



universität
wien

Diplomarbeit

Enzymkatalysierte Spaltung der Polysaccharide
aus den Samen von *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.

zur Erlangung

des akademischen Grades

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser: Susanne Schorn

Matrikelnummer: 9805955

Studienrichtung: Pharmazie

Betreuer: O. Univ.-Prof. Dr. Helmut Viernstein

Wien, am 8.1.2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	11
1.1 Hyptis suaveolens	11
1.1.1 Taxonomische Hierarchie.....	12
1.1.2 Traditionelle Verwendung.....	12
1.1.3 Chemische Zusammensetzung	13
1.1.3.1 Ätherisches Öl.....	13
1.1.3.2 Blätter.....	13
1.1.3.3 Samen.....	14
1.2 Probiotika, Präbiotika, Synbiotika	15
1.2.1 Probiotika.....	15
1.2.2 Präbiotika.....	15
1.2.3 Synbiotika.....	16
1.2.3.1 Prä-, Pro- und Synbiotika – Effekte und Hoffnungen	16
1.3 Mucilagen	17
1.4 Enzyme	18
1.4.1 Cellulase	18
1.4.1.1 Anwendungsmöglichkeiten von Cellulase	18
1.4.2 Hemicellulase	19
1.4.3 Pektinase.....	20
2 Forschungsstand, Forschungsdesign und Zielsetzung	23
2.1 Zielsetzung dieser Arbeit	25
3 Material und Methoden.....	27
3.1 Zentrifugation	27
3.2 Dialyse.....	27
3.3 Lyophilisation	28
3.4 Ionenaustauschchromatographie.....	28
3.5 Dünnschichtchromatographie.....	30
3.6 Größenausschlusschromatographie.....	31
3.7 UV/VIS-Absorptionsmessung.....	31

4 Ergebnisse	35
4.1 Extraktion und Trennung der Polysaccharide.....	35
4.1.1 Gewinnung der alkalilöslichen Fraktion	35
4.1.2 Zentrifugation.....	35
4.1.3 Neutralisation	35
4.1.4 Dialyse.....	36
4.1.5 Lyophilisation	36
4.1.6 Ionenaustauschchromatographie – Trennung in saures und neutrales Polysaccharid.....	36
4.1.6.1 Durchführung 1	36
4.1.6.2 Durchführung 2.....	39
4.2 HPLC-SEC der Polysaccharide.....	40
4.3 Hydrolyse des sauren Polysaccharides mit 1M Ameisensäure zur Gewinnung von Oligosacchariden.....	41
4.4 Bestimmung der Pentosen, Hexosen und Hexuronsäuren	43
4.4.1 Ohne vorherige Hydrolyse über Nacht mit 72 % Schwefelsäure	43
4.4.1.1 Colorimetrische Bestimmung der Pentosen – Fe-Orcinmethode	43
4.4.1.2 Colorimetrische Bestimmung der Hexosen – Anthronmethode	44
4.4.1.3 Colorimetrische Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren	46
4.4.1.4 Colorimetrische Bestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren	48
4.4.2 Mit vorangehender Hydrolyse über Nacht mit 72 % Schwefelsäure.....	50
4.4.2.1 Hydrolyse der alkalilöslichen Fraktion mit 72 % Schwefelsäure.....	50
4.4.2.2 Bestimmung der Pentosen	50
4.4.2.3 Bestimmung der Hexosen	51
4.4.2.4 Colorimetrische Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren	52
4.4.2.5 Colorimetrische Bestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren	53
4.4.2.6 Berechnung der im Gesamtpolysaccharid enthaltenen Hexosen, Pentosen und Hexuronsäuren	54
4.5 Spaltung der alkalilöslichen Fraktion aus <i>Hyptis suaveolens</i> mit Hemicellulase.....	54
4.6 Enzymkatalysierte Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Hemicellulase und anschließende Fällung der hochpolymeren Saccharide mit MeOH.....	60

4.7 Spaltung des sauren Polysaccharides mit Hemicellulase.....	63
4.8 Enzymkatalysierte Spaltung des neutralen Polysaccharides mit Hemicellulase	66
4.9 Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Cellulase	69
4.10 Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Pektinase	72
4.11 Vergleich der einzelnen enzymatischen Spaltungen	73
5 Diskussion	77
6 Literatur	81
6.1 Zeitschriften, Monografien und Sammelbände	81
6.2 Internetquellen.....	85
6.3 Unpublizierte Quellen	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomische Hierarchie von <i>Hyptis suaveolens</i>	12
Tabelle 2: Kommerziell verfügbare präbiotische Oligosaccharide (nach Rastall 2002).....	16
Tabelle 3: Standardreihe zur Pentosenbestimmung (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	43
Tabelle 4: Konzentrationsbestimmung an Pentosen (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	44
Tabelle 5: Standardreihe zur Hexosenbestimmung (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄).....	45
Tabelle 6: Konzentrationsbestimmung an Hexosen (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	46
Tabelle 7: Standardreihe zur Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	47
Tabelle 8: Konzentrationsbestimmung an Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄).....	47
Tabelle 9: Standardreihe zur Bestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	49
Tabelle 10: Konzentrationsbestimmung an Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	49
Tabelle 11: Standardreihe zur Pentosenbestimmung (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	50

Tabelle 12: Konzentrationsbestimmung an Pentosen (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	50
Tabelle 13: Standardreihe zur Hexosenbestimmung (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	51
Tabelle 14: Konzentrationsbestimmung an Hexosen (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	52
Tabelle 15: Standardreihe zur Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	52
Tabelle 16: Konzentrationsbestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	53
Tabelle 17: Standardreihe zur Bestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	53
Tabelle 18: Konzentrationsbestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Hyptis suaveolens</i> , Quelle: http://www.metafro.be/prelude/prelude_pic/Hyptis_suaveolens1.jpg (17.11.2008)	10
Abbildung 2: <i>Hyptis suaveolens</i> während der Blüte, Quelle: http://www.treknature.com/gallery/photo163682.htm	11
Abbildung 3: Funktionsweise des Cellulase-komplexes. Quelle: http://www.answers.com/topic/types-of-cellulase2-png-1	19
Abbildung 4: Funktionsweise der Hemicellulase. Quelle: (http://www.enzymeindia.com/enzymes/images2/hemicellulase-image.jpg)	20
Abbildung 5: Funktionsweise der Pektinase Quelle: (http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/19500/Pectinase_Pectinesterase.gif)	21
Abbildung 6: Schematischer Strukturausschnitt der Diethylaminoethylcellulose, Quelle: http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Bild:Diethylaminoethylcellulose.png&filetimestamp=20080930095222	29
Abbildung 7: Bildung eines Xanthon-Farbstoffes mit Pentosen, Quelle: http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/p32_rib_rna.htm	32
Abbildung 8: Reaktion von Anthron mit Hexosen; Quelle: Biochemische Übungen - KH/GF, Aufgabe 2: Quantifizierung von Sacchariden, Laborprotokoll	33
Abbildung 9: Nachweis der neutralen Fraktion des Polysaccharides	37
Abbildung 10: Nachweis der sauren Fraktion des Polysaccharides	38
Abbildung 11: SEC-Vergleich des Gesamtpolysaccharides mit dem sauren und dem neutralen Polysaccharid	40
Abbildung 12: DC der Hydrolyse des sauren Polysaccharides mit 1M Ameisensäure	42
Abbildung 13: SEC der Hydrolyse des sauren Polysaccharides mit 1M Ameisensäure	42

Abbildung 14: Eichgerade zur Pentosenbestimmung (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	44
Abbildung 15: Eichgerade zur Hexosenbestimmung (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	45
Abbildung 16: Eichgerade zur Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	47
Abbildung 17: Eichgerade zur Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H ₂ SO ₄)	48
Abbildung 18: Eichgerade zur Pentosenbestimmung (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄).....	50
Abbildung 19: Eichgerade zur Hexosenbestimmung (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄).....	51
Abbildung 20: Eichgerade zur Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄).....	52
Abbildung 21: Eichgerade zur Bestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren (nach vorangegangener Hydrolyse mit H ₂ SO ₄).....	53
Abbildung 22: SEC der enzymatischen Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Hemicellulase.....	55
Abbildung 23: DC der durch enzymatischen Abbau der alkalilöslichen Fraktion mit Hemicellulase entstandenen Oligosaccharide.....	56
Abbildung 24: Poolbildung nach Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Hemicellulase und SEC.....	56
Abbildung 25: DC der Pools 4–6 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase in Monosaccharid-Laufmittel	57
Abbildung 26: DC der Pools 4–6 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase in Oligosaccharid-Laufmittel	58
Abbildung 27: Hydrolyse der Pools mit 2M TFA nach Spaltung mit Hemicellulase.....	59
Abbildung 28: Poolbildung nach Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Hemicellulase, Fällung mit MeOH und SEC.....	60
Abbildung 29: DC der Pools 3 und 4 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase und Fällung mit MeOH in Monosaccharid-Laufmittel.....	61
Abbildung 30: DC der Pools 2–5 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase und Fällung mit MeOH in Oligosaccharid-Laufmittel.....	61
Abbildung 31: DC der Pools nach Hydrolyse mit 2M TFA nach Spaltung mit Hemicellulase und Fällung mit MeOH	62
Abbildung 32: SEC der enzymatischen Spaltung des sauren Polysaccharides mit Hemicellulase.....	63
Abbildung 33: Poolbildung nach Spaltung des sauren Polysaccharides mit Hemicellulase und SEC	64

Abbildung 34: DC der Pools 1–3 des sauren Polysaccharides nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase und Hydrolyse mit 2M TFA in Monosaccharid-Laufmittel	64
Abbildung 35: DC der Pools 1–3 des sauren Polysaccharides nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase in Oligosaccharid-Laufmittel	65
Abbildung 36: SEC der enzymatischen Spaltung des neutralen Polysaccharides mit Hemicellulase	66
Abbildung 37: Poolbildung nach Spaltung des neutralen Polysaccharides mit Hemicellulase und SEC	67
Abbildung 38: DC der Pools 1–4 des neutralen Polysaccharides nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase und Hydrolyse mit 2M TFA in Monosaccharid-Laufmittel	67
Abbildung 39: DC der Pools 1–4 des neutralen Polysaccharides nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase in Oligosaccharid-Laufmittel	68
Abbildung 40: SEC der enzymatischen Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Cellulase	69
Abbildung 41: Poolbildung nach Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Cellulase und SEC	69
Abbildung 42: DC der Pools 4–6 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Cellulase in Monosaccharid-Laufmittel	70
Abbildung 43: DC der Pools 4–6 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Cellulase in Oligosaccharid-Laufmittel	71
Abbildung 44: Hydrolyse der Pools mit 2M TFA nach Spaltung mit Cellulase	72
Abbildung 45: SEC der enzymatischen Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Pektinase	73
Abbildung 46: SEC-Vergleich der enzymatischen Spaltung mit verschiedenen Enzymen	73
Abbildung 47: DC-Vergleich der enzymatischen Spaltung mit verschiedenen Enzymen in Monosaccharid-Laufmittel	74
Abbildung 48: DC-Vergleich der enzymatischen Spaltung mit verschiedenen Enzymen in Oligosaccharid-Laufmittel	75

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn O.Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein, der mit dieser Diplomarbeit meine Aufmerksamkeit auf ein interessantes Thema lenken konnte und mir die Möglichkeit gab, mich mit diesem intensiv zu befassen.

Des weiteren danke ich Prof.Dr. Frank M. Unger, der mich an das Thema heranführte und eine große Unterstützung, gerade in der schwierigen Anfangsphase dieser Arbeit, war.

Ich danke Frau Dr. Diana Berner für die Hilfe bei zahlreichen praktischen Versuchen und die geleistete Hilfestellung, sofern Probleme auftraten.

Ich danke Herrn Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing.Dr.nat.techn. Werner Praznik und Frau Dr. Renate Löppert für die herzliche Aufnahme am Institut für Chemie der Universität für Bodenkultur Wien und für die aufopfernde Betreuung während meiner Zeit dort.

Ebenso dankbar bin ich Frau Mag. Andrea Ondrovics für ihre kollegiale Zusammenarbeit und ihre Einsatzbereitschaft.

Meinen Eltern danke ich für Ihr Verständnis, Ihre Geduld und Ihre großzügige Unterstützung während der gesamten Dauer des Studiums.

Ich danke des weiteren Herrn Dr. Patric Kment, der mir bei der Erstellung der Diplomarbeit eine große Hilfe geleistet hat, ebenso wie bei der Formatierung des Textes und mich in allen diesbezüglichen Belangen geduldig beraten hat.

Auch bedanken darf ich mich bei Herrn Mag. Richard Kisling für das Korrektorat und viele hilfreiche Hinweise bezüglich dieser Arbeit.

Zusammenfassung

Hyptis suaveolens (L.) Poit (zu Deutsch: ‚Sangura‘ oder ‚Ödland-Lavendel‘) ist ein einjähriges Kraut aus der Familie der Lamiaceae. Volksmedizinisch häufig auch bei Störungen des Verdauungstraktes angewendet, sollen die in der Mucilage der Samen enthaltenen Polysaccharide als präbiotische Zusätze ihre Anwendung finden.

Die Mucilage aus den Samen von *Hyptis suaveolens* (L.) Poit konnte – nach Extraktion der alkalilöslichen Fraktion mittels Ionenaustauschchromatographie – in ein saures, als auch ein neutrales Polysaccharid getrennt werden, die in einem Verhältnis von ca. 60–65:40–35 vorlagen.

Es wurde versucht, die als Präbiotika vorgesehenen Polysaccharide sowohl von den Enzymen Hemicellulase, Cellulase, als auch Pectinase spalten zu lassen, wobei je nach gewähltem Enzym unterschiedliche Produkte aus Oligosacchariden zu erwarten waren. Die gespaltenen Produkte wurden durch Größenausschlusschromatographie aufgetrennt und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und HPLC charakterisiert.

Die in den Polysacchariden gefundenen Monozucker waren: im sauren Polysaccharid Xylose, Glucose, Glucuronsäure und wahrscheinlich Fucose und Galacturonsäure, im neutralen Polysaccharid Mannose, Galaktose und Glucose.

Alle Enzyme zeigten einen bevorzugten enzymatischen Abbau des neutralen Polysaccharides, wohingegen das saure Polysaccharid durch die Enzyme weniger angegriffen wurde. Die effektivste Spaltung in Oligosaccharide erfolgte durch Cellulase.

Zusätzlich wurde mittels UV/VIS-Absorptionsmessung die Verteilung von Pentosen:Hexosen:Hexuronsäuren in der alkalilöslichen Fraktion untersucht, welche sich verhielt wie 24:55:23.

Summary

Hyptis suaveolens (L.) Poit (in english: ‚Horehound‘, ‚pignut‘, ‚wild spikenard‘) is an annual herb of the family of the Lamiaceae. Traditionally often used with disorders of the digestive tract, the polysaccharides contained in the mucilage of the seeds should find their application as prebiotic additives.

The mucilage out of the seeds of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit could – after the extraction of the alkali-soluble fraction with ion-exchange chromatography – be separated into an acid and a neutral polysaccharide, which are present in a ratio of 60–65:40–35.

Attempts were made to cleave the polysaccharides with the enzymes hemicellulase, cellulase or with pectinase; depending on the chosen enzyme, different oligosaccharide-products were obtained. The cleaved products were separated by size exclusion chromatography and characterised by thin layer chromatography and HPLC.

The monosaccharides found within the polysaccharides are: within the acid polysaccharide xylose, glucose, glucuronic acid and most likely fucose and galacturonic acid, within the neutral polysaccharide mannose, galactose and glucose.

All enzymes were more effective in degrading the neutral polysaccharide, whereas the acid polysaccharide was less affected by the enzymes. The most effective cleavage into oligosaccharides resulted with cellulase.

Additionally the distribution of pentoses:hexoses:hexuronic acids within the alkali-soluble fraction was analysed with UV/VIS-absorptiometry, which were present in a ratio of 24:55:23.



Abbildung 1: *Hyptis suaveolens*,

Quelle: http://www.metafro.be/prelude/prelude_pic/Hyptis_suaveolens1.jpg (17.11.2008)

1 EINLEITUNG

1.1 *Hyptis suaveolens*

Hyptis suaveolens (L.) Poit. ist ein harzig-minzig riechendes einjähriges Kraut aus der Familie der *Lamiaceae*, das eine Höhe von bis zu 2 m erreichen kann. Sein Stamm ist quadratisch und behaart, die 3–5 cm langen und 2–4 cm breiten Blätter sind oval und gezähnt. Die Blattunterseite ist ebenfalls behaart. Die Blütenfarbe ist blau bis violett, die Früchte werden ca. 1,5 mm groß und sind von dornigen Kletten umgeben, die der Verbreitung dienen. Die Samen sind dimorph und produzieren bei Kontakt mit Wasser Mucilage.¹

Die ursprünglich in Amerika heimische Pflanze ist inzwischen überall auf der Welt in gemäßigt-tropischen Regionen verbreitet. Daher kommt auch die Vielzahl der Namen, unter denen *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. bekannt ist, z. B.: ‚Horehound‘, ‚pignut‘, ‚wild spikenard‘, ‚gros baume‘, ‚hyptis à odeur‘, ‚alfavaca-brava‘, ‚betônica-brava‘, ‚chao‘, ‚hierba de las muelas‘, ‚hortela do campo‘, ‚Jukut‘, ‚bushmint‘, ‚mumutun‘ u.a.m.

Im deutschen Sprachraum ist die Pflanze vor allem unter den Namen ‚Sangura‘ oder ‚Ödland-Lavendel‘ bekannt.²

Aufgrund seiner großen und raschen Ausbreitung wird *Hyptis suaveolens* heute weltweit eher als Unkraut betrachtet.



Abbildung 2: *Hyptis suaveolens* während der Blüte,

Quelle:
<http://www.treknature.com/gallery/photo163682.htm>
(16.11.2008)

¹ Raizada, P.: "Ecological and vegetative characteristics of a potent invader, *Hyptis suaveolens* Poit. from India.", *Lyonia. A journal of ecology and application*, Vol.11 (2)

² <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?19643> (19.5.2008)

1.1.1 Taxonomische Hierarchie

Tabelle 1: Taxonomische Hierarchie von *Hyptis suaveolens*, Quelle: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt> (4.6.2008)

Reich	Plantae
Abteilung	Tracheobionta
Stamm	Magnoliophyta
Klasse	Magnoliopsida
Unterklasse	Asteridae
Ordnung	Lamiales
Familie	Lamiaceae
Gattung	<i>Hyptis</i> Jacq.
Art	<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.

1.1.2 Traditionelle Verwendung

Zubereitungen aus *Hyptis suaveolens* werden in der Volksmedizin zahlreiche Wirkungen zugeschrieben: sie gelten als analgetisch, appetitanregend, reinigend für Blut und Humor, wirksam gegen Husten, carminativ, expectorierend, als Beruhigungsmittel, Lactagogum, kühlend, stimulierend, magenstärkend und schweißtreibend.

Folgende Anwendungen sind bekannt: bei Gallenblasenentzündung, Katarrhen, Erkältungen, Asthma, Verstopfung, Dermatosen, Dyspepsie, Nasenbluten (Epistaxis), Fieber, Durchfall, Kopfschmerzen, Malaria, als Repellent, bei Nausea, Menorrhagie, Lähmungen, Rheuma, Krämpfen, Bauchschmerzen, Tumoren und Gelbfieber³.

Die Anwendung erfolgt oft in Form von Tees oder Decocten aus den Blättern und Wurzeln, als Bäder oder Inhalationen. Die frischen Blätter werden auf Wunden aufgelegt oder bei Rheuma an den betreffenden Stellen eingerieben. Der Pflanzensaft wird bei Magenschmerzen (gemeinsam mit Zitronensaft) getrunken, oder bei Kopfschmerzen in die Nase getropft.⁴

³ Johnson, Timothy: *CRC Ethnobotany Desk Reference* (13720, p. 424)

⁴ Neuwinger, H. D.: *African Traditional Medicine. A Dictionary of Plant Use and Applications: Hyptis suaveolens* Poit., p. 269

Vor allem in Afrika wird die Pflanze gerne vor Häuser gepflanzt, da sie Moskitos und andere Insekten fernhält, zu diesem Zweck werden auch nur die Blütenstände in Matratzen gefüllt oder die Blätter über Holzkohle geräuchert.⁵ Aus den Samen wird ein erfrischendes Getränk bereitet.⁶

1.1.3 Chemische Zusammensetzung

1.1.3.1 Ätherisches Öl

Verschiedene Chemotypen von *Hyptis suaveolens* sind bekannt, die beschriebenen Hauptinhaltsstoffe sind:

- 1) Sesquiterpene: β -Caryophyllen, β -Elemen, trans- α -Bergamoten, Bicyclogermacren und der Sesquiterpenalkohol Spathulenol
- 2) Monoterpene: Camphen, Limonen, Terpinene, Fenchon, β -Phellandren, Sabinol, 1,8-Cineol, Pinen
- 3) Phenylpropane: Eugenol
- 4) Terpene: p-Cymol⁷

Für das ätherische Öl sind antibakterielle und antifungale (v.a. gegen *Mucor sp.* und *Fusarium moniliforme*) Eigenschaften belegt⁸, die Tests auf Toxizität bei der Anwendung des ätherischen Öls in Salben zeigten keine signifikanten Ergebnisse.⁹

1.1.3.2 Blätter

Die Blätter enthalten vor allem Alkaloide (14,32 %), Tannine (0,52 %), Phenole, (0,05 %), Saponine (0,3 %), sowie Flavonoide (12,54 %)¹⁰.

⁵ Pålsson, T. G., T. Jaenson: "Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa" *Acta Tropica* 72 (1999), 3952

⁶ <http://www.ruehlemanns.de/texte/texte2005/2005003.html> (8.6.2008)

⁷ Azevedo, N., Campos Irani F. P., Ferreira H. D., Portes T. A., Santos S. C., Seraphin J. C., Paula J. R. and Ferri P. H.: "Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*" *Phytochemistry* 57 (2001), pp. 733–736

⁸ Malele, R. S.: "Essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Tanzania: Composition and antifungal activity". *Journal of Essential Oil Research: JEOR*. Nov/Dec 2003.

⁹ Niwatananun, K., W. Niwatananun, N. Lertprasertsook, S. Okonogi: "Repeated-Dose Dermal Toxicity of Topical Formulation of *Hyptis suaveolens* oil" *CMU. Journal* (2006) Vol 5(3), pp. 369–380

Die Diterpene Suaveolol und Methylsuaveolat, deren anti-inflammatorische Wirkung bei Dermatosen belegt wurde, wurden ebenfalls in den Blättern gefunden.¹¹

Des weiteren entdeckte man Dehydroabietinol und 13[alpha]-epi-dioxiabiet-8(14)en-18-ol¹², zwei antiplasmodische Diterpene, die für die Wirkung als Mosquito-Repellent (v.a. *Plasmodium falciparum*) verantwortlich gemacht werden, deren Anwendung aber zu einer schädigenden Nebenwirkung auf die Erythrocytenmembranen führt.¹³

Die antimikrobielle Wirksamkeit eines Extraktes aus den Blättern gegen grampositive Bakterien (*Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis*) wurde bereits belegt¹⁴, ebenso der antinociceptive Effekt bei gleichzeitiger geringer akuter Toxizität.¹⁵

1.1.3.3 Samen

In den Samen von *Hyptis suaveolens* (L.) Poit wurde Anti-A-Agglutinin entdeckt, was insofern bemerkenswert ist, als es das erste entdeckte Anti-A-Agglutinin außerhalb der Leguminosen ist.¹⁶

¹⁰ Edeoga, H. O., G. Omosun and L. C. Uche: "Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigeria" *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (10), 16 May 2006, pp. 892–895

¹¹ Grassi P., Reyes T. S. U., Sosa S., Tubaro A., Hofer O., Zitterl-Eglseer K.: "Anti-Inflammatory Activity of Two Diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador" *Z. Naturforsch.* 61c, 165–170 (2006)

¹² Chukwujekwu, J. C., P. Smith, P. H. Coombes, D. A. Mulholland and J. van Staden: "Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*" *Journal of Ethnopharmacology* Volume 102, Issue 2, 14 November 2005, pp. 295–297

¹³ Ziegler H. L., Jensen T. H., Christensen J., Stærk D., Hägerstrand H., Sittie A. A., Olsen C. E., Staalsø T., Ekpe P., Jaroszewski: "Possible Artefacts in the in vitro Determination of Antimalarial Activity on Natural Products that Incorporate into Lipid Biolayer: Apparent Antiplasmodial Activity of Dehydroabietinol, a Constituent of *Hyptis suaveolens*" *Letter... Planta Med* 2002; 68, pp. 547–549

¹⁴ Rojas, A., L. Hernandez, R. Pereda-Miranda, R. Mata: "Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants" *Journal of Ethnopharmacology*, 35 (1992), pp. 275–283

¹⁵ Santos, T. C., M. S. Marques, I. A. C. Menezes, K. S. Dias, A. B. L. Silva, I. C. M. Mello, A. C. S. Carvalho, S. C. H. Cavalcanti, A. R. Antonioli, R. M. Marçal: "Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice" *Fitoterapia* 78 (2007), pp. 333–336

¹⁶ Bird, G. W. G.: "Anti-A Haemagglutinins from a Non-Leguminous Plant – *Hyptis suaveolens* Poit" *Nature* No. 4680, July 11, 1959, pp. 109–120

1.2 Probiotika, Präbiotika, Synbiotika

1.2.1 Probiotika

Das Wort „Probiotikum“ stammt aus dem Griechischen. Wörtlich übersetzt bedeutet es „für das Leben“. Die Definition eines Probiotikums änderte sich im Laufe der Zeit: Ursprünglich waren Probiotika definiert als: „Lebende mikrobielle Zusätze, welche das Wirtstier günstig über eine Verbesserung des mikrobiellen intestinalen Gleichgewichts beeinflussen“ (Fuller, 1989¹⁷) bzw. „Ein lebender mikrobieller Zusatz, der für die Gesundheit von Vorteil ist“ (Salminen et al., 1998¹⁸). Die WHO präziserte schließlich die Definition von Probiotika als

„Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host¹⁹“.

