

| | |
|---------------------------------------|---|
| Zuwendungsempfänger | Technische Universität Braunschweig Institut für Biochemie und Biotechnologie Abteilung Biotechnologie |
| Forschungsprojekt Nr. Thema | 05HS010 Herstellung und Einsatz von oligomeren Beta-Glucanen als Alternative für Antibiotika in der Tierernährung |
| Laufzeit Berichtszeitraum | 01.01.2006 – 31.07.2008 01.01.2006 – 31.07.2008 |
| Zusammenarbeit mit anderen Stellen | Prof. Dr. Gerhard Breves Physiologisches Institut Tierärztliche Hochschule Hannover Prof. Dr. Gerhard Flachowsky Dr. Doris Förster Dr. Andreas Berk Friedrich-Loeffler-Institut Institut für Tierernährung, Braunschweig Prof. Dr. Hermann-Josef Rothkötter Dr. Diane Bimczok Institut für Anatomie Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg Dr. Victor Wray Helmholz Zentrum für Infektionsforschung Abtlg. Strukturbiologie, Braunschweig Dr. Wolfgang Wach Südzucker AG Mannheim/Ochsenfurt Zentralabteilung Forschung, Entwicklung und Services |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts | 4 |
| 1.1. Wissenschaftliche und technische Arbeitsziele | 4 |
| 1.2. Planung und Ablauf des Projekts..... | 5 |
| 1.2.1. Mikrobielle Produktion der Beta-Glucane im 300 L Reaktor inkl. Aufarbeitung | 5 |
| 1.2.2. Test verschiedener Hydrolyseverfahren im kleinen Maßstab | 6 |
| 1.2.3. Isolierung einzelner Molekulargewichtsfractionen im kleinen Maßstab für Zelluntersuchungen | 6 |
| 1.2.4. Physikochemische Untersuchungen der Beta-Glucane, die im kleinen als auch großen Maßstab hydrolysiert wurden..... | 7 |
| 1.2.5. Zell- und Blutuntersuchungen zur Immunstimulanz | 7 |
| 1.2.6. Durchführung von Hydrolysen im kg-Maßstab..... | 8 |
| 1.2.7. Reinigung, Isolierung und Trocknung einzelner Molekulargewichtsfractionen im kg Maßstab für Tierversuche | 8 |
| 1.2.8. Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Verwertung degradierter Beta-Glucane im Tierversuch..... | 9 |
| 1.2.9. Optimierung des Hydrolyseverfahrens zur Produktion von Beta-Glucanen mit einer bestimmten, engen Molekulargewichtsverteilung..... | 9 |
| 1.3. Wissenschaftliche und technische Stand..... | 9 |
| 1.3.1. Stand der Wissenschaft und Forschung/Bisherige Arbeiten des Auftragnehmers | 9 |
| 2. Material und Methoden | 13 |
| 2.1. Produktion des β -Glucans..... | 13 |
| 2.2. Trocknungsmethoden | 13 |
| 2.3. Hydrolyse | 14 |
| 2.3.1. Enzymatische Hydrolyse | 15 |
| 2.3.2. Darminhalt | 18 |
| 2.3.3. Cositec-Puffer..... | 18 |
| 2.3.4. Pansen-Puffer..... | 19 |
| 2.3.5. Batch-Versuch mit Darminhalt..... | 20 |
| 2.3.6. Erste Reaktorhydrolyse von Scleroglucan | 21 |
| 2.3.7. Zweite Reaktorhydrolyse mit Scleroglucan | 21 |
| 2.4. Analytik..... | 22 |
| 2.4.1. Gelpermeationschromatographie (GPC)..... | 22 |
| 2.4.2. Bestimmung reduzierender Enden von Zuckern..... | 23 |
| 2.4.3. Viskositätsmessung..... | 24 |
| 2.5. Fluoreszenzmarkierung von Scleroglucan..... | 24 |
| 2.6. Aktivierung von Dendritischen Zellen..... | 25 |
| 2.7. ELISA | 26 |
| 2.7.1. ELISA zur Bestimmung von Zytokinen..... | 26 |
| 2.7.2. ELISA zur Bestimmung von Immunglobulinen im Blutplasma..... | 27 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.8. | Fütterungsversuche | 28 |
| 2.9. | Ussing-Kammer Darmtransport | 29 |
| 2.9.1. | Aufbau der Ussing-Kammer | 29 |
| 2.9.2. | Gewebepräparation und Ablauf des Versuches..... | 30 |
| 2.9.3. | Elektrolytlösungen | 30 |
| 3. | Ergebnisse..... | 31 |
| 3.1. | Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse..... | 31 |
| 3.1.1. | Optimierung der Hydrolyse mit AS 100, Charge 2006..... | 31 |
| 3.1.2. | Erste Reaktorhydrolyse des Scleroglucans mit AS 100..... | 33 |
| 3.1.3. | Zweite Reaktorhydrolyse..... | 36 |
| 3.1.4. | Optimierung der Hydrolyse mit AS 100, Charge 2008..... | 41 |
| 3.1.5. | Hydrolyse mit der β -1,3-D-Glucanase aus <i>Helix pomatia</i> und der Glucanase aus <i>Bacillus subtilis</i> | 43 |
| 3.1.6. | Hydrolyse mit der Laminarinase aus <i>Trichoderma species</i> | 44 |
| 3.1.7. | Inkubation von Scleroglucan mit dem Darminhalt verschiedener Spezies | 45 |
| 3.1.8. | Pferdedarminhalt | 46 |
| 3.1.9. | Schweinedarminhalt | 48 |
| 3.1.10. | Panseninhalt vom Rind | 50 |
| 3.2. | Ussing-Kammer | 51 |
| 3.3. | Aktivierung von Dendritischen Zellen..... | 52 |
| 3.4. | Zytokin-Spiegel bei Aktivierung von Dendritischen Zellen durch Scleroglucan..... | 55 |
| 3.5. | Immunglobuline im Plasma | 56 |
| 3.6. | Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse..... | 58 |
| 4. | Zusammenfassung..... | 59 |
| 5. | Gegenüberstellung der ursprünglichen geplanten zu den tatsächlichen erreichten Zielen..... | 60 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 62 |

