



MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Verhalten von ausgewählten Saponinen im Ames Test

verfasst von

Julia Rath, Bakk.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften UG2002

Betreut von:

Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die kompetente und hilfsbereite Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit am Institut für Ernährungswissenschaften.

Bei Dr. Christine Mölzer möchte ich mich gerne für die Laboreinschulung sowie für die Unterstützung bei diversen technischen Problemen bedanken.

Ein großer Dank gilt auch meiner Laborkollegin Mag. Michaela Kreuml für die Herstellung der Proben und die tolle Zusammenarbeit während der vielen Stunden im Labor.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben dieses Studium zu absolvieren. Meiner Schwester Anna, meinem Freund Peter sowie all meinen Freunden für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe bei diversen Schwierigkeiten und Problemen sowie für die vielen motivierenden Worte im Laufe der Zeit ein riesiges Dankeschön!

Herzlichen Dank für alles!

1 Inhaltsverzeichnis

2	Tabellenverzeichnis.....	V
3	Abbildungsverzeichnis.....	VII
4	Abkürzungsverzeichnis.....	IX
5	Einführung	1
6	Literatur	3
6.1	Saponine.....	3
6.1.1	Definition	3
6.1.1.1	Sekundäre Pflanzenstoffe.....	3
6.1.2	Chemische Struktur.....	4
6.1.3	Vorkommen	5
6.1.4	Eigenschaften von Saponinen.....	6
6.1.4.1	Physikochemische Eigenschaften	6
6.1.4.2	Biologische Aktivität.....	7
6.1.5	Ernährungsphysiologie.....	8
6.1.6	Verwendete Substanzen	8
6.1.6.1	Diosgenin.....	8
6.1.6.2	Digitonin.....	8
6.1.6.3	Escin (Aescin).....	9
6.1.6.4	Hederacosid C	10
6.1.6.5	Alpha-Solanin	10
6.1.6.6	Oleanolsäure	11
6.2	Ames Test.....	12
6.2.1	Allgemeines.....	12
6.2.2	Geschichte	12
6.2.3	Prinzip	12

6.2.4	Teststämme – Salmonella Typhimurium	13
6.2.4.1	Genotypen	13
6.2.4.1.1	rfa-Mutation	13
6.2.4.1.2	uvrB-Mutation	13
6.2.4.2	Merkmale der Salmonella Typhimurium Stämme	14
6.2.5	Metabolische Aktivierung	15
6.2.5.1	Oxidativer Metabolismus	15
6.2.5.2	Reduktiver Metabolismus	15
6.2.6	Positiv- und Negativkontrolle	15
6.2.6.1	Positivkontrolle	16
6.2.6.2	Negativkontrolle	16
7	Ames Test und Saponine	18
8	Material und Methoden	19
8.1	Grundlagen Ames Test	19
8.2	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	19
8.3	Vorbereitungen für den Ames Test	21
8.3.1	Minimum Glucose Agar	21
8.3.1.1	Vogel-Bonner Lösung	21
8.3.1.2	Glucose Lösung (40 %)	21
8.3.2	Top Agar (TA)	22
8.3.2.1	Histidin-Biotin Lösung	22
8.3.3	Master Plates Agar (MP)	22
8.3.3.1	Ampicillin Lösung	23
8.3.3.2	Tetracyclin Lösung	23
8.3.3.3	Histidin/Biotin Lösung	24
8.3.4	Nutrient Broth und Overnight culture	24

8.3.5	S9-Mix	25
8.3.5.1	Glucose-6-Phosphat Lösung (304 mg/ml)	25
8.3.5.2	NADP Lösung	25
8.3.5.3	MgCl ₂ /KCl Lösung	26
8.3.6	Verwendete Positiv- und Negativkontrollen	26
8.3.7	Probenvorbereitung	26
8.4	Genetische Analyse	29
8.5	Experimentelles Design	30
8.5.1	Pipettierschema	32
8.5.2	Präinkubationstest	32
8.5.3	Verwendete Geräte	33
8.5.4	Auszählen der Kolonien	34
8.6	Statistik	35
8.6.1	Statistische Auswertung	35
8.6.2	Nicht-Statistische Auswertung	35
9	Ergebnisse und Diskussion	37
9.1	Testergebnisse	38
9.1.1	Testergebnisse TA 98_ohne S9	38
9.1.2	Testergebnisse TA 98_mit S9	44
9.1.3	Testergebnisse TA 102_ohne S9	51
9.1.4	Testergebnisse TA 102_mit S9	57
10	Conclusio	63
11	Zusammenfassung	67
12	Summary	68
13	Referenzen	69
14	Anhang	72

14.1	Testergebnisse TA 98_ohne S9	72
14.2	Testergebnisse TA 98_mit S9.....	74
14.3	Testergebnisse TA 102_ohne S9	75
14.4	Testergebnisse TA 102_mit S9.....	77
15	Lebenslauf.....	79

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auszug biologischer Aktivitäten aus in-vitro Studien [modifiziert nach: ÖZLEM und MAZZA, 2007]	7
Tabelle 2: Genotypen der Salmonellen Teststämme [modifiziert nach: MÖLZER, 2007]	14
Tabelle 3: Standard Mutagene der Salmonella Teststämme [modifiziert nach: MORTELMANS und ZEIGER, 2000]	16
Tabelle 4: Spontanrevertanten der Salmonella Teststämme [modifiziert nach: MORTELMANS und ZEIGER, 2000]	17
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	20
Tabelle 6: Zugabe Antibiotikallösung MP	22
Tabelle 7: Antibiotikallösungen für OVNC	24
Tabelle 8: Verwendete Positivkontrollen	26
Tabelle 9: Einzelstammlösungen	27
Tabelle 10: Einzellösungen	28
Tabelle 11: Verwendete Konzentrationen für die Tests	28
Tabelle 12: Pipettierschema der Genetischen Analyse	29
Tabelle 13: Vorbereitungen für Ames Test	31
Tabelle 14: Pipettierschema für alle Tests	32
Tabelle 15: Verwendete Geräte	33
Tabelle 16: Ergebnisse Diosgenin TA 98_ohne S9	39
Tabelle 17: Ergebnisse Escin TA 98_ohne S9	39
Tabelle 18: Ergebnisse alpha-Solanin TA 98_ohne S9	40
Tabelle 19: Ergebnisse Hederacosid C TA 98_ohne S9	40
Tabelle 20: Ergebnisse Digitonin TA 98_ohne S9	41
Tabelle 21: Ergebnisse Oleanolsäure TA 98_ohne S9	41
Tabelle 22: Ergebnisse Diosgenin TA 98_mit S9	45
Tabelle 23: Ergebnisse Escin TA 98_mit S9	45
Tabelle 24: Ergebnisse alpha-Solanin TA 98_mit S9	46
Tabelle 25: Ergebnisse Hederacosid C TA 98_mit S9	46
Tabelle 26: Ergebnisse Digitonin TA 98_mit S9	47

Tabelle 27: Ergebnisse Oleanolsäure TA 98_mit S9	47
Tabelle 28: Ergebnisse Diosgenin TA 102_ohne S9	51
Tabelle 29: Ergebnisse Escin TA 102_ohne S9.....	52
Tabelle 30: Ergebnisse alpha-Solanin TA 102_ohne S9	52
Tabelle 31: Ergebnisse Hederacosid C TA 102_ohne S9.....	53
Tabelle 32: Ergebnisse Digitonin TA 102_ohne S9	53
Tabelle 33: Ergebnisse Oleanolsäure TA 102_ohne S9	54
Tabelle 34: Ergebnisse Diosgenin TA 102_mit S9.....	57
Tabelle 35: Ergebnisse Escin TA 102_mit S9.....	58
Tabelle 36: Ergebnisse alpha-Solanin TA 102_mit S9.....	58
Tabelle 37: Ergebnisse Hederacosid C TA 102_mit S9	59
Tabelle 38: Ergebnisse Digitonin TA 102_mit S9.....	59
Tabelle 39: Ergebnisse Oleanolsäure TA 102_mit S9	60

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln von Steroid- und Triterpen-Sapogeninen [modifiziert nach: SPARG et al., 2004].....	4
Abbildung 2: Strukturformel Diosgenin [AUGUSTIN et al., 2011].....	8
Abbildung 3: Strukturformel Digitonin [EID et al., 2012]	9
Abbildung 4: Strukturformel Escin [ZHOU et al., 2009]	9
Abbildung 5: Strukturformel Hederacosid C [BÖTTGER et al., 2012]	10
Abbildung 6: Strukturformel alpha-Solanin [LANGKILDE et al., 2012]	11
Abbildung 7: Strukturformel Oleanolsäure [POLLIER und GOOSSENS, 2012] ..	11
Abbildung 8: Negativkontrolle TA 98.....	17
Abbildung 9: Gießen des Minimum Glucose Agars.....	21
Abbildung 10: Masterplates TA 98 und TA 102	23
Abbildung 11: OVNC nach der Inkubation	25
Abbildung 12: OVNC vor der Inkubation	25
Abbildung 13: Durchführungsschritte AMES Test.....	31
Abbildung 14: Laminar flow.....	33
Abbildung 15: Auszählen der Platten	34
Abbildung 16: Ergebnisse TA 98_ohne S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin	43
Abbildung 17: Ergebnisse TA 98_ohne S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure.....	44
Abbildung 18: Ergebnisse TA 98_mit S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin	48
Abbildung 19: Ergebnisse TA 98_mit S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure.....	49
Abbildung 20: Ergebnisse TA 102_ohne S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin	55
Abbildung 21: Ergebnisse TA 102 ohne S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure.....	56
Abbildung 22: Ergebnisse TA 102_mit S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin	61

Abbildung 23: Ergebnisse TA 102_mit S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure.....	62
---	----

4 Abkürzungsverzeichnis

2-AA	2-Aminoanthracen
ADI	Acceptable daily intake
DMSO	Dimethylsulfoxid
GA	Genetische Analyse
HCl	Salzsäure
his⁺	Histidin unabhängig
KCl	Kaliumchlorid
LM	Lösungsmittel
MeOH	Methanol
MP	Master plates
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamid Adenindinucleotid Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Nutrient broth
NOEL	No-observed-effect-Level
NPD	4-nitro-o-phenyldiamin
OVNC	Overnight culture
S9	Rattenleberhomogenat
TA	Top Agar
TA 102	Histidin auxotropher Salmonella Typhimurium Teststamm 102
TA 98	Histidin auxotropher Salmonella Typhimurium Teststamm 98

5 Einführung

Saponine sind in Pflanzen vorkommende Glykoside, die zu den sekundären Pflanzenstoffen zählen und eine Vielzahl an physikalisch-chemischen sowie auch physiologischen Eigenschaften aufweisen. Einsatz finden diese in der Phytotherapie bis hin zur kosmetischen Industrie.

Im Pflanzenreich sind sie weit verbreitet und sind demnach auch in einigen Lebensmitteln zu finden. Zu den wichtigsten Nahrungsquellen zählen: Leguminosen, Hafer und Alliumarten. Saponine weisen eine Vielzahl an biologischen Aktivitäten auf. Die physiologische Wirkung von Saponinen hängt mit der individuellen chemischen Struktur der einzelnen Verbindungen zusammen, weshalb für diese Stoffgruppe auch keine allgemeine Aussage getroffen werden kann.

Einige Saponine können bei Insekten, Weichtieren und Fischen toxisch wirken. Die Toxizität von Saponinen bei Warmblütlern ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Studien weisen darauf hin, dass einige Saponine mutagene Wirkungen entfalten können. Die Identifizierung von Mutagenen ist ein wichtiger Teil im Safety Assessment geworden, da diese beispielsweise zu Fertilitätsstörungen führen und auch die Ursache von Krebserkrankungen sein können.

Ein beliebtes Testverfahren für die Erforschung mutagener Eigenschaften ist der Ames-Test. Dabei handelt es sich um einen Kurzzeit-Bakterien Rückmutationstest. Über die Austestung von Saponinen im Ames-Test gibt es momentan nur sehr wenige aussagekräftige Studien.

Ziel der vorliegenden in-vitro Studie war daher, das mutagene beziehungsweise oxidative Potential sechs verschiedener Saponine (Diosgenin, Escin, alpha-Solanin, Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure) mittels Ames-Test zu untersuchen. Diese sechs Substanzen wurden ausgewählt, da diese zur Zeit auch im Rahmen einer Dissertation von Frau Mag. Kreuml mittels LC/MS-MS in Oberflächengewässern und vereinzelt auch in Abwässern untersucht werden.

Angewendet wurde dafür der Präinkubationstest mit und ohne metabolischer Aktivierung. Die Tests wurden mit den Salmonella Typhimurium Stämmen TA 98 und TA 102 durchgeführt. Es wurden sechs verschiedene Konzentrationen getestet, wobei zwei davon etwas höher gewählt wurden, um die Ergebnisse auch in höheren Konzentrationsbereichen abzusichern.

6 Literatur

6.1 Saponine

Der Name „Saponin“ leitet sich vom lateinischen Wort „sapo“ für „Seife“ ab, da diese Substanzen in wässrigen Lösungen eine starke Schaumbildung - wie Seifen - aufzeigen [VINCKEN et al., 2007].

Viele Saponine besitzen pharmakologische Eigenschaften und werden daher auch in der Phytotherapie und in der kosmetischen Industrie eingesetzt [SPARG et al., 2004].

6.1.1 Definition

„Saponine sind in Pflanzen vorkommende Glykoside, die wegen ihrer physikalisch-chemischen sowie physiologischen Eigenschaften in einer Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe zusammengefasst werden“ [WATZL, 2001].

6.1.1.1 Sekundäre Pflanzenstoffe

Sekundäre Pflanzenstoffe bestehen aus einer Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher Verbindungen, welche die Pflanze beispielsweise als Abwehrstoffe gegen Schädlingsbefall oder diverser Krankheiten bildet. Sie werden auch als Wachstumsregulatoren und als Farbstoffe von der Pflanze synthetisiert. Merkmale sekundärer Pflanzenstoffe sind, dass diese nur in geringen Mengen und in bestimmten Pflanzen vorkommen [WATZL und LEITZMANN, 1999]. Im menschlichen Körper können sie pharmakologische Wirkung ausüben [ELMADFA, 2004].

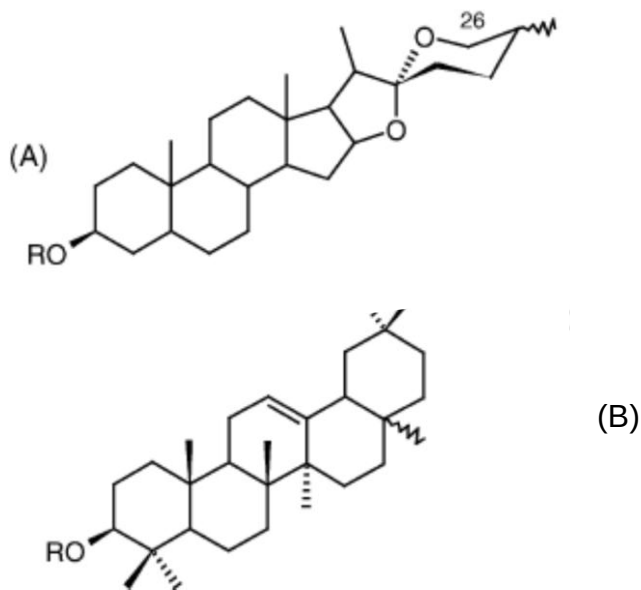
6.1.2 Chemische Struktur

Saponine zählen zu den Glykosiden. Das Aglykon – „Nichtzucker-Teil“ – des Saponinmoleküls wird auch als Sapogenin oder Genin bezeichnet. Abhängig von der Zusammensetzung des Sapogenins, erfolgt die Unterteilung der Saponine in die drei folgenden Gruppen:

- Triterpen-Glykoside
- Steroid-Glykoside
- Steroid-Alkaloid-Glykoside

[HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]

In Abbildung 1 ist die Grundstruktur der Sapogenine ersichtlich.



(A) Steroid-Grundgerüst (Spirostan)

(B) Triterpen-Grundgerüst

R= Zuckerrest

Abbildung 1: Strukturformeln von Steroid- und Triterpen-Sapogeninen [modifiziert nach: SPARG et al., 2004]

Die Mehrzahl der Saponine besitzt Triterpenstruktur [WATZL, 2001]. Die Unterscheidung einzelner Saponine erfolgt durch deren polycyclischen Grundkörper, das Hydroxylierungsmuster sowie auch die Anzahl und Position der Zuckerreste [NUHN und LUDGES, 2006]. Anhand der Menge an Zuckerketten, die direkt am Sapogenin gebunden sind, werden diese in Mono-, Bi- oder Tridesmoside unterteilt. Bei Monodesmosiden ist der Zuckerrest über die C3-Position an das Aglykon gebunden. Bidesmoside enthalten zwei Zuckerreste, welche über die C3- und C28-Position gebunden sind [ÖZLEM und MAZZA, 2007]. Tridesmoside beinhalten drei Zuckerreste, diese Verbindungen kommen allerdings sehr selten vor [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

Zu den am häufigsten vorkommenden Monosacchariden zählen die D-Glucose, D-Galactose, D-Glucuronsäure, D-Galacturonsäure, L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Xylose und D-Fucose [ÖZLEM und MAZZA, 2007]. Durch die Anwesenheit polarer und unpolarer Gruppen besitzen Saponine amphiphile Eigenschaften die sie befähigen, sowohl mit lipophilen als auch mit hydrophilen Strukturen Wechselwirkungen einzugehen [BÖTTGER et al., 2012].

6.1.3 Vorkommen

Saponine sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Ihr Vorkommen ist in mehr als 100 Pflanzengattungen bekannt, sowie auch in einigen Meeresressourcen wie beispielsweise dem Seestern und der Seegurke [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]. Steroidsaponine kommen meist in Monokotyledonen wie Agavaceae, Dioscoreaceae und Liliaceae vor. Im Gegensatz dazu findet man Triterpenoidsaponine überwiegend in Dikotyledonen, zu denen unter anderem die Familien der Leguminosae, Araliaceae und Caryophyllaceae zählen. Zu den wichtigsten Nahrungsquellen, in denen Saponine enthalten sind gehören: Leguminosen (Kidney-, Mung- und Sojabohnen, Bohnen, Erdnüsse, Kichererbsen, Linsen), Hafer und Alliumarten wie Lauch und Knoblauch. Spargel, Tee, Spinat, Zuckerrübe und Yam dienen ebenso als Saponinquelle.