Um die Zusammensetzung und die Funktion der Darmflora positiv zu modulieren, werden derzeit in Medikamenten und Lebensmitteln (Joghurts und Trinknahrungen) Probiotika aus verschiedenen Bakterienstämmen wie z.B. *E. coli* Nissle 1957, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. casei*, *L. acidophilus* und Bifido-Bakterienstämme bzw. Hefen wie *Saccharomyces boulardii* eingesetzt.

1.2.2 Präbiotika

Unter Präbiotika versteht man einen „durch körpereigene Enzyme nicht abbaubaren Nahrungsmittelbestandteil, dessen Verzehr vorteilhaft ist, da er selektiv das Wachstum und/oder die Aktivität einer einzigen oder weniger Bakterienspezies im Kolon stimuliert“ (Gibson und Roberfroid, 1995²⁰). Unverdauliche Oligosaccharide, vor allem kurzkettige Oligofruktosen, die natürlich in vielen Gemüse-Arten wie z.B. Zwiebeln, Knoblauch oder Weizen vorkommen, sind Präbiotika²¹.

¹⁷ Fuller R.: “Probiotics in man and animals.” *J Appl Bacteriol* 1989; 66, pp. 365–78.

¹⁸ Salminen, S., Bouley, M. C., Boutron-Rualt, M. C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M-C., Roberfroid, M. & Rowland, I. (1998): “Functional food science and gastrointestinal physiology and function”. *Br. J. Nutr.* 80(Suppl. 1), pp. 147–171.

¹⁹ Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002

²⁰ Gibson G. R., Roberfroid, M. B. (1995): “Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.” *J of Nutr* 125, pp. 1401–1412

²¹ OA: Prebiotic fibres. A natural source of cancer prevention, Nutraceutical Business and Technology – 1/2 2007, p 42–46. (12.12.2008) http://www.beghin-meiji.com/actilight/upload/Actilight_cancer_nbt0107.pdf

Neben dem Polysaccharid Inulin haben vor allem folgende Oligosaccharide den größten Marktanteil an Präbiotika²²:

Tabelle 2: Kommerziell verfügbare präbiotische Oligosaccharide (nach Rastall 2002)

Lactulose
Galacto-Oligosaccharide
Fructo-Oligosaccharide
Isomalto-Oligosaccharide
Soyabohnen-Oligosaccharide
Lactosucrose
Xylo-Oligosaccharide
Gentio-Oligosaccharide

Diese Präbiotika passieren unverändert den oberen Verdauungstrakt und werden erst von den Darmbakterien ganz oder teilweise abgebaut. Dabei entstehen als Stoffwechselprodukte kurzkettige Fettsäuren und somit ein schwach saures Milieu im Dickdarm. Dieses wirkt sich positiv auf das Wachstum der nützlichen Bakterien wie Lactobazillen oder Bifidusbakterien aus, jedoch negativ auf das Wachstum krank machender Bakterien.²³

1.2.3 Synbiotika

Die Kombination aus Pro- und Präbiotika, von der synergistische Effekte erhofft werden.²⁴

1.2.3.1 Prä-, Pro- und Synbiotika – Effekte und Hoffnungen

Nach Schrezenmeir und de Vrese sind die gesundheitlichen Effekte, die Probiotika zugeschrieben werden:

- geringere Frequenz und kürzere Dauer von durch Antibiotika, Chemotherapie oder Rotavirus ausgelöster Diarrhöe
- Stimulation von humoraler und zellulärer Abwehr

²² Rastall, R. A., G. R. Gibson: "Functional Foods. Developments in colonic functional foods for improved digestive health." *Bioscience-explained 2004, Vol 1, No 2*

²³ siehe: Unger, Frank M., H. Viernstein: *Florale Gesundheit*, Verlagshaus der Ärzte, 2004, S. 98

²⁴ vgl. Bischoff, S. C., M. P. Manns: „Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. Stellenwert in Klinik und Praxis.“ *Deutsches Ärzteblatt, Jg. 102, Heft 11, 18. März 2005, A752-9*

- Verminderung von unerwünschten Metaboliten (durch Ammonium und pro-cancerogene Enzyme im Darm)

des weiteren:

- Reduktion von *Helicobacter pylori* Infektion
- Reduktion allergischer Symptome
- Krebs-Prävention
- Reduktion von Cholesterol- und Triacylglycerol-Konzentrationen im Plasma
- positiver Effekt auf den Mineralhaushalt (v.a. auf die Knochendichte und -stabilität)
- Besserung bei Verstopfung, Reizdarmsyndrom und Reisedurchfall²⁵

1.3 Mucilagen

„Mucilagen sind Schleimstoffe, die als Wasserspeicher in sukkulenten Pflanzen z.B. Kakteen vorhanden sind, die bei Verletzungen (Umweltstress) zum Schutz von Pflanzen gegen Austrocknung und Schädlingsbefall ausgeschieden werden (Exsudate wie Gummi arabicum). Ebenso wird in ariden Gebieten die Sicherstellung der Wasserversorgung des Keimlings in den Außenschichten von Samen (Guar, Carob, Flachs,...) gewährleistet.“²⁶

Verwendet werden Mucilagen in der Lebensmittelindustrie aufgrund ihrer hohen Wasser-Bindungskapazität als Verdickungs- und Geliermittel, in der pharmazeutischen Industrie als Schutzkolloide, Laxantien und als Präbiotika (die aus Polysacchariden bestehenden Mucilagen sind magensäure-stabil und gelangen daher größtenteils unverdaut durch den Intestinaltrakt, um anschließend als Nährboden für die Dickdarmflora zu dienen).²⁷

²⁵ siehe: Schrezenmeir, J., M. de Vresce: “Probiotics-prebiotics and synbiotics – approaching a definition” (*Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73 (suppl.): S. 361S–4S)

²⁶ zitiert nach: Praznik, W.: Strukturuntersuchungen an prebiotisch wirksamen Pflanzenmucilagen, derzeit noch unveröffentlicht

²⁷ vgl. Praznik, W.: Strukturuntersuchungen an prebiotisch wirksamen Pflanzenmucilagen, derzeit noch unveröffentlicht

1.4 Enzyme

1.4.1 Cellulase

Cellulase ist ein Enzymkomplex, der die Fähigkeit besitzt Cellulose zu β -Glucose abzubauen. Produziert wird sie vor allem von symbiotischen Bakterien in Wiederkäuern/Pflanzenfressern. Bakterien im Menschen hingegen produzieren keine Cellulase, weshalb auch viele Pflanzenmaterialien vom menschlichen Verdauungstrakt nicht verwertet werden können.

Der Enzymkomplex der Cellulase umfasst 3 Typen:

- 1) Endocellulasen: können die β -(1,4)-Bindungen innerhalb der Cellulose-Ketten aufbrechen und führen zur Bildung individueller Polysaccharid-Ketten, wobei die kristalline Struktur der Cellulose zerstört wird
- 2) Exocellulasen: spalten vom Rand der Polysaccharide Einheiten aus 2–4 Zuckermolekülen ab; dies führt zu einer Bildung von Tetra- oder Disacchariden (wie z.B. Cellobiose)
- 3) Cellobiase (β -Glucosidase): vermag die Produkte der Exocellulasen in Monosaccharide zu hydrolysieren

1.4.1.1 Anwendungsmöglichkeiten von Cellulase²⁸:

- Cellulase kann Fasern verdauen und ist hilfreich bei Verdauungsstörungen wie Malabsorption
- Cellulase unterstützt den Abbau von Pflanzenzellen (Cellulose) und führt durch die Bindung von Cholesterol und Toxinen im Verdauungstrakt zu einer erhöhten Ausscheidung dieser Stoffe
- Cellulase hilft bei Allergien und Lebensmittelallergien, bei der Behandlung von Phytobezoaren, Drogenentzug, Zellentgiftung, Darmreinigung, Blähungen und Schmerzsyndromen, sowie bei Candida-Infektionen und Paralysis
- Cellulase wird verwendet bei der Kaffee-Herstellung, bei der Trocknung von Bohnen, bei der Fermentation von Biomasse in Biotreibstoff, sowie in der Textilindustrie und in Feinwaschmitteln

²⁸ <http://www.enzymeindia.com/enzymes/cellulase.asp> (14.7.2008)

- Cellulase dient in der Tierzucht (bei Geflügel) als Nahrungsergänzungsmittel und steigert die Milchproduktion der Rinderzucht.

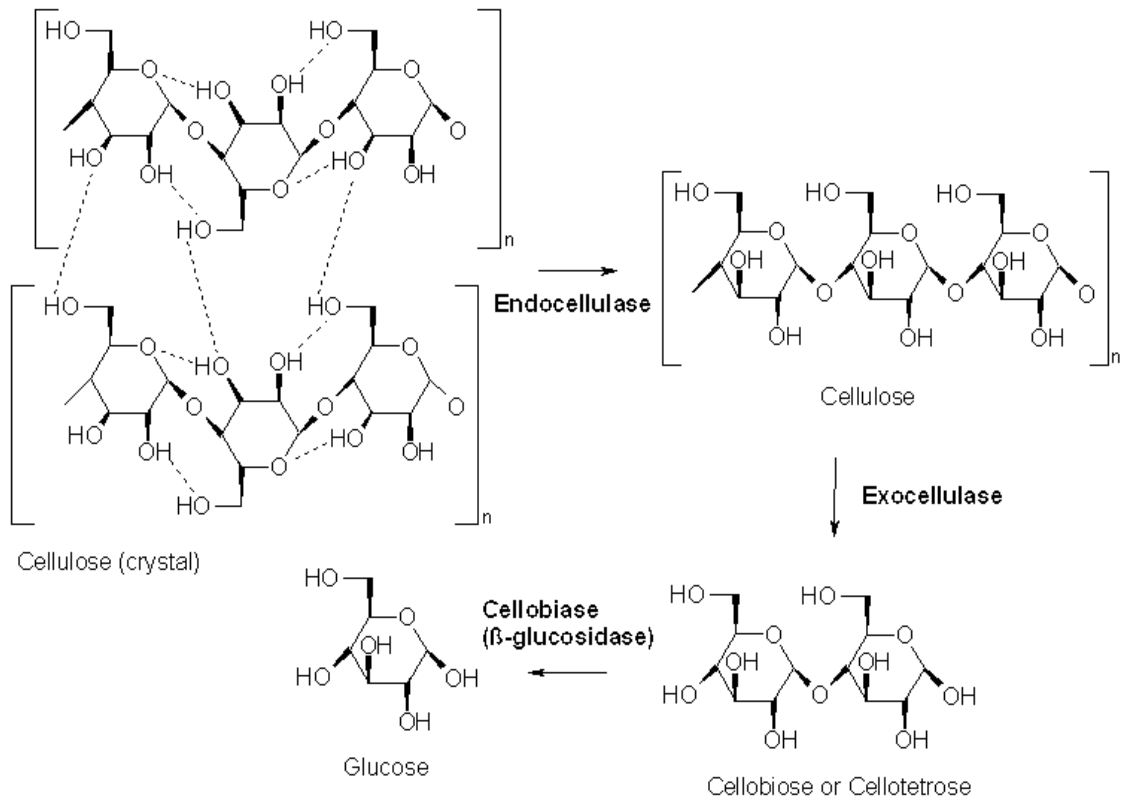


Abbildung 3: Funktionsweise des Cellulase-Komplexes. Quelle: <http://www.answers.com/topic/types-of-cellulase2-png-1> (16.7.2008)

1.4.2 Hemicellulase

Baut Hemicellulose (Heteropolysaccharide, die häufigsten sind: Xylan, Glucuronoxylan, Arabinoxylan, Glucomannan und Xyloglucan²⁹) ab und ist eine Mischung (meist enthält sie Xylanase, Mannanase u.a.m) von Enzymen, die für den Menschen unverdauliche Pflanzenbestandteile hydrolysieren kann. Kleinere Fragmente werden herausgespalten.

Anwendungsmöglichkeiten

- Nahrungsergänzungsmittel bei Mensch und Tier
- In der Backindustrie³⁰

²⁹ http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis/Carbohydrate_AnalysisII.html#Hemicellulase (14.7.2008)

³⁰ <http://www.enzymeindia.com/enzymes/hemicellulase.asp> (14.7.2008)

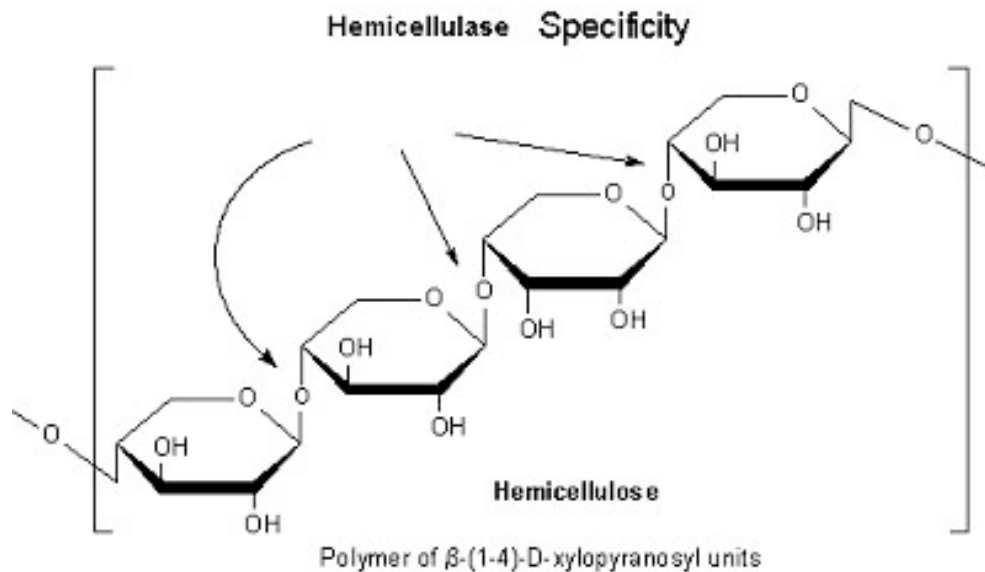


Abbildung 4: Funktionsweise der Hemicellulase. Quelle:
(<http://www.enzymeindia.com/enzymes/images2/hemicellulase-image.jpg>) (16.7.2008)

1.4.3 Pektinase

Pektinase ist die allgemeine Bezeichnung für Enzyme, die Pektin (Polysaccharide, v.a. aus Galakturonsäuremolekülen) abbauen. Sie katalysiert die Hydrolyse von 1,4- α -D-Galakturonsäureverknüpfungen in Pektin und anderen Galakturonanen³¹. Die bekannteste und kommerziell am häufigsten verwendete ist die Polygalacturonidase, neben der Pektinmethylesterase und der Pektinlyase.

Die höchste Aktivität weist Pektinase bei einer Temperatur von 45 bis 55 °C und einem pH-Wert von ca. 5 auf.

Anwendungsmöglichkeiten³²:

- In der Fruchtsaftindustrie
- Als Nahrungsergänzungsmittel bei Tieren
- Als Nutraceutical
- In der Weinproduktion

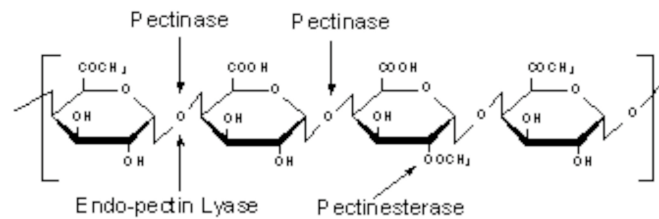
³¹ http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis/Carbohydrate_AnalysisIII.html#Pectin (14.7.2008)

³² <http://www.enzymeindia.com/Enzymes-Pectinase.php> (16.7.2008)

Pectinase and Pectinesterase Specificities

Homogalacturonan

Poly- α -(1-4)-D-galacturonic acid backbone with random partial methylation and acetylation



Rhamnogalacturonan I

Alternating α -(1-2)-L-rhamnosyl- α -(1-4)-D-galacturonosyl backbone with two types of branching composed of arabinofuranose or galactose oligomers

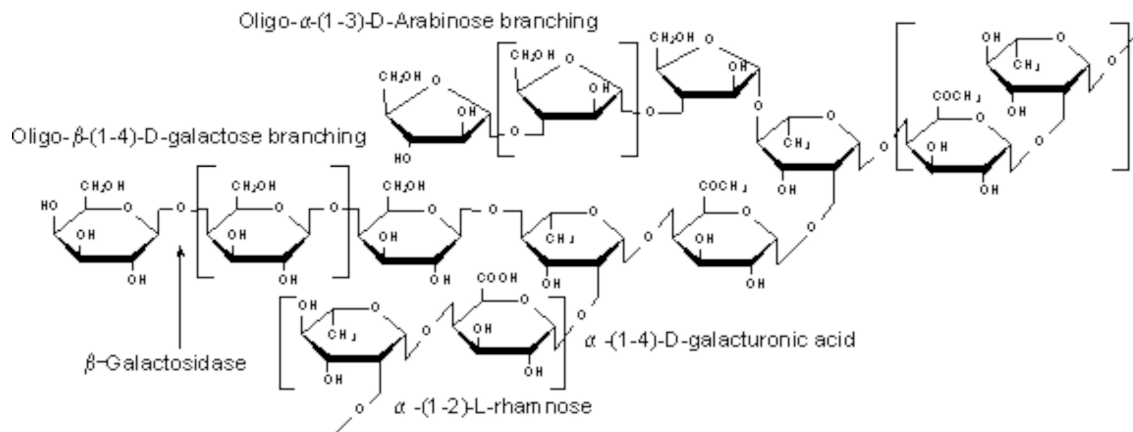


Abbildung 5: Funktionsweise der Pektinase (http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/19500/Pectinase_Pectinesterase.gif) (16.7.2008)

2 FORSCHUNGSSTAND, FORSCHUNGSDESIGN UND ZIELSETZUNG

Seit mehreren Jahren beschäftigt sich das Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Wien mit der Forschung über Prä-, Pro- und Synbiotika und deren Anwendung in Arzneimitteln. Dabei wurden unter anderem Untersuchungen zur Optimierung von Zubereitungen, die Milchsäurebakterien enthalten, durchgeführt³³, sowie die Verwertung von präbiotischen Kohlenhydraten durch Hefen erforscht³⁴. Im Zuge der vorliegenden Arbeit fand eine Kooperation mit dem Institut für Chemie der Universität für Bodenkultur Wien statt, deren Forschung sich ebenfalls seit längerem mit Kohlenhydraten aus Pflanzenexsudaten beschäftigt^{35,36}.

1984 veröffentlichte D.C. Gowda eine Arbeit zu seinen Untersuchungen der Mucilage aus den Samen von *Hyptis suaveolens*. Durch Fraktionierung mit Fehling'scher Lösung konnte er ein sowohl ein neutrales, als auch ein saures Polysaccharid extrahieren. Das neutrale Polysaccharid schien einen homogenen Aufbau aufzuweisen und aus D-Mannose, D-Galaktose und Glucose in den Molraten 1,0:4,5:7,5 zu bestehen. Das saure Polysaccharid wies die Zucker L-Fucose, D-Xylose und 4-O-Methyl-Glucuronsäure in den Molraten 1,0:2,5:1,1 auf³⁷.

Ausgehend von dieser Arbeit führten Aspinall et al. weitergehende Untersuchungen durch, um die Struktur des sauren Polysaccharides aufzuklären. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das hochverzweigte saure Polysaccharid ein 1,4-verknüpftes β -D-Xylan-

³³ Siehe dazu: Stadler, M., H. Viernstein: "Optimization of a formulation containing viable lactic acid bacteria", *Int J Pharm.* 2003 Apr 30;256(1-2), pp. 117-122.

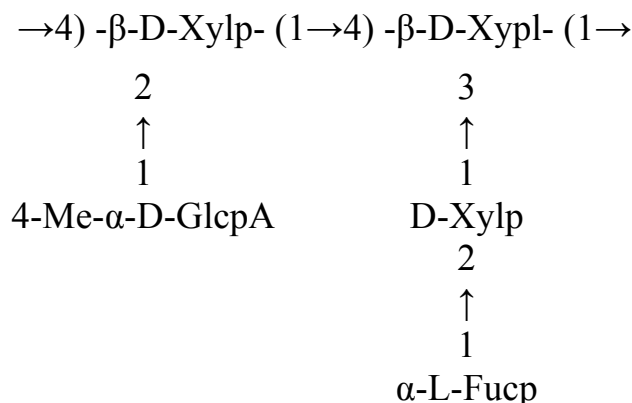
³⁴ Mitterdorfer, G., W. Kneifel, H. Viernstein: "Utilization of prebiotic carbohydrates by yeasts of therapeutic relevance." *Letters in Applied Microbiology* 2001, 33, pp. 251-255

³⁵ siehe dazu: Praznik, W., T. Spies, A. Hofinger: "Fructo-oligosaccharides from the stems of *Triticum aestivum*." *Carbohydrate Research*, 235 (1992), pp. 231-238

³⁶ Praznik, W., T. Spies, A. Hofinger: "Fructo-oligosaccharides from the stems of *Triticum aestivum*." *Carbohydrate Research*, 235 (1992), pp. 91-97

³⁷ Siehe dazu: Gowda, D. C.: "Polysaccharide components of the seed-coat mucilage from *Hyptis suaveolens*." *Phytochemistry, Volume 23, Issue 2, 1984*, pp. 337-338

Rückgrat haben muss, das Seitenketten aus 4-O-Methyl- α -D-Glucuronsäure am O-2 und 2-O-L-Fucopyranosyl-D-Xylopyranose-Einheiten am O-3 trägt³⁸:



Darauf aufbauend wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Wien die Forschung fortgesetzt. Das Ausgangsmaterial – die Mucilage – wurde von Prof. Siriporn Okonogi (Thailand / Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University) zur Verfügung gestellt. Begonnen wurde mit der Optimierung der Extraktion der Polysaccharide und deren Trennung durch Ionenaustauschchromatographie. Die Zuckerzusammensetzung des sauren und neutralen Polysaccharides wurde ebenfalls bestätigt, mit dem Unterschied, dass im sauren Polysaccharid neben der 4-O-Methyl-Glucuronsäure auch Glucuronsäure, sowie Glucose und Galaktose detektiert wurden. Das saure Polysaccharid wurde zur Gewinnung eines Oligosaccharides mit Xylanase gespalten. Das erhaltene Oligosaccharid war aus den Monosacchariden Xylose und Glucose zusammengesetzt³⁹.

Des weiteren wurde die Zuckerzusammensetzung mittels HPAEC-PAD analysiert, wobei zusätzlich noch die Zucker Rhamnose und Arabinose detektiert wurden⁴⁰.

³⁸ Aspinall et al.: "A novel L-Fuco-4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan from *Hyptis suaveolens*." *Carbohydrate research*, 214 (1991), pp. 107–113,

³⁹ Riha, J.: Saures Polysaccharid aus *Hyptis suaveolens*: Präbiotikum und protektives Hydrogel, Diplomarbeit, 2007, Universität Wien

⁴⁰ Dalakaki, E.: *Hyptis suaveolens*: Characterization of the polysaccharides and their prebiotic properties, Diplomarbeit, 2007, Universität Wien

2.1 Zielsetzung dieser Arbeit

Um die Relevanz der als Präbiotika vorgesehenen Polysaccharide zu bestätigen, sollte die enzymatische Spaltung dieser Saccharide mit verschiedenen Enzymen vorgenommen werden.

Es war zu erwarten, dass die Enzyme Hemicellulase, Cellulase und Pectinase unterschiedliche Produkte an Oligosacchariden herauspalten würden. Die Isolierung und erste Charakterisierung dieser Oligosaccharide sollte durch Größenausschlusschromatographie und Dünnschichtchromatographie erfolgen. Dabei sollte durch Hydrolyse mit 2M Trifluoressigsäure die Monosaccharid-Zusammensetzung der Polysaccharide überprüft, sowie die der enzymatisch erhaltenen Oligosaccharide geklärt werden, ebenso wie die Fähigkeit der einzelnen Enzyme, die beiden Polysaccharide mehr oder weniger gut zu spalten.