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben über die immunstimulierende Wirkung von Beta-Glucanen in der Tierzucht. Daher werden Beta-Glucane auf ihre Eignung als Alternative für Antibiotika in der Tierernährung getestet. Die Faktoren Molekulargewicht und -verteilung, Verzweigungsgrad, Überstruktur und Begleitkomponenten wie z.B. Protein beeinflussen die Aktivität. Aus diesem Grund werden die Beta-Glucane mittels verschiedener Hydrolyseverfahren degradiert, einzelne Molekulargewichtsfractionen durch Querstromfiltration isoliert und physikochemisch charakterisiert. Zunächst wird in Zellkultur die immunstimulierende Wirkung der verschiedenen Molekulargewichtsfractionen untersucht. Das effektivste Hydrolyseverfahren ist zu optimieren, um ausreichende Mengen für Fütterungsversuche zur Verfügung stellen zu können. Eine ernährungsphysiologische Bewertung der Beta-Glucane und eine wirtschaftliche Betrachtung des Herstellungsverfahrens werden vorgenommen. Es wird eine Prognose zum potentiellen Markt immunstimulierender Stoffe sowie zu Preisen derzeit eingesetzter Produkte aufgestellt.

1.1. *Wissenschaftliche und technische Arbeitsziele*

- Mikrobielle Produktion der Beta-Glucane im 300 L Reaktor inkl. Aufarbeitung
- Test verschiedener Hydrolyseverfahren im kleinen Maßstab
- Isolierung einzelner Molekulargewichtsfractionen im kleinen Maßstab für Zelluntersuchungen
- Physikochemische Untersuchungen der Beta-Glucane, die im kleinen als auch großen Maßstab hydrolysiert wurden.
- Zell- und Blutuntersuchungen zur Immunstimulanz
- Durchführung von Hydrolysen im kg-Maßstab
- Reinigung, Isolierung und Trocknung einzelner Molekulargewichtsfractionen im kg Maßstab für Tierversuche
- Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Verwertung degradierteter Beta-Glucane

- Optimierung des Hydrolyseverfahrens zur Produktion von Beta-Glucanen mit einer bestimmten, engen Molekulargewichtsverteilung
- Überprüfung der Wirtschaftlichkeit des optimierten Hydrolyseverfahrens

