürsorge dieses Studium ermöglicht.

Abstract (Deutsch)

Das therapeutische Potenzial von Polyphenolen wie z.B. Quercetin umfasst unter anderem eine antiinflammatorische und eine neuroprotektive Wirkung. Quercetin kommt in der Natur häufig in glykosidischer Form z.B. als Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin) vor. Dieses wird nur mangelhaft absorbiert, da eine Spaltung zu den aktiveren Formen Isoquercitrin bzw. Quercetin erst durch Enzyme der Dickdarmflora erfolgen kann. Um die Bioverfügbarkeit des Rutins zu erhöhen, ist dessen glykolytischer Abbau von therapeutischem Interesse.

Es wurde die glykolytische Aktivität ausgewählter probiotisch wirksamer Bakterienstämme sowie deren Fähigkeit, Rutin abzubauen, untersucht. Der Nachweis der Enzymaktivität der Probiotika erfolgte durch den Abbau der Standardsubstanzen 4-Nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosid (4-NPRP) und 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (4-NPGP). Die Deglykosylierung dieser Substanzen und von Rutin wurde mittels Hochleistungsflüssigchromatographie analysiert. Zwei Rhamnosidasen (rekombinant und aus *Aspergillus niger*) wurden für die Abspaltung der Rhamnose von 4-NPRP und von Rutin herangezogen. Beide Enzyme konnten die Substrate umsetzen.

Es wurden Lysate aus den Bakterien gewonnen und deren Enzymaktivität untersucht. Eine Rhamnosidase- bzw. Glucosidaseaktivität konnte durch die Spaltung von 4-NPRP und von 4-NPGP nachgewiesen werden. Bei acht der 14 untersuchten Lysate waren die von den Bakterien exprimierten Enzyme in der Lage, Rutin teilweise zu Isoquercitrin bzw. Quercetin abzubauen. Ausgewählte Stämme wurden mit Rutin versetzt und kultiviert. Eine geringfügige Umwandlung des Rutins durch die Probiotika in die biologisch aktiveren Formen konnte beobachtet werden. Durch die nachgewiesene glykolytische Aktivität der Probiotika ist deren gezielter Einsatz zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Polyphenolen denkbar.

Abstract (Englisch)

The therapeutic potential of polyphenols like quercetin includes an anti-inflammatory and a neuroprotective effect. In nature quercetin occurs in glycosidic form, for example as quercetin-3-O-rutinoside (rutin). Rutin can only be absorbed insufficiently because its degradation to the more active forms isoquercitrin and quercetin occurs only by enzymes of the microbiome in the colon. To increase the bioavailability of rutin, its glycosidic degradation would be of therapeutic interest.

The glycolytic activity of selected probiotic strains as well as their ability to break down rutin was tested. To proof the probiotics' enzymatic activity, both the degradation of 4-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside (4-NPRP) as well as the degradation of 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (4-NPGP) was tested. The deglycosylation of these substances and of rutin was analyzed by high performance liquid chromatography. Two rhamnosidases (recombinant and from *Aspergillus niger*) were tested regarding the cleavage of rhamnose both from 4-NPRP and from rutin. Both enzymes were able to degrade the substrates.

Lysates of the probiotics were obtained and tested regarding their enzyme activity. Both a rhamnosidase and a glucosidase activity could be proved through the degradation of 4-NPRP and 4-NPGP. The enzymes in eight out of 14 lysates were able to degrade rutin partially to isoquercitrin and quercetin. Selected probiotic strains were cultivated in the presence of rutin. A slight degradation of rutin through the probiotics to more active forms could be observed.

Because of the proven glycolytic activity of the probiotics tested, their use to increase the bioavailability of polyphenols could be considered.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Normalflora des Menschen.....	1
1.2 Probiotika.....	2
1.3 Polyphenole	3
1.3.1 Polyphenole in der Natur	3
1.3.2 Bioaktivität der Polyphenole	4
1.3.3 Flavonoide	4
1.3.4 Bioverfügbarkeit von Polyphenolen	7
1.4 Enzyme.....	8
1.4.1 α -L-Rhamnosidase	11
1.4.2 Cellulase.....	12
1.5 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Geräte und Reagenzien.....	16
2.2 Versuche mit isolierten Enzymen.....	21
2.2.1 Vorbereitung der Enzyme	21
2.2.2 Enzymreaktionen	21
2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	23
2.3.1 Vermessung der Reinsubstanzen.....	25
2.4 Arbeiten mit Bakterien.....	26
2.4.1 Herstellung des MRS-Mediums (de Man-Rogosa-Sharpe-Medium). ..	27
2.4.2 Herstellung von Glycerolstocks.....	28
2.4.3 Übersicht über die verwendeten Probiotika	28
2.4.4 Kultivieren der Bakterien.....	29
2.4.5 Bestimmung der OD ₆₀₀	30
2.5 Umsetzung des Polyphenolglykosids Rutin durch Enzyme im Lysat von Bakterien.....	30
2.6 Umsetzung des Polyphenolglykosids Rutin in einer Bakteriensuspension	32
3. Ergebnisse und Diskussion.....	33
3.1 Umsetzung des Polyphenolglykosids Rutin mit isolierten Enzymen	33
3.1.1 Cellulase	33
3.1.2 α -L-Rhamnosidase	34

3.2	Umsetzung des Polyphenolglykosids Rutin durch Enzyme aus dem Lysat der Probiotika.....	37
3.2.1	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactobacillus acidophilus</i>	41
3.2.2	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CRL431	42
3.2.3	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> DN114001	43
3.2.4	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> DSM20312	44
3.2.5	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	45
3.2.6	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactobacillus plantarum</i>	46
3.2.7	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactobacillus reuteri</i>	47
3.2.8	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bf3	48
3.2.9	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactobacillus fermentum</i>	49
3.2.10	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophiles</i>	50
3.2.11	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	51
3.2.12	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i>	53
3.2.13	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactococcus lactis</i> Sr 3.54 ..	54
3.2.14	Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lactobacillus brevis</i>	55
3.2.15	Vergleich der enzymatischen Aktivität der Lysate	56
3.3	Umsetzung des Polyphenolglykosids Rutin in einer Bakteriensuspension	58
3.3.1	Abbau von Rutin durch <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CRL431	59
3.3.2	Abbau von Rutin durch <i>Lactobacillus reuteri</i>	60
3.3.3	Abbau von Rutin durch <i>Lactobacillus plantarum</i>	61
3.3.4	Vergleich des Abbaus von Rutin in Bakteriensuspension.....	61
4.	Zusammenfassung.....	63
5.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	65
5.1	Tabellenverzeichnis	65
5.2	Abbildungsverzeichnis	65
6.	Abkürzungsverzeichnis	68
7.	Literaturverzeichnis	69

1. Einleitung

1.1 Die Normalflora des Menschen

Unter dem Begriff Normalflora versteht man die physiologische Mikroflora, die den gesunden menschlichen Organismus besiedelt.^[1] Die mikrobielle Flora des Darms ist sehr komplex und variiert in der genauen Zusammensetzung von Individuum zu Individuum. Neben Bakterien gehören auch Archaeen, Pilze und Viren zu einer normalen Besiedelung.^[2]

Schätzungen zufolge besiedeln über 1000 verschiedene Bakterienarten den menschlichen Darmtrakt^[3], wobei die Gattungen *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Streptococcus* und diverse Milchsäurebakterien wie zum Beispiel die Gattung *Lactobacillus* die Mehrheit bilden. Die Zusammensetzung und die Dichte der Mikroflora variiert je nach Darmabschnitt.^[4] Pro Gramm Darminhalt nimmt die Zahl der Bakterienzellen zu: von 10^2 - 10^3 im Dünndarm bis zu 10^{10} - 10^{12} im Dickdarm.^[2]

Kohlenhydrate, die aufgrund fehlender Enzyme des Menschen nicht im Dünndarm metabolisiert werden können, stellen die wichtigste Energiequelle der Darmflora dar. Dabei handelt es sich vorwiegend um Bestandteile von Pflanzenzellwänden sowie um Oligo- und Polysaccharide wie Inulin oder Schleimstoffe. Der anaerobe Abbau dieser Kohlenhydrate liefert eine große Anzahl an Metaboliten, wobei kurzkettige Fettsäuren den Hauptanteil ausmachen. Zu diesen Abbauprozessen trägt eine Fülle von Enzymen - wie zum Beispiel Glykosidasen, Lyasen und Esterasen - bei.^[5] Die kurzkettigen Fettsäuren wie Essigsäure, Buttersäure und Propionsäure, die durch die Fermentation entstehen, können unter anderem vom Darmepithel, der Leber und den Muskeln metabolisiert und als Energiequelle genutzt werden.^[6]

Eine funktionierende Darmflora ist von großer Bedeutung für die Gesundheit.^[4] Sie dient gemeinsam mit der Mukosa und dem Mukus als Barriere gegen Pathogene und diverse Antigene^[4] und stimuliert die Darmmotilität.^[7] Des Weiteren kommt ihr auch eine metabolische Rolle zu: Neben der Produktion von kurzkettigen

Fettsäuren, synthetisiert sie Vitamin K und Folsäure und kann auch zum Metabolismus von Xenobiotika - wie zum Beispiel Arzneistoffen - beitragen. Sie stimuliert das Immunsystem, indem die Immunglobulin A-Produktion angeregt und das Verhältnis zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen günstig beeinflusst wird. Außerdem wird auch die Bildung regulatorischer T-Zellen induziert.^[8]

Es gibt Hinweise darauf, dass eine veränderte Darmflora bei einigen Erkrankungen - wie zum Beispiel bei der Entwicklung von Übergewicht, Diabetes mellitus Typ 1 und 2, von kardiovaskulären Erkrankungen und funktionellen sowie entzündlichen Darmerkrankungen - eine Rolle spielt.^[3] Außerdem zeigt sich bei einer gestörten Darmflora auch ein vermehrtes Auftreten von Toxinen und Karzinogenen.^[9]

Die Ernährung und die Zufuhr von Xenobiotika, vor allem die Einnahme von Antibiotika, haben einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmflora.^[6]

1.2 Probiotika

Probiotika sind lebensfähige Mikroorganismen, die in der Lage sind, den Darm lebend zu erreichen, und die sich durch verschiedene Mechanismen positiv auf die Gesundheit des Wirtsorganismus auswirken.^[10]

Als Probiotika werden oft Bakterien der Gattung *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* und *Bifidobacterium* verwendet, selten Bakterien der Gattungen *Bacillus* und *Enterococcus*.^[1,10]

Die Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* und *Streptococcus* gehören zur Ordnung der *Lactobacillales*, während die Gattung *Bifidobacterium* zur Ordnung der *Bifidobacteriales* gehört.^[11, 12] Bei den genannten Gattungen handelt es sich um gram-positive, fakultativ anaerobe Bakterien, die ihre Energie aus der anaeroben Milchsäuregärung von Zuckern gewinnen.^[1, 13]

Die probiotische Wirkung von Bakterien ist stammspezifisch. Dabei sollte es sich um einen nicht-pathogenen, nicht-allergen und nicht-karzinogenen Stamm handeln, der in der Lage ist, die Passage durch den Verdauungstrakt - wenn möglich in großer Zahl - zu überleben. Dafür ist eine Toleranz gegenüber Magensäure, Galle und diversen Verdauungsenzymen Voraussetzung sowie die Fähigkeit, sich an der Mukosaoberfläche im Darm anzuheften.^[9]

Probiotika bieten eine Möglichkeit, die intestinale Mikroflora des Menschen günstig zu beeinflussen, und sie können somit eine positive Wirkung auf das Wohlbefinden und die Gesundheit ausüben.

Eine wichtige Rolle nehmen sie bei der Abwehr von Pathogenen ein. Dies geschieht mittels Absenkung des pH-Werts im Darm durch ihre Stoffwechselprodukte, durch die Produktion von Bakteriozinen^[14] und durch die Stärkung der Barrierefunktion aufgrund einer vermehrten Mukusproduktion.^[15] Sie wirken cholesterinsenkend^[16], können Symptome des Reizdarmsyndroms mildern^[14], die Schwere und Dauer von Durchfallerkrankungen positiv beeinflussen^[17] und sich positiv auf die glykämische Kontrolle bei Diabetes mellitus Typ 2 auswirken.^[18] Des Weiteren wirken sie immunstimulierend^[19] und antiinflammatorisch.^[20] Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass sie eine antiproliferative Wirkung auf Krebszellen haben.^[21]

1.3 Polyphenole

1.3.1 Polyphenole in der Natur

Polyphenole sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die über mehrere phenolische Hydroxylgruppen verfügen und biogenetisch entweder dem Shikimatweg (Phenylpropanstoffwechsel), dem Polyketidweg (Acetat-Malonat-Stoffwechsel) oder einer Kombination beider Wege entstammen.^[25]

Anhand ihres Grundkörpers können sie unter anderem in Phenolsäuren, Cumarine, Naphthochinone, Xanthone, Stilbene, Flavonoide, Lignane und Tannine eingeteilt werden.^[26] Mehr als 8000 Strukturen sind momentan bekannt, wobei die Flavonoide die größte Gruppe mit über 4000 bekannten Verbindungen darstellen.^[25]

In der Regel liegen Polyphenole gebunden an Zucker oder Pflanzensäuren vor. Andere mögliche Komponenten sind Amine oder Lipide. Die Zucker liegen entweder als Mono-, Di- oder auch als Oligosaccharide vor. Häufige Zuckerkomponenten sind D-Glucose, L-Rhamnose oder D-Galactose. Sie sind in Tee, Weintrauben, Olivenöl, Kaffee, Kakao, Soja und anderen Früchten und in Gemüse zu finden.^[27, 28] In der Pflanze dienen phenolische Komponenten der Pigmentierung, Pathogenabwehr, dem Schutz vor UV-Strahlung, als Antioxidantien und dem Wachstum.^[26]

1.3.2 Bioaktivität der Polyphenole

Polyphenolen kommt eine Rolle als sogenannte Phytochemikalien zu. Dabei handelt es sich um bioaktive Verbindungen pflanzlichen Ursprungs.^[6] Die Bioaktivität der Polyphenole ist vielfältig. Sie umfasst eine antioxidative Wirkung, die unter anderem auf den Einfluss der Verbindungen auf verschiedene Signaltransduktionswege und Enzyme zurückzuführen ist^[25], sowie eine antiinflammatorische Wirkung^[29]. Des Weiteren können Polyphenole zur Reduktion der Initiation, Entwicklung und Progression von Krebszellen beitragen.^[30] Sie verbessern das Blutlipidprofil, indem das Gesamtcholesterin, das Apolipoprotein B und LDL-Cholesterin gesenkt werden und das HDL-Cholesterin erhöht wird, wodurch sie zur Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen können.^[31] Außerdem zeigen sie protektive Effekte bei neurodegenerativen Erkrankungen.^[32]

1.3.3 Flavonoide

Flavonoide sind die am häufigsten vorkommenden Polyphenole. Sie sind vor allem in Blättern, Blüten, Samen, Fruchtschalen und in der Rinde zu finden.^[33] Weit verbreitete Vertreter sind Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin.^[34]

Es handelt sich biogenetisch um Phenylchromanderivate mit einem C6-C3-C6-Gerüst. Das Flavan stellt den Grundkörper der Flavonoide dar (Abb. 1). Dieses entsteht durch Kondensation eines Phenylpropankörpers aus dem Shikimatweg und eines Polyketidkörpers aus dem Acetat-Malonat-Weg. Die C3-Brücke, die die

beiden aromatischen Ringe miteinander verbindet, entstammt ebenfalls dem Shikimatweg und ist zu einem O-Heterozyklus verschlossen.^[34, 35]

Aufgrund des Oxidationsgrades der Kohlenstoffatome in Position 2, 3 und 4 des Chromanrings des Flavans, lassen sich Flavonoide in Flavanone, Flavanonole, Flavone, Flavonole, Leukoanthocyanidine und Anthocyanidine einteilen (Abb. 2). Die Substitutionsmuster der Ringe korrelieren mit ihrer biogenetischen Herkunft: So ist der Ring A meist in 5- und 7-Stellung mit Hydroxylgruppen substituiert, Ring C in 4'- bzw. 3',4'- bzw. 3',4',5'-Stellung.

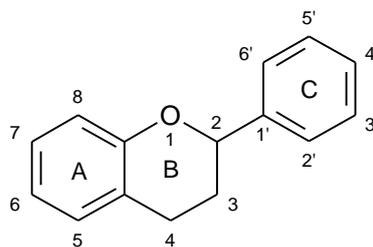
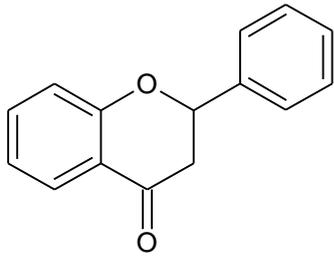


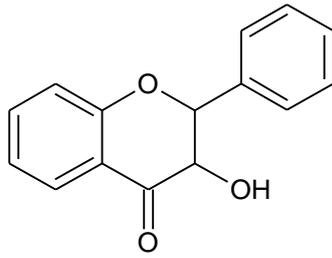
Abbildung 1: Flavan ^[35]

In der Regel liegen Flavonoide in der Pflanze als Glykoside vor. Hierbei treten sowohl O-Glykoside als auch C-Glykosyle auf. Ubiquitäre Zucker wie D-Glucose, D-Galactose, L-Rhamose oder D-Xylose sind als Mono-, Di- oder seltener als Tri- oder Tetrasaccharide verknüpft. Ihre Hydroxylgruppen können mit Methylgruppen alkyliert oder mit Schwefelsäure verestert sein. Des Weiteren können sie auch als freie, dimere Verbindungen vorliegen. Flavonoide werden unter anderem als Venotonika, Kardiotonika, Nootropika, Diuretika und Hepatika eingesetzt.^[35, 36]

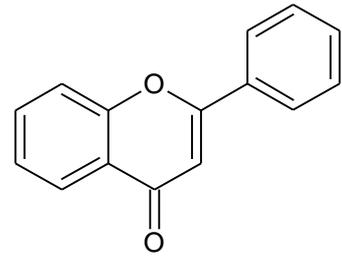
Das Flavonoid Rutin (Quercetin-3-O-glucorhamnosid; Abb. 5) ist ein Flavonol-Derivat und besteht aus dem Aglykon Quercetin (Abb. 3), das in der Position 3 mit einer Rutinose (Abb. 6) substituiert ist. Bei der Rutinose handelt es sich um ein Disaccharid, das aus einer L-Rhamnose und einer D-Glucose besteht, die über eine α -1,6-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Isoquercitrin (Abb. 4) stellt das Quercetin-3-O-glucosid dar.^[34, 35]



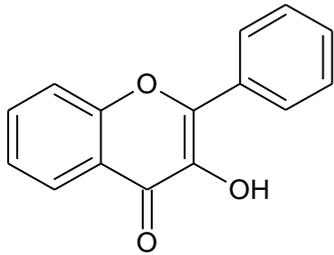
Flavanon



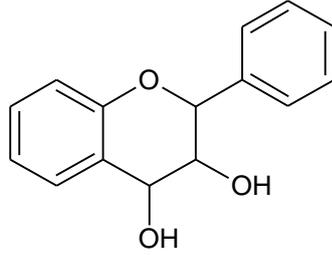
Flavanonol



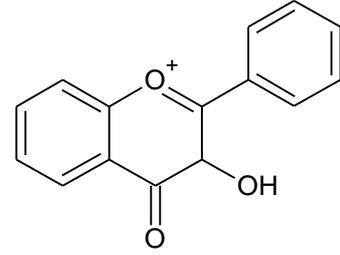
Flavon



Flavonol



Leukoanthocyanidine



Anthocyanidine

Abbildung 2: Übersicht über die Grundkörper der Flavonoide ^[35]

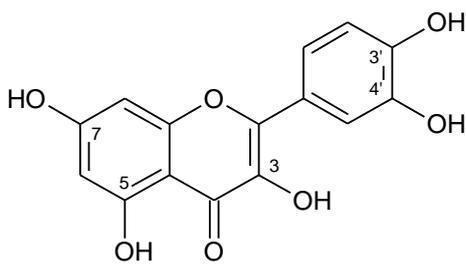


Abbildung 3: Quercetin ^[35]

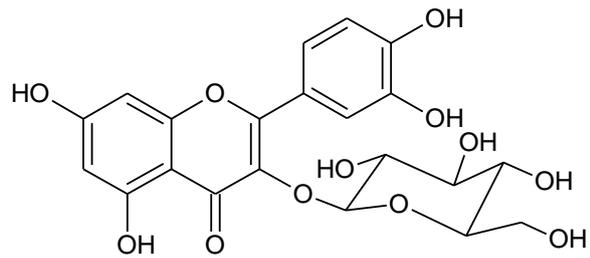


Abbildung 4: Isoquercitrin ^[35]

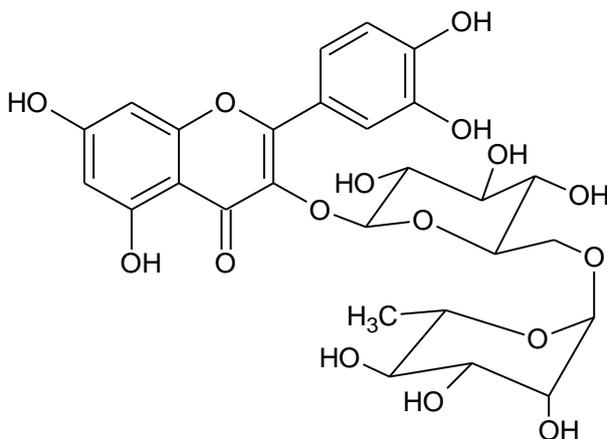


Abbildung 5: Rutin ^[35]

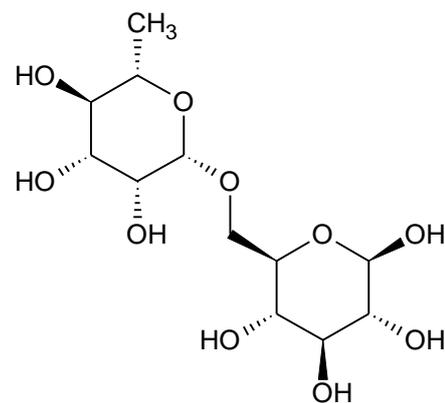


Abbildung 6: Rutinose:
α-L-Rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranose ^[37]

1.3.4 Bioverfügbarkeit von Polyphenolen

Polyphenole sind im Körper einem starken Metabolismus unterworfen. Im Speichel sind sie weitgehend stabil. Im Magen werden lediglich die Aglyka absorbiert, während die Glykoside im Magen stabil sind.^[38]

Sie können im Dünndarm und auch zu einem geringen Teil im Kolon absorbiert werden. Das Ausmaß der Absorption hängt von ihrer Struktur, dem Grad und der Art der Glykosylierung, dem Grad der Polymerisation und von ihrer Löslichkeit ab.^[28]

Polyphenolglucoside können im Dünndarm durch das Enzym Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) in die Aglyka umgewandelt und in dieser Form durch passive Diffusion aufgenommen werden. LPH befindet sich membrangebunden auf der luminalen Seite der Enterozyten.