Zusätzlich sollte mittels UV-Absorptionsmessung die Verteilung von Pentosen, Hexosen und Hexuronsäuren in den Proben eruiert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zentrifugation

„Die Zentrifugation ist ein mechanisches Trennverfahren zur Separation von Suspensionen und Emulsionen oder von Rauch und Nebel mit Hilfe der Zentrifugalkraft. [...] Wichtigster Bestandteil aller Zentrifugen ist eine mit hoher Geschwindigkeit um eine horizontale oder vertikale Achse rotierende Trommel.⁴¹“ Die Trennung erfolgt mittels eines die Feststoffe zurückhaltenden Siebes (Filterzentrifugen), oder aufgrund von Dichteunterschieden der einzelnen Stoffe (Sedimentierzentrifugen). Dabei wird die Massenträgheit zur Stofftrennung benutzt, indem Partikel oder Medien mit höherer Dichte aufgrund der höheren Trägheit nach außen wandern⁴².

Folgende Sedimentierzentrifugen wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

- Sorvall RC-5C Plus Superspeed Centrifuge: zur Abtrennung der alkalilöslichen Fraktion nach der Extraktion mit 4M NaOH (10.000rpm, 5 min.)
- Sorvall RC-53 Refrigerated Superspeed Centrifuge: zur Abtrennung der ausgefällten Polysaccharide nach Fällung mit MeOH (3500rpm, 30 min.)
- MiniSpin (Eppendorf): zur Vorreinigung der Proben vor dem Einspritzen in die HPLC (13.500rpm, 5 min.)

3.2 Dialyse

Unter Dialyse versteht man die „Abtrennung niedermolekularer Stoffe von hochmolekularen aus Lösungen mit Hilfe einer semipermeablen Membran“.⁴³ Dabei ist es den niedermolekularen Stoffen möglich, durch die Poren der Membran hindurch zu diffundieren, während die höhermolekularen Bestandteile zurückgehalten werden.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde zur Abtrennung von Salzen und niedermolekularen Verunreinigungen von den Polysacchariden ein Dialysierschlauch aus Cellulose von Sigma-Aldrich mit den Maßen 27 x 43mm verwendet, der Moleküle mit einem Molekulargewicht von 12.000 oder höher zurückhält.

⁴¹ <http://www.vt.tuwien.ac.at/scripts/159682/zentrifugieren.pdf> (17.11.2008)

⁴² <http://de.wikipedia.org/wiki/Zentrifuge> (16.09.2008)

⁴³ Brockhaus Enzyklopädie in 24 Bdn., 5. Band COT-DR, 19. Auflage, F.A. Brockhaus, Mannheim, 1988, S. 448

3.3 Lyophilisation

Das Ziel der Lyophilisation ist die schonende Entfernung von Wasser, v.a. aus thermolabilen Proben, um diese besser haltbar und dosierbar zu machen. Der Vorgang der Gefriertrocknung besteht aus 3 Teilen: dem Einfrieren, der Trocknung im Vakuum (Primär- und Sekundärtrocknung) und ggf. der Nachbehandlung.

Nach dem Einfrieren bei Atmosphärendruck mit möglichst geringer Schichtdicke durch Rotieren des Kolbens in einem Gefrierbad, wobei die Flüssigkeit an der Wand in einer gleichmäßigen dünnen Schicht einfriert (dynamisches Einfrieren)⁴⁴, muss die Endtemperatur tief genug liegen, um beim Absenken des Druckes während der Primärtrocknung die Phasengrenze von fest zu gasförmig überschreiten zu können (Sublimation). Dies ist nur dann möglich, wenn der Tripelpunkt unterschritten wird. Der Tripelpunkt ist jener Punkt, definiert durch die Parameter Druck und Temperatur, bei dem ein Stoff in allen drei Aggregatzuständen (fest, flüssig, gasförmig) nebeneinander vorliegt. Gleichzeitig muss aber genug Energie zugeführt werden, um die Sublimation des Eises zu ermöglichen.⁴⁵ Das übrige, nicht als Eis vorliegende Wasser wird bei der Sekundärtrocknung entfernt. Hierbei handelt es sich um Hydrat-, Quellungs- oder Konstitutionswasser, das durch weiteres Absenken des Wasserdampfpartialdruckes bei gleichzeitiger Steigerung der Temperatur entfernt werden kann.⁴⁶

Zur Trocknung der Poly- und Oligosaccharide wurden verwendet: Heto Power Dry LL3000 Freeze Dryer und Hetosicc.

3.4 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist ein Prozess, bei dem Ionen gleicher Ladung zwischen zwei nicht mischbaren Phasen ausgetauscht bzw. verteilt werden. Diese Diffusions- und Absorptionsvorgänge beruhen auf unterschiedlichen Wechselwirkungs-

⁴⁴ vgl. Rupprecht, H.: „Physikalisch-chemische Grundlagen der Gefriertrocknung“ in: Dr. D. Essig, Dr. R. Oschmann (Hg.): *Lyophilisation*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1993, S. 29

⁴⁵ vgl. Rupprecht, H.: „Physikalisch-chemische Grundlagen der Gefriertrocknung“ in: Dr. D. Essig, Dr. R. Oschmann (Hg.): *Lyophilisation*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1993, S. 13ff.

⁴⁶ vgl. Rupprecht, H.: „Physikalisch-chemische Grundlagen der Gefriertrocknung“ in: Dr. D. Essig, Dr. R. Oschmann (Hg.): *Lyophilisation*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1993, S. 33f.

kräften zum Austauschermaterial. Die eine Phase dient dabei als Lösungsmittel für die Ionen, die andere Phase bildet die Gegenionen, an die sie gebunden werden können⁴⁷.

Puffer mit geringer Ionenstärke dienen dabei als Elutionsmittel. Die darin enthaltenen Ionen können die Ionen aus der Bindung am Austauscher verdrängen. Die Substanztrennung erfolgt somit nach Selektivität zu dem Ionenaustauscher, je höher diese ist, desto stärker wird eine Substanz retendiert⁴⁸.

Je nach funktioneller Gruppe unterscheidet man schwache und stark saure (Kationen-Austauscher mit z.B. Carboxy- oder Sulfonsäure-Gruppen), sowie schwache und stark basische Ionenaustauscher (Anionenaustauscher wie z.B. prim. Aminogruppen oder tertiäre Amine)⁴⁹.

Zur Trennung der alkalilöslichen Fraktion in saures und neutrales Polysaccharid wurde eine Säule, gefüllt mit Diethylaminoethyl-Cellulose (DEAE-C) der Firma Sigma-Aldrich verwendet, ein schwach basischer Anionenaustauscher. Dabei band sich das saure Polysaccharid an den Anionenaustauscher, das neutrale wurde nicht retendiert.

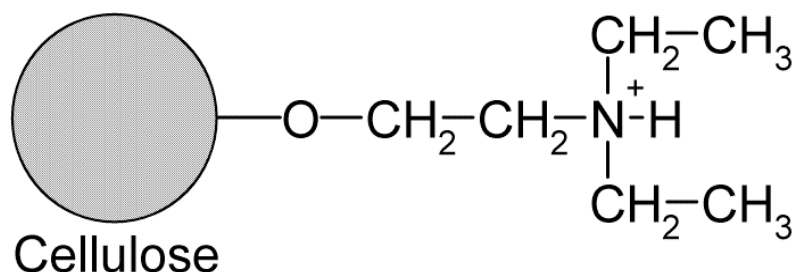


Abbildung 6: Schematischer Strukturausschnitt der Diethylaminoethylcellulose: die positiv geladenen DEAE-Gruppen binden negativ geladene Ionen, Quelle: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Bild:Diethylaminoethylcellulose.png&filetimestamp=20080930095222> (10.11.2008)

⁴⁷ vgl. Schwendt, G.: *Chromatographische Trennmethode. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen*, 3. erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag 1994, S. 44ff.

⁴⁸ Rücker, G., M. Neugebauer, G.G. Willems: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden*, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001, S. 457ff.

⁴⁹ vgl. Schwendt, G.: *Chromatographische Trennmethode. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen*, 3. erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag 1994, S. 71ff.

3.5 Dünnschichtchromatographie

Das Prinzip der Dünnschichtchromatographie beruht auf unterschiedlichen Verteilungs- und Adsorptionsprozessen (oder auch Ionenaustausch) zwischen mobiler und stationärer Phase. Für die stationäre Phase werden geeignete Träger wie Glas-, Aluminium- oder Kunststoffplatten verwendet, auf die dünne, feinkörnige Sorptionsschichten aufgebracht werden (z.B. Kieselgel, Kieselgur oder Aluminiumoxid). Mithilfe geeigneter Kapillaren werden die Substanzproben auf die Startzone aufgetragen, wobei die Konzentration etwa im Bereich von $1\mu\text{g/ml}$ liegen sollte. Das Fließmittel (mobile Phase) wandert dann aufgrund der Kapillarkwirkung des Sorptionsmittels nach oben. Je länger sich eine Substanz in der mobilen Phase aufhält, desto weiter wird sie mit dieser Phase ebenfalls nach oben wandern. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sollte der Dampfraum in der Trennkammer eine definierte Zusammensetzung haben (Kammersättigung)^{50,51}.

Im Laufe dieser Arbeit wurden zahlreiche Dünnschichtchromatogramme zur Detektion der Mono- und Oligosaccharide erstellt. Verwendet wurden dafür DC-Alufolien von 10cm Höhe aus Kieselgel 60 F254. Als Laufmittel für Monosaccharide wurde eine Mischung aus Acetonitril+Wasser=17+3 verwendet, für Oligosaccharide eine Mischung aus Wasser:Ethanol:Propanol:n-Butanol=2:3:3:2 ($\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{Pr}:\text{nB}=2:3:3:2$). Zur Sichtbarmachung der Zucker wurden die Platten nach dem Lauf getrocknet, in Thymol-Reagens (0,5g Thymol, 5ml H_2SO_4 und 95ml Ethanol) getaucht und anschließend für 5 min. bei ca. 100°C in den Trockenschrank gegeben. Dabei entstehen Triphenylmethanfarbstoffe, die bei Tageslicht sichtbar sind⁵².

⁵⁰ Wird dies außer Acht gelassen, so verdampft das Fließmittel während des Trennvorganges, es wird mehr davon benötigt und der jeweilige R_f -Wert dadurch vergrößert. Bei Fließmittelgemischen kann sich durch das Verdampfen der flüchtigsten Bestandteile außerdem die Zusammensetzung ändern.

(Schwendt, G.: *Chromatographische Trennmethode. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen*, 3. erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag 1994, S. 95).

⁵¹ Ehlers, E.: *Analytik II. Kurzlehrbuch Quantitative und instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 10. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2002, S.440f

⁵² siehe: http://www.uni-muenster.de/imperia/md/content/pharmazeutische_biologie/_v/kohlenhydrate_allg_analytik_n_wittschier.pdf (17.9.2008)

3.6 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography: SEC) wird eine Säule mit einem porösen Feststoff mit definierter Porengröße gefüllt (z.B. polymere Gele wie Dextrane). Die Substanztrennung erfolgt bei diesem Verfahren nicht durch Wechselwirkungen wie Verteilung oder Adsorption, sondern nach Größe der Moleküle. Kleinere Substanzen dringen bei der Elution tiefer in die Poren des Feststoffes ein und verweilen dort länger, während dies größeren Molekülen weniger möglich ist. Dieses Eindringen in die Poren führt zu einer Retention der Moleküle. Diejenigen Moleküle, die zu groß sind um in die Poren einzudringen, erreichen das Säulenende zuerst, gefolgt von immer kleiner werdenden Partikeln. Idealerweise sollten sich die zu trennenden Moleküle in ihrer relativen Molekülmasse um mindestens 10–20 % unterscheiden.⁵³

Die Größenausschlusschromatographie wurde zum einen durchgeführt, um erste Erkenntnisse über die enzymatische Spaltung der Polysaccharide zu erhalten. In diesem Fall wurde eine analytische SEC mit folgendem Säulensystem verwendet: VorsHW40 (12cm) + 2mal HW40+Superose 6 (30cm). Zum anderen wurden mittels präparativer SEC die durch die Spaltung entstandenen Oligosaccharide von den noch in der Probe enthaltenen Polysaccharid-Resten und den Monosacchariden getrennt. In diesem Fall wurde ein Säulensystem aus FractogelHW40 (50cm) + P2-Gel (100cm) benutzt.

3.7 UV/VIS-Absorptionsmessung

Die UV/VIS-Spektroskopie nutzt Wellenlängen im Bereich von 200–800nm. Durch Absorption von Strahlung dieser Wellenlängen werden Valenzelektronen von einem Grundenergieniveau in einen „angeregten Zustand“ übergeführt, der energiereicher ist. Dieser HOMO-LUMO-Übergang⁵⁴ benötigt nur eine sehr geringe Energiemenge, wobei bereits die der langwelligen UV/VIS-Strahlung ausreichend ist. Durch Emission der aufgenommenen Lichtenergie kehrt das System wieder in das ursprüngliche Energieniveau zurück.

⁵³ Rücker, G., M. Neugebauer, G.G. Willems: Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001, S. 459ff

⁵⁴ Highest occupied MO = energiehöchstes besetztes Orbital

Lowest unoccupied MO = energietiefstes unbesetztes Orbital

Der Elektronenübergang ist vom HOMO zum LUMO am wahrscheinlichsten, da hierfür die geringste Energie benötigt wird.

Die meisten Substanzen zeigen bei einem bestimmten Wellenlängenbereich, in dem vermessen werden sollte, ein Absorptionsmaximum. Die Transmission ergibt sich aus der Lichtstärke nach dem Durchgang durch die Küvette geteilt durch die Lichtstärke vor dem Durchgang durch die Küvette. Zur Quantifizierung sollte die Konzentration der Proben so gewählt werden, dass die Extinktion⁵⁵ mindestens 0,100 und nicht höher als 1,000 beträgt, da nur in diesem Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration gegeben ist. Dieser Zusammenhang ist im Lambert-Beerschen Gesetz wiedergegeben:

$$E = \epsilon \times c \times d$$

Alternativ dazu ist eine Quantifizierung auch durch die Erstellung einer Eichgerade mittels Proben bekannter Konzentration möglich.⁵⁶

Die Methode der UV/VIS-Absorptionsmessung wurde zur Bestimmung des Gehaltes an Pentosen, Hexosen und Hexuronsäuren angewendet. Die Quantifizierung erfolgte in allen Fällen mittels einer Eichgeraden aus bekannten Konzentrationen von Standardlösungen. Zu den Proben und Standardlösungen wurden bei den unterschiedlichen Nachweisen chromophore Reagentien gegeben, die in Kombination mit den Zuckern zu einer sichtbaren Farbbildung führen.

Bei der Pentosenbestimmung wurden Eisen-Ammonium-Citrat-Lösung und Orcin-Schwefelsäure-Lösung zugegeben. Die Pentosen werden dabei in einen aromatischen Aldehyd (Furfural) umgewandelt, der mit Orcin (3,5-Dihydroxytoluol) unter Bildung eines blaugrünen Kondensationsproduktes reagiert. Das Absorptionsmaximum dieses Xanthonfarbstoffes liegt bei 660nm:

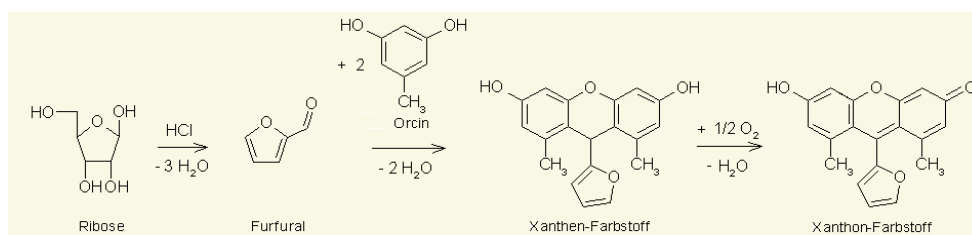


Abbildung 7: Bildung eines Xanthon-Farbstoffes mit Pentosen, Quelle: http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/p32_rib_rna.htm (12.7.2008)

⁵⁵ Extinktion = der negative dekadische Logarithmus der Transmission

⁵⁶ siehe dazu: Gottwald, W., K. H. Heinrich: UV/VIS-Spektroskopie für Anwender, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto 1998.

Zur Bestimmung der Hexosen wurden die Proben mit Anthron-Schwefelsäure-Lösung versetzt. Dabei werden die Hexosen in 5-Hydroxymethylfurfural umgewandelt und es kommt durch die Reaktion mit Anthron zur Bildung eines grünen Triarylmethan-Farbstoffes, der sein Absorptionsmaximum bei 540nm hat:

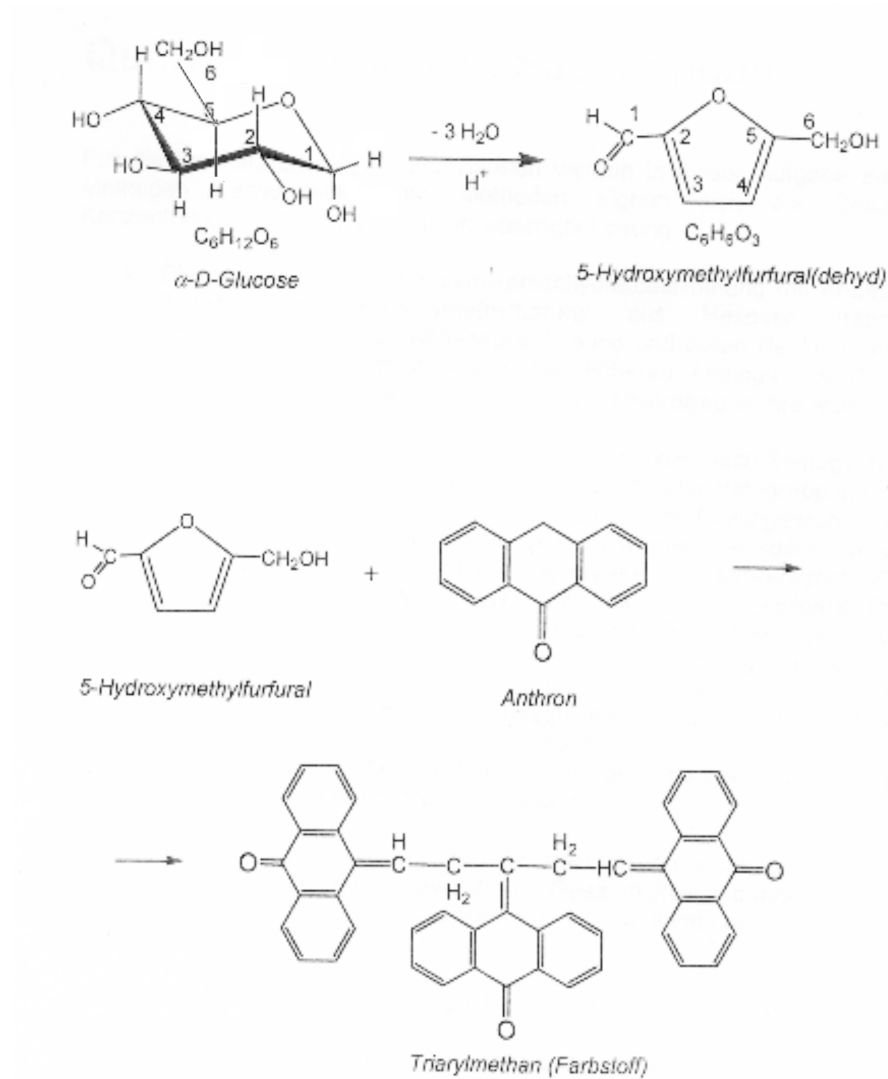


Abbildung 8: Reaktion von Anthron mit Hexosen; Quelle: Modifiziert; nach: Biochemische Übungen – KH/GF, Aufgabe 2: Quantifizierung von Sacchariden, Laborprotokoll

Bei der Uronsäurebestimmung wird die Probe mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt, wodurch sich 5-Formyl-2-furancarbonsäure aus den Uronsäuren bildet. Diese reagiert selektiv mit 3,5-Dimethylphenol unter Bildung eines gelben Farbstoffes, der sein Absorptionsmaximum bei 450nm hat.

4 ERGEBNISSE

Das Ausgangsmaterial der Mucilage aus den Samen von *Hyptis suaveolens* (Gesamtmenge ~30g) wurde bereitgestellt von Prof. S. Okonogi (hergestellt am 16. Nov. 2006)

4.1 Extraktion und Trennung der Polysaccharide

4.1.1 Gewinnung der alkalilöslichen Fraktion

Es wurden 1,0394g des Ausgangsmaterials eingewogen und in ca. 30ml 4M NaOH⁵⁷ (=4,83g NaOH in 30ml dest. Wasser) gelöst. Die Lösung wurde in einem 100ml Erlenmeyerkolben mit Parafilm verschlossen und am Magnetrührer (Heidolph MR 3001K) unter Temperaturkontrolle mittels Thermometer (Heidolph EKT 3000), das an die Heizplatte gekoppelt war, eine Nacht lang bei 60°C gerührt.

4.1.2 Zentrifugation

Um das Volumen zu erhöhen, wurden zu der Lösung am nächsten Tag ca. 30ml dest. Wasser gegeben⁵⁸. Anschließend wurde die Lösung für 5 Minuten bei 11.952g (=10.000rpm) bei ca. 20–30°C zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde gesammelt. Der Feststoffanteil wurde noch zweimal mit 25ml 2M NaOH nachgewaschen und anschließend wieder zentrifugiert. Die jeweiligen Überstände wurden abgetrennt und in einem Becherglas vereinigt.

4.1.3 Neutralisation

Das pH-Meter wurde kalibriert, der pH-Wert der vereinigten Extrakte gemessen. Der pH-Wert lag bei 13,01. Die Probe wurde mit ca. 25–35ml 25 % HCl unter Rühren am Eisbad neutralisiert, bis ein pH-Wert von 6,98 eingestellt war. Das Volumen des Extraktes betrug zu diesem Zeitpunkt 130ml.

⁵⁷ vgl. Reid, J. S. G: "Analysis of Carbohydrates Conferring Hardness on Seeds, in: Modern Methods of Plant Analysis." *New Series, Volume 10: Plant Fibers*, herausgegeben von H.F. Linskens und J.F. Jackson, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris Tokio 1989, p. 304

⁵⁸ also die gleiche Menge dest. Wassers, als 4M NaOH-Lösung während der Extraktion verwendet wurde

4.1.4 Dialyse

Das Volumen sollte auf 3 Dialyseschläuche (Cellulose Membran 43mm × 27mm, Sigma-Aldrich) aufgeteilt werden. Ein Stück Dialyseschlauch (ca. 0,5cm pro ml Füllflüssigkeit) wurde 20 Minuten lang in entmineralisiertem Wasser gekocht und anschließend mit kaltem entmineralisierten Wasser abgeschreckt. Die eine Seite des Dialyseschlau-ches wurde mit 2 Klammern fest verschlossen, der Schlauch anschließend zu 2/3 mit der Probe befüllt. Die zweite Seite des Schlauches wurde ebenfalls mit zwei Klammern verschlossen. Der gefüllte Schlauch wurde an beiden Enden an einem mit entmineralisiertem Wasser befüllten 5l-Plastikbecherglas befestigt. In das Becherglas wurde ein Magnetrührer gegeben und für 30 min. gerührt. Anschließend wurde das entmineralisierte Wasser durch frisches ersetzt. Der Wasserwechsel wurde dreimal nach je 30 min. wiederholt und die Dialyse im Anschluss über Nacht fortgesetzt. Das Gesamtvolumen der Probe nach der Dialyse betrug 160ml.

4.1.5 Lyophilisation

Das Gesamtvolumen wurde auf drei 250ml-Rundkolben aufgeteilt (da der Lyophilisator nur bei max. 60ml Probe pro Rundkolben noch ein optimales Ergebnis liefert). Der Lyophilisator wurde ca. ½ h lang vorgekühlt, bis er eine Temperatur von $\sim -56^{\circ}\text{C}$ erreicht hatte.

Die aufgeteilte Probe wurde unter schnellem Drehen am Rotovapor mit einer Mischung aus zerkleinertem Trockeneis in Methanol eingefroren, wobei darauf zu achten war, dass der 250ml-Kolben möglichst tief in die Trockeneis-Methanol-Mischung eintauchte. Die vorgefrorenen Proben wurden an den Lyophilisator gehängt und über Nacht gefriergetrocknet. Am nächsten Morgen (nach ca. 16h) waren sämtliche Proben vollständig trocken. Die Ausbeute des Gesamtpolysaccharides betrug 432mg (=41,95 % der Ausgangsmenge an Mucilage).

