



Titel der Diplomarbeit

verfasst von

Marielouise Stutzig

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreuerin/Betreuer: o.Univ-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Danksagung

Ich möchte hiermit die Gelegenheit nutzen, den Menschen zu danken, die mich während der Zeit meiner Diplomarbeit unterstützt haben.

Einerseits bedanke ich mich bei o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes und des interessanten Diplomarbeitsthemas.

Besonders großen Dank möchte ich meiner Betreuerin MMag. DI. Dr. Monika Müller aussprechen, die für mich während der gesamten Diplomarbeitszeit ein offenes Ohr und immer wertvollen Rat bei verschiedensten Problemen parat hatte. Vielen Dank vor allem auch für die Geduld und die angenehme, freundliche Arbeitsatmosphäre.

Weiters gilt mein Dank Univ.-Prof. DI. Dr. Werner Praznik und Dr. Renate Löppert für die Bereitstellung der Oligo- und Polysaccharidproben, die Unterstützung während der praktischen Arbeit und für die vielen guten Tipps und Erklärungen, die mir sehr weitergeholfen haben. Danke vor allem an Dr. Löppert für die geduldige Einweisung in die „Geheimnisse“ der Dünnschichtchromatographie.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, dass sie mir das Pharmaziestudium finanziell ermöglicht haben, mich ermutigt und bestärkt haben, nicht aufzugeben und ebenso möchte ich meinem Freund danken, der mich in jeder Hinsicht unterstützt und aufgebaut hat.

VIELEN DANK !

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	Seite 1
Inhaltsverzeichnis	Seite 2
Kurzfassung	Seite 5
Abstract	Seite 5
1. Einleitung	Seite 6
1.1. Functional Food	Seite 6
1.1.1. Probiotika	Seite 7
1.1.2. Präbiotika	Seite 7
1.1.3. Synbiotika	Seite 8
1.2. Probiotische Bakterien	Seite 8
1.2.1. <i>Lactobacillus reuteri</i>	Seite 8
1.2.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Seite 9
1.2.3. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Seite 9
1.2.4. <i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i>	Seite 10
1.2.5. <i>Bifidobacterium animalis</i>	Seite 10
2. Material und Methoden	Seite 11

2.1. Herstellung eines MRS-Mediums	Seite 11
2.1.1. Herstellung einer MRS-Bouillon ohne Glukose	Seite 11
2.1.2. Herstellung einer MRS-Bouillon mit Glukose	Seite 12
2.2. Herstellung einer PBS-Lösung	Seite 12
2.3. Herstellung eines MRS-Agar-Mediums mit Glukose	Seite 13
2.4. Herstellung einer Cystein HCl-Lösung	Seite 14
2.5. Herstellung einer PBS/Cystein HCl-Lösung	Seite 14
2.6. Herstellung der Zuckerlösungen	Seite 14
2.7. Verwendete Bakterienkulturen	Seite 16
2.7.1. Anzucht der Bakterienkulturen	Seite 17
2.8. Bioscreen C-Messung	Seite 17
2.9. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)	Seite 18
2.10. Dünnschichtchromatographie	Seite 18
3. Resultate	Seite 19
3.1. <i>Lactobacillus reuteri</i>	Seite 19
3.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Seite 22
3.3. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Seite 25

3.4. <i>Lactobacillus paracasei</i> 1	Seite 28
3.5. <i>Lactobacillus paracasei</i> 2	Seite 31
3.6. <i>Lactobacillus paracasei</i> 3	Seite 34
3.7. <i>Bifidobacterium animalis</i>	Seite 37
3.8. Koloniebildende Einheiten (KBE)	Seite 40
3.9. Dünnschichtchromatographie	Seite 42
4. Diskussion	Seite 44
5. Zusammenfassung	Seite 46
Literaturverzeichnis	Seite 47
Abbildungsverzeichnis	Seite 50
Tabellenverzeichnis	Seite 52
Lebenslauf	Seite 53

Kurzfassung

Es ist schon lange bekannt, dass Pro-, Prä- und Synbiotika einen positiven Einfluss auf die Gesundheit des Menschen haben. In dieser Diplomarbeit wurde die wachstumsfördernde Wirkung von verschiedenen Oligo- und Polysacchariden auf ausgewählte Bakterienstämme untersucht. Diese Saccharide wurden aus Agave, Topinambur, Knoblauch, Grünstilbe, Kakteen und Pilzen gewonnen. Die ausgewählten Arten waren *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* und *Bifidobacterium animalis*. Die Wachstumszunahme der Bakterien wurde mittels Trübungsmessung bestimmt. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte ein positiver Einfluss einiger Zucker festgestellt werden, der durch zusätzliche Bestimmung der koloniebildenden Einheiten auf Agarplatten bestätigt werden konnte.

Abstract

It has long been known, that pro-, pre- and synbiotics have a positive influence on the human health. In this thesis, the specific effect of different oligosaccharides and polysaccharides on selected bacterial strains was tested. These saccharides were obtained from agave, „Jerusalem Artichoke“, garlic, green lily, cactus and mushrooms. The selected bacterial species were *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium animalis*. The increase in growth of the bacterial species was determined by turbidity measurement. As result of these investigations a positive influence of some sugars could be detected. This could be confirmed using further determinations of the colony forming units on agar plates.

1. Einleitung

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde das Wachstum von ausgewählten Bakterienstämmen aus den Gattungen Lactobazillen und Bifidobakterien unter dem Einfluss verschiedener Zuckerlösungen untersucht und dokumentiert. In den folgenden Kapiteln wird näher auf die Hintergründe von Functional Food, Pro-, Prä- und Synbiotika sowie auf die verwendeten Methoden und Materialien der Untersuchung eingegangen.

1.1. Functional Food

„Ein Lebensmittel wird dann als funktionell eingestuft, wenn ausreichend gezeigt werden konnte, dass es eine oder mehrere Funktionen im Körper günstig beeinflusst. Diese Wirkung erfolgt über die üblichen Ernährungseinflüsse hinaus und zwar so, dass entweder verbesserte Gesundheit oder Wohlbefinden und/oder eine Verringerung des Risikos von Erkrankungen nachgewiesen wird. Funktionelle Lebensmittel müssen Lebensmittel bleiben und müssen ihre Wirkung in solchen Mengen zeigen, die den üblicherweise mit der Nahrung verzehrten Mengen entsprechen. Sie sind keine Pillen oder Kapseln, sondern üblicherweise Bestandteile der üblicherweise aufgenommenen Nahrung“ [1].

Der Ursprung von „Functional food“ liegt in Japan; dort dürfen entsprechend angereicherte Lebensmittel seit 1991 unter dem Begriff „Food for specific health use“ (Essen für spezifischen Gesundheitsnutzen) vermarktet werden [2]. Japanische Gesundheitsbehörden hatten in den 80er-Jahren erkannt, dass eine verbesserte Lebensqualität Hand in Hand mit einer Verbesserung der Lebenserwartung des ständig steigenden Bevölkerungsanteils älterer Menschen geht. So wurde ein Konzept entwickelt und es wurden spezielle Lebensmittel eingeführt, die nun vermehrt konsumiert werden [3]. In den letzten Jahrzehnten fand ein Paradigmenwechsel statt von Überleben, Gesundheitserhaltung, Stillen von Hunger hin zu Gesundheitsverbesserung, Steigerung von Wohlbefinden und Verringerung von gesundheitlichen Risiken wie Krebs und Fettsucht [1]. Es gibt heutzutage ein viel größeres Bewusstsein dafür, dass die Menschen sich selbst und ihren Familien helfen können, Krankheitsrisiken zu verringern und Gesundheit und Wohlbefinden durch einen gesunden Lebensstil, einschließlich der Ernährung, zu erhalten [3].

1.1.1. Probiotika

Das Wort „Probiotika“ leitet sich vom Griechischen „pro bios“ ab und bedeutet soviel wie „für das Leben“. Es handelt sich dabei um definierte lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und positive gesundheitliche Effekte erzielen. Vor allem Lactobazillen und Bifidobakterien werden verwendet, da sie die Magen-Darm-Passage besser als andere Mikroorganismen überleben und ihre protektive Wirkung im Darm entfalten. Zu finden sind Probiotika beispielsweise in Joghurt mit definierten und untersuchten Stämmen (z.B. Yakult, Actimel), Müslis oder auch Säuglingsnahrung wie Beba [4].

Zu den Wirkungen der Probiotika zählen die verkürzte Dauer und Vorbeugung von Durchfallerkrankungen (wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder Reizdarmsyndrom), Stimulation der Antikörperbildung gegen Erreger von Darminfektionen wie *Helicobacter pylori*, Verbesserung der Enzymaktivität in der Darmflora (bei Lactoseintoleranz), Reduzierung der Dauer und Schwere von Erkältungskrankheiten durch Stärkung des Immunsystems. Vermutet wird auch eine Verringerung der Beschwerden bei Allergikern, Kindern mit Neurodermitis und Säuglingen mit Windeldermatitis [4, 5]. Hoffnung schöpft die Medizin auch hinsichtlich neuer Einsatzgebiete außerhalb des Verdauungstraktes, wie Atemwege oder Urogenitaltrakt. In diesen Fällen müssen aber noch weitere Studien vorgenommen werden, um Patienten Empfehlungen in diese Richtung auszusprechen. Als unzureichend wird die Datenlage hinsichtlich der Vorbeugung von Frühgeburten infolge vaginaler Infektionen während einer Schwangerschaft angesehen, wenngleich es in früheren Untersuchungen Hinweise darauf gab [5]. Fraglich ist die mögliche Senkung des Cholesterinspiegels und die antimutagene Wirkung; auch hierzu sind noch weitere Untersuchungen nötig [6].

1.1.2. Präbiotika

Während Probiotika lebende Mikroorganismen enthalten, sind Präbiotika für den Menschen unverdauliche Lebensmittelbestandteile. Sie fördern das Wachstum und/oder die Aktivität von Bakterien im Darm, sind also quasi Substratquelle für die probiotischen Bakterien. Wichtig ist dabei vor allem, dass das Präbiotikum nicht gleich in den oberen Darmabschnitten hydrolysiert bzw. absorbiert wird und die selektive Verwertung durch bestimmte Bakterien in einer Mischkultur erfolgt.

Als Präbiotika werden für den Menschen unverdauliche Polysaccharide verwendet, wie

Oligosaccharide, Oligofructose, Fructo- und Galactooligosaccharide oder Inulin [7].

Präbiotika fördern beispielsweise die Absorption von Eisen, Magnesium und Calcium, hemmen die Funktion der Osteoclasten und damit den Knochenabbau, fördern gleichzeitig die Calciumaufnahme in den Knochen, haben einen positiven Einfluss auf die Blutfettwerte, beeinflussen den Darm positiv bei Durchfallerkrankungen oder Obstipation. Es gibt auch erste Hinweise, dass Präbiotika, die das Wachstum von Bifidobakterien fördern und das Risiko, an Kolonkrebs zu erkranken, verringern können [6, 7].

1.1.2. Synbiotika

Synbiotische Lebensmittel enthalten Pro- und Präbiotika [7].

1.2. Probiotische Bakterien

Wie schon erwähnt, werden als probiotische Bakterien vor allem Lactobazillen und Bifidobakterien verwendet [4]. Lactobazillen und Bifidobakterien zählen zu den grampositiven, nicht sporenbildenden, anaeroben bis fakultativ anaeroben Milchsäurebakterien [8].

1.2.1. *Lactobacillus reuteri*

Unter anderem konnte in Studien nachgewiesen werden, dass Antibiotika-assoziierte Durchfälle von hospitalisierten Patienten durch *Lactobacillus reuteri* verringert werden konnten [9]. Es gibt Hinweise auf entzündungshemmende Effekte und nachdem es in kleinen Mengen auch in der Muttermilch vorkommt, wirkt sich dieser Stamm positiv auf Koliken bei gestillten Neugeborenen aus [10, 11]. Ebenso eignet sich *Lactobacillus reuteri* gut als Unterstützung einer Tripeltherapie von *Helicobacter pylori*-Infektionen und reduziert gastrointestinale Nebenwirkungen [12]. Auch gibt es Studien, die zeigen, dass Lactobazillen eine gute, nebenwirkungsfreie Methode zur Behandlung einer bakteriellen Vaginalinfektion darstellen [13].

1.2.2. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus hat eine lange Geschichte als Zusatz in fermentierten Milchprodukten und gilt als sicher in der Anwendung [14]. In klinischen Studien konnte bewiesen werden, dass die Kombination aus *Lactobacillus acidophilus* und Vitamin C vorbeugend gegen Infektionen des Respirationstraktes bei Vorschulkindern wirkt [15]. Ebenso gibt es Hinweise, dass mit *Lactobacillus* angereichertes Joghurt das Lipidprofil von Typ 2-Diabetikern verbessern kann [16]. Sehr effektiv ist die Wirkung gegen *Clostridium difficile*, einem pathogenen Keim, der Antibiotika-assoziierte Durchfälle und Enterokolitis verursacht. Bei Patienten, die an chronischen Erschöpfungszuständen leiden, konnte eine teilweise Linderung der Symptome gezeigt werden [17].

1.2.3. *Lactobacillus rhamnosus* GG

Lactobacillus rhamnosus GG ist gegen saure pH-Werte (Magensäure, Gallensäure) resistent und wird daher gern in Kombination mit anderen Milchsäurebakterien in der Lebensmittelindustrie verwendet [7]. Der Anhang „GG“ stammt von den beiden Forschern Dr. Sherwood Gorbach und Dr. Barry Goldin, die diese *Lactobacillus*-Unterart 1985 erstmals isoliert haben [18]. Nicht alle Vertreter von *Lactobacillus rhamnosus* GG wirken positiv auf Immunsystem und Gastrointestinaltrakt, da einige pathogene Eigenschaften haben und Karies, rheumatisch-vaskuläre Erkrankungen oder gar Endokarditis hervorrufen können [19]. Für viele Vertreter sind aber verschiedene Gesundheitseffekte gut dokumentiert, wie zum Beispiel die Prävention und Behandlung gastrointestinaler Infekte und Durchfälle, Stimulation der Immunantwort durch Aktivierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen, antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen und Freisetzung verschiedener Zytokine oder die Prävention bestimmter allergischer Reaktionen. [20]. Auch bei der atopischen Dermatitis von Kindern zeigte *Lactobacillus rhamnosus* GG günstige Eigenschaften und konnte einerseits die Entwicklung einer atopischen Dermatitis verhindern, andererseits gab es auch eine Milderung des Schweregrades bei bereits erkrankten Kindern. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Kinder, die genetisch bedingt zur Hochrisikogruppe für Ekzeme gehören, durch die Gabe von *Lactobacillus rhamnosus* GG weniger Ekzeme entwickelt haben, als Kinder in der Placebogruppe [21].

1.2.4. *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*

Lactobacillus paracasei ist im Stande das Wachstum verschiedener pathogener Keime wie *Streptococcus mutans*, der für Infektionen im Mundbereich und Karies verantwortlich ist, zu hemmen [22]. In Studien konnte zwar Prävention oder Verringerung der Schwere von Ekzemen bei Kindern nicht verifiziert werden, wohl aber schien die Sensibilisierung der Haut gegenüber Nahrungsmittelallergenen und somit die Häufigkeit des Auftretens von atopischen Ekzemen bei jüngeren Kindern verringert zu werden [23]. Ebenso wird von einer Aktivierung des Immunsystems über intestinale Probiotika berichtet [24]. Sein positiver Einfluss auf Durchfallerkrankungen, besonders durch *Escherichia coli* verursachte, und die Senkung des Körperfettgehaltes und des Gewichtes bei Patienten, die Diät halten und gleichzeitig Probiotika zu sich nehmen, konnte in mehreren Studien bewiesen werden [25, 26, 27].

1.2.5. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*

Die Einnahme von Bifidobakterien wirkt sich positiv bei Zahnfleischentzündungen und Plaquebildung aus, weiters wirkt es immunmodulierend durch Aktivierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen, antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen und Freisetzung verschiedener Zytokine [28]. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, auch bekannt unter der Bezeichnung Bb12, ist eine Unterart der beiden Subspezies der *Bifidobacterium animalis*-Organismen, allerdings im Gegensatz zu den anderen Lactobacillen nicht gegen Säure resistent und wird oft in Kombination mit anderen Milchsäurebakterien eingesetzt.

In Studien konnte gezeigt werden, dass Bifidobakterien, genauso wie *Lactobacillus acidophilus*-Keime, das Lipidprofil von Typ-2-Diabetikern verbessern können, bei Kleinkindern und Säuglingen einen positiven Einfluss auf die Gesundheit haben und Infektionen sowohl im Gastrointestinalbereich, als auch im Respirationstrakt, vorbeugen können [16]. Ebenso wie bei *Lactobacillus acidophilus* können die Symptome chronischer Erschöpfungszustände teilweise gemildert werden [28].

2. Material und Methoden

2.1. Herstellung eines MRS (Man-Ragosa-Sharpes)-Mediums

2.1.1. Herstellung einer MRS-Bouillon ohne Glukose (MRS⁻ -Medium)

Tabelle 1: Bestandteile des MRS-Mediums

Pepton aus Casein	10g
Fleischextrakt	8g
Hefeextrakt	4g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	2g
Tween 80	1g
Di-Ammoniumhydrogencitrat	2g
Natriumacetat	5g
Magnesiumsulfat	0,2g
Cystein-Hydrochlorid Monohydrat	0,56g
Mangansulfat	0,04g

Die Substanzen wurden in einem 1000ml Messzylinder eingewogen und mit Aqua destillata auf 900ml aufgefüllt.

Dann wurden die Bestandteile mittels Magnetrührer bei Raumtemperatur gelöst. Im Anschluss wurde die Lösung für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlraum gelagert.