Ein anderes Enzym, die cytosolische β -Glucosidase (CBG), hydrolysiert ebenso Polyphenolglucoside. Dazu müssen diese allerdings durch den Natrium-abhängigen Glucose Transporter-1 (SGLT-1 = sodium-dependent glucose transporter 1) zunächst in die Epithelzellen aufgenommen werden.^[39]

Einige Polyphenole können im Dünndarm aufgrund ihrer Größe oder aufgrund fehlender Enzyme nicht abgebaut werden. Diese Verbindungen gelangen in den Dickdarm und werden dort durch die Mikroflora metabolisiert. Dies betrifft vor allem Flavonoid-Rhamnoglucoside wie Rutin oder Naringin, komplexe Catechine oder Hydroxyzimtsäureester.^[38] Die im Dickdarm ansässigen Bakterien können sowohl Glykoside, Glucuronide, Sulfate, Amide, Ester und Lactone hydrolysieren als auch das Polyphenol-Grundgerüst selbst durch Reduktion, Decarboxylierung, Demethylierung und Dehydroxylierung abbauen.^[39] Für die Abspaltung der Rhamnose sorgt die α -Rhamnosidase, die von im Dickdarm ansässigen Bakterien gebildet wird. Die so erhaltenen Polyphenolglucoside können dann absorbiert werden.^[40] Es hat sich gezeigt, dass Polyphenole mit einem Glucoserest eine

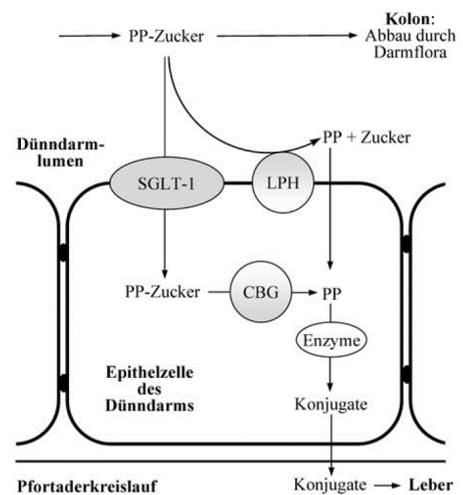


Abbildung 7: Metabolismus von Polyphenolglykosiden im Darm ^[34]

höhere Bioverfügbarkeit aufweisen als die entsprechenden Polyphenolrhamnoglucoside und die zugehörigen Aglyka.^[41]

Nach der intestinalen Aufnahme werden die Polyphenole zunächst noch in der Darmwand einem Phase-II-Metabolismus unterworfen, indem sie entweder glucuronidiert, methyliert oder sulfatiert werden. In der Leber werden sie weiter metabolisiert und gelangen so in den Blutkreislauf. Für Polyphenole wurde sowohl eine renale als auch eine biliäre Exkretion beschrieben.^[39]

Um die Bioverfügbarkeit von Flavonoid-Rhamnoglucosiden - wie zum Beispiel von Rutin - zu erhöhen, ist es günstig, die Abspaltung der Rhamnose schon vor Erreichen des Dickdarms vorzunehmen, sodass die Flavonoid-Glucoside im Dünndarm in höherem Ausmaß vorliegen und absorbiert werden können. Die Abspaltung der Rhamnose von Rutin liefert Isoquercitrin (Abb. 8). Aufgrund der Tatsache, dass im Dickdarm ansässige Bakterien dazu in der Lage sind, Rhamnose von Polyphenolen abzuspalten, könnten auch als Probiotika eingesetzte Stämme diese Fähigkeit besitzen.

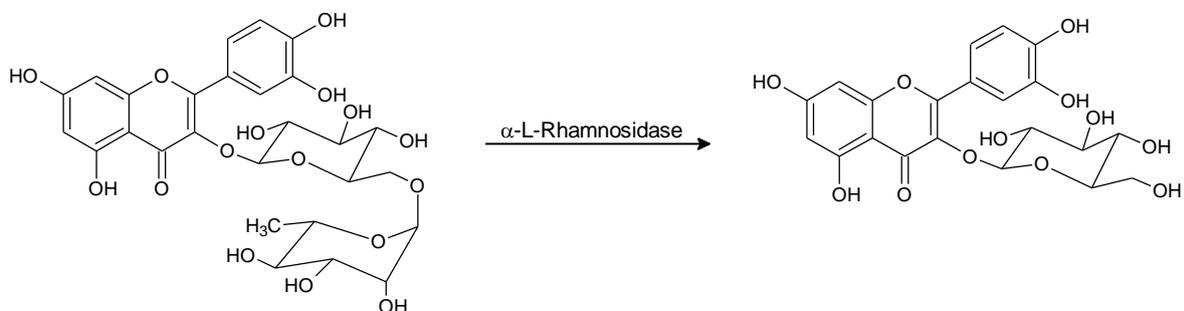


Abbildung 8: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin durch die α -L-Rhamnosidase

1.4 Enzyme

Enzyme sind Proteine, die in der Lage sind, als biologische Katalysatoren zu agieren. Dabei handelt es sich um Substanzen, die die Aktivierungsenergie einer Reaktion herabsetzen, sodass die Geschwindigkeit, mit der die Reaktion abläuft,

erhöht wird.^[43] Zu diesem Zweck verfügen sie über ein katalytisches und in vielen Fällen auch über ein regulatorisches Zentrum.^[44]

Enzyme können anhand der von ihnen katalysierten Reaktionen kategorisiert werden. Dazu dient ein numerisches Klassifikationssystem, das jedes Enzym durch eine vierziffrige EC-Nummer (Enzyme Commission) definiert. Die erste Ziffer gibt eine der sechs Hauptklassen an: Oxidoreduktasen (EC 1), Transferasen (EC 2), Hydrolasen (EC 3), Lyasen (EC 4), Isomerasen (EC 5) und Ligasen (EC 6). Jede Hauptklasse wird weiter in Unterklassen (zweite Ziffer) und diese in Unterunterklassen (dritte Ziffer) gegliedert. Die vierte Ziffer kennzeichnet das spezielle Enzym.^[44, 45]

Für die Umsetzung eines Substrats zum Produkt ist es wichtig, dass dieses in das katalytische Zentrum des Enzyms passt. Diese Bindungsstelle befindet sich in der Regel in einer Art Tasche, in der durch die räumliche Anordnung der Aminosäuren die höchstmögliche Substratspezifität gegeben ist.^[45] Hierbei sind vor allem Aminosäurereste wichtig, die protonierbar sind (z.B. Amino-, Hydroxyl- oder Sulfanylgruppen). Reichen die Seitenketten der Aminosäuren nicht aus, um Substratspezifität zu gewährleisten, kommen Cofaktoren zum Einsatz. Manche sind kovalent an das Enzym gebunden und werden als prosthetische Gruppen bezeichnet, andere sind nicht kovalent gebunden und werden Coenzyme genannt. Ist der Cofaktor an das Enzym gebunden, wird dieses als Holoenzym bezeichnet, wenn der Cofaktor nicht mehr gebunden ist, als Apoenzym.^[44]

Das regulatorische oder allosterische Zentrum befindet sich räumlich getrennt vom katalytischen Zentrum. Die Bindung eines allosterischen Regulators kann die Bindung eines Substrats an das Enzym entweder positiv beeinflussen, sodass die Bindung des Substrats erleichtert wird, oder negativ, sodass die Bindung erschwert wird.^[45]

Enzyme werden bei der von ihnen katalysierten Reaktion weder verändert noch verbraucht. Sie wirken weder auf die Energetik der Reaktion noch auf deren Gleichgewicht, sondern ausschließlich auf die Geschwindigkeit der Reaktion. Dies gelingt ihnen, indem sie die Aktivierungsenergie herabsetzen, die bei einer Reaktion überwunden werden muss, bevor diese ablaufen kann. Die Aktivierungsenergie ist jene Energie, die vonnöten ist, um alle beteiligten Moleküle in einen reaktiven Zustand, den Übergangszustand, zu versetzen.^[43] Enzyme binden den Übergangszustand mit höherer Affinität als die Edukte und führen so zu einer Verschiebung des Gleichgewichts hin zum Übergangszustand und somit zu den Produkten, wodurch die Reaktion beschleunigt wird. Die Geschwindigkeit einer durch Enzyme katalysierten Reaktion kann durch die Enzymkinetik beschrieben werden.^[45]

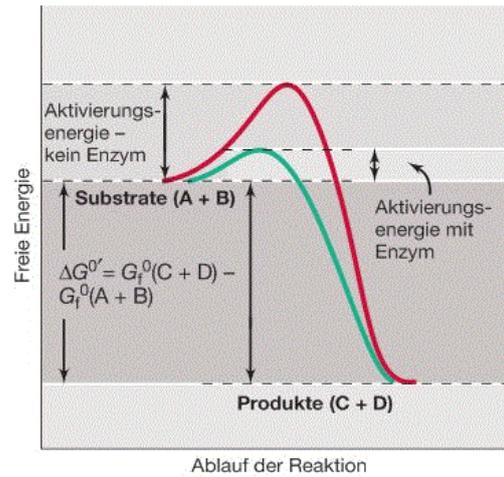


Abbildung 9: Herabsetzung der Aktivierungsenergie durch ein Enzym^[43]

Beim Arbeiten mit Enzymen müssen einige wichtige Faktoren berücksichtigt werden. Die Enzymaktivität ist abhängig vom pH-Wert, von der Temperatur sowie der Ionenstärke des Mediums, in dem die Reaktion stattfindet. Abhängig vom pH-Wert liegen protonierbare Gruppen (z.B. Carboxyl- oder Aminogruppen) des katalytischen Zentrums entweder in protonierter oder deprotonierter Form vor, was gleichbedeutend ist mit dem aktiven oder inaktiven Zustand des Enzyms.

Die katalytische Funktion von Enzymen ist an das sie umgebende pH-Milieu gebunden. Sie besitzen eine für sie charakteristische pH-Optimumskurve mit einem pH-Optimum, bei dem das jeweilige Enzym seine maximale Aktivität aufweist. Bei leichten Abweichungen vom pH-Optimum bleibt das Enzym noch weitgehend funktionstüchtig, während starke Abweichungen zu einer irreversiblen Beeinträchtigung der Funktion führen können.

Enzyme verfügen auch über für sie charakteristische Temperaturbereiche. Die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht sich mit der Temperatur, da durch die erhöhte Teilchenbewegung eine Reaktion wahrscheinlicher wird. Allerdings sind diesem Prozess Grenzen gesetzt, da bei zu hohen Temperaturen eine thermische Denaturierung eintritt.

Ebenso wirken zu hohe oder auch zu niedrige Ionenstärken, die vor allem durch die Wahl des Puffers beeinflusst werden, auf die meisten Enzyme denaturierend.

In der Regel bevorzugen Enzyme ein wässriges Milieu. Sie tolerieren geringe Zusätze von organischen Lösungsmitteln, denaturieren aber bei Zugabe von höheren Konzentrationen.^[44]

1.4.1 α -L-Rhamnosidase

Bei der α -L-Rhamnosidase (EC 3.2.1.40) handelt es sich um eine Glykohydrolase, die endständige α -L-Rhamnose-Reste abspaltet.^[46]

In der Natur wurde sie in tierischem Gewebe, in Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Bakteriophagen nachgewiesen.^[49]

Ein umfassendes Einsatzgebiet der α -L-Rhamnosidase ist die Lebensmittelindustrie. Sie wird eingesetzt, um den Geschmack verschiedener Fruchtsäfte sowie von Wein zu verbessern. Außerdem kann sie für die Hydrolyse von Hesperidin zu Hesperetin-7-O-glucosid eingesetzt werden, das eine wichtige Vorstufe für die Produktion von Süßstoffen darstellt.^[35, 47, 48]

In der Pharmazie kommt α -L-Rhamnosidase z.B. bei Umwandlung von Cyclosporin B zu Cyclosporin C, das immunsuppressiv wirkt, zum Einsatz. Viele L-Rhamnose enthaltende Steroide - zum Beispiel Dioscin oder Desglucoruscin - können durch Derhamnosylierung als Rohstoffe zugänglich gemacht werden. Dioscin ist das Glykosid des Diosgenins, das eine wichtige Vorstufe für die Partialsynthese von Steroidhormonen darstellt. Außerdem kann durch die Abspaltung der L-Rhamnose die Bioverfügbarkeit von Polyphenolglykosiden erhöht werden.^[49]

Eine geeignete Methode zur Untersuchung der Rhamnosidaseaktivität von Enzymen stellt der Nachweis der Umsetzung des synthetischen 4-Nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosids (4-NPRP) zu 4-Nitrophenol (4-NP) und L-Rhamnose dar. Der Abbau von 4-NPRP ist schematisch in Abbildung 10 dargestellt.^[49]

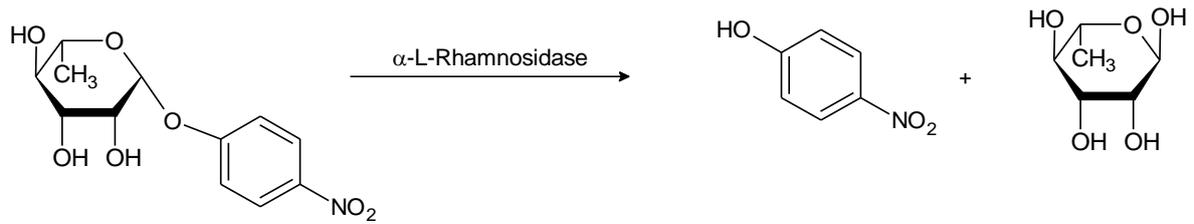


Abbildung 10: Umsetzung von 4-Nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosid zu 4-Nitrophenol und L-Rhamnose durch α -L-Rhamnosidase^[49]

1.4.2 Cellulase

Die Bezeichnung Cellulase ist ein Sammelbegriff für Enzyme, die Cellulose abbauen können. Für den vollständigen Abbau von Cellulose ist ein Multienzymkomplex verantwortlich, der sich aus drei Enzymen zusammensetzt (Abb. 11):

- Endoglucanase (EC 3.2.1.4): Sie greift an einem beliebigen Bereich innerhalb des Cellulosemoleküls an und zerlegt dieses in verschieden große Oligosaccharide, aber zum Teil auch in Cellobiose und Glucose.
- Exoglucanase (EC 3.2.1.91): Sie greift vom nicht-reduzierenden Ende der Oligosaccharidkette an und setzt Cellobiose frei.
- β -Glucosidase: Sie baut Cellobiose und kurze Cellooligosaccharide zu Glucose ab.^[50, 51]

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Cellulase (EC 3.2.1.4) ist eine Glykohydrolase, die die β -1,4-glykosidische Bindung in Cellulose, Lichenin und in anderen β -D-Glucanen hydrolysiert.^[52]

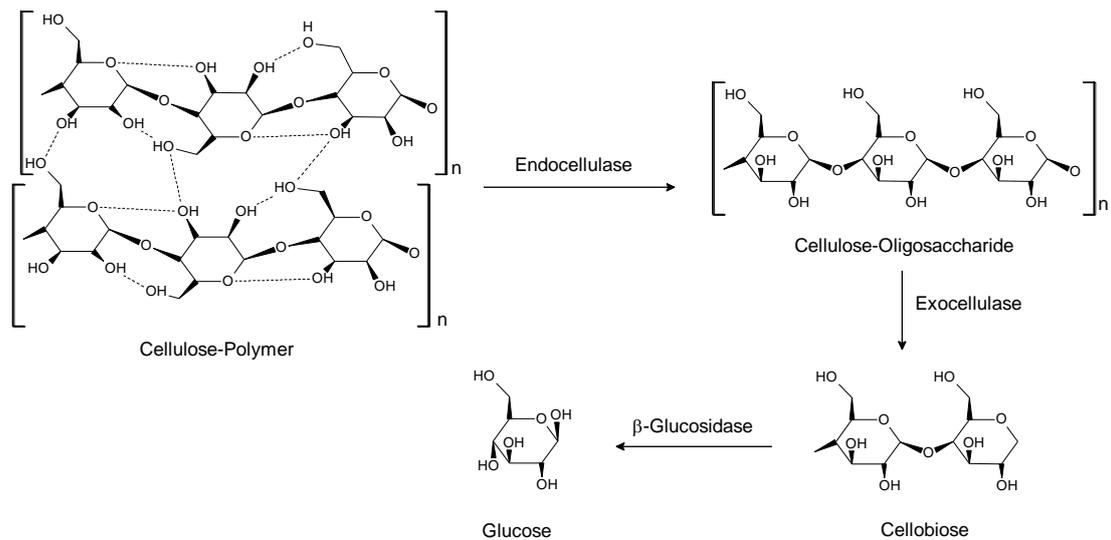


Abbildung 11: Abbau von Cellulose durch den Multienzymkomplex^[56]

Die meisten Tiere besitzen keine endogenen Cellulasen. Im Falle von zum Beispiel Wiederkäuern wird der Abbau der Cellulose durch Bakterien der Darmflora übernommen.^[57] Auch beim Menschen wurden anaerobe Bakterien gefunden, die Cellulose abbauen können. Sie gehören den Gattungen *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Enterococcus* und *Bifidobacterium* an.^[5, 54]

Cellulase wird in der Textilindustrie, in Waschmitteln, in der Zellstoff- und Papierindustrie und auch in der Lebensmittelindustrie eingesetzt.^[53] Außerdem gibt es Bemühungen, aus pflanzlicher Biomasse enzymatisch Ethanol als alternativen Kraftstoff herzustellen.^[56] Im Rahmen der Herstellung von Diosgenin wurde bei einer kommerziellen isolierten Cellulase eine Rhamnosidase-Nebenaktivität beobachtet.^[57]

1.5 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) stellt eine leistungsfähige chromatographische Trennmethode dar, mit der lösliche Stoffe analysiert oder präparativ aufgetrennt werden können. Die Chromatographie ist ein Trennprozess, bei dem das Probengemisch zwischen zwei Phasen verteilt wird. Die sich

bewegende (= mobile) Phase strömt dabei an der ruhenden (= stationären) Phase vorbei. [58]

Die mobile Phase, auch als Eluent bezeichnet, wird mittels einer Pumpe zum Injektor befördert, über den die Probe in das HPLC-System eingebracht wird. Dies geschieht entweder manuell oder automatisch über einen Autosampler. Die Probe, die mit dem Eluenten mittransportiert wird, gelangt durch eine Vorsäule in die Hauptsäule, in der sich die stationäre Phase befindet. Hier findet die Trennung der Substanzen voneinander statt, indem sie Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen. Anschließend gelangen die Substanzen nacheinander in einen Detektor, der mit einem Computer verbunden ist und somit eine Auswertung über eine Software ermöglicht. [59, 61]

Die Säulen für die analytische HPLC weisen meist einen Durchmesser von 1-5 mm und eine Länge von 5-30 cm auf und sind in der Regel aus Stahl. Sie sind mit einer Vorsäule versehen, die dem Schutz der Hauptsäulen dient. Die Säule kann während des Trennvorgangs mittels eines Säulenofens auf eine gewünschte Temperatur eingestellt werden. [60, 61]

Als stationäre Phase wird in der Regel Silicagel (Abb. 12) verwendet, das eine Teilchengröße zwischen 1,7 und 5 μm aufweist. Es handelt sich um unregelmäßig geformte oder runde poröse Teilchen, die eine enorme Oberfläche besitzen und eine enge Korngrößenverteilung aufweisen sollten. [60, 61]

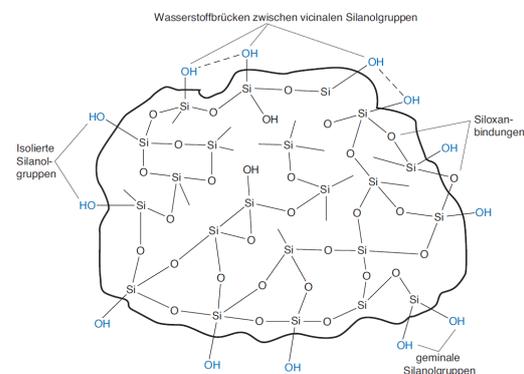


Abbildung 12: Schematische Darstellung von Silicagel [61]

Die mobile Phase wird in Abhängigkeit von der stationären Phase gewählt, wobei man sich mit der elutropen Reihe behilft. Diese ermöglicht eine Aussage über die Elutionskraft des jeweiligen Eluenten, womit die Fähigkeit bezeichnet wird, einen Analyten wieder von der stationären Phase zu verdrängen. [63]

Die Elution kann entweder isokratisch oder als Gradientenelution erfolgen. Bei der isokratischen Arbeitsweise wird die Zusammensetzung des Eluenten nicht verändert. Bei Verwendung eines Gradienten erfolgt die Elution mit einem

Lösungsmittelgemisch, dessen Zusammensetzung über die Zeit verändert wird, wodurch dessen Elutionskraft variiert werden kann.

Die Darstellung einer chromatographischen Trennung erfolgt in einem Chromatogramm, in dem das Signal des Detektors gegen die Elutionszeit aufgetragen wird. Als qualitatives Merkmal einer Substanz dient deren Retentionszeit. Als quantitatives Merkmal können sowohl Peakfläche als auch -höhe dienen. Beide Größen sind der in das HPLC-System eingebrachten Stoffmenge proportional.^[59, 61]

Als Detektor kommt häufig der UV/Vis-Detektor zum Einsatz. Dieser weist einen großen linearen Bereich auf und erlaubt den Einsatz bei Gradientenelution. Möglich ist auch der Einsatz von sogenannten Diodenarray-Detektoren, die das gesamte Spektrum einer Substanz auf einmal aufzeichnen können.^[58]

Die Umkehrphasenchromatographie (reversed-phase chromatography) ist die

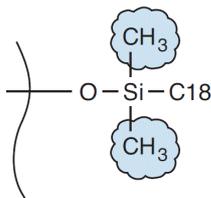


Abbildung 13:
Kieselgel mit kovalent
gebundenem
Octadecylrest^[64]

heute gebräuchlichste Variante der HPLC: Die Silanolgruppen sind chemisch verändert. Der Gebrauch der Octadecylphase, bei der eine C₁₈-Alkylkette kovalent an die Kieselgeloberfläche gebunden ist, ist sehr verbreitet. (Abb. 13).^[63, 64] Bei der Umkehrphasenchromatographie ist die stationäre Phase somit apolar. Die mobile Phase besteht in der Regel aus einem Gemisch aus Wasser und einer oder mehreren apolaren

Komponenten. Die Elutionskraft der mobilen Phase steigt, je apolarer das Elutionsmittel ist.^[58, 61]

2. Material und Methoden

Um die Deglykosylierung von Polyphenolglykosiden zu untersuchen, stand im Rahmen dieser Arbeit das Flavonoid Rutin zur Verfügung. Einerseits wurde durch den Einsatz isolierter Enzyme (Cellulase aus *Aspergillus niger* und rekombinante α -L-Rhamnosidase) die Zuckerabspaltung von diesem Flavonoid und andererseits dessen Abbau durch Probiotika untersucht.

2.1 Geräte und Reagenzien

Geräte	
Analysewaage	MC 210 P Sartorius AG (Göttingen, DE)
Dampfsterilisator	Varioklav® Typ 400 H + P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim, DE)
Feindosierungsspritzen 1 ml	Injekt®-F; 0,01 ml – 1 ml Luer solo B.Braun (Melsungen, DE)
HPLC-Anlage	HPLC UltiMate 3000 UHPLC+ focused Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
Klimaschrank	KBF 115 Binder (Tuttlingen, DE)
Laminar Air Flow	FAZ 3 Waldner Electronics (Wangen, DE)
Mini-Zentrifuge	uniCFUGE 3 Lab Logistics Group International GmbH (Meckenheim, DE)
pH/Ionen-Messgerät	SevenCompact™ S220 Mettler Toledo (Columbus, OH, USA)
Reagenzglasschüttler	Reax top 2000 Heidolph (Schwabach, DE)

Spektrophotometer	U-1100 Hitachi (Tokyo, JP)
Spritzen 2 ml	Norm-ject® Luer Henke-Sass Wolf GmbH (Tuttlingen, DE)
Spritzenvorsatzfilter	Minisart SRP 4; 0,45 µm Sartorius AG (Göttingen, DE)
Ultraschallbad	Starsonic 60 Liarre (Casalfiumanese, IT)
Vakuumtrockenschrank	VD 53 Binder (Tuttlingen, DE)
Wasseraufbereitungssystem	Barnstead™ Smart2Pure™ 3UV ThermoFisher (Waltham, MA, USA)
Zentrifuge	Z 323 K Hermle Labortechnik GmbH (Wehingen, DE)

Reagenzien	
2-Propanol	LC-MS Chromasolv® CAS 67-63-0 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
4-Nitrophenol	CAS 100-02-7 Merck (Darmstadt, DE)
4-Nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosid	CAS 18918-31-5 Carbosynth (Berkshire, UK)
4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid	≥ 98 % (TLC) CAS 2492-87-7 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Acetonitril	HPLC-Qualität CAS 75-05-8 Chem-Lab (Zedelgem, BEL)
Ammoniumhydrogencitrat	$\geq 99,0$ % (T) CAS 3012-65-5 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Cellulase	aus <i>Aspergillus niger</i> , EC 3.2.1.4 0,45 U/mg, fest Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
D(+)-Glucose Monohydrat	für die Mikrobiologie; ≥ 99 % (HPLC) CAS 14431-43-7 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Dikaliumhydrogenphosphat	CAS 7758-11-4 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)

Dimethylsulfoxid	ReagentPlus®, ≥ 99,5% CAS 67-68-5 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	CAS 10028-24-7 VWR Chemicals (Radnor, PA, USA)
Essigsäure	zur Synthese, 99-100 % CAS 64-19-7 Merck (Darmstadt, DE)
Fleischextrakt	für die Mikrobiologie Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Glycerol	85% CAS 56-81-5 Gatt-Koller (Absam, AUT)
Hefeextrakt	LP0021 Oxoid (Hampshire, UK)
Isoquercitrin	analytischer Standard CAS 482-35-9 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
L-Cysteinhydrochlorid monohydrat	CAS 7048-04-6 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Magnesiumchlorid hexahydrat	99%, ACS Reagenz CAS 7791-18-6 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Magnesiumsulfat	CAS 7487-88-9 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)

Methanol	Optigrade®, für die HPLC Promochem (Teddington, UK)
Natriumacetat	wasserrfrei zur Analyse CAS 127-09-3 Merck (Darmstadt, DE)
Natriumphosphat monobasisch Dihydrat	CAS 13471-35-0 Riedel-de Haën (Seelze, DE)
Pepton	aus Casein und anderen tierischen Proteinen; für die Mikrobiologie CAS 73049-73-7 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Quercetin	≥ 95% (HPLC), fest CAS 117-39-5 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Rutin Hydrat	≥ 94% (HPLC), Pulver CAS 207671-50-9 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
Trifluoressigsäure	ReagentPlus®, 99% CAS 76-05-1 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	CAS 6132-04-3 Merck (Darmstadt, DE)
TWEEN® 80	CAS 9005-65-6 Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)
α-L-Rhamnosidase	3000 U; 190 U/mg; EC 3.2.1.40 Megazyme (Bray, IRL)

2.2 Versuche mit isolierten Enzymen

2.2.1 Vorbereitung der Enzyme

Cellulase

Die Cellulase aus *Aspergillus niger* der Firma Sigma Aldrich lag als Pulver vor. Wie im Produktdatenblatt beschrieben, wurde das Produkt vor dem Gebrauch in einem 50 mM Acetatpuffer mit pH 5,0 gelöst.^[62]

α -L-Rhamnosidase

Die rekombinante α -L-Rhamnosidase der Firma Megazyme lag als Präzipitat mit Ammoniumsulfat vor. Vor der Anwendung musste das Präzipitat, wie vom Hersteller beschrieben, in einem 20 mM Phosphatpuffer mit pH 6,5 gelöst und kurz vor der Anwendung durchmischt werden.^[63]

2.2.2 Enzymreaktionen

Allgemeines

Für die Durchführung der Versuche wurden die Substrate 4-Nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosid und Rutin in einer Konzentration von 0,1 mM gewählt. 4-NPRP diente als Bezugssubstanz. Die Enzymeinheit Unit (U) stellt eine Möglichkeit dar, um die Enzymaktivität anzugeben. 1 U ist definiert als die Enzymmenge, welche 1 μ M Substanz in einer Minute unter definierten Bedingungen umsetzt.^[44]

Cellulase

1 Unit Cellulase ist definiert als jene Menge, die 1 μ M Glucose aus Cellulose innerhalb einer Stunde in einem Acetatpuffer bei einem pH-Wert von 5,0 und einer Temperatur von 37°C freisetzt.^[62] Der Lösung des Enzyms wurde das jeweilige

Substrat zugesetzt und bei 37°C inkubiert. In gewissen Zeitabständen wurden Proben gezogen und diese im Verhältnis von 1:1 mit Methanol versetzt, um das Enzym zu denaturieren und zu fällen und die Reaktion dadurch anzuhalten. Zur Durchmischung der Probe wurde ein Vortexmischer benutzt. Sie wurde anschließend bei 13 500 U/min und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Analyse mittels HPLC herangezogen.