4.1.6 Ionenaustauschchromatographie – Trennung in saures und neutrales Polysaccharid

4.1.6.1 Durchführung 1

16,0g DEAE-Cellulose wurden in 30ml dest. Wasser suspendiert und in einen Messzylinder übergeführt. Nach Ende der Sedimentation betrug das Volumen des Gels 30ml. Das Gel wurde unter Vakuum zweimal mit je 500ml dest. Wasser gewaschen und an-

anschließend direkt auf der Nutsche wieder in 50ml dest. Wasser suspendiert. Im Anschluss daran wurde das Gel noch zweimal unter Vakuum mit je 30ml 0,1M TRIS-Puffer, der mit 25 % HCl auf einen pH 7,5 eingestellt wurde, gewaschen. Das gewaschene Gel wurde in einem Becherglas in 30ml 0,1M TRIS-Puffer suspendiert. Der pH-Wert der Suspension betrug 8,1 und wurde mit 0,01M Zitronensäure auf einen pH=7,5 eingestellt (Verbrauch an Zitronensäure ca. 12ml!).

0,2510g Gesamt-Polysaccharid wurden in 20ml TRIS-Puffer gelöst und die Lösung zu dem Gel gegeben. Die Mischung wurde für 40 min. am Magnetrührer gerührt.

Die Säule wurde mit der Gel-Polysaccharid-Mischung befüllt und über Nacht im Kühlraum gelagert. Am nächsten Tag wurde die Säule aus dem Kühlraum geholt und auf Raumtemperatur erwärmen gelassen. Dann wurde mit 0,1M TRIS-Puffer bei einer Fließgeschwindigkeit von ca. 1ml/min. eluiert, um das neutrale Polysaccharid zu erhalten. Pro Fraktion wurden etwa 9–10ml gesammelt. Der Nachweis des neutralen Polysaccharides erfolgte durch Auftragen kleiner Probenmengen mittels Micropipetten auf DC-Platten (DC-Alufolien von Merck, Kieselgel 60 F254, 5 × 10cm,) und anschließendem Eintauchen in Thymol Reagens.

Thymol-Reagens⁵⁹:

- 0,5g Thymol (Thymol, min. 99,5 %, Sigma-Aldrich)
- 5ml H₂SO₄ (Schwefelsäure 95–98 %, A.C.S. Reagens, Aldrich)
- 95ml Ethanol (96 % Ethanol)

Die Farben entwickelten sich, nachdem die DC-Platten für 5 min. im Trockenschrank bei ca. 110°C erhitzt wurden.

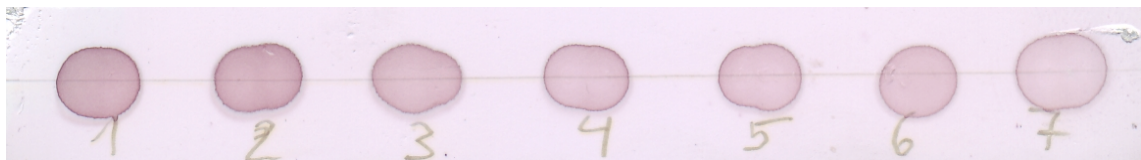


Abbildung 9: Nachweis der neutralen Fraktion des Polysaccharides

⁵⁹ siehe: Jork, H., W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer: Dünnschichtchromatographie: *Reagenzien und Nachweismethoden, Band 1b*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo 1993, S. 423–435

Das neutrale Polysaccharid wurde in den ersten 10 Fraktionen detektiert, es zeigte nach dem Anfärben mit Thymol-Reagens eine rote Farbe.

Nachdem in den darauffolgenden Fraktionen kein neutrales Polysaccharid mehr nachweisbar war, wurde zur Gewinnung des sauren Polysaccharides mit 0,5M NaCl eluiert. Der Nachweis erfolgte ebenfalls mit Thymol-Reagens, wobei das saure Polysaccharid aber braun gefärbt erschien und erst nach einiger Zeit an der Luft nach violett-grau nachdunkelte.

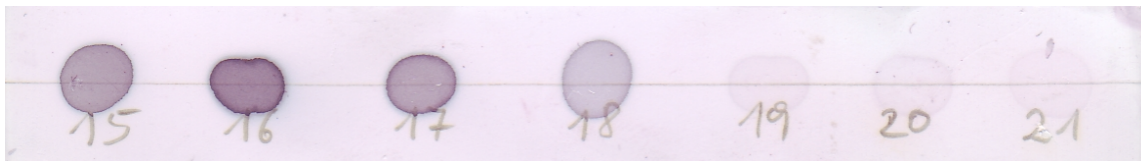


Abbildung 10: Nachweis der sauren Fraktion des Polysaccharides

Die Fraktionen 1–10 enthielten das neutrale Polysaccharid, wurden gepoolt und über Nacht dialysiert. Die Fraktionen 14–23 enthielten das saure Polysaccharid und wurden getrennt davon ebenfalls gepoolt und dialysiert. Am Ende der Dialyse ergab sich für die Lösung des neutralen Polysaccharids ein Volumen von 110ml, für das saure Polysaccharid ein Volumen von 130ml.

Das Ionenaustauschharz wurde für die weitere Verwendung in folgender Reihenfolge regeneriert mit:

- 100ml 0,1M NaCl-Lösung
- 100ml dest. Wasser
- 100ml 20 % Ethanol

Die Säule wurde anschließend wieder im Kühlraum gelagert.

Das saure Polysaccharid wurde für die Lyophilisation auf 2 Kolben zu je 55ml aufgeteilt, das neutrale Polysaccharid wurde am Rotovapor auf ein Volumen von ca. 50ml eingengt. Beide Polysaccharide wurden über Nacht bei -56°C gefriergetrocknet und am nächsten Tag gewogen.

Ausbeute neutrales Polysaccharid: 162,95mg (=64,92 %)

Ausbeute saures Polysaccharid: 84,60mg (=33,71 %).

4.1.6.2 Durchführung 2

Alternativ dazu wurde die Trennung in saures und neutrales Polysaccharid an einer DEAE-Säule mit unterschiedlich konzentrierten Formiatpuffern bei pH 5 vollzogen.

Zuerst wurden zwei Puffer-Lösungen bereitete. Für die Pufferlösung 1 wurden ca. 500ml eines 0,005M Formiatpuffer bereitet, der mit 4M Ammoniak auf einen pH von 5 eingestellt wurde. Mit dieser Pufferlösung wurde die DEAE-Säule vor Beginn der Elution equilibriert. Pufferlösung 2 war ein 0,5M Formiatpuffer, der ebenfalls mit 4M Ammoniak auf pH 5 eingestellt wurde.

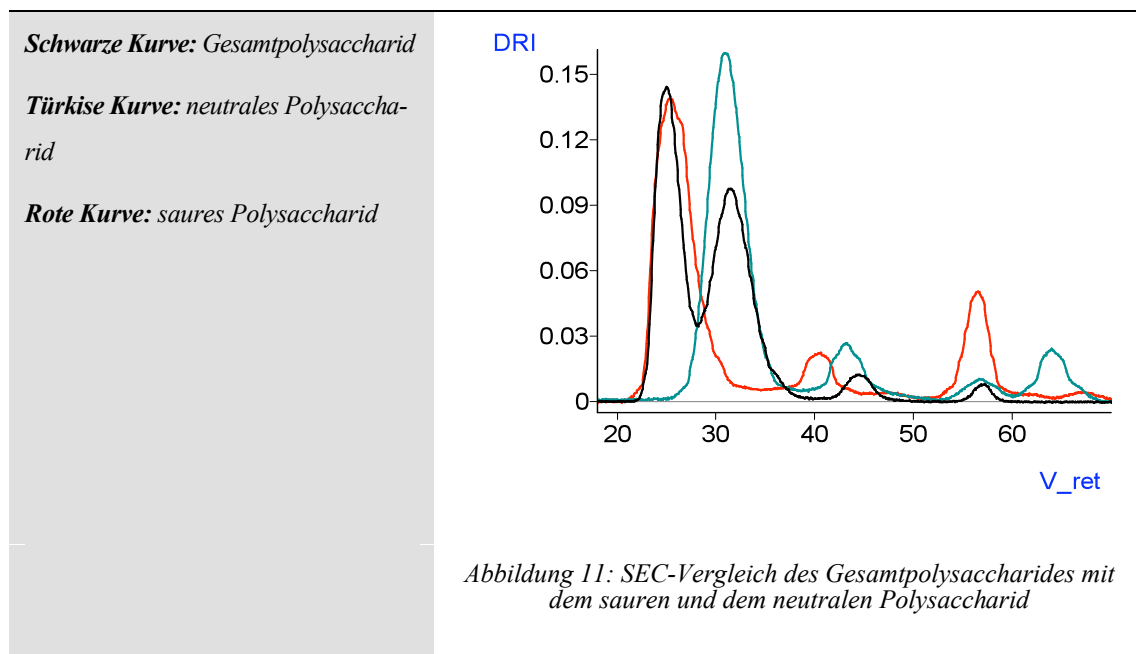
150mg der alkalilöslichen Fraktion aus *Hyptis suaveolens* wurden in 5ml der Pufferlösung 1 über Nacht bei 70°C unter Rühren gelöst und abgekühlt. Danach wurde die Lösung für 10 min. bei 3500rpm zentrifugiert. Der Fraktionskollektor wurde auf 10 Minuten (dies entspricht in diesem Fall 10 ml) pro Fraktion eingestellt. Anschließend wurde die Probe auf die DEAE-Säule aufgetragen und zur Gewinnung der neutralen Fraktion mit der Pufferlösung 1 eluiert. Der Nachweis auf das Vorhandensein des neutralen Polysaccharids erfolgte, indem von jeder Fraktion 0,5ml entnommen und mit Anthron-Reagens (0,4mg Anthron in 200ml conc. H₂SO₄) versetzt wurden. Eine grüne Färbung zeigte das Vorhandensein des Polysaccharides in den Fraktionen 3–14 an. Diese Fraktionen wurden gepoolt und im Anschluss daran lyophilisiert.

Zur Gewinnung des sauren Polysaccharids wurde im Anschluss daran mit 0,5M Formiatpuffer eluiert, der Nachweis erfolgte ebenfalls mit Anthron-Reagens. Das saure Polysaccharid wurde in den Fraktionen 20–37 detektiert, welche wieder gepoolt und lyophilisiert wurden.

Die Regeneration der Säule erfolgte durch Nachwaschen mit 0,05M NH₄OH, bis der pH-Wert deutlich alkalisch war und anschließendem Waschen mit 0,005M Formiatpuffer, bis der pH-Wert wieder 5 betrug.

4.2 HPLC-SEC der Polysaccharide

Es wurden 10mg der alkalilöslichen Fraktion unter Rühren auf der Heizplatte während 2 Stunden bei 70°C in 1ml Eluent (14,62g NaCl und 200mg NaN₃ in 5l deionisiertem Wasser) gelöst, abgekühlt, anschließend bei 13.500rpm zentrifugiert und 0,3ml des Überstandes in die SEC eingespritzt (schwarze Kurve). Zur Klärung, welches Polysaccharid höhermolekular ist, wurden sowohl das saure (rote Kurve), als auch das neutrale Polysaccharid (türkise Kurve) in gleicher Weise behandelt und ebenfalls in die SEC eingespritzt (analytische SEC: (Säulensystem: VorsHW40 (12cm) + 2mal HW40+Superose 6 (30cm)))



Es zeigt sich, dass das saure Polysaccharid höhermolekular als das neutrale ist und dass sich das Gesamtpolysaccharid etwa im Verhältnis 60:40 aus saurem und neutralem Polysaccharid zusammensetzt.

4.3 Hydrolyse des sauren Polysaccharides mit 1M Ameisensäure zur Gewinnung von Oligosacchariden

10mg des sauren Polysaccharides wurden in 1ml 1M Ameisensäure gelöst und bei 80°C auf der Heizplatte gerührt. Nach zwei Stunden wurden 0,5ml davon entnommen: 0,4ml wurden mit 100µl 4M Ammoniak neutralisiert (wobei Ammonformiat entsteht) und in die SEC eingespritzt, 0,1ml wurden mit 0,5ml MeOH versetzt und bis zur Trockene unter N₂-Begasung eingedampft. Der Rückstand wurde wieder in 0,5ml Wasser gelöst, nochmals mit 0,5ml MeOH versetzt und wieder unter N₂-Begasung eingedampft. Um die Probe neutral werden zu lassen, wurde dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand in 1ml Wasser aufgenommen und 3µl der Lösung auf eine DC-Platte aufgetragen.

Nach vier Stunden wurde der Rest der hydrolysierten Lösung auf die gleiche Art und Weise behandelt. Die DC-Platte wurde in einem Laufmittel zur Detektion der Oligosaccharide (als Laufmittel wurde ein Gemisch aus H₂O:EtOH:Pr:nB=2:3:3:2 verwendet) laufen gelassen und anschließend mit Thymol-Reagens detektiert.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie war eine Detektion mit freiem Auge aufgrund der zu geringen Konzentration der entstandenen Oligosaccharide kaum möglich. Besser sichtbar waren jedoch die noch nicht vollständig hydrolysierten Polysaccharid-Reste, sowie die entstandenen Monosaccharide, v.a. Xylose.

SEC (Säulensystem: VorsHW40 (12cm) + 2mal HW40+Superose6 (30cm)):

Bei der SEC zeigt sich nach der Hydrolyse mit 1M Ameisensäure die Verschiebung in den niedermolekularen Bereich. Hier ist der Abbau deutlicher zu erkennen als auf der Dünnschichtchromatographie. Es zeigt sich, dass der größte Teil der Polysaccharide nach zwei Stunden bereits hydrolysiert war, nach vier Stunden war der Abbau noch weiter fortgeschritten und es lagen vermehrt auch Monosaccharide vor.

Bahn 1: Standard 1 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose (je 0,25mg/ml), Glucuronsäure (1mg/ml), Galacturonsäure (0,25mg/ml)

Bahn 2: saures PS nach 2h Hydrolyse mit 1M Ameisensäure

Bahn 3: saures PS nach 4h Hydrolyse mit 1M Ameisensäure

Bahn 4: Standard 2 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose (je 0,25mg/ml)

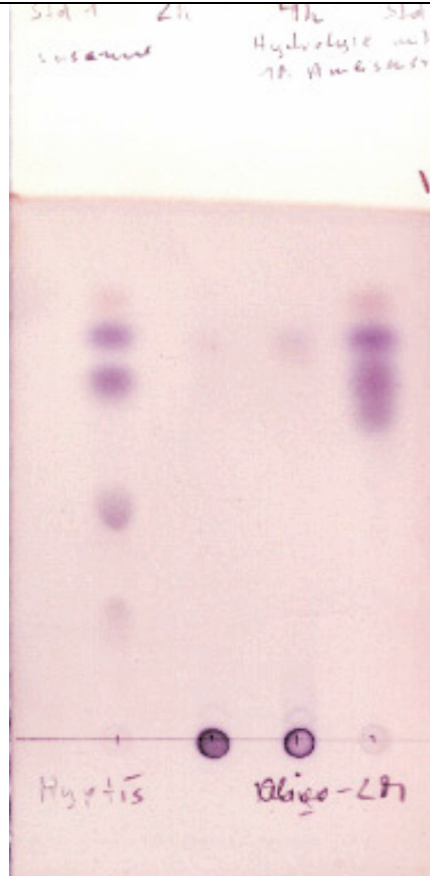


Abbildung 12: DC der Hydrolyse des sauren Polysaccharides mit 1M Ameisensäure

Schwarz: saures Polysaccharid vor der Hydrolyse

Blau: saures Polysaccharid nach zwei Stunden Hydrolyse mit 1M Ameisensäure

Rot: saures Polysaccharid nach vier Stunden Hydrolyse mit 1M Ameisensäure

DRI

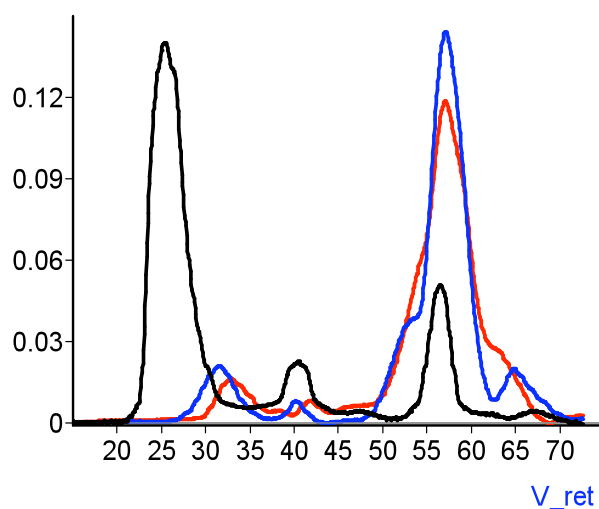


Abbildung 13: SEC der Hydrolyse des sauren Polysaccharides mit 1M Ameisensäure

4.4 Bestimmung der Pentosen, Hexosen und Hexuronsäuren

4.4.1 Ohne vorherige Hydrolyse über Nacht mit 72 % Schwefelsäure

4.4.1.1 Colorimetrische Bestimmung der Pentosen – Fe-Orcinmethode⁶⁰

Reagentien:

- 0,2g Orcin/100ml (30ml deionisiertes Wasser + 70ml conc. H₂SO₄)
- 10mg Eisen-Ammoniumcitrat/ml deionisiertes Wasser

Standard:

Frisch bereitete Lösung aus 10mg Xylose/100ml deionisiertem Wasser (immer frisch bereiten, da sich Xylose mit der Zeit zersetzt). Aus dieser Standardlösung wurde eine Eichgerade mit folgenden Konzentrationen erstellt: 3µg/ml, 6 µg/ml, 12µg/ml und 20µg/ml.

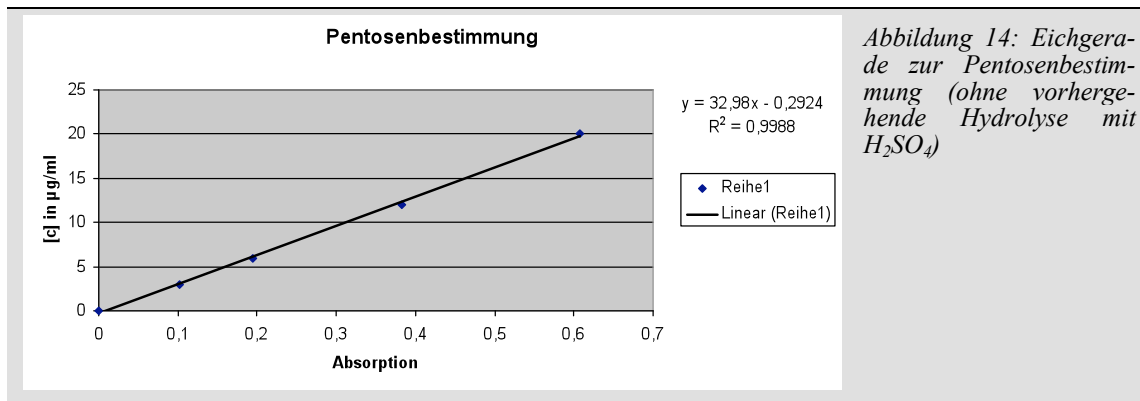
Zu 1ml Probe wurden 50µl Eisen-Ammonium-Citrat-Lösung und 1ml der Orcin-Schwefelsäure-Lösung zugegeben und gut gemischt. Für die Blindprobe wurde 1ml deionisiertes Wasser anstelle der Probe verwendet.

Anschließend wurden die Eprouvetten bei 95°C für 10 min. ins Wasserbad gestellt und danach im kalten Wasser abgekühlt, wieder gemischt und für 10 min. stehengelassen. Nach dieser Zeit zeigten die Proben je nach Konzentration eine schwächere oder kräftigere blaugüne Färbung und es wurde bei 660nm die Absorption gemessen. Die Standardreihe wurde in der selben Weise gleichzeitig mit den Proben bereitete und eine Eichgerade erstellt:

Tabelle 3: Standardreihe zur Pentosenbestimmung (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H₂SO₄)

Probe	Abs.	Mittelwert	abzügl. Blank	[c] in µg/ml
blank	0,052			
	0,048	0,05	0	0
Standard 1	0,144			
	0,161	0,1525	0,1025	3
Standard 2	0,249			
	0,241	0,245	0,195	6
Standard 3	0,423			
	0,443	0,433	0,383	12
Standard 4				
	0,657	0,657	0,607	20

⁶⁰ Quelle: Praznik, W.: Determination of Pentosans; unveröffentlichtes Laborprotokoll vom 12.01.2008



Nach der Erstellung der Eichgeraden wurden die Messwerte der verdünnten Proben in die Geradengleichung eingesetzt und aus folgenden Werten der Mittelwert der Konzentration berechnet:

Tabelle 4: Konzentrationsbestimmung an Pentosen (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H_2SO_4)

Verdünnung	Absorption bei 660nm	Absorption abzügl. blank	Konzentration in µg/ml	Mittelwert Konzentration in µg/ml
Gesamt-Polysaccharid				
1:125	1,327	1,277	5227,88	
1:166,6	1,258	1,208	6588,60	
1:200	1,120	1,070	6999,24	
1:250	0,956	0,906	7396,87	6553,15
Neutrales Polysaccharid				
1:100	0,326	0,276	881,01	
1:125	0,314	0,264	1051,79	
1:166,6	0,212	0,162	841,39	
1:200	0,227	0,177	1109,01	970,80
Saures Polysaccharid				
1:166,6	0,876	0,826	4489,72	
1:200	0,962	0,912	5957,07	
1:250	0,855	0,805	6564,13	5670,30

4.4.1.2 Colorimetrische Bestimmung der Hexosen – Anthronmethode⁶¹

Reagentien: 0,9g Anthron wurden in einem 600ml Becherglas eingewogen, in 450ml konz. Schwefelsäure am Magnetrührer gelöst und in den Dispenser gefüllt.

Stammlösung: 0,200g wasserfreie Glucose/100ml deionisiertes Wasser

Standardlösung: 10ml der Stammlösung wurden in einen 100ml Messkolben übergeführt und mit deionisiertem Wasser auf 100ml aufgefüllt (Konzentration: 0,2mg/ml)

⁶¹ Quelle: Biochemische Übungen – KH/GF, Aufgabe 2 /Quantifizierung v. Sacchariden. Laborprotokoll

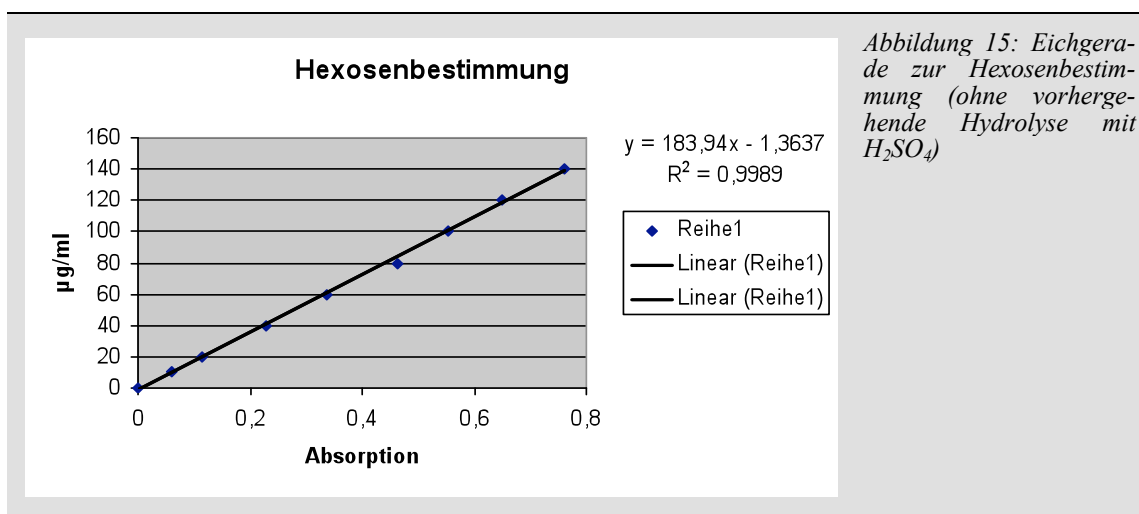
Aus dieser Standardlösung wurde für die Erstellung der Eichgerade auf folgende Konzentrationen verdünnt: 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml, 140 µg/ml.

1ml Probelösung wurde mit 2ml der Anthron-Schwefelsäure-Lösung vorsichtig unterschichtet und gut vermischt, dann für 10min bei 95°C im Wasserbad erhitzt, im kalten Wasser abgekühlt und gemischt. Nach 30min wurde die Absorption bei 540nm gemessen.

Nullwert und Standardreihe wurden in der selben Weise mit den Proben gleichzeitig bereit.