2.1.2. Herstellung einer MRS-Bouillon mit Glukose (MRS+ - Medium)

Für das MRS+ - Medium wurden dieselben Bestandteile, wie in Tabelle 1 angegeben, verwendet. Die Bestandteile wurden ebenfalls in einem 1000ml Messzylinder eingewogen, mit Aqua destillata auf 900ml aufgefüllt und bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert.

Zur Bereitung einer 20%igen Glukoselösung wurden 200g Glukose in einem 1000ml Messzylinder eingewogen, mit Aqua destillata auf 1000ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur am Magnetrührer gelöst. Anschließend wurde die Lösung 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden 100ml dieser Lösung zu den 900ml MRS⁻ - Medium zugefügt. Danach wurde die Lösung bis zur weiteren Verwendung im Kühlraum bei 4°C gelagert.

2.2. Herstellung einer PBS-Lösung (Phosphate Buffered Saline-Lösung)

Die Bestandteile (2,46g Kalium-dihydrogenphosphat, 14,2g Di-Natriumhydrogenphosphat, 2,01g Kaliumchlorid und 80,06g Natriumchlorid) wurden in einem 1000ml Messzylinder eingewogen, mit Aqua destillata auf 1000ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur am Magnetrührer gelöst. Die Lösung wurde anschließend für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung im Kühlraum bei 4°C gelagert.

Um eine einfache PBS-Lösung zu erhalten, wurde die derart hergestellte PBS-Lösung mit sterilem Wasser 1:10 verdünnt.

2.3. Herstellung eines MRS-Agar-Mediums mit Glukose

Tabelle 2: Bestandteile des MRS-Agar-Mediums

Pepton aus Casein	10g
Fleischextrakt	10g
Hefeextrakt	4g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	2g
Tween 80	1g
Di-Ammoniumhydrogencitrat	2g
Natriumacetat	5g
Magnesiumsulfat	0,2g
Cystein-Hydrochlorid Monohydrat	0,56g
Mangansulfat	0,04g
Agar	14g

Die Bestandteile wurden in einem 1000ml Messzylinder eingewogen und mit Aqua destillata auf 900ml aufgefüllt. Nachdem die Bestandteile am Magnetrührer bei Raumtemperatur gelöst wurden, wurde die Lösung für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Nachdem das Agarmedium auf Handwärme abgekühlt war, wurden unter der Laminar-Air-Flow-Werkbank 100ml Glukoselösung in das Agarmedium pipettiert. Anschließend wurden die Petrischalen mit dem Agarmedium befüllt und über Nacht zum Festwerden stehen gelassen. Nachdem das Agarmedium sich über Nacht verfestigt hatte, wurden die Schalen mit dem Deckel nach unten bis zur weiteren Verwendung im Kühlraum bei 4°C gelagert.

2.4. Herstellung einer Cystein HCl-Lösung

1g Cystein-HCl wurde in einem Messzylinder eingewogen und mit Aqua destillata auf 200ml aufgefüllt. Danach wurde die Lösung für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung im Kühlraum bei 4°C gelagert.

2.5. Herstellung einer PBS/Cystein HCl-Lösung

50ml PBS-Lösung und 50ml Cystein HCl-Lösung wurden in einen 500ml Messzylinder überführt, mit sterilem Aqua destillata auf 500ml aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlraum bei 4°C gelagert.

.

2.6. Herstellung der Zuckerlösungen

Für die Untersuchungen wurden 2%-ige Zuckerlösungen aus den in Tabelle 3 aufgelisteten Sacchariden hergestellt, am Magnetrührer bei Raumtemperatur gelöst, anschließend unter dem Laminar-Air-Flow durch einen Membranfilter filtriert und bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

Tabelle 3: Liste, der im Rahmen der Diplomarbeit verwendeten Oligo- und Polysaccharide

Bezeichnung der Probe	Pflanzenname(-familie)/Firma	Merkmale und Aussehen der Probe	Zuckerart
1) Topinambur Extrakt 10	<i>Helianthus tuberosus</i> -Topinambur (Asteraceae, Korbblütler)	Weißes Pulver	β-2-1-verknüpftes Fruktan
2) Topinambur Extrakt 3	<i>Helianthus tuberosus</i> -Topinambur (Asteraceae, Korbblütler)	Weißes Pulver	β-2-1-verknüpftes Fruktan
3) FOS (Topinambur)	<i>Helianthus tuberosus</i> -Topinambur (Asteraceae, Korbblütler)	Bräunliche, kristalline Substanz	β-2-1-verknüpftes Fruktan

4) Sinistrin	<i>Squilla maritima</i> -Meerzwiebel (Liliaceae, Liliengewächse)	Weißes Pulver	Mixtyp, β -2-1- und β -2-6-verknüpft
5) Agavenfructan	<i>Agave tequilana</i> Weber-Mexikanische Agave (Agavoideae, Agavengewächse)	Weißes Pulver	Mixtyp, β -2-1- und β -2-6-verknüpft
6) Metlin	<i>Agave tequilana</i> Weber-Mexikanische Agave (Agavoideae, Agavengewächse)	Weißes, kristallines Pulver	Mixtyp, β -2-1- und β -2-6-verknüpft, höher molekular
7) Metlos	<i>Agave tequilana</i> Weber-Mexikanische Agave (Agavoideae, Agavengewächse)	Braune, bröckelige Substanz	Mixtyp, β -2-1- und β -2-6-verknüpft, niedermolekular
8) Knoblauch	<i>Allium sativum</i> (Amaryllidaceae, Amaryllisgewächse)	Weiß, kristalline Substanz	Mixtyp, β -2-1- und β -2-6-verknüpft
9) Chlorophytum	<i>Chlorophytum comosum</i> -Grünlilie (Agavoideae, Agavengewächse)	Weiß, Substanz mit watteartiger Konsistenz	β -2-1-verknüpftes Fruktan
10) 1-Kestose		Weißes Pulver	Triose, β -2-1-verknüpftes Fruktan, unverzweigt, niedermolekular
11) Raftiline ST	<i>Cichorium intybus</i> -Wegwarte (Asteraceae, Korbblütler), Firma: ORAFTI	Weißes Pulver	β -2-1-verknüpftes Fruktan, unverzweigt
12) Raftiline GR	<i>Cichorium intybus</i> -Wegwarte (Asteraceae, Korbblütler), Firma: ORAFTI	Weißes Pulver	β -2-1-verknüpftes Fruktan
13) Raftilose P95	<i>Cichorium intybus</i> -Wegwarte (Asteraceae, Korbblütler), Firma:	Weißes Pulver	β -2-1-verknüpftes Fruktan, niedermolekular

	ORAFTI		
14) Benefiber	<i>Cyamopsis tetragonoloba</i> -Guarbohne (Fabaceae, Hülsenfrüchtler), Firma:Novartis	Weißes Pulver	Heteropolysaccharid
15) Frutafit IQ	<i>Cichorium intybus</i> -Wegwarte (Asteraceae, Korbblütler), Firma: Neuber GmbH	Weißes Pulver	β -2-1-verknüpftes Fruktan
16) Nopalzin	<i>Opuntia ficus-indica</i> -Feigenkaktus (Cactaceae, Kakteen)	bräunliches Pulver	Heteropolysaccharid
17) Chagatee	<i>Inonotus obliquus</i> -Schiefer Schillerporling (Basidiomycetes, Ständerpilze)	Dunkelbraune Stücke des zermahlenden Pilzes	vorwiegend β -Glukan

2.7. Verwendete Bakterienkulturen

Im Zuge der Diplomarbeit wurde das Wachstum der folgenden 7 Bakterienstämme unter dem Einfluss der in Tabelle 3 genannten Saccharide genauer untersucht.

- 1.) *Lactobacillus reuteri*, ATCC 55730, Firma BioGaia
- 2.) *Lactobacillus acidophilus*, LA-5, Firma Hansen
- 3.) *Lactobacillus rhamnosus* GG, ATCC 53103
- 4.) *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, CRL 431, Firma Hansen (1)
- 5.) *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, DN 114001, Firma Danone (2)
- 6.) *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* /Shirota, DSM 20312, Firma Yakult (3)
- 7.) *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* (BB12), Firma Hansen

2.7.1. Anzucht der Bakterienkulturen

Am Vortag des Experiments wurde jeweils eine frische Bakteriensuspension hergestellt, 1 Tropfen der Bakterienausgangskultur in 5 ml MRS⁺ - Medium aufgenommen und über Nacht im Brutschrank unter anaeroben Bedingungen bei 37°C bebrütet.

2.8. Bioscreen C-Messung

Am nächsten Tag wurde von den frisch angezüchteten Bakterienkulturen die OD600 (optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm) mittels Photometer bestimmt. Aus den erhaltenen OD600-Werten wurde die Verdünnung errechnet, die nötig ist, um eine OD600 von 0,2 zu erhalten. Die errechnete Menge Bakterienkultur wurde in ein steriles Eppendorf-Röhrchen pipettiert, mit 1ml verdünnter PBS-Lösung gewaschen und 8 Minuten bei 13500rpm zentrifugiert. Das Waschen des Pellets wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Nach dem 3. Waschvorgang wurde mit der errechneten Menge MRS⁻ - Medium auf eine OD600 von 0,2 verdünnt.

Vor der Messung wurde zuerst die Mikrotiterplatte mit 200µl Flüssigkeit pro Well befüllt. Dabei enthielten die ersten beiden Wells 200µl MRS⁻ - Medium, das 3. und 4. Well jeweils 200µl MRS⁺ - Medium und die weiteren Wells 100µl Bakteriensuspension in MRS⁻ - Medium (OD600=0,2) und 100µl 2%-ige Zuckerlösung in MRS⁻ - Medium beziehungsweise reines MRS⁻ - Medium als Negativkontrolle.

Die endgültige Zuckerkonzentration betrug somit 1% und die Start OD600 0,1.

Die befüllte Mikrotiterplatte wurde anschließend im Bioscreen C-Messgerät positioniert und die Messung über 48 Stunden bei 37°C gestartet.

Das Bioscreen C-Messgerät ist sowohl Inkubator als auch Photometer und misst die durch die wachsenden Bakterienkulturen entstehende Trübung. Dabei wird stündlich die OD600 gemessen.

Nach 3 Messdurchgängen am Bioscreen C-Messgerät mit den in Kapitel 2.7. genannten Bakterienkulturen und den in Tabelle 3 genannten Sacchariden wurden die Mittelwerte der Messwerte berechnet und als Wachstumskurven in Diagrammen graphisch dargestellt.

2.9. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)

Im Anschluss an die Bioscreen C-Messungen wurden Agarplatten mit Glukose, Agavenfructan, Metlos, Raftiline ST und Benefiber in der Konzentration 1% mit allen Bakterienstämmen beimpft.

Zur Bereitung der Agarplatten wurde die Hälfte der Substanzmenge, die in Tabelle 2 angegeben ist, eingewogen, mit Aqua destillata auf 450ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur am Magnetrührer gelöst. Für die Zuckerlösungen wurden 5g des Zuckers mit 50ml Aqua destillata aufgefüllt und am Magnetrührer gelöst. Agarmedium und 10%-ige Zuckerlösung wurden anschließend für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert, danach wurde die Zuckerlösung dem Medium unter der Laminar-Air-Flow-Werkbank zugesetzt und die Mischung in Agarplatten gefüllt. Die Platten wurden bis zur weiteren Verwendung im Kühlraum bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten wurde zuerst die OD600 der Bakterienkulturen mittels Photometer bestimmt. Die Bakteriensuspension wurde mit der errechneten Menge PBS/Cystein Hydrochlorid auf eine OD600 von 0,01 verdünnt und Verdünnungsstufen hergestellt. Anschließend wurden 50µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} auf die Agarplatten pipettiert, mit dem Drigalskispatel auf den Agarplatten verteilt und über Nacht im Brutschrank unter anaeroben Bedingungen bei 37°C bebrütet.

2.10. Dünnschichtchromatographie

Ebenso wurde eine dünnschichtchromatographische Untersuchung von 1-Kestose, Sinistrin, Metlos, Topinambur 3, Topinambur 10, Knoblauch und Chlorophytum durchgeführt.

Zuerst wurden Lösungen von 1-Kestose, Metlos, Topinambur 3, Topinambur 10, Sinistrin, Knoblauch und Chlorophytum hergestellt. Dazu wurden 4-5mg der Substanzen mit 500µl Wasser und 500µl Methanol versetzt und die Substanzen gelöst.

3µl jeder Lösung wurden durch den SOP Linomat IV auf eine mit Kieselgel beschichtete Dünnschichtplatte (DC Kieselgel 60 F254) aufgetragen und anschließend in einem Trog mit Laufmittel (40ml 1-Butanol, 60ml Propanol, 60ml Ethanol, 40ml Wasser) 65 Minuten laufen gelassen. Das Lösungsmittel wurde danach abgetrocknet, die Platte erneut mit einer Laufzeit von 65 Minuten in den Trog gestellt und danach wieder getrocknet. Dann kam die Platte in ein Bad mit Entwicklerflüssigkeit; diese war eine Mischung aus Thymol, Schwefelsäure und Methanol. Nach kurzer Zeit im Trockenschrank zeigten sich eindeutige Banden auf der Dünnschichtplatte.

3. Resultate

3.1. *Lactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri (1)

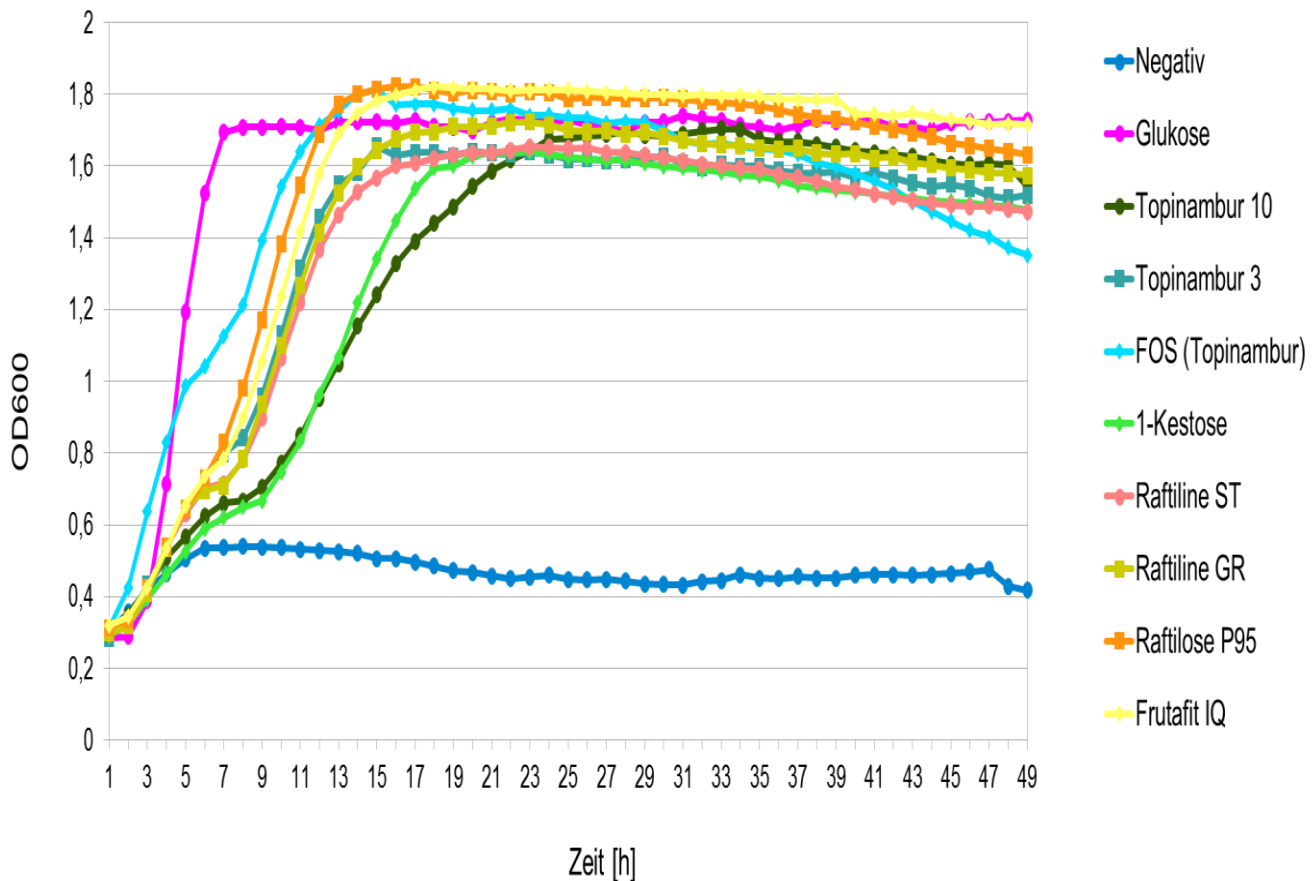


Abb. 1. Wachstumskurven von *Lactobacillus reuteri* unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)

Wie in Abb. 1. ersichtlich ist, zeigt sich unter dem Einfluss von Glukose das stärkste Wachstum, gefolgt von FOS und Raftilose P95. Ebenso bewirkt Frutafit IQ, Topinambur 10, Raftiline GR, Topinambur 3, 1-Kestose und Raftiline ST ein gutes Wachstum. Alle Zuckerlösungen liegen signifikant über der Negativkontrolle, welche der Bakterienstamm ohne Zuckerlösung war.