1.2. Planung und Ablauf des Projekts

1.2.1. Mikrobielle Produktion der Beta-Glucane im 300 L Reaktor inkl. Aufarbeitung

Im Zeitplan sind insgesamt sieben 300 L Kultivierungen vorgesehen. Für einen Fütterungsversuch mit 80 Ferkeln werden voraussichtlich im Durchschnitt 0,2 g Beta-Glucan/kg Futter benötigt. Ein Ferkel frisst in den 42 Versuchstagen ca. 37 kg Futter. Ergibt einen Bedarf von ca. 592 g pro Versuchsreihe. Ein 300 L Bioreaktorlauf mit ca. 5 g/l minimaler Ausbeute ergibt 1500 g Beta-Glucan, die nach Aufarbeitungsverlusten auf ca. 1 kg Reinprodukt reduziert werden. Nach der Hydrolyse werden weitere Verluste auftreten, so dass insgesamt 7 Bioreaktorkultivierungen zur Herstellung von Beta-Glucanen für die Tierversuche ausreichen sollten. Die Produktion im Bioreaktor erfordert ca. 1 Woche. Für die Zellabtrennung, Reinigung und Konzentrierung mittels Querstromfiltration sind ca. 3 Wochen anzusetzen. Die Sprühtrocknung kann nur in kleinen Chargen erfolgen, so dass dafür 4 Wochen zu berücksichtigen sind. Die Trocknung ist auch gleichzeitig Infektionsschutz, da wässrige Beta-Glucan Lösungen zum Schutz vor mikrobiellem Bewuchs mit Bakterioziden/Fungiziden stabilisiert werden müssen. Diese Substanzen können die Fütterungsversuche beeinflussen. Eine weitere Möglichkeit wässrige Beta-Glucanlösungen für einen längeren Zeitraum zu stabilisieren, ist die Sterilisation bei 121°C und 1 bar Überdruck. Dieses Verfahren wird verwendet, um den Einsatz von Flüssigprodukten (Sprühen auf ca. 70°C warme Futterpellets) im Fütterungsversuch zu testen.

1.2.2. Test verschiedener Hydrolyseverfahren im kleinen Maßstab

Getestet werden:

- a) Die protonogene Oberflächenhydrolyse in/mit Borsilikatgläsern als Katalysator. Eine Optimierung des Verfahrens hinsichtlich Zeit, pH, Temperatur, Konzentration der β -Glucane muss vorgenommen werden.
- b) Abbau durch Glucanasen. Enzyme mit verschiedenen β -Glucanase Aktivitäten sollen getestet werden. Der Einsatz von besonders preisgünstigen, ggf. auch Rohenzymen, wird überprüft, um einen wirtschaftlichen Prozess gestalten zu können.
- c) Der zusätzliche Einsatz von Proteasen soll im Vergleich zeigen, ob der assoziierte Proteinanteil einen Einfluss auf die Immunstimulanz besitzt.
- d) Nach Verbrauch der Kohlenstoffquelle scheiden die Pilze selbst Glucanasen aus, die das gebildete Glucan degradieren, um es als Substrat zu nutzen. Das Ausmaß dieser Art von Hydrolyse ist noch nicht untersucht worden. Es ist zu klären, ob diese "Autohydrolyse" für den Abbauprozess genutzt werden kann.
- e) Abbau durch Ultraschall. Dieser Abbauprodukte sollen auch als Referenz zu schon publizierten Daten dienen.

Die Hydrolyse wird überprüft durch Viskositätsmessungen und Freisetzung von Glucose bzw. reduzierender Enden. Durch die Verwendung von Congo-Rot kann ermittelt werden, ob die tripelhelikale Struktur erhalten geblieben ist. Der Farbstoff wird in die Triplex eingebaut und lässt sich nicht mehr auswaschen.

1.2.3. Isolierung einzelner Molekulargewichtsfractionen im kleinen Maßstab für Zelluntersuchungen

Über Querstromfilter mit geringer Filterfläche von ca. 50 cm² – 200 cm² werden nach der Hydrolyse alle Bestandteile größer 0,1 μ m (entspricht einer Molmasse von ca. 1.000.000) abgetrennt. Das Filtrat wird dann stufenweise über Filter mit einer Ausschlussgrenze von 100.000, 50.000, 10.000, 5000 und 1.000 geführt und die einzelnen Fraktionen isoliert. Querstromfilter sind notwendig, um eine Verblockung der Filteroberfläche durch die Glucane zu reduzieren. Die Reinheit der Fraktionen wird durch die Bestimmung freier Glucose (enzymatisch) und des Restproteins

bestimmt. Da es sich um kleine Fraktionsmengen handelt, erfolgt anschließend eine Gefriertrocknung zu stabiler Lagerung.