Daneben finden sich Saponine auch in der Seifenbaumrinde, Bockshornklee, Luzerne, Rosskastanien, Süßholz, Seifenkraut und auch Ginseng. Deren Einsatz erfolgt meist bei gesundheitlichen- und industriellen Anwendungen. Eine einzige Pflanzengattung kann eine komplexe Mischung von Saponinen enthalten. Der Saponingehalt der Pflanzen wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Die Pflanzenart, genetische Herkunft, ökologische und agronomische Faktoren sowie auch Lagerung und Verarbeitung nach der Ernte spielen dabei eine große Rolle [ÖZLEM und MAZZA, 2007].

Über den Saponingehalt in Lebensmitteln gibt es derzeit jedoch nur wenige Zahlen, da es in der Analytik immer wieder zu technischen Schwierigkeiten kommt. Allerdings kann der Gehalt an Saponinen durch eine entsprechende Verarbeitung reduziert werden. Beispielsweise gehen bis zu 10 % der Saponine beim Einweichen ins Wasser über. Werden saponinhaltige Lebensmittel gekocht, kann der Gehalt zusätzlich um bis zu 50 % reduziert werden [WATZL, 2001].

6.1.4 Eigenschaften von Saponinen

Die strukturelle Komplexität der Saponine ist verantwortlich für eine Reihe von physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften.

6.1.4.1 Physikochemische Eigenschaften

Durch die Anwesenheit des fettlöslichen Aglykons und der wasserlöslichen Zuckerreste in der Struktur zählen Saponine zu den oberflächenaktiven Verbindungen, welche spülmittel-, netzmittel- und emulgatorenartige Eigenschaften aufweisen. Deshalb werden sie in der Industrie unter anderem als Schaumbildner eingesetzt.

6.1.4.2 Biologische Aktivität

Es steht eine Vielzahl an biologischen Aktivitäten von Saponinen in Diskussion, allerdings handelt es sich hierbei um Daten beziehungsweise Ergebnisse die vorwiegend aus in-vitro Studien stammen. In Tabelle 1 befindet sich ein kleiner Auszug davon.

Tabelle 1: Auszug biologischer Aktivitäten aus in-vitro Studien [modifiziert nach: ÖZLEM und MAZZA, 2007]

Biologische Aktivitäten
antiallergisch
antifungal
entzündungshemmend
antimikrobiell
antimutagen
antioxidativ

Bei Parasiten wie Insekten und Würmern sowie Weichtieren und Fischen können Saponine toxisch wirken. Die Toxizität von Saponinen bei Warmblütlern ist abhängig von der Art der Verabreichung, der Herkunft, wie auch der Zusammensetzung und Konzentration der Saponinmischung. Während Saponine ihre volle toxische Wirkung entfalten, wenn sie intravenös verabreicht werden, ist dieser Effekt bei oraler Verabreichung deutlich geringer. Dies beruht auf ihrer geringen Absorptionsrate sowie der stark reduzierten hämolytischen Aktivität in Gegenwart von Plasmabestandteilen. Ergebnisse von in-vivo Studien an Ratten, Mäusen und Hasen zeigen, dass Saponine vom Verdauungstrakt nicht in die Blutbahn absorbiert werden, jedoch durch eine enzymatische Reaktion zu Sapogeninen hydrolysiert werden. Eine Humanstudie über die Bioverfügbarkeit von Sojasaponinen zeigte, dass diese eine geringe Resorbierbarkeit in menschlichen Darmzellen hatten [ÖZLEM und MAZZA, 2007].

6.1.5 Ernährungsphysiologie

Die physiologischen Wirkungen der Saponine werden mit der individuellen chemischen Struktur der einzelnen Verbindungen in Zusammenhang gebracht. Somit kann für diese Stoffgruppe, keine allgemeine Aussage getroffen werden. Saponine besitzen eine geringe Bioverfügbarkeit, dadurch ist die physiologische Wirkung vor allem auf den Magen-Darm-Trakt beschränkt [WATZL, 2001].

6.1.6 Verwendete Substanzen

6.1.6.1 Diosgenin

Diosgenin, ein Steroidsapogenin, ist im Rhizoma Dioscoreae Nipponicae, Yams und Bockshornklee enthalten. In der pharmazeutischen Industrie findet es vor allem als Rohmaterial für die Herstellung von Steroidhormonen Verwendung (Abbildung 2) [MU et al., 2012].

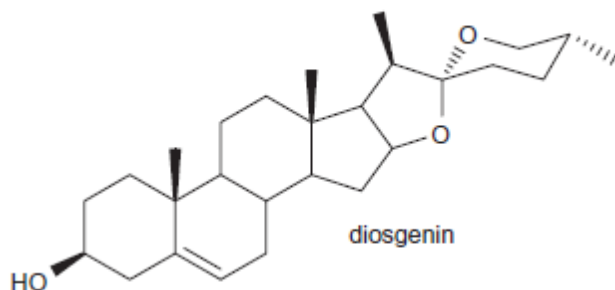


Abbildung 2: Strukturformel Diosgenin [AUGUSTIN et al., 2011]

6.1.6.2 Digitonin

Digitonin (Abbildung 3) zählt ebenfalls zu den Steroidsaponinen und kommt in Arten der Gattung Digitalis vor. Darüber hinaus weist Digitonin zytotoxische Wirkungen auf. Es kann die Aufnahme und somit die Bioverfügbarkeit von polaren zytotoxischen Substanzen in die Zellen erleichtern. Darüber hinaus

könnte es die Aktivität von ABC-Transportern hemmen und dadurch den Transport von zytotoxischen Substanzen aus den Zellen behindern. Digitonin besitzt die Fähigkeit Apoptose zu induzieren [EID et al., 2012].

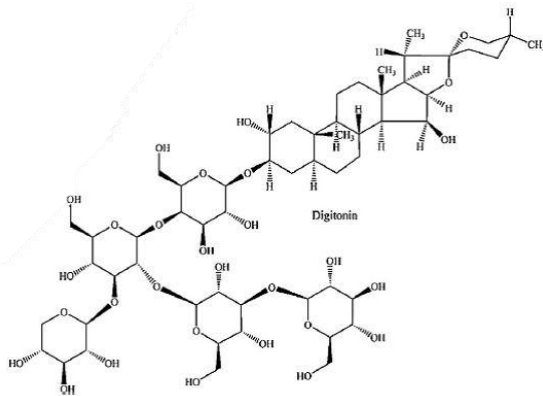


Abbildung 3: Strukturformel Digitonin [EID et al., 2012]

6.1.6.3 Escin (Aescin)

Escin (Abbildung 4) zählt zu den Triterpensaponinen [NUHN und LUDGES, 2006]. Es ist der wichtigste Wirkstoff aus *Aesculus hippocastanum* – dem Roskastanienbaum. Dieser gehört der Pflanzengattung Hippocastanaceae an und ist auf der ganzen Welt weit verbreitet [SIRTORI, 2001].

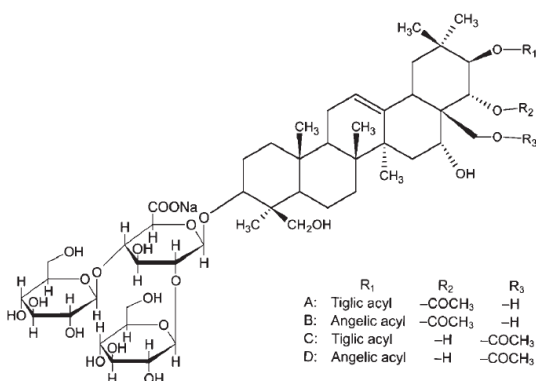


Abbildung 4: Strukturformel Escin [ZHOU et al., 2009]

6.1.6.4 Hederacosid C

Auch diese Verbindung gehört der Gruppe der Triterpensaponinen an. Dabei handelt es sich um eine Komponente des Saponingemisches der Gattung Efeu (Hedera) [NUHN und LUDGES, 2006]. In den Efeublättern zählt Hederacosid C (Abbildung 5) zu den toxischen Verbindungen [GAILLARD et al., 2003].

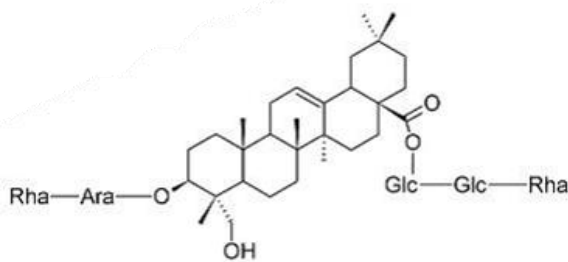


Abbildung 5: Strukturformel Hederacosid C [BÖTTGER et al., 2012]

6.1.6.5 Alpha-Solanin

Alpha-Solanin (Abbildung 6) zählt zu den Steroidalkaloidsaponinen und kommt in Pflanzen der Gattung Solanaceae vor. Solanaceae produzieren von Natur aus Toxine, eines davon ist das α -Solanin. Die natürlichen Toxine werden von der Pflanze benötigt um sich vor Insekten und mikrobiellen Schädlingen zu verteidigen [LANGKILDE et al., 2012]. α -Solanin kommt in Früchten, Sprossen und den Knollen der Kartoffelpflanze vor. Die Gehalte an Glykosidalkaloiden in Nahrungspflanzen liegen zwischen 0,2 – 1 mg/kg, manche Sorten und Teile einer Pflanze können diesen Gehalt allerdings überschreiten. Beispielsweise enthalten unreife Tomaten 90 – 320 mg/kg und reife Tomaten maximal 7 mg Solanin/kg. Der Gehalt von geschälten Kartoffeln kann bis zu 100 mg/kg betragen. Eine zu hohe Zufuhr kann zu Magenbeschwerden, Brennen im Hals, Erbrechen, Nierenreizungen und auch Hämolyse führen. Die letale Dosis liegt bei 400 mg. Bisher sind auf nationaler und auch internationaler Ebene keine Grenzwerte festgelegt. Von der JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) wird derzeit ein Gehalt von 100 mg/kg als “machbar”

angesehen. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden noch kein ADI-beziehungsweise NOEL-Wert festgelegt [BALTES und MATISSEK, 2011].

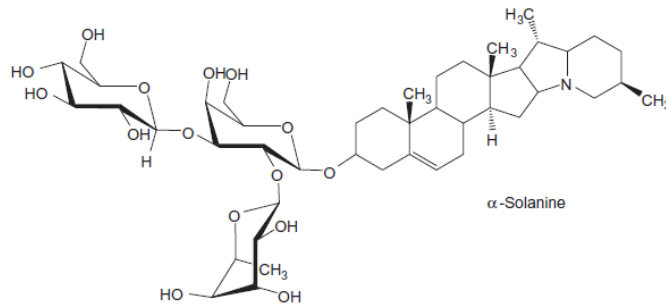


Abbildung 6: Strukturformel alpha-Solanin [LANGKILDE et al., 2012]

6.1.6.6 Oleanolsäure

Oleanolsäure (3 β -hydroxylen-12-en-28-oic acid) ist eine biologisch aktive pentacyclische Triterpenoid-Komponente, welche von mehr als 1620 Pflanzenspezies isoliert werden konnte. Die Verbindung kommt meist in Pflanzen vor, die zur Familie der Oleaceae gehören, wozu auch die Oliven gezählt werden [POLLIER und GOOSSENS, 2012]. Die Darstellung der Oleanolsäure erfolgt in Abbildung 7.

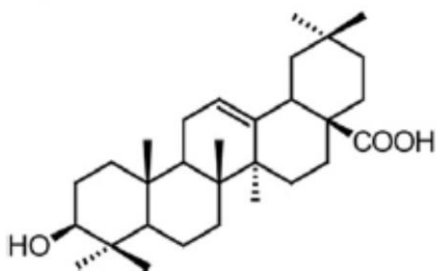


Abbildung 7: Strukturformel Oleanolsäure [POLLIER und GOOSSENS, 2012]

6.2 Ames Test

6.2.1 Allgemeines

Mutagene Substanzen können zu Fertilitätsproblemen oder Erbkrankheiten führen und des Weiteren auch die Ursache von Krebserkrankungen sein. Dadurch ist deren Identifikation zu einem wichtigen Ziel im Safety Assessment geworden [MORTELMANS und ZEIGER, 2000]. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurde der Ames Test häufig eingesetzt, um das mutagene Potential von vielen unterschiedlichen Substanzen zu prüfen [GEE et al., 1994].

6.2.2 Geschichte

1964 wurde der Ames Test von Bruce Ames entwickelt, als dieser verschiedene Mutanten von Salmonella Typhimurium Stämmen fand, die nicht fähig waren die Aminosäure Histidin zu bilden und somit nicht in der Lage waren Kolonien aufzubauen. Nach Zugabe einer mutagenen Substanz revertierten die Bakterien zu ihrem „Wildtyp“ zurück, dadurch kam auch die Bezeichnung „reversion assay“ zustande. Innerhalb des Testverfahrens wurden die unterschiedlichsten Teststämme verwendet, um Mutationen im Histidin-Operon zu differenzieren.

Durch Ames et al. kam es 1973 zur Entwicklung des quantitativ besseren Standard-Platten-Inkorporations-Test, welcher den Spot-Test ersetzte [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

6.2.3 Prinzip

Beim Ames Test – auch als salmonella/microsome mutagenicity assay bezeichnet – handelt es sich um einen Kurzzeit-Bakterien Rückmutationstest.

Bei allen in diesem Testverfahren verwendeten Salmonella Typhimurium Bakterien handelt es sich um Histidin-Mangelmutanten, welche nicht auf

histidinfreien Nährmedien wachsen können. Der Einfluss mutagener Substanzen kann jedoch zu einer Rückmutation führen, welche es den Bakterien ermöglichen die Aminosäure Histidin wieder zu synthetisieren. Dadurch werden Histidin-Revertanten (his+) Kolonien gebildet welche auf histidinfreiem Medium wachsen können [MORTELMANS und ZEIGER, 2000]. Die Anzahl der gebildeten Kolonien ist ein direktes Maß für das mutagene Potential der Testverbindung [GEE et al., 1994].

6.2.4 Teststämme – Salmonella Typhimurium

6.2.4.1 Genotypen

Beim Ames Test werden eine Vielzahl unterschiedlichster Salmonellenstämme, die die Aminosäure Histidin benötigen, verwendet. Wobei jeder Stamm eine andere Art der Mutation im Histidin-Operon aufweist. Neben der genetischen Histidinabhängigkeit enthalten die Teststämme auch andere Mutationen [MARON und AMES, 1984].

6.2.4.1.1 rfa-Mutation

Diese Art von Mutation führt bei allen Teststämmen zu defekten Lipopolysaccharid Zellwänden. Daraufhin sind die Bakterienstämme permeabel für Chemikalien, die unter normalen Bedingungen die Zellwand nicht durchdringen können [AMES et al., 1973].

6.2.4.1.2 uvrB-Mutation

Die uvrB-bio Mutation betrifft den DNA-Reparatur-Mechanismus. Dabei wird der korrekte Reparaturmechanismus ausgeschaltet, wodurch mehr DNA-Schäden durch den fehleranfälligen Mechanismus repariert werden. Durch die Löschung

des Biotin-Gens, wird das Bakterium biotinabhängig [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

6.2.4.2 Merkmale der Salmonella Typhimurium Stämme

Der Salmonellenstamm TA 98 weist eine hisD3052 Mutation auf. Dabei handelt es sich um eine Frameshift-Mutation in der DNA-Sequenz –C-G-C-G-C-G-C-G-.

Die Umkehrung von der hisD3052 Mutation zum Wild-Typ kann mittels Frameshift Mutagenen wie beispielsweise 2-Nitrofluoren oder aromatischen Nitroso-Derivaten induziert werden. Im Gegensatz zum TA 98 Stamm, welcher die Basenpaare GC besitzt, verfügt der Bakterienstamm TA 102 über die Basenpaare AT an der hisG428 Stelle. Die Mutation des Stammes TA 102 findet am Plasmid pAQ1 statt, dadurch besteht die Möglichkeit zur Histidinabhängigkeit zu revertieren [MORTELMANS und ZEIGER, 2000]. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der Genotypen.

Tabelle 2: Genotypen der Salmonellen Teststämme [modifiziert nach: MÖLZER, 2007]

Mutation	Bio chID uvrB gal	LPS defekt	Plasmid	
TA 98 His D3052	Deletion mutation	Rfa	pKM101(Ampicillin Resistenz)	
TA 102 His G428	Wild type	rfa	pKM101, (Tetracyclin Resistenz)	pAQ1

6.2.5 Metabolische Aktivierung

6.2.5.1 Oxidativer Metabolismus

Einige kanzerogene Substanzen, wie zum Beispiel Aromatische Amine oder polyzyklische aromatische Kohlenstoffe, werden erst durch Metabolisierung in ihre aktiven Formen umgewandelt. Davor sind diese Verbindungen biologisch inaktiv. Metabolische Oxidationen laufen meist über das Cytochrom P450 System ab, welches sich vor allem in der Leber im menschlichen Organismus befindet. Bakterien fehlt ein solches Oxidationssystem, deshalb wird zusätzlich ein exogenes Aktivierungssystem – von Nagetieren - im Test verwendet. Bezeichnet wird dieses als S9-Mix, ein Rattenleberhomogenat mit Oxidaseenzymen unterschiedlichster Funktionen.