Lactobacillus reuteri (2)

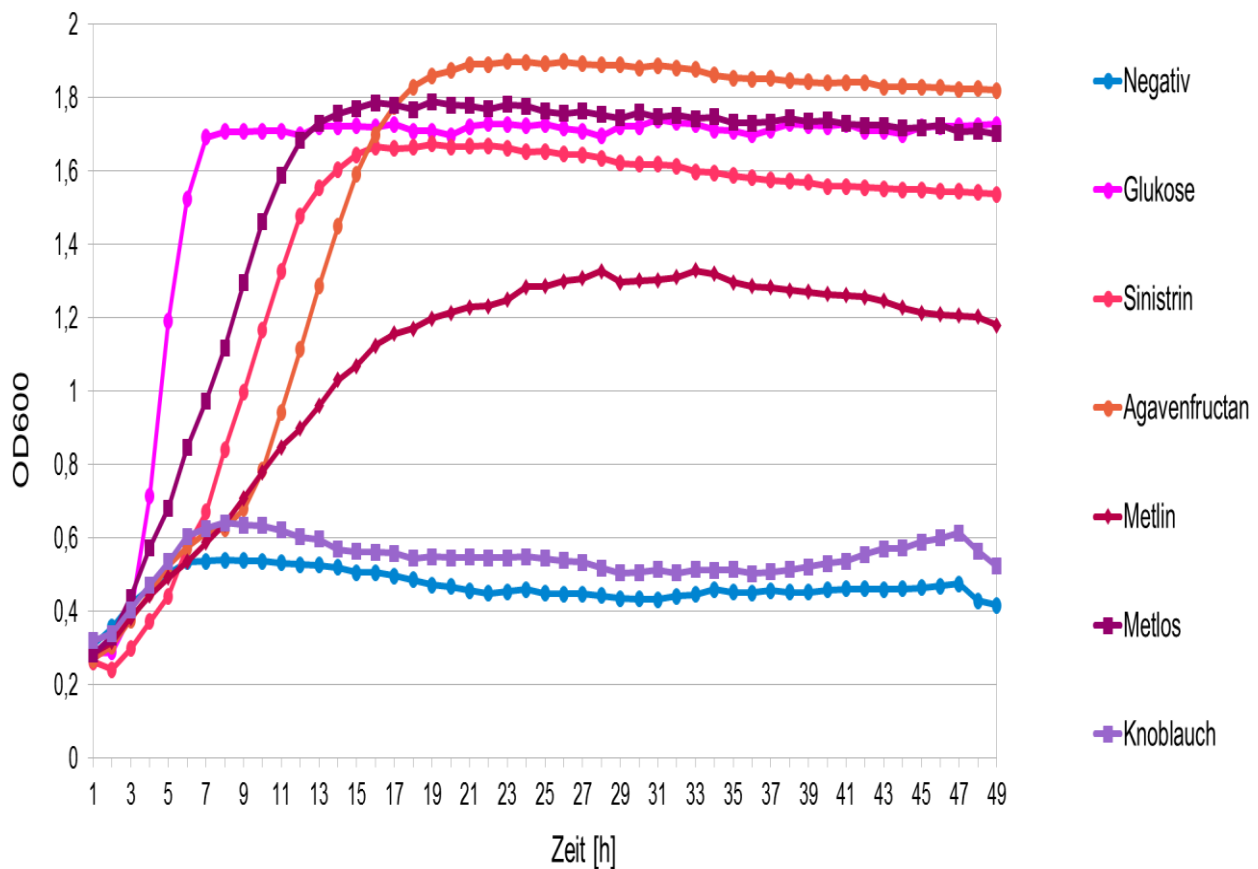


Abb. 2. Wachstumskurven von *Lactobacillus reuteri* unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)

Das beste Wachstum zeigt sich in Abb. 2. mit Glukose, Metlos, Sinistrin und Agave. Auch Metlin zeigt einen positiven Einfluss auf das Wachstum, allerdings etwas verzögerter als die anderen Zuckerlösungen. Knoblauch lässt die Bakterien am schwächsten anwachsen, liegt allerdings über der Negativkontrolle.

Lactobacillus reuteri (3)

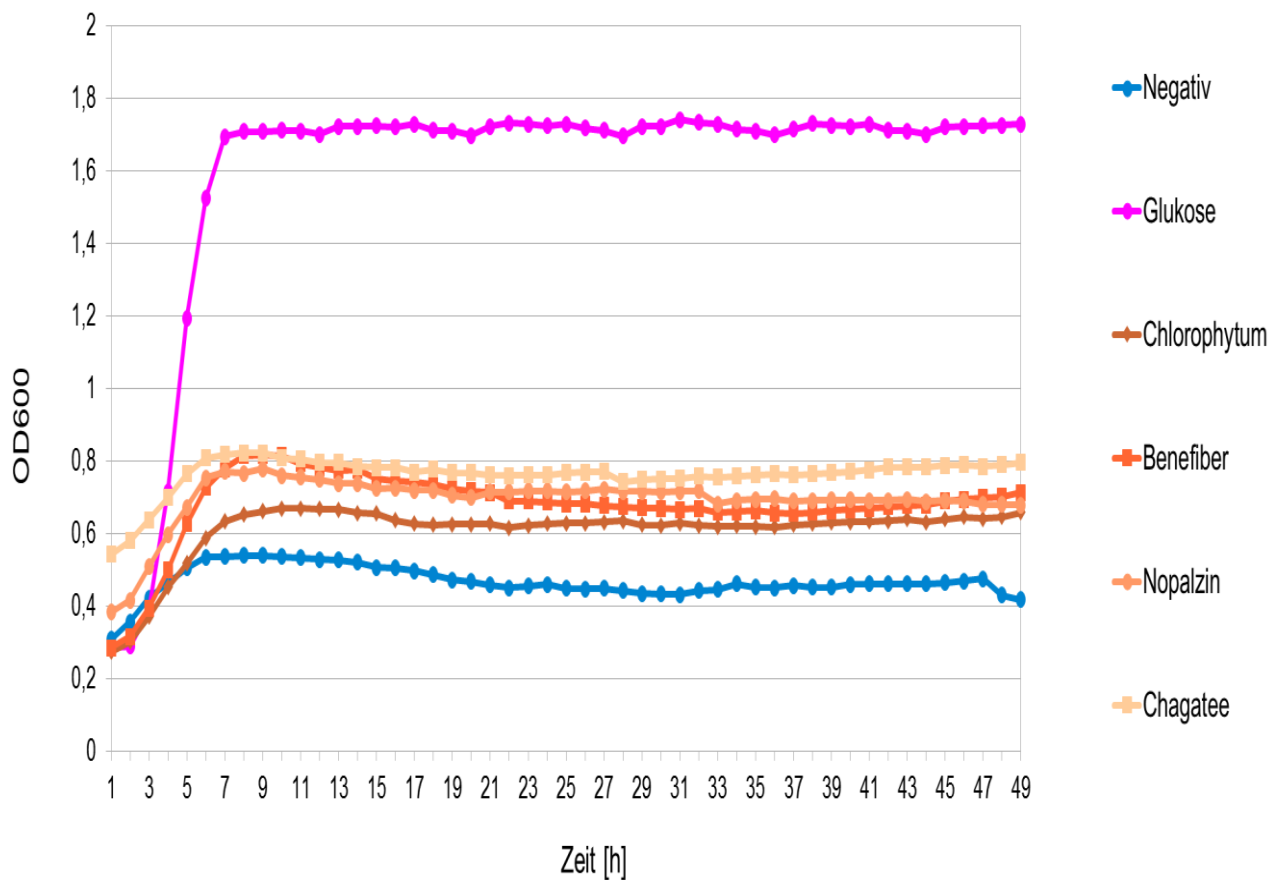


Abb. 3. Wachstumskurven von *Lactobacillus reuteri* unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)

Chagatee, Benefiber, Chlorophytum und Nopalzin bewirken eine moderate Wachstumssteigerung.

3.2. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus (1)

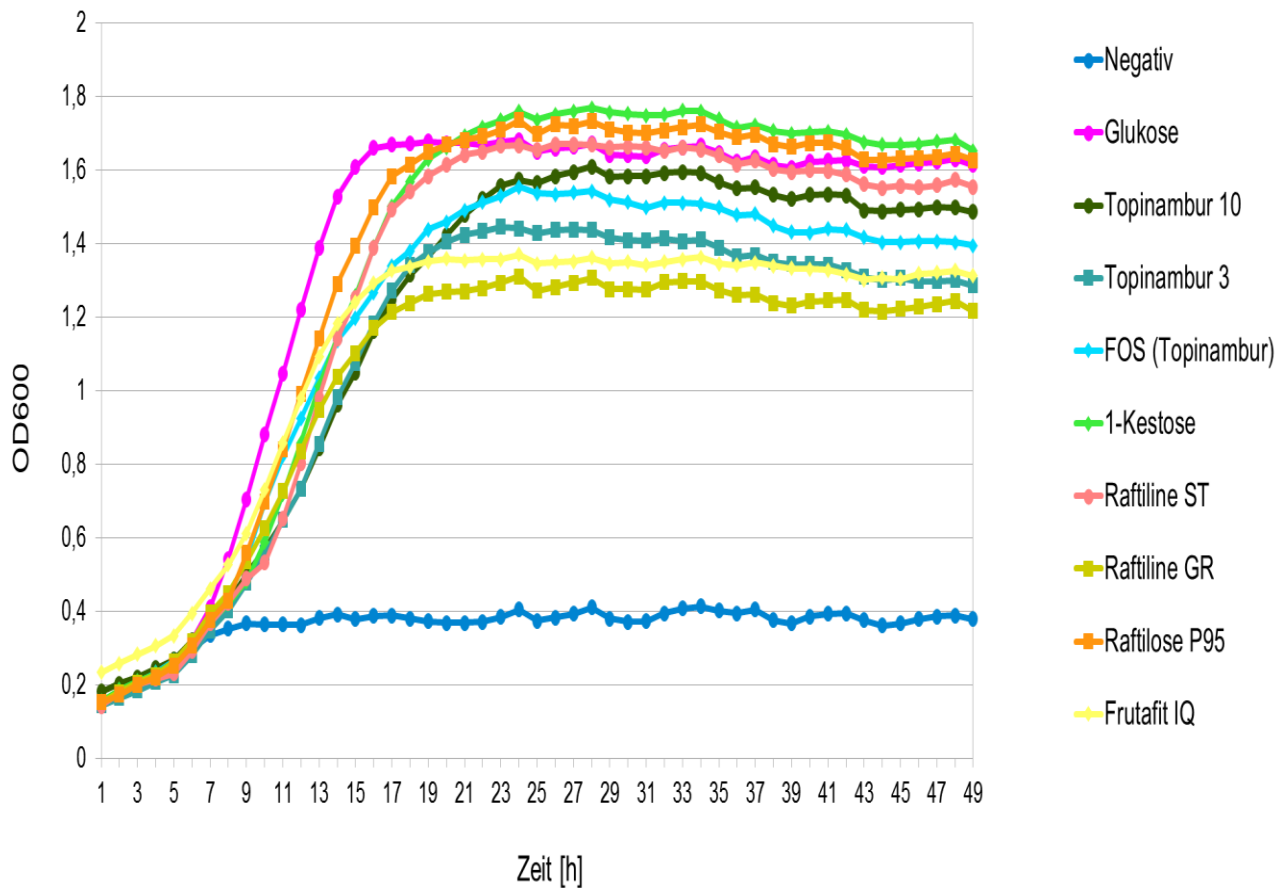


Abb. 4. Wachstumskurven von *Lactobacillus acidophilus* unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)

Das beste Wachstum zeigt sich hier wiederum in Glukoselösung, aber auch Raftilose P95, 1-Kestose, FOS und Raftiline ST bewirken eine beträchtliche Wachstumssteigerung. Auch der Zusatz von Topinambur 10 und 3 führt zu einer signifikanten Wachstumssteigerung, ebenso Raftiline GR.

Lactobacillus acidophilus (2)

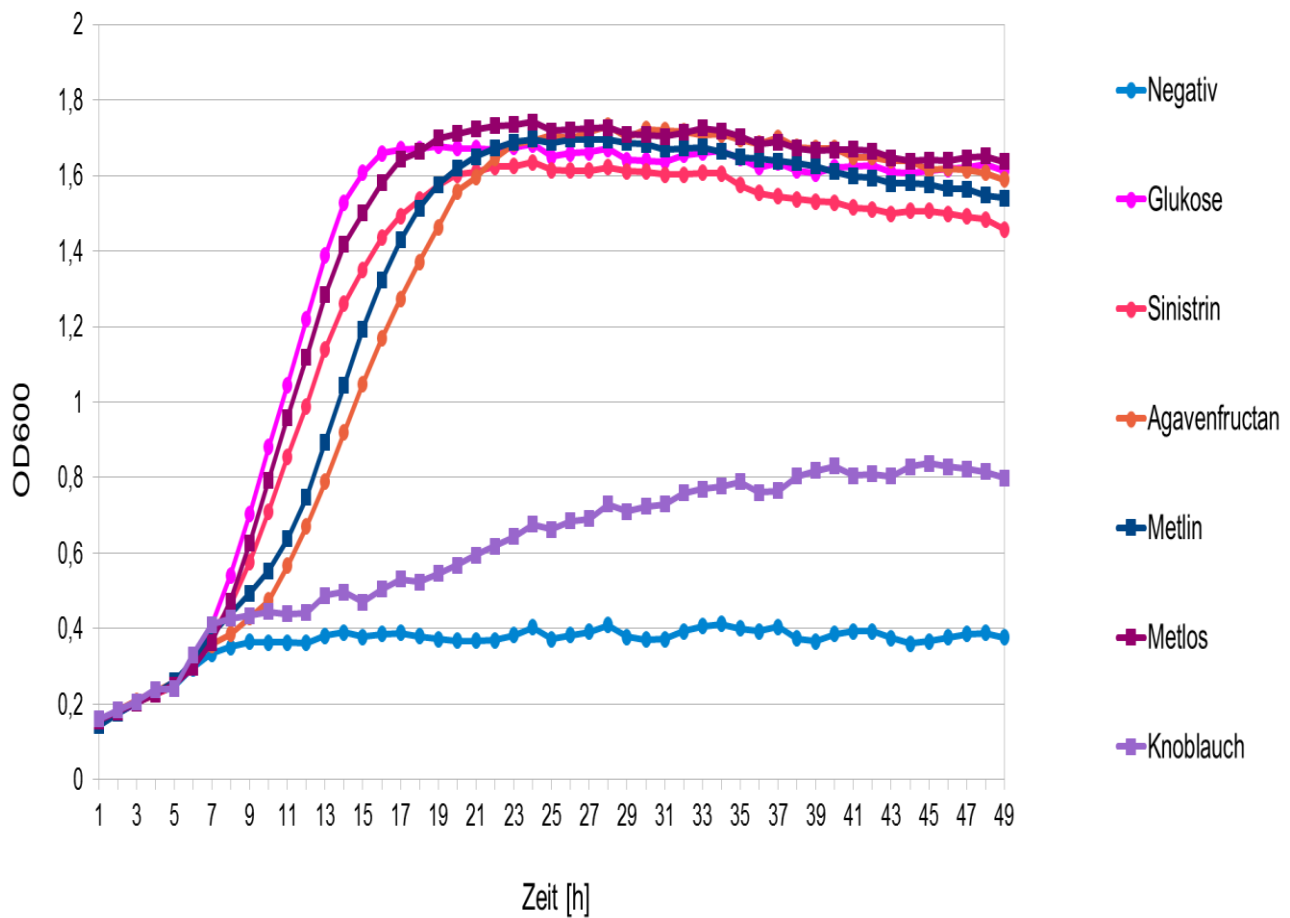


Abb. 5. Wachstumskurven von *Lactobacillus acidophilus* unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)

Wie in Abb. 5. ersichtlich, zeigt sich ein ähnlich starkes Wachstum bei Metlos, Glukose, Metlin, Agavenfructan und Sinistrin. Knoblauch bewirkt zwar auch eine Wachstumssteigerung und liegt über der Negativkontrolle, lässt *Lactobacillus acidophilus* im Vergleich zu den anderen Zuckern aber vergleichsweise schwach wachsen.