α-L-Rhamnosidase

1 Unit α-L-Rhamnosidase ist als jene Menge definiert, die notwendig ist, um 1 μM 4-Nitrophenol pro Minute aus 4-Nitrophenyl-α-L-rhamnopyranosid freizusetzen. Die Reaktion sollte in einem 100 μM Phosphatpuffer mit pH 6,5 stattfinden. Als optimale Reaktionstemperatur der α-L-Rhamnosidase wurde vom Hersteller 50°C angegeben.^[63]

Um eine günstige Konzentration für die Umsetzung von 4-NPRP, aber vor allem von Rutin, zu finden, wurden Vortests mit verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt.

Die gewählte Substratkonzentration von 0,1 mM sollte innerhalb von einer Stunde umgesetzt werden, wodurch 1,67 U der Rhamnosidase eingesetzt werden mussten. Um festzustellen, welchen Einfluss die Enzymmenge auf den Verlauf der Reaktion hat, und um eine praktikable Enzymkonzentration zu ermitteln, wurden Versuche mit einem Zehntel (0,167 U) und einem Hundertstel (0,0167 U) der berechneten Enzymmenge durchgeführt.

Nach Auswertung dieser Versuche wurde eine Enzymmenge von 1 U festgelegt. Die Umsetzung der Substrate wurde sowohl bei 50°C als auch bei 37°C getestet. Es wurde 1 U des Enzyms eingesetzt, mit dem Substrat versetzt und bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. In gewissen Zeitabständen wurde ein Aliquot entnommen und dieses im Verhältnis von 1:1 mit Methanol versetzt und durchmischt, sodass die Reaktion zum Erliegen kam. Nach dem Zentrifugieren bei 13 500 U/min und 4°C für 10 Minuten wurde eine Analyse des Überstands mittels HPLC durchgeführt.

2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Um sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage über den Verlauf der Umsetzung zu erhalten, wurde die Methode der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) angewendet.

Die Analyse wurde mit folgenden Komponenten und unter den in Tabelle 2 angeführten Bedingungen durchgeführt:

HPLC-System	UltiMate 3000 UHPLC+ focused
Säule	Kinetex™ C-18 (5 µm Partikelgröße, 100 Å, 150 x 4,6 mm) (Phenomenex)
UV-Vis Detektor	DAD-3000 (RS)
Software	Chromeleon 6.80

Tabelle 1: Komponenten der HPLC-Anlage

Mobile Phase	Eluent A 0,1% Trifluoressigsäure 5% Acetonitril ad 100% Wasser Eluent B 0,1% Trifluoressigsäure ad 100% Acetonitril
Säulentemperatur	40°C
Injektionsvolumen	20 µl
Flussrate	0,5 ml/min
Detektionswellenlänge	350 nm

Tabelle 2: Bedingungen der HPLC-Analyse

Für die HPLC-Analyse wurde ein stufenförmiger Gradient mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Retentionszeit [Minuten]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
5	90	10
10	85	15
16	81	19
20	50	50
22	0	100
24	100	0
27	100	0

Tabelle 3: Zusammensetzung des Laufmittelgradienten

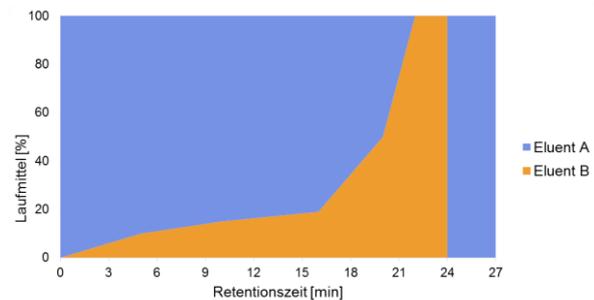


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Laufmittelgradienten

Es wurde mit 100% des polaren Eluenten A begonnen. Dieser wurde bis zu Minute 22 schrittweise reduziert, wodurch der Anteil an Eluent B stieg und das Laufmittel somit apolarer wurde. Dadurch konnte seine Elutionskraft gegenüber apolaren Substanzen schrittweise gesteigert werden. Anschließend wurde der Eluent B über zwei Minuten mit 100% eingesetzt, um alle apolaren Substanzen aus der Säule zu eluieren. Ab Minute 24 wurde für drei Minuten der polare Eluent A mit 100% eingesetzt, um die Säule zu equilibrieren und auf die nächste Analyse vorzubereiten.

2.3.1 Vermessung der Reinsubstanzen

Von allen verwendeten Substanzen wurden zunächst Stammlösungen mit einer Konzentration von 0,1 M in Dimethylsulfoxid hergestellt. Für die Durchführung der Versuche mit isolierten Enzymen und bei den Versuchen mit den Enzymen aus den Lysaten wurde eine Endkonzentration von 0,1 mM gewählt. Für die Versuche mit lebenden Bakterien wurde eine Endkonzentration von 0,01 mM gewählt.

Die Reinsubstanzen wurden mit dem in Kapitel 2.3 beschriebenen Laufmittelgradienten ebenfalls in einer Konzentration von 0,1 mM vermessen. Die Auswertung mittels HPLC erfolgte stets bei einer Wellenlänge von 350 nm.

Für die Reinsubstanzen ergaben sich die in Tabelle 4 angeführten Retentionszeiten.

Substanz	Retentionszeit [Minuten]
4-NPGP	9,9
4-NPRP	17,7
4-NP	18,8
Rutin	15,2
Isoquercitrin	16,1
Quercetin	22,9

Tabelle 4: Retentionszeiten der Reinsubstanzen

In Abbildung 15 bis 20 sind die Chromatogramme der Reinsubstanzen dargestellt.

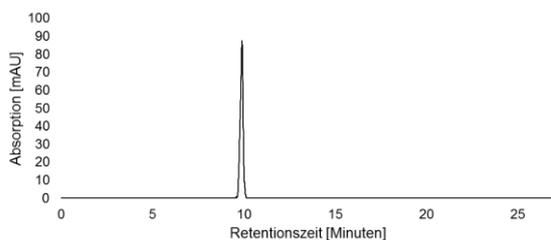


Abbildung 15: Vermessung von 4-NPGP mittels HPLC

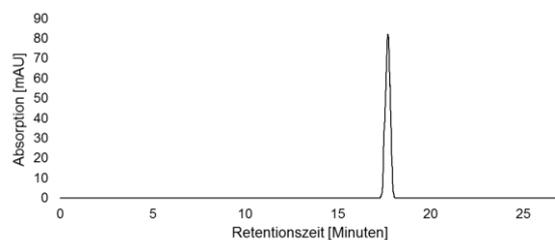


Abbildung 16: Vermessung von 4-NPRP mittels HPLC

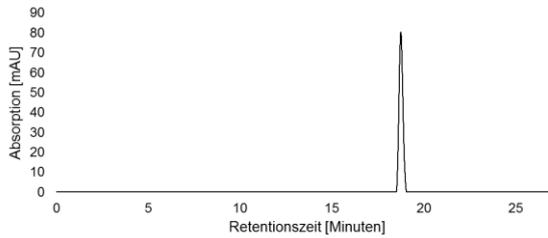


Abbildung 17: Vermessung von 4-NP mittels HPLC

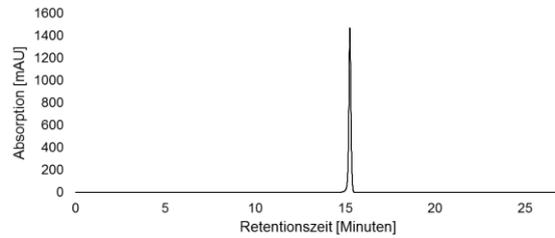


Abbildung 18: Vermessung von Rutin mittels HPLC

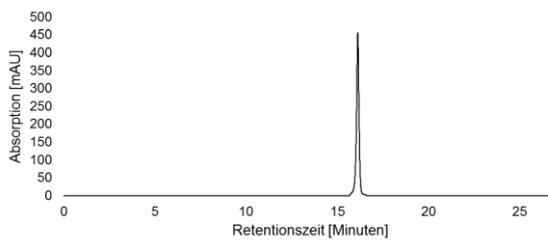


Abbildung 19: Vermessung von Isoquercitrin mittels HPLC

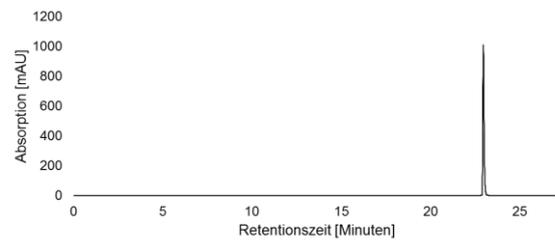


Abbildung 20: Vermessung von Quercetin mittels HPLC

2.4 Arbeiten mit Bakterien

Allgemeines

Um Kontaminationen zu vermeiden, ist das sterile Arbeiten beim Umgang mit Bakterien unerlässlich. Alle Arbeitsschritte, die eine keimarme Umgebung erforderten, wurden in einem Laminar Air Flow System durchgeführt. Das verwendete Medium sowie alle anderen für das Arbeiten erforderlichen Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert. Glasgeräte und andere Materialien wurden autoklaviert oder als sterile Einweggerätschaften gebraucht. Sämtliche Arbeitsflächen wurden mit Ethanol gereinigt. Alle verwendeten Lösungen wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.4.1 Herstellung des MRS-Mediums (de Man-Rogosa-Sharpe-Medium)

Die verwendeten Bakterienstämme wurden im MRS-Medium kultiviert. Dabei handelt es sich um ein flüssiges, komplexes Medium, das für die Kultivierung von Milchsäurebakterien gut geeignet ist.^[43]

Die Rezeptur, wie sie zum Beispiel im Handbook of Microbiological Media zu finden ist, wurde adaptiert.^[64] Zur Herstellung des Mediums wurden folgende Komponenten in einen 1000 ml Messzylinder eingewogen:

Komponente	Menge [g]
Pepton aus Casein	10,0
Fleischextrakt	8,0
Hefeextrakt	4,0
Di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat	2,0
TWEEN 80	1,0
di-Ammoniumhydrogencitrat	2,0
Natriumacetat	5,0
Magnesiumsulfat	0,2
Cysteinhydrochlorid Monohydrat	0,5
Mangansulfat Monohydrat	0,04

Tabelle 5: Rezeptur des MRS-Mediums

Es wurde sowohl ein Medium ohne Glucose (MRS-) als auch ein Medium mit Glucose (MRS+) hergestellt.

Für die Fertigstellung des MRS- Mediums wurde nach dem Einwiegen der Substanzen mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Für die Herstellung des MRS+ Mediums wurde lediglich auf 900 ml aufgefüllt, da diesem nach dem Autoklavierprozess noch 100 ml einer 20%igen Glucoselösung hinzugefügt wurden, sodass die Endkonzentration der Glucose im Medium 2% entsprach.

Nach dem Auffüllen mit destilliertem Wasser wurde der Messzylinder so lange auf einem Magnetrührer belassen, bis alle Komponenten gelöst waren. Nach dem

Überführen in ein geeignetes Autoklaviergefäß wurde das Medium für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die Glucoselösung wurde getrennt vom Medium bereitet, indem 20 g Glucose in 100 ml Wasser gelöst wurden. Diese Lösung wurde ebenfalls für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

2.4.2 Herstellung von Glycerolstocks

Um Bakterien über einen längeren Zeitraum in einer Suspension haltbar zu machen, werden diese eingefroren und bei -80°C gelagert. Zu diesem Zweck wird der Bakteriensuspension Glycerol zugesetzt, das den Gefrierpunkt des Wassers senkt und das Auskristallisieren des Wassers vermindert, sodass die Zellen nicht geschädigt werden. Der Einsatz von Glycerol in einer Konzentration von 20% ist üblich.^[44]

Für die Herstellung der Glycerolstocks wurde eine optische Dichte (OD₆₀₀) der Bakterien in der exponentiellen Phase zwischen 1 und 2 angestrebt. Die Glycerollösung wurde keimfrei filtriert. Für die Herstellung von 1 ml Glycerolstock wurden 760 µl der jeweiligen Bakteriensuspension und 240 µl einer 85%igen Glycerollösung verwendet. Die Lagerung erfolgte in Kryoröhrchen bei -80°C.

2.4.3 Übersicht über die verwendeten Probiotika

Für die Durchführung der Versuche zur Umsetzung von 4-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid, 4-Nitrophenyl-α-L-rhamnopyranosid und Rutin wurden Probiotika verwendet. Dabei handelte es sich mehrheitlich um Bakterien der Gattung *Lactobacillus*. Des Weiteren wurden zwei verschiedene *Bifidobacterium*-Stämme und je ein Stamm der Gattung *Lactococcus* und *Streptococcus* verwendet.

Bakterienstamm	verwendete Abkürzung
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bf3	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bf3
<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i>	<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>L. brevis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CRL431	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> DN114001	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> DSM20312	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	<i>L. rhamnosus</i> GG
<i>Lactococcus lactis</i> Sr 3.54	<i>Lc. lactis</i>
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophiles</i>	<i>St. salivarius</i> ssp. <i>thermophiles</i>

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Probiotika und deren Abkürzungen

2.4.4 Kultivieren der Bakterien

Die verwendeten Bakterienstämme standen entweder als Lyophilisat, als gefrorener Glycerolstock oder bereits in einer Suspension zur Verfügung. Für das Kultivieren aus lyophilisiertem Material wurde eine kleine Menge des Lyophilisats in das Medium eingebracht. Der Glycerolstock wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde das Zellmaterial mit 10 000 U/min bei 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Um mögliche Rückstände des Glycerols zu beseitigen, wurde das Pellet zwei Mal gewaschen. Zu diesem Zweck wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren verworfen und der Rückstand in 1 ml MRS+ Medium aufgenommen, mit der Pipette wieder vorsichtig in dem Medium suspendiert und anschließend das Zellmaterial erneut abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das

Pellet in das MRS+ Medium aufgenommen. Aus einer bestehenden Bakteriensuspension wurde ein Aliquot entnommen und in frisches MRS+ Medium eingebracht.

Die Kultivierung erfolgte anschließend stets unter anaeroben Bedingungen bei 37°C. Zur Beurteilung des Wachstums der Bakterien wurde die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) herangezogen.

2.4.5 Bestimmung der OD_{600}

Eine praktikable Methode, um das Wachstum von Bakterien zu beurteilen, ist die Trübungsmessung. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass Bakterien in einem Medium durchscheinendes Licht streuen, was mit freiem Auge als Trübung wahrgenommen wird. Das Ausmaß dieser Trübung kann mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen werden. Mit diesem wird Licht durch die Bakteriensuspension geleitet und der Anteil nicht gestreuten Lichts mittels einer Photozelle gemessen. Dabei wird häufig Licht mit einer Wellenlänge von 600 nm verwendet. Als Ergebnis der Messung erhält man die Absorption der Probe, die sich im linearen Bereich zwischen 0,2 und 1,2 befinden muss. Andernfalls ist für die Messung eine Verdünnung der Probe notwendig. Die optische Dichte (OD) ist die Maßeinheit der Trübung.^[43]

2.5 Umsetzung des Polyphenolglykosids Rutin durch Enzyme im Lysat von Bakterien

In der Regel verfügen Probiotika über eine β -Glucosidase. Diese ist in der Lage, 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (4-NPGP) zu 4-NP und Glucose abzubauen (Abb. 25). Durch den Einsatz dieser Standardsubstanz sollte einerseits die gewählte Methode zur Herstellung des Lysats zur Gewinnung funktionstüchtiger Enzyme evaluiert und andererseits das Ausmaß der Glucosidaseaktivität untersucht werden.

Die Deglykosylierung der Standardsubstanz 4-Nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosid (4-NPRP) diente dem Nachweis einer Rhamnosidaseaktivität.

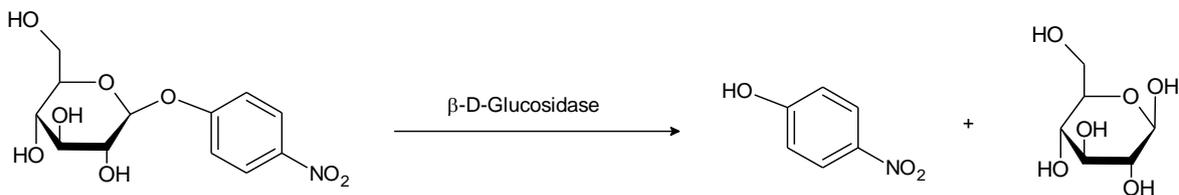


Abbildung 21: Abbau von 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid zu 4-Nitrophenol und β -D-Glucose mittels β -D-Glucosidase

Für den Zellaufschluss wurden die Bakterien dreimal als Übernachtskultur im MRS+ Medium kultiviert. Dazu wurde an drei Tagen ein Aliquot der Bakteriensuspension mit frischem MRS+ Medium versetzt und dieser Ansatz bis zum nächsten Tag anaerob kultiviert. Dies sollte ein gutes Wachstum der Bakterien gewährleisten. Für diese Versuche wurde eine hohe Zelldichte verwendet. In Abhängigkeit des Wachstums des jeweiligen Bakterienstamms wurden die Probiotika mit einer OD_{600} von 24, 12 oder 6 für den Zellaufschluss eingesetzt.

Die erforderlichen Mengen wurden der Suspension entnommen und bei 10 000 U/min bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um das Zellmaterial zu gewinnen. Der Überstand wurde verworfen. Es wurde dreimal mit Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5) gewaschen. Dazu wurde 1 ml des Puffers zu dem Pellet gegeben und dieses durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach dem letzten Waschschriff wurden zu dem Pellet im Verhältnis von 1:1,5 Glasperlen gegeben, und 300 μ l Phosphatpuffer wurden zugesetzt. Danach erfolgte der Aufschluss der Zellen in zehn Zyklen. Zunächst wurde das Gemisch für eine Minute auf den Vortexmischer gebracht, mit dem Zweck, die Zellmembran und Zellwand der Bakterien zu zerstören und somit den Zellinhalt zu gewinnen. Danach wurde die Probe eine Minute auf dem Eisbad abgekühlt, um sicherzugehen, dass keine zu starke Erwärmung auftrat, die zu einer Schädigung der Enzyme hätte führen können. Im Anschluss wurde bei 13 500 U/min und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen.

Die Versuche wurden in Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,5) durchgeführt. Zu diesem wurden sowohl das jeweilige Substrat als auch ein Aliquot des Lysats zugesetzt. Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert.

2.6 Umsetzung des Polyphenolglykosids Rutin in einer Bakteriensuspension

Auf der Grundlage der Ergebnisse der Versuche mit den aus den Bakterien gewonnenen Lysaten, wurden drei Stämme ausgewählt, mit denen versucht wurde, Rutin durch Zugabe zu der Bakteriensuspension und anschließender Kultivierung derselben umzusetzen. Die Konzentration wurde mit 0,01 mM im Gegensatz zu den Versuchen mit den Lysaten geringer gewählt, um eine mögliche Zytotoxizität zu vermeiden.

Es wurde versucht, durch die Zugabe von Rutin als alternative Kohlenstoffquelle die Rhamnosidaseaktivität in den Bakterien zu induzieren. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Stämme in Anwesenheit von Rutin in einer Konzentration von 0,01 mM vor dem eigentlichen Beginn des Versuchs über den Zeitraum von einer Woche kultiviert. Es wurde sowohl MRS+ Medium als auch MRS- Medium verwendet, um zu untersuchen, ob das Fehlen der Glucose, die für die Bakterien eine leicht verwertbare Kohlenstoffquelle darstellt, einen stärkeren Effekt auf die Induktion der Rhamnosidaseproduktion hat. Somit wurden die ausgewählten Stämme unter der Zugabe von Rutin über den Zeitraum von einer Woche sowohl in MRS+ als auch in MRS- bei 37°C anaerob kultiviert.

Nach Ablauf dieser Woche wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Von jedem Ansatz wurde eine entsprechende Menge entnommen und mit frischem Medium (MRS+ bzw. MRS-) versetzt, sodass die Start-OD₆₀₀ in MRS+ 3, jene in MRS- 1,2 betrug. Es wurde erneut Rutin in einer Konzentration von 0,01 mM zugegeben. Gleichzeitig wurde von jedem Ansatz auch eine Blindprobe mitkultiviert, zu der Rutin nicht erneut zugesetzt wurde. Die Proben wurden über einen Zeitraum von neun Tagen kultiviert und nur aus dem Inkubator genommen, um ein Aliquot zu entnehmen. Die Probenziehung erfolgte vor der Inkubation sowie an Tag 4 und 9 des Versuchs.

Das entnommene Aliquot wurde in einem Verhältnis von 4:1 mit Methanol versetzt. Die Mischung wurde mit Hilfe eines Vortexmischers durchmischt, und anschließend wurde das Zellmaterial bei 13 500 U/min und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Dieser wurde anschließend durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und dann der HPLC-Analyse zugeführt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Umsetzung des Polyphenolglykosids Rutin mit isolierten Enzymen

3.1.1 Cellulase

Das für den Versuch herangezogene Produkt der Firma Sigma Aldrich ist eine Enzymmischung aus *Aspergillus niger* mit einer ausgewiesenen Cellulase-Aktivität und einer vermuteten Rhamnosidase-Nebenaktivität. Die Umwandlung von Rutin durch ein Enzymextrakt aus *Aspergillus niger* wurde beschrieben.^[65]

Gleiche Mengen 4-NPRP und Rutin wurden mit 1 U Cellulase umgesetzt.