1.2.4. Physikochemische Untersuchungen der Beta-Glucane, die im kleinen als auch großen Maßstab hydrolysiert wurden.

Die Molekulargewichtsverteilung wird über HPSEC (High pressure size exclusion chromatography) ermittelt. Entsprechende Säulen (Drittmittel Südzucker) und Polysaccharide (Pullulan) mit definiertem Molekulargewicht zur Referenz müssen noch angeschafft werden. Pumpen und Detektoren (RI oder Lichtstreuung) sind vorhanden. Der Strukturerhalt wird mittels ¹³C-NMR überprüft. Eventuell ist eine weitere Aufreinigung der Fraktionen über eine quantitative Größenausschlusschromatographie notwendig.

1.2.5. Zell- und Blutuntersuchungen zur Immunstimulanz

Es werden Untersuchungen zum Immunstatus von Zelllinien und dem der Tiere durchgeführt. Ein Differentialblutbild gibt Aufschluss über die prozentuale Zusammensetzung der einzelnen Zellfraktionen des Blutes (Erythrozyten, Leukozyten, Lymphozyten etc.). Anhand der Lymphozytenproliferation bzw. Bestimmung der Serum-Immunglobuline soll ein möglicher Einfluss der β -Glucane auf die immunkompetenten Zellen des Blutes nachgewiesen werden. Die Bestimmung des Haptoglobinspiegels im Blut von Schweinen, eines Akute-Phase-Proteins, welches zu Beginn einer Entzündungsreaktion ausgeschüttet wird, ist ein weiterer Parameter zur Erfassung des Gesundheitsstatus der Tiere.

Durch die Bestimmung von Zytokinen wie TNF α und Interleukin-6 ergibt sich die Möglichkeit, Vorversuche und begleitende Experimente zur immunstimulatorischen Wirkung der unterschiedlich aufgearbeiteten Glucane in Form von Zellkulturstudien durchzuführen. Vorteilhaft sind dabei vor allem der geringe Bedarf an Glucanmaterial und Zeit. Die Freisetzung der Zytokine kann quantitativ durch ELISA erfolgen (Enzyme linked Immunosorbent Assay), entsprechende Antikörper sind kommerziell erhältlich. Zur Verwendung kämen humane Zelllinien oder primäre Schweinezellen,

die aus dem Blut von Versuchstieren isoliert werden. Die Übertragung von Antikörperreaktionen vom Mensch auf Schwein ist eher gegeben als von der Maus zum Schwein. Durch ELISA können die Zytokine auch im Blut von Versuchstieren nachgewiesen werden und so Informationen zur Wirkung der verfütterten Glucane auf das Immunsystem liefern. Insbesondere kann der Zeitverlauf der Zytokinpegel verfolgt werden. Ein weiterer Ansatz, um Effekte auf zellulärer Ebene zu verfolgen, ist die Messung der Teilungsaktivität von primären Immunzellen aus Schweinen nach Stimulation mit Glucanen. Dazu werden Immunzellen aus dem Blut der Tiere isoliert, mit Glucanen behandelt und das Wachstum verfolgt.

1.2.6. Durchführung von Hydrolysen im kg-Maßstab

Nach der Bewertung der verschiedenen Hydrolysen im kleinen Maßstab auf Effektivität und Gewinnung einzelner Molmassenfractionen, werden größere Mengen an Beta-Glucan einer gezielten Degradation unterworfen. Nicht alle Hydrolyseverfahren werden im größeren Maßstab möglich sein. Das Ausmaß der Hydrolyse ist mit den schon beschriebenen physikochemischen Methoden zu ermitteln.