6.2.5.2 Reduktiver Metabolismus

Für Chemikalien, welche Azo- und Diazoverbindungen enthalten, kann das metabolische Aktivierungssystem auch aus reduktiven Enzymsystemen bestehen. Die Durchführung der Reduktion von chemischen Substanzen erfolgt bei Menschen und Säugetieren in der anaeroben Intestinalflora sowie durch Reduktasen der Darmwand und der Leber. In vitro gibt es zwei Arten von Metabolisierungssystemen: bei ersterer wird ein Leberhomogenat mit FMN ergänzt, die Zweite beruht auf der Herstellung aus der intestinalen Rattenmikroflora [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

6.2.6 Positiv- und Negativkontrolle

Jeder Test soll eine Negativ- sowie auch eine Positivkontrolle beinhalten.

6.2.6.1 Positivkontrolle

In Tabelle 3 befindet sich eine Auflistung der Mutagene, welche für die jeweiligen Bakterienstämme Verwendung finden.

Tabelle 3: Standard Mutagene der Salmonella Teststämme [modifiziert nach: MORTELMANS und ZEIGER, 2000]

Bakterien- stamm	Kontrollchemikalie (µg/Platte)	
	Ohne S9	Mit S9
TA 98	4-Nitro-o-phenylenediamine (2,5)	2-Aminoanthracene (1-5)
TA 102	Mitomycin C (0,5)	2-Aminoanthracene (1-5)

Als Positivkontrolle werden Chemikalien beziehungsweise bekannte Mutagene verwendet, damit die im Ames Test getesteten Substanzen mit diesen verglichen werden können. Damit die richtige Konzentration festgelegt werden kann, wird die Positivkontrolle in Vortests über einen weiten Konzentrationsbereich getestet. Der höchste Wert oder die höchste Konzentration wird entweder durch einen beliebigen Wert – welcher in etwa viermal höher ist als der der Negativkontrolle – oder durch die Löslichkeit begrenzt. Außerdem müssen die Vortests sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit des Stoffwechselaktivierungssystems durchgeführt werden. Zwei oder drei Platten sollten für jede Dosierung sowie auch für die Positiv- und Negativkontrolle eingesetzt werden [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

6.2.6.2 Negativkontrolle

Jeder Teststamm weist eine spontane Mutationsrate auf, welche für ihn charakteristisch ist. Tages- beziehungsweise Laborabhängig kann es zu einer

Variation in der Anzahl von spontanen Revertantenkolonien kommen [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

Die nachfolgende Tabelle 4 zeigt die Anzahl von Spontanrevertanten der einzelnen Salmonella Teststämme.

Tabelle 4: Spontanrevertanten der Salmonella Teststämme [modifiziert nach: MORTELMANS und ZEIGER, 2000]

Bakterienstamm	Anzahl der Revertanten	
	Ohne S9	Mit S9
TA98	20-50	20-50
TA 102	100-300	200-400

In Abbildung 8 sind die Platten nach der Inkubationszeit von 48 Stunden mit den Spontanrevertanten des Bakterienstammes TA 98 abgebildet.

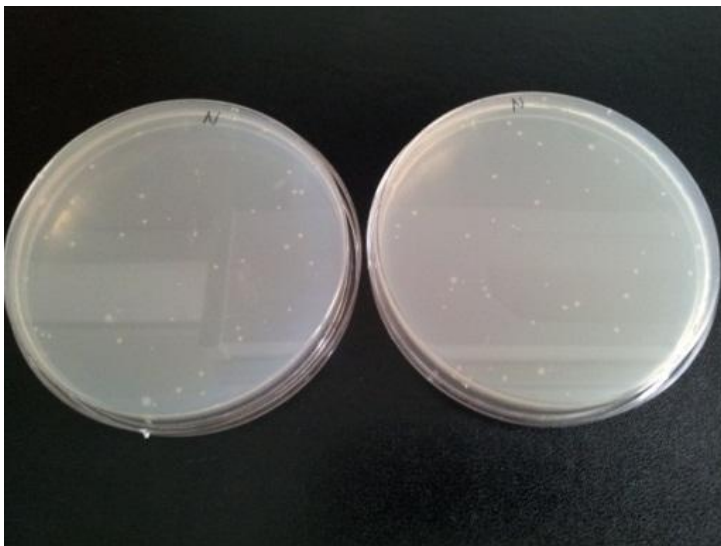


Abbildung 8: Negativkontrolle TA 98

7 Ames Test und Saponine

Bis dato gibt es wenige aussagekräftige Literatur über Saponine die mittels Ames Test getestet wurden. Dennoch möchte ich hier auf zwei Studien hinweisen.

Ramos et al. (1998), eine Studie, in der Extrakte von *Calendula officinalis* L. mittels Ames Test auf deren Mutagenität/Antimutagenität überprüft wurden. Der Test wurde mittels *Salmonella Typhimurium* Stämmen TA 153S, TA 1537, TA 98 und TA 100 durchgeführt. Getestet wurden 5 verschiedene Konzentrationen (50-5000 µg/Platte) im Dreifachansatz. Die Ergebnisse zeigten keinen Anstieg der Revertanten in einen der vier Standard Bakterienstämmen, sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung. Beim Bakterienstamm TA 100 wurde eine Erniedrigung der Revertanten in höheren Dosen beobachtet, vor allem bei den Tests der S9-Variante. Dies ist vermutlich auf die Toxizität des Extrakts zurückzuführen [RAMOS et al., 1998].

In einer Studie von Ma et al. (2011) wurde das Steroidsaponin DT-13 getestet. Ziel dieser Studie war, die Sicherheit dieses Saponins zu beurteilen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Genotoxizität sowie akute orale Toxizität gelegt. Durchgeführt wurde der Ames Test mit den Bakterienstämmen TA 97, TA 98, TA 100 und TA 102. Die Ergebnisse der Tests bestätigten, dass das Saponin DT-13 keine Mutationen in den Histidin auxotrophen *Salmonellen Typhimurium* Stämmen sowohl mit als auch ohne metabolischer Aktivierung induzierten.

8 Material und Methoden

8.1 Grundlagen Ames Test

Der Ames Test ist ein Kurzzeit-Bakterien Rückmutationstest. Alle im Ames Test verwendeten *Salmonella Typhimurium* Bakterien sind Histidin-Mangelmutanten, welche nicht auf histidinfreien Nährmedien wachsen können. Der Einfluss mutagener Substanzen führt zu Mutationen, welche es den Bakterien ermöglichen die Aminosäure Histidin zu synthetisieren. Aufgrund dessen werden Histidin-Revertanten (his+) Kolonien gebildet welche auf histidinfreiem Medium wachsen können [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

In dieser Studie wurde der Kurzzeit-Bakterien Rückmutationstest verwendet um das mutagene sowie auch das oxidative Potential ausgewählter Saponine (Digitonin, Diosgenin, Escin, Hederacosid C, Oleanolsäure und α -Solanin) mit den Salmonellenstämmen TA 98 und TA 102 zu testen.

8.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Herkunft der Chemikalien und Reagenzien ist in Tabelle 5 dargestellt. Angegeben sind jeweils die Bezugsquelle, die Bestellnummer sowie auch der Verwendungszweck.

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Abkürzung	Bezugsquelle	Bestellnummer	Anwendung
Agar No I		Oxoid/Bertoni	LP011P	Platten, TA
2 Aminoanthracene				Mutagen
Ampicillin Trihydrat		Sigma	A6140	GA, MP, OVNC
D-Biotin	C10H16N2O3S	Sigma	B4639	MP
Digitonin (Digitin)	C56H92O29	Sigma	D141	Probe
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma	D5B79	LM
Diosgenin	C27H42O3	Sigma	D1634	Probe
D-Glucose	C6H12O6	Sigma	GB270	MG-Agar , MP
Escin (Aescin)	C54H84O23	Sigma	E1378	Probe
Glucose-6-Phosphat	Glu-6-P	Sigma	G7250	S9-Mix
Hederacosid C	C59H96O26	Fulka	97151	Probe
Kaliumchlorid	KCl	Sigma	P5404	S9-Mix
Dikaliumhydrogenphosphat	K2HPO4	Sigma	P3786	VB-Lsg.
L-Histidin	C6H9N3O2	Sigma	HB125	TA, MP
Magnesiumchlorid	MgCl2*6H2O	Sigma	M9272	S9-Mix
Magnesiumsulfat	MgSO4*H2O	Sigma	M9397	VB-Lsg
Mitomycin C				Mutagen
Nutrient Broth No 2 CM 67		Oxoid/Bertoni	CM067B	OVNC, NB
Natriumammoniumphosphat	Na2NH2PO4*4H2O	Sigma	S963B	VB-Lsg.
Natriumchlorid	NaCl	Sigma	S5886	TA
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma	O6203	Ampicillin Lösung
Nicotinamidadenindinucleotidphosphat	NADP	Sigma	N0505	S9-Mix
4-Nitro-o-phenylenediamin				Mutagen
Oleanolsäure	C30H48O3	Aldrich	O5504	Probe
Phosphatpuffer	PBS	PAA Labor	H15002	Prä-Inkubation, S9-Mix
Rattenleber homogenat	S9	Biomedica/IC N	50412	Metabolische Aktivität
Salmonellenstamm TA 98	TA 98	Discovery Partners International Inc.San Diago, USA		
Salmonellenstamm TA102	TA 102	Discovery Partners International Inc.San Diago, USA		
α-Solanin	C45H73NO15	Aldrich	S3757	Probe
Tetracyclin Hydrochlorid		Sigma	T33B3	MP, OVNC
Zitronensäure monohydrat	C6H8O7*H2O	Sigma	C1909	VB-Lsg.

8.3 Vorbereitungen für den Ames Test

8.3.1 Minimum Glucose Agar

Für die Herstellung der Minimum Glucose Agar Platten wurden 11.25 g Oxoid Agar in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben eingewogen, in 700 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Danach wurden 15 ml Vogel-Bonner Lösung und 37,5 ml Glucose Lösung hinzugefügt. Der heiße Agar wurde ca. 5 mm dick in Petrischalen gegossen (Abbildung 9).

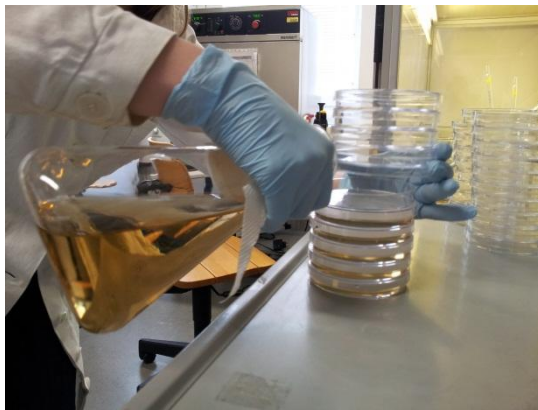


Abbildung 9: Gießen des Minimum Glucose Agars

8.3.1.1 Vogel-Bonner Lösung

Bei circa 45 °C wurden in 670 ml destilliertem Wasser 10 g Magnesiumsulfat-heptahydrat, 100 g Zitronensäuremonohydrat, 500 g Dikaliumhydrogenphosphat und 175 g Natriumammoniumphosphat langsam aufgelöst. Die Vogel-Bonner-Lösung wurde vor jedem Gebrauch autoklaviert.

8.3.1.2 Glucose Lösung (40 %)

400 g Glucose wurden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung musste vor jeder Verwendung sterilisiert werden.

8.3.2 Top Agar (TA)

1,2 g Oxoid Agar und 1 g NaCl wurden eingewogen, bis zu 200 g mit destilliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Vor jedem Gebrauch wurden noch 20 ml der Histidin-Biotin Lösung beigelegt. Während des Tests wurde der Top Agar bei 55 °C im Wasserbad warm gehalten.

Der Top Agar ist eine der wichtigsten Komponenten im Ames Test, da dieser Spuren Mengen an Histidin für begrenztes Wachstum enthält.

8.3.2.1 Histidin-Biotin Lösung

Für die Histidin-Biotin Lösung wurden 30,9 mg D-Biotin und 24 ml L-Histidin eingewogen und auf 250 g mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde vor jedem Gebrauch im Autoklaven sterilisiert und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

8.3.3 Master Plates Agar (MP)

Für die Herstellung von zwei Master Plates wurden 3,2 g Oxoid Agar eingewogen, auf 200 g mit destilliertem Wasser aufgefüllt und im Autoklaven sterilisiert. Unter sterilen Bedingung wurden 4,3 ml Vogel-Bonner- und 10,8 ml Glucose-Lösung hinzugegeben, gefolgt von 2,17 ml Histidin- und 1,3 ml Biotin-Lösung. Der Agar wurde kurz abgekühlt und die Antibiotikallösungen hinzugefügt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zugabe Antibiotikallösung MP

Salmonellenstamm	Antibiotikallösung
TA 98	682 µl Ampicillin
TA 102	682 µl Ampicillin + 54,3 µl Tetracyclin

Im Anschluss wurde der Agar mit einer Stärke von etwa 1 cm in sterile Petrischalen gegossen. Diese wurden im Anschluss für 24 Stunden unter dem Laminar Flow getrocknet. Danach konnten die Bakterienstämme auf die Platten aufgetragen werden (Abbildung 10). Diese wurden 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Aufbewahrung fand im Kühlschrank bei 4 °C statt. Die Verwendungszeit für die Masterplates betrug für den Bakterienstamm TA 98 zwei Monate und für den Stamm TA 102 zwei Wochen.



Abbildung 10: Masterplates TA 98 und TA 102

8.3.3.1 Ampicillin Lösung

0,2 g Ampicillin wurden mit 2 ml 0,2N NaOH versetzt. Im Anschluss wurde die Lösung steril filtriert und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

8.3.3.2 Tetracyclin Lösung

Für die Tetracyclin-Lösung wurden 80 ml Tetracyclin eingewogen und in 10 ml 0,2N HCl gelöst. Die Lösung wurde über einen sterilen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm sterilisiert und bei 4 °C gekühlt.

8.3.3.3 Histidin/Biotin Lösung

Für die Histidin-Lösung wurden 0,25 g Histidin eingewogen und mit 50 ml destilliertem Wasser vermischt. Bei der Biotin-Lösung wurden 6,1 mg D-Biotin verwendet und ebenfalls mit 50 ml destilliertem Wasser vermengt. Im Anschluss wurden beide Lösungen steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

8.3.4 Nutrient Broth und Overnight culture

Zur Herstellung der OVNC wurden 5 g Nutrient Broth No. 2 in eine 250 ml Pyrex-Flasche eingewogen und auf 200 g mit destilliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert.

Danach wurde die Lösung etwa auf Raumtemperatur abgekühlt und mit folgenden Antibiotikallösungen beimpft (Tabelle 7).

Tabelle 7: Antibiotikallösungen für OVNC

Salmonellenstamm	Antibiotikum
TA 98	625 µl Ampicillin
TA 102	625 µl Ampicillin +156 µl Tetracyclin

Davon wurden je 12 ml in 2 sterile 250 ml Erlenmeyerkolben pipettiert. Jeder Kolben wurde mit einem Bakterienstamm (entweder TA 98 oder TA 102) – von den Masterplates – beimpft und leicht geschüttelt. Die Kolben wurden mit Watte und Alufolie verschlossen und für 12 Stunden im Inkubator (37 °C) bei 55 rpm inkubiert. In den Abbildungen 11 und 12 sind die OVNC vor und nach der Inkubation ersichtlich.



Abbildung 12: OVNC vor der Inkubation

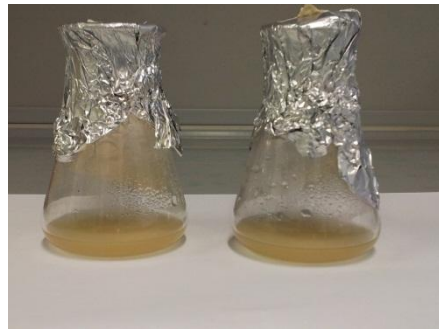


Abbildung 11: OVNC nach der Inkubation

8.3.5 S9-Mix

Für den S9-Mix wurden 19,75 ml steriles destilliertes Wasser, 25 ml PBS, 1 ml MgCl_2/KCl -Lösung, 2 ml NADP-Lösung und 250 μl Glucose-6-Phosphat Lösung in ein steriles 50 ml Vial gegeben. Kurz vor Testbeginn wurden 2 ml S9 (Rattenleberhomogenat) hinzugefügt. Dieser Mix wurde vor jedem Test frisch zubereitet. Während des Tests wurde die Lösung auf Eis gelagert. Der S9-Mix behält für nur 60 Minuten seine metabolische Aktivität.

8.3.5.1 Glucose-6-Phosphat Lösung (304 mg/ml)

Dafür wurde 1 g Glucose-6-Phosphat in 3,289 ml destilliertem Wasser gelöst und steril filtriert. Im Anschluss wurden Portionen von je 1 ml abgefüllt und bei minus 20 °C gefroren.

8.3.5.2 NADP Lösung

1 g NADP wurde in 14,814 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung über einen Sterilfilter sterilisiert und in Mengen zu je 1 ml abgefüllt und bei -20 °C deponiert.

8.3.5.3 MgCl₂/KCl Lösung

61,5 g KCl und 40,7 g MgCl₂ wurden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und danach autoklaviert.

8.3.6 Verwendete Positiv- und Negativkontrollen

Folgende Tabelle (8) zeigt die Positivkontrollen die für die Tests verwendet wurden. Die angegebenen Konzentrationen wurden mittels Vortests ermittelt.

Tabelle 8: Verwendete Positivkontrollen

Mutagene	Lösungsmittel	Bakterienstamm	Konzentration (µg/100µl)	S9 (-/+)
2-Amino-anthracene (2-AA)	DMSO	TA 98	0,1µg/100µl	+S9
		TA 102	5µg/100µl	+S9
4-nitro-o-phenyldiamine	Negativkontrolle	TA 98	2µg/100µl	-S9
Mitomycin C	Negativkontrolle	TA 102	0,2 µg/100µl	-S9

Negativkontrolle

Bei der Negativkontrolle handelt es sich um das Lösungsmittel in dem die Proben hergestellt wurden.

8.3.7 Probenvorbereitung

Für diese Studie wurden die Saponine Digitonin, Diosgenin, Escin, Hederacosid C, Oleanolsäure und α-Solanin verwendet.