Lactobacillus acidophilus (3)

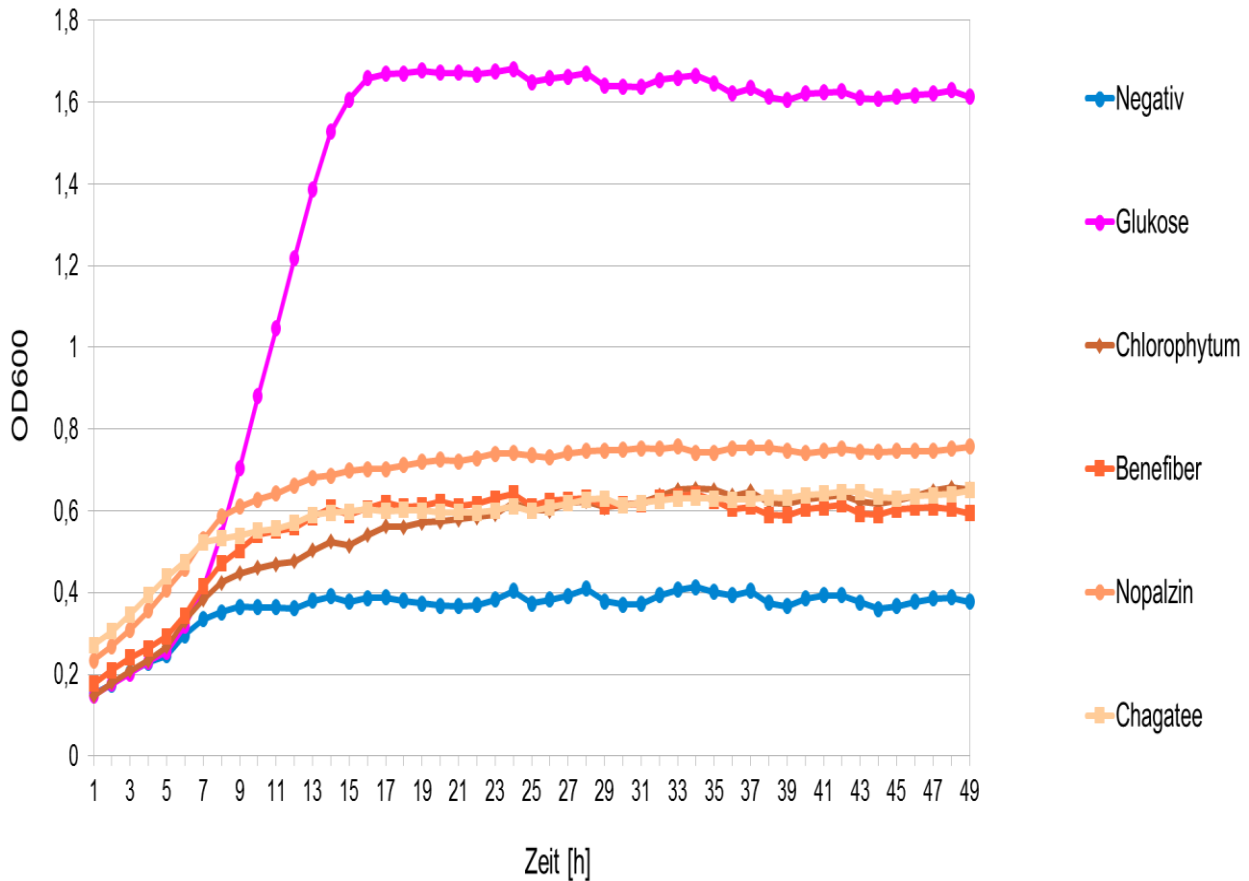


Abb. 6. Wachstumskurven von *Lactobacillus acidophilus* unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)

Das stärkste Wachstum ist in dieser Abbildung in Glukoselösung zu sehen. Ebenfalls gutes Wachstum ist durch Chagatee und Nopalzin, gefolgt von Benefiber und Chlorophytum zu verzeichnen.

3.3. *Lactobacillus rhamnosus* GG

Lactobacillus rhamnosus GG (1)

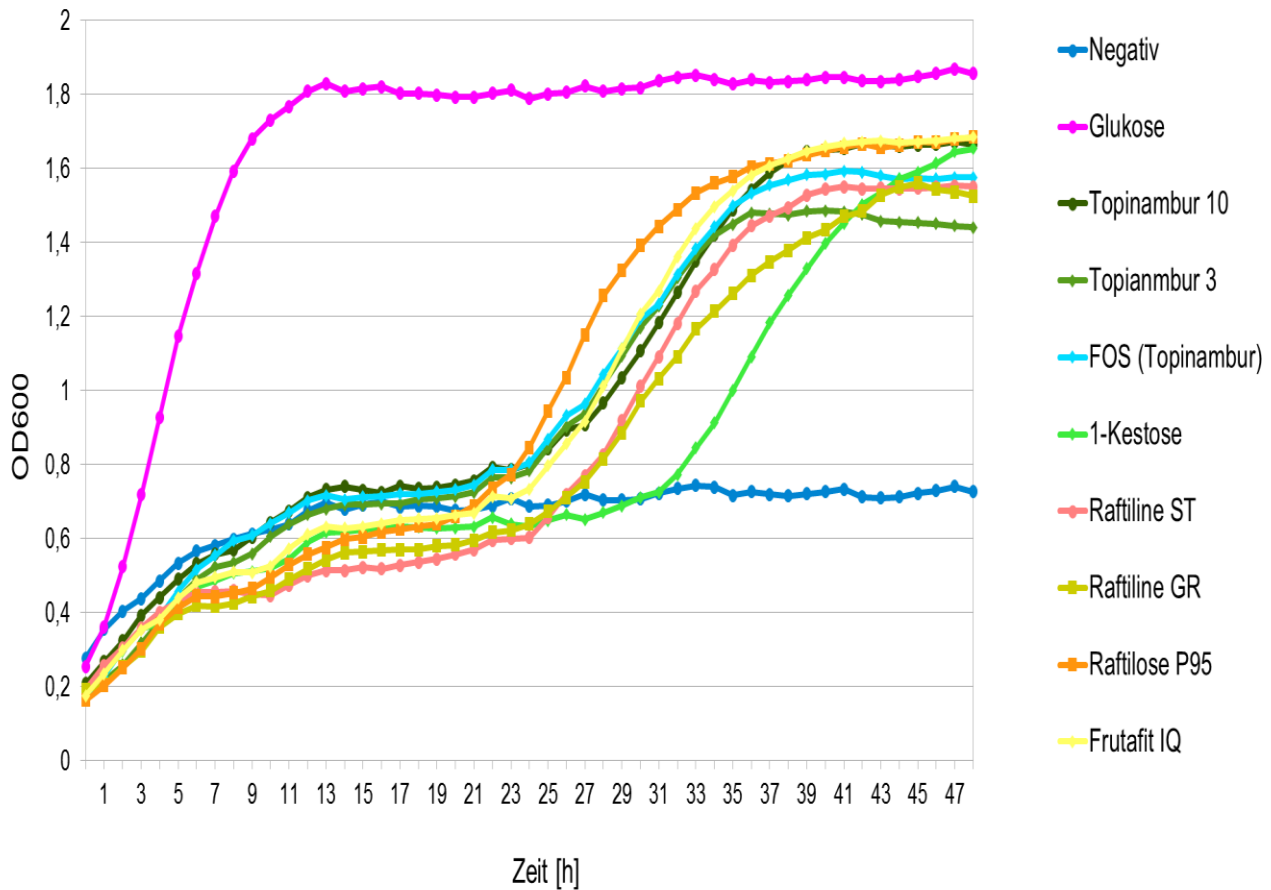


Abb. 7. Wachstumskurven von *Lactobacillus rhamnosus* GG unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)

Lactobacillus rhamnosus GG zeigt ein sehr starkes, steiles Wachstum in Glukoselösung. In den Zuckerlösungen von Raftilose P95, Frutafit IQ, FOS, Topinambur 10 und 3 erfolgt das Bakterienwachstum verzögert, in den Lösungen von Raftiline ST, GR und 1-Kestose stark verzögert.

Lactobacillus rhamnosus GG (2)

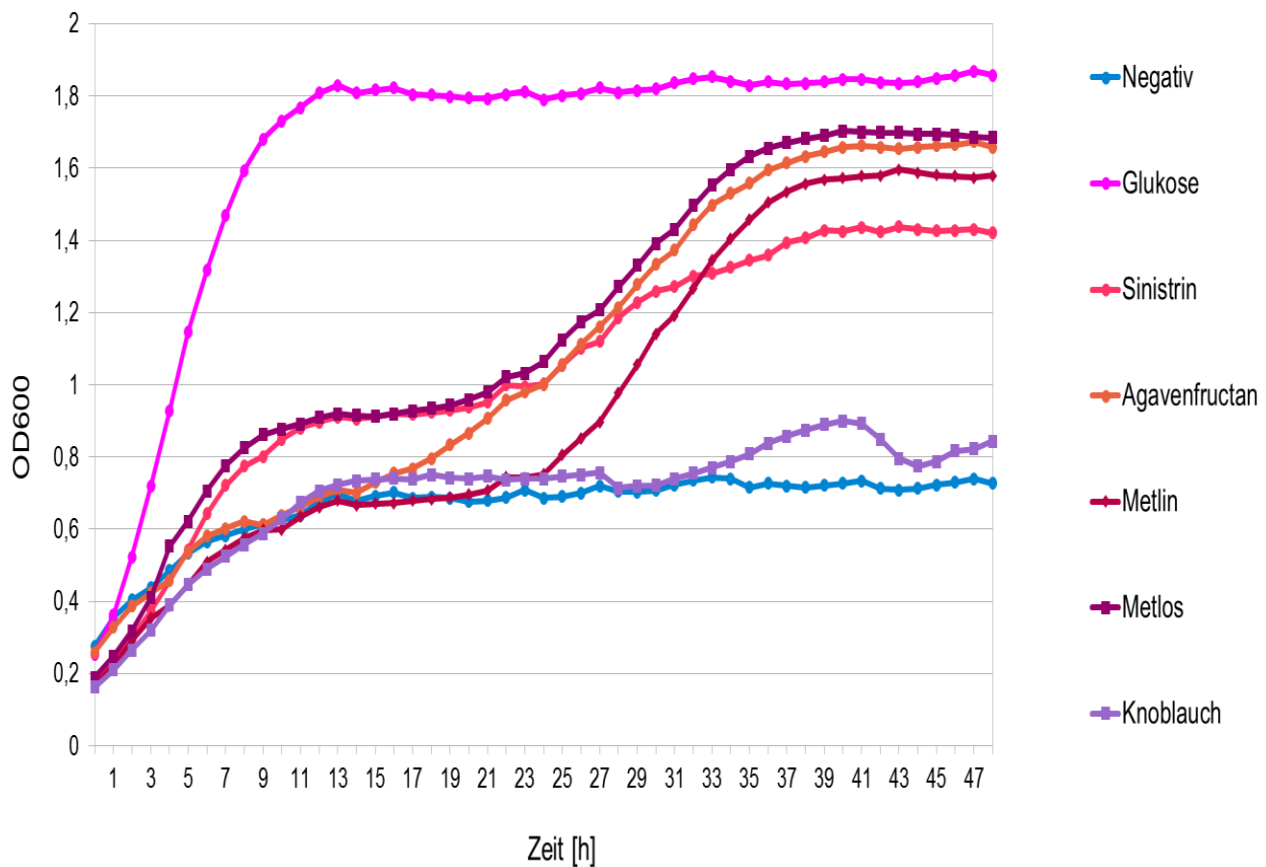


Abb. 8. Wachstumskurven von *Lactobacillus rhamnosus* GG unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)

Metlos und Sinistrin bewirken zunächst starkes Wachstum von *Lactobacillus*, das Wachstum bleibt dann konstant und steigt anschließend wieder steil an. Ebenfalls verzögertes, aber gutes Wachstum zeigt die Lösung von Agavenfructan. Metlin lässt die Bakterienkultur nur allmählich und verzögert anwachsen. Das schwächste Wachstum erfolgt in Lösungen mit Knoblauch, es liegt aber dennoch knapp über der Negativkontrolle.

Lactobacillus rhamnosus GG (3)

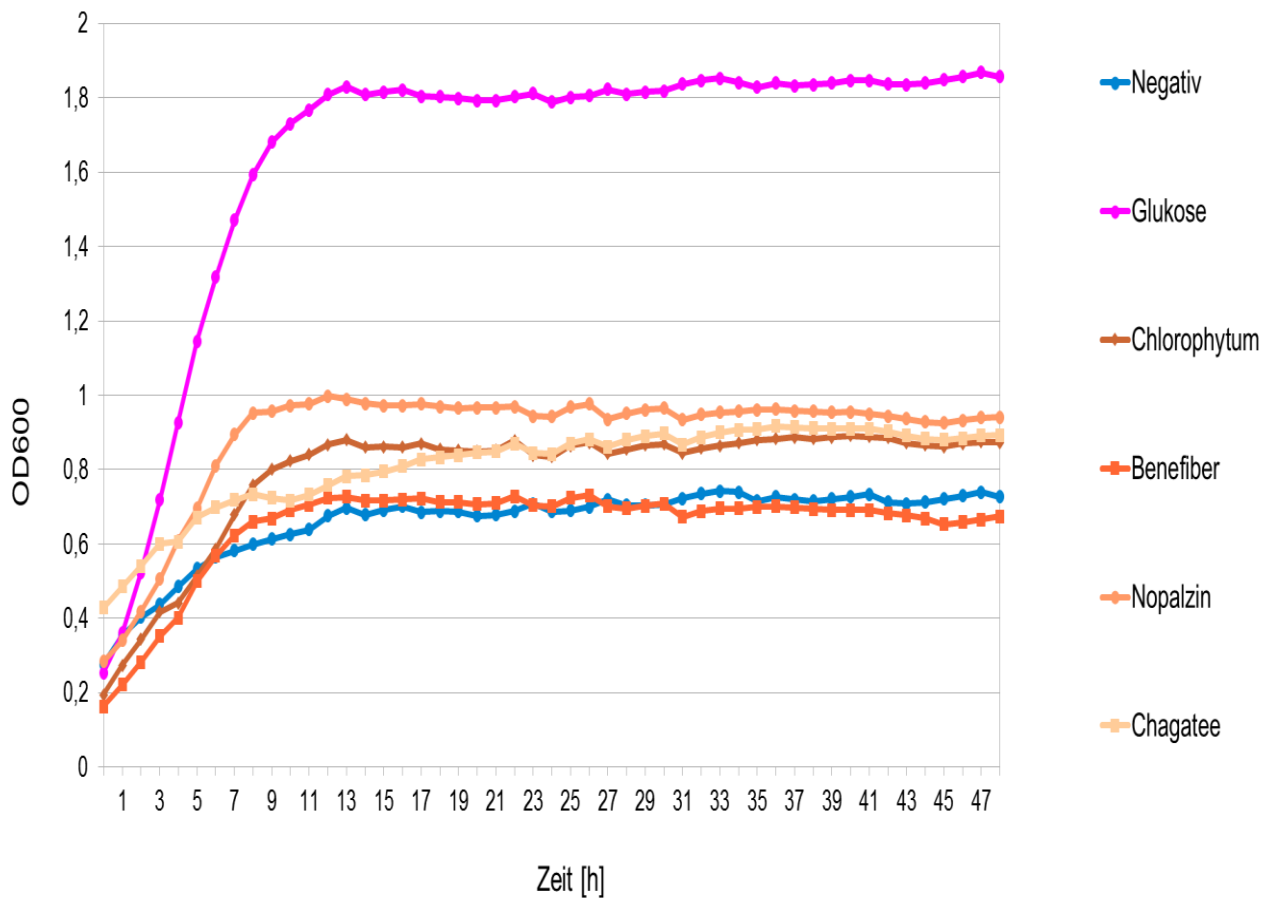


Abb. 9. Wachstumskurven von *Lactobacillus rhamnosus* GG unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)

Die Vermehrung der Zellzahl liegt in allen Zuckerlösungen unter der des Bakteriums in der Glukoselösung. Chlorophytum, Nopalzin, Chagatee und Benefiber bewirken in den ersten 9 Stunden der Messung dennoch ganz gutes Wachstum, bleiben dann jedoch eher konstant und lassen das Bakterium kaum noch wachsen.

3.4. *Lactobacillus paracasei* 1

Lactobacillus paracasei 1 (1)

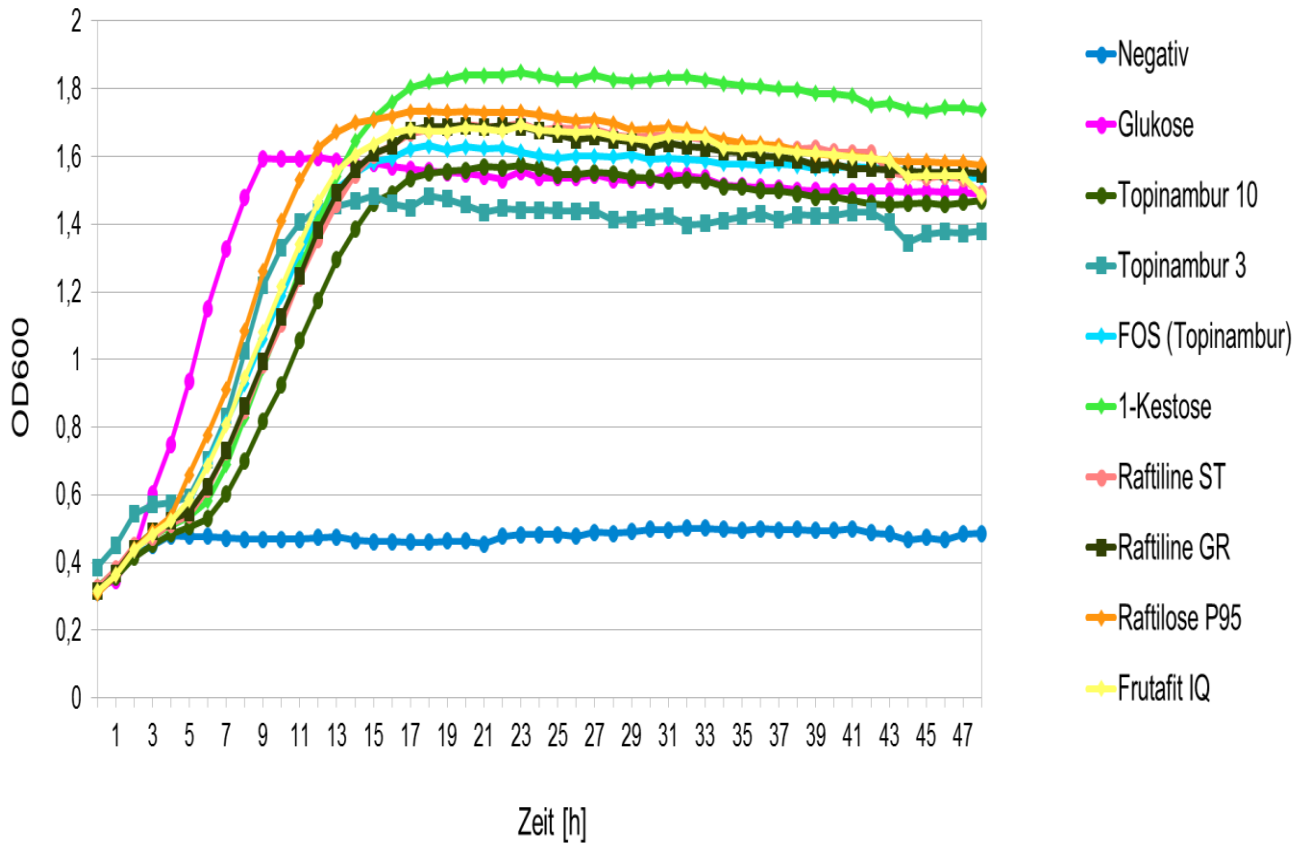


Abb. 10. Wachstumskurven von *Lactobacillus paracasei* 1 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)

Wie in dieser Abbildung ersichtlich ist, steigt die Zellzahl in Glukoselösung sehr früh steil an und erreicht das Maximum bereits nach Stunden 8. Etwas verzögert, aber auch sehr stark, steigt die Bakterienmasse in Lösungen von Raftilose P95, 1-Kestose, Frutafit IQ, FOS, Topinambur 3 und 10, Raftiline ST und GR an.