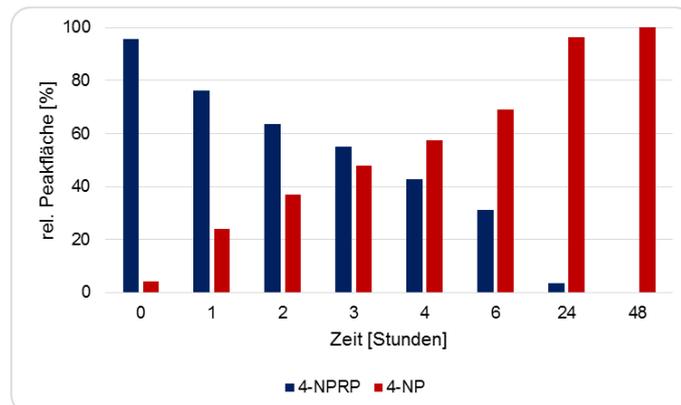


Abbildung 22: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP durch Cellulase

Die Umsetzung von 4-NPRP zu 4-Nitrophenol wurde anfangs in kürzeren Abständen gemessen. Nach sechs Stunden waren bereits 69% des 4-NPRP umgesetzt. Nach 24 Stunden waren lediglich 3,5% des 4-NPRP übrig, und nach 48 Stunden war es vollends zu 4-Nitrophenol umgesetzt. Somit wurde eine Rhamnosidase-Nebenaktivität bestätigt.

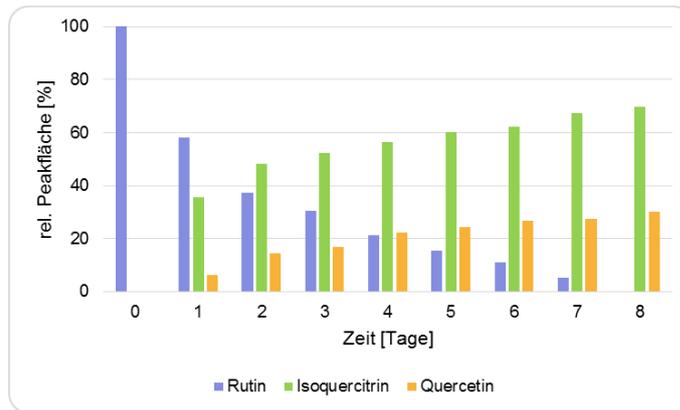


Abbildung 23: Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin mit Cellulase

Bis zum vollständigen Abbau von Rutin vergingen acht Tage. Damit dauerte die Umsetzung im Vergleich zu der von 4-NPRP viermal so lange. Rutin wurde zu Isoquercitrin und dieses in weiterer Folge zu Quercetin umgesetzt. Somit war das eingesetzte Produkt nicht nur in der Lage, L-Rhamnose, sondern auch D-Glucose abzuspalten. Der Versuch wurde nach dem vollständigen Abbau von Rutin beendet.

3.1.2 α -L-Rhamnosidase

Zur Bestimmung einer praktikablen Enzymkonzentration wurden zunächst Vortests durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass 1 U α -L-Rhamnosidase in einer Minute 1 μ M 4-Nitrophenol aus 4-NPRP freisetzt, wurde die erforderliche Enzymmenge berechnet, die 100 μ M des Substrats in einer Stunde umsetzt. Für diese Bedingungen ergab sich eine Menge des Enzyms von 1,67 U. Des Weiteren wurde der Versuch auch mit einem Zehntel dieser Enzymmenge (0,167 U) und einem Hundertstel der berechneten Menge (0,0167 U) durchgeführt. Diese Vortests wurden bei einer Temperatur von 50°C durchgeführt.

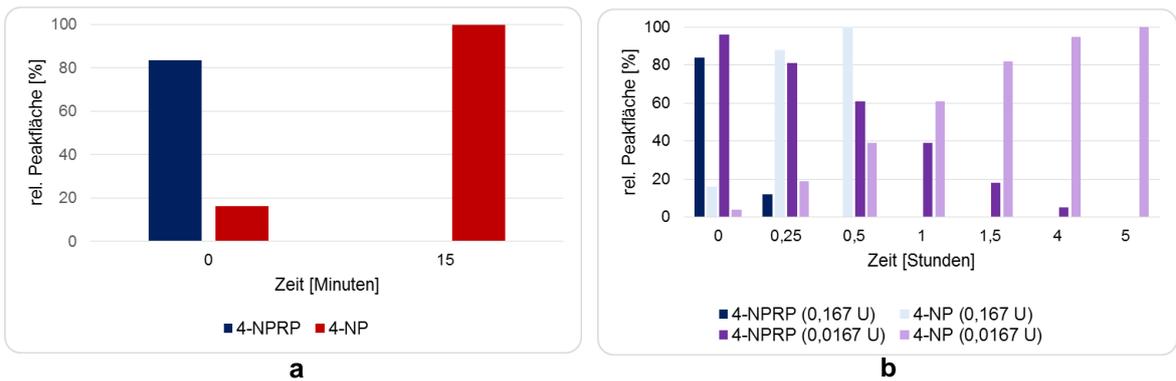


Abbildung 24: Umsetzung von 4-NPRP zu 4-NP durch α -L-Rhamnosidase
a: Verwendung von 1,67 U
b: Verwendung von 0,167 U und 0,0167 U

Mit der für die Umsetzung von 100 μ M 4-NPRP errechneten Enzymmenge von 1,67 U wurde das Substrat innerhalb von 15 Minuten vollständig umgesetzt (Abb. 24 a). Die Umsetzung lief sehr schnell an, sodass bei Minuten 0, also unmittelbar nach Zugabe des Substrats zu der Enzymlösung, bereits ein Teil des Substrats zum Produkt umgesetzt war. Dieses Verhalten war auch bei den weiteren Enzymversuchen zu beobachten. In Abbildung 24 b ist die Umsetzung von 4-NPRP mit den beiden geringeren Enzymmengen ersichtlich. Mit 0,167 U α -L-Rhamnosidase dauerte die Umsetzung von 4-NPRP zu 4-NP 30 Minuten. Mit der geringsten Enzymmenge (0,0167 U) war die Reaktion nach fünf Stunden komplett abgelaufen.

Eine Verringerung um den Faktor 10 der berechneten Enzymmenge bedingte eine Verdoppelung der Umsetzungszeit. Die Verringerung der ursprünglichen Enzymmenge um den Faktor 100 verlangsamte die Reaktionsgeschwindigkeit um das 20-fache.

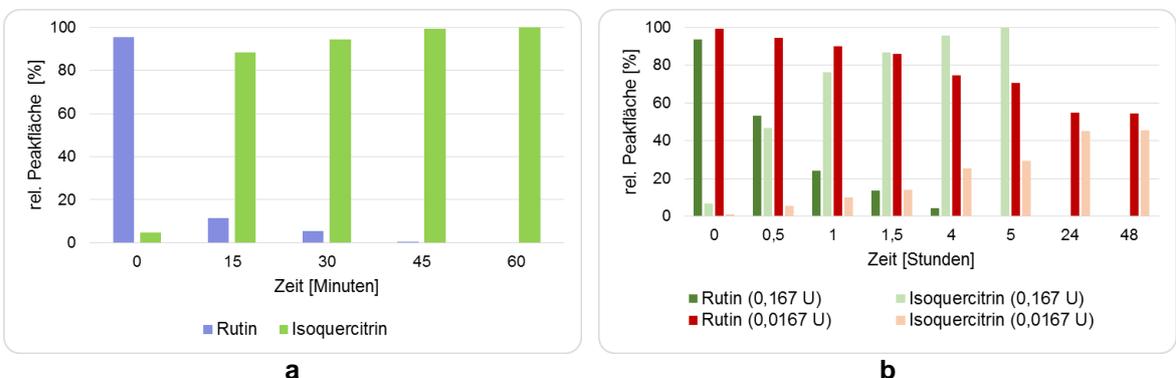


Abbildung 25: Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin mit α -L-Rhamnosidase
a: Verwendung von 1,67 U
b: Verwendung von 0,167 U und 0,0167 U

1,67 U der α -L-Rhamnoseidase bauten innerhalb von 15 Minuten 88% des Rutins zu Isoquercitrin ab (Abb. 25 a). Die Reaktion war nach einer Stunde vollständig abgeschlossen.

In Abbildung 25 b wurde die Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin mit 0,167 U und 0,0167 U der α -L-Rhamnosidase verglichen. Mit 0,167 U α -L-Rhamnosidase wurde Rutin nach fünf Stunden komplett zu Isoquercitrin umgesetzt. Bei der niedrigsten Enzymmenge von 0,0167 U ging die Umsetzung sehr langsam vonstatten und die Reaktion wurde nach 48 Stunden gestoppt. Die Verringerung der Enzymmenge um den Faktor 10 von 1,67 U auf 0,167 U bedingte eine Verlängerung der Umsetzungszeit um den Faktor 5.

Für alle weiteren Versuche wurde eine Enzymmenge von 1 U gewählt.

Das vom Hersteller angegebene Temperaturoptimum der α -L-Rhamnosidase beträgt 50°C. Zusätzlich zu dieser Temperatur, wurde die Umsetzung noch bei der physiologischen Körpertemperatur von 37°C durchgeführt, um festzustellen, welchen Einfluss die Temperatur auf die Reaktion hat.

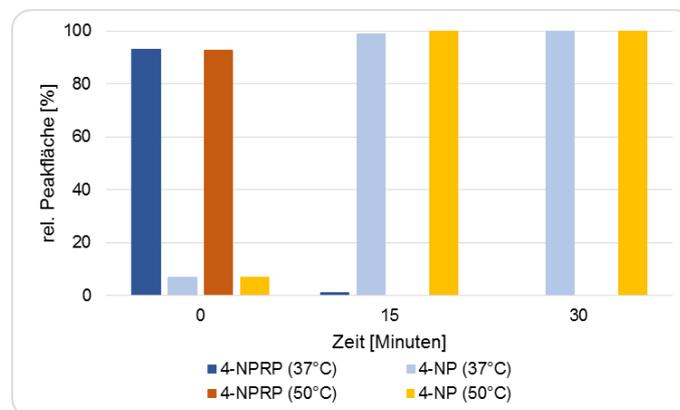


Abbildung 26: Vergleich der Umsetzung von 4-NPRP zu 4-NP bei 37°C und 50°C

In Abbildung 26 ist der Vergleich der Umsetzung der Standardsubstanz 4-NPRP bei 37°C und 50°C dargestellt. α -L-Rhamnosidase setzte 4-NPRP bei beiden Temperaturen vollständig zu 4-NP um. Die Reaktion war bei der Temperatur von 50°C bereits nach 15 Minuten vollständig abgelaufen, während bei der Umsetzung bei 37°C noch knapp 1,0% 4-NPRP verblieben waren. Das gesamte 4-NPRP wurde bei der Reaktion bei 37°C nach 30 Minuten komplett umgesetzt.

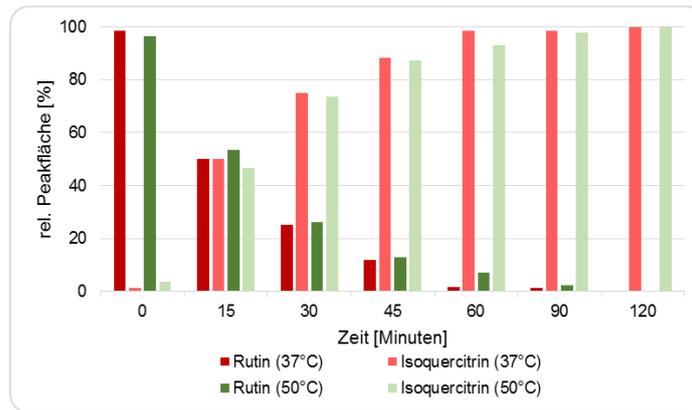


Abbildung 27: Vergleich der Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin bei 37°C und 50°C

Wie aus Abbildung 27 ersichtlich ist, war Rutin sowohl bei 37°C als auch bei 50°C nach 15 Minuten bereits zur Hälfte zu Isoquercitrin umgesetzt. Bei beiden Temperaturen war die Reaktion nach 120 Minuten vollständig abgelaufen.

Rutin wurde im Vergleich zu 4-NPRP durch die α -L-Rhamnosidase viermal langsamer abgebaut.

Insgesamt zeigte sich, dass die α -L-Rhamnosidase auch bei 37°C eine vergleichbar gute Umsetzung lieferte wie bei 50°C, und dass durch die Verminderung der Temperatur kein wesentlicher Einfluss auf die Geschwindigkeit der Reaktion erkennbar war.

3.2 Umsetzung des Polyphenolglykosids Rutin durch Enzyme aus dem Lysat der Probiotika

Insgesamt wurden 14 probiotisch wirkende Stämme untersucht. Die Bakterienstämme wurden kultiviert, und anschließend wurde ein Lysat hergestellt. Jedem Lysat wurde zwecks Untersuchung der Glucosidaseaktivität 4-NPGP zugesetzt. Um die Rhamnosidaseaktivität zu untersuchen, wurde 4-NPRP zugegeben. Außerdem wurde auch ein Ansatz mit Rutin hergestellt, um einen möglichen Abbau zu untersuchen.

Die ausgewählten Bakterienstämme wurden, nachdem dreimal eine Übernachtskultur hergestellt worden war, für den Versuch verwendet. Die

eingesetzte Zelldichte orientierte sich daran, wie stark sich der jeweilige Stamm in MRS+ vermehrt hatte. Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Stämme und die dazugehörige verwendete Zelldichte, die durch Trübungsmessung ermittelt wurde.

Bakterienstamm	OD ₆₀₀
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CRL431	24
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> DN114001	24
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> DSM20312	24
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	24
<i>Lactobacillus plantarum</i>	24
<i>Lactobacillus reuteri</i>	24
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bf3	24
<i>Lactobacillus fermentum</i>	12
<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophiles</i>	12
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	12
<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i>	12
<i>Lactococcus lactis</i> Sr 3.54	6
<i>Lactobacillus brevis</i>	6

Tabelle 8: Übersicht über die für die Herstellung des Lysats eingesetzte Zelldichte, gemessen als OD₆₀₀

Der Abbau von 4-NPGP, 4-NPRP und Rutin wurde mittels HPLC-Analyse untersucht. Exemplarisch ist in den Abbildungen 28 a bis c zunächst der Abbau von 4-NPGP und in den Abbildungen 29 a bis c der Abbau von 4-NPRP durch Enzyme aus dem Lysat von *St. salivarius* ssp. *thermophiles* durch Chromatogramme dargestellt. Der Abbau von Rutin durch Enzyme des Lysats aus *St. salivarius* ssp. *thermophiles* ist mittels der Chromatogramme in den Abbildungen 30 a und b dargestellt.

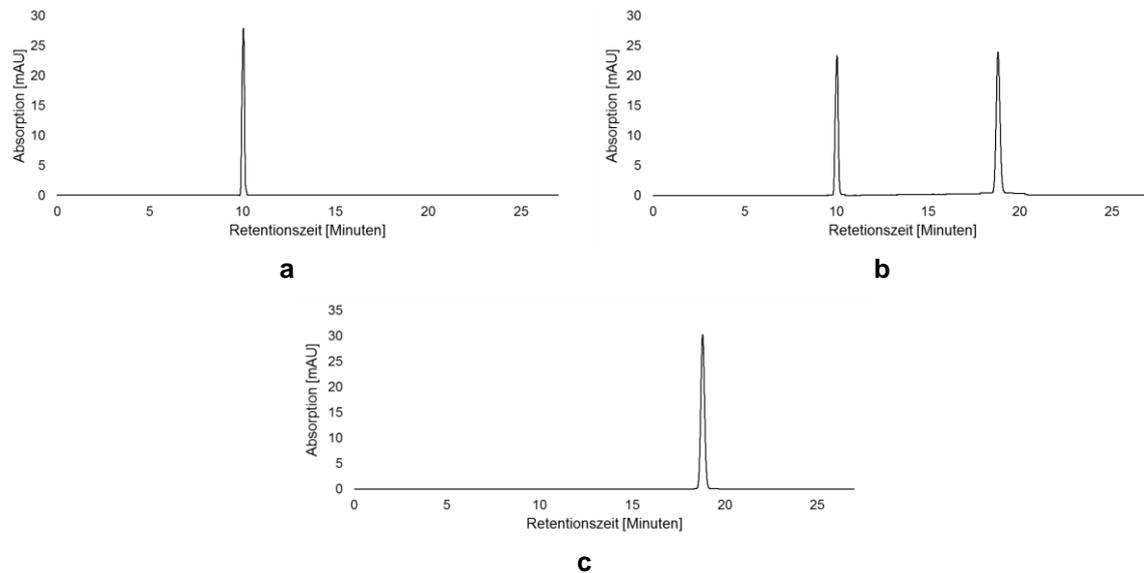


Abbildung 28: Abbau von 4-NPGP durch Enzyme aus dem Lysat von *St. salivarius* ssp. *thermophiles*
a: Chromatogramm vor dem Abbau
b: Chromatogramm zwei Tage nach Versuchsbeginn
c: Chromatogramm vier Tage nach Versuchsbeginn

In dem Chromatogramm vor dem Abbau ist nur ein Peak bei 9,9 Minuten nachweisbar, der dem 4-NPGP zuzuordnen war (Abb. 28 a). Zwei Tage nach Zugabe des Lysats von *St. salivarius* ssp. *thermophiles* konnte sowohl der Peak des 4-NPGP als auch jener des 4-NP bei Minute 18,8 detektiert werden. Am vierten Versuchstag war lediglich 4-NP nachweisbar, womit der Abbau von 4-NPGP abgeschlossen war.

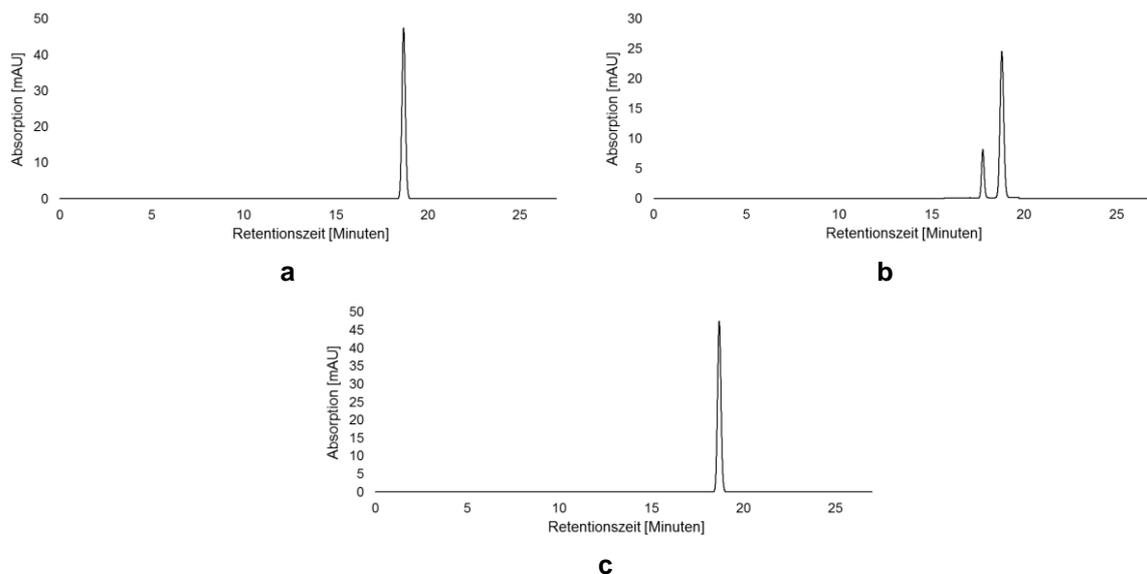


Abbildung 29: Abbau von 4-NPRP durch Enzyme aus dem Lysat von *St. salivarius* ssp. *thermophiles*
a: Chromatogramm vor dem Abbau
b: Chromatogramm zwei Tag nach Versuchsbeginn
c: Chromatogramm drei Tage nach Versuchsbeginn

Zum Nachweis einer Rhamnosidaseaktivität der aus den Probiotika gewonnenen Lysate, wurde der Abbau von 4-NPRP zu 4-NP herangezogen. In Abbildung 29 a ist zu erkennen, dass vor dem Beginn des Abbaus durch die Enzyme aus dem Lysat, nur ein Peak bei Minute 17,7 vorhanden war, der dem 4-NPRP entsprach. Zwei Tage nach Versuchsbeginn, war neben dem Peak des 4-NPRP noch ein Peak bei Minute 18,8 nachweisbar, der dem 4-NP entsprach (Abb. 29 b). Am 3. Tag war nur mehr 4-NP nachweisbar, was auf einen vollständigen Abbau der Standardsubstanz schließen ließ (Abb. 29 c).

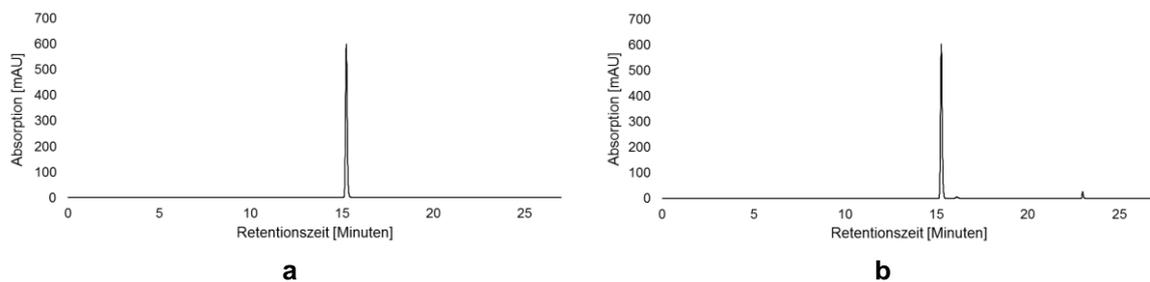


Abbildung 30: Abbau von Rutin durch Enzyme aus dem Lysat von *St. thermophiles* ssp. *salivarius*
a: Chromatogramm vor dem Abbau
b: Chromatogramm vier Tage nach Versuchsbeginn

In den Abbildungen 30 a und b ist der Abbau von Rutin durch Enzyme aus dem Lysat von *St. salivarius* ssp. *thermophiles* dargestellt. In Abbildung 30 a ist nur der Peak des Rutins bei Minute 15,2 zu erkennen. Am vierten Versuchstag, der in Abbildung 30 b dargestellt ist, sind neben dem Peak des Rutins noch zwei weitere Peaks zu erkennen. Es konnten Isoquercitrin und Quercetin nachgewiesen werden, wodurch ein Abbau durch die Enzyme des Lysats nachgewiesen werden konnte.

3.2.1 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactobacillus acidophilus*

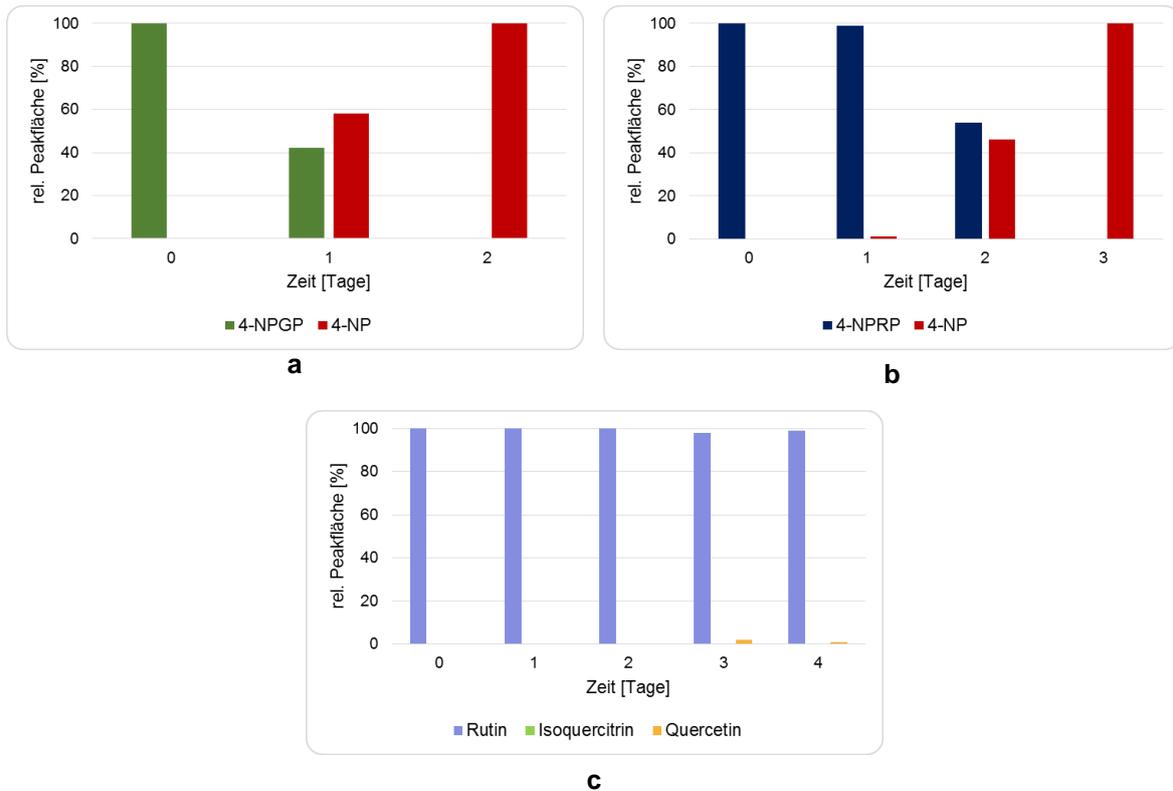


Abbildung 31: Enzymatische Aktivität des Lysats von *L. acidophilus*
a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP
b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP
c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Wie in Abbildung 31 a ersichtlich, wurde 4-NPGP innerhalb eines Tages im Ausmaß von 58% zu 4-NP umgesetzt und war nach zwei Tagen vollständig abgebaut.