Zuerst wurden folgende Einzelstammlösungen (Ausgangsstandards) der Saponine hergestellt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Einzelstammlösungen

Saponine	Einwaage (mg)	Volumen (ml)	Lösungsmittel	Konzentration (mg/ml)
Digitonin	5,11	2	MeOH:H ₂ O (1:1)	1,771
Hederacosid C	10,96	2	MeOH:H ₂ O (1:1)	5,107
α-Solanin	1,34	2	MeOH	0,663
Diosgenin	2,29	2	MeOH	1,076
Escin	4,63	2	MeOH:H ₂ O (1:1)	2,269
Oleanolsäure	3,15	2	MeOH	1,559

Im Anschluss wurde für jedes Saponin eine Einzellösung mit der Endkonzentration 100 µg/ml hergestellt (Tabelle 10).

Die Berechnung erfolgte mittels nachstehender Formel:

Endkonzentration [100 µg/ml] / Konzentration [µg/ml] * 1000 * Endvolumen [10ml]

Tabelle 10: Einzellösungen

	µl Ausgangsstandard	Lösungsmittel MeOH:H₂O 9:1
Digitonin [c = 100 µg/ml]	564.65 µl	9935.35 µl
Hederacosid C [c = 100 µg/ml]	195.81 µl	9804.19 µl
α – Solanin [c = 100 µg/ml]	1508.30 µl	8491.70 µl
Diosgenin [c = 100 µg/ml]	929.37 µl	9070.63 µl
Escin [c = 100 µg/ml]	440.72 µl	9559.28 µl
Oleanolsäure [c = 100 µg/ml]	641.44 µl	9358.56 µl

Ausgehend von diesen Lösungen wurden die entsprechenden Konzentrationen für unsere Tests hergestellt. In Tabelle 11 sind die verwendeten Konzentrationen abgebildet:

Tabelle 11: Verwendete Konzentrationen für die Tests

	Verwendete Konzentrationen	
Konzentration 1	0,00038 ng/ml	0,0001ng/Platte
Konzentration 2	0,01 ng/ml	0,002 ng/Platte
Konzentration 3	0,1 ng/ml	0,02 ng/Platte
Konzentration 4	1 ng/ml	0,2 ng/Platte
Konzentration 5	10 ng/ml	2 ng/Platte
Konzentration 6	100 ng/ml	20 ng/Platte

8.4 Genetische Analyse

Die Genetische Analyse wurde einmal zu Beginn mit jedem Testbakterienstamm durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese den jeweiligen Kriterien entsprechen. Zur Herstellung der Platten wurde von folgendem Agar-Mix ausgegangen:

In sechs Kolben (250 ml) wurden jeweils 3,26 g Oxoid Agar eingewogen und auf 200 g mit destilliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Danach wurden in jeden Kolben 4,35 ml Vogel-Bonner- und 10,87 ml Glucose-Lösung hinzugefügt. Je nach Platte wurden noch weitere Lösungen in die Kolben pipettiert (Tabelle 12).

Tabelle 12: Pipettierschema der Genetischen Analyse

Biotin-Platten	+ 1,74 ml Biotin-Lösung 0,01 % (= 6,1mg/50ml H ₂ O)
Histidin-Platten	+ 1,74 ml Histidin-Lösung 0,5 % (= 0,25g/50ml H ₂ O)
Biotin/Histidin Platten:	+ 1,74 ml Biotin-Lösung + 1,74 ml Histidin-Lösung
Biotin/Histidin/Ampicillin Platten:	+ 1,74 ml Biotin-Lösung + 1,74 ml Histidin-Lösung + 666 µl Ampicillin-Lösung
Biotin/Histidin/Tetracyclin Platten:	+ 1,74 ml Biotin-Lösung + 1,74 ml Histidin-Lösung + 54 µl Tetracyclin-Lösung
Biotin/Histidin/Ampicillin/Tetracyclin Platten:	+ 1,74 ml Biotin-Lösung + 1,74 ml Histidin-Lösung + 666 µl Ampicillin-Lösung + 54 µl Tetracyclin-Lösung

Die Platten wurden getrocknet und im Anschluss die Bakterienstämme TA 98 und TA 102 unter sterilen Bedingungen aufgetragen und bei 37 °C für 48 h in den Inkubator gegeben. Im Anschluss erfolgten die Kontrollen der jeweiligen Kriterien.

Biotin Abhängigkeit:

Bakterienwachstum darf nur bei TA 102 vorhanden sein, da dieser nicht biotin-abhängig ist.

Histidin-Abhängigkeit:

Hier darf keine der beiden Platten bewachsen sein, da alle Stämme histidin-abhängig sind.

Biotin- & Histidinabhängigkeit:

Beide Platten (TA 98 und TA 102) müssen bewachsen sein.

Ampicillinresistenz (Vorkommen des Plasmids pKM 101)

Wachstum muss bei TA 98 und TA 102 auftreten.

Tetracyclin-Resistenz (Vorkommen des Plasmids pAQ1)

Wachstum muss nur bei TA 102 zu sehen sein.

Spontanrevertanten (Negativkontrolle)

Zur Bestimmung der Spontanrevertanten.

Die Genetisch Analyse war bei beiden in dieser Studie verwendeten Bakterienstämmen in Ordnung.

8.5 Experimentelles Design

Alle Tests werden anhand des Präinkubationstests nach MORTELMANS und ZEIGER, 2000 und MARON und AMES, 1984 durchgeführt.

Der Testablauf erfolgt in mehreren Stufen. Die Einhaltung der vorgegebenen Zeitfenster ist sehr wichtig, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und etwaige Fehler zu minimieren.

Bevor mit dem Test gestartet werden konnte, mussten folgende Vorbereitungen erfüllt sein (Tabelle 13).

Tabelle 13: Vorbereitungen für Ames Test

Vorbereitungen für den Ames Test

Top-Agar und Histidin-Biotin Lösung autoklavieren

Laminar Flow einschalten

Beschriften der Minimum Glucose Agar Platten (schon am Vortag aus Kühlraum geben)

Beschriften der sterilen Teströhrchen

pro Test:

- 6 Röhrchen Negativkontrolle
- 3 Röhrchen Positivkontrolle
- Für jede Probe 3 Röhrchen (3-fach Ansatz)

Substanzen und Positivkontrolle vorbereiten

Autoklavierten Top Agar mit Histidin-Biotin Lösung beimpfen

Folgende Abbildung zeigt die Schritte eines Ames Tests:

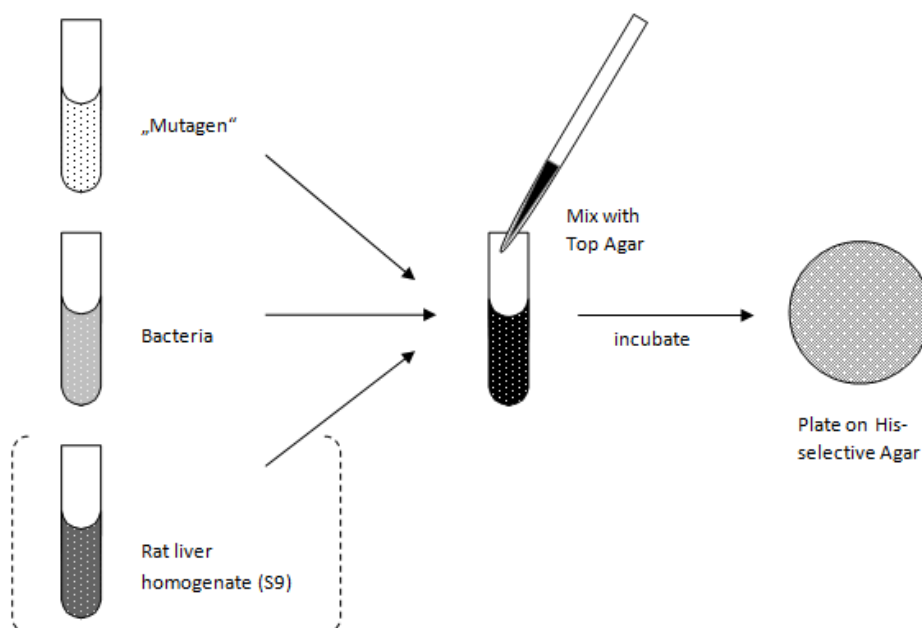


Abbildung 13: Durchführungsschritte AMES Test

8.5.1 Pipettierschema

Das in den Tests verwendete Pipettierschema ist in der darauffolgenden Tabelle 14 abgebildet. Dieses wurde bei jedem Test angewendet.

Tabelle 14: Pipettierschema für alle Tests

	PBS/S9-Mix	Bakterien	Proben	Positivk. (Mutagen)	Negativk.	Flüssigkeitsausgleich	Top Agar	Total v
Probe	500 µl	100 µl	200 µl				2 ml	2,8 ml
Positiv	500 µl	100 µl		100 µl		100 µl	2 ml	2,8 ml
Negativ	500 µl	100 µl			100 µl	100 µl	2 ml	2,8 ml

Alle Konzentrationen der sechs Proben wurden im Dreifachansatz bestimmt und jeder Test wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

8.5.2 Präinkubationstest

Für den Präinkubationstest wurde der Standard-Platten-Inkorporationstest modifiziert. Es wird angenommen, dass bei diesem Testverfahren die kurzlebenden mutagenen Metaboliten eine bessere Reaktionsmöglichkeit mit den Teststämmen haben.

Nach vollständiger Zugabe der Positivkontrolle wurde ein Timer auf 25 Minuten gestellt. Die Röhrchen wurden kurz leicht geschüttelt und dann für 25 Minuten bei 37 °C in den Inkubator gestellt wo diese bei 55 rpm am Rüttler durchgemischt wurden. Im Anschluss wurde jedes Röhrchen mit 2 ml Top Agar vermengt, gevortext und auf die Minimum Glucose Agar Platten aufgebracht. Nachdem diese getrocknet waren, wurden sie für 48 Stunden bei 37 °C in den Inkubator gegeben.

8.5.3 Verwendete Geräte

In Tabelle 15 befindet sich ein kurzer Überblick der für den Ames Test verwendeten Geräte.

Tabelle 15: Verwendete Geräte

Gerät	Beschreibung
Autoklaven	HI CLAVE™ HV-85L HMC MELAG Autoklav 23
Inkubator	Memmert Modell 500
Laminar flow	Holten Lamin air HB 2472
Magnetrührer	Heidolph MR 3001 K
Messpipetten	
Pipetten	
Vortex	Heidolph REAX 2000
Waage	Mettler AT201 FACT Sartorius LC 4801P
Wasserbad	GFL

Abbildung 14 zeigt den Laminar flow, der für die gesamten durchgeführten Tests verwendet wurde.



Abbildung 14: Laminar flow

8.5.4 Auszählen der Kolonien

Die Platten wurden nach 48 Stunden Inkubationszeit aus dem Inkubator gegeben und die Bakterienkolonien auf den Platten mit Hilfe eines Zählers ausgezählt. Zur besseren Sicht wurde dieser Schritt mithilfe einer Lampe durchgeführt (Abbildung 15).

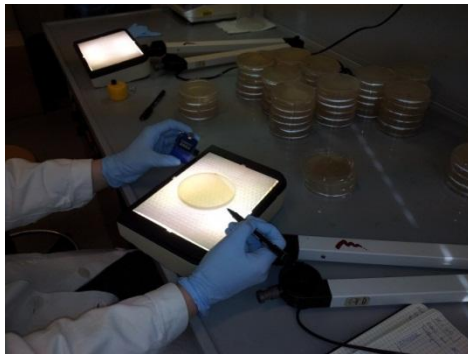


Abbildung 15: Auszählen der Platten

8.6 Statistik

8.6.1 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Testergebnisse wurde die Software SPSS 19 für Windows und Microsoft Excel 2010 verwendet. Es erfolgte eine Überprüfung aller Werte auf Normalverteilung mittels K-S Test (Kolmogorov-Smirnov). Die Ergebnisse zeigten, dass alle Daten normalverteilt sind. In weiterer Folge wurden diese mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und verschiedenen Post-Hoc-Tests (Scheffé und Tukey) auf signifikante Unterschiede mit der Negativkontrolle getestet. Als Signifikanzniveau wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ angenommen.

8.6.2 Nicht-Statistische Auswertung

Die nicht-statistische Auswertung erfolgte nach den publizierten Kriterien von MORTELMANS und ZEIGER, 2000. Hiermit können die Ergebnisse zusätzlich interpretiert werden.

Positiv:

Mutagen: eine Verbindung wird dann als mutagen betrachtet, wenn diese eine reproduzierbare, dosisabhängige Zunahme der Anzahl an Revertantenkolonien in einem oder mehreren Stämmen produziert, welche die doppelte Menge im Vergleich zur Negativkontrolle sein muss.

Schwach-mutagen: Für schwach mutagene Verbindungen gelten dieselben Kriterien, außer dass diese nicht die doppelte Menge an Revertanten aufweisen.

Negativ:

Nicht-Mutagen: Substanzen gelten als nicht-mutagen, wenn keine dosisabhängige Zunahme der Anzahl an Revertanten in mindestens zwei unabhängigen Experimenten beobachtet wird.

Ergebnislos:

Wenn Substanzen nicht klar als mutagen beziehungsweise nicht-Mutagen identifiziert werden können, werden diese als „ergebnislos“ klassifiziert.

9 Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit wurde das mutagene Potential der Saponine Diosgenin, Digitonin, Escin, Hederacosid C, Oleanolsäure und α -Solanin mittels Ames Test untersucht. Dafür wurden die Salmonella Typhimurium Stämme TA 98 und TA 102 verwendet und der Testablauf sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung durchgeführt.

Die verwendeten Proben wurden in Methanol-Wasser Mischungen (bei der höchsten getesteten Konzentration – 20 ng/Platte – wurden 0,5 μ l MeOH pro Milliliter H₂O verwendet) gelöst und in sechs unterschiedlichen Konzentrationen (0,0001, 0,002, 0,02, 0,2, 2 und 20 ng/Platte) getestet. Vor Beginn der Tests wurden die beiden verwendeten Bakterienstämme mittels Genetischer Analyse auf ihre Funktionalität überprüft.

Die sechs verwendeten Konzentrationen wurden aufgrund von LC-MS/MS Messungen österreichischer Gewässer festgelegt. Meine Kollegin Mag. Michaela Kreuml hat im Zuge ihrer Dissertation Saponine in Oberflächengewässern und vereinzelt auch Abwässer untersucht. Die dabei erhaltenen Saponingehalte wurden für den Ames Test herangezogen. Dazu wurden noch zwei höhere Konzentrationen (2 ng/Platte und 20 ng/Platte) gewählt, um ein toxikologisches Urteil fällen zu können. Insgesamt wurden fünf log Stufen berücksichtigt.

9.1 Testergebnisse

Die statistische Auswertung der Testergebnisse zeigt, dass keine der sechs überprüften Substanzen mutagenes Potential aufweist. Weder beim Bakterienstamm TA 98, der Informationen für Frameshift-Mutationen aufzeigt, noch beim Salmonella Typhimurium Stamm TA 102, mit dem oxidative Stressreaktionen nachgewiesen werden können.

In den nachstehenden Ergebnis-Tabellen und Abbildungen finden sich die Mittelwerte und Standardabweichungen der sechs ermittelten Werte (zwei Testansätze mit jeweils 3 Platten) der jeweiligen Substanzen und Konzentrationen, sowie die Mittelwerte der Positiv- und Negativkontrolle. Werte die mit einem Stern gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p \leq 0,05$ herangezogen.

9.1.1 Testergebnisse TA 98_ohne S9

In den folgenden Tabellen sind die Testergebnisse des Salmonella Typhimurium Stammes TA 98 ohne Verwendung von S9 abgebildet. Tabelle 16 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von Diosgenin, gefolgt von Escin (Tabelle 17), alpha-Solanin (Tabelle 18), Hederacosid C (Tabelle 19), Digitonin (Tabelle 20) und Oleanolsäure (Tabelle 21).

Tabelle 16: Ergebnisse Diosgenin TA 98_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	42,67	6,44
0,002	43,33	7,15
0,02	40,17	5,64
0,2	41,33	6,89
2	37,83	12,16
20	39,83	9,81
POS	210,42	35,48
NEG	35,79	8,16

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 17: Ergebnisse Escin TA 98_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	36,67	7,12
0,002	34,17	9,87
0,02	40,17	5,57
0,2	35,40	3,21
2	43,17	8,89
20	40,33	9,85
POS	210,42	35,48
NEG	35,79	8,16

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 18: Ergebnisse alpha-Solanin TA 98_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	39,67	4,37
0,002	32,83	6,94
0,02	42,00	3,90
0,2	41,00	6,57
2	32,00	8,65
20	30,17	7,99
POS	210,42	35,48
NEG	35,79	8,16

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 19: Ergebnisse Hederacosid C TA 98_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	32,83	3,13
0,002	35,17	10,76
0,02	33,33	4,18
0,2	30,67	7,34
2	35,33	6,83
20	37,17	6,27
POS	210,42	35,48
NEG	35,79	8,16

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 20: Ergebnisse Digitonin TA 98_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	31,00	10,53
0,002	29,17	4,83
0,02	29,50	6,16
0,2	28,67	5,20
2	32,17	8,66
20	28,67	7,34
POS	210,42	35,48
NEG	35,79	8,16

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 21: Ergebnisse Oleanolsäure TA 98_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	27,17	4,75
0,002	33,80	8,20
0,02	34,00	7,13
0,2	29,00	6,78
2	38,83	5,49
20	32,67	3,27
POS	210,42	35,48
NEG	35,79	8,16

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Bei allen durchgeführten Tests im Ansatz TA 98 ohne S9, befinden sich die Ergebnisse der Negativkontrolle im vorgegebenen Bereich.

In den Tabellen 16 bis 21 ist gut ersichtlich, dass sich die überprüften Konzentrationen nicht von der Negativkontrolle unterscheiden, da sich alle ermittelten Werte innerhalb dieses Bereiches befinden. Keine der sechs getesteten Substanzen weist mutagenes Potential auf, alle sind signifikant niedriger als die Positivkontrolle ($p < 0,001$).

Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse, sind die Daten (Tabelle 16 bis 21) in den Abbildungen 16 und 17 grafisch dargestellt. In den folgenden Illustrationen (Abbildung 16-23) sind in der x-Achse die Negativ- und Positivkontrolle sowie pro Abbildung drei Substanzen (mit den je sechs unterschiedlichen Konzentrationen) mit ihren Mittelwerten und Standardabweichungen abgebildet. In der y-Achse befindet sich die Anzahl der Revertanten. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse, wurde auch der Wert der doppelten Negativkontrolle in das Diagramm eingefügt, der als erster Hinweis auf ein mutagenes Potential gilt.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin.

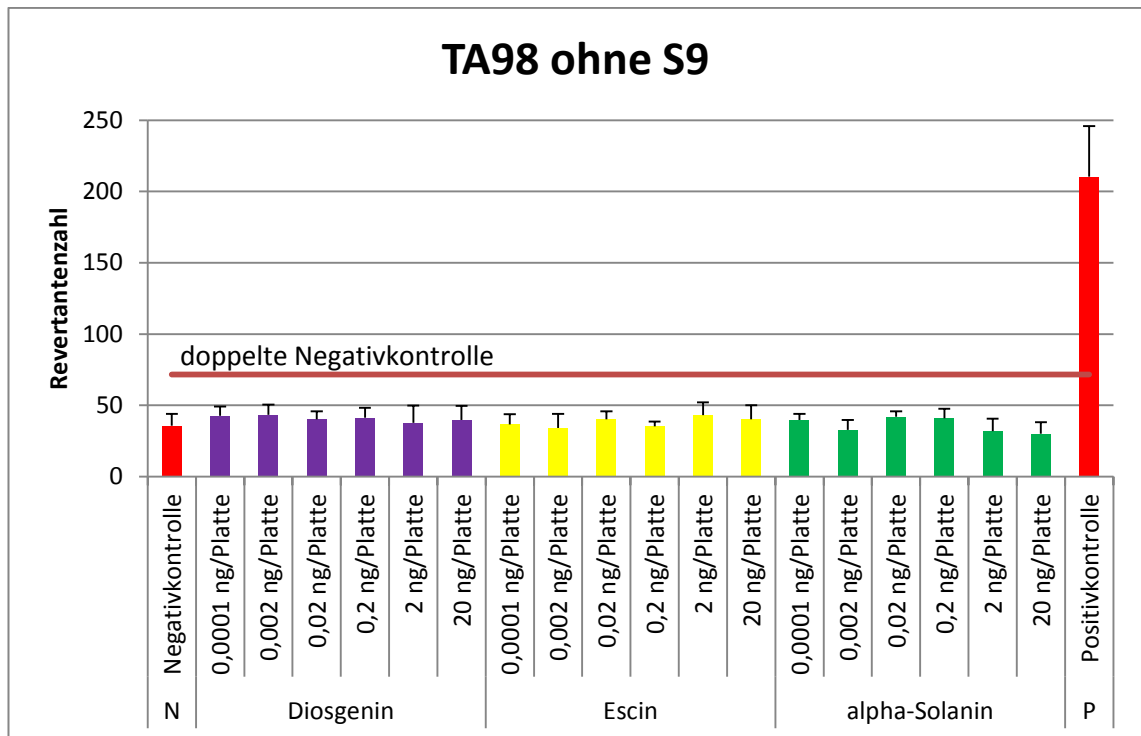


Abbildung 16: Ergebnisse TA 98_ohne S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin

Beim Salmonella Typhimurium Stamm TA 98 ohne S9 lagen die Mittelwerte aller getesteten Konzentrationen der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin deutlich unter dem doppelten Wert der Negativkontrolle. Weiters konnte bei den einzelnen Saponinen zwischen den verwendeten Konzentrationen kein signifikanter Unterschied eruiert werden, infolgedessen war auch keine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten.

Ebenso wie in Abbildung 16 zeigt sich in der nächsten grafischen Darstellung (Abbildung 17) der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanonsäure ein fast identisches Bild.

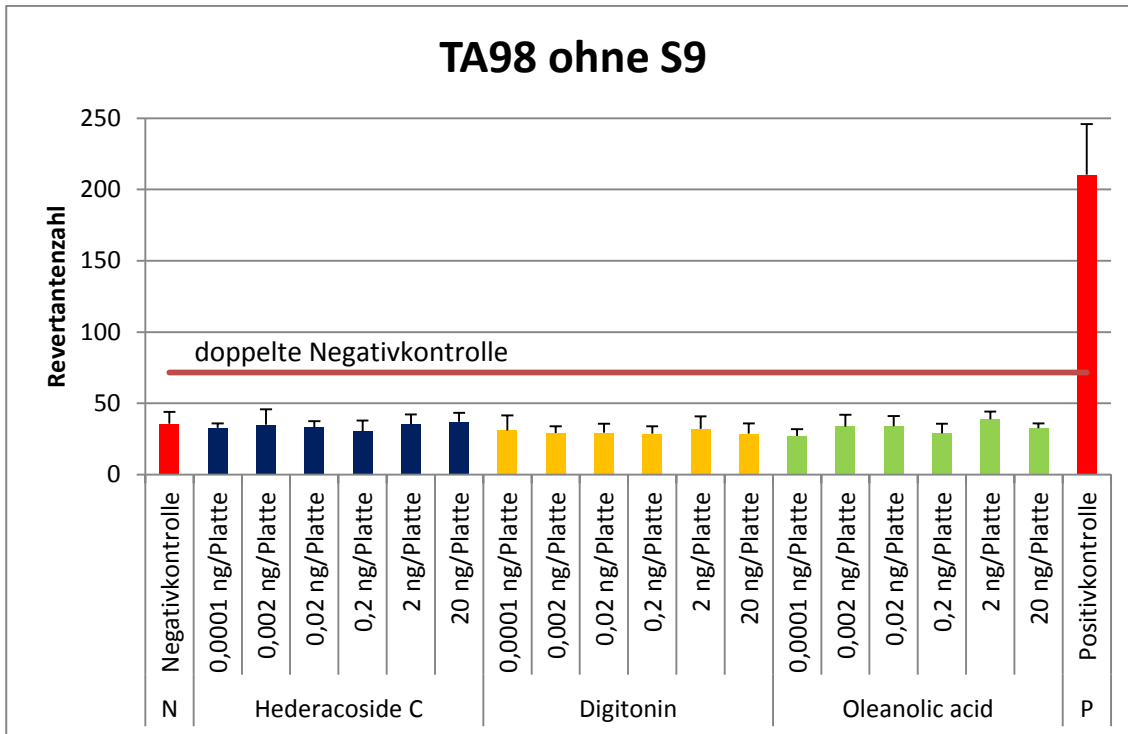


Abbildung 17: Ergebnisse TA 98_ohne S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure

Wiederum liegen die getesteten Mittelwerte unter der doppelten Negativkontrolle und zusätzlich konnte auch hier keine Konzentrationsabhängigkeit ermittelt werden.

Demzufolge sind alle sechs verwendeten Saponine im Testansatz TA 98 ohne S9 als nicht mutagen einzustufen.

9.1.2 Testergebnisse TA 98_mit S9

Die kommenden Tabellen (Tabelle 22 bis 27) zeigen die Testergebnisse des Bakterienstammes TA 98 mit metabolischer Aktivierung und stellen die einzelnen Substanzen in den sechs gemessenen Konzentrationen dar.

Tabelle 22: Ergebnisse Diosgenin TA 98_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	70,20	13,52
0,002	64,67	11,08
0,02	67,20	21,19
0,2	69,83	18,58
2	66,33	9,18
20	64,50	4,51
POS	240,50	41,35
NEG	56,42	13,59

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle (p<0,001)

Tabelle 23: Ergebnisse Escin TA 98_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	58,33	13,72
0,002	60,33	16,01
0,02	61,50	10,93
0,2	67,40	7,89
2	59,17	5,42
20	54,67	9,25
POS	240,50	41,35
NEG	56,42	13,59

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle (p<0,001)

Tabelle 24: Ergebnisse alpha-Solanin TA 98_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	65,00	12,62
0,002	55,17	14,05
0,02	68,00	8,85
0,2	67,67	13,98
2	65,00	8,76
20	65,67	9,42
POS	240,50	41,35
NEG	56,42	13,59

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 25: Ergebnisse Hederacosid C TA 98_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	43,17	10,91
0,002	47,83	12,22
0,02	55,33	10,08
0,2	52,33	12,96
2	49,33	6,53
20	43,17	8,04
POS	240,50	41,35
NEG	56,42	13,59

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 26: Ergebnisse Digitonin TA 98_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	56,50	5,79
0,002	47,17	2,93
0,02	47,33	12,60
0,2	45,60	10,48
2	50,17	13,95
20	46,33	8,02
POS	240,50	41,35
NEG	56,42	13,59

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle (p<0,001)

Tabelle 27: Ergebnisse Oleanolsäure TA 98_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	43,83	3,92
0,002	44,33	10,75
0,02	52,00	9,90
0,2	43,50	10,62
2	52,17	17,06
20	47,20	9,15
POS	240,50	41,35
NEG	56,42	13,59

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle (p<0,001)

Auch bei den Ergebnissen des Stammes TA 98 mit S9 zur metabolischen Aktivierung zeigten die durchschnittlichen Werte keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle auf. Wiederum befand sich die Negativkontrolle im vorgegebenen Bereich. Es konnte lediglich beobachtet werden, dass die Revertantenzahlen im Mittel etwas höher waren, als im Vergleich zum Testansatz TA 98 ohne metabolische Aktivierung. Die Abbildungen 18 und 19 zeigen jedoch, dass diese Erkenntnis keinen Einfluss auf das Resultat der getesteten Substanzen hat. Alle sechs Substanzen waren wieder signifikant niedriger als die Positivkontrolle ($p < 0,001$).

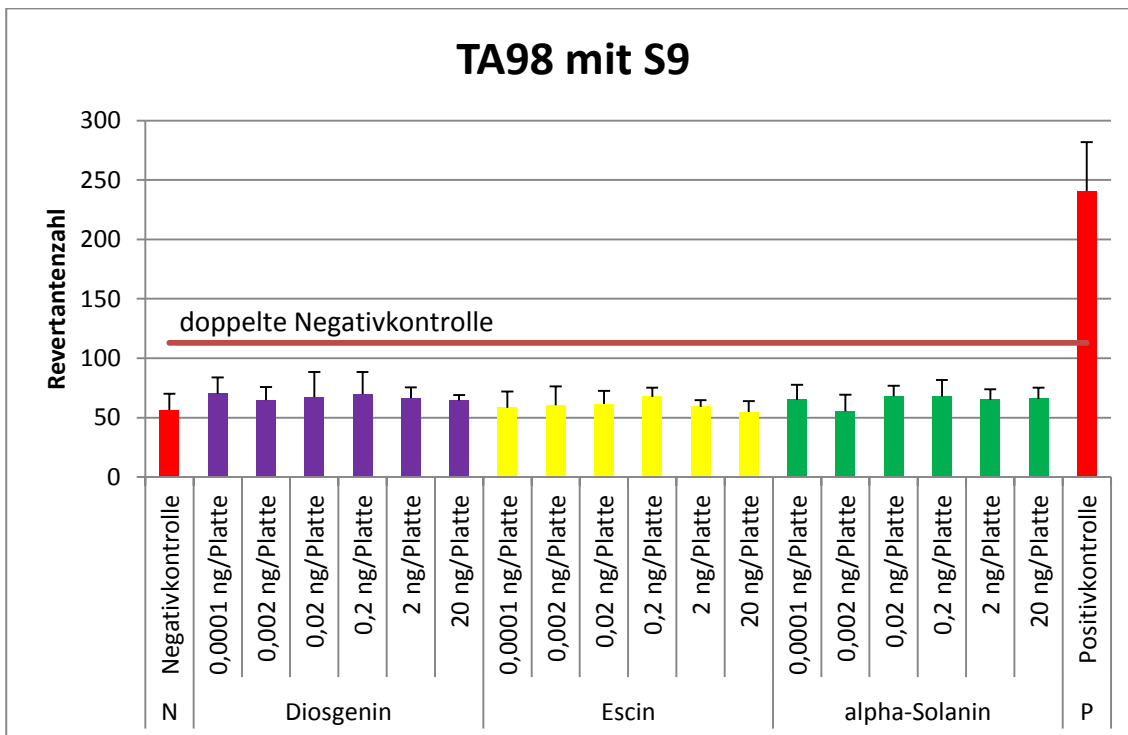


Abbildung 18: Ergebnisse TA 98_mit S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin

Abbildung 18, in der die Saponine Diosgenin, Escin und alpha-Solanin dargestellt sind, zeigt, dass die durchschnittlichen Werte der getesteten Substanzen und Konzentrationen auch mit metabolischer Aktivierung unter dem doppelten Wert der Negativkontrolle lagen. Zudem gab es keine

Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten, alle Revertantenzahlen lagen etwa im selben Bereich.

Abbildung 19 stellt die Werte der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure (aus Tabelle 25-27) bildlich dar.

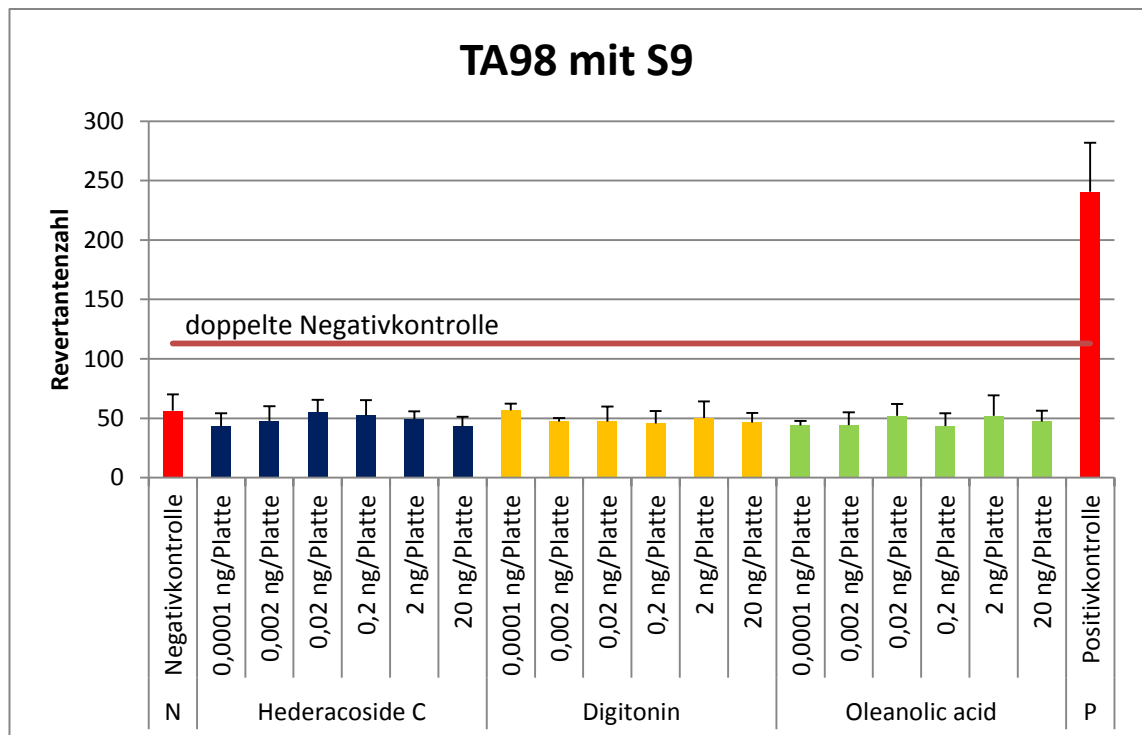


Abbildung 19: Ergebnisse TA 98_mit S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure

Auch für diese Darstellung ergibt sich dieselbe Beobachtung wie schon zuvor in Abbildung 18. Die Ergebnisse sind auch hier deutlich unter dem doppelten Wert der Negativkontrolle und es ist ebenfalls keine Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen.

Bei einer Gegenüberstellung der Abbildungen 18 und 19 ist sehr gut zu erkennen, dass es auch zwischen den verwendeten sechs Substanzen (Abbildung 18 und 19) keine großen Unterschiede gibt. Die Saponine Diosgenin, Escin und alpha-Solanin (in Abbildung 18) weisen zwar etwas

höhere Werte auf als jene in Abbildung 19, allerdings sind die Unterschiede gering und nicht signifikant.

Schlussendlich konnte auch in diesem Testansatz TA 98 mit metabolischer Aktivität keine mutagene Wirkung nachgewiesen werden.

9.1.3 Testergebnisse TA 102_ohne S9

Die folgenden Tabellen 28 bis 33 zeigen die Testergebnisse des Salmonella Typhimurium Stammes TA 102 ohne metabolische Aktivierung. Die mit einem Stern gekennzeichneten Konzentrationen unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle. Tabelle 28 stellt die Ergebnisse des Saponins Diosgenin dar. Gefolgt von Escin (Tabelle 29), alpha-Solanin (Tabelle 30), Hederacosid C (Tabelle 31), Digitonin (Tabelle 32) und Oleanolsäure (Tabelle 33).