Lactobacillus paracasei 1 (2)

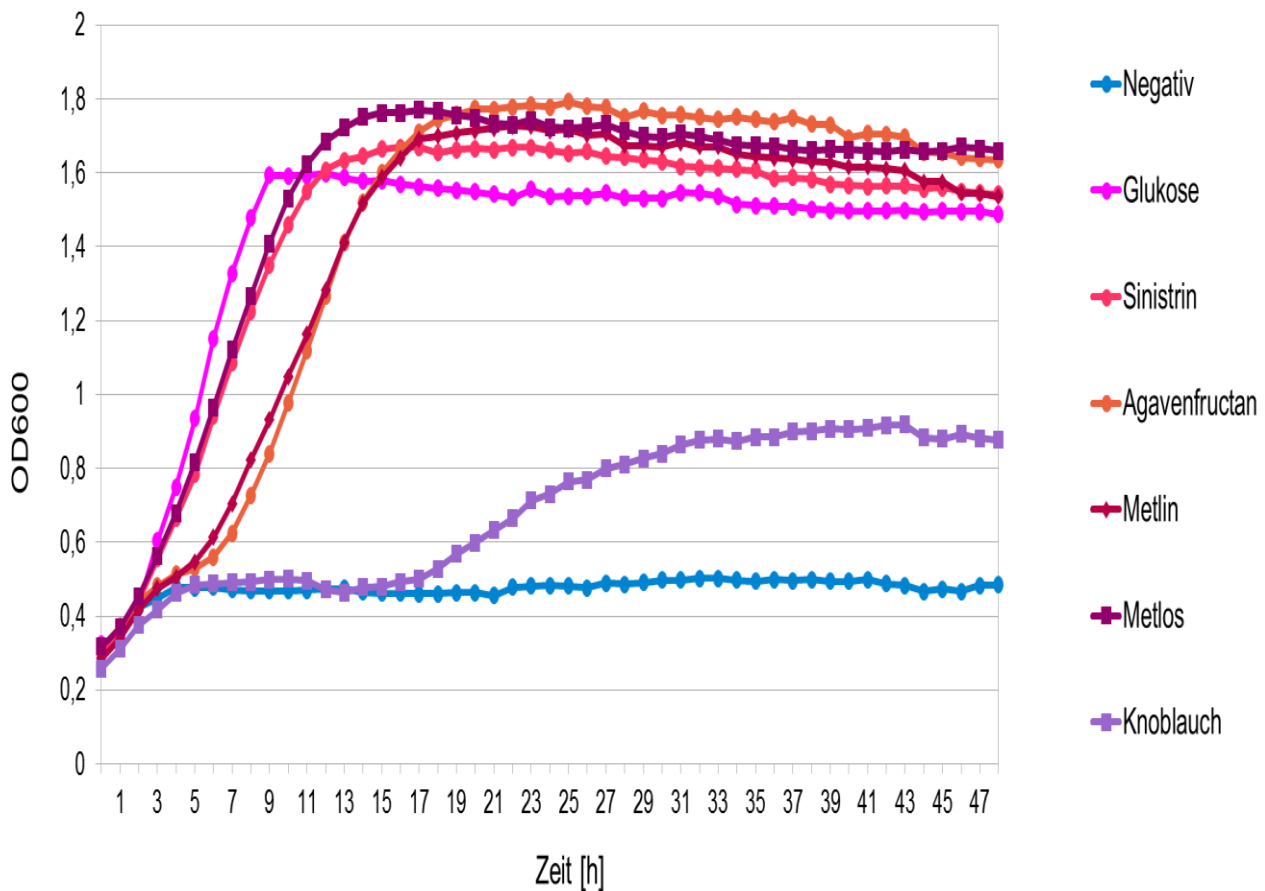


Abb. 11. Wachstumskurven von *Lactobacillus paracasei* 1 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)

Die steilsten Wachstumskurven zeigen sich bei Glukose, dann erst bei Metlos und Sinistrin. Etwas zeitverzögert, aber auch gut, wachsen die Bakterien in Lösungen von Metlin und Agave. Das schwächste Wachstum zeigt sich wiederum in Knoblauchlösung. Knoblauch lässt die Bakterien zu Beginn zwar gut wachsen, stagniert dann aber ab Stunde 5 und ab Stunde 16 wird das Bakterienwachstum wieder geringfügig beschleunigt.

Lactobacillus paracasei 1 (3)

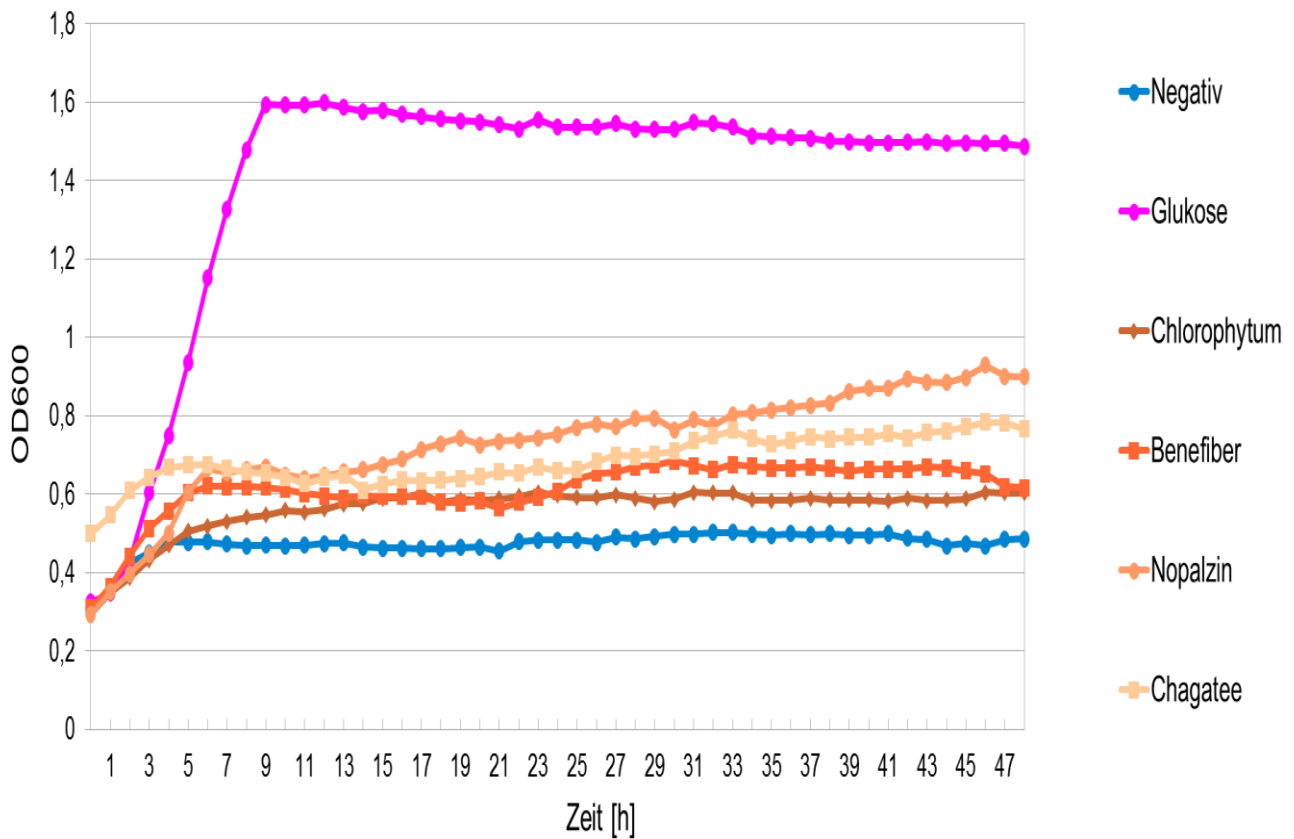


Abb. 12. Wachstumskurven von *Lactobacillus paracasei* 1 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)

Die Lösungen von Nopalzin, Chlorophytum, Benefiber und Chagatee bewirken im Vergleich zu den anderen Zuckerlösungen schwaches, aber gleichmäßiges Wachstum von *Lactobacillus paracasei*.

3.5. *Lactobacillus paracasei* 2

Lactobacillus paracasei 2 (1)

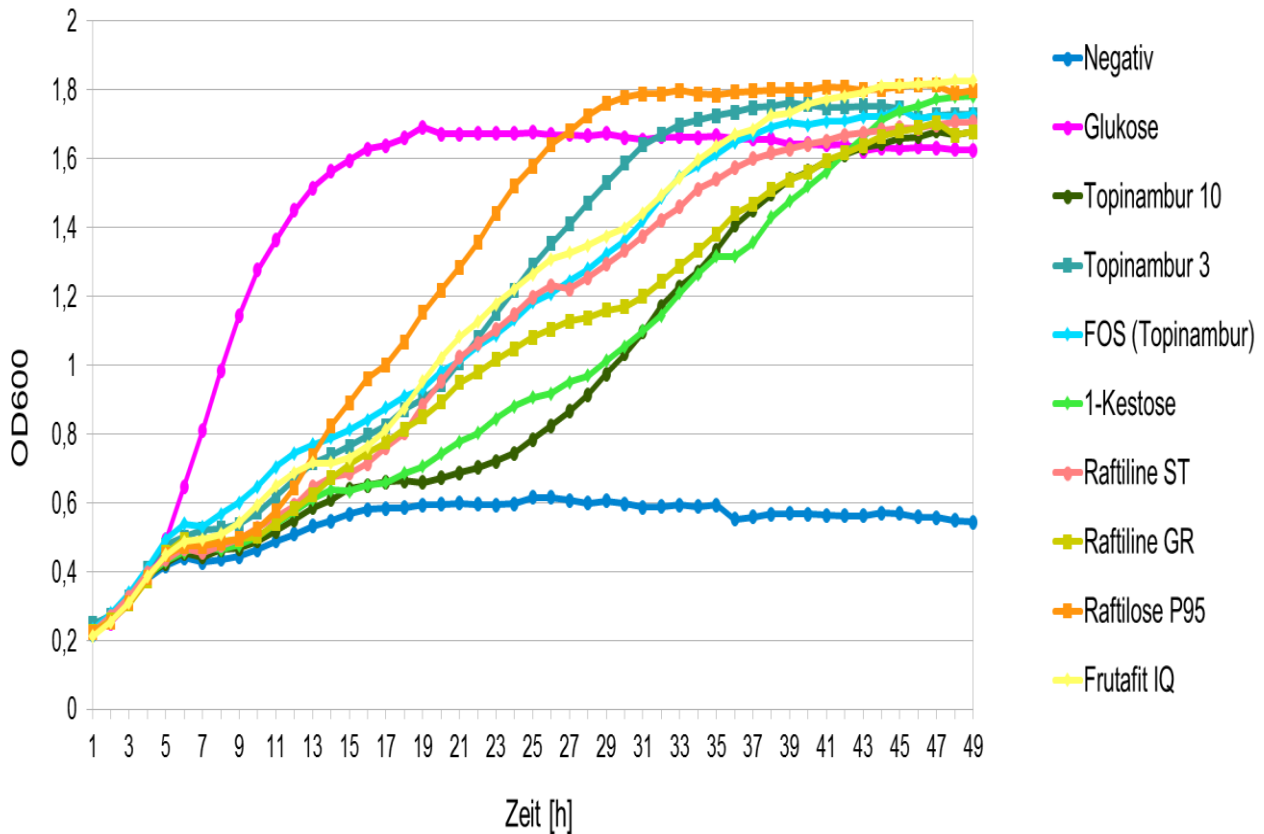


Abb. 13. Wachstumskurven von *Lactobacillus paracasei* 2 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)

Lactobacillus paracasei zeigt ein sehr starkes, steiles Wachstum in Glukoselösung, ebenso ein gutes, aber verzögertes Wachstum zeigt sich in Raftilose P95, Topinambur 3, Frutafit IQ, FOS und Raftiline ST. Noch stärkere zeitliche Verzögerung im Wachstum zeigt *Lactobacillus paracasei* in Raftiline GR, Topinambur 10 und 1-Kestose. Alle Zuckerlösungen lassen die Bakterien stark anwachsen.

Lactobacillus paracasei 2 (2)

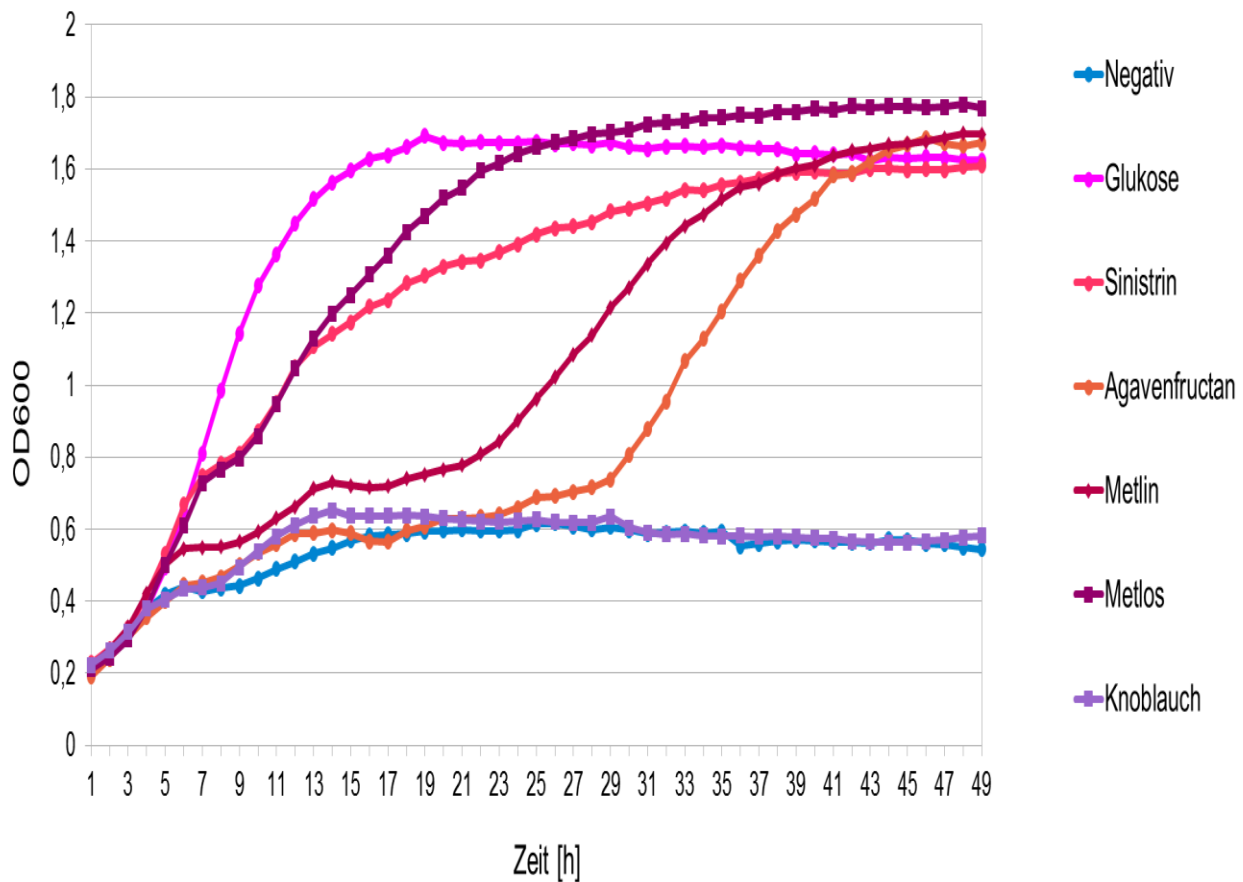


Abb. 14. Wachstumskurven von *Lactobacillus paracasei* 2 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)

Metlos und Sinistrin lässt die Zellzahl im Vergleich zu Glukoselösung zeitlich verzögert, jedoch dann stark ansteigen. Die stärkste Verzögerung bewirken Metlin und Agavenfructan. Knoblauch bleibt konstant auf dem Niveau der Negativkontrolle.