Die Abbildung 31 b zeigt den Abbau von 4-NPRP. Einen Tag nach Beginn des Versuchs war nur ein geringer Anteil von 1% des 4-NPRP abgebaut. Zwei Tage nach Zugabe des Lysats waren 54% des 4-NPRP zu 4-NP umgesetzt, und nach drei Tagen war die Reaktion vollständig abgelaufen.

In Abbildung 31 c ist zu erkennen, dass in den vier Tagen des Versuchszeitraums nur ein sehr geringer Abbau von Rutin von unter 2% stattfand. Isoquercitrin konnte nicht nachgewiesen werden. Quercetin lag am dritten Tag in der Höhe von 2% vor und sank am vierten Versuchstag auf 1% ab. Dies könnte durch einen weiteren enzymatischen Abbau des Quercetins zu erklären sein.

3.2.2 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CRL431

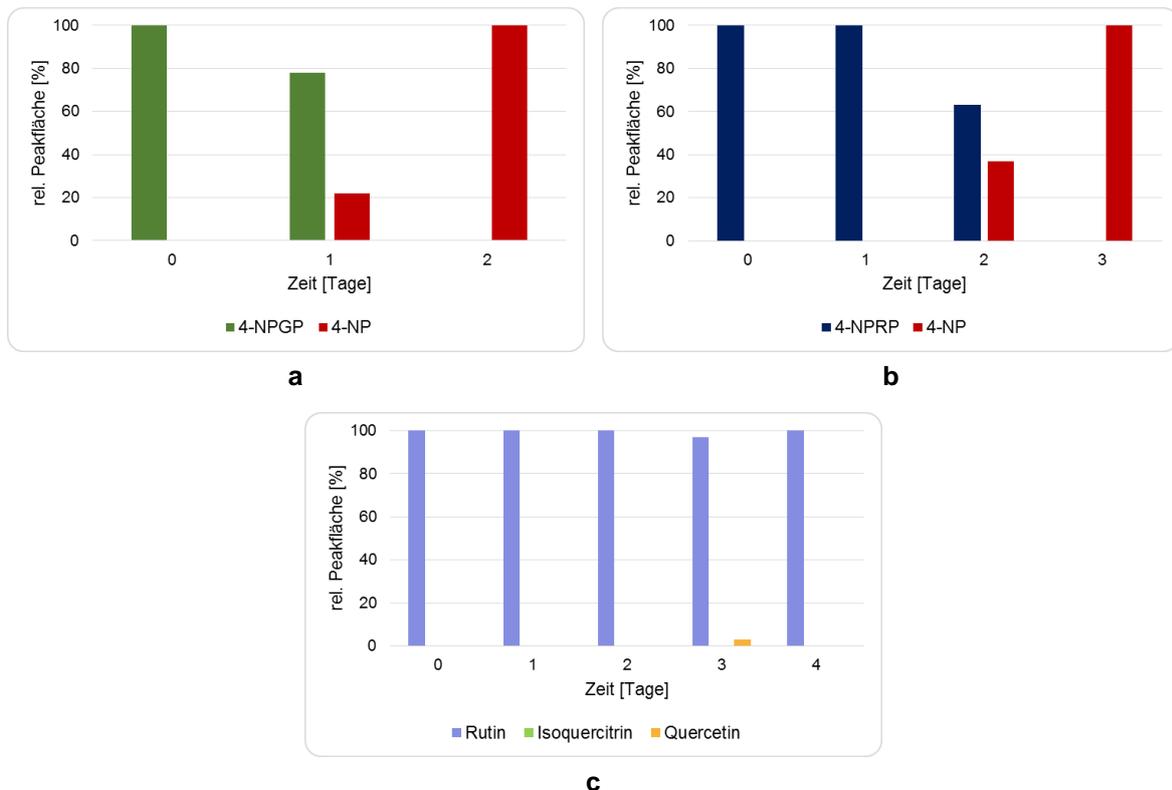


Abbildung 32: Enzymatische Aktivität des Lysats von *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1
a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP
b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP
c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Abbildung 32 a zeigt, dass am ersten Tag nach Zugabe des Lysats noch 78% des 4-NPGP vorhanden waren. Am Tag 2 war dieses vollständig zu 4-NP umgesetzt.

Der Abbau von 4-NPRP setzte erst nach 24 Stunden ein (Abb. 32 b). Nach zwei Tagen waren 37% des 4-NPRP zu 4-NP abgebaut. Am dritten Tag war 4-NPRP vollständig umgesetzt.

Trotz einer durch den Abbau von 4-NPRP nachgewiesenen Rhamnosidaseaktivität, konnte Rutin durch die Enzyme aus dem Lysat nur unvollständig abgebaut werden (Abb. 32 c). Am dritten Tag konnte eine geringe Menge Quercetin im Ausmaß von 4% nachgewiesen werden, was am vierten Tag - möglicherweise durch einen Abbau von Quercetin - nicht mehr möglich war. Isoquercitrin konnte nicht nachgewiesen werden.

3.2.3 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* DN114001

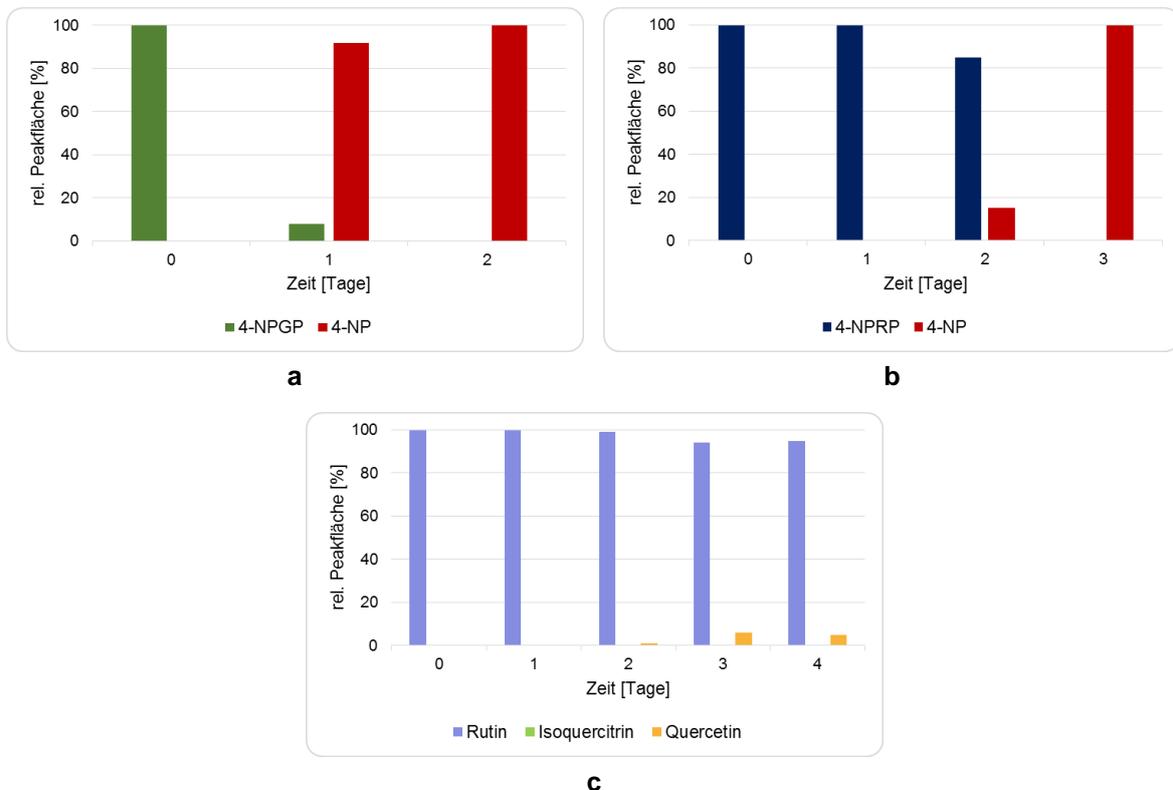


Abbildung 33: Enzymatische Aktivität des Lysats von *L. paracasei* ssp. *paracasei* 2
a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP
b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP
c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Wie in Abbildung 33 a ersichtlich, konnte 4-NPGP durch die Enzyme aus dem Lysat von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* DN114001 zu 4-NP abgebaut werden. Innerhalb von zwei Tagen war der Abbau komplett, wobei am ersten Tag bereits 92% des 4-NPRP umgesetzt waren. Der Abbau von 4-NPRP durch *L. paracasei* ssp. *paracasei* 2 setzte erst nach der Messung am Tag 1 ein (Abb. 33 b). Am Tag 2 waren 15% des 4-NPRP zu 4-NP umgesetzt. Am dritten Tag nach der Zugabe des Lysats war der Abbau von 4-NPRP vollständig. In Abbildung 33 c ist der Abbau von Rutin ersichtlich. Eine geringe Abspaltung der Zuckerreste konnte beobachtet werden. Quercetin war am Tag 2 zu 1% und am Tag 3 zu 6% nachweisbar, wobei am Tag 4 wieder ein Rückgang auf 5% zu verzeichnen war.

3.2.4 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* DSM20312

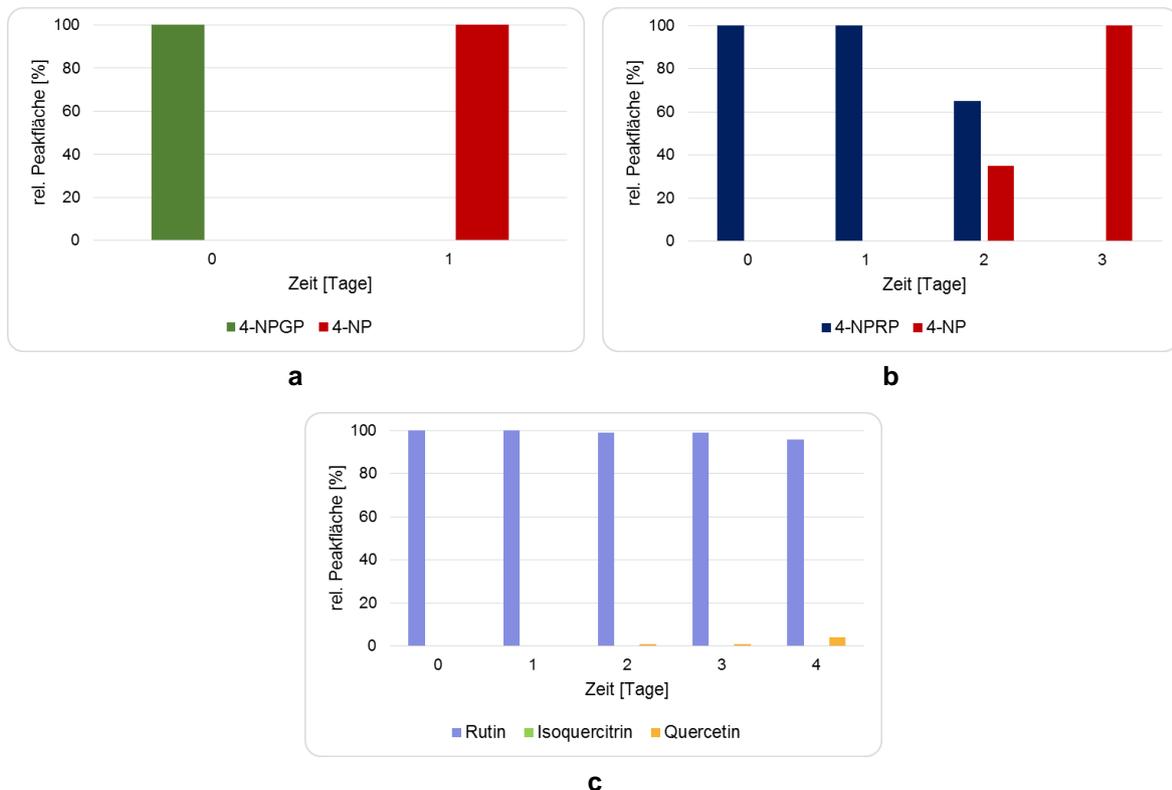


Abbildung 34: Enzymatische Aktivität des Lysats von *L. paracasei* ssp. *paracasei* 3

a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP

b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP

c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Die Abspaltung von Glucose von 4-NPGP durch Enzyme aus dem Lysat von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 3 ging rasch und vollständig vonstatten und war bereits nach einem Tag abgeschlossen (Abb. 34 a).

Die Abbildung 34 b zeigt, dass - wie bei den vorangegangenen *Lactobacillus paracasei*-Stämmen - auch bei diesem Stamm eine Rhamnosidaseaktivität nachweisbar war. Der Abbau von 4-NPRP setzte erst nach dem ersten Messtag ein. Am Tag 2 nach Versuchsbeginn waren 35% 4-NP nachweisbar. Am Tag 3 war 4-NPRP vollständig zu 4-NP abgebaut.

Die Abbildung 34 c zeigt den Abbau von Rutin. Der Anteil von Quercetin stieg ab dem zweiten Tag des Versuchs an. Dieser betrug am zweiten Tag 1%, am dritten Tag 2% und am vierten Tag 4%. Isoquercitrin war über den Versuchszeitraum nicht nachweisbar.

3.2.5 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactobacillus rhamnosus* GG

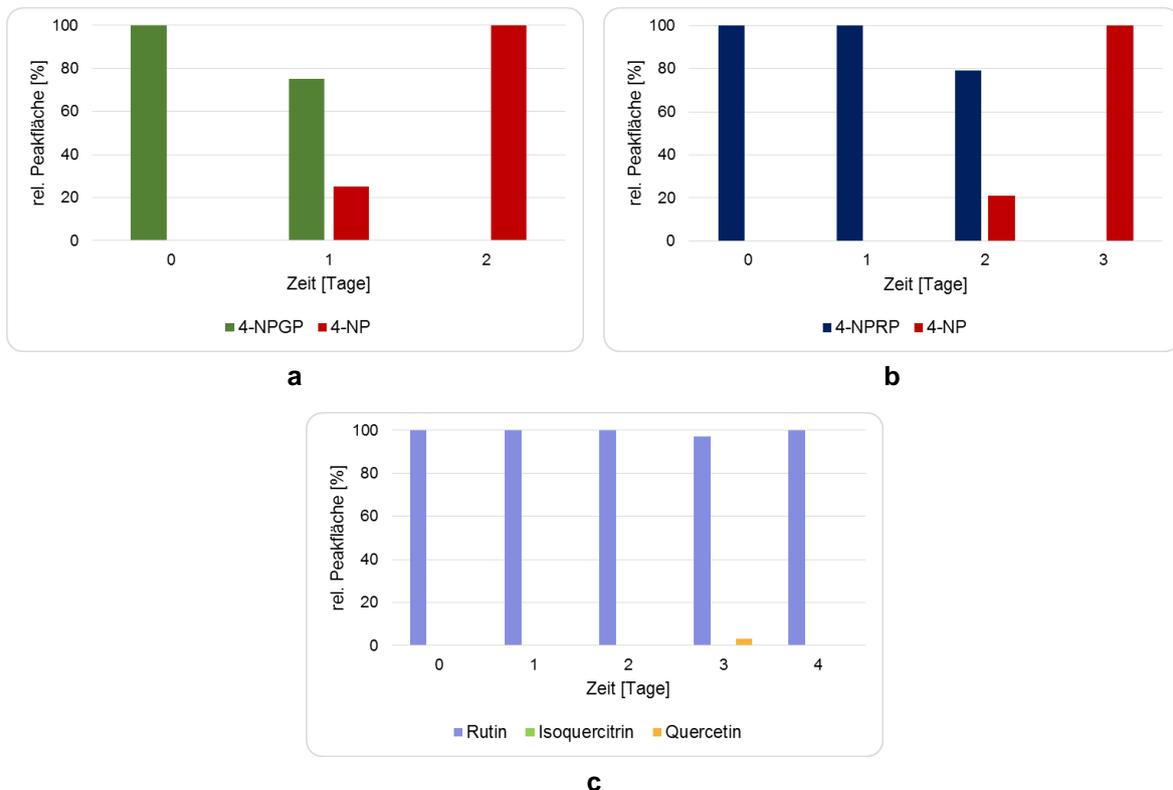


Abbildung 35: Enzymatische Aktivität des Lysats von *L. rhamnosus* GG
a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP
b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP
c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Der Anteil von 4-NPGP betrug nach einem Tag des Abbaus durch die Enzyme aus dem Lysat von *L. rhamnosus* GG noch 75% (Abb. 35 a). Nach zwei Tagen war die Umsetzung vollständig.

Wie in der Abbildung 35 b ersichtlich, war auch bei diesem *Lactobacillus*-Stamm eine Rhamnosidaseaktivität nachweisbar. Der Abbau von 4-NPRP setzte nach dem ersten Tag ein, und dessen Anteil betrug am Tag 2 der Messung 80%. Am dritten Tag nach Zugabe des Lysats war das gesamte 4-NPRP zu 4-NP abgebaut.

Rutin konnte durch die Enzymaktivität des Lysats von *L. rhamnosus* GG nur geringfügig abgebaut werden (Abb. 35 c). Am Tag 3 nach Zugabe des Lysats waren 3% Quercetin detektierbar. Am Tag 4 war kein Quercetin mehr nachweisbar. Isoquercitrin war über den Zeitraum der Messung nicht nachweisbar.

3.2.6 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactobacillus plantarum*

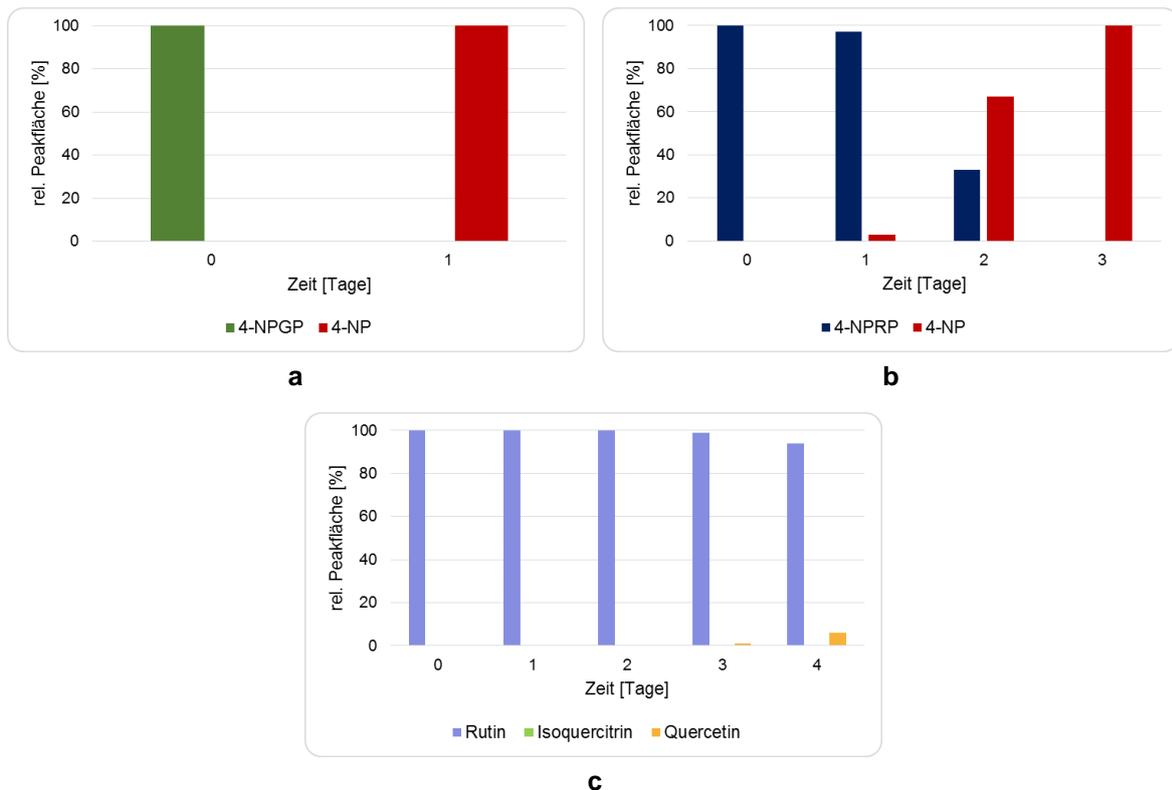


Abbildung 36: Enzymatische Aktivität des Lysats von *L. plantarum*
a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP
b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP
c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Da 4-NPGP durch die Enzyme des Lysats von *L. plantarum* innerhalb eines Tages vollständig zu 4-NP abgebaut wurde, konnte auf eine ausgeprägte Glucosidaseaktivität geschlossen werden (Abb. 36 a).

Die Abbildung 36 b zeigt, dass auch bei diesem Stamm eine Rhamnosidaseaktivität gegeben war, die dazu führte, dass 4-NPRP durch die Enzyme aus dem Lysat von *L. plantarum* abgebaut werden konnte. Am ersten Tag des Abbaus betrug der Anteil an 4-NP 3% und am zweiten Tag 67%. Am Tag 3 nach Zugabe des Lysats war die Reaktion komplett abgelaufen.

Rutin konnte durch die Enzyme aus dem Lysat von *L. plantarum* zu einem geringen Teil abgebaut werden (Abb. 36 c). Am Tag 4 lagen 6% Quercetin vor. Isoquercitrin war nicht nachweisbar.

3.2.7 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactobacillus reuteri*

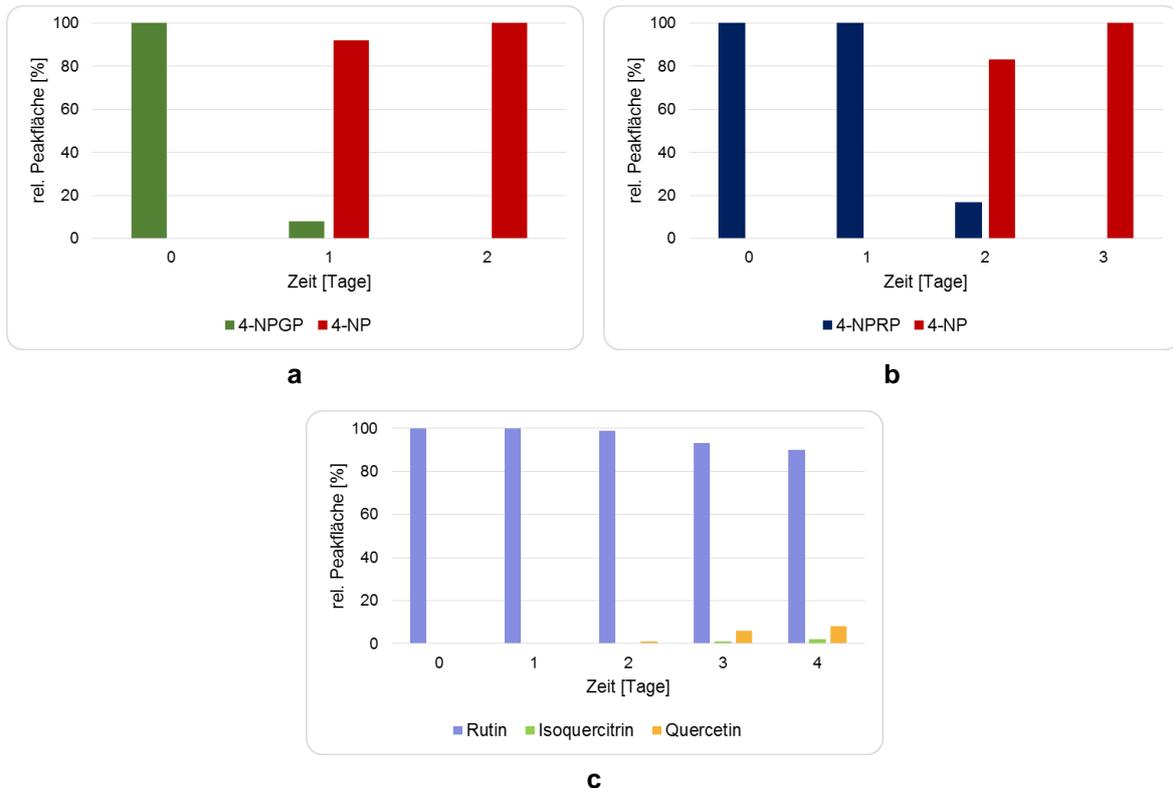


Abbildung 37: Enzymatische Aktivität des Lysats von *L. reuteri*
a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP
b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP
c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Auch für das Lysat von *L. reuteri* konnte eine Glucosidaseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 37 a). 4-NPGP war am ersten Tag nach Zugabe des Lysats nur mehr zu 9% detektierbar. Am zweiten Tag war der Abbau vollständig.