Tabelle 28: Ergebnisse Diosgenin TA 102_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
	MW	+/- SD
0,0001	723,50	17,73
0,002	731,17	13,09
0,02	765,20	30,38
0,2	746,17	36,69
2	648,50	35,48
20	666,50	16,75
POS	1361,33	96,04
NEG	676,42	74,28

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 29: Ergebnisse Escin TA 102_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
	MW	+/- SD
0,0001	777,17	37,83
0,002	792,00	82,62
0,02*	841,83	87,47
0,2*	847,00	54,05
2	694,00	33,75
20	656,00	75,40
POS	1361,33	96,04
NEG	676,42	74,28

*signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle ($p < 0,05$)

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 30: Ergebnisse alpha-Solanin TA 102_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
	MW	+/- SD
0,0001	776,17	25,86
0,002	782,00	55,77
0,02*	822,83	65,00
0,2*	792,60	47,61
2	668,00	23,24
20	661,50	30,05
POS	1361,33	96,04
NEG	676,42	74,28

*signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle ($p < 0,05$)

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 31: Ergebnisse Hederacosid C TA 102_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	645,83	20,80
0,002	656,25	13,35
0,02	648,00	8,72
0,2	641,33	15,29
2	682,67	40,83
20	689,67	16,12
POS	1361,33	96,04
NEG	676,42	74,28

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 32: Ergebnisse Digitonin TA 102_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	663,33	20,72
0,002	667,50	16,60
0,02	639,00	26,97
0,2	634,00	55,72
2	670,17	61,40
20	635,33	70,68
POS	1361,33	96,04
NEG	676,42	74,28

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 33: Ergebnisse Oleanolsäure TA 102_ohne S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	641,83	8,04
0,002	646,33	13,16
0,02	653,00	15,75
0,2	647,00	14,27
2	590,83	45,95
20	666,67	25,79
POS	1361,33	96,04
NEG	676,42	74,28

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Aus den Tabellen 28 bis 33 ist ersichtlich, dass bei einigen getesteten Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle ermittelt werden konnte. Betrachtet man die folgenden Abbildungen 20 und 21, ist zu erkennen, dass das keinen Einfluss auf unsere Testergebnisse hat. Alle Werte waren signifikant niedriger als die Positivkontrolle ($p < 0,001$).

Abbildung 20 zeigt die ermittelten Werte aus den Tabellen 28 bis 30 der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin.

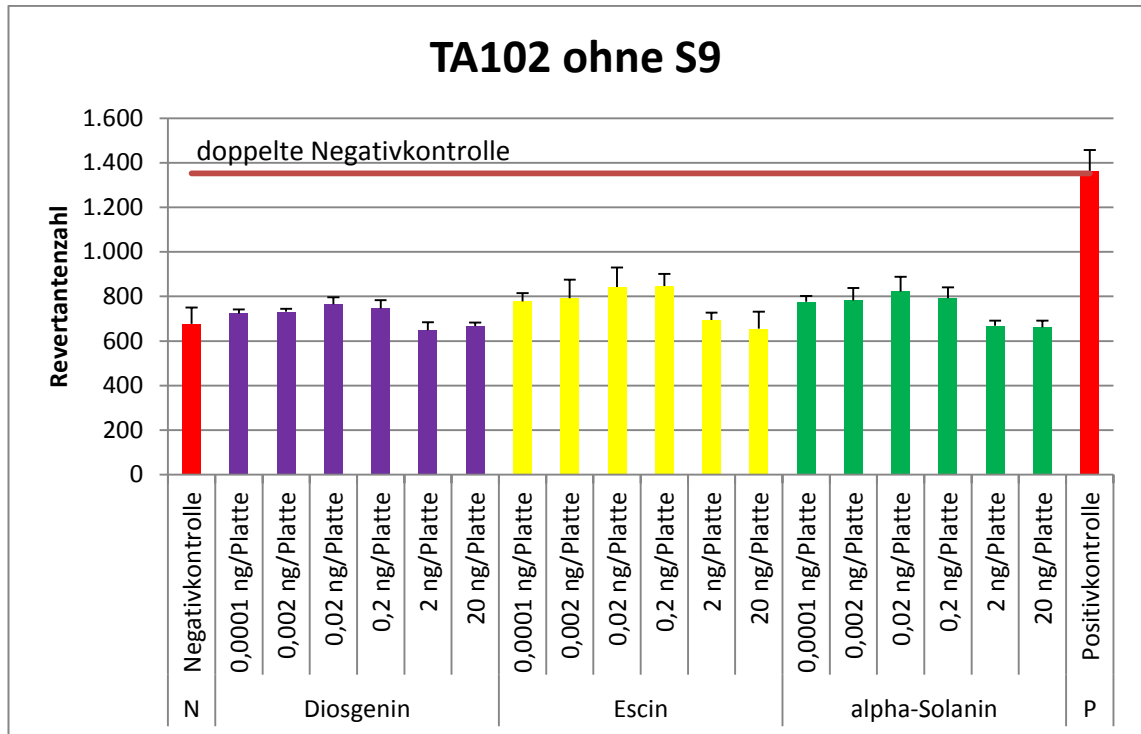


Abbildung 20: Ergebnisse TA 102_ohne S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, lagen die durchschnittlichen Werte aller getesteten Substanzen und Konzentrationen im Testansatz TA 102 ohne metabolische Aktivierung weit unterhalb der doppelten Negativkontrolle. Wie auch schon in den Ergebnissen zuvor, konnte auch hier keine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden.

Die nachstehende Abbildung 21 zeigt die Testergebnisse der Saponine Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure aus den Tabellen 31 bis 33.

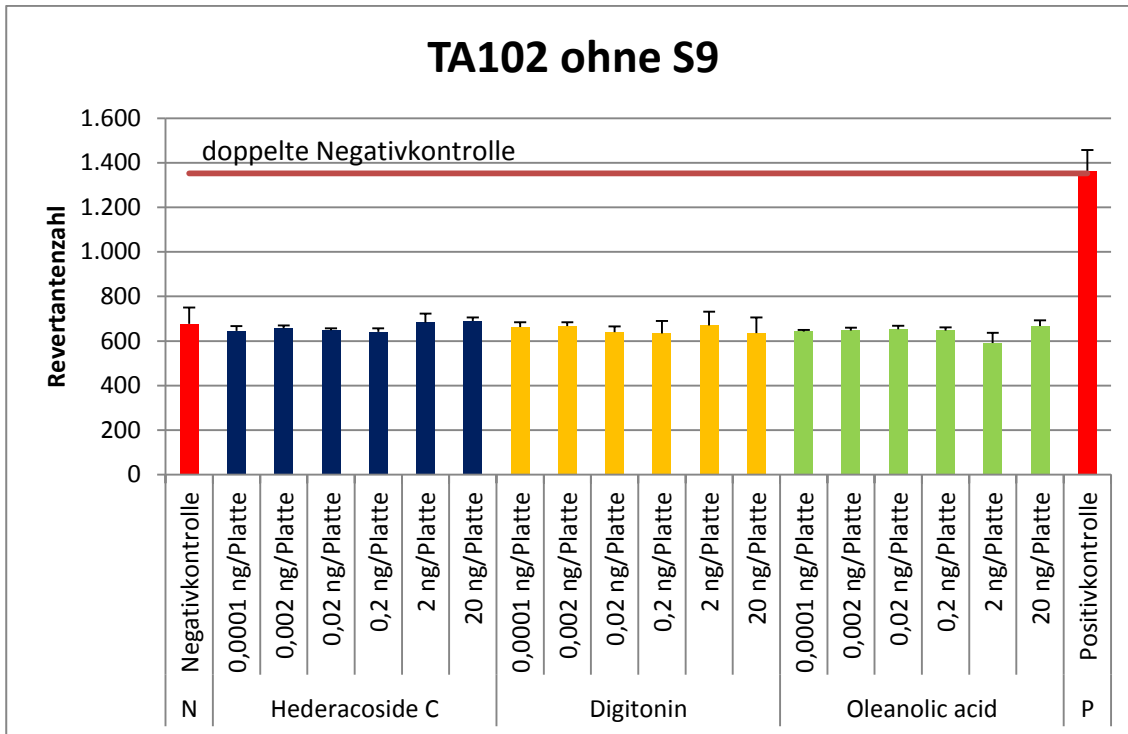


Abbildung 21: Ergebnisse TA 102 ohne S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure

Abbildung 21 liefert wiederum eine ähnliche Darstellung wie Abbildung 20. Es konnte keine Annäherung der Werte zur doppelten Negativkontrolle und auch keine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. Die Ergebnisse stellen ein sehr homogenes Bild dar.

Demgemäß konnte auch in diesem Testansatz (TA 102 ohne S9) weder ein mutagenes noch ein oxidatives Potential der sechs getesteten Saponine nachgewiesen werden.

9.1.4 Testergebnisse TA 102_mit S9

In diesem Kapitel sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Testergebnisse des Bakterienstammes TA 102 mit metabolischer Aktivierung zusammengefasst (Tabelle 34 bis 39), sowie der Positiv- und Negativkontrolle. Alle Werte die mit einem Stern gekennzeichnet wurden, unterscheiden sich wiederum signifikant von der Negativkontrolle.

Tabelle 34: Ergebnisse Diosgenin TA 102_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	859,17	22,40
0,002	868,63	29,98
0,02	827,50	8,39
0,2	839,33	24,41
2*	774,00	42,57
20	785,83	45,61
POS	1677,83	61,07
NEG	841,26	47,87

*signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle ($p < 0,05$)

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 35: Ergebnisse Escin TA 102_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
	MW	+/- SD
0,0001	774,50	21,70
0,002	782,50	14,87
0,02	771,00	57,08
0,2	786,17	21,35
2*	746,50	18,46
20	775,00	23,93
POS	1677,83	61,07
NEG	841,26	47,87

* signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle ($p < 0,05$)

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 36: Ergebnisse alpha-Solanin TA 102_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
	MW	+/- SD
0,0001	801,40	68,72
0,002	861,67	35,29
0,02	852,50	41,86
0,2	814,33	21,01
2	765,00	44,43
20	771,33	15,48
POS	1677,83	61,07
NEG	841,26	47,87

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 37: Ergebnisse Hederacosid C TA 102_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	879,83	9,95
0,002	859,17	22,68
0,02	857,83	25,54
0,2	849,00	35,67
2	887,60	9,99
20	883,50	9,09
POS	1677,83	61,07
NEG	841,26	47,87

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 38: Ergebnisse Digitonin TA 102_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	858,40	21,08
0,002	881,67	14,01
0,02	884,83	14,05
0,2	872,67	17,26
2	868,20	9,86
20	865,00	22,25
POS	1677,83	61,07
NEG	841,26	47,87

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Tabelle 39: Ergebnisse Oleanolsäure TA 102_mit S9

Präinkubationstest	Kolonien	
Konzentration (ng/Platte)	MW	+/- SD
0,0001	890,67	7,12
0,002	877,80	21,53
0,02	868,67	21,13
0,2	881,83	18,97
2	870,50	12,79
20	835,17	18,23
POS	1677,83	61,07
NEG	841,26	47,87

Positivkontrolle > als alle getesteten Konzentrationen und Negativkontrolle ($p < 0,001$)

Wie auch schon bei den Ergebnissen vom Stamm TA 102 ohne S9 sind auch in dieser Testreihe einige Werte zu beobachten, die sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle unterscheiden. Allerdings hat das für die Fragestellung der Studie keine Relevanz. Alle Werte unterscheiden sich wieder signifikant von der Positivkontrolle ($p < 0,001$). Auch bei diesem durchgeführten Test lag die Revertanzzahl etwas höher als im Vergleich zu denselben Substanzen ohne metabolische Aktivierung. Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Ergebnisse noch einmal in bildlicher Darstellung.

Wobei Abbildung 22 die Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin darstellt.

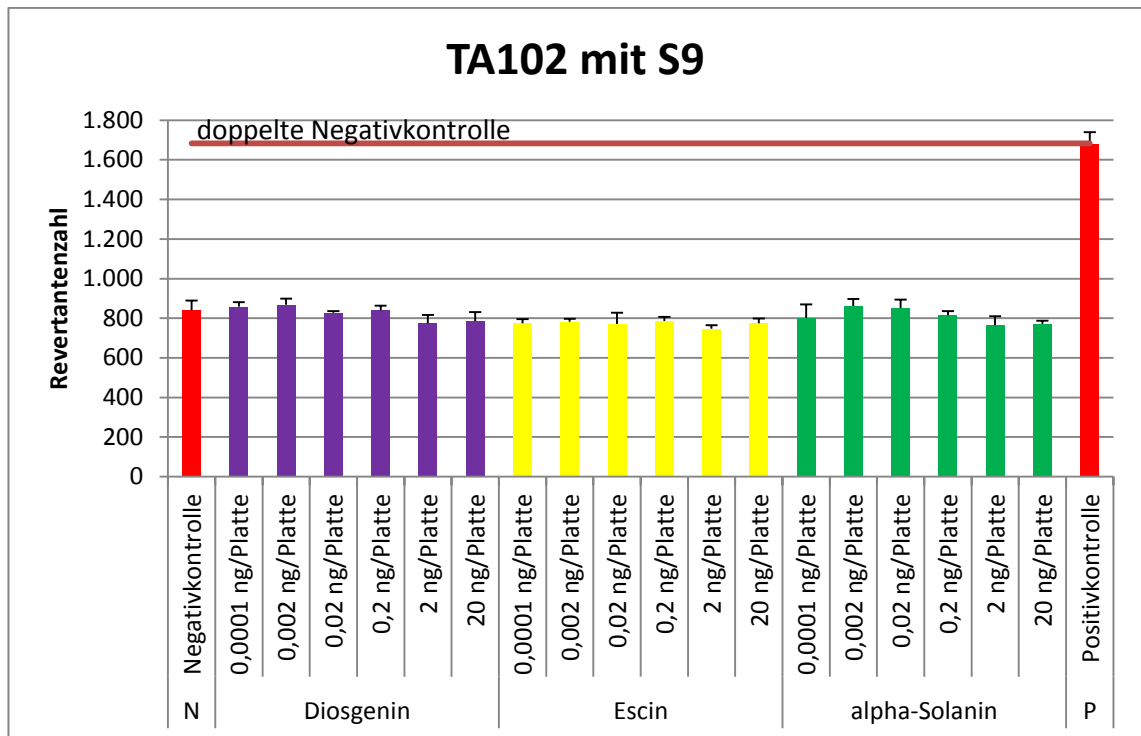


Abbildung 22: Ergebnisse TA 102_mit S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und alpha-Solanin

Wie in Abbildung 22 dargestellt, erreicht auch hier keine der getesteten Substanzen die doppelte Negativkontrolle. Des Weiteren ist keine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten, alle Werte liegen in einem ähnlichen Bereich.

Letztendlich zeigt die nachstehende Abbildung 23 noch die Ergebnisse von Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure aus der Testreihe TA 102 mit S9.

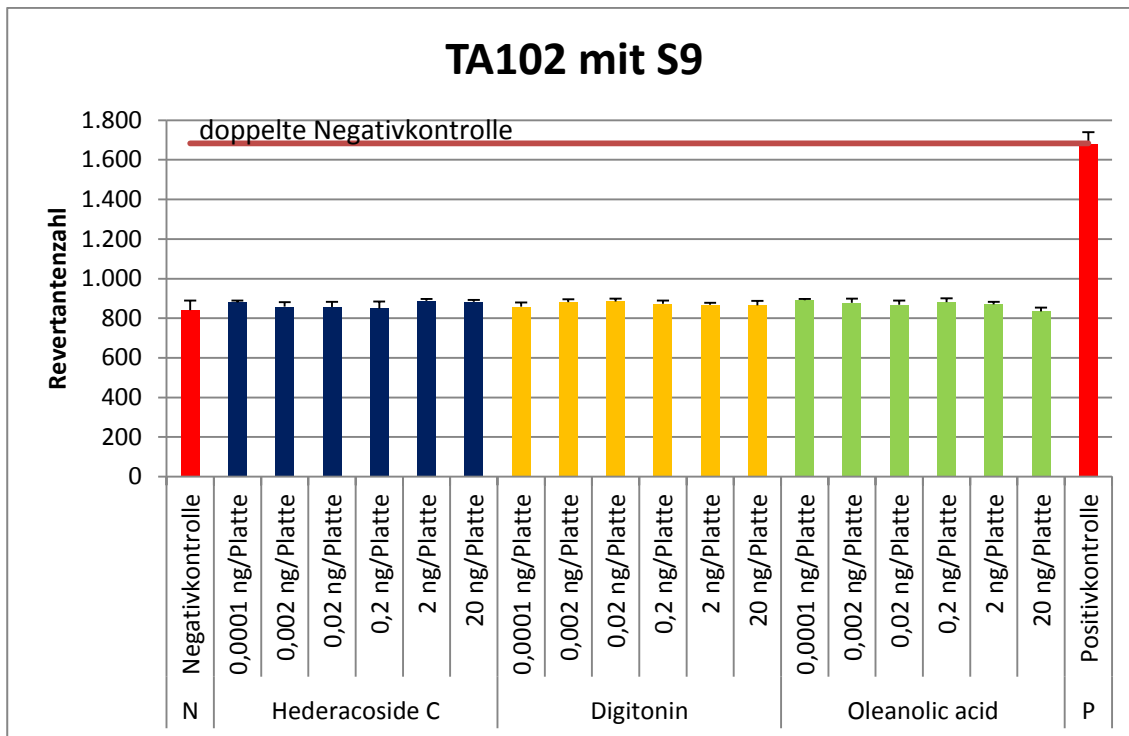


Abbildung 23: Ergebnisse TA 102_mit S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure

Auch hier (Abbildung 23) erreicht kein Ergebnis den doppelten Wert der Negativkontrolle und es ist keine Konzentrationsabhängigkeit ersichtlich. Es zeigt sich ein homogenes Bild aller ermittelten Daten.

Abschließend betrachtet, weist keine der überprüften sechs Substanzen ein mutagenes beziehungsweise oxidatives Potential auf.

10 Conclusio

Bei Saponinen handelt es sich um, in Pflanzen vorkommende Glykoside, die aufgrund ihrer physikalisch-chemischen und auch physiologischen Eigenschaften zu einer Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe gezählt werden [WATZL, 2001]. Ihre Verbreitung ist im Pflanzenreich sehr weitläufig, da sie in mehr als 100 Pflanzengattungen bekannt sind [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]. Zu den wesentlichsten Nahrungsquellen von Saponinen zählen unter anderem Leguminosen, Hafer, Alliumarten, Spargel, Tee, Spinat, Zuckerrübe und Yam [ÖZLEM und MAZZA, 2007]. Ihre strukturelle Komplexität ergibt sich durch eine Reihe von physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften.