Tabelle 5: Standardreihe zur Hexosenbestimmung (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H_2SO_4)

Probe	gemessene Absorption	Mittelwert	Wert ohne Leerwert	Wert in µg/ml
blank	0,048			
	0,043	0,046	0	0
Standard 1	0,100			
	0,112	0,106	0,061	10
Standard 2	0,155			
	0,163	0,159	0,114	20
Standard 3	0,273			
	0,273	0,273	0,228	40
Standard 4	0,377			
	0,389	0,383	0,338	60
Standard 5	0,508			
		0,508	0,463	80
Standard 6	0,600			
	0,595	0,598	0,552	100
Standard 7	0,696			
		0,696	0,651	120
Standard 8	0,827			
	0,787	0,807	0,762	140



Daraus wurde folgende Konzentration an Hexosen innerhalb der Polysaccharide berechnet:

Tabelle 6: Konzentrationsbestimmung an Hexosen (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H_2SO_4)

Verdünnung	gemessene Absorption	Wert ohne Leerwert	Wert in $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert in $\mu\text{g/ml}$
Gesamt-Polysaccharid				
1:125	0,520	0,475	10739,48	
1:100	0,497	0,452	8168,52	8168,52
Saures Polysaccharid				
1:125	0,235	0,190	4186,62	
1:100	0,328	0,283	5059,94	4885,06
1:50	0,641	0,596	5408,63	
Neutrales Polysaccharid				
1:125	0,345	0,300	6715,79	
1:100	0,451	0,406	7322,40	7019,09
1:50	0,877	0,832	7579,12	

4.4.1.3 Colorimetrische Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren⁶²

Reagentien:

- 2 % NaCl Lösung in deionisiertem Wasser
- 0,1g 3,5-Dimethylphenol in 100ml Eisessig

Standard: 10mg D-Galacturonsäure/100ml deionisiertes Wasser

Aus dieser Standardlösung wurde eine Eichgerade mit folgenden Konzentrationen erstellt: 10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$ und 90 $\mu\text{g/ml}$.

In einer Epruvette wurden zu 0,125ml Probe 0,125ml 2%ige NaCl-Lösung und 2ml H_2SO_4 zugegeben, gut gemischt und für 10 min. bei 70°C ins Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Proben in kaltem Wasser abgekühlt, mit 0,1ml einer 3,5-Dimethylphenol-Lösung (Colorimetrisches Reagens) versetzt und gut gemischt. Es zeigt sich je nach enthaltener Konzentration eine mehr oder weniger intensive Gelbfärbung. Nach 10 min. wurden die Absorptionen bei 450 und 400nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration an Hexuronsäuren beruht auf der Differenz der Absorptionen bei 400 und 450nm. Zusätzlich war die Einberechnung eines Korrekturfaktors von 1,12 notwendig, um die korrekte Absorption von Hexuronsäuren aus Polymeren zu erhalten.

⁶² Scott, R. W.: "Colorimetric Determination of Hexuronic Acids in Plant Materials", *Analytical Chemistry*, Vol. 51, No. 7, June 1979

Nullwert und Standardreihe wurden in selber Weise mit den Proben gleichzeitig bereitete.

Tabelle 7: Standardreihe zur Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H_2SO_4)

Probe	Absorption bei 400nm	Absorption bei 450nm	Differenz	Mittelwert	tatsächl. Wert in $\mu\text{g/ml}$
blank	0,052	0,046	0		
	0,048	0,041	0	0	0
Standard 1	0,062	0,106	0,044		
	0,077	0,118	0,041	0,043	10
Standard 2	0,092	0,219	0,127		
	0,080	0,215	0,135	0,131	25
Standard 3	0,107	0,356	0,249		
	0,110	0,395	0,285	0,267	50
Standard 4	0,137	0,538	0,401		
	0,129	0,522	0,393	0,397	75
Standard 5	0,146	0,616	0,470		
	0,151	0,647	0,496	0,483	90

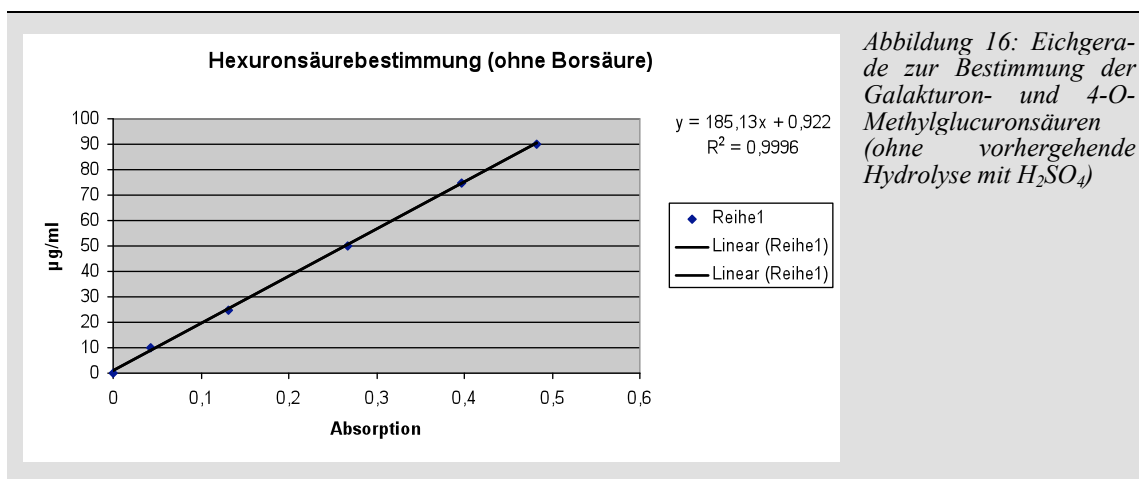


Tabelle 8: Konzentrationsbestimmung an Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H_2SO_4)

Verdünnung	Absorption bei 400nm	Absorption bei 450nm	Differenz	*1,12 (Korrekturfaktor)	Wert in $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
Gesamt-Polysaccharid						
1:20	0,223	0,939	0,716	0,802	2987,63	
1:50	0,113	0,336	0,223	0,250	2358,00	2672,82

4.4.1.4 Colorimetrische Bestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren⁶³

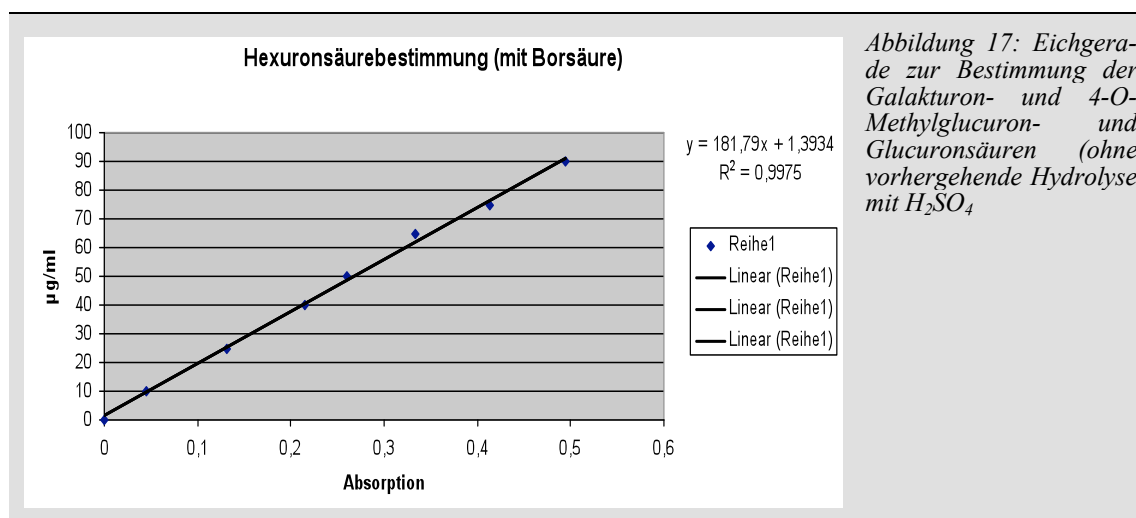
Durch Zugabe von Borsäure und die Verlängerung der Heizperiode im Wasserbad können auch Glucuronsäuren neben den Galacturonsäuren und 4-O-Methylglucuronsäuren colorimetrisch bestimmt werden: Zieht man den erhaltenen Wert aus der Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren von demjenigen der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäure-Bestimmung ab, so erhält man den Wert der enthaltenen Glucuronsäuren.

Reagentien:

- 2g NaCl und 3g H₃BO₃ in 100ml deionisiertem Wasser
- 0,1g 3,5-Dimethylphenol in 100ml Eisessig

Standard: 10mg D-Galacturonsäure/100ml deionisiertes Wasser

Aus dieser Standardlösung wurde eine Eichgerade mit folgenden Konzentrationen erstellt: 10µg/ml, 25µg/ml, 40µg/ml, 50µg/ml, 65µg/ml, 75µg/ml und 90µg/ml.



In einer Epruvette wurden zu 0,125ml Probe 0,125ml NaCl-H₃BO₃-Lösung und 2ml H₂SO₄ zugegeben, gut gemischt und für 40 min. bei 70°C ins Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Proben in kaltem Wasser abgekühlt, mit 0,1ml einer 3,5-Dimethylphenol-Lösung (Colorimetrisches Reagens) versetzt und gut gemischt. Nach

⁶³ ebd.

10 min. wurden die Absorptionen bei 450 und 400nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration an Hexuronsäuren beruht wieder auf der Differenz der Absorptionen bei 400 und 450nm. Zusätzlich war die Einberechnung eines Korrekturfaktors von 1,12 notwendig, um die korrekte Absorption von Hexuronsäuren aus Polymeren zu erhalten.

Nullwert und Standardreihe wurden in selber Weise mit den Proben gleichzeitig bereit.

Tabelle 9: Standardreihe zur Bestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H_2SO_4)

Probe	Absorption bei 400nm	Absorption bei 450nm	Differenz	Mittelwert	tatsächl. Wert in $\mu\text{g/ml}$
blank	0,050	0,048	0		
	0,054	0,049	0	0	0
	0,057	0,052	0		
Standard 1	0,080	0,126	0,046		
	0,083	0,126	0,043	0,045	10
Standard 2	0,080	0,206	0,126		
	0,082	0,218	0,136	0,131	25
Standard 3	0,097	0,295	0,198		
	0,104	0,337	0,233	0,216	40
Standard 4	0,110	0,362	0,252		
	0,112	0,380	0,268	0,260	50
Standard 5	0,131	0,453	0,322		
	0,127	0,471	0,344	0,333	65
Standard 6	0,154	0,566	0,412		
	0,148	0,562	0,414	0,413	75
Standard 7	0,165	0,655	0,490		
	0,161	0,660	0,499	0,495	90

Tabelle 10: Konzentrationsbestimmung an Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren (ohne vorhergehende Hydrolyse mit H_2SO_4)

Verdünnung	Absorption bei 400nm	Absorption bei 450nm	Differenz	*1,12 (Korrekturfaktor)	Wert in $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
1:30	0,185	0,684	0,499	0,559	3089,77	
1:40	0,144	0,476	0,332	0,372	2759,61	2938,55
1:200	0,075	0,141	0,066	0,074	2966,26	

4.4.2 Mit vorangehender Hydrolyse über Nacht mit 72 % Schwefelsäure

4.4.2.1 Hydrolyse der alkalilöslichen Fraktion mit 72 % Schwefelsäure

10mg der alkalilöslichen Fraktion wurden in 1ml 72 %iger H_2SO_4 gelöst und bei 0°C im Kühlraum für 24h unter Rühren in die Monosaccharide hydrolysiert. Anschließend wurden für die Bestimmung von Pentosen, Hexosen und Hexuronsäuren die Proben verdünnt.

4.4.2.2 Bestimmung der Pentosen

Nach der Hydrolyse der Probe mit 72 % Schwefelsäure wurden die Pentosen in derselben Art und Weise wie unter Punkt 4.4.1.1, Seite 43, angegeben bestimmt.

Tabelle 11: Standardreihe zur Pentosenbestimmung (nach vorangegangener Hydrolyse mit H_2SO_4)

Probe	Absorption bei 660nm	Mittelwert der Absorption	Mittelwert abzügl. blank	Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
Blank 1	0,052			
	0,052	0,052	0,000	0
Standard 1	0,159			
	0,169	0,164	0,112	3
Standard 2	0,501			
	0,501	0,501	0,449	12
Standard 3	0,988			
	0,943	0,966	0,914	30

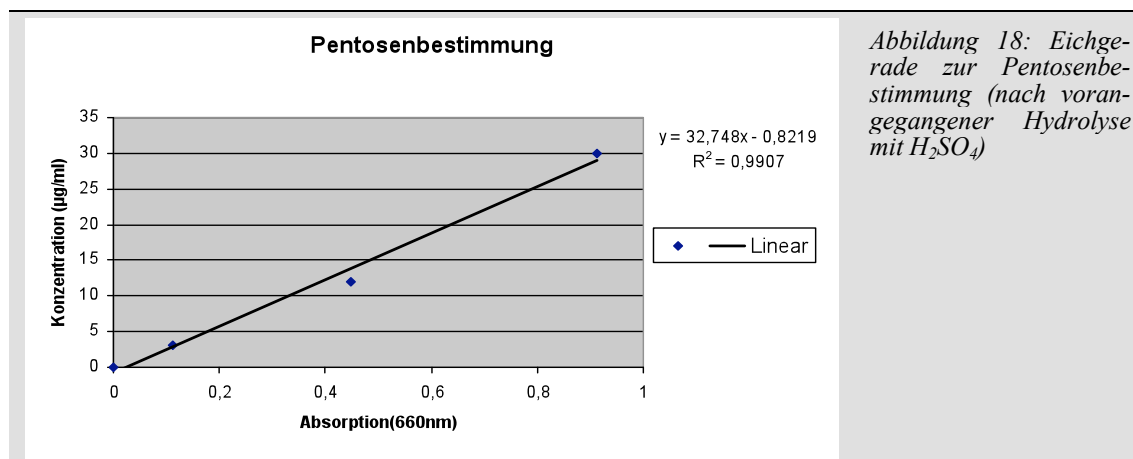


Tabelle 12: Konzentrationsbestimmung an Pentosen (nach vorangegangener Hydrolyse mit H_2SO_4)

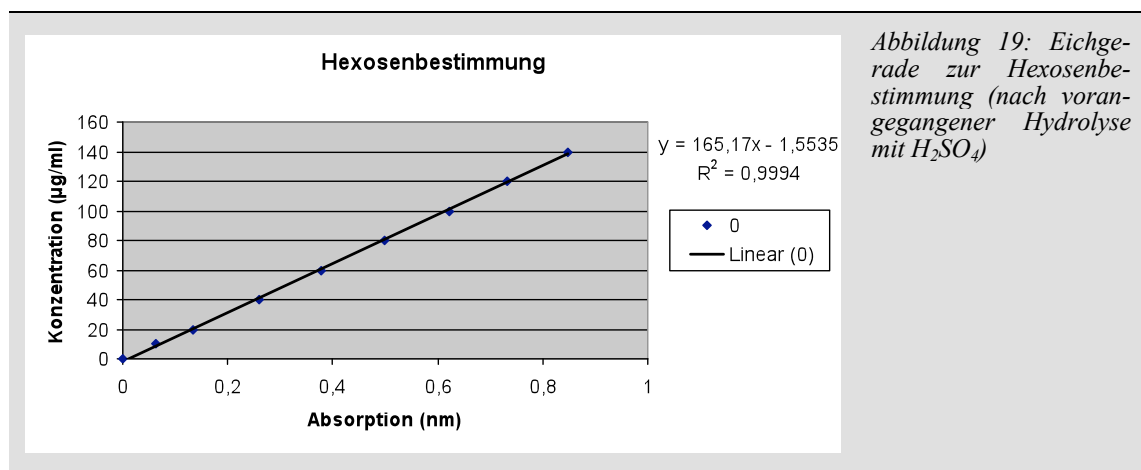
Verdünnung	Absorption bei 660nm	Absorption abzügl. Blank	Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
1:133	0,717	0,665	2794,07	
1:200	0,382	0,330	1996,99	2797,35
1:400	0,352	0,300	3601,00	

4.4.2.3 Bestimmung der Hexosen

Nach der Hydrolyse der Probe mit 72 % Schwefelsäure wurden die Hexosen wie unter Punkt 4.4.1.2, Seite 44 beschrieben bestimmt.

Tabelle 13: Standardreihe zur Hexosenbestimmung (nach vorangegangener Hydrolyse mit H_2SO_4)

Probe	Absorption bei 540nm	Mittelwert Absorption	Mittelwert abzügl. Blank	Konzentration $\mu\text{g/ml}$
Blank	0,060			
	0,063	0,062	0	0
Standard 1	0,129			
	0,124	0,125	0,064	10
Standard 2	0,195			
	0,195	0,195	0,134	20
Standard 3	0,318			
	0,324	0,321	0,260	40
Standard 4	0,437			
	0,443	0,440	0,379	60
Standard 5	0,555			
	0,565	0,560	0,499	80
Standard 6	0,678			
	0,691	0,685	0,623	100
Standard 7	0,790			
	0,796	0,793	0,732	120
Standard 8	0,908			
	0,909	0,909	0,847	140



Daraus wurde folgende Konzentration an Hexosen innerhalb des Gesamtpolysaccharides berechnet:

Tabelle 14: Konzentrationsbestimmung an Hexosen (nach vorangegangener Hydrolyse mit H_2SO_4)

Verdünnung	Absorption bei 540nm	Absorption abzügl. blank	Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
1:100	0,449	0,388	6244,99	
1:133	0,355	0,294	6256,52	6139,24
1:200	0,250	0,189	5916,21	

4.4.2.4 Colorimetrische Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren

Nach der Hydrolyse der Probe mit 72 % Schwefelsäure wurden die Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren in derselben Art und Weise wie unter Punkt 4.4.1.3, Seite 46, beschrieben – aber ohne Einberechnung eines Korrekturfaktors für Polymere – bestimmt.

Tabelle 15: Standardreihe zur Bestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren (nach vorangegangener Hydrolyse mit H_2SO_4)

Probe	Absorption bei 400nm	Absorption bei 450nm	Differenz	Mittelwert	[c] in $\mu\text{g/ml}$
blank	0,068	0,043	0		
	0,063	0,040	0	0	0
Standard 1	0,067	0,091	0,024		
	0,068	0,086	0,018	0,021	10
Standard 2	0,094	0,289	0,195		
	0,095	0,297	0,202	0,199	50
Standard 3	0,120	0,457	0,337		
	0,130	0,479	0,349	0,343	90

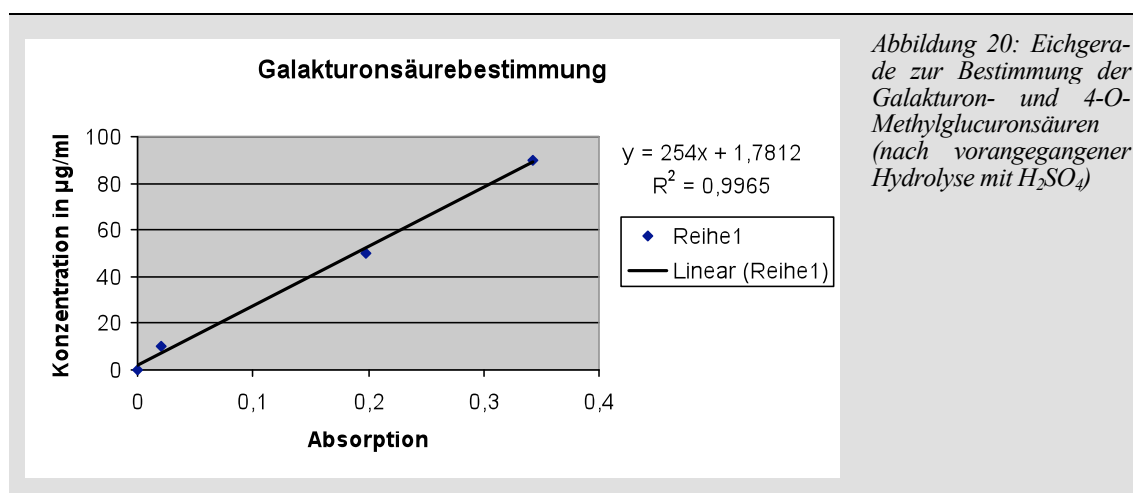


Tabelle 16: Konzentrationsbestimmung der Galakturon- und 4-O-Methylglucuronsäuren (nach vorangegangener Hydrolyse mit H_2SO_4)

Verdünnung	Absorption bei 400nm	Absorption bei 450nm	Differenz	Wert in $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
1:133	0,066	0,113	0,047	1829,23	
1:100	0,072	0,144	0,072	2006,92	1918,07

4.4.2.5 Colorimetrische Bestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren

Nach der Hydrolyse der Probe mit 72 % Schwefelsäure wurden die Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren wie unter Punkt 4.4.1.4, Seite 48, beschrieben – aber ohne Einberechnung eines Korrekturfaktors für Polymere – bestimmt.

Tabelle 17: Standardreihe zur Bestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren (nach vorangegangener Hydrolyse mit H_2SO_4)

Probe	Absorption bei 400nm	Absorption bei 450nm	Differenz	Mittelwert	[c] in $\mu\text{g/ml}$
blank	0,052	0,043	0		
	0,053	0,044	0	0	0
Standard 1	0,057	0,089	0,032	0,032	10
Standard 2	0,083	0,245	0,162		
	0,092	0,271	0,179	0,171	50
Standard 3	0,113	0,425	0,312		
	0,117	0,449	0,332	0,322	90

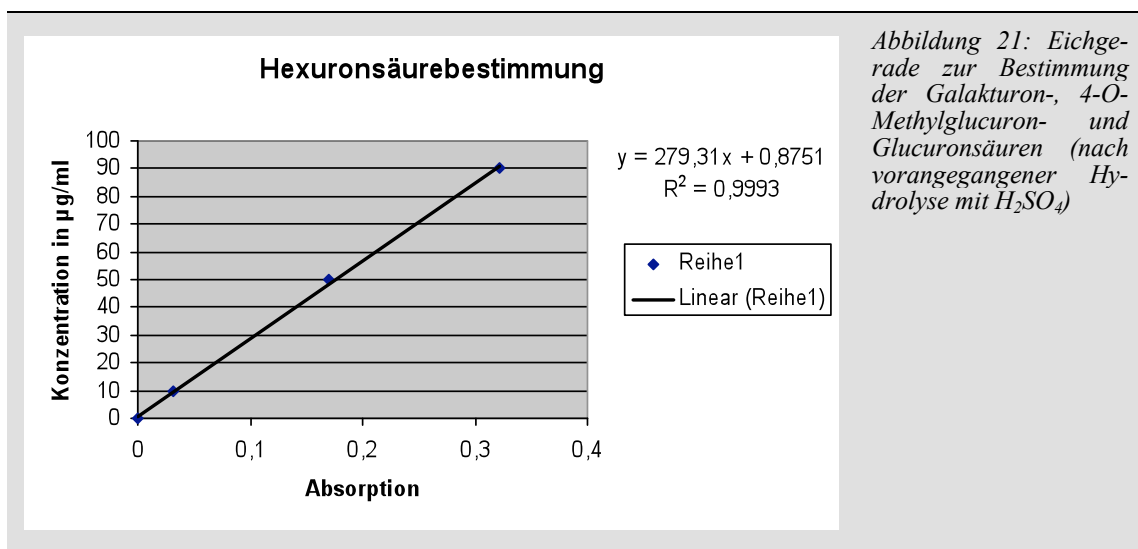


Tabelle 18: Konzentrationsbestimmung der Galakturon-, 4-O-Methylglucuron- und Glucuronsäuren (nach vorangegangener Hydrolyse mit H_2SO_4)

Verdünnung	Absorption bei 400nm	Absorption bei 450nm	Differenz	Wert in $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
1:133	0,064	0,120	0,056	2134,03	
1:100	0,082	0,184	0,102	2768,92	2451,47

Es zeigte sich, dass die Zuckerbestimmungen nach vorangehender Hydrolyse über Nacht mit 72 % Schwefelsäure besser reproduzierbar waren, als ohne vorhergehende Hydrolyse. Aus diesem Grund wurden auch die nach der Hydrolyse erhaltenen Werte zur folgenden Berechnung der prozentuellen Zusammensetzung aus Pentosen, Hexosen und Hexuronsäuren herangezogen.

4.4.2.6 Berechnung der im Gesamtpolysaccharid enthaltenen Hexosen, Pentosen und Hexuronsäuren

Zur Berechnung der prozentuellen Zusammensetzung der Polysaccharide aus Pentosen, Hexosen und Hexuronsäuren muss jeweils ein Korrekturfaktor einberechnet werden:

Dieser berechnet sich aus dem Verhältnis des Molekulargewichtes des Zucker-Anhydrids zum Standardzucker, im Falle der Pentosen also aus Xylose-Anhydrid zu Xylose $\Rightarrow f=0,88$

d.h. für Pentosen:	$2,8 \times f = 2,8 \times 0,88 = 2,4 \Rightarrow$	24%
Hexosen:	$6,1 \times f = 6,1 \times 0,90 = 5,5 \Rightarrow$	55%
Hexuronsäuren:	$2,5 \times f = 2,5 \times 0,91 = 2,3 \Rightarrow$	23%
Gesamt:		102%

4.5 Spaltung der alkalilöslichen Fraktion aus *Hyptis suaveolens* mit Hemicellulase

80mg der alkalilöslichen Fraktion wurden in 5ml deionisiertem Wasser bei 70°C gelöst und mit wenig Na-Azid (eine kleine Spatelspitze voll) versetzt, um mikrobielles Wachstum während der Inkubation zu verhindern. Nach dem Abkühlen wurden 10mg Hemicel-

lulase (Sigma) zugegeben und der Probenansatz fünf Tage lang bei Raumtemperatur inkubiert. Am fünften Tag wurden erneut 10mg Hemicellulase zugegeben und der Ansatz weitere zwei Tage inkubiert. Am siebten Tag wurde die enzymatische Hydrolyse durch Erhitzen gestoppt und 5 Minuten lang bei 13.500rpm zentrifugiert. 0,3ml der überstehenden Lösung wurden in die analytische SEC (Säulensystem: VorsHW40 (12cm) + 2mal HW40+Superose 6 (30cm)) eingespritzt.