Wie auch bei den vorangegangenen *Lactobacillus*-Stämmen war auch bei diesem Stamm eine Rhamnosidaseaktivität gegeben (Abb. 37 b). Der Abbau des 4-NPRP setzte nach dem ersten Tag nach Zugabe des Lysats ein. Am Tag 2 lag der Anteil von 4-NP bereits bei 83% und am Tag 3 bei 100%.

Die Abbildung 37 c zeigt, dass bei der Vermessung der Umsetzung von Rutin durch Enzyme aus dem Lysat von *L. reuteri* sowohl Isoquercitrin als auch Quercetin nachweisbar waren. Am zweiten Tag nach dem Start der Messung war 1% Quercetin nachweisbar. Am Tag 3 wurden 1% Isoquercitrin und 6% Quercetin detektiert. Nach vier Tagen waren insgesamt 10% Rutin abgebaut worden, wobei ein Anteil von 8% bereits zu Quercetin umgewandelt war.

3.2.8 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bf3

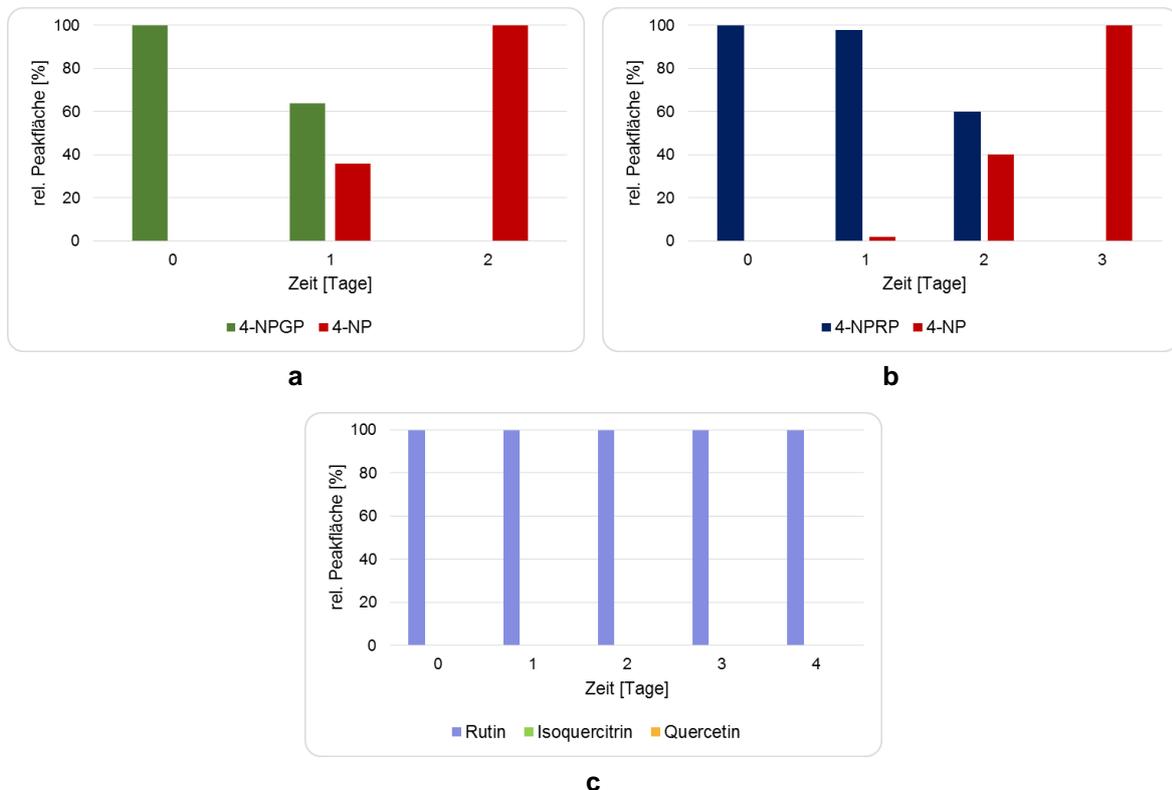


Abbildung 38: Enzymatische Aktivität des Lysats von *B. animalis* ssp. *lactis* Bf3
a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP
b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP
c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

In Abbildung 38 a ist zu erkennen, dass 4-NPGP durch eine Enzymaktivität des Lysats dieses Bakterienstamm innerhalb von zwei Tagen zu 4-NP abgebaut werden konnte. Am Tag 1 nach der Zugabe des Lysats waren 36% des 4-NPRP zu 4-NP umgesetzt.

Die Abbildung 38 b zeigt, dass am Tag 1 nach Beginn des Versuchs mit 2% des 4-NPRP nur ein geringer Anteil zu 4-NP abgebaut war. Am Tag 2 lag der Anteil von 4-NP bei 40%. Der Abbau von 4-NPRP war am dritten Tag nach Beginn des Versuchs vollständig.

Trotz der durch den Abbau von 4-NPRP nachgewiesenen Rhamnosidaseaktivität, war ein Abbau von Rutin durch diesen Stamm nicht zu beobachten (Abb. 38 c).

3.2.9 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactobacillus fermentum*

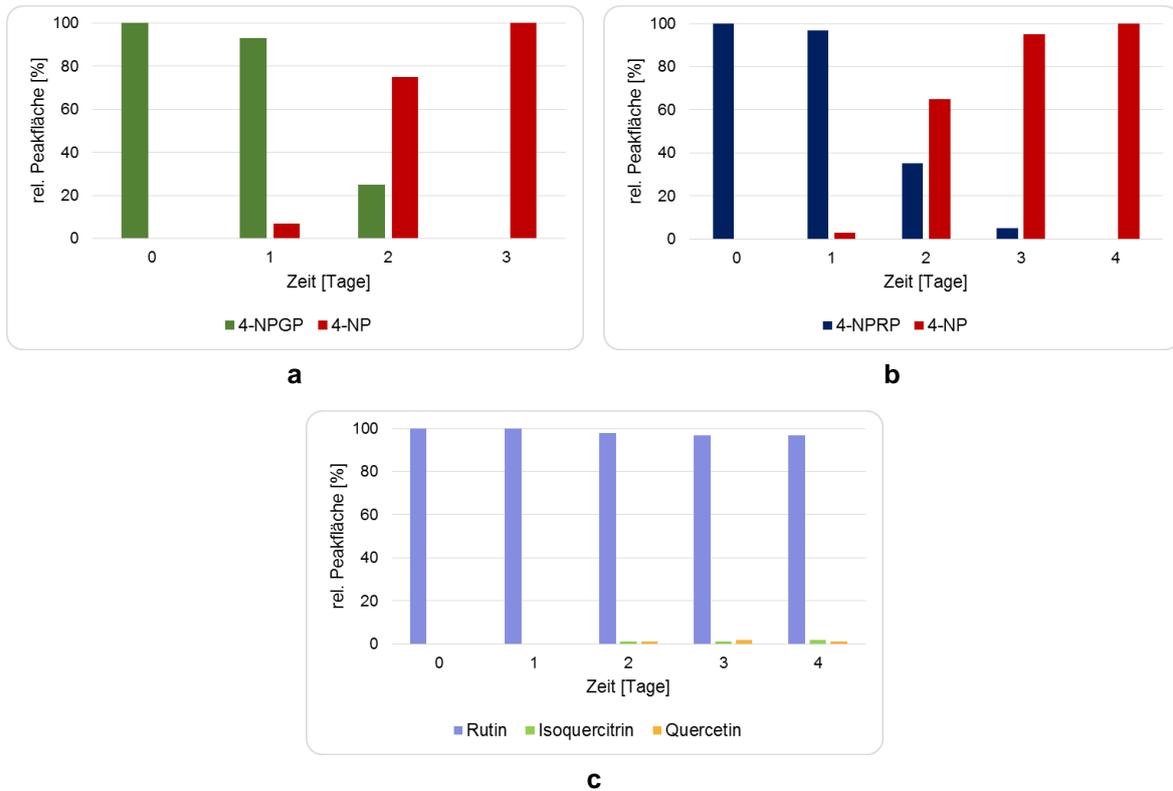


Abbildung 39: Enzymatische Aktivität des Lysats von *L. fermentum*
a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP
b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP
c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Auch bei dem aus *L. fermentum* gewonnenen Lysat war eine Glucosidaseaktivität nachweisbar (Abb. 39 a). 4-NPGP war nach Ablauf eines Tages teilweise abgebaut, wobei sein Anteil bei 93% lag. Am zweiten Tag nach Zugabe des Lysats betrug dessen Anteil 25%, und am dritten Tag war 4-NPGP vollständig zu 4-NP abgebaut. Durch eine Rhamnosidaseaktivität des Lysats von *L. fermentum* konnte 4-NPRP innerhalb von vier Tagen vollständig abgebaut werden (Abb. 39 b). Der Abbau setzte innerhalb von 24 Stunden ein, wobei der Anteil an 4-NP am ersten Tag der Messung bei 3% lag. Am Tag 2 war der Anteil auf 66% gestiegen, und am dritten Tag war der Abbau vollständig.

In der Abbildung 39 c ist ersichtlich, dass der Abbau von Rutin durch die Enzyme aus dem Lysat von *L. fermentum* zwar gering, aber nachweisbar war, da sowohl Isoquercitrin als auch Quercetin zu finden waren. Deren Anteile stiegen ab dem zweiten Tag an. Am zweiten Messtag lagen 1% Isoquercitrin und 2% Quercetin vor. Am dritten Tag zeigte sich keine Veränderung der Anteile an Isoquercitrin und

Quercetin. Der Anteil an Quercetin sank am Tag 4 wieder leicht ab, was auf einen Abbau des Ringsystems hindeuten könnte. Der Anteil von Isoquercitrin lag am Tag 4 bei 2%.

3.2.10 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophiles*

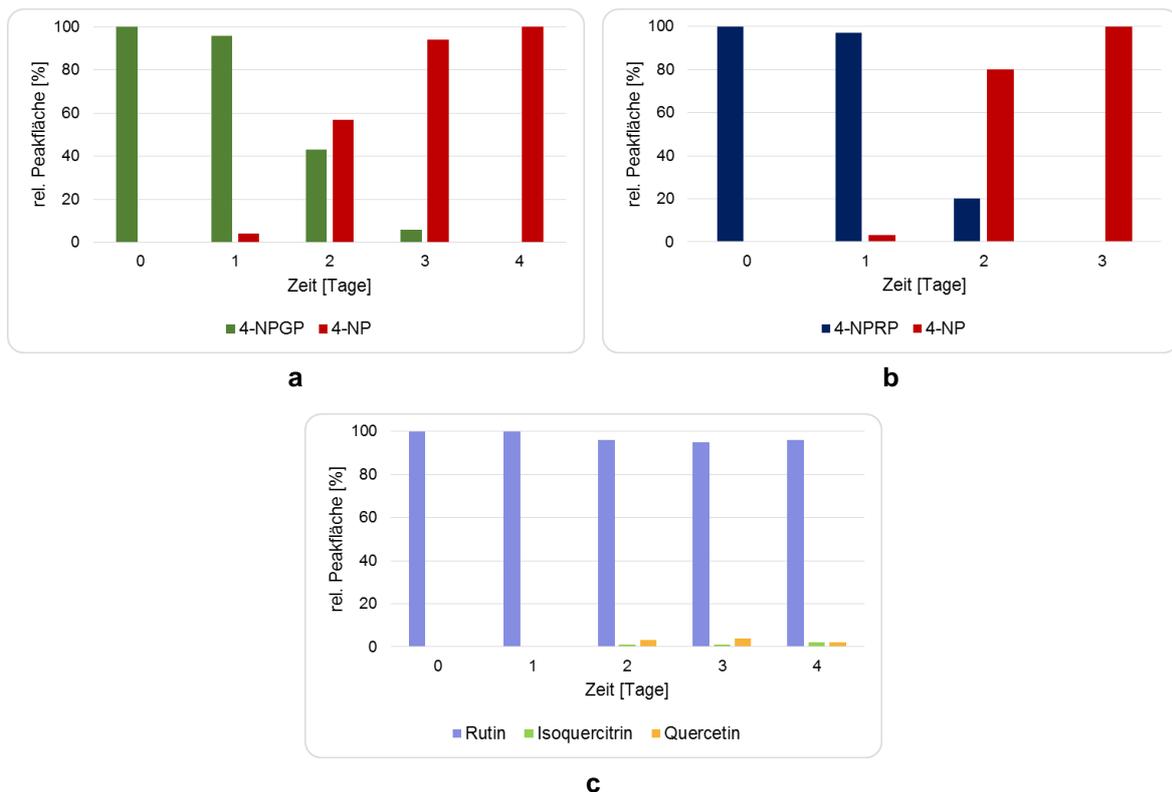


Abbildung 40: Enzymatische Aktivität des Lysats von *St. salivarius* ssp. *thermophiles*
a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP
b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP
c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Bei dem einzigen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *Streptococcus*-Stamm waren einen Tag nach Zugabe des Lysats 4%, nach zwei Tagen 57% und nach drei Tagen 94% des 4-NPGP zu 4-NP abgebaut (Abb. 40 a). Nach vier Tagen war die Reaktion vollständig abgelaufen.

In Abbildung 40 b ist ersichtlich, dass mittels des Abbaus von 4-NPRP zu 4-NP durch im Lysat von *St. salivarius* ssp. *thermophiles* vorhandene Enzyme eine Rhamnosidaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Einen Tag nach Beginn des

Versuchs lagen noch 97% 4-NPRP vor. Sein Anteil ging am Tag 2 auf 20% zurück und war am Tag 3 vollständig zu 4-NP abgebaut.

Rutin konnte durch Enzyme aus dem Lysat von *St. salivarius* ssp. *thermophiles* zu Isoquercitrin und Quercetin abgebaut werden (Abb. 40 c). Isoquercitrin konnte am zweiten Versuchstag detektiert werden, an dem sein Anteil bei 1% lag. Am Tag 3 blieb dessen Anteil konstant, wohingegen am Tag 4 ein Anstieg auf 2% verzeichnet werden konnte. Quercetin war ebenfalls ab dem zweiten Versuchstag mit einem Anteil von 3% nachweisbar. Dessen Anteil lag am Tag 3 bei 4% und ging am Tag 4 auf 2% zurück.

3.2.11 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*

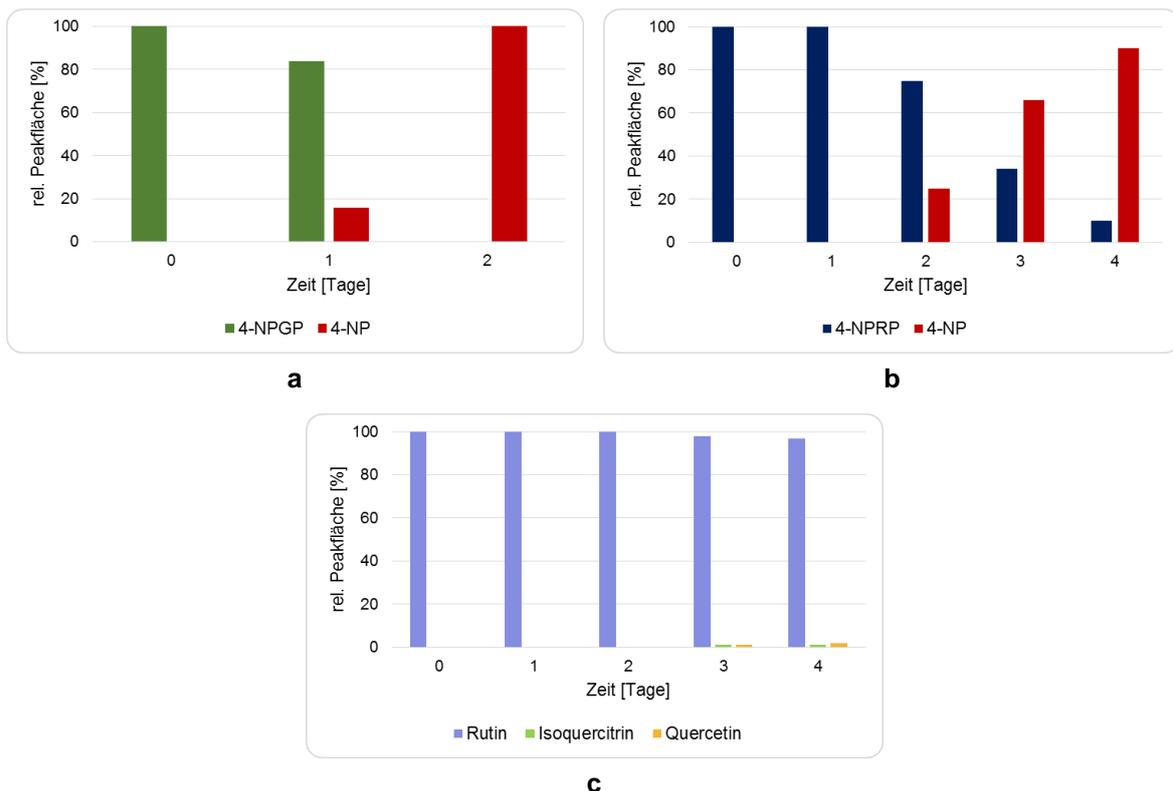


Abbildung 41: Enzymatische Aktivität des Lysats von *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*

a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP

b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP

c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Auch das Lysat dieses *Lactobacillus*-Stamms zeigte eine Glucosidaseaktivität (Abb. 41 a). Am ersten Tag nach Versuchsbeginn waren 16% 4-NPGP zu 4-NP umgesetzt worden, und am zweiten Tag war die Reaktion vollständig abgelaufen.

Eine Rhamnosidaseaktivität war im Lysat dieses *Lactobacillus*-Stamms ebenfalls gegeben (Abb. 41 b). Der Abbau von 4-NPRP setzte einen Tage nach Versuchsbeginn ein, wobei der Anteil von 4-NP am zweiten Tag der Messungen bei 25% lag. Im Vergleich zu den untersuchten Lysaten der anderen *Lactobacillus*-Stämmen konnten die Enzyme des Lysats von *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 4-NPRP nicht innerhalb von vier Tagen abbauen.

Trotz des langsameren Abbaus von 4-NPRP, konnte durch die Enzyme aus dem Lysat dieses Stamms Rutin abgebaut werden (Abb. 41 c). Es waren sowohl Isoquercitrin als auch Quercetin nachweisbar. Am zweiten Tag nach Versuchsbeginn lagen sowohl 1% Isoquercitrin als auch 1% Quercetin vor. Der Anteil des detektierten Isoquercitrin ging während des restlichen Versuchszeitraums über 1% nicht hinaus. Der Anteil von Quercetin betrug am Tag 3 ebenso noch 1% und stieg an Tag 4 auf 2%.

3.2.12 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*

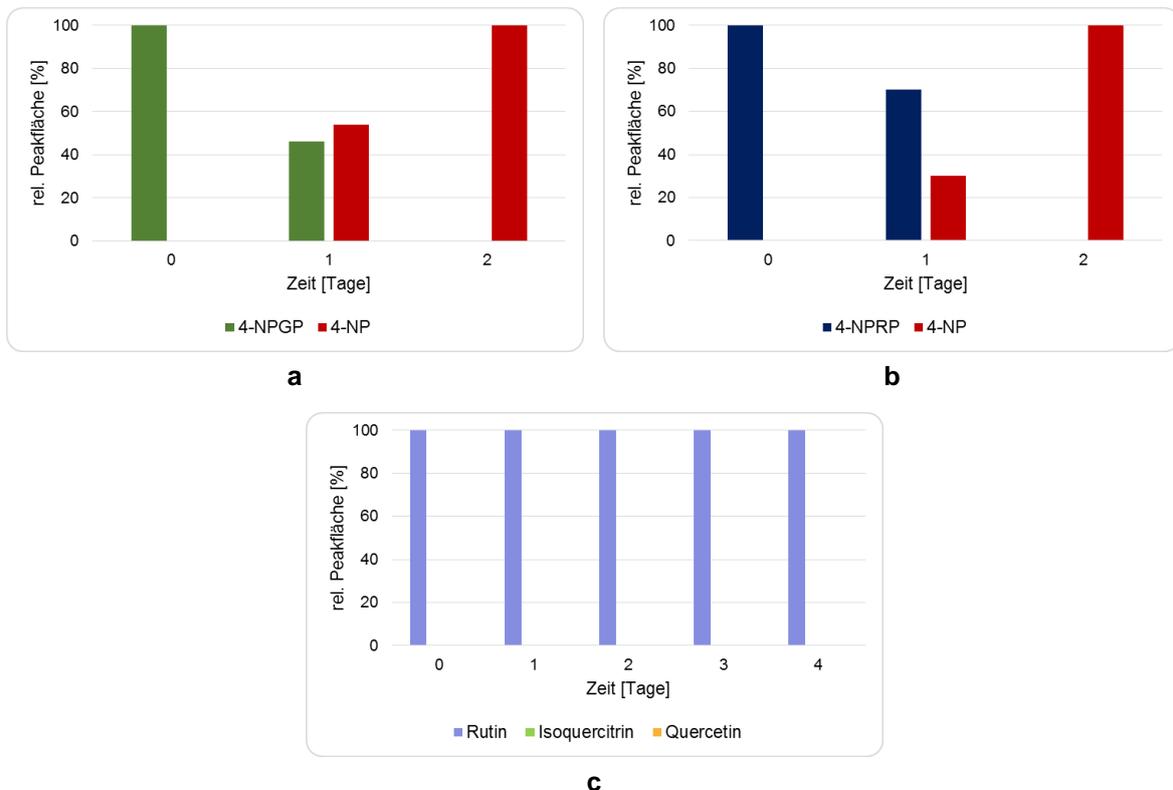


Abbildung 42: Enzymatische Aktivität des Lysats von *B. longum* ssp. *infantis*

a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP

b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP

c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Es trat auch bei der Verwendung des Lysats aus *B. longum* ssp. *infantis* ein Abbau von 4-NPGP ein, der auf eine Glucosidaseaktivität im Lysat schließen ließ (Abb. 42 a). Innerhalb von 24 Stunden war der Anteil von 4-NPGP auf 46% gesunken. Nach zwei Tagen war 4-NPGP vollständig abgebaut.

Verglichen mit den anderen untersuchten probiotischen Stämmen und in Anbetracht dessen, dass hier eine geringere Zelldichte eingesetzt werden konnte, zeigte das Lysat von *B. longum* ssp. *infantis* den schnellsten Abbau von 4-NPRP zu 4-NP (Abb. 42 b). Einen Tag nach Beginn des Versuchs waren 30% des 4-NPRP abgebaut und dieses nach Ablauf von 48 Stunden komplett zu 4-NP umgesetzt. Dies deutete auf eine hohe Rhamnosidaseaktivität des Lysats hin.

Trotz des Hinweises auf eine hohe Rhamnosidaseaktivität durch den raschen Abbau von 4-NPRP, konnte Rutin durch die Enzyme aus dem Lysat des *Bifidobacterium*-Stamms nicht abgebaut werden (Abb. 42 c).