Lactobacillus paracasei 2 (3)

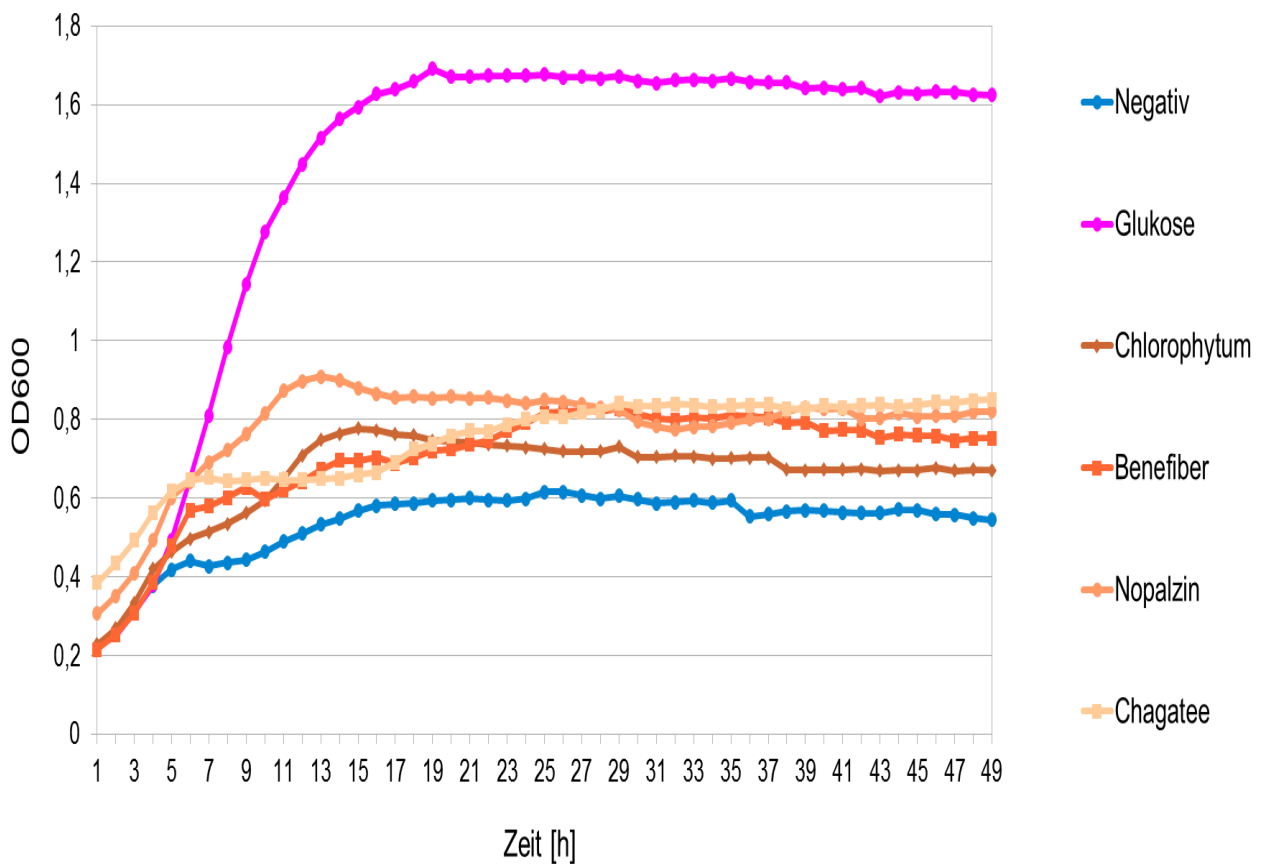


Abb. 15. Wachstumskurven von *Lactobacillus paracasei* 2 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)

Chlorophytum, Benefiber, Nopalzin und Chagatee zeigen schwachen, aber immerhin positiven Einfluss auf das Wachstum der Bakterienkultur. Alle Proben liegen in ihrem Wachstumspotential über der Negativkontrolle.

3.6. *Lactobacillus paracasei* 3

Lactobacillus paracasei 3 (1)

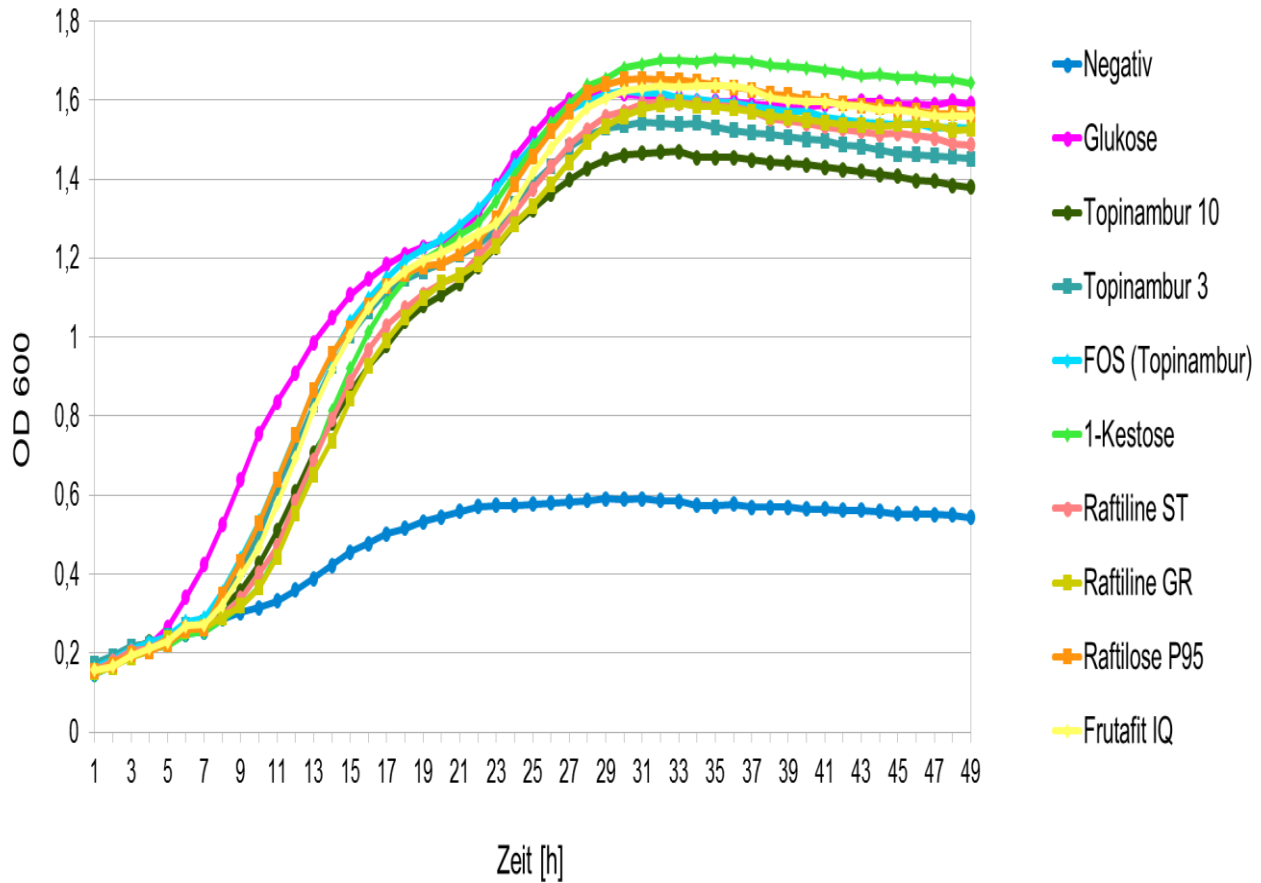


Abb. 16. Wachstumskurven von *Lactobacillus paracasei* 3 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)

Lactobacillus paracasei 3 wächst in allen Zuckerlösungen ähnlich und gleichförmig. 1-Kestose, Glukose, Raftilose P95, Frutafit IQ, Raftiline GR, FOS, Raftiline ST, Topinambur 3 und 10 bewirken schnell hohe OD600-Werte.

Lactobacillus paracasei 3 (2)

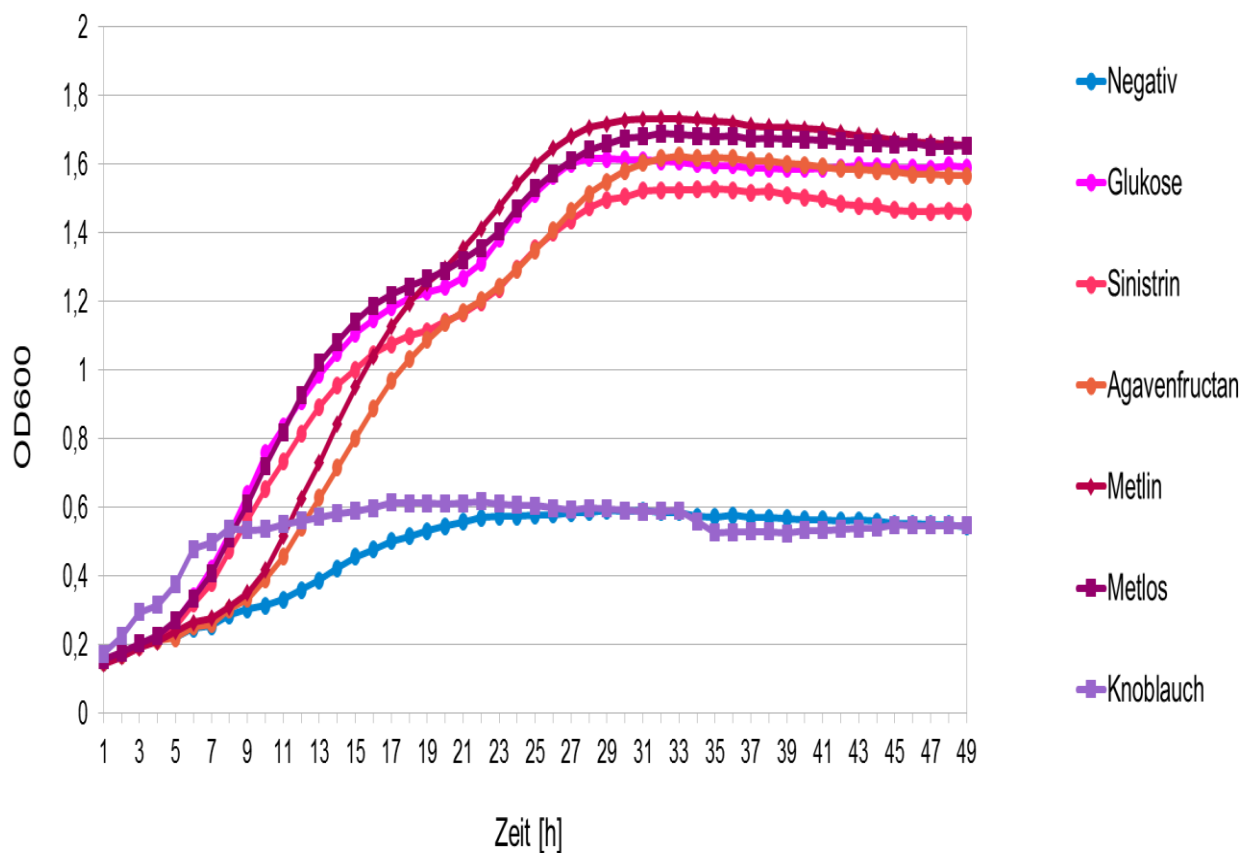


Abb. 17. Wachstumskurven von *Lactobacillus paracasei* 3 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)

Auf Höhe der Glukose ist, mit sehr starker und ähnlicher Wachstumssteigerung, die Kurve von *Lactobacillus paracasei* in Gegenwart von Metlos zu erkennen. Metlin, Agavenfructan und Sinistrin haben einen etwas verzögerten Wachstumsanstieg. Knoblauch lässt die Bakterien zu Beginn ebenfalls gut wachsen, die Wachstumskurve bleibt dann aber auf Höhe der Negativkontrolle.

Lactobacillus paracasei 3 (3)

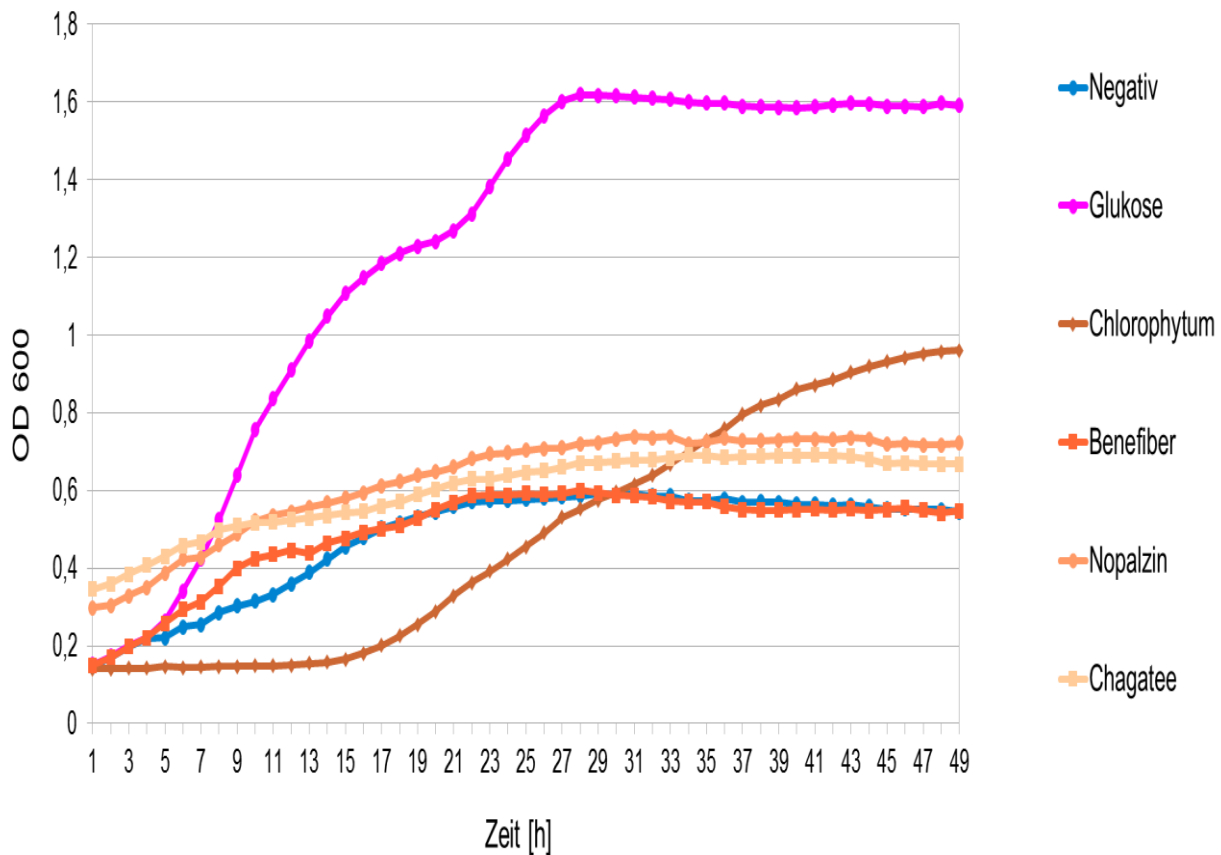


Abb. 18. Wachstumskurven von *Lactobacillus paracasei* 3 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)

Nopalzin und Chagatee bewirken verzögertes, nicht sehr steiles Wachstum, beeinflussen die Zellvermehrung aber ebenfalls positiv. Benefiber bewirkt kaum Wachstum. Unter Zusatz von Chlorophytum wächst das Bakterium zunächst kaum, erst ab Stunde 15 beginnt ein starkes Wachstum.

3.7. *Bifidobacterium animalis*

Bifidobacterium animalis (1)

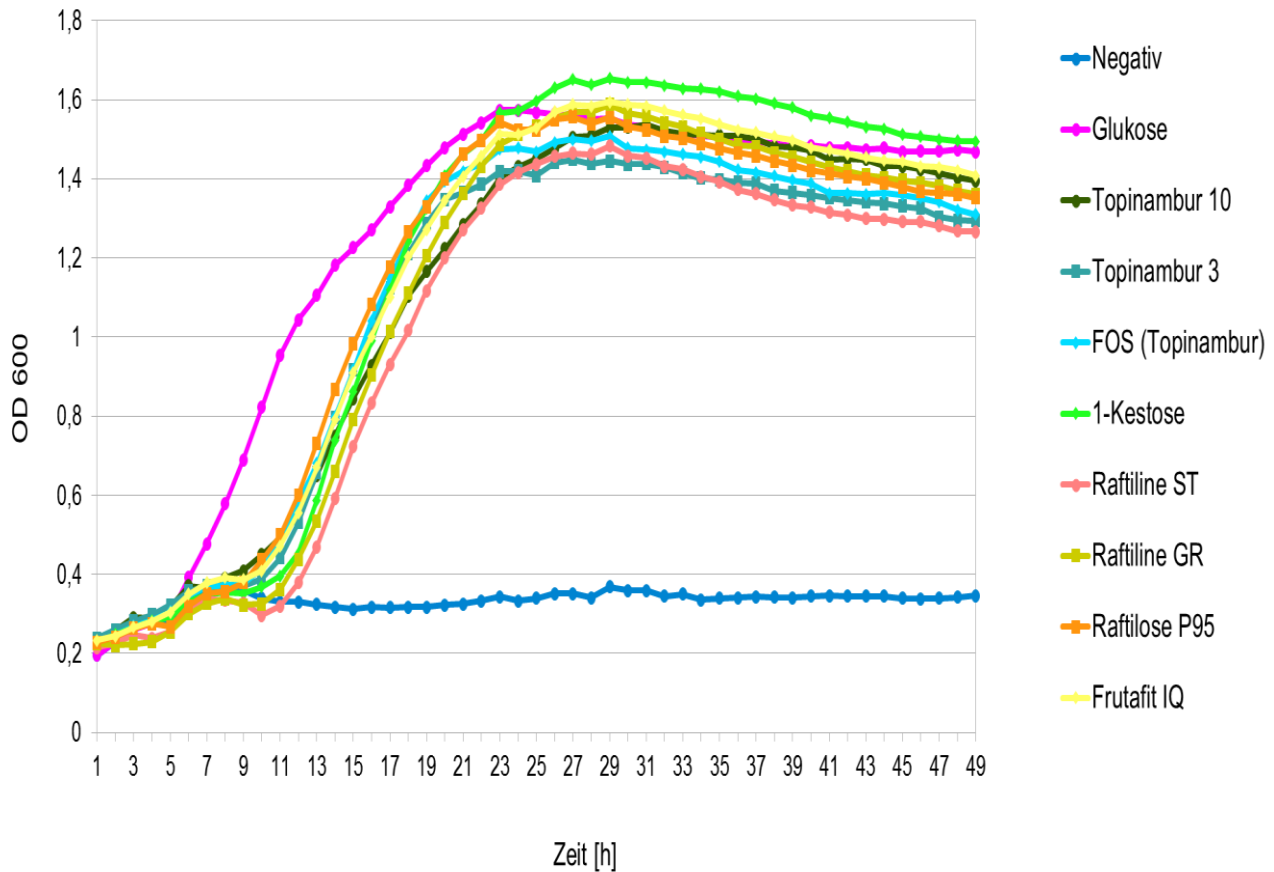


Abb. 19. Wachstumskurven von *Bifidobacterium animalis* unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)

Den frühesten, steilen Wachstumsanstieg zeigt das Bakterium in Glukoselösung. Ebenfalls stark ist die Zellvermehrung in Lösungen von Raftilose P95, Raftiline GR, Frutafit IQ, FOS, Topinambur 10, Topinambur 3 und Raftiline ST.