Saponine können bei Parasiten, Weichtieren und Fischen toxisch wirken. Bei Warmblütlern ist ihre Toxizität abhängig von der Art der Verabreichung, der Herkunft, sowie auch der Zusammensetzung und Konzentration der Saponinmischung [ÖZLEM und MAZZA, 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde das mutagene beziehungsweise oxidative Potential sechs verschiedener Saponine mittels Ames Test ermittelt. Getestet wurden die Substanzen Diosgenin, Digitonin, Escin, Hederacosid C, alpha-Solanin und Oleanolsäure. Bekanntlich weist das Saponin Digitonin in höheren Konzentrationen zytotoxische Wirkungen auf [EID et al., 2012]. Alpha-Solanin ist ein von Natur aus produziertes Toxin [LANGKILDE et al., 2012], für welches bisher keine Grenzwerte festgelegt wurden [BALTES und MATISSEK, 2011].

In einer Studie von Ramos et al. (1998) wurden Extrakte von *Calendula officinalis* L. mittels Ames Test auf deren Mutagenität/Antimutagenität überprüft. Das Steroidsaponine DT-13 wurde von Ma et al. (2011) mittels Ames-Test getestet. Bis dato ist nicht mehr publizierte Literatur über dieses Themengebiet (Saponine und Ames Test) bekannt.

Der Ames Test wurde in den vergangenen zwei Jahrzehnten reichlich verwendet, um das mutagene Potential von vielen verschiedenen Substanzen zu überprüfen [GEE et al., 1994]. Dabei handelt es sich um einen Kurzzeit-Bakterien Rückmutationstest, der 1964 von Bruce Ames entwickelt wurde. Ein Vorteil dieses in-vitro Tests ist, dass er schnell und kostengünstig durchgeführt werden kann. Einige Substanzen können allerdings erst durch Metabolisierung ihre mutagene Wirkung entfalten, deshalb wird beim Ames Test zusätzlich ein Rattenleberhomogenat (S9) als exogenes Aktivierungssystem verwendet, da es den Bakterien fehlt [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

Meine Kollegin Mag. Michaela Kreuml untersuchte im Zuge ihrer Dissertation Saponine in Oberflächengewässern mittels LC-MS/MS. Die von ihr gemessenen Ergebnisse, dienten als Grundlage für den im Ames Test verwendeten Konzentrationsbereich.

Die Saponin-Proben wurden in Methanol-Wasser Gemischen (bei einer Konzentration von 20 ng/Platte – 100 ng/ml – betrug der MeOH-Anteil 0,5 µl) gelöst. Alle verwendeten Saponine wurden in sechs verschiedenen Konzentrationen (0,0001, 0,002, 0,02, 0,2, 2 und 20 ng/Platte) auf den Salmonella Typhimurium Stämmen TA 98 und TA 102 mittels Präinkubationstest mit und ohne metabolischer Aktivierung getestet. Davor wurden die Bakterienstämme mittels Genetischer Analyse überprüft und die Anzahl der Spontanrevertanten festgelegt.

Ausgewertet wurden die Daten mittels Microsoft Excel 2010 und SPSS 19, sowie einer nicht-statistischen Methode nach MORTELMANS und ZEIGER, 2000 die typisch für den Ames Test ist.

Die Testergebnisse des Bakterienstammes TA 98 ohne metabolische Aktivierung zeigten, dass sich alle überprüften Konzentrationen nicht von der Negativkontrolle unterschieden. Die Mittelwerte aller getesteten Substanzen und Konzentrationen lagen deutlich unter dem doppelten Wert der

Negativkontrolle. Es konnte zwischen den verwendeten Konzentrationen kein signifikanter Unterschied eruiert werden, infolgedessen war auch keine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten. Demzufolge sind alle sechs überprüften Saponine im Testansatz TA 98 ohne S9 als nicht mutagen einzustufen.

Ähnliche Ergebnisse lieferte der Testansatz TA 98 mit metabolischer Aktivierung. Die ermittelten durchschnittlichen Werte zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle auf. Es konnte lediglich beobachtet werden, dass die Revertantenzahlen im Mittel etwas höher waren, als im Vergleich zum Testansatz TA 98 ohne metabolischer Aktivierung. Was jedoch keinen Einfluss auf das Endergebnis hat, da wiederum alle Saponinen in den getesteten Konzentrationen unter der doppelten Negativkontrolle lagen. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte auch nicht beobachtet werden, alle Revertantenzahlen lagen etwa im selben Bereich.

Die Daten des durchgeführten Tests mittels Bakterienstamm TA 102 ohne metabolischer Aktivierung zeigen, dass bei einigen getesteten Konzentrationen ein statistisch signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle ermittelt werden konnte. Bei genauerer Betrachtung war allerdings zu sehen, dass auch in diesem Ansatz bei weitem nicht der Wert der zweifachen Negativkontrolle erreicht wurde. Demgemäß konnte kein mutagenes und oxidatives Potential der sechs getesteten Saponine nachgewiesen werden.

Der letzte durchgeführte Testansatz TA 102 mit S9 ergab auch keine positiven Ergebnisse. Wie auch schon davor ohne metabolischer Aktivierung waren auch in dieser Testreihe einige Werte zu beobachten, die sich signifikant von Negativkontrolle unterscheiden, jedoch nicht in der doppelten Menge. Auch bei diesem durchgeführten Test lag die Revertantenzahl etwas höher als im Vergleich zum Selben ohne metabolischer Aktivierung. Es zeigt sich ein sehr homogenes Bild aller ermittelten Daten. Alle getesteten Konzentrationen und

Negativkontrollen unterscheiden sich immer signifikant ($p < 0,001$) von der jeweiligen Positivkontrolle.

Abschließend betrachtet, weist keine der überprüften sechs Substanzen ein mutagenes beziehungsweise oxidatives Potential auf.

11 Zusammenfassung

Saponine sind in Pflanzen vorkommende Glykoside, die zu den sekundären Pflanzenstoffen gezählt werden, allerdings produzieren einige dieser Verbindungen Toxine.

In der vorliegenden Arbeit wurde das mutagene beziehungsweise oxidative Potential sechs verschiedener Saponine (Diosgenin, Digitonin, Escin, Hederacosid C, alpha-Solanin und Oleanolsäure) mittels Ames Test untersucht. Die Proben wurden in einem Methanol-Wasser Gemisch gelöst. Alle verwendeten Saponine wurden in sechs Konzentrationen (0,0001, 0,002, 0,02, 0,2, 2 und 20 ng/Platte) mit den Salmonella Typhimurium Stämmen TA 98 und TA 102 sowohl mit als auch ohne metabolischer Aktivierung getestet. Der verwendete Konzentrationsbereich wurde an die Ergebnisse angepasst, welche meine Kollegin Mag. Michaela Kreuml bei der Untersuchung von Saponinen in Oberflächengewässern und zum Teil auch in Abwässern mittels LC-MS/MS erzielte. Davor wurden die Bakterienstämme mittels Genetischer Analyse auf ihre jeweiligen Kriterien überprüft.

Die Testergebnisse aller durchgeführten Tests (TA 98 und TA 102 mit und ohne S9) zeigten, dass sich alle überprüften Substanzen und Konzentrationen zwar von der jeweiligen Positivkontrolle nicht aber von der Negativkontrolle unterscheiden. Die Mittelwerte aller getesteten Substanzen und Konzentrationen lagen unter dem doppelten Wert der Negativkontrolle. Zwischen den überprüften Konzentrationen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied eruiert werden, infolgedessen war auch keine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten.

Zusammengefasst konnte keine der überprüften sechs Substanzen ein mutagenes beziehungsweise oxidatives Potential im Ames Test aufweisen.

12 Summary

Saponins are glycosides in plants, which belong to the group of phytochemicals. However, some of them are able to produce toxins.

In the present study the mutagenic and oxidative potential of six different saponins (diosgenin, digitonin, hederacoside C, alpha-solanine and oleanolic acid) was examined in the Ames Test. The samples were dissolved in a methanol-water mixture. All saponins were tested in six concentrations (0,0001, 0,002, 0,02, 0,2, 2 and 20 ng/plate) with the Salmonella Typhimurium tester strains TA 98 and TA 102 with and without metabolic activation. The utilized concentration range was adjusted to the results, which my colleague Mag. Michaela Kreuml achieved in the investigation of saponins in surface waters. Previously, the bacterial strains were determined by genetic analysis tested for their respective criteria.

The outcomes of all tests (TA 98 and TA 102 with and without S9) showed that there is always a significant difference to the positive control but no difference among all verified substances and concentrations to the negative control. The mean values of all tested substances and concentrations were below the doubled value of the negative control. Between the examined concentrations also no significant difference could be observed.

In conclusion it can be said that none of the examined six substances have a mutagenic or oxidative potential in the Ames Test.

13 Referenzen

AMES BN. LEE FD. DURSTON WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1973; 70:782-786

AUGUSTIN JM. KUZINA V. ANDERSEN S. BAK S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. Phytochemistry. 2011; 72:435-457

BALTES W. MATISSEK R. Lebensmittelchemie. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2011

BASU N. RASTOGI RP. Triterpenoid Saponins and Sapogenins. Phytochemistry. 1967; 6:1249-1270

BÖTTGER S. HOFMANN K. MELZIG M. Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation?. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2012; 20:2822–2828

EID S. EL-READI M. WINK M. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. Phytomedicine. 2012; 19:1307-1314

ELMADFA I. Ernährungslehre. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart, 2004

GAILLARD Y. BLAISE P. DARRÉ A. BARBIER T. PÉPIN G. An Unusual Case of Death: Suffocation Caused by leaves of Common Ivy (*Hedera helix*). Detection of Hederacoside C, α -Hederin and Hederagenin by LC-ESI/MS-MS. Journal of Analytical Toxicology. 2003; Vol. 27

GEE P. MARON DM. AMES BN. Detection and classification of mutagens: A set of base-specific *Salmonella* tester strains. Genetics. 1994; 91:11606-11610

HOSTETTMANN K. MARSTON A. Saponins. Cambridge University Press, Cambridge, New York, 1995

LANGKILDE S. SCHRODER M. FRANK T. SHEPHERD L. CONNER S. DAVIES H. MEYER O. DANIER J. RYCHLIK M. BELKNAP W. MCCUE K. ENGEL KH. STEWART D. KNUDSEN I. POULSEN M. Compositional and toxicological analysis of a GM potato line with reduced α -solanine content – A 90-day feeding study in the Syrian Golden hamster. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2012; 64:177-185

MA S. KOU J. YU B. Safety evaluation of steroidal saponin DT-13 isolated from the tuber of *Liriope muscari* (Decne.) Baily. *Food and Chemical Toxicology*. 2011; 49:2243-2251

MARON DM. AMES BN. (1984): Revised Methods for the Salmonella mutagenicity test. In: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. (Kilbey, B.J. et al. Hrsg.) Elsevier Science Publishers BV

MÖLZER C. Anti-/Mutagenic and Anti-/Oxidative potential of heating products based on alanin, dextrin 10, glucose and maltose (Diplomarbeit). 2007

MORTELMANS K, ZEIGER E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*. 2000; 455:29-60

MU S. TIAN X. RUAN Y. LIU Y. BIAN D. MA CH. YU CH. FENG M. WANG F. GAO L. ZHAO J. Diosgenin induces apoptosis in IGF-1-stimulated human thyrocytes through two caspase-dependent pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012; 418:247-352

NUHN P. LUDGES W. *Naturstoffchemie. Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*. S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 2006

ÖZLEM G, MAZZA G. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Food Science and Nutrition*. 2007; 47:231-258

POLLIER J. GOOSSENS A. Oleanolic acid. *Phytochemistry*. 2012; 77:10-15

RAMOS A. EDREIRA A. VIZOSO A. BETANCOURT J. LÓPEZ M. DÉCALO M. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 61:49-55

SIRTORI C. Aescin: Pharmacology, Pharmacokinetics and Therapeutic Profile. Pharmacological Research. 2001; 44:3

SPARG S.G, LIGHT M.E, STADEN J. Biological activities and distribution of plant saponins. Journal of Ethnopharmacology. 2004; 94:219–243

WATZL B. Saponine: Charakteristik, Vorkommen, Aufnahme, Stoffwechsel, Wirkungen. Ernährungs-Umschau. 2001; 48:Heft 6

WATZL B, LEITZMANN C. Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, 1999

VINCKEN J.P, HENG L, GROOT A, GRUPPEN H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry. 2007; 68:275-297

ZHOU X. FU F. LI Z. DONG Q. HE J. WANG CH. Escin, a Natural Mixture of Triterpene Saponins, Exhibits Antitumor Activity Against Hepatocellular Carcinoma. Planta Med. 2009; 75:1580-1585

Auswertung Testergebnisse TA 98_-S9

Negativ	44	32	43	46	Positiv	228	238	175	172
Negativ	45	23	46	25	Positiv	219	267	176	191
Negativ	44	34	51	37	Positiv	220	271	179	189
Negativ	32	29	45	37					
Negativ	33	27	37	37					
Negativ	29	33	25	25					

Negativ Gesamt	MW	35,79	Positiv Gesamt	MW	210,42
STABW	8,16		STABW	35,48	

Substanz 4 --> Hederacoside C

TEST Nr. 2.1	S4 K1	31	S4 K2	31	S4 K3	26	S4 K4	24	S4 K5	39	S4 K6	44
	S4 K1	32	S4 K2	22	S4 K3	32	S4 K4	26	S4 K5	46	S4 K6	41
	S4 K1	28	S4 K2	27	S4 K3	33	S4 K4	26	S4 K5	38	S4 K6	41
TEST Nr. 2.2	S4 K1	34	S4 K2	40	S4 K3	38	S4 K4	40	S4 K5	29	S4 K6	37
	S4 K1	36	S4 K2	52	S4 K3	35	S4 K4	40	S4 K5	31	S4 K6	33
	S4 K1	36	S4 K2	39	S4 K3	36	S4 K4	28	S4 K5	29	S4 K6	27
TEST 2.1 + 2.2	MW	32,83	MW	35,17	MW	33,33	MW	30,67	MW	35,33	MW	37,17
TEST 3.1 + 3.2	STABW	3,13	STABW	10,76	STABW	4,18	STABW	7,34	STABW	6,83	STABW	6,27

Substanz 5 --> Digitonin

TEST Nr. 2.1	S5 K1	19	S5 K2	28	S5 K3	22	S5 K4	31	S5 K5	36	S5 K6	43
	S5 K1	30	S5 K2	22	S5 K3	34	S5 K4	22	S5 K5	44	S5 K6	27
	S5 K1	21	S5 K2	28	S5 K3	23	S5 K4	30	S5 K5	34	S5 K6	29
TEST Nr. 2.2	S5 K1	35	S5 K2	30	S5 K3	37	S5 K4	26	S5 K5	23	S5 K6	26
	S5 K1	48	S5 K2	37	S5 K3	33	S5 K4	26	S5 K5	21	S5 K6	24
	S5 K1	33	S5 K2	30	S5 K3	28	S5 K4	37	S5 K5	35	S5 K6	23
TEST 2.1 + 2.2	MW	31,00	MW	29,17	MW	29,50	MW	28,67	MW	32,17	MW	28,67
TEST 3.1 + 3.2	STABW	10,53	STABW	4,83	STABW	6,16	STABW	5,20	STABW	8,66	STABW	7,34

Substanz 6 --> Oleanolic Acid

TEST Nr. 2.1	S6 K1	32	S6 K2	22	S6 K3	23	S6 K4	25	S6 K5	40	S6 K6	33
	S6 K1	24	S6 K2	15	S6 K3	32	S6 K4	16	S6 K5	42	S6 K6	36
	S6 K1	21	S6 K2	31	S6 K3	30	S6 K4	37	S6 K5	47	S6 K6	29
TEST Nr. 2.2	S6 K1	32	S6 K2	44	S6 K3	43	S6 K4	27	S6 K5	37	S6 K6	31
	S6 K1	24	S6 K2	38	S6 K3	38	S6 K4	35	S6 K5	36	S6 K6	37
	S6 K1	30	S6 K2	34	S6 K3	38	S6 K4	21	S6 K5	31	S6 K6	30
TEST 2.1 + 2.2	MW	27,17	MW	30,67	MW	34,00	MW	26,83	MW	38,83	MW	32,67
TEST 3.1 + 3.2	STABW	4,75	STABW	10,61	STABW	7,13	STABW	8,06	STABW	5,49	STABW	3,27

14.2 Testergebnisse TA 98_mit S9

Auswertung Testergebnisse TA 98_+S9

[illegible]

Substanz 1 --> Diosgenin

TEST Nr. 1.1	S1 K1	59	S1 K2	47	S1 K3	49	S1 K4	51	S1 K5	51	S1 K6	62
TEST Nr. 1.2	S1 K1	54	S1 K2	55	S1 K3	47	S1 K4	56	S1 K5	62	S1 K6	66
	S1 K1	77	S1 K2	71	S1 K3	61	S1 K4	52	S1 K5	65	S1 K6	61
	S1 K1	74	S1 K2	73	S1 K3	93	S1 K4	84	S1 K5	70	S1 K6	59
	S1 K1	87	S1 K2	68	S1 K3	96	S1 K4	87	S1 K5	74	S1 K6	69
TEST 1.1 + 1.2	S1 K1	89	S1 K2	74	S1 K3	86	S1 K4	89	S1 K5	76	S1 K6	70
	MW	73,33	MW	64,67	MW	72,00	MW	69,83	MW	66,33	MW	64,50
	STABW	14,32	STABW	11,08	STABW	22,31	STABW	18,58	STABW	9,18	STABW	4,51