Schwarz: alkalilösliche Fraktion

Rot: alkalilösliche Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase

DRI

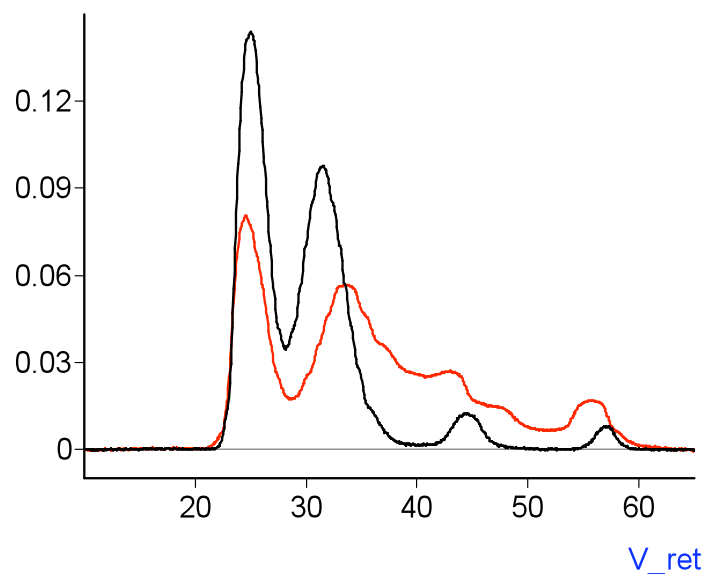


Abbildung 22: SEC der enzymatischen Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Hemicellulase

Die schwarze Kurve der SEC zeigt die alkalilösliche Fraktion vor der enzymatischen Hydrolyse mit Hemicellulase, während die rote Kurve das Gesamt-Polysaccharid nach enzymatischer Spaltung wiedergibt. Es zeigte sich, dass sich das neutrale Polysaccharid wesentlich besser mit Hemicellulase spalten ließ, als das saure. Im niedriger-molekularen Bereich zeigt sich die Bildung von Oligosacchariden, die größtenteils aus dem neutralen Polysaccharid abgespalten worden sein dürften.

Bahn 1: alkalilösliche Fraktion +
Hemicellulase 1 μ l

Bahn 2: alkalilösliche Fraktion +
Hemicellulase 2 μ l

Bahn 3: alkalilösliche Fraktion +
Hemicellulase 3 μ l



Abbildung 23: DC der durch enzymatischen Abbau der alkalilöslichen Fraktion mit Hemicellulase entstandenen Oligosaccharide

Auf der Dünnschichtchromatographie (als Laufmittel wurde eine Mischung aus $H_2O:EtOH:Pr:nB=2:3:3:2$ verwendet) lassen sich deutlich die Banden der verschiedenen entstandenen Oligosaccharide erkennen. Im oberen Teil sichtbar befinden sich bereits die ebenfalls entstandenen Di- und Monosaccharide.

Das mit Hemicellulase gespaltene Gesamt-Polysaccharid wurde mittels präparativer SEC (Säulensystem: Fractogel HW40 (50cm) + P2-Gel (100cm)) in einzelne Fraktionen zu je 6ml (=10 min.) aufgeteilt, die durch einen Fraktionskollektor gesammelt wurden. Aus diesen Fraktionen wurden 6 Pools gebildet:

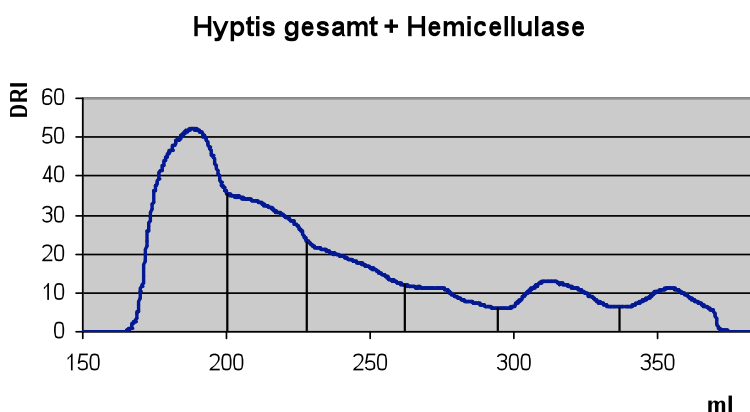


Abbildung 24: Poolbildung nach Spaltung der alkalilöslichen Fraktion m. Hemicellulase und SEC

Pool 1: Fraktionen 24–28

Pool 2: Fraktionen 29–32

Pool 3: Fraktionen 33–38

Pool 4: Fraktionen 39–43

Pool 5: Fraktionen 44–48

Pool 6: Fraktionen 49–54

Die Pools wurden lyophilisiert und eine Dünnschichtchromatographie derjenigen Pools, in denen die Oligosaccharide vermutet wurden, also den Pools 4–6, erstellt. (Da die noch vorhandenen höhermolekularen Polysaccharide die SEC rascher durchlaufen, wurde davon ausgegangen, dass diese in den ersten 3 Pools zu finden sein würden). Die Proben dieser Pools ($[c]=1\text{mg/ml}$) wurden in Monosaccharidlaufmittel (Acetonitril:Wasser=17+3), als auch in Oligosaccharid-Laufmittel (Laufmittel= $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{Pr}:\text{nB}=2:3:3:2$) laufen gelassen. Die Detektion erfolgte mit Thymol-Reagens.

Bahn 1: Pool 4

Bahn 2: Standard 1 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose (je $0,25\text{mg/ml}$), Glucuronsäure (1mg/ml), Galacturonsäure ($0,25\text{mg/ml}$)

Bahn 3: Pool 5

Bahn 4: Standard 2 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose (je $0,25\text{mg/ml}$)

Bahn 5: Pool 6

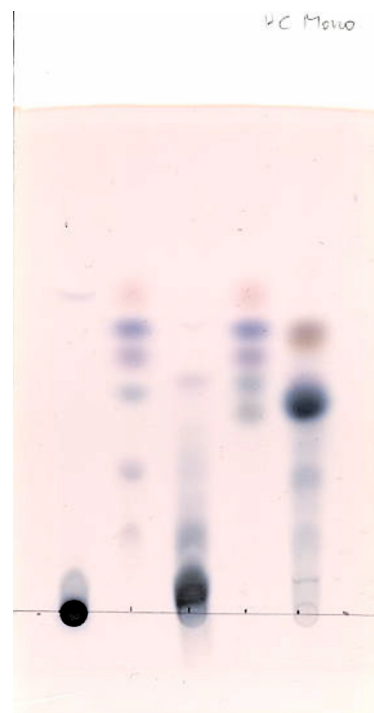


Abbildung 25: DC der Pools 4–6 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase in Monosaccharid-Laufmittel

In den Pools 4 und 5 waren noch keine enzymatisch abgespaltenen Monosaccharide detektierbar, erst in Pool 6 waren diese deutlich erkennbar zu finden. Hier fielen vor allem ein hoher abgebauter Anteil an Xylose und Glucose, aber auch ein geringerer Anteil an Glucuronsäuren auf.

Bahn 1: Pool 4

Bahn 2: Pool 5

Bahn 3: Pool 6

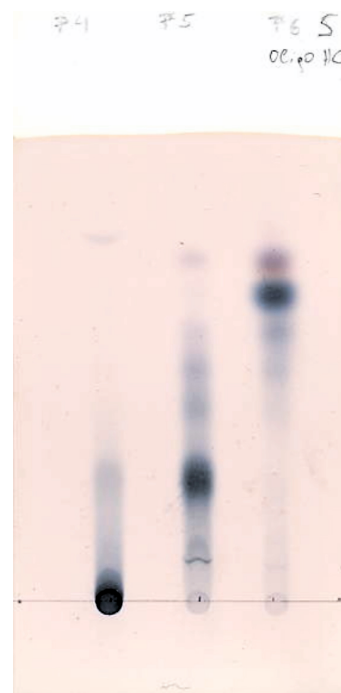


Abbildung 26: DC der Pools 4–6 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase in Oligosaccharid-Laufmittel

Hier wird deutlich, dass sich in Pool 4 noch größtenteils höhermolekulare Saccharide befanden, die durch das gewählte Laufmittel nicht nach oben wandern konnten. In Pool 5 hingegen befand sich der Hauptteil der Oligosaccharide, während im Pool 6 fast ausschließlich Monosaccharide zu finden waren, die am weitesten wandern konnten.

Im Anschluss daran wurden die Pools 1–6 mit 2M Trifluoressigsäure bei 90°C für 2 Stunden hydrolysiert, um die Monosaccharid-Zusammensetzung aller gebildeten Pools zu ermitteln und wieder eine DC erstellt. (Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Acetonitril:Wasser=17+3 verwendet, die Konzentration der Proben betrug 1mg/ml). Jeweils 1mg der Proben wurde in mit 0,1ml 2M TFA versetzt und bei 90–100°C für zwei Stunden auf der Heizplatte hydrolysiert. Die TFA wurde unter Stickstoff-Begasung abgedampft. Die Proben wurden danach dreimal mit je 1ml Methanol nachgewaschen, das jeweils wieder unter N₂-Begasung abgedampft wurde. Anschließend wurden die Proben in 1ml Methanol gelöst und die Zuckerzusammensetzung mittels DC im Monosaccharid-Laufmittel überprüft.

Bahn 1: saures PS

Bahn 2: neutrales PS

Bahn 3: alkalilösliche Fraktion

Bahn 4: Pool 1

Bahn 5: Pool 2

Bahn 6: Standard 1 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose (je 0,25mg/ml), Glucuronsäure (1mg/ml), Galacturonsäure (0,25mg/ml)

Bahn 7: Pool 3

Bahn 8: Pool 4

Bahn 9: Standard 2 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose (je 0,25mg/ml)

Bahn 10: Pool 5

Bahn 11: Pool 6

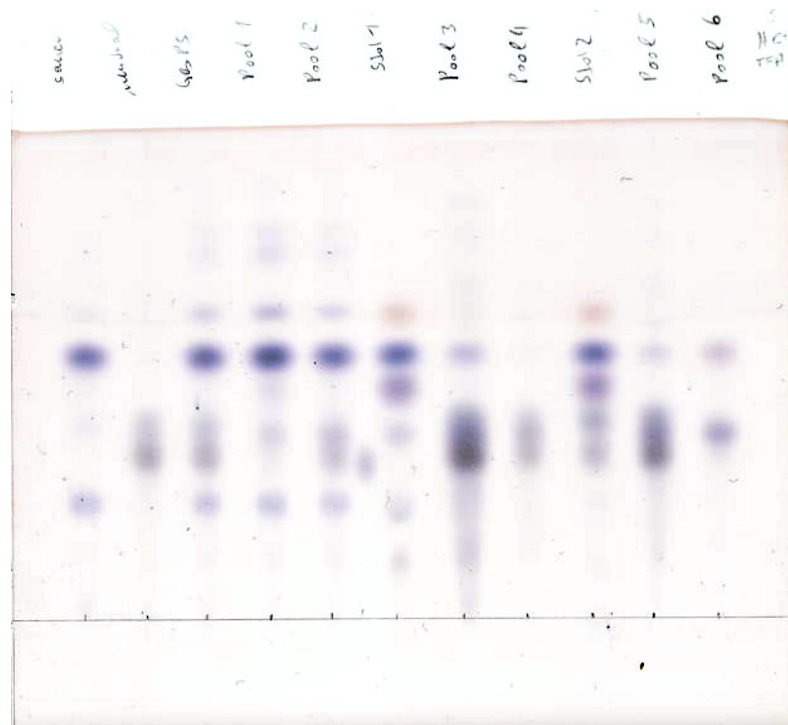


Abbildung 27: Hydrolyse der Pools mit 2M TFA nach Spaltung mit Hemicellulase

Die in den Polysacchariden gefundenen Monozucker waren: im sauren Polysaccharid Xylose, Glucose, Glucuronsäure, im neutralen Polysaccharid Mannose, Galaktose und Glucose.

Es zeigt sich, dass in den Pools 1 und 2 die Zuckerzusammensetzung sowohl derjenigen des sauren, als auch des neutralen Polysaccharides entsprach. Somit konnten beide Polysaccharide im Zeitraum der enzymatischen Spaltung nicht vollständig durch die Hemicellulase abgebaut werden. Im Pool 3 befanden sich vor allem die hydrolysierten Monosaccharide des neutralen Polysaccharides, da dieses von vornherein ein niedrigeres Molekulargewicht hatte. Im Pool 5, in dem, wie in Abb. 26 zu sehen ist, die Oligosaccharide zu finden waren, zeigten sich neben Xylose fast ausschließlich die Zucker des neutralen Polysaccharides (Mannose, Galaktose und Glucose), was darauf schließen lässt, dass dieses durch Hemicellulase wesentlich rascher und besser abgebaut wird, als das saure.

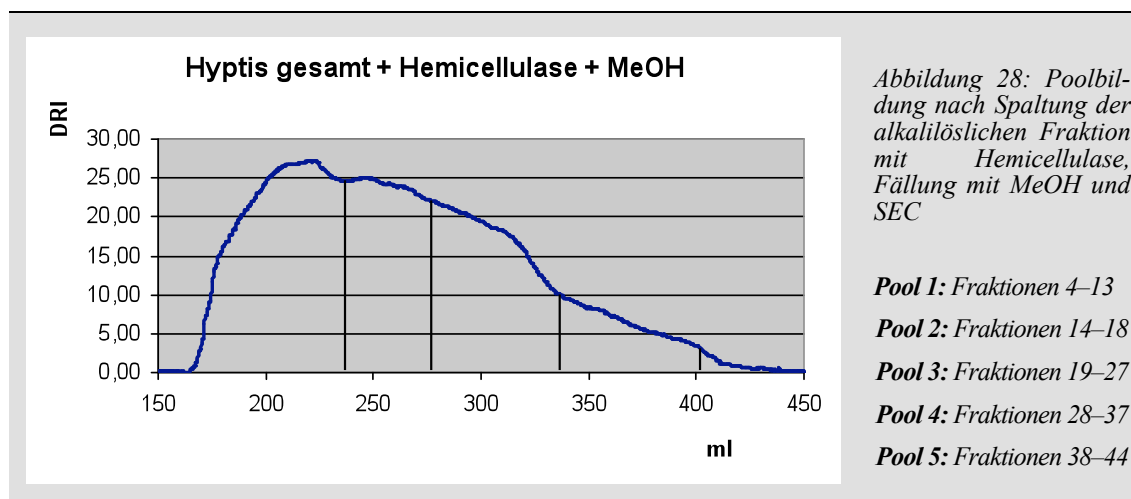
In Pool 6 befanden sich die bereits vollständig hydrolysierten Monosaccharide: v.a. Xylose, Glucose und Mannose. Es scheint, dass das Enzym Hemicellulase bezüglich des sauren Polysaccharides nur in der Lage ist, Xylose-Moleküle abzuspalten, wohingegen im neutralen Polysaccharid alle enthaltenen Zuckerbindungen gespalten werden können.

4.6 Enzymkatalysierte Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Hemicellulase und anschließende Fällung der hochpolymeren Saccharide mit MeOH

500mg der alkalilöslichen Fraktion wurden in 30ml deionisiertem Wasser bei 70°C gelöst und mit wenig Na-Azid versetzt. 50mg Hemicellulase (Sigma) wurden zugegeben, fünf Tage bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals 50mg HC zugegeben. Am siebten Tag wurde die enzymatische Spaltung durch Erhitzen gestoppt.

Bei diesem Versuch wurde als eine erste Vorreinigung der nach der enzymatischen Behandlung übriggebliebene hochpolymere Polysaccharid-Rest mit MeOH ausgefällt (die Lösung wurde in die doppelte Menge (60ml) MeOH eingegossen), die Probe zentrifugiert, der Überstand eingengt, lyophilisiert und in 3ml deionisiertes Wasser aufgenommen.

Die Auftrennung der Probe erfolgte wiederum mit präparativer SEC (FractogelHW40 (50cm), P2-Gel (100cm)), wobei erneut jede Fraktion 6ml umfasste. Da die ungefähre Durchflusszeit der Polysaccharide nun schon bekannt war, wurde der Fraktionskollektor auf eine Vorlaufzeit von 180 min. eingestellt. Aus den entstandenen Fraktionen wurden 5 Pools gebildet:



Die einzelnen Pools wurden lyophilisiert und eine Dünnschichtchromatographie der Pools 3 und 4 ($[c]=1\text{mg/ml}$) in Monosaccharidlaufmittel (Acetonitril:Wasser=17+3), als auch eine Dünnschichtchromatographie der Pools 2–5 in Oligosaccharid-Laufmittel (Laufmittel= $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{Pr}:\text{nB}=2:3:3:2$) laufen gelassen.

Bahn 1: Pool 3

Bahn 2: Standard 1 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose (je 0,25mg/ml), Glucuronsäure (1mg/ml), Galacturonsäure (0,25mg/ml)

Bahn 3: Pool 4

Bahn 4: Standard 2 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose (je 0,25mg/ml)



Abbildung 29: DC der Pools 3 und 4 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase und Fällung mit MeOH in Monosaccharid-Laufmittel

Hier zeigt sich wieder, dass die abgespaltenen Monosaccharide (Mannose, Galaktose und Glucose) vor allem aus dem neutralen Polysaccharid stammen. Sehr schwach ist auch Xylose sichtbar. Von den Pools 2–5 wurde ebenfalls eine DC zur Detektion der Oligosaccharide laufen gelassen:

Bahn 1: Pool 2

Bahn 2: Pool 3

Bahn 3: Pool 4

Bahn 4: Pool 5



Abbildung 30: DC der Pools 2–5 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase und Fällung mit MeOH in Oligosaccharid-Laufmittel

In den Pools 2–4 befanden sich ausschließlich höhermolekulare Saccharide, die durch die Fällung mit Methanol nicht vollständig abgetrennt werden konnten, sowohl Oligo-, als auch Monosaccharide wurden hingegen in Pool 5 detektiert.

Hydrolyse mit 2M Trifluoressigsäure

Je 1mg jedes Pools wurde mit 0,1ml 2M TFA versetzt und bei 90–100°C für 2 Stunden auf der Heizplatte hydrolysiert. Die TFA wurde unter Stickstoff-Begasung abgedampft. Die Proben wurden danach dreimal mit je 1ml Methanol nachgewaschen, das jeweils wieder unter N₂-Begasung abgedampft wurde. Anschließend wurde die Zuckerzusammensetzung mittels DC im Monosaccharid-Laufmittel überprüft.

Bahn 1: saures Polysaccharid

Bahn 2: neutrales Polysaccharid

Bahn 3: Pool 1

Bahn 4: Standard 1 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose (je 0,25mg/ml), Glucuronsäure (1mg/ml), Galacturonsäure (0,25mg/ml)

Bahn 5: Pool 2

Bahn 6: Pool 3

Bahn 7: Standard 2 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose (je 0,25mg/ml)

Bahn 8: Pool 4

Bahn 9: Pool 5

Bahn 10: Fucose-Standard

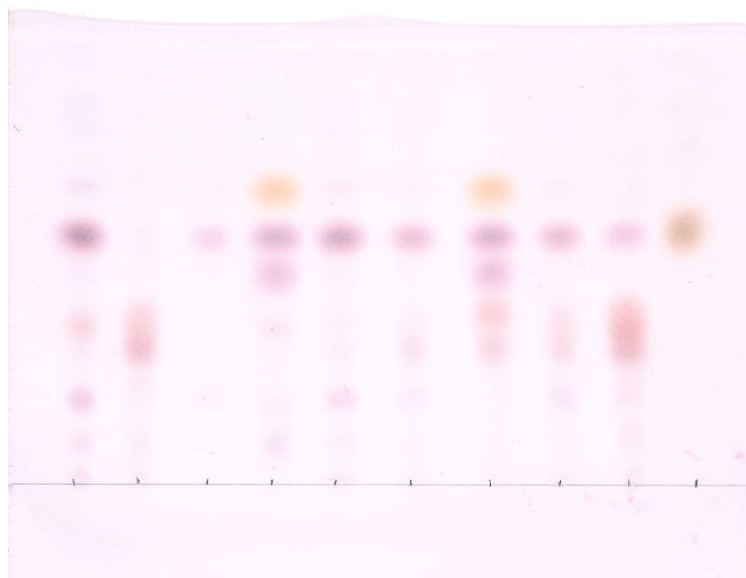


Abbildung 31: DC der Pools nach Hydrolyse mit 2M TFA nach Spaltung mit Hemicellulase und Fällung mit MeOH

Pool 1 und 2 wiesen vor allem die Monosaccharide des höhermolekularen sauren Polysaccharides auf, die Zucker des niedriger-molekularen neutralen Polysaccharides befanden sich hauptsächlich in den Pools 3 und 4. Pool 5, der die enzymatisch entstandenen Oligosaccharide enthielt, wies eine deutlich höhere Konzentration an Zuckern aus dem neutralen Polysaccharid auf, was belegt, dass dieses durch Hemicellulase besser gespalten wird, als das saure.

Ein ebenfalls aufgetragener Fucose-Standard konnte nach Hydrolyse mit 2M TFA mittels Dünnschichtchromatographie in keinem der Proben-Pools nachgewiesen werden (wurde ev. durch die Hydrolyse zerstört). *Aber:* Fucose und Xylose wandern in der DC

gleich weit, d.h. es kommt zu einer Überlagerung der Substanzflecken. Ein getrennter Nachweis von Xylose neben Fucose konnte somit innerhalb dieses Nachweisverfahrens nicht erbracht werden, dieser müsste mittels Dionex erfolgen.⁶⁴

4.7 Spaltung des sauren Polysaccharides mit Hemicellulase

40mg des sauren Polysaccharides wurden in 2ml deionisiertem Wasser mit wenig Azid bei ca. 70°C gelöst und nach dem Abkühlen mit 5mg Hemicellulase versetzt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für vier Tage stengelassen. Am fünften Tag erfolgte eine neuerliche Zugabe von 5mg Hemicellulase. Der Ansatz wurde anschließend weiter bei Raumtemperatur stehen gelassen, am sechsten Tag wurde durch Erhitzen am Bunsenbrenner die enzymatische Spaltung gestoppt.

Die Probe wurde 5 min. lang bei 13.500rpm zentrifugiert und 0,3ml der überstehenden Lösung in die SEC (Säulensystem: VorsHW40 (12cm) + 2mal HW40 + Superose 6 (30cm)) eingespritzt.

Schwarz: saures Polysaccharid

Rot: saures Polysaccharid nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase

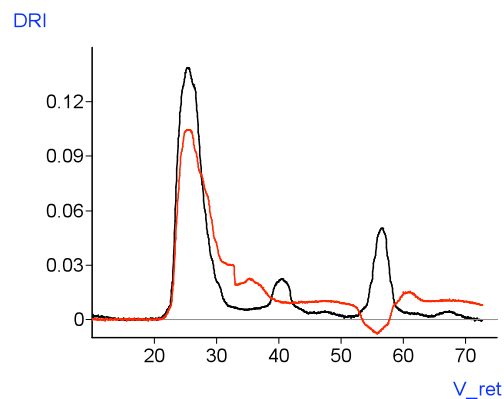
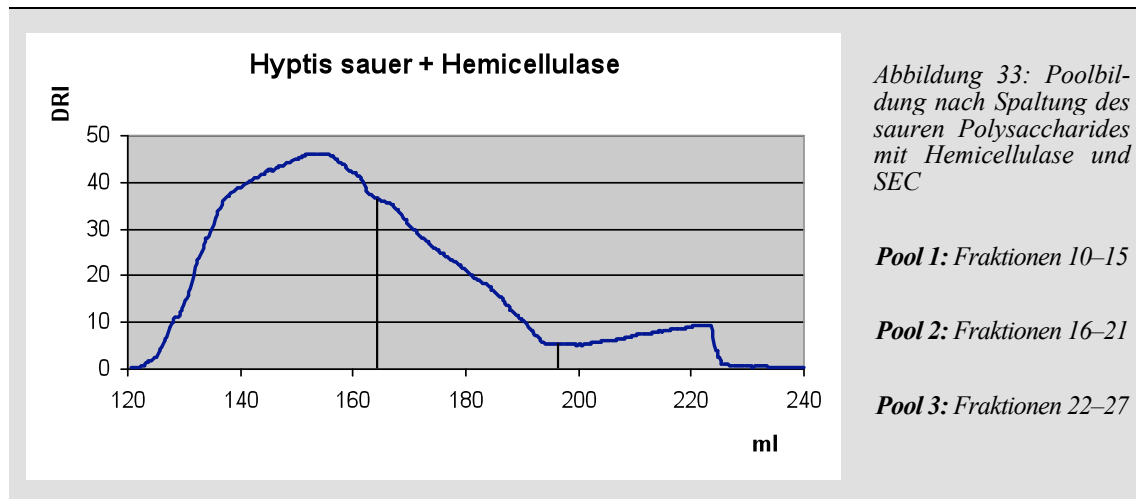


Abbildung 32: SEC der enzymatischen Spaltung des sauren Polysaccharides mit Hemicellulase

Es zeigt sich, dass trotz sechstägiger Behandlung mit Hemicellulase das saure Polysaccharid nur zu geringen Teilen abgebaut wurde.