Bifidobacterium animalis (2)

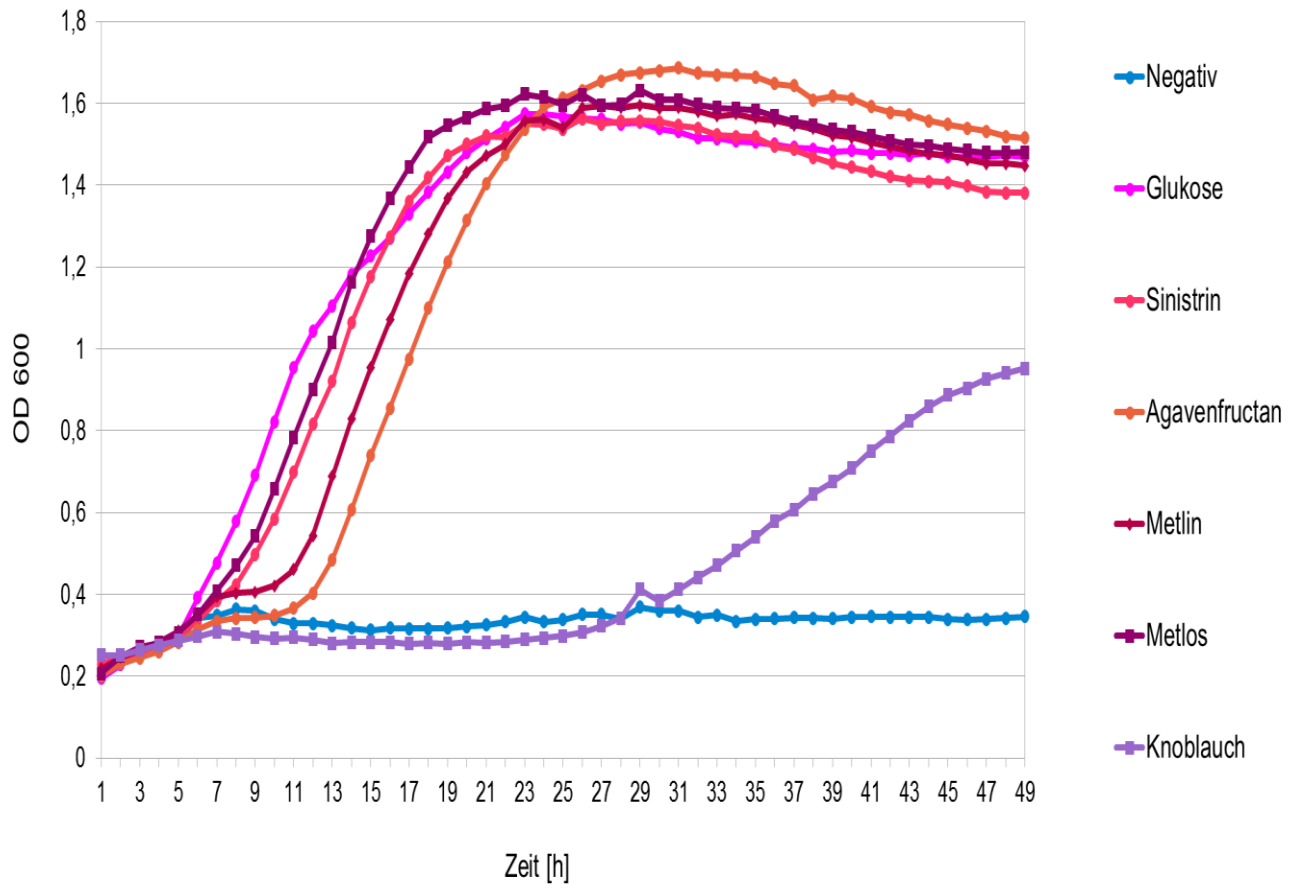


Abb. 20. Wachstumskurven von *Bifidobacterium animalis* unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)

Wie in Abb. 20. ersichtlich ist, ist die Zellvermehrung in Glukose, Metlos und Sinistrin am stärksten. Ebenfalls starkes, wenn auch zeitlich verzögertes Wachstum ist in Agavenfructan- und Metlinlösung gegeben. Knoblauch bewirkt zunächst sehr schwaches Wachstum, das erst ab Stunde 28 stärker wird.

Bifidobacterium animalis (3)

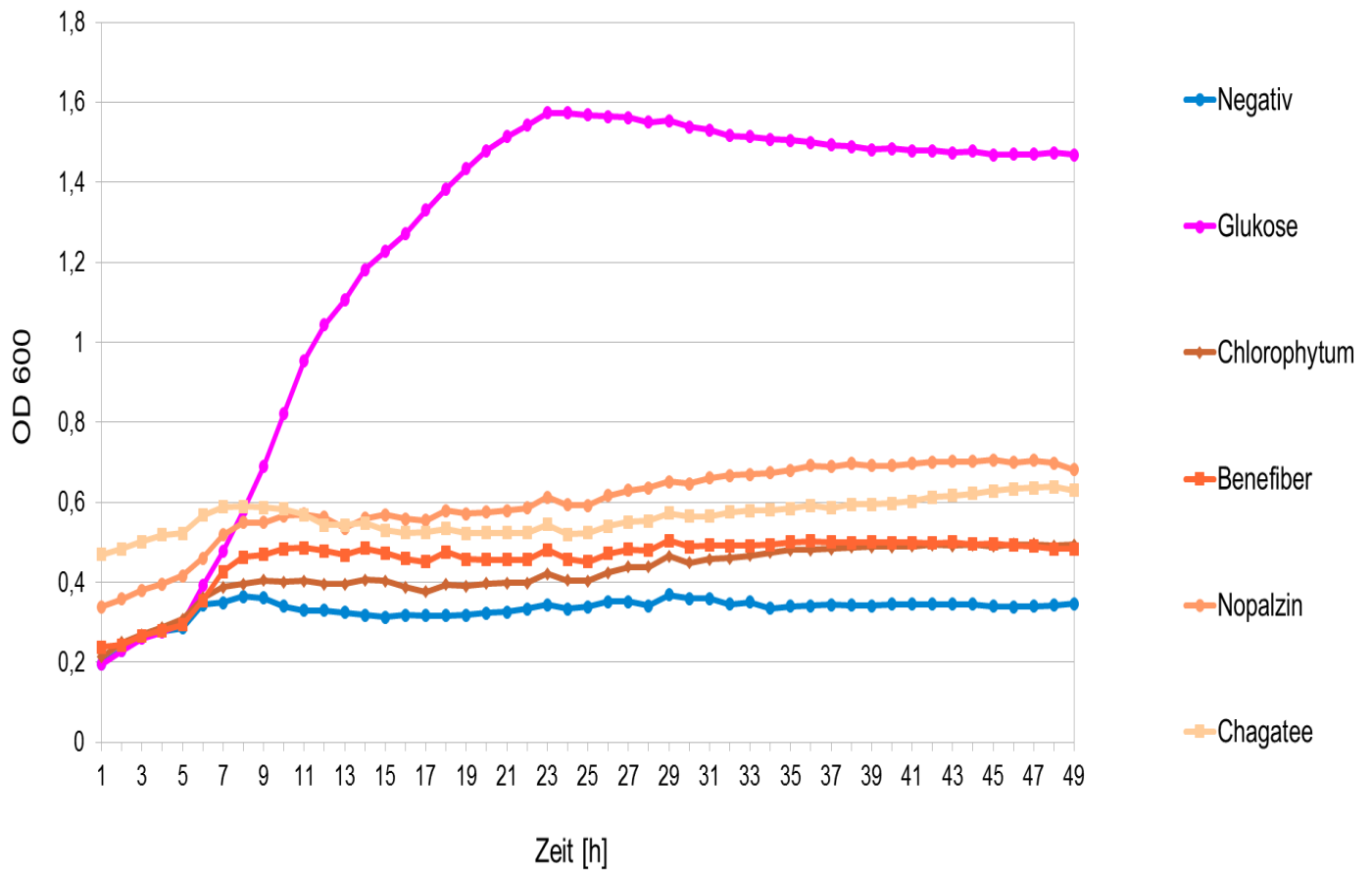


Abb. 21. Wachstumskurven von *Bifidobacterium animalis* unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)

Chagatee, Chlorophytum, Benefiber und Nopalzin zeigen eindeutig einen positiven, wenn auch schwachen Einfluss auf das Wachstum von *Bifidobacterium animalis*.

3.8. Koloniebildende Einheiten (KBE)

Tabelle 4: Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Bestimmung KBE	MRS-	Glukose	Benefiber	Metlos	Raftiline ST	Agavenfructan
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0	$2,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$5,9 \times 10^7$
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	$2,7 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	0	$8,4 \times 10^7$	$8,7 \times 10^7$	$9,1 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$
<i>Lactobacillus paracasei 1</i>	0	$1,4 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$7,6 \times 10^7$
<i>Lactobacillus paracasei 2</i>	0	$2,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$
<i>Lactobacillus paracasei 3</i>	0	$3,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$
<i>Bifidobacterium animalis</i>	0	$3,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$

Im Rahmen der Bestimmung koloniebildender Einheiten, wurde das Wachstum 7 verschiedener Bakterienstämme unter dem Einfluss von 5 ausgewählten Zuckerquellen (Glukose, Benefiber, Metlos, Raftiline ST und Agavenfructan) auf Agarplatten untersucht, zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit MRS⁻-Medium durchgeführt.

Wie in Tabelle 4 ersichtlich, zeigt *Lactobacillus reuteri* die größte Anzahl an Kolonien unter dem Einfluss von Agavenfructan, Metlos und Raftiline ST. Ebenfalls gutes, vergleichbares Wachstum zeigte das Bakterium, wenn Benefiber oder Glukose als Zuckerquelle verwendet werden. Wenn man dieses Ergebnis nun mit der Wachstumskurve von *Lactobacillus reuteri* vergleicht, ist zu bemerken, dass auch hier Agave, Metlos, Glukose und Raftiline ST das Wachstum sehr gut fördern, Benefiber liegt allerdings eher im unteren Bereich der Wachstumsförderung.

Sehr hohe Werte an koloniebildenden Einheiten zeigten sich bei *Lactobacillus acidophilus* bei allen Zuckern, vor allem aber bei Agavenfructan. Unter dem Einfluss von Glukose zeigte der Stamm ebenfalls gute, wenn auch etwas geringere Koloniebildung als Raftiline ST, Benefiber und Metlos. Auch hier ist in den Wachstumskurven der Bioscreenmessung ein ähnliches Wachstumsverhalten zu erkennen.

Bei *Lactobacillus rhamnosus* GG war auf den Agarplatten, ebenso in den Bioscreen C-Messungen, sehr gutes Wachstum durch Glukose, Metlos, Benefiber, Raftiline ST und Agavenfructan zu sehen.

Bei *Lactobacillus paracasei* 1 gab es hohe Koloniezahlen bei Agavenfructan, ebenso bei Metlos, Benefiber, Glukose und Raftiline ST.

Lactobacillus paracasei 2 wurde durch Raftiline ST am stärksten zur Koloniebildung angeregt, ebenfalls sehr wachstumsfördernd wirkten Agavenfructan und Benefiber, aber auch Glukose. In den Wachstumskurven von *Lactobacillus paracasei* 2 zeigt sich eine Bestätigung dieser Messung.

Lactobacillus paracasei 3 zeigte unter dem Einfluss von Raftiline ST die höchste Zahl an koloniebildenden Einheiten, gefolgt von Agave, Metlos, Benefiber und dann Glukose.

Auch auf den Agarplatten von *Bifidobacterium animalis* zeigte sich mit Raftiline ST sehr starkes Wachstum, das Wachstum durch Metlos, Benefiber, Agavenfructan und Glukose ist ebenfalls gut. Ein ähnliches Bild vom Wachstum zeigt sich auch in den Wachstumskurven von *Bifidobacterium animalis*.

3.9. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie von Fruktanen, die im Bioscreen untersucht worden waren, wurde zur Bestimmung deren Zusammensetzung durchgeführt.

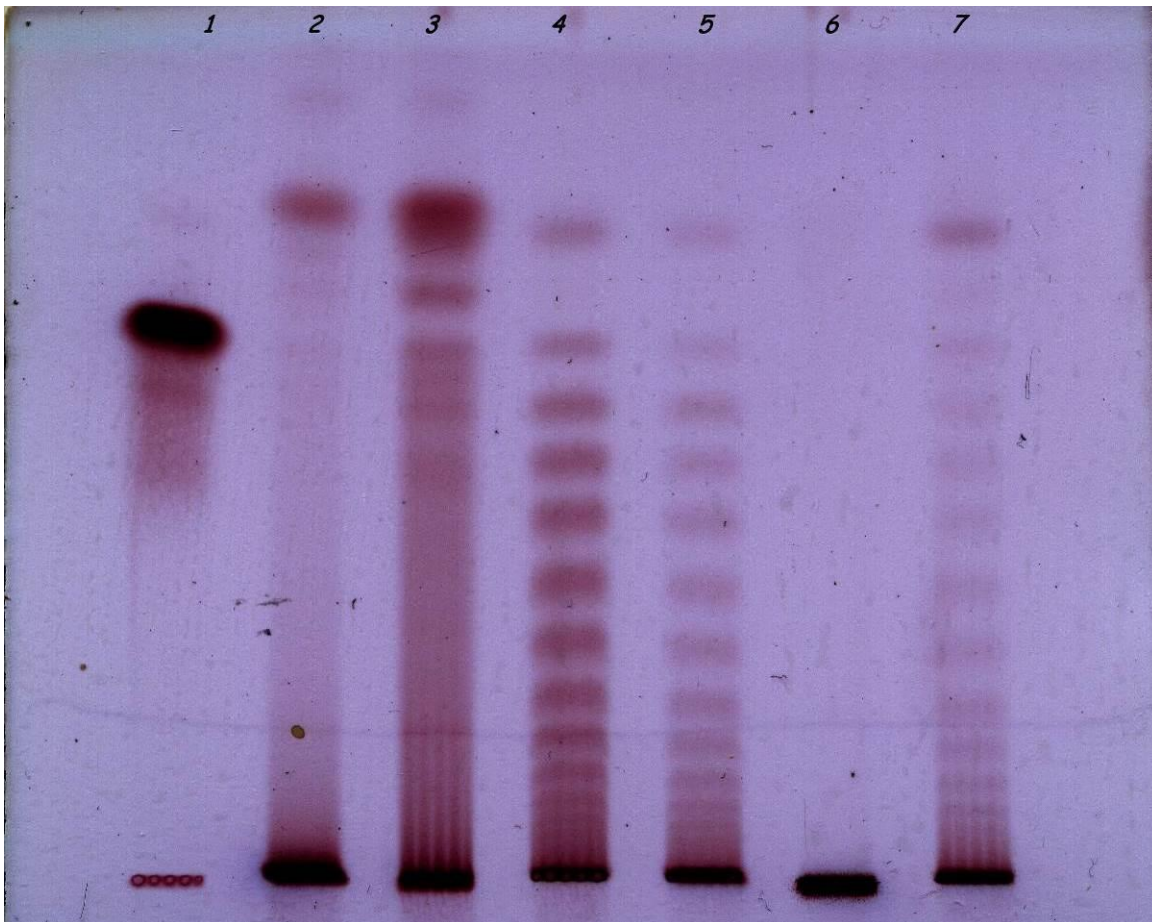


Abb. 22. Dünnschichtchromatographie ausgewählter Saccharide: 1=1-Kestose, 2=Sinistrin, 3=Metlos, 4=Topinambur 3, 5=Topinambur 10, 6=Knoblauch, 7=Chlorophytum

1-Kestose wurde als Kontrolle aufgetragen. Es handelt sich dabei um eine Triose, die kleinste Einheit der Inulinreihe, bei der ein Fruktosylrest über eine β -2-1-Verknüpfung an der Fruktoseseite der Saccharose, die aus Glukose und Fruktose besteht, gebunden ist. Da zuviel Menge der Probe aufgetragen wurde, ist die Bande im Vergleich zu den 1-Kestose Banden von Topinambur 3, Topinambur 10 und Chlorophytum zu intensiv und zu hoch. Topinambur und Chlorophytum zeigen die Banden der Inulinreihe (β -2-1 verknüpfte Fruktoseeinheiten mit einer endständigen Glukoseeinheit pro Molekül).