3.2.13 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactococcus lactis* Sr 3.54

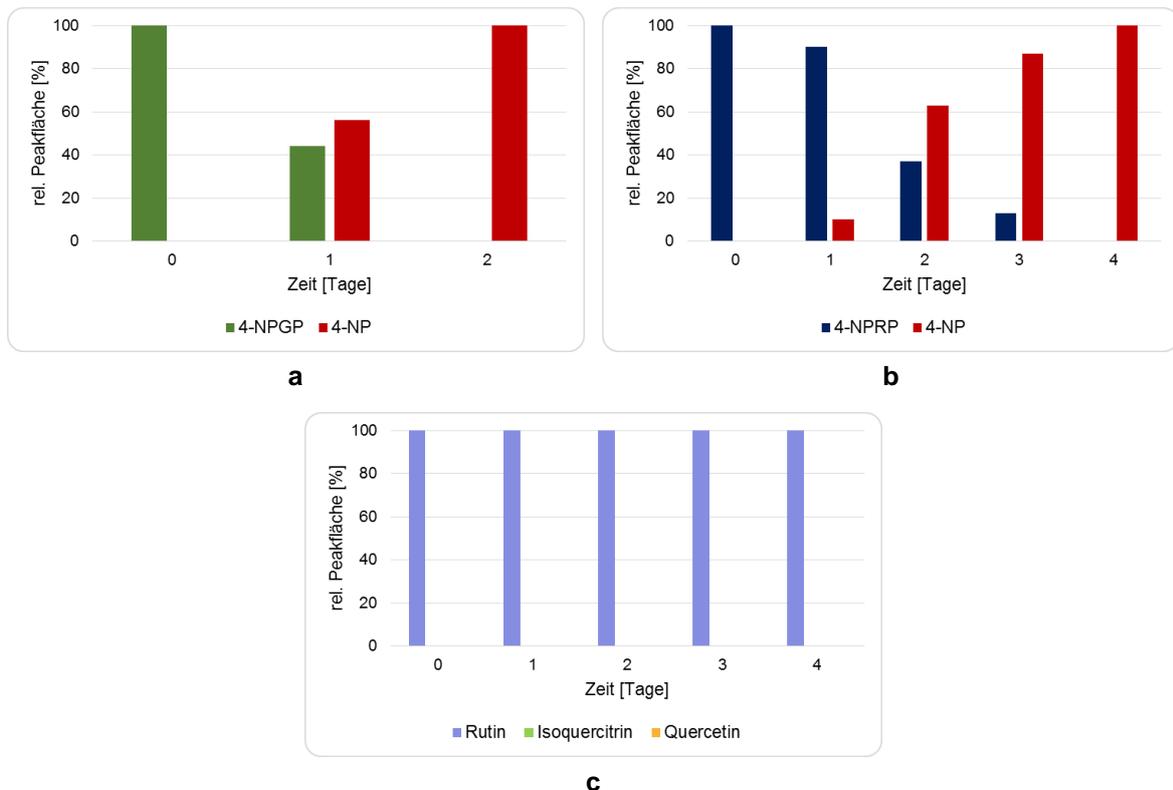


Abbildung 43: Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lc. lactis*
a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP
b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP
c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Durch den Abbau von 4-NPGP mittels der Enzyme aus dem Lysat von *Lc. lactis* war auch bei dem Lysat dieses Stamms eine Glucosidaseaktivität nachweisbar (Abb. 43 a). Am ersten Tag nach Beginn des Versuchs waren bereits 56% des Substrats zu 4-NP umgesetzt. Am zweiten Tag des Versuchs war der Abbau vollständig.

Auch eine Rhamnosidaseaktivität war im Lysat dieses Stamms nachweisbar (Abb. 43 b). Einen Tag nach Zugabe des Lysats waren noch 90% des 4-NPRP vorhanden. Am Tag 2 betrug der Anteil 37% und am Tag 3 13%. Am vierten Tag nach Versuchsbeginn war die Reaktion vollständig abgelaufen.

Rutin konnte durch die Enzyme aus dem Lysat allerdings nicht abgebaut werden (Abb. 43 c). Weder Isoquercitrin noch Quercetin war nachweisbar.

3.2.14 Enzymatische Aktivität des Lysats von *Lactobacillus brevis*

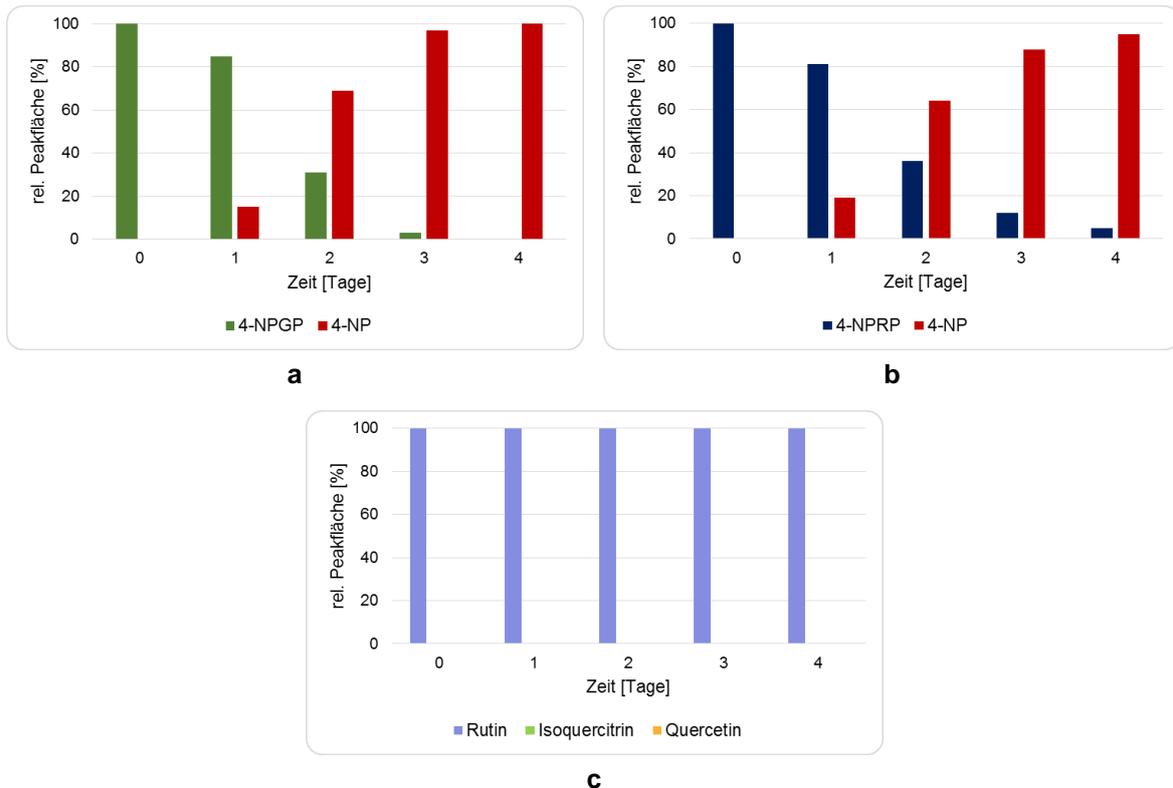


Abbildung 44: Enzymatische Aktivität des Lysats von *L. brevis*

a: Abbau von 4-NPGP zu 4-NP

b: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP

c: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin

Im Vergleich zu den anderen *Lactobacillus*-Stämmen war die Glucosidaseaktivität des Lysats aus *L. brevis* nicht so ausgeprägt (Abb. 44 a). Zwar setzte der Abbau innerhalb von 24 Stunden ein, dieser war aber erst nach vier Tagen abgeschlossen. Am ersten Tag nach Zugabe des Lysats lag der Anteil des verbliebenen 4-NPGP bei 85%, am Tag 2 bei 31% und am Tag 3 bei 3%. Am vierten Tag nach Versuchsbeginn war nur mehr 4-NP nachweisbar.

Wie in der Abbildung 44 b ersichtlich ist, setzte der Abbau von 4-NPRP zu 4-NP durch die Enzyme aus dem Lysat von *L. brevis* innerhalb von 24 Stunden ein. Nach Ablauf eines Tages waren 19% des 4-NPRP zu 4-NP umgesetzt. Am zweiten Tag betrug der Anteil von 4-NP 64%, am dritten Tag 88% und am vierten Tag 95%.

Trotz einer grundsätzlich durch den Abbau von 4-NPRP nachgewiesenen Rhamnosidaseaktivität des Lysats, konnte Rutin nicht abgebaut werden (Abb. 44 c).

3.2.15 Vergleich der enzymatischen Aktivität der Lysate

Es konnte gezeigt werden, dass die Methode des Zellaufschlusses, mit der das Lysat aus den Probiotika hergestellt wurde, grundsätzlich effektiv und schonend genug ist, sodass die Enzyme funktionstüchtig blieben. Um die Effektivität der Methode zu überprüfen, wurde dem Lysat jedes Stammes 4-NPGP zugesetzt. Die β -Glucosidase, die endständige β -D-Glucose abspaltet, ist unter Probiotika weit verbreitet und daher geeignet für einen Funktionsnachweis der Methode.

Alle Lysate der untersuchten Stämme zeigten eine hinreichende Glucosidaseaktivität, sodass das Substrat vollständig umgesetzt wurde. Mit Ausnahme der Enzyme aus den Lysaten von *L. fermentum* und *L. brevis*, die 4-NPGP innerhalb von drei beziehungsweise vier Tagen abbauten, konnten die Enzyme aus Lysaten der anderen *Lactobacillus*-Stämmen das Substrat innerhalb eines Tages oder innerhalb von zwei Tagen umsetzen. Die Enzyme aus dem Lysat von *Lc. lactis* sowie die aus den Lysaten der beiden *Bifidobacterium*-Stämme bauten 4-NPGP innerhalb von zwei Tagen zu 4-NP ab. Lediglich die Enzymaktivität des Lysats von *St. salivarius* ssp. *thermophiles* war geringer, sodass der Abbau von 4-NPGP vier Tage dauerte.

Alle im Rahmen dieser Arbeit aus den Bakterien gewonnenen Lysate zeigten eine Rhamnosidaseaktivität, die mittels des Abbaus von 4-NPRP zu 4-NP durch die in den Lysaten enthaltenen Enzymen nachgewiesen werden konnte. Durch den parallelen Ansatz von Blindproben, die zwar das jeweilige Substrat, aber kein Lysat enthielten, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich lediglich um eine unspezifische Zersetzung handelte. 4-NPGP, 4-NPRP und Rutin in den Blindproben waren über den Versuchszeitraum stabil. Somit ist davon auszugehen, dass es sich wirklich um einen enzymatischen Abbau handelt.

Durch die Enzymaktivität der Lysate durch neun der 14 untersuchten Stämme, konnte 4-NPRP innerhalb von drei Tagen abgebaut werden. Eine nicht so ausgeprägte Rhamnosidaseaktivität zeigte sich bei den Lysaten von *L. fermentum* und *Lc. lactis*, da der Abbau vier Tage dauerte. Bei zwei der gewonnenen Lysate, nämlich aus den Stämmen *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* und *L. brevis*, war die Enzymaktivität nicht ausgeprägt genug, um das Substrat innerhalb des Versuchszeitraums von vier Tagen abzubauen. Eine schnellere Umsetzung von 4-

NPRP fand durch die Enzyme aus dem Lysat von *B. longum* ssp. *infantis* statt, durch die die Umsetzung nach zwei Tagen abgeschlossen war.

Durch das Vorhandensein sowohl einer Glucosidase- als auch einer Rhamnosidaseaktivität der Lysate war davon auszugehen, dass beim Abbau von Rutin sowohl Isoquercitrin als auch Quercetin detektierbar sein würde.

Die Ergebnisse des Abbaus von Rutin lieferten ein uneinheitliches Bild. Obwohl bei allen aus den Bakterien gewonnenen Lysaten eine Rhamnosidaseaktivität nachweisbar war, konnte Rutin entweder in einem sehr geringen Ausmaß oder auch gar nicht abgebaut werden. Kein Abbau fand durch die Enzyme aus den Lysate von *Lc. lactis*, *L. brevis*, *B. animalis* ssp. *lactis* Bf3 und *B. longum* ssp. *infantis* statt.

Bei der Umsetzung mit den Enzymen aus allen anderen Probiotika-Lysaten war entweder Isoquercitrin und Quercetin oder nur Quercetin alleine nachweisbar. Isoquercitrin ließ sich meist nicht nachweisen, was darauf zurückzuführen ist, dass dieses durch die in den Lysaten vorhandene Glucosidaseaktivität rasch zu Quercetin abgebaut wurde. Die beste Ausbeute an Quercetin konnte durch die Enzyme aus dem Lysat von *L. reuteri* erzielt werden. Auffällig war, dass bei der Umsetzung durch Enzyme aus den Lysaten von *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1 und *L. rhamnosus* GG Quercetin am dritten Tag des Versuchs nachweisbar war, bei der folgenden Messung am Tag 4 aber nicht mehr. Bei den Umsetzungen mit den Enzymen aus den Lysaten von *L. acidophilus*, *L. paracasei* ssp. *paracasei* 2 und bei *L. fermentum* sank der Anteil an Quercetin vom Tag 3 auf Tag 4 ab.

Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand ist, dass Quercetin weiter metabolisiert wurde. Die Ringspaltung von Flavonoiden im Zuge der Metabolisierung durch Enzyme der Darmflora wurde beschrieben.^[34] Möglicherweise verfügen auch einige der verwendeten Probiotika über die erforderlichen Enzyme, um das Ringsystem der Flavonoide abzubauen.

Bei der Umsetzung von 4-NPGP zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zu jenen Lysaten, die aus Stämmen hergestellt wurden, die mit einer höheren OD₆₀₀ eingesetzt werden konnten. Die Enzyme aus dem Lysat von *St. salivarius* ssp. *thermophiles* und jene aus dem Lysat von *L. brevis* setzten 4-NPGP allerdings innerhalb von vier Tagen um. Die Enzymaktivität der Lysate von *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* und *L. brevis*, führte dazu, dass 4-NPRP nicht innerhalb der vier Tagen des Versuchszeitraums umgesetzt werden konnte. Die Enzyme aus den Lysate von

drei der Stämme mit niedrigerer Zelldichte (*B. longum* ssp. *infantis*, *Lc. lactis* und *L. brevis*) konnten Rutin nicht abbauen. Beim Abbau von Rutin durch Enzyme aus den Lysaten von *L. fermentum*, *St. salivarius* ssp. *thermophiles* und *L. bulgaricus* konnte sowohl Isoquercitrin als auch Quercetin detektiert werden.

3.3 Umsetzung des Polyphenolglykosids Rutin in einer Bakteriensuspension

Auf der Grundlage der vorangegangenen Versuche wurden drei Stämme ausgewählt, deren Enzymaktivität in den Lysaten im Vergleich zu den anderen eine höhere Rhamnosidaseaktivität zeigten, und bei denen ein Abbau von Rutin nachzuweisen war. Die ausgewählten Stämme wurden sowohl in MRS+ als auch in MRS- kultiviert. Durch diese Maßnahme sollte festgestellt werden, ob es möglich ist, durch das Entziehen einer für die Bakterien leicht zugänglichen Kohlenstoffquelle wie der Glucose eine Rhamnosidaseaktivität zu induzieren, da die Bakterien dazu genötigt wären, alternative Quellen - wie zum Beispiel Rutin - zu erschließen. Rutin wurde zugegeben und die Kultur für neun Tage anaerob kultiviert. Es wurden sowohl vor dem Kultivieren als auch an den Tagen 4 und 9 Proben entnommen.

Die Auswertung erfolgte wieder mittels HPLC. Nachfolgend ist exemplarisch der Abbau von Rutin durch *L. reuteri*, kultiviert in MRS-, dargestellt (Abb.45 a und b). Am neunten Tag nach Versuchsbeginn waren sowohl Isoquercitrin als auch Quercetin detektierbar, wodurch ein Abbau von Rutin nachgewiesen werden konnte.

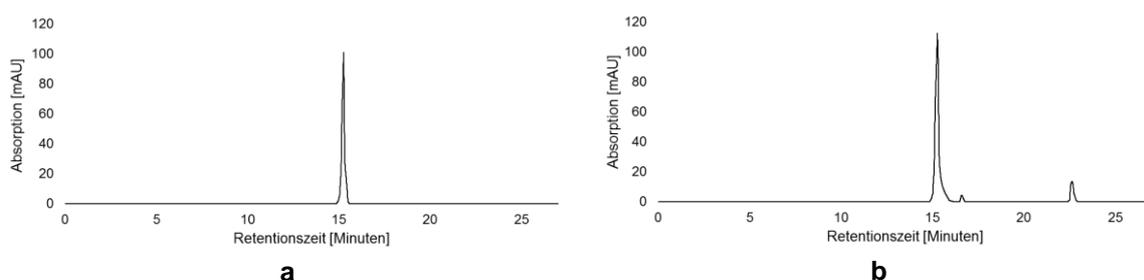


Abbildung 45: Abbau von Rutin durch *L. reuteri*, kultiviert in MRS-
a: Chromatogramm vor dem Abbau
b: Chromatogramm neun Tage nach Versuchsbeginn

3.3.1 Abbau von Rutin durch *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CRL431

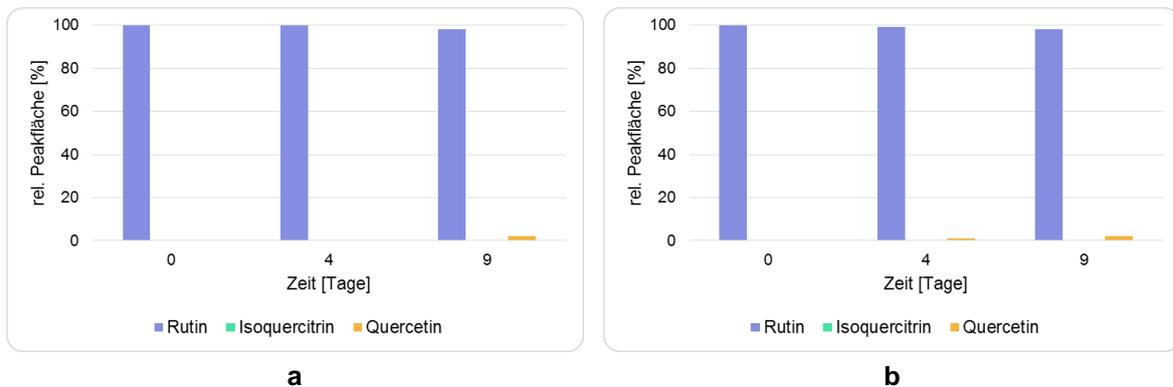


Abbildung 46: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin durch *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1
a: Kultivierung in MRS+
b: Kultivierung in MRS-

Wie in Abbildung 46 a ersichtlich ist, war am vierten Tag nach Beginn des Versuchs mit *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1, kultiviert in MRS+, ausschließlich Rutin in der Bakteriensuspension nachweisbar. Am Tag 9 betrug der Anteil von Quercetin 2%. Isoquercitrin war an keinem Analysetag nachweisbar.

Die Abbildung 46 b zeigt die Ergebnisse der Kultivierung von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 1 im glucosefreien Medium. Vier Tage nach Versuchsbeginn war 1% Quercetin vorhanden, am Tag 9 betrug der Anteil 2%. Somit entsprach dieser Prozentsatz demjenigen, der auch bei der Kultivierung des Stammes in MRS+ erreicht wurde. Isoquercitrin war an keinem Versuchstag nachweisbar.

3.3.2 Abbau von Rutin durch *Lactobacillus reuteri*

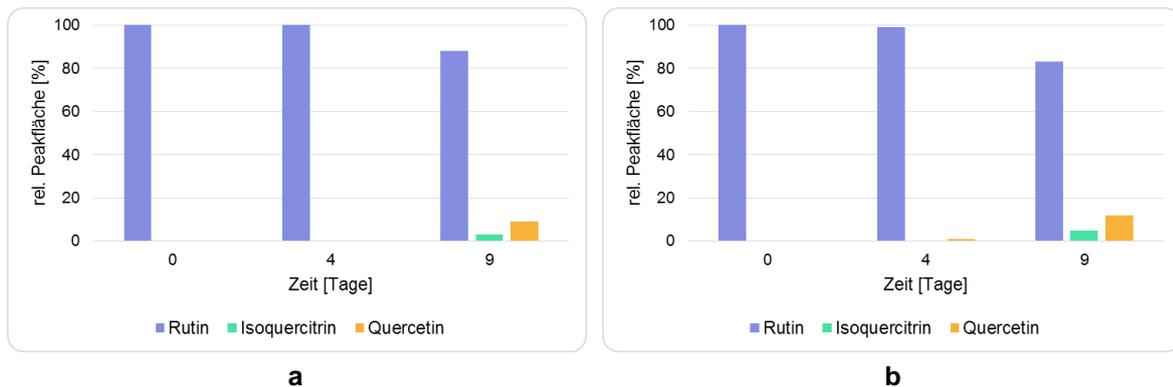


Abbildung 47: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin durch *L. reuteri*
a: Kultivierung in MRS+
b: Kultivierung in MRS-

Vier Tage nach Beginn der Kultivierung von *L. reuteri* in MRS+ war noch kein Abbau des Rutins zu erkennen (Abb. 47 a). Am Tag 9 waren 12% des Rutin abgebaut. Der Anteil an Isoquercitrin betrug 3%, jener von Quercetin 9%.

In Abbildung 47 b ist ersichtlich, dass *L. reuteri* auch bei der Kultivierung im MRS-Medium in der Lage war, Rutin abzubauen. Vier Tage nach Beginn des Versuchs lag ein Anteil von 1% Quercetin vor. Am Tag 9 war Rutin zu 17% abgebaut. Davon entfielen 5% auf Isoquercitrin und 12% auf Quercetin.

Im Vergleich zu der Kultur im MRS+ Medium konnte *L. reuteri* im glucosefreien Medium im selben Versuchszeitraum 5% mehr Rutin umsetzen.

3.3.3 Abbau von Rutin durch *Lactobacillus plantarum*

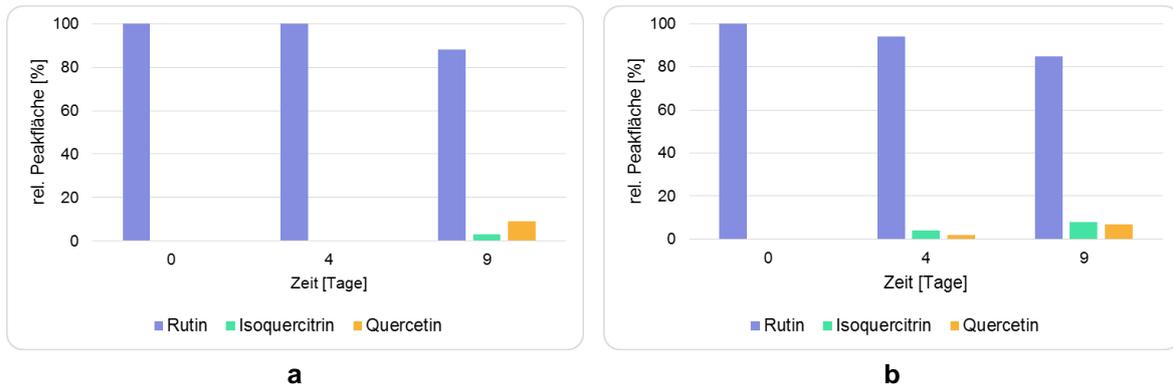


Abbildung 48: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin durch *L. plantarum*
a: Kultivierung in MRS+
b: Kultivierung in MRS-

Wie in der Abbildung 48 a zu erkennen ist, setzte der Abbau von Rutin durch *L. plantarum* erst nach der Messung am Tag 4 des Versuchs ein. Am Tag 9 war Rutin zu 12% abgebaut, wobei der Anteil an Isoquercitrin bei 3% und jener von Quercetin bei 9% lag.

Der Abbau von Rutin durch *L. plantarum* in MRS- ist in der Abbildung 48 b dargestellt. Am Tag 4 nach Versuchsbeginn war der Abbau von Rutin nachweisbar. Dieses war zu 6% abgebaut, wobei 4% Isoquercitrin und 2% Quercetin detektiert wurden. Am Tag 9 waren insgesamt 15% des Rutin abgebaut, wobei der Anteil von Isoquercitrin bei 8% und jener des Quercetins bei 7% lag.

3.3.4 Vergleich des Abbaus von Rutin in Bakteriensuspension

L. paracasei ssp. *paracasei* 1, *L. reuteri* und *L. plantarum* wurden für den Versuch des Abbaus von Rutin in Suspension ausgewählt, weil die aus den Bakterien gewonnenen Lysate eine Glucosidase- und Rhamnosidaseaktivität zeigten und die Enzyme aus den Lysaten in der Lage waren, Rutin abzubauen. Alle ausgewählten Stämme konnten Rutin - wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß - abbauen.

Vergleicht man den Abbau von Rutin im glucosehaltigen Medium durch die drei ausgewählten Stämme, zeigte sich, dass *L. reuteri* und *L. plantarum* vergleichbare Ergebnisse erzielten. Beide bauten innerhalb von neun Tagen 12% des Rutins ab,

wobei sowohl Isoquercitrin als auch Quercetin nachweisbar waren. Im Vergleich dazu baute *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1 in demselben Versuchszeitraum lediglich 2% des Rutins ab.

Bei der Betrachtung des Abbaus von Rutin im glucosefreien Medium war erkennbar, dass *L. reuteri* innerhalb von neun Tagen Rutin mit 17% am effektivsten abbauen konnte. *L. plantarum* konnte in diesem Zeitraum 15% des Rutins umsetzen und *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1 2%.