Substanz 2 --> Escin

TEST Nr. 1.1	S2 K1	54	S2 K2	48	S2 K3	61	S2 K4	55	S2 K5	61	S2 K6	79	WH
	S2 K1	52	S2 K2	50	S2 K3	45	S2 K4	68	S2 K5	49	S2 K6	50	
	S2 K1	54	S2 K2	41	S2 K3	56	S2 K4	69	S2 K5	64	S2 K6	38	
	S2 K1	70	S2 K2	74	S2 K3	78	S2 K4	68	S2 K5	63	S2 K6	68	
	S2 K1	79	S2 K2	69	S2 K3	66	S2 K4	101	S2 K5	58	S2 K6	48	
	S2 K1	41	S2 K2	80	S2 K3	63	S2 K4	77	S2 K5	60	S2 K6	38	
TEST 1.1 + 1.2	MW	58,33	MW	60,33	MW	61,50	MW	73,00	MW	59,17	MW	53,50	54,67
	STARW	13,72	STARW	16,01	STARW	10,93	STARW	15,43	STARW	5,42	STARW	16,63	9,24

Substanz 3 --> α -Solanin

TEST Nr. 1.1	S3 K1	61	S3 K2	62	S3 K3	59	S3 K4	63	S3 K5	70	S3 K6	60
	S3 K1	56	S3 K2	55	S3 K3	71	S3 K4	54	S3 K5	53	S3 K6	58
	S3 K1	49	S3 K2	57	S3 K3	65	S3 K4	51	S3 K5	56	S3 K6	66
	S3 K1	66	S3 K2	61	S3 K3	80	S3 K4	84	S3 K5	76	S3 K6	78
	S3 K1	84	S3 K2	68	S3 K3	58	S3 K4	72	S3 K5	68	S3 K6	76
	S3 K1	74	S3 K2	28	S3 K3	75	S3 K4	82	S3 K5	67	S3 K6	56
TEST 1.1 + 1.2	MW	65,00	MW	55,17	MW	68,00	MW	67,67	MW	65,00	MW	65,67
	STABW	12,62	STABW	14,05	STABW	8,85	STABW	13,98	STABW	8,76	STABW	9,42

14.3 Testergebnisse TA 102_ohne S9

Auswertung Testergebnisse TA 102_-S9

Negativ	704	709	648	659	Positiv	1484	1405	1398	1246
Negativ	751	722	558	646	Positiv	1497	1386	1383	1251
Negativ	824	721	557	662	Positiv	1377	1439	1236	1234
Negativ	807	739	659	649					
Negativ	722	705	564	643					
Negativ	743	667	542	633					
Negativ Gesamt	MW	676,42	676,42	Positiv Gesamt	MW	1361,33			
	STABW	74,28	74,28		STABW	96,04			

Substanz 1 --> Diosgenin

TEST Nr. 1.1	S1 K1	737	S1 K2	751	S1 K3	814	S1 K4	795	S1 K5	639	S1 K6	647
	S1 K1	747	S1 K2	727	S1 K3	744	S1 K4	694	S1 K5	586	S1 K6	654
	S1 K1	704	S1 K2	733	S1 K3	776	S1 K4	781	S1 K5	641	S1 K6	663
TEST Nr. 1.2	S1 K1	729	S1 K2	739	S1 K3	744	S1 K4	732	S1 K5	668	S1 K6	667
	S1 K1	721	S1 K2	724	S1 K3	748	S1 K4	743	S1 K5	684	S1 K6	673
	S1 K1	703	S1 K2	713	S1 K3	422	S1 K4	732	S1 K5	673	S1 K6	695
TEST 1.1 + 1.2	MW	723,50	MW	731,17	MW	708,00	MW	746,17	MW	648,50	MW	666,50
TEST 3.1 + 3.2	STABW	17,73	STABW	13,09	STABW	142,72	STABW	36,69	STABW	35,48	STABW	16,75

Substanz 2 --> Escin

TEST Nr. 1.1	S2 K1	797	S2 K2	902	S2 K3	841	S2 K4	933	S2 K5	644	S2 K6	721
	S2 K1	791	S2 K2	839	S2 K3	974	S2 K4	891	S2 K5	671	S2 K6	588
	S2 K1	837	S2 K2	842	S2 K3	916	S2 K4	838	S2 K5	689	S2 K6	541
TEST Nr. 1.2	S2 K1	753	S2 K2	744	S2 K3	765	S2 K4	807	S2 K5	721	S2 K6	703
	S2 K1	744	S2 K2	747	S2 K3	801	S2 K4	819	S2 K5	702	S2 K6	720
	S2 K1	741	S2 K2	678	S2 K3	754	S2 K4	794	S2 K5	737	S2 K6	663
TEST 1.1 + 1.2	MW	777,17	MW	792,00	MW	841,83	MW	847,00	MW	694,00	MW	656,00
TEST 3.1 + 3.2	STABW	37,83	STABW	82,62	STABW	87,47	STABW	54,05	STABW	33,75	STABW	75,40

Substanz 3 --> alpha-Solanin

TEST Nr. 1.1	S3 K1	733	S3 K2	812	S3 K3	867	S3 K4	816	S3 K5	647	S3 K6	639
	S3 K1	796	S3 K2	778	S3 K3	862	S3 K4	844	S3 K5	656	S3 K6	646
	S3 K1	775	S3 K2	673	S3 K3	854	S3 K4	805	S3 K5	644	S3 K6	621
TEST Nr. 1.2	S3 K1	806	S3 K2	827	S3 K3	702	S3 K4	273	S3 K5	671	S3 K6	689
	S3 K1	783	S3 K2	799	S3 K3	858	S3 K4	780	S3 K5	689	S3 K6	681
	S3 K1	764	S3 K2	803	S3 K3	794	S3 K4	718	S3 K5	701	S3 K6	693
TEST 1.1 + 1.2	MW	776,17	MW	782,00	MW	822,83	MW	706,00	MW	668,00	MW	661,50
TEST 3.1 + 3.2	STABW	25,86	STABW	55,77	STABW	65,00	STABW	216,36	STABW	23,24	STABW	30,05

Auswertung Testergebnisse TA 102_-S9

Negativ	704	709	648	659	Positiv	1484	1405	1398	1246
Negativ	751	722	558	646	Positiv	1497	1386	1383	1251
Negativ	824	721	557	662	Positiv	1377	1439	1236	1234
Negativ	807	739	659	649					
Negativ	722	705	564	643					
Negativ	743	667	542	633					
Negativ Gesamt		MW	676,42	Positiv Gesamt	MW	1361,33			
		STAB	74,28		STAB	96,04			

Substanz 4 --> Hederacoside C

TEST Nr. 2.1	S4 K1	664	S4 K2	663	S4 K3	653	S4 K4	635	S4 K5	617	S4 K6	682
	S4 K1	605	S4 K2	353	S4 K3	645	S4 K4	626	S4 K5	668	S4 K6	665
	S4 K1	654	S4 K2	667	S4 K3	632	S4 K4	635	S4 K5	665	S4 K6	689
TEST Nr. 2.2	S4 K1	649	S4 K2	637	S4 K3	653	S4 K4	658	S4 K5	711	S4 K6	695
	S4 K1	655	S4 K2	658	S4 K3	649	S4 K4	663	S4 K5	729	S4 K6	714
	S4 K1	648	S4 K2	334	S4 K3	656	S4 K4	631	S4 K5	706	S4 K6	693
TEST 2.1 + 2.2	MW	645,83	MW	552,00	MW	648,00	MW	641,33	MW	682,67	MW	689,67
TEST 3.1 + 3.2	STABW	20,80	STABW	161,95	STABW	8,72	STABW	15,29	STABW	40,82	STABW	16,12

Substanz 5 --> Digitonin

TEST Nr. 2.1	S5 K1	685	S5 K2	672	S5 K3	629	S5 K4	674	S5 K5	669	S5 K6	633
	S5 K1	632	S5 K2	689	S5 K3	630	S5 K4	651	S5 K5	646	S5 K6	646
	S5 K1	658	S5 K2	642	S5 K3	618	S5 K4	536	S5 K5	562	S5 K6	661
TEST Nr. 2.2	S5 K1	661	S5 K2	679	S5 K3	693	S5 K4	648	S5 K5	704	S5 K6	688
	S5 K1	688	S5 K2	666	S5 K3	632	S5 K4	215	S5 K5	735	S5 K6	686
	S5 K1	656	S5 K2	657	S5 K3	632	S5 K4	661	S5 K5	705	S5 K6	498
TEST 2.1 + 2.2	MW	663,33	MW	667,50	MW	639,00	MW	564,17	MW	670,17	MW	635,33
TEST 3.1 + 3.2	STABW	20,72	STABW	16,60	STABW	26,97	STABW	178,17	STABW	61,40	STABW	70,68

Substanz 6 --> Oleanolic Acid

TEST Nr. 2.1	S6 K1	646	S6 K2	658	S6 K3	643	S6 K4	627	S6 K5	613	S6 K6	675
	S6 K1	638	S6 K2	627	S6 K3	636	S6 K4	649	S6 K5	518	S6 K6	677
	S6 K1	639	S6 K2	638	S6 K3	641	S6 K4	654	S6 K5	644	S6 K6	671
TEST Nr. 2.2	S6 K1	650	S6 K2	662	S6 K3	676	S6 K4	659	S6 K5	556	S6 K6	686
	S6 K1	629	S6 K2	651	S6 K3	656	S6 K4	661	S6 K5	597	S6 K6	676
	S6 K1	649	S6 K2	642	S6 K3	666	S6 K4	632	S6 K5	617	S6 K6	615
TEST 2.1 + 2.2	MW	641,83	MW	646,33	MW	653,00	MW	647,00	MW	590,83	MW	666,67
TEST 3.1 + 3.2	STABW	8,04	STABW	13,16	STABW	15,75	STABW	14,27	STABW	45,95	STABW	25,79

14.4 Testergebnisse TA 102_mit S9

Auswertung Testergebnisse TA 102_+S9

Negativ	772	834	867	898	Positiv	1615	1617	1752	1734
Negativ	833	841	899	888	Positiv	1742	1657	1679	1620
Negativ	734	816	897	892	Positiv	1601	1692	1777	1648
Negativ	794	786	879	847					
Negativ	851	781	874	874					
Negativ	788 kaputt		888	816					
Negativ Gesamt	MW	841,26	841,26	Positiv Gesamt	MW	1677,83			
	STABW	47,87	47,87		STABW	61,07			

Substanz 1 --> Diosgenin

TEST Nr. 1.1	S1 K1	841	S1 K2	881	S1 K3	829	S1 K4	819	S1 K5	711	S1 K6	747
	S1 K1	878	S1 K2	907	S1 K3	825	S1 K4	835	S1 K5	773	S1 K6	759
	S1 K1	827	S1 K2	896	S1 K3	842	S1 K4	827	S1 K5	756	S1 K6	732
TEST Nr. 1.2	S1 K1	863	S1 K2	825	S1 K3	817	S1 K4	819	S1 K5	828	S1 K6	827
	S1 K1	887	S1 K2	871	S1 K3	823	S1 K4	855	S1 K5	761	S1 K6	809
	S1 K1	859	S1 K2	843	S1 K3	829	S1 K4	881	S1 K5	815	S1 K6	841
TEST 1.1 + 1.2	MW	859,17	868,83	827,50	MW	827,50	MW	839,33	MW	774,00	MW	785,83
	STABW	22,40	29,98	8,38	STABW	8,38	STABW	24,41	STABW	42,57	STABW	45,61

Substanz 2 --> Escin

TEST Nr. 1.1	S2 K1	773	S2 K2	799	S2 K3	733	S2 K4	776	S2 K5	733	S2 K6	798
	S2 K1	747	S2 K2	788	S2 K3	729	S2 K4	771	S2 K5	764	S2 K6	792
	S2 K1	798	S2 K2	767	S2 K3	737	S2 K4	764	S2 K5	775	S2 K6	787
TEST Nr. 1.2	S2 K1	780	S2 K2	782	S2 K3	799	S2 K4	781	S2 K5	741	S2 K6	773
	S2 K1	797	S2 K2	796	S2 K3	875	S2 K4	817	S2 K5	731	S2 K6	732
	S2 K1	752	S2 K2	763	S2 K3	753	S2 K4	808	S2 K5	735	S2 K6	768
TEST 1.1 + 1.2	MW	774,50	782,50	771,00	MW	771,00	MW	786,17	MW	746,50	MW	775,00
	STABW	21,70	14,87	57,08	STABW	57,08	STABW	21,35	STABW	18,46	STABW	23,93

Substanz 3 --> α-Solanin

TEST Nr. 1.1	S3 K1	746	S3 K2	856	S3 K3	826	S3 K4	833	S3 K5	807	S3 K6	754
	S3 K1	773	S3 K2	815	S3 K3	818	S3 K4	828	S3 K5	741	S3 K6	769
	S3 K1	738	S3 K2	829	S3 K3	802	S3 K4	814	S3 K5	835	S3 K6	795
TEST Nr. 1.2	S3 K1	884	S3 K2	900	S3 K3	879	S3 K4	811	S3 K5	741	S3 K6	756
	S3 K1	908	S3 K2	899	S3 K3	894	S3 K4	894	S3 K5	731	S3 K6	773
	S3 K1	866	S3 K2	871	S3 K3	896	S3 K4	875	S3 K5	735	S3 K6	781
TEST 1.1 + 1.2	MW	819,17	861,67	852,50	MW	852,50	MW	814,33	MW	765,00	MW	771,33
	STABW	75,31	35,29	41,86	STABW	41,86	STABW	21,01	STABW	44,43	STABW	15,47

Auswertung Testergebnisse TA 102_ +S9

Negativ	772	834	867	898	Positiv	1615	1617	1752	1734
Negativ	833	841	899	888	Positiv	1742	1657	1679	1620
Negativ	734	816	897	892	Positiv	1601	1692	1777	1648
Negativ	794	786	879	847					
Negativ	851	781	874	874					
Negativ	788 kaputt		888	816					
Negativ Gesamt	MW	841,26	Positiv Gesamt	MW	1677,83				
	STABW	47,87		STABW	61,07				

Substanz 4 --> Hederacoside C

TEST Nr. 2.1	S4 K1	884	S4 K2	844	S4 K3	865	S4 K4	831	S4 K5	891	S4 K6	882
	S4 K1	882	S4 K2	875	S4 K3	886	S4 K4	869	S4 K5	873	S4 K6	895
	S4 K1	867	S4 K2	890	S4 K3	871	S4 K4	899	S4 K5	nicht auswertbar	S4 K6	872
TEST Nr. 2.2	S4 K1	869	S4 K2	832	S4 K3	815	S4 K4	839	S4 K5	882	S4 K6	892
	S4 K1	893	S4 K2	843	S4 K3	841	S4 K4	807	S4 K5	897	S4 K6	885
	S4 K1	884	S4 K2	871	S4 K3	869	S4 K4	895	S4 K5	895	S4 K6	875
TEST 2.1 + 2.2	MW	879,83	MW	859,17	MW	857,83	MW	849,00	MW	887,60	MW	883,50
	STABW	9,95	STABW	22,68	STABW	25,54	STABW	35,67	STABW	9,99	STABW	9,09

Substanz 5 --> Digitonin

TEST Nr. 2.1	S5 K1	693	S5 K2	894	S5 K3	878	S5 K4	873	S5 K5	931	S5 K6	886
	S5 K1	865	S5 K2	861	S5 K3	883	S5 K4	851	S5 K5	866	S5 K6	860
	S5 K1	876	S5 K2	888	S5 K3	894	S5 K4	887	S5 K5	858	S5 K6	855
TEST Nr. 2.2	S5 K1	877	S5 K2	867	S5 K3	899	S5 K4	897	S5 K5	863	S5 K6	830
	S5 K1	828	S5 K2	888	S5 K3	894	S5 K4	858	S5 K5	870	S5 K6	868
	S5 K1	846	S5 K2	892	S5 K3	861	S5 K4	870	S5 K5	884	S5 K6	891
TEST 2.1 + 2.2	MW	830,83	MW	881,67	MW	884,83	MW	872,67	MW	878,67	MW	865,00
	STABW	70,11	STABW	14,01	STABW	14,05	STABW	17,26	STABW	27,11	STABW	22,25

Substanz 6 --> Oleanolic Acid

TEST Nr. 2.1	S6 K1	877	S6 K2	895	S6 K3	873	S6 K4	881	S6 K5	883	S6 K6	816
	S6 K1	893	S6 K2	884	S6 K3	896	S6 K4	892	S6 K5	879	S6 K6	836
	S6 K1	896	S6 K2	842	S6 K3	866	S6 K4	902	S6 K5	858	S6 K6	844
TEST Nr. 2.2	S6 K1	894	S6 K2	893	S6 K3	839	S6 K4	890	S6 K5	852	S6 K6	843
	S6 K1	895	S6 K2	875	S6 K3	852	S6 K4	879	S6 K5	871	S6 K6	860
	S6 K1	889	S6 K2	516	S6 K3	886	S6 K4	847	S6 K5	880	S6 K6	812
TEST 2.1 + 2.2	MW	890,67	MW	817,50	MW	868,67	MW	881,83	MW	870,50	MW	835,17
	STABW	7,12	STABW	148,95	STABW	21,13	STABW	18,97	STABW	12,79	STABW	18,23

15 Lebenslauf

Persönliche Daten

Julia Rath, Bakk.

Vornholz 183, 8250 Voralpe (Steiermark)

geboren am 15.10.1987 in Graz, Steiermark



Ausbildung

2011-2013:	Masterstudium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien
2007-2011:	Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften, Universität Wien
2002-2007:	Matura - HBLA für Tourismus, Oberwart

Praktika

Juli 2011:	MA 38 - Lebensmitteluntersuchungsanstalt Wien
12/2010-01/2011:	Praktikum Österreichische Gesellschaft f. Ernährung
Juli-August 2007:	Serviceangestellte, Cafe Pub Zwoaradl in Voralpe Serviererin mit Inkasso
Juli-August 2006:	Serviceangestellte, Cafe Pub Julia in Voralpe Serviererin mit Inkasso
Juni-September 2005:	Reisebüroangestellte, Prima Reisen GmbH in Wien
Juni-September 2004:	Praktikum im Hotel im Palais Schwarzenberg in Wien Serviererin mit Inkasso

Studienbegleitende Jobs

seit Februar 2013:	Durchführung der Kinderkochwerkstatt Gourmet Group
seit März 2011:	Assistentin der Wiener Ernährungsakademie