Sinistrin, Metlos (niedermolekulares technisches Produkt aus Agavenfructan) und Knoblauch zeigen Neostruktur (eine mittelständige Glukoseeinheit pro Molekül) mit Verzweigungen (β -2-6 verknüpfte Fruktoseeinheiten in der Verzweigung); diese Polymere weisen β -2-1- und β -2-6 Verknüpfungen auf und sind daher komplex aufgebaut (Mischtyp).

Sinistrin ist ein ziemlich hochpolymeres Fruktan (intensive Grundlinie) und zeigt 3-4 schwache Banden und eine etwas intensivere oberste Bande (Fruktose).

Metlos ist eine Mischung von Oligomeren, die aus der mexikanischen Agave (*Agave tequilana* Weber) gewonnen wurden; dieses Fruktan läßt etwa 7 obere Banden erkennen, wobei die erste und zweite Bande fast zusammenfallen (Fruktose, Saccharose); die dritte Bande zeigt Neokestose, die vierte Bande 1-Kestose; weitere Banden stehen für Oligomere mit dem Polymerisationsgrad (DP) 4, 5 und 6.

Bei Knoblauch ist aufgrund der hochpolymeren Struktur nur der intensive Startpunkt zu sehen.

Topinambur 3 und 10 unterscheiden sich aufgrund des Zeitpunktes ihrer Ernte. Topinambur 3 wurde im März, Topinambur 10 im Oktober geerntet, was sich auf den DP der Fruktanmoleküle in der Knolle auswirkt, Topinambur 10 hat aufgrund des vorangegangenen Sommers (Sonneneinstrahlung) einen hohen Gehalt an höheren Polymeren, während Topinambur 3 über den Winter die höheren Polymere vermehrt zu Oligomeren abbaut und daher ein höherer Gehalt an niederen Polymeren vorhanden ist. Beide Topinamburproben zeigen eine homologe Reihe von 11-13 Banden, wobei die Banden von Topinambur 3 intensiver sind (höherer Anteil an Oligomeren) mit Saccharose als oberste Bande, 1-Kestose als zweite Bande; weitere Banden stehen für DP 4-13,14,... dieser Inulinreihe.

Eine ebenfalls homologe Bandenreihe wie für die Inulinreihen von Topinambur 3 und 10 zeigt sich auch bei *Chlorophytum* (Grünlilie); hier dürften auch Neostrukturen enthalten sein, wie die zweite Bande von oben, die für Neokestose steht, zeigt.

4. Diskussion

Mit dem Bioscreen C-Messgerät wurden Wachstumskurven von 7 verschiedenen Bakterienstämmen ermittelt. Mit zunehmender Zellzahl nimmt auch die Trübung der Bakteriensuspension zu, wodurch Rückschlüsse auf das Zellwachstum gezogen werden können.

Durch Vergleich der Wachstumskurven konnte ein unterschiedliches Wachstumsverhalten unter dem Einfluss ausgewählter Zuckerlösungen festgestellt werden. Glukose und Metlos (niedermolekularer als Metlin) bewirken die größte Wachstumssteigerung bei allen Bakterienstämmen. Metlin (höhermolekularer als Metlos) zeigt auch starke Wachstumssteigerung, aber etwas zeitverzögert zu Metlos und Glukose. Metlos und Metlin sind Mixtypen der Fruktane aus Agave und zeigen sowohl β -2-1-, als auch β -2-6-Verknüpfung in der Struktur. Ebenso lässt Agavenfructan bei allen Bakterienstämmen die Wachstumskurven überdurchschnittlich gut ansteigen. Raftiline GR und ST lassen die Kurven ebenso ansteigen, wie Raftilose P95. Raftiline ST, GR und Raftilose P95 stammen aus der Wegwarte und sind β -2-1-verknüpfte Fruktane. In diesem Fall bewirkt wieder die niedermolekularere Raftilose einen schnelleren Anstieg als die Raftilineproben, die höhermolekular sind. Auch die 1-Kestose, bestehend aus einem Fruktosylrest, der über eine β -2-1-Bindung mit dem Fruktosylrest der Saccharose verknüpft ist, und Frutafit IQ aus der Wegwarte, ebenfalls ein β -2-1-verknüpftes Fruktan, fördern das Wachstum aller Bakterienstämme in außergewöhnlich gutem Maße.

Unterschiedlich starken, aber ebenfalls nennenswerten Einfluss auf das Keimwachstum, zeigen Sinistrin aus der Meerzwiebel, Topinambur 3 und 10 und FOS (aus Topinambur). Topinambur 3 und 10 haben unterschiedliche Erntezeitpunkte und daher auch unterschiedliche Zuckerkomponenten. Während Topinambur 3 im März geerntet wurde und einen höheren Oligomergehalt (niedere Polymere) hat, wurde Topinambur 10 im Oktober geerntet und enthält (bedingt durch die vermehrte Sonneneinstrahlung im vorangegangenen Sommer) mehr höhere Polymere. In den Wachstumskurven war zu erkennen, dass Topinambur 3 aufgrund seiner niederen Polymere schneller verwertet werden konnte, als Topinambur 10 mit seinem erhöhten Gehalt höherer Polymere.

Die Proben Knoblauch (hochpolymer), Chagatee (vorwiegend β -Glukan), Nopalzin (Heteropolysaccharid), Chlorophytum (β -2-1-verknüpftes Fruktan) und Benefiber (Heteropolysaccharid) haben in diesen Versuchen zwar ebenfalls das Wachstum der Bakterienstämme signifikant angeregt, allerdings im Vergleich zu den anderen Zuckerlösungen in geringerem

Ausmaß.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Vermehrung der Zellzahl während der Messung stattgefunden hat, allerdings könnten auch andere Gründe zu einer Trübung geführt haben, wie beispielsweise chemische Prozesse in der Suspension, verringerte Löslichkeit der Saccharide, was zum Ausfallen führt oder Abbauprodukte, die bei der Zuckerverwertung durch die Bakterien entstanden sind.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich zur Bioscreenmessung eine Ermittlung der Bakterienzahl mittels Keimzahlbestimmung durchgeführt. Weiters sind die getesteten Stämme anaerobe Milchsäurebakterien, die zwar unter aeroben Bedingungen gutes Wachstum gezeigt haben, jedoch haben sie unter anaeroben Bedingungen höhere Vermehrungsraten. Daher ist es nötig, das Wachstum sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen zu untersuchen, wie es bei der Bestimmung der Keimzahl getan wurde.

Bei der Keimzahlbestimmung auf Agarplatten zeigten alle getesteten Zuckerlösungen einen positiven Einfluss auf das Wachstum der Bakterienstämme unter anaeroben Bedingungen.

Im Rahmen von dünnschichtchromatographischen Untersuchungen unter Einsatz von 1-Kestose, Sinistrin, Metlos, Topinambur 3 und 10, Knoblauch und Chlorophytum wurden die jeweils erwarteten Banden der Inulinreihe und der Mixtypfruktanen sichtbar und einige Oligomere konnten identifiziert werden. Durch die Dünnschichtchromatographie konnte man sehen, dass Knoblauch hochpolymer ist, weshalb es eine verminderte Löslichkeit aufweist und von den Bakterienkulturen während der Bioscreenmessung nicht so gut verwertet werden konnte, wie die Fruktane der Inulinreihe und die Mixtypfruktane. Ebenso konnte man durch die Dünnschichtchromatographie sehen, dass Topinambur 3 und 10 einen unterschiedlichen Gehalt an niederen und höheren Polymeren besitzen und dadurch von den Bakterien in der Bioscreenmessung unterschiedlich verwertet wurden. Topinambur 3 zeigte hierbei aufgrund seines hohen Gehalt an niederen Polymeren einen schnelleren Anstieg im Keimwachstum, als Topinambur 10.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde das Wachstum von *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus*, drei verschiedenen Stämmen von *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus reuteri* und *Bifidobacterium animalis* unter dem Einfluss verschiedener Oligo- oder Polysaccharide, wie Topinambur 3 und 10, FOS (aus Topinambur), 1-Kestose, Sinistrin, Metlin, Metlos, Knoblauch, Agavenfructan, Frutafit IQ, Raftiline ST und GR, Raftilose P95, Benefiber, Chagatee, Nopalzin, Chlorophytum sowie Glukose in mehreren Messvorgängen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem Lösungen von Agave, Metlin, Metlos, 1-Kestose, Raftilose P95, Raftiline ST und GR, Frutafit IQ, FOS, Topinambur 3 und 10 das Wachstum besonders positiv beeinflussen, während Lösungen von Benefiber, Nopalzin, Chlorophytum, Chagatee und Knoblauch gutes, aber im Vergleich zu den anderen Zuckerlösungen schwächeres, Wachstum bewirken.

Für die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten wurden Agarplatten mit Glukose, Raftiline ST, Benefiber, Metlos und Agavenfructan verwendet und in allen Zuckermedien zeigte sich nach Beimpfen und Bebrüten unter anaeroben Bedingungen ein signifikant gutes Wachstum für alle Bakterienstämme.

Zur Identifizierung der Zuckerzusammensetzung wurde abschließend noch eine dünnschichtchromatographische Untersuchung mit 1-Kestose, Sinistrin, Metlos, Topinambur 3 und 10, Knoblauch und Chlorophytum durchgeführt. Es konnten alle erwarteten Inhaltstoffe detektiert und somit die Zusammensetzung der Zucker bestätigt werden.

Der nächste Schritt, um genauere Aussagen über den Einfluss der Saccharide auf das Wachstum der Bakterienstämme zu erzielen, könnte sein, dass weitere Keimzahlbestimmungen mit allen Zuckern und eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Bestimmung des Polymerisierungsgrades durchgeführt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Pfannhauser W. Consensus Document „Scientific Concepts of Functional Food in Europe“, Vortrag “Funktionelle Lebensmittel” im Rahmen der 8. Sommerakademie für Apotheker Pörschach, 24.-26.6.2005
- [2] <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/hokenkinou/hyouziseido-1.html>
- [3] European Food Information Council, Funktionelle Lebensmittel, die Grundlagen 2006
- [4] Groeneveld M. Ernährungsbericht 2004, Else Kröner-Fresenius-Zentrum für Ernährungsmedizin, Klinikum rechts der Isar der TU München, Ismaninger Str. 22, 81675 München
- [5] Österreichische Apothekerkammer, Nützen Probiotika dem Darm wirklich?
http://www.apotheker.or.at/Internet/OEAK/NewsPresse_1_0_0a.nsf/webPages/095DBA87CA4ED8DFC12573B40047C7D8!OpenDocument (abgerufen am 17.9.2014)
- [6] Unger F.M. Die Bedeutung von Pro- und Präbiotika in der Ernährung. Journal für Ernährungsmedizin 1999, 1(1): 22-29
- [7] Klikovits A. Polysaccharide und Oligosaccharide als Kohlenstoffquelle für Milchsäurebakterien, Diplomarbeit 2013
- [8] Pschyrembel W. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2002, 259: 204-920
- [9] Cimperman L., Bayless G., Best K., Diligente A., Mordarski B., Oster M., Smith M., Vatakis F., Wiese D., Steiber A., Katz J. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in hospitalized adults. Journal of Clinical Gastroenterology 2011, 45(9): 785-9
- [10] Juarez G., Villena J., Salva S., Font de Valdez G., Rodriguez A. *Lactobacillus reuteri* CRL1101 beneficially modulate lipopolysaccharide-mediated inflammatory response in a mouse model of endotoxic shock. Journal of Functional Foods 2013, 5(4): 1761-1773
- [11] Szajewska H., Gyrzduk E., Horvath A. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the management of infantile colic in breastfed Infants: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The Journal of Pediatrics 2013, 162(2): 257-262
- [12] Emara M., Mohamed S., Abdel-Aziz H. *Lactobacillus reuteri* in management of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. Therapeutic Advances in Gastroenterology 2014, 7(1): 4-13
- [13] Vujic G., Jajac A., Despot V., Kuzmic V. Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology 2013, 168(1): 75-9

- [14] Klänhammer T., Russell W. *Lactobacillus acidophilus*. Encyclopedia of Food Microbiology (second edition) 2014, 2: 412-417
- [15] Garaiova I., Muchova J., Nagyova Z., Wang D., Li J., Orszaghova Z., Plummer S., Durackova Z. Probiotics and vitamin C for the prevention of respiratory tract infections in children attending preschool: a randomised, controlled pilot study. European Journal of Clinical Nutrition 2014, in press
- [16] Mohamadshahi M., Veissi M., Haidari F., Javid A., Mohammadi F. Effects of probiotic yogurt consumption on lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized, controlled clinical trial. International Journal of Research in Medical Science 2014, 19(6): 531-6
- [17] Yun B., Oh S. *Lactobacillus acidophilus* modulates the virulence of *Clostridium difficile*. Journal of Dairy Science 2014, 97(8):4745-58
- [18] Gorbach S., Goldin B. *Lactobacillus* strains and methods of selection. US Patent (US4839281 A), 1989
- [19] Harty D., Oakey H., Patriakis M., Hume E., Knox K. Pathogenic potential of lactobacilli. International Journal of Food Microbiology 1994, 24(1-2): 179-89
- [20] Segers M., Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. Microbial Cell Factories 2014,1(7), in press
- [21] Foolad N., Armstrong A. Prebiotics and probiotics: the prevention and reduction in severity of atopickermatitis in children. Beneficial Microbes 2014, 5(2):151-60
- [22] Chuang L., Ou-Yang L., Lin S. Probiotic *Lactobacillus paracasei* effect on cariogenic bacterial flora. Clinical Oral Investigations 2011, 15(4): 471-6
- [23] Allen S., Jordan S., Storey M., Thornton C., Gravenor M., Garaiova I., Plummer S. Probiotics in the prevention of eczema: a randomized, controlled trial. Archive of Disease in Childhood 2014, in press
- [24] Tsai Y., Cheng P., Fan C., Pan T. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. International Journal of Food Micro-biology 2008,128(2): 219-225
- [25] Caridi A. Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2002, 29(6): 303-308
- [26] Aleljung P., Fonden R., Svensson U., Wadstroem T., Strain of bacteria of the species *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, composition thereof for use in food and product containing said strain. EP Patent (EP1036160B1), 1999

[27] Aronsson L., Huang Y., Parini P., Korach-André M., Hakansson J., Gustafson J., Petterson S., Arulampalam V., Rafter J. Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). Plos One 2010, 5(9):13087

[28] Toiviainen A., Jalasvuori H., Lahti E. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. Clinical Oral Investigation 2014, in press

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus reuteri</i> unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)	Seite 19
Abbildung 2	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus reuteri</i> unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)	Seite 20
Abbildung 3	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus reuteri</i> unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)	Seite 21
Abbildung 4	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus acidophilus</i> unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)	Seite 22
Abbildung 5	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus acidophilus</i> unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)	Seite 23
Abbildung 6	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus acidophilus</i> unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)	Seite 24
Abbildung 7	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)	Seite 25
Abbildung 8	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)	Seite 26

Abbildung 9	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)	Seite 27
Abbildung 10	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus paracasei</i> 1 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)	Seite 28
Abbildung 11	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus paracasei</i> 1 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)	Seite 29
Abbildung 12	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus paracasei</i> 1 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)	Seite 30
Abbildung 13	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus paracasei</i> 2 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)	Seite 31
Abbildung 14	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus paracasei</i> 2 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)	Seite 32
Abbildung 15	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus paracasei</i> 2 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)	Seite 33
Abbildung 16	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus paracasei</i> 3 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)	Seite 34
Abbildung 17	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus paracasei</i> 3 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)	Seite 35

Abbildung 18	Wachstumskurven von <i>Lactobacillus paracasei</i> 3 unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)	Seite 36
Abbildung 19	Wachstumskurven von <i>Bifidobacterium animalis</i> unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Inulintyp im Vergleich zu Glukose (1)	Seite 37
Abbildung 20	Wachstumskurven von <i>Bifidobacterium animalis</i> unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide vom Mischtyp im Vergleich zu Glukose (2)	Seite 38
Abbildung 21	Wachstumskurven von <i>Bifidobacterium animalis</i> unter dem Einfluss ausgewählter Oligo- und Polysaccharide im Vergleich zu Glukose (3)	Seite 39
Abbildung 22	Dünnschichtchromatographie ausgewählter Saccharide	Seite 42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Bestandteile des MRS-Mediums	Seite 11
Tabelle 2	Bestandteile des MRS-Agar-Mediums	Seite 13
Tabelle 3	Liste der im Rahmen der Diplomarbeit verwendeten Oligo- und Polysaccharide	Seite 14
Tabelle 4	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten	Seite 40

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marielouise Stutzig

geboren am: 3.9.1983

Staatsbürgerschaft: Österreich

Eltern: Franz Stutzig

Luise Stutzig

Schulische Ausbildung

Kindergarten „Alt Wien“, 1140 Wien : 1985-1989

Volksschule Reichsapfelgasse, 1150 Wien : 1989-1994

Gymnasium Diefenbachgasse, 1150 Wien : 1994-2002

Beginn des Studiums : 2002

Diplomarbeit : März-September 2014

Außerordentliche Tätigkeit neben dem Studium

Ferialjob „Apotheke zum Lindwurm“, 1150 Wien : August 2005 und 2006

Geringfügige Beschäftigung „Apotheke zur heiligen Corona“, 1150 Wien : 2007-2015