Zwei der ausgewählten Stämme - nämlich *L. reuteri* und *L. plantarum* - konnten im glucosefreien Medium mehr Rutin umsetzen als im glucosehaltigen Medium. Der effektivste Stamm *L. reuteri* konnte bei der Kultivierung in MRS- 5% mehr Rutin umsetzen als in MRS+. Durch *L. plantarum* konnten in MRS- 3% mehr Rutin umgesetzt werden.

4. Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war die Untersuchung ausgewählter Probiotika hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Enzyme zu bilden, die dazu in der Lage sind, Rutin abzubauen. Parallel wurden 14 probiotisch wirksame Bakterienstämme hinsichtlich ihrer α -Rhamnosidase- und ihrer β -Glucosidaseaktivität untersucht.

Rutin, das aus dem Aglykon Quercetin und dem Zucker Rutinose besteht, zählt zu jenen Polyphenolglykosiden, die vom Körper im Dünndarm nicht ausreichend resorbiert werden können. Polyphenolrutinoside sind nicht ohne weiteres verfügbar, da Rhamnose zwar durch Enzyme der Dickdarmflora gespalten werden kann, aber die Resorption im Dickdarm nicht in solchem Ausmaß gegeben ist wie im Dünndarm. Daher gibt es Bemühungen, die Rhamnose schon vorher abzuspalten und damit die Bioverfügbarkeit der Polyphenole zu erhöhen.

Polyphenolen wird eine Reihe positiver Eigenschaften zugeschrieben. Neben einer antiinflammatorischen und antimikrobiellen Wirkung wurden auch günstige Effekte auf das Blutlipidprofil und bei der Bekämpfung von Krebs beschrieben.

Es wurde eine α -L-Rhamnosidase aus rekombinanter Herstellung untersucht. Des Weiteren wurde eine Cellulase aus *Aspergillus niger* getestet, da bei diesem Produkt eine Rhamnosidase-Nebenaktivität vermutet wurde. Dabei wurde mittels einer Standardsubstanz, dem 4-Nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosid, und Rutin die katalytische Aktivität der Enzyme hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Abspaltung der Rhamnose untersucht.

Die rekombinante α -L-Rhamnosidase setzte sowohl 4-NPRP als auch Rutin vollständig um. Die Umsetzung von Rutin dauerte im Vergleich zu der Umsetzung von 4-NPRP um das Vierfache länger. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass Rutin im Vergleich zu 4-NPRP ein größeres Molekül ist, das sich möglicherweise nicht so gut in das katalytische Zentrum des Enzyms einfügt.

Das Enzymgemisch aus *Aspergillus niger* mit einer definierten Cellulase-Hauptaktivität zeigte eine Rhamnosidase-Nebenaktivität. Dies konnte durch den Abbau von 4-NPRP zu 4-NP belegt werden. Des Weiteren konnte sowohl Rhamnose von Rutin als auch Glucose von Isoquercitrin abgespalten werden, sodass das Aglykon Quercetin gebildet wurde.

Die Umsetzung verlief im Vergleich zu der Umsetzung durch die rekombinante α -L-Rhamnosidase langsamer, sodass sich die Frage nach der Effizienz stellt.

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bakterienstämme verfügten über eine Glucosidase- und eine Rhamnosidaseaktivität. Dies konnte durch die Enzymaktivität der aus den Bakterien gewonnenen Lysaten belegt werden. Die beiden Standardsubstanzen 4-NPGP und 4-NPRP konnten durch die im Lysat enthaltenen Enzyme abgebaut werden.

Durch die Enzymaktivität in acht der 14 untersuchten Lysate konnte Rutin geringfügig abgebaut werden und am Tag 4 waren neben Rutin noch Isoquercitrin bzw. Quercetin detektierbar. Bei den Versuchen mit *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1 und *L. rhamnosus* GG konnte am dritten Versuchstag jeweils ein geringer Anteil Quercetin detektiert werden, jedoch am vierten Versuchstag nicht mehr. Bei *L. acidophilus*, *L. paracasei* ssp. *paracasei* 2, *L. fermentum* und *St. salivarius* ssp. *thermophiles* sank der Anteil des detektierten Quercetins vom dritten auf den vierten Versuchstag ab. Dies könnte auf einen enzymatischen Abbau des Ringsystems hindeuten. Gar kein Abbau des Rutins war bei *B. animalis* ssp. *lactis* Bf3, *B. longum* ssp. *infantis*, *Lc. lactis* und *L. brevis* nachweisbar. Isoquercitrin konnte kaum nachgewiesen werden. Dies kann durch die weitere Metabolisierung zu Quercetin durch die vorhandene Glucosidaseaktivität erklärt werden.

Bei den Versuchen, bei denen die Bakterien in Anwesenheit von Rutin kultiviert wurden, konnte insgesamt ein stärkerer Abbau des Rutins beobachtet werden, der wohl auf den längeren Versuchszeitraum von neun Tagen zurückzuführen sein dürfte. Alle für diesen Versuch ausgewählten Stämme konnten Rutin - wenn auch in sehr unterschiedlichem Ausmaß - abbauen.

Sowohl bei der Verwendung der Enzyme aus den Lysaten der Bakterien zum Abbau von Rutin als auch bei dessen Abbau während der Kultivierung der Bakterien erwiesen sich die Stämme *L. plantarum* und *L. reuteri* als die effektivsten.

Bei dem Abbau von Rutin während der Kultivierung der Bakterien konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung im glucosefreien Medium zu einer etwas besseren Produktausbeute führte als die Umsetzung im glucosehaltigen Medium.

Daher wäre ein möglicher Ansatzpunkt für weitere Studien, zu versuchen, die Rhamnosidaseaktivität der Probiotika verstärkt durch Kultivierung in einem glucosefreien Nährmedium zu induzieren.

5. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

5.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Komponenten der HPLC-Anlage	23
Tabelle 2: Bedingungen der HPLC-Analyse.....	23
Tabelle 3: Zusammensetzung des Laufmittelgradienten	24
Tabelle 4: Retentionszeiten der Reinsubstanzen	25
Tabelle 5: Rezeptur des MRS-Mediums.....	27
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Probiotika und deren Abkürzungen ..	29
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Probiotika und die Abkürzungen	29
Tabelle 8: Übersicht über die für die Herstellung des Lysats eingesetzte Zelldichte, gemessen als OD ₆₀₀	38

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flavan ^[35]	5
Abbildung 2: Übersicht über die Grundkörper der Flavonoide ^[35]	6
Abbildung 3: Quercetin ^[35]	6
Abbildung 4: Isoquercitrin ^[35]	6
Abbildung 5: Rutin ^[35]	6
Abbildung 6: Rutinose: α -L-Rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose ^[37]	6
Abbildung 7: Metabolismus von Polyphenolglykosiden im Darm ^[34]	7
Abbildung 8: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin durch die α -L-Rhamnosidase	8
Abbildung 9: Herabsetzung der Aktivierungsenergie durch ein Enzym ^[43]	10
Abbildung 10: Umsetzung von 4-Nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosid zu 4-Nitrophenol und L-Rhamnose durch α -L-Rhamnosidase ^[49]	12
Abbildung 11: Abbau von Cellulose durch den Multienzymkomplex ^[56]	13
Abbildung 12: Schematische Darstellung von Silicage ^[61]	14
Abbildung 13: Kieselgel mit kovalent gebundenem Octadecylrest ^[64]	15
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Laufmittelgradienten.....	24
Abbildung 15: Vermessung von 4-NPGP mittels HPLC	25

Abbildung 16: Vermessung von 4-NPRP mittels HPLC.....	25
Abbildung 17: Vermessung von 4-NP mittels HPLC	26
Abbildung 18: Vermessung von Rutin mittels HPLC	26
Abbildung 19: Vermessung von Isoquercitrin mittels HPLC	26
Abbildung 20: Vermessung von Quercetin mittels HPLC	26
Abbildung 21: Abbau von 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid zu 4-Nitrophenol und β -D-Glucose mittels β -D-Glucosidase	31
Abbildung 22: Abbau von 4-NPRP zu 4-NP durch Cellulase.....	33
Abbildung 23: Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin mit Cellulase	34
Abbildung 24: Umsetzung von 4-NPRP zu 4-NP durch α -L-Rhamnosidase a : Verwendung von 1,67 U b : Verwendung von 0,167 U und 0,0167 U	35
Abbildung 25: Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin mit α -L-Rhamnosidase a : Verwendung von 1,67 U b : Verwendung von 0,167 U und 0,0167 U	35
Abbildung 26: Vergleich der Umsetzung von 4-NPRP zu 4-NP bei 37°C und 50°C	36
Abbildung 27: Vergleich der Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin bei 37°C und 50°C	37
Abbildung 28: Abbau von 4-NPGP durch Enzyme aus dem Lysat von <i>St. salivarius</i> <i>ssp. thermophiles</i> a : Chromatogramm vor dem Abbau b : Chromatogramm zwei Tage nach Versuchsbeginn c : Chromatogramm vier Tage nach Versuchsbeginn	39
Abbildung 29: Abbau von 4-NPRP durch Enzyme aus dem Lysat von <i>St. salivarius</i> <i>ssp. thermophiles</i> a : Chromatogramm vor dem Abbau b : Chromatogramm zwei Tag nach Versuchsbeginn c : Chromatogramm drei Tage nach Versuchsbeginn	39
Abbildung 30: Abbau von Rutin durch Enzyme aus dem Lysat von <i>St.</i> <i>thermophiles ssp. salivarius</i> a : Chromatogramm vor dem Abbau b : Chromatogramm vier Tage nach Versuchsbeginn	40
Abbildung 31: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>L. acidophilus</i> a : Abbau von 4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin	41
Abbildung 32: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>L. paracasei ssp. paracasei</i> 1 a : Abbau von 4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin	42

Abbildung 33: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	
2 a : Abbau von 4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von	
Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin	43
Abbildung 34: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	
3 a : Abbau von 4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von	
Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin	44
Abbildung 35: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>L. rhamnosus</i> GG a : Abbau	
von 4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von Rutin zu	
Isoquercitrin und Quercetin	45
Abbildung 36: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>L. plantarum</i> a : Abbau von 4-	
NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von Rutin zu	
Isoquercitrin und Quercetin	46
Abbildung 37: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>L. reuteri</i> a : Abbau von 4-	
NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von Rutin zu	
Isoquercitrin und Quercetin	47
Abbildung 38: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bf3	
a : Abbau von 4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von	
Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin	48
Abbildung 39: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>L. fermentum</i> a : Abbau von	
4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von Rutin zu	
Isoquercitrin und Quercetin	49
Abbildung 40: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>St. salivarius</i> ssp.	
<i>thermophiles</i> a : Abbau von 4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c :	
Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin	50
Abbildung 41: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	
a : Abbau von 4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von	
Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin	51
Abbildung 42: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> a :	
Abbau von 4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von Rutin	
zu Isoquercitrin und Quercetin.....	53
Abbildung 43: Enzymatische Aktivität des Lysats von <i>Lc. lactis</i> a : Abbau von 4-	
NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von Rutin zu	
Isoquercitrin und Quercetin	54

Abbildung 44: Enzymatische Aktivität des Lyssats von <i>L. brevis</i> a : Abbau von 4-NPGP zu 4-NP b : Abbau von 4-NPRP zu 4-NP c : Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin	55
Abbildung 45: Abbau von Rutin durch <i>L. reuteri</i> , kultiviert in MRS- a : Chromatogramm vor dem Abbau b : Chromatogramm neun Tage nach Versuchsbeginn	58
Abbildung 46: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin durch <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1 a : Kultivierung in MRS+ b : Kultivierung in MRS-	59
Abbildung 47: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin durch <i>L. reuteri</i> a : Kultivierung in MRS+ b : Kultivierung in MRS-	60
Abbildung 48: Abbau von Rutin zu Isoquercitrin und Quercetin durch <i>L. plantarum</i> a : Kultivierung in MRS+ b : Kultivierung in MRS-	61

6. Abkürzungsverzeichnis

4-NP	4-Nitrophenol
4-NPGP	4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid
4-NPRP	4-Nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosid
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
MRS+	de Man-Rogosa-Sharpe Medium mit Glucose
MRS-	de Man-Rogosa-Sharpe Medium ohne Glucose
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
U	Unit; Enzymmenge, welche 1 μ M Substanz in einer Minute unter definierten Bedingungen umsetzt
U/min	Umdrehungen pro Minute

7. Literaturverzeichnis

- [1] Munk, K. (Hg.) (2001) *Grundstudium Biologie. Mikrobiologie*. Berlin: Spektrum. S. 3-24; 11-26
- [2] Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A.M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti, G.V. (2011) *Probiotics and Health: An evidence-based review*. *Pharmacological Research*, 63 (5): 366-376
- [3] Li, D., Wang, P., Wang, P., Hu, X., Chen, F. (2016) *The gut microbiota: A treasure for human health*. *Biotechnology Advances*, 34 (8): 1210-1224
- [4] Holzapfel, W. H., Schillinger, U. (2002) *Introduction to pre- and probiotics*. *Food Research International*, 35 (2-3): 109-116
- [5] Bernalier-Donadille, A. (2010) *Fermentative metabolism by the human gut microbiota*. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34 (4, Suppl.1): S16-S22
- [6] Laparra, J.M., Sanz, Y. (2010) *Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals*. *Pharmacological Research*, 61 (3): 219-255
- [7] Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J. (1998) *Overview of gut flora and probiotics*. *International Journal of Food Microbiology*, 41 (2): 85-101
- [8] Quigley, E. M. M. (2013) *Gut Bacteria in Health and Disease*. *Gastroenterology & Hepatology*, 9 (9): 560-569
- [9] Kumar, M., Nagpal, R., Hemalatha, R., Yadav, H., Marotta, F. (2016) *Probiotics and Prebiotics for Promoting Health: Through Gut Microbiota*. In: Watson, R.R. (Ed.), Preedy, V.R. (Ed.) *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics - Bioactive Foods in Health Promotion*. Amsterdam: Elsevier. S. 76-78

- [10] Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Arés, I., Martínez, A.M. (2016) *Prebiotics and Probiotics: An Assessment of Their Safety and Health Benefits*. In: Watson, R.R. (Ed.), Preedy, V.R. (Ed.) *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics - Bioactive Foods in Health Promotion*. Amsterdam: Elsevier. S. 10
- [11] Do Vos, P. (Ed.) , Garrity, G.M. (Ed.), Jones D. (Ed.), Krieg, N.R. (Ed.), Ludwig, W. (Ed.), Rainey, F.A. (Ed.), Schleifer, K.-H. (Ed.) (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3: Firmicutes. 2. Auflage. Berlin: Springer. S. 465, 624, 655, 711
- [12] Whitman, W. (Ed.), Goodfellow, M. (Ed.), Kämpfer, P. (Ed.), Busse, H.-J. (Ed.), Trujillo, M. (Ed.), Ludwig, W. (Ed.), Suzuki, K.-I. (Ed.), Parte, A. (Ed.) 2012) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 5: The Actinobacteria, Part A. 2. Auflage. Berlin: Springer. S. 171
- [13] Fuchs, G., Schlegel, H.G. (2007) *Allgemeine Mikrobiologie*. 8. Auflage. Stuttgart: Thieme. S. 353-356
- [14] O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F., Quigley, E.M.M. (2005) *Lactobacillus and Bifidobacterium in Irritable Bowel Syndrome: Symptom Responses and Relationship to Cytokine Profiles*. *Gastroenterology*, 128 (3): 541-551
- [15] Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., Chadee, K. (2007) *The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells*. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver*, 292 (1): G315-G322
- [16] Shehata, M.G., El Sohaimy, S.A., El-Sahn, M.A., Youssef, M.M. (2016) *Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity*. *Annals of Agricultural Science*, 61 (1): 65-75

- [17] Kaur, I.P., Chopra, K., Amarpreet, S. (2002) *Probiotics: potential pharmaceutical applications*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 15 (1): 1-9
- [18] Bordalo Tonucci, L., Olbrich dos Santos, K.M. (2015) *Clinical applications of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Clinical Nutrition, 36 (1): 85-92
- [19] Belguesmia, Y., Domenger, D., Caron, J., Dhulster, P., Ravallec, R., Drider, D., Cudennec, B. (2016) *Novel probiotic evidence of lactobacilli on immunomodulation and regulation of satiety hormones release in intestinal cells*. Journal of Functional Foods 24: 276-286
- [20] Tien, M.-T., Girardin, S.E., Gegnault, B., Le Bourhis, L., Dillies, M.-A., Coppée, J.-Y., Bourdet-Sicard, R., Sansonetti, P.J., Pédrón, T. (2006) *Anti-Inflammatory Effect of Lactobacillus casei on Shigella-Infected Human Intestinal Epithelial Cells*. The Journal of Immunology, 176 (2): 1228-1237
- [21] Saxami, G., Karapetsas, A., Lamprianidou, E., Kotsianidis, I., Chlichlia, A., Tassou, C., Zoumpourlis, V., Galanis, A. (2016) *Two potential probiotic lactobacillus strains isolated from olive microbiota exhibit adhesion and anti-proliferative effects in cancer cell lines*. Journal of Functional Foods, 24: 461-471
- [22] Roberfroid, M. (2007) *Prebiotics: The Concept Revisited*. Journal of Nutrition, 137 (3): 830-837
- [23] Quigley, E.M.M. (2010): *Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota*. Pharmaceutical Research, 61 (3): 213-218
- [24] Ambalam, P., Raman, M., Purama, R.K., Doble, M. (2016) *Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 30 (1): 119-131

- [25] Tsao, R. (2010) *Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols*. *Nutrients*, 2 (12): 1231-1246
- [26] Lattanzio, V., Kroon, P.A., Quideau S., Treutter, D. (2008) *Plant Polyphenols - Secondary Metabolites with Diverse Functions*. In: Daayf, F. (Ed.), Lattanzio, V. (Ed.) *Recent Advances in Polyphenol Research*. Volume 1. Hoboken: Wiley-Blackwell. S. 2-3
- [27] Parisi, O.I., Puoci, F., Restucci, D., Farina G., Iemma, F., Picci, N. (2014) *Polyphenols and Their Formulations: Different Strategies to Overcome the Drawback Associated with Their poor Stability and Bioavailability*. In: Watson, R.R. (Ed.), Preedy, V.R. (Ed.) *Polyphenols in Human Health and Disease*. Amsterdam: Elsevier. S. 29
- [28] Zern, T.L., Fernandez, M.L. (2005) *Cardioprotective Effects of Dietary Polyphenols*. *Journal of Nutrition*, 135 (11): 2291-2294
- [29] Nichols, J.A., Katiyar, S.K. (2010) *Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA-repair mechanisms*. *Archives of Dermatological Research*, 302 (2): 71-83
- [30] Ramos, S. (2008) *Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52 (5): 507-526
- [31] Coimbra, S., Santos-Silva, A., Rocha-Pereira, P., Rocha, S., Castro, E. (2006) *Green tea consumption improves plasma lipid profiles in adults*. *Nutrition Research*, 26 (11): 604-607
- [32] Pasinetti, G.M., Wang, J., Ho, L., Zhao, W., Dubner, L. (2015) *Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852 (6): 1202-1208

- [33] Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002) *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. Journal of Nutritional Biochemistry 13 (10): 572-584
- [34] Hänsel, R. (Hg.), Sticher, O. (Hg.) (2010) *Pharmakognosie. Phytopharmazie*. 9. Auflage. Berlin: Springer. S.1098, 1099, 1105, 1121
- [35] Teuscher, E., Melzig, M.F., Lindequist, U. (2012) *Biogene Arzneimittel – Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie*. 7. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. S. 299-318
- [36] Andersen, Ø. M., Markham, K.R. (2006) *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton: CRC Press. S. 749-753
- [37] Amaretti, A., Raimondi, S., Leonardi, A., Quartieri, A., Rossi, M. (2015) *Hydrolysis of the Rutinose-Conjugates Flavonoids Rutin and Hesperidin by the Gut Microbiota and Bifidobacteria*. Nutrients 7 (4): 2788-2800
- [38] Barron, D. (2008) *Recent Advances in the Chemical Synthesis and Biological Activity of Phenolic Metabolites*. In: Daayf, F. (Ed.), Lattanzio, V. (Ed.) *Recent Advances in Polyphenol Research*. Volume 1. Hoboken: Wiley-Blackwell. S. 319-320
- [39] Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C.G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., Mena, P., Del Rio, D., Crozier, A. (2014) *Bioavailability, bioactivity and impact on health in dietary flavonoids and related compounds: an update*. Archives of Toxicology, 88 (10): 1803-1853
- [40] Marín, L., Miguélez, E.M., Villar, C.L., Lombó, F. (2015) *Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties*. BioMed Research International, 2015: 1-19
- [41] Melo Branco de Araújo, M.E., Moreira Franco, Y.E., Grando Alberto, T., Alves Sobreiro, M., Conrado, M.A., Gonçalves Priolli, D., Frankland Sawaya, A.C.H., Ruiz,

A.L.T.G., Ernesto de Carvalho, J., de Oliveira Varvalho, P. (2013) *Enzymatic deglycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities*. Food Chemistry, 141 (1): 266-273

[42] López de Lacey, A.M., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M.E., Montero, P. (2014) *Biotransformation and resulting biological properties of green tea polyphenols produced by probiotic bacteria*. LWT – Food Science and Technology, 58 (2): 633-638

[43] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. (2013) *Brock Mikrobiologie*. 13. Auflage. München: Pearson. S. 118-120, 128, 183-184

[44] Bisswanger, H. (2015) *Enzyme: Struktur, Kinetik und Anwendungen*. Hoboken: Wiley-Blackwell. S. 13, 28-29, 47

[45] Müller-Esterl, W. (2011) *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 2. Auflage. Berlin: Spektrum. S. 63, 69, 138, 142

[46] BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System

<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.40>

[Zugriff am 3.11.2016]

[47] Ávila, M., Jaquet, M., Moine, D., Requena, T., Peláez, C., Arigoni, F., Jankovic, I. (2009) *Physiological and biochemical characterization of the two α -L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245*. Microbiology, 155 (8): 2739-2749

[48] Monti, D., Pišvejcová, A., Křen, V., Lama, M., Riva, S. (2004) *Generation of an α -L-Rhamnosidase Library and its Application for the Selective Derhamnosylation of Natural Products*. Biotechnology and Bioengineering, 87 (6): 763-771

[49] Yadav, V., Yadav, P.K., Yadav, S., Yadav, K.D.S. (2010) *α -L-Rhamnosidase: A review*. Process Biochemistry, 45 (8): 1226-1235

- [50] Schwarz, W.H. (2001) *The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria*. Applied Microbiology and Technology, 56 (5-6): 634-649
- [51] Antranikian, G. (Hg.) (2006) *Angewandte Mikrobiologie*. Berlin: Springer. S 144-145
- [52] BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System
<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.4>
[Zugriff am 21.11.2016]
- [53] Sukumaran, R., Singhanian, R.R., Pandey, A. (2005) *Microbial cellulose – Production, applications and challenges*. Journal of Scientific & Industrial Research, 64 (11): 832-844
- [54] Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., White, B.A. (2008) *Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis*. Nature Reviews Microbiology, 6 (2): 121-131
- [55] Davison, A., Blaxter, M. (2005) *Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes*. Molecular Biology and Evolution, 22 (5): 1273-1284
- [56] Keshk, S.M.A.S. (2016) *Cellulase Application in Enzymatic Hydrolysis of Biomass*. In: Gupta, V. (Ed.) *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Amsterdam: Elsevier. S. 187-191
- [57] Liu, W., Huang, W., Sun, W., Zhu, Y., Ni, J. (2010) *Production of diosgenin from yellow ginger (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) saponins by commercial cellulase*. World Journal of Microbiology and Technology, 26 (7): 1171-1180
- [58] Meyer, V.R. (2004) *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 9. Auflage. Hoboken: Wiley-Blackwell. S. 10, 15, 160-162

[59] Dr. Kromidas, S. *HPLC für Neueinsteiger*

<http://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/HPLCfuerNeueinsteiger.pdf>

[Zugriff am 18.10.2016]

[60] Gey, M.H. (2015) *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*. 3. Auflage. Berlin: Springer. S. 121, 128

[61] Harris, D.C. (2014) *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. 8. Auflage. Berlin: Springer. S. 616-619, 672-682

[62] Sigma-Aldrich

[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/c9422enz.pdf)

[aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/c9422enz.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/c9422enz.pdf) [Zugriff am 17.05.2015]

[63] Megazyme

https://secure.megazyme.com/files/Booklet/E-RHAMS_DATA.pdf

[Zugriff am 22.04.2015]

[64] Atlas M.R. (2010) *Handbook of Microbiological Media*. Fourth Edition. Boca Raton: CRC Press. S. 1233

[65] You, H.J., Ahn, H.J., Ji, G.E. (2010) *Transformation of Rutin to Antiproliferative Quercetin-3-glucoside by Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (20): 10886-10892