Das enzymatisch gespaltene saure Polysaccharid wurde mittels präparativer SEC (Fractogel HW40 (50cm), P2-Gel (100cm)) aufgetrennt und mittels Fraktionskollektor nach 100 min. Vorlaufzeit gesammelt. Aus den Fraktionen zu je 6ml wurden 3 Pools gebildet.

⁶⁴ zum Nachweis der in dem sauren Polysaccharid enthaltenen Fucose siehe: Riha, J.: Saures Polysaccharid aus *Hyptis suaveolens*: Präbiotikum und protektives Hydrogel, Diplomarbeit, 2007, Universität Wien



Die Pools wurden lyophilisiert und eine DC der Pools ($[c]=1\text{mg/ml}$) in Oligosaccharid-Laufmittel ($\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{Pr:nB}=2:3:3:2$), als auch nach Hydrolyse mit 2M TFA in Monosaccharid-Laufmittel (Acetonitril:Wasser=17+3) angefertigt.

Bahn 1: saures Polysaccharid

Bahn 2: Pool 1

Bahn 3: Standard 1 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose (je $0,25\text{mg/ml}$), Glucuronsäure (1mg/ml), Galacturonsäure ($0,25\text{mg/ml}$)

Bahn 4: Pool 2

Bahn 5: Pool 3

Bahn 6: Standard 2 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose (je $0,25\text{mg/ml}$)

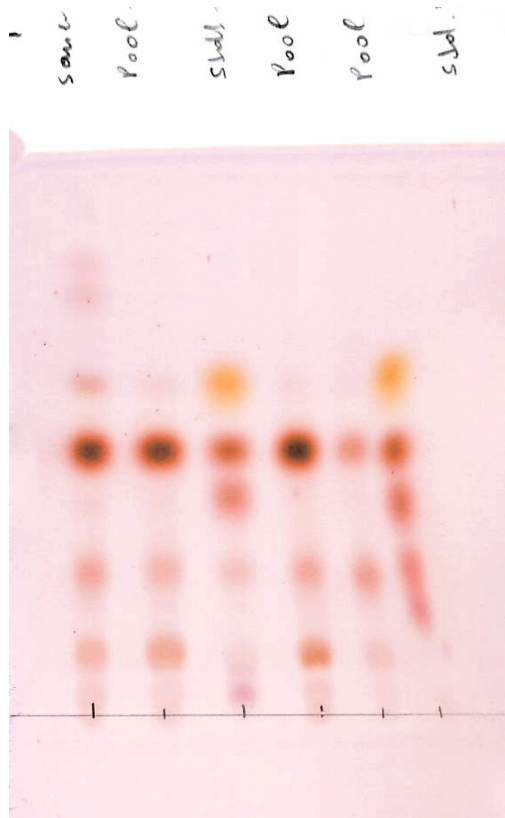


Abbildung 34: DC der Pools 1–3 des sauren Polysaccharides nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase und Hydrolyse mit 2M TFA in Monosaccharid-Laufmittel

Bei den Monosacchariden zeigte sich eine gleich bleibende Verteilung der Zucker des sauren Polysaccharides in allen Pools.

Bahn 1: Pool 1

Bahn 2: Pool 2

Bahn 3: Pool 3



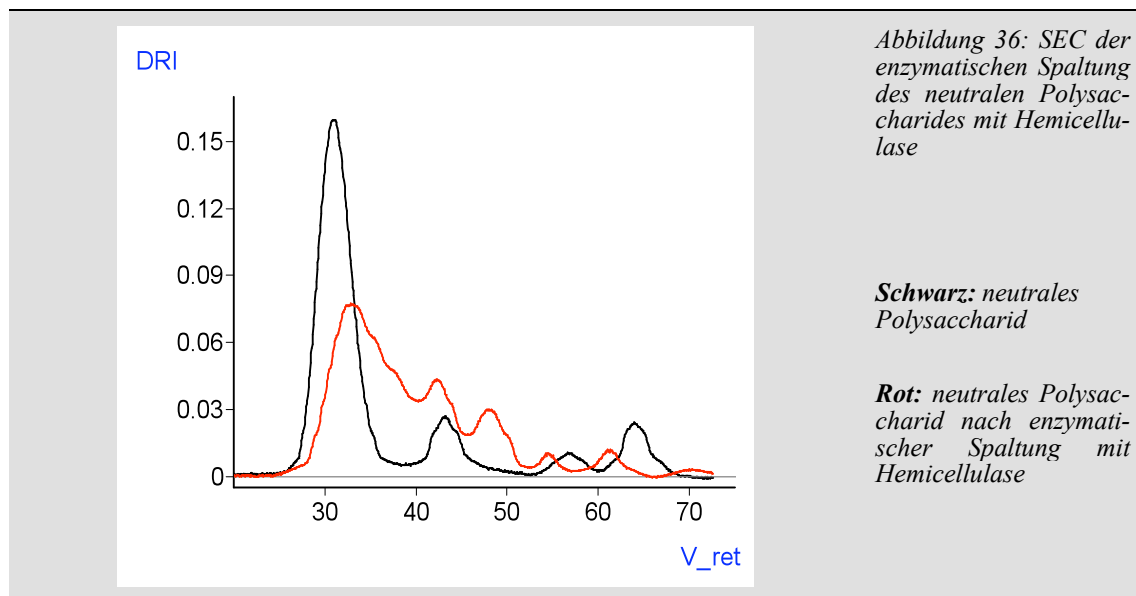
Abbildung 35: DC der Pools 1–3 des sauren Polysaccharides nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase in Oligosaccharid-Laufmittel

Bei dieser Dünnschichtchromatographie zeigt sich besonders deutlich, dass das saure Polysaccharid mit Hemicellulase enzymatisch kaum zu spalten ist. In allen Pools sind höhermolekulare Zucker zu finden, die in diesem Laufmittel nicht nach oben wandern konnten.

4.8 Enzymkatalysierte Spaltung des neutralen Polysaccharides mit Hemicellulase

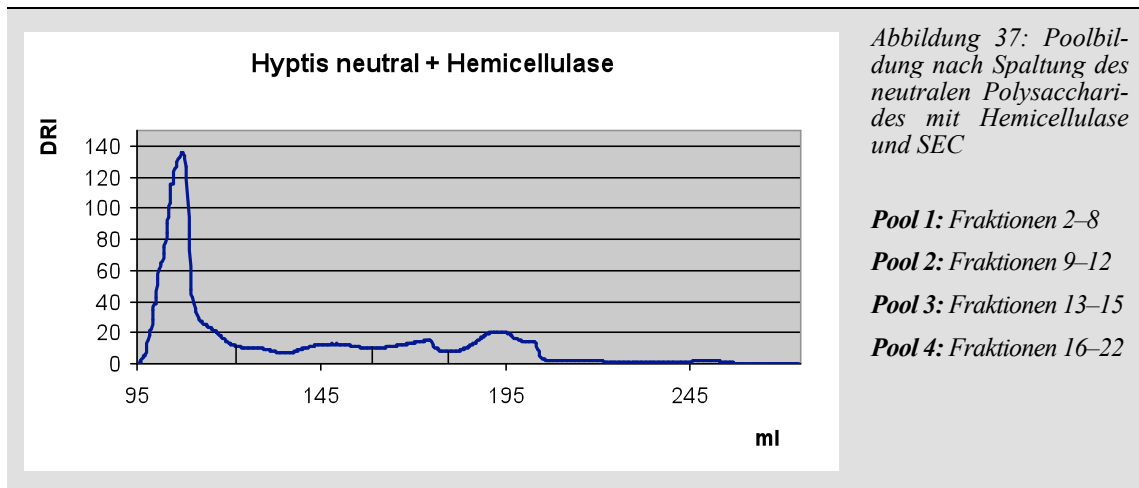
40mg des neutralen Polysaccharides wurden in 2ml Wasser deionat mit wenig Azid bei ca. 70°C gelöst und nach dem Abkühlen mit 5mg Hemicellulase versetzt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für vier Tage stehengelassen. Am fünften Tag wurden neuerlich 5mg Hemicellulase zugegeben und der Ansatz weiter bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am sechsten Tag wurde durch Erhitzen am Bunsenbrenner gestoppt.

Die Probe wurde 5 min. lang bei 13.500rpm zentrifugiert und 0,3ml der überstehenden Lösung in die SEC (Säulensystem: VorsHW40 (12cm) + 2mal HW40 + Superose 6 (30cm)) eingespritzt.



Bei der SEC wird sichtbar, dass das neutrale Polysaccharid sich mit Hemicellulase gut abbauen lässt. Es zeigte sich eine Verschiebung der Kurve in den niedermolekularen Bereich, wobei sich wie in der roten Kurve sichtbar relevante Mengen an drei unterschiedlich großen Spaltprodukten bildeten.

Die Auftrennung des Hydrolysats aus dem neutralen Polysaccharid erfolgte mit präparativer SEC (Fractogel HW40 (50cm), P2-Gel (100cm)). Nach einer Vorlaufzeit von 160 min. bei einer Fraktionsgröße von 6ml wurden die einzelnen Fraktionen im Kollektor gesammelt und vier Pools gebildet.



Die Pools wurden lyophilisiert und eine DC der Pools ($[c]=1\text{mg/ml}$) in Oligosaccharid-Laufmittel ($\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{Pr}:\text{nB}=2:3:3:2$), als auch nach Hydrolyse mit 2M TFA in Monosaccharid-Laufmittel (Acetonitril:Wasser=17+3) angefertigt.

Bahn 1: neutrales Polysaccharid
Bahn 2: Pool 1
Bahn 3: Standard 1 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose (je $0,25\text{mg/ml}$), Glucuronsäure (1mg/ml), Galacturonsäure ($0,25\text{mg/ml}$)
Bahn 4: Pool 2
Bahn 5: Pool 3
Bahn 6: Standard 2 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose (je $0,25\text{mg/ml}$)
Bahn 7: Pool 4



Abbildung 38: DC der Pools 1–4 des neutralen Polysaccharides nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase und Hydrolyse mit 2M TFA in Monosaccharid-Laufmittel

Nach der Hydrolyse der Pools mit 2M TFA zeigte sich, dass alle im neutralen Polysaccharid enthaltenen Monosaccharide (Mannose, Galaktose und Glucose) auch in den entstandenen niedermolekularen Produkten enthalten waren.

Bahn 1: Pool 1

Bahn 2: Pool 2

Bahn 3: Pool 3

Bahn 4: Pool 4

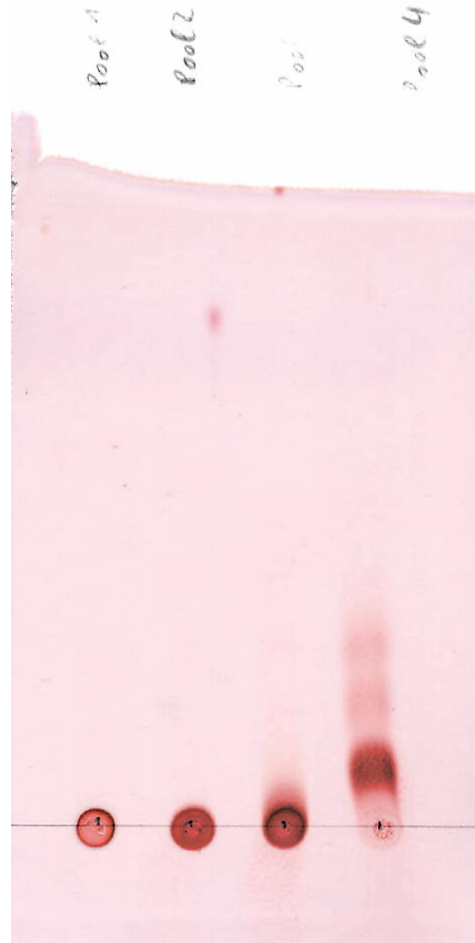
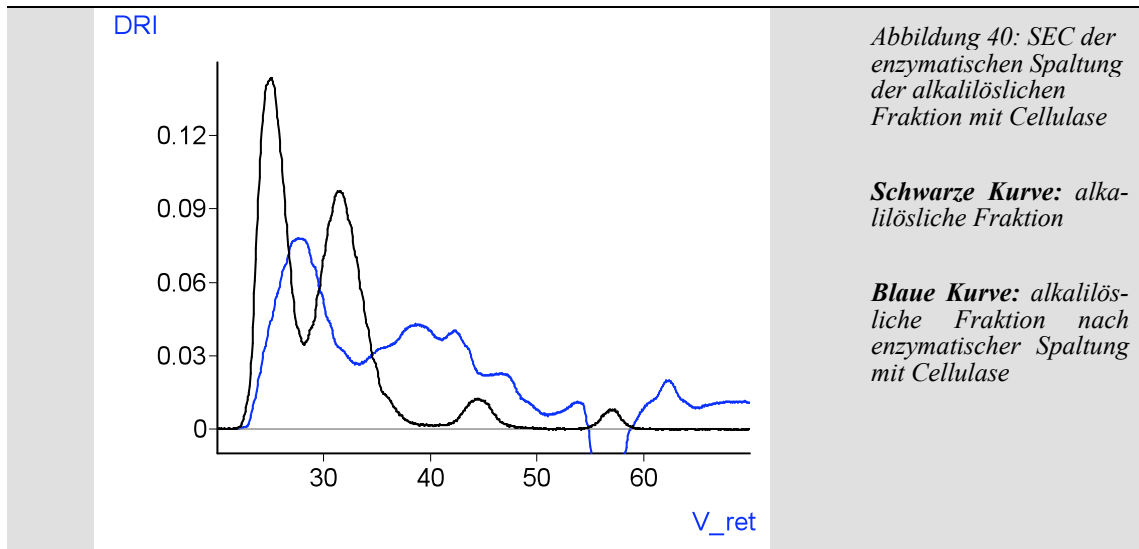


Abbildung 39: DC der Pools 1–3 des neutralen Polysaccharides nach enzymatischer Spaltung mit Hemicellulase in Oligosaccharid-Laufmittel

In den Pools 1–3 befanden sich noch hochmolekulare Teile des neutralen Polysaccharides. Im Gegensatz zum sauren Polysaccharid zeigte sich aber bei der enzymatischen Spaltung des neutralen in Pool 4 sehr deutlich eine Bildung von drei verschiedenen Oligosacchariden, wobei wie in der DC an unterster Stelle der Bahn 4 sichtbar, eines mengenmäßig besonders dominierte.

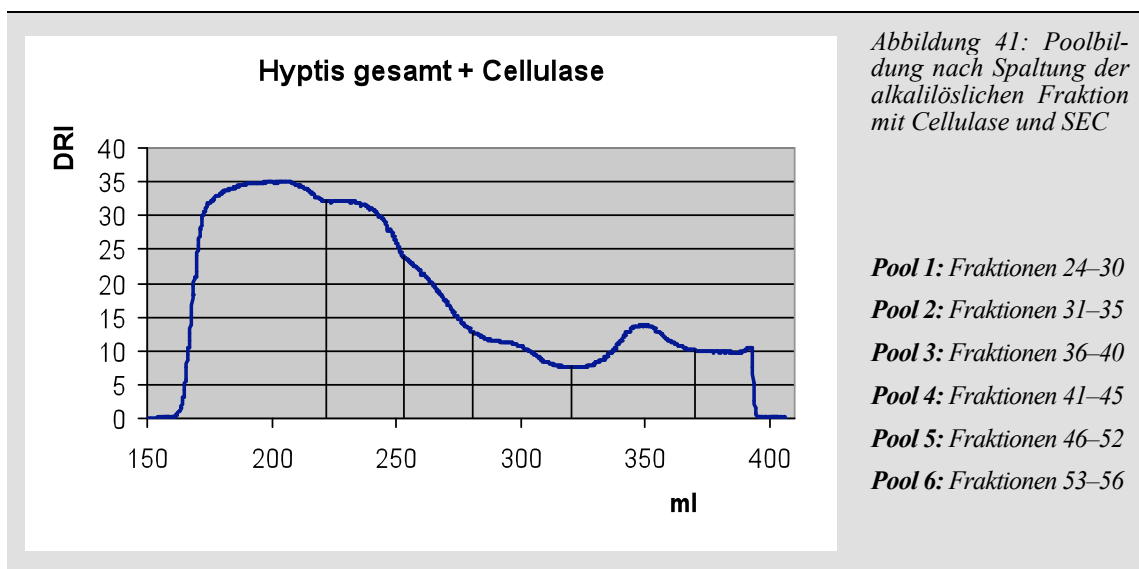
4.9 Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Cellulase

80mg der alkalilöslichen Fraktion wurden in 5ml deionisiertem Wasser mit wenig Azid bei ca. 70°C gelöst, nach dem Abkühlen mit 10mg ungereinigter Cellulase versetzt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach sechs Tagen wurde durch Erhitzen gestoppt.



Auch hier zeigte sich deutlich sichtbar ein enzymatischer Abbau, wiederum vor allem des neutralen Polysaccharides, während das saure Polysaccharid wesentlich weniger angegriffen wurde.

Bei der Auftrennung der alkalilöslichen Fraktion mit präparativer SEC (Fractogel HW40 (50cm), P2-Gel (100cm)) wurden sechs Pools gebildet.



Die Pools wurden lyophilisiert und eine DC der Pools ($[c]=1\text{mg/ml}$) in Oligosaccharid-Laufmittel ($\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{Pr}:\text{nB}=2:3:3:2$), als auch in Monosaccharid-Laufmittel (Acetonitril:Wasser = 17+3) angefertigt.

Bahn 1: Pool 4

Bahn 2: Standard 1 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose (je $0,25\text{mg/ml}$), Glucuronsäure (1mg/ml), Galacturonsäure ($0,25\text{mg/ml}$)

Bahn 3: Pool 5

Bahn 4: Standard 2 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose (je $0,25\text{mg/ml}$)

Bahn 5: Pool 6



Abbildung 42: DC der Pools 4–6 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Cellulase in Monosaccharid-Laufmittel

Während in Pool 4 die Zucker noch zu hochmolekular waren, um in diesem Laufmittel wandern zu können, zeigten sich in den Pools 5 und 6 Monosaccharide in großer Menge, wobei vor allem Xylose, Glucose, Mannose und Galactose zu finden waren. Trotz der aus dem sauren Polysaccharid abgespaltenen Xylose, dominierten diejenigen Zucker, die aus dem neutralen Polysaccharid stammten. Dies gibt wieder, was bereits in der vorangegangenen Abbildung der SEC sichtbar wurde: das neutrale Polysaccharid wird von Cellulase ebenfalls besser gespalten als das saure.

Bahn 1: Pool 4

Bahn 2: Pool 5

Bahn 3: Pool 6

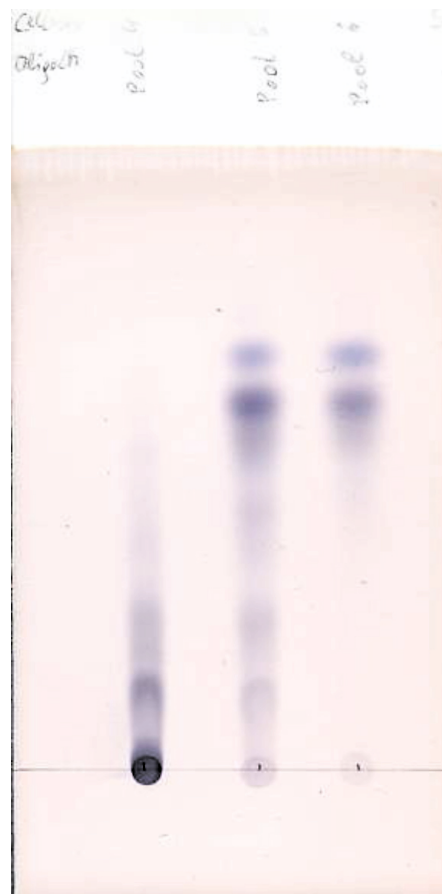


Abbildung 43: DC der Pools 4–6 der alkalilöslichen Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Cellulase in Oligosaccharid-Laufmittel

Im Oligosaccharid-Laufmittel zeigte sich nach der Spaltung mit Cellulase in den Pools 4 und 5 die Bildung von Oligosacchariden, wobei es in diesem Fall zwei Hauptprodukte zu geben schien. In Pool 6 waren nur mehr Monosaccharide zu finden.

Nach Hydrolyse mit TFA

Je 1mg jedes Pools wurde in mit 0,1ml 2M TFA versetzt und bei 90–100°C für 2 Stunden auf der Heizplatte hydrolysiert. Die TFA wurde unter Stickstoff-Begasung abgedampft. Die Proben wurden danach 3x mit je 1ml Methanol nachgewaschen, das jeweils wieder unter N₂-Begasung abgedampft wurde. Anschließend wurde die Zuckerzusammensetzung mittels DC im Monosaccharid-Laufmittel überprüft. Die Detektion erfolgte mit Thymol-Reagens.

Bahn 1: saures Polysaccharid
Bahn 2: neutrales Polysaccharid
Bahn 3: alkalilösliche Fraktion
Bahn 4: Pool 2
Bahn 5: Standard 1 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose (je 0,25mg/ml), Glucuronsäure (1mg/ml), Galacturonsäure (0,25mg/ml)
Bahn 6: Pool 3
Bahn 7: Pool 4
Bahn 8: Standard 2 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose (je 0,25mg/ml)
Bahn 9: Pool 5
Bahn 10: Pool 6



Abbildung 44: Hydrolyse der Pools mit 2M TFA nach Spaltung mit Cellulase

Bei der Spaltung mit Cellulase zeigte sich, dass wiederum vor allem das neutrale Polysaccharid von dem Enzym angegriffen wird, da die Zuckerverteilung in den Pools 4–6, welche die entstandenen Mono- und Oligosaccharide enthielten, vor allem der des neutralen Polysaccharides entsprachen (vgl. Bahn 2). In geringeren Mengen scheint jedoch auch vom sauren Polysaccharid Xylose abgespalten worden zu sein.

4.10 Spaltung der alkalilöslichen Fraktion mit Pektinase

10mg der alkalilöslichen Fraktion wurden in 1ml Eluenten (Wasser + Na-Azid) gelöst.

50µl Pektinase wurden durch Zentrifugieren mit dem Eluenten von dem in dem Enzym zur Stabilisierung enthaltenen Glycerin gereinigt und der Probe zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Brutschrank für ca. sieben Tage.

Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Erhitzen gestoppt, die Probe für 5 min. bei 13.500rpm zentrifugiert und 0,3ml des Überstandes in die SEC eingespritzt.

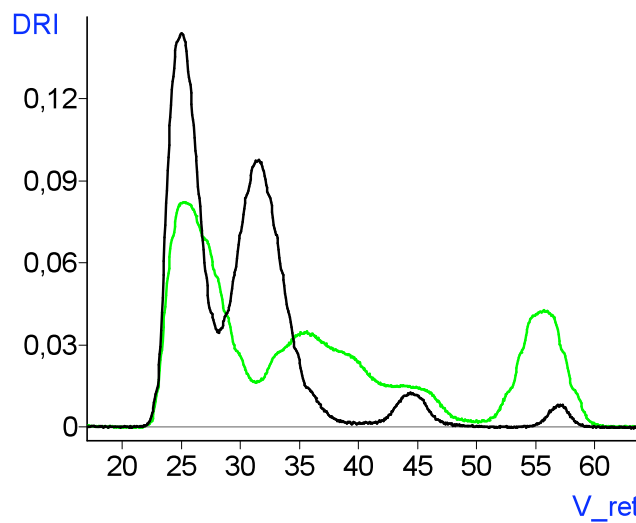


Abbildung 45: SEC der enzymatischen Spaltung der alkali-löslichen Fraktion mit Pektinase

Schwarze Kurve: alkali-lösliche Fraktion

Grüne Kurve: alkali-lösliche Fraktion nach enzymatischer Spaltung mit Pektinase

Auch die Pektinase schien das neutrale Polysaccharid besser enzymatisch spalten zu können, als das saure. Die SEC zeigt, dass das ursprünglich vorhandene neutrale Polysaccharid fast vollständig zu Spaltprodukten abgebaut worden ist, während vom sauren Polysaccharid noch größere Mengen vorhanden waren.

4.11 Vergleich der einzelnen enzymatischen Spaltungen

Zum besseren Vergleich der einzeln durchgeführten enzymatischen Spaltungen wurden die durch die SEC erhaltenen Kurven übereinander gelegt:

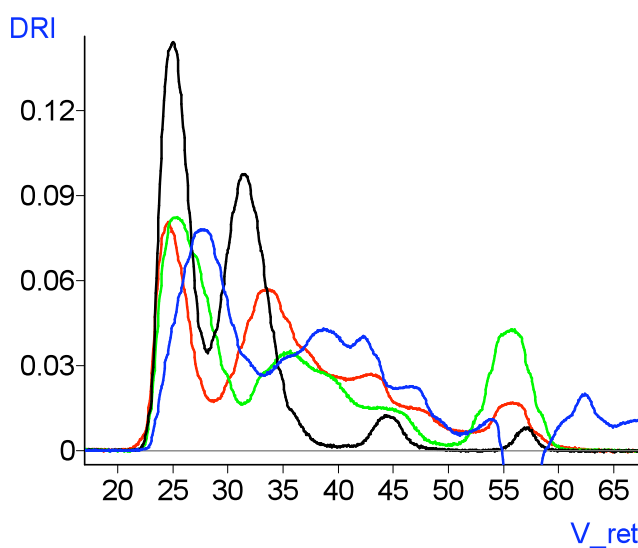


Abbildung 46: SEC-Vergleich der enzymatischen Spaltung mit verschiedenen Enzymen

Schwarz: alkali-lösliche Fraktion

Blau: alkali-lösliche Fraktion nach Spaltung mit Cellulase

Grün: alkali-lösliche Fraktion nach Spaltung mit Pectinase

Rot: alkali-lösliche Fraktion nach Spaltung mit Hemicellulase

Bei dem Vergleich der Spaltungen durch die einzelnen Enzyme zeigte sich, dass das neutrale Polysaccharid von allen Enzymen besser angreifbar war, als das saure. Das saure Polysaccharid wurde von dem Enzym Cellulase am effektivsten angegriffen, ebenso wie das neutrale. Auch Pektinase konnte das neutrale Polysaccharid sehr gut spalten, am schlechtesten gelang dies mit Hemicellulase.

Bahn 1: alkalilösliche Fraktion aus *Hyptis suaveolens* + Hemicellulase

Bahn 2: Standard 1 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Glucose (je 0,25mg/ml), Glucuronsäure (1mg/ml), Galacturonsäure (0,25mg/ml)

Bahn 3: alkalilösliche Fraktion aus *Hyptis suaveolens* + Cellulase

Bahn 4: Standard 2 Standard 2 (von oben nach unten): Rhamnose, Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose (je 0,25mg/ml)

Bahn 5: alkalilösliche Fraktion aus *Hyptis suaveolens* + Pektinase

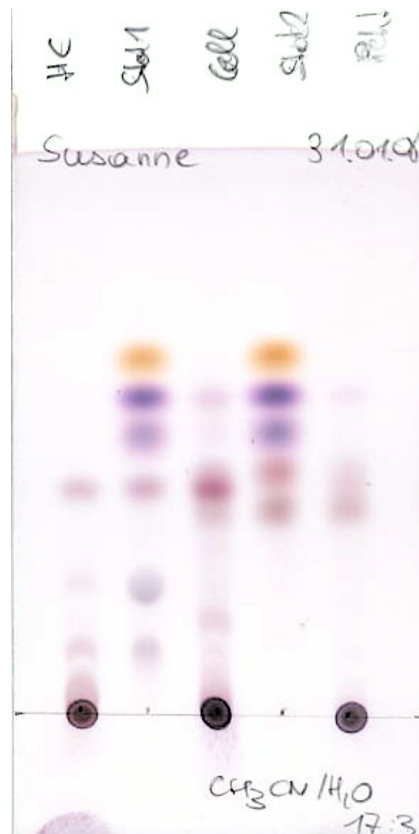


Abbildung 47: DC-Vergleich der enzymatischen Spaltung mit verschiedenen Enzymen in Monosaccharid-Laufmittel

Bei allen enzymatischen Spaltungen blieben hochmolekulare Reste bestehen, die in dem Monosaccharid-Laufmittel nicht nach oben wandern konnten. Die DC zeigt auch, dass vor allem die Zucker des neutralen Polysaccharides nach allen enzymatischen Spaltungen als Monosaccharide (Glucose, Mannose und Galactose) vorlagen. In geringeren Mengen wurde jedoch aus dem sauren Polysaccharid bei allen Versuchen auch Xylose abgespalten.

Bahn 1: alkalilösliche Fraktion
Hyptis + Hemicellulase

Bahn 2: alkalilösliche Fraktion
Hyptis + Pektinase

Bahn 3: alkalilösliche Fraktion
Hyptis + Cellulase

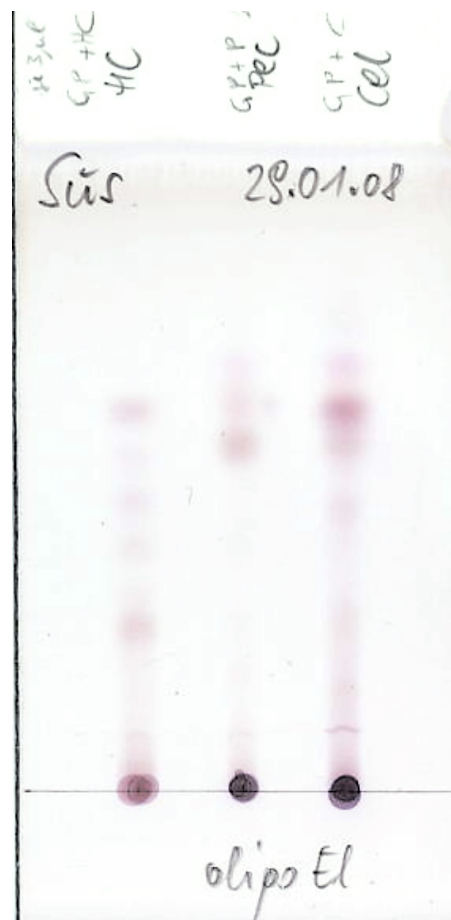


Abbildung 48: DC-Vergleich der enzymatischen Spaltung mit verschiedenen Enzymen in Oligosaccharid-Laufmittel

Bei dem Vergleich der enzymatisch entstandenen Oligosaccharide zeigt sich, dass diese vermehrt von dem Enzymen Hemicellulase und Cellulase produziert wurden. Die Spaltung durch Pektinase produzierte weniger Oligosaccharide, die Reaktion ging in diesem Fall größtenteils bis zu den Monosacchariden weiter.

Bei der Spaltung mit Hemicellulase zeigt sich ein sehr regelmäßiger Abstand zwischen den einzelnen Substanzflecken, was auf eine Reihe aus Mono-, Di-, Tri- und Tetrasacchariden hinweisen könnte. Die genaue Zuordnung bleibt jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten.

5 DISKUSSION

Aus den Polysacchariden der Mucilage, die aus den Samen von *Hyptis suaveolens* extrahiert wurde, sollten Oligosaccharide gewonnen werden, die als Präbiotika ihre Anwendung finden sollen. Zu diesem Zweck erfolgte zuerst eine Voruntersuchung dieser Polysaccharide mittels HPLC-SEC. Es zeigte sich, wie in Abb. 11 ersichtlich, dass das Gesamtpolysaccharid etwa im Verhältnis 60:40 aus dem sauren und dem neutralen Polysaccharid zusammengesetzt ist und dass das saure Polysaccharid ein höheres Molekulargewicht besitzt, als das neutrale Polysaccharid. Im Zuge weiterer Untersuchungen erfolgte auch die Hydrolyse aller Polysaccharide mit 2M Trifluoressigsäure, um herauszufinden, aus welchen Monosacchariden diese bestehen. Die in der alkalilöslichen Fraktion gefundenen Monosaccharide waren: Xylose, Glucose, Glucuronsäure, Galakturonsäure, Mannose, Galaktose (vgl. Abb. 44, 27), die sich folgendermaßen auf die beiden Polysaccharide aufteilen: im sauren Polysaccharid enthalten sind Xylose, Glucose, Glucuronsäure und Galakturonsäure (Abb. 27, 31, 34, 44), im neutralen Polysaccharid Mannose, Galaktose und Glucose (vgl. Abb. 27, 31, 38, 44). Der Fucose-Standard, der bei einer DC (siehe Abb. 31) zusätzlich aufgetragen wurde, konnte innerhalb der mit TFA hydrolysierten Polysaccharide nicht detektiert werden. Dies liegt möglicherweise daran, dass durch die Hydrolyse mit 2M TFA die Fucose zerstört wurde und somit mittels Dünnschichtchromatographie nicht mehr nachweisbar war. Ein Hinweis auf das Vorhandensein von Fucose zeigt sich dennoch in Abb. 25, Bahn 5. Da Fucose und Xylose den selben R_f-Wert besitzen und in der Dünnschichtchromatographie gleich weit wandern (und sich die Substanzflecken somit überlagern), muß der getrennte Nachweis von Fucose neben Xylose mittels Dionex erfolgen.

Ein erster Versuch zur Gewinnung von Oligosacchariden erfolgte mittels Hydrolyse des sauren Polysaccharides mit 1M Ameisensäure. Wie in den Abb. 12 und 13 zu sehen ist, bildeten sich bei der Hydrolyse aber weniger Oligosaccharide, sondern größtenteils sofort Monosaccharide, wobei vor allem Xylose abgespalten wurde.

Weiters wurde versucht, aus der alkalilöslichen Fraktion mit den Enzymen Hemicellulase, Cellulase und Pectinase unterschiedliche Produkte an Oligosacchariden abzuspalten.

Alle Enzyme waren in der Lage, das Gesamtpolysaccharid zu spalten, was mit Hilfe der HPLC-SEC belegt wurde (Abb. 22, 40, 45, 46). Hier zeigte sich ebenfalls, dass sich die Zuckerbindungen des sauren Polysaccharids (Abb. 32) zwar schon, aber wesentlich schlechter spalten ließen, als die des neutralen (Abb. 36). Durch das Übereinanderlegen der Kurven konnte ein direkter Vergleich zwischen den enzymatischen Spaltungen der einzelnen Enzyme erreicht werden (Abb. 46). Sowohl das saure, als auch das neutrale Polysaccharid wurden durch Cellulase am stärksten angegriffen, Pektinase konnte das neutrale Polysaccharid ebenfalls sehr gut spalten (wobei ein hoher Anteil an Monosacchariden entstand), am schlechtesten gelang dies mit dem Enzym Hemicellulase. Nach der enzymatischen Spaltung der Polysaccharide wurde versucht, die entstandenen Produkte mittels präparativer SEC aufzutrennen.

Außerdem wurden Dünnschichtchromatographien der entstandenen Oligosaccharide erstellt (Abb. 23, 26, 30, 43). Wie zu erwarten war, wurden durch die unterschiedlichen Enzyme unterschiedliche Oligosaccharide aus dem Polysaccharid herausgespalten (Abb. 48). Durch die Spaltung mit Pektinase konnte nur eine geringe Menge an Oligosacchariden erhalten werden – hier schien die Spaltung bis zu den Monosacchariden weiterzugehen. Oligosaccharide in größeren Mengen wurden sowohl von Cellulase, als auch Hemicellulase produziert, wobei gerade bei der Hemicellulase ein bestimmtes Oligosaccharid mengenmäßig zu dominieren schien (vgl. Abb. 23, 26, 30). Abb. 35 zeigt eine DC-Aufnahme der Spaltung des sauren Polysaccharides mit Hemicellulase. Wie bereits erwähnt, ließ sich das saure Polysaccharid sehr viel schlechter spalten als das neutrale, was durch diese DC bestätigt wurde. Die durch die Spaltung des neutralen Polysaccharides mit Hemicellulase entstandenen Oligosaccharide sind in Abb. 39 wiedergegeben. Es zeigt sich, dass das oben genannte, mengenmäßig dominierende Oligosaccharid aus dem neutralen Polysaccharid stammt. Dieses Oligosaccharid könnte als Ausgangspunkt für die weitere Forschung verwendet werden.

Um die abgespaltenen Monosaccharide zu ermitteln, wurden die durch die präparative SEC entstandenen Pools mittels DC auf ihre Monosaccharid-Zusammensetzung überprüft (Abb. 25, 29, 42). Es wurden Xylose, Glucose, Mannose, Galaktose und Glucuronsäure detektiert.

Anschließend wurden die Pools mit 2M Trifluoressigsäure hydrolysiert, um die Monosaccharid-Zusammensetzung der entstandenen Oligosaccharide zu ermitteln (Abb. 27, 31, 34, 38). Es zeigte sich, dass diejenigen Pools, die die Oligosaccharide enthielten, vor allem aus den Zuckern des neutralen Polysaccharides bestanden (Mannose, Galaktose und Glucose). Ein kleinerer Anteil an Xylose, die aus dem sauren Polysaccharid stammt, war allerdings auch enthalten. Dies bestärkt den Schluss, dass größtenteils das neutrale Polysaccharid enzymatisch in Oligosaccharide gespalten wird. Ein beinahe identes Bild der Zuckerzusammensetzung der Oligosaccharide zeigt sich nach der Spaltung mit Cellulase (Abb.44).

Zusätzlich wurde mittels UV-Absorptionsmessung die Verteilung von Pentosen, Hexosen und Hexuronsäuren in den Proben eruiert. Ohne vorangegangene Hydrolyse der Polysaccharide waren die erhaltenen Ergebnisse bei den Einzelnachweisen, aber auch in Summe zu hoch und nur schlecht reproduzierbar. Aus diesem Grund wurden die Polysaccharide vor den Bestimmungen in 72%iger H_2SO_4 gelöst und bei 0°C im Kühlraum für 24h unter Rühren belassen, um eine vollständige Hydrolyse in die Monosaccharide zu gewährleisten. Dies führte bei den anschließenden Zuckerbestimmungen zu besseren Ergebnissen. Das Verhältnis von Pentosen:Hexosen:Hexuronsäuren beträgt ca. 24:55:23.

Ausblick

Das mengenmäßig dominierende Oligosaccharid, das durch enzymatische Spaltung mit Hemicellulase aus dem neutralen Polysaccharid gewonnen wurde (s.o.), könnte als Ausgangspunkt für weitere Forschungen verwendet werden. Es scheint aus den Monosacchariden Mannose, Galaktose und Glucose zu bestehen. Zur genauen Strukturaufklärung dieses Oligosaccharids müsste es in größeren Mengen hergestellt und soweit mit Hilfe der SEC gereinigt werden, um damit Untersuchungen mittels NMR, MS, sowie eine Methylierungs-Analyse durchführen zu können.

6 LITERATUR

6.1 Zeitschriften, Monografien und Sammelbände

- Aspinall et al.: "A novel L-Fuco-4-O-methyl-D-glucurono-D-xylan from *Hyptis suaveolens*." *Carbohydrate Research*, 214 (1991), pp. 107–113,
- Azevedo, N., Campos I. F. P., Ferreira H. D., Portes T. A., Santos S. C., Seraphin J. C., Paula J. R. und P. H. Ferri: "Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*" *Phytochemistry* 57 (2001), pp. 733–736
- Bird, G. W. G.: „Anti-A Haemagglutinins from a Non-Leguminous Plant – *Hyptis suaveolens* Poit“ *Nature No. 4680, July 11, 1959*, pp. 109–120
- Bischoff, S. C., M. P. Manns: „Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. Stellenwert in Klinik und Praxis.“ *Deutsches Ärzteblatt, Jg. 102, Heft 11, 18. März 2005*, A752-9
- Brockhaus Enzyklopädie in 24 Bänden, *Fünfter Band COT-DR*, 19. Auflage, F.A. Brockhaus, Mannheim, 1988, S. 448
- Chukwujekwu, J. C., Smith P., Coombes P. H., Mulholland D. A. und J. van Staden: "Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*" *Journal of Ethnopharmacology Volume 102, Issue 2, 14 November 2005*, pp. 295–297
- Dalakaki, E.: *Hyptis suaveolens: Characterization of the polysaccharides and their prebiotic properties*, Diplomarbeit, 2007, Universität Wien
- Edeoga, H. O., Omosun G. und L. C. Uche: "Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigeria" *African Journal of Biotechnology Vol. 5 (10), 16 May 2006*, pp. 892–895,
- Ehlers, E.: *Analytik II. Kurzlehrbuch Quantitative und instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 10. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 2002, S. 440f
- Fuller R.: "Probiotics in man and animals." *J Appl Bacteriol* 1989; 66, pp. 365–78.
- Gibson G. R. und M. B. Roberfroid, (1995): "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." *J of Nutr* 125, pp. 1401–1412

- Gottwald, W., K. H. Heinrich: UV/VIS-Spektroskopie für Anwender, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto 1998.
- Gowda, D. C.: "Polysaccharide components of the seed-coat mucilage from *hyptis suaveolens*." *Phytochemistry, Volume 23, Issue 2, 1984*, pp. 337–338
- Grassi P., Reyes T. S. U., Sosa S., Tubaro A., Hofer O., K. Zitterl-Eglseer: "Anti-Inflammatory Activity of Two Diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador" *Z. Naturforsch. 61c, 165–170 (2006)*
- Johnson, Timothy: CRC Ethnobotany Desk Reference (13720, S. 424)
- Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002
- Jork, H., Funk W., Fischer W., H. Wimmer: Dünnschichtchromatographie: *Reagenzien und Nachweismethoden, Band 1b*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo. 1993, S. 423–435
- Malele, R. S.: "Essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Tanzania: Composition and antifungal activity". *Journal of Essential Oil Research: JEOR. Nov/Dec 2003*.
- Mitterdorfer, G., Kneifel W., H. Viernstein: "Utilization of prebiotic carbohydrates by yeasts of therapeutic relevance." *Letters in Applied Microbiology 2001, 33*, pp. 251–255
- Neuwinger, H. D.: *African Traditional Medicine. A Dictionary of Plant Use and Applications: Hyptis suaveolens Poit.*
- Niwatananun, K., Niwatananun W., Lertprasertsook N., S. Okonogi: "Repeated-Dose Dermal Toxicity of Topical Formulation of *Hyptis suaveolens* oil" *CMU. Journal (2006) Vol 5(3)*, pp. 369–380
- Pålsson, T. G., T. Jaenson: "Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa" *Acta Tropica 72 (1999)*, 3952
- Praznik, W.: *Strukturuntersuchungen an prebiotisch wirksamen Pflanzenmucilagen*, derzeit noch unveröffentlicht
- Praznik, W., Spies T., A. Hofinger: "Fructo-oligosaccharides from the stems of *Triticum aestivum*." *Carbohydrate Research, 235 (1992)*, pp. 231–238

- Praznik, W., T. Spies: "Fructo-oligosaccharides from *Urginea maritima*." *Carbohydrate Research*, 243 (1993), pp. 91–97
- Raizada, P.: "Ecological and vegetative characteristics of a potent invader, *Hyptis suaveolens* Poit. from India." (*Lyonia. A journal of ecology and application*, Vol.11 (2))
- Rastall, R. A., G. R. Gibson: "Functional Foods. Developments in colonic functional foods for improved digestive health." *Bioscience-explained 2004*, Vol 1, No 2
- Reid, J. S. G: "Analysis of Carbohydrates Conferring Hardness on Seeds, in: Modern Methods of Plant Analysis." *New Series, Volume 10: Plant Fibers*, herausgegeben von H.F. Linskens und J.F. Jackson, Springer Verlag 1989, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio.
- Riha, J.: *Saures Polysaccharid aus Hyptis suaveolens: Präbiotikum und protektives Hydrogel*, Diplomarbeit, 2007, Universität Wien
- Rojas, A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., R. Mata: "Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants" *Journal of Ethnopharmacology*, 35 (1992), pp. 275–283
- Rücker, G., Neugebauer M., G.G. Willems: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden*, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.
- Rupprecht, H.: „Physikalisch-chemische Grundlagen der Gefriertrocknung“ in: Dr. D. Essig, Dr. R. Oschmann (Hg.): *Lyophilisation*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1993
- Salminen, S., Bouley, M. C., Boutron-Rualt, M. C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M-C., Roberfroid, M. und I. Rowland, (1998): "Functional food science and gastrointestinal physiology and function". *Br. J. Nutr.* 80(suppl. 1), pp. 147–171.
- Santos, T. C., Marques M. S., Menezes I. A. C., Dias K. S., Silva A. B. L., Mello I. C. M., Carvalho A. C. S., Cavalcanti S. C. H., Antonioli A. R. und R. M. Marçal: "Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice" *Fitoterapia* 78 (2007), pp. 333–336
- Schrezenmeir, J., M. de Vrese: "Probiotics-prebiotics and synbiotics – approaching a definition" (*Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73 (suppl.): S. 361S–4S)

- Schwendt, G.: *Chromatographische Trennmethode. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen*, 3. erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag 1994.
- Scott, R. W.: "Colorimetric Determination of Hexuronic Acids in Plant Materials", *Analytical Chemistry*, Vol. 51, No. 7, June 1979
- Stadler, M., H. Viernstein: "Optimization of a formulation containing viable lactic acid bacteria", *Int J Pharm.* 2003 Apr 30;256(1–2), pp. 117–122.
- Unger, Frank M., H. Viernstein: *Florale Gesundheit*, Verlagshaus der Ärzte, 2004
- Ziegler H. L., Jensen T. H., Christensen J., Stærk D., Hägerstrand H., Sittie A. A., Olsen C. E., Staalsø T., Ekpe P., Jaroszewski: "Possible Artefacts in the in vitro Determination of Antimalarial Activity on Natural Products that Incorporate into Lipid Biolayer: Apparent Antiplasmodial Activity of Dehydroabietinol, a Constituent of *Hyptis suaveolens*" *Letter... Planta Med* 2002; 68, pp. 547–549
- Autor unbekannt: Prebiotic fibres. A natural source of cancer prevention, Nutraceutical Business and Technology – January/February 2007, p 42–46. (12.12.2008)
http://www.beghin-meiji.com/actilight/upload/Actilight_cancer_nbt0107.pdf

6.2 Internetquellen

<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?19643> (19.5.2008)

http://www.uni-muenster.de/imperia/md/content/pharmazeutische_biologie/_v/kohlenhydrate_allg_analytik_n_wittschier.pdf (14.12.2008)

<http://www.vt.tuwien.ac.at/scripts/159682/zentrifugieren.pdf> (14.12.2008)

<http://de.wikipedia.org/wiki/Zentrifuge> (14.12.2008)

<http://www.enzymeindia.com/enzymes/cellulase.asp> (14.7.2008)

http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis/Carbohydrate_AnalysisII.html#Hemicellulase (14.7.2008)

<http://www.enzymeindia.com/enzymes/hemicellulase.asp> (14.7.2008)

http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis/Carbohydrate_AnalysisIII.html#Pectin (14.7.2008)

<http://www.ruehlemanns.de/texte/texte2005/2005003.html> (8.6.2008)

http://www.beghin-meiji.com/actilight/upload/Actilight_cancer_nbt0107.pdf
(12.12.2008)

<http://www.enzymeindia.com/Enzymes-Pectinase.php>

6.3 Unpublizierte Quellen

Praznik, W.: Determination of Pentosans; unveröffentlichtes Laborprotokoll vom 12.01.2008

Biochemische Übungen – KH/GF, Aufgabe 2 /Quantifizierung v. Sacchariden. Laborprotokoll

CV Susanne Schorn

Persönliche Daten / Kontakt

Geburtsdatum: 19. November 1979
Geburtsort: Lienz, Osttirol
Eltern: Waltraud und Siegfried Schorn
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: ledig
Adresse: Mumbgasse 7/16, 1020 Wien
Tel. / e-mail: 0650/9417416 / schorn@lit-verlag.at



Ausbildung

1986–1990: Volksschule Dölsach
1990–1998: Bundesrealgymnasium Lienz
ab 1998: Studium der Pharmazie an der Universität Wien
SS 2008: Beendigung des Diplomstudiums der Pharmazie an der Universität Wien. Thema der Diplomarbeit: „Enzymkatalysierte Spaltung von Polysacchariden aus den Samen von *Hyptis suaveolens*“
ab SS 2008: Univ. Tutorin am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

Berufliche Erfahrung

2001–2002: Krankenhaus Lienz: Hol- und Bringdienst (Sommerpraktikum)
ab 2003: Projektassistentin im LIT Verlag Wien, Verlag für wissenschaftliche Literatur (Abwicklung von Subventionsansuchen, Autorenbetreuung)
Dasselbst: Betreuung des internen EDV-Netzwerkes
Dasselbst: kleine Faktura, allgemeine Bürotätigkeit

Qualifikationen / Sprachkenntnisse

Projektkalkulation, Buchhaltung, Kundenkontakte und Präsentationen
Englisch und Französisch (schriftlich und mündlich)
Führerschein: B

Softwarekenntnisse

Windows 2000; XP; Vista
MS Office 2004 / 2007 (MS Word, MS Excel, MS PowerPoint), Open Office



Wien, den 14. 4. 2008