1.2.7. Reinigung, Isolierung und Trocknung einzelner Molekulargewichtsfractionen im kg Maßstab für Tierversuche

Dieser Vorgang erfolgt analog zum Verfahren im kleinen Maßstab. Es werden aber Querstromfilter mit wesentlich größeren Oberflächen und daraus resultierend höheren Filtrationsraten eingesetzt. Eine Isolierung der gleichen Anzahl von Fractionen wie bei der Aufarbeitung kleiner Mengen ist zum Vergleich der Ergebnisse aus den Fütterungsversuchen mit dem aus den Zelluntersuchungen notwendig. 0,1 µm Filter sind vorhanden mit einer Oberfläche von 1 m². Filter mit Ausschlussgrenzen von 1.000, 5.000, 10.000 und 100.000 müssen angeschafft werden. Die stabile Lagerung der isolierten Fractionen erfolgt über die ebenfalls anzuschaffende Sprühtrocknung (Drittmittel Südzucker).

1.2.8. Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Verwertung degradierter Beta-Glucane im Tierversuch

Geplant sind mehrere Ferkelaufzuchtversuche, in denen die unterschiedlich aufbereiteten β -Glucane hinsichtlich ihrer Wirkung im Tier überprüft werden sollen. Die Versuchsstation der FAL verfügt über einen Ferkelaufzuchtstall mit 80 Ferkelplätzen (20 Abteile je 4 Ferkel). Die Aufzucht findet in einem Lebendmassebereich von 8 – 25 kg, d.h. über eine Versuchsdauer von ca. 42 Tagen, statt. Neben der Erfassung der üblichen Leistungsparameter (Futteraufnahme, Lebendmassezunahme, Futteraufwand) sollen weitergehende Untersuchungen zum Immunstatus der Tiere durchgeführt werden (siehe auch 1.4.5).

1.2.9. Optimierung des Hydrolyseverfahrens zur Produktion von Beta-Glucanen mit einer bestimmten, engen Molekulargewichtsverteilung

Nach der Ermittlung, welche Molmassenfraktion die höchste Immunstimulanz bei den Ferkeln ermöglicht und mit welcher Hydrolysemethode, diese Fraktion am effektivsten herzustellen ist, soll das entsprechende Hydrolyseverfahren hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit optimiert werden.

1.3. Wissenschaftliche und technische Stand

1.3.1. Stand der Wissenschaft und Forschung/Bisherige Arbeiten des Auftragnehmers

In der Vergangenheit wurden die filamentösen Pilze *Schizophyllum commune*, *Sclerotium rolfsii* und *Monilinia fructigena* untersucht, die als gemeinsames Merkmal ein β -Glucan mit gleicher molekularer Primärstruktur (Abbildung 1-1) während des Wachstums ausscheiden. Das Biopolymer besteht aus einer Grundkette β -1,3-

gebundener Glucose, die als Seitenkette ein einzelnes β -1,6-verknüpftes Glucosemolekül an durchschnittlich jeder dritten Glucose der Grundkette trägt. Das native Molekulargewicht variiert zwischen $6-12 \times 10^6$ g/mol (Rau 1997).

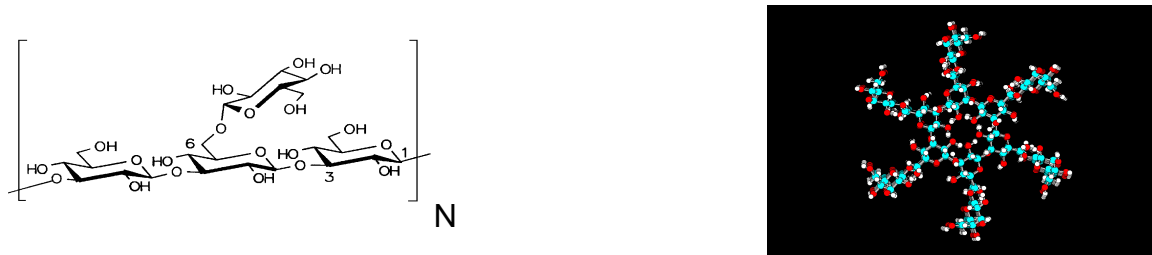


Abbildung 1-1: Strukturen der β -Glucane Links: Molekulare Primärstruktur $N=9.000-18.000$, Molekulargewicht $2-12 \times 10^6$ g/mol. Rechts: Sekundärstruktur Tripelhelix, Aufsicht.

In wässriger Lösung sind drei Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen zu einer Tripelhelix assoziiert. Die Seitenkettenglucose ist nach außen gerichtet.

Im Sauerstoff limitierten Chemostaten mit partieller Zellrückführung wurden Produktivitäten bis zu 100 g pro Liter und Tag erreicht (Schilling et al. 1999; Maier et al. 2003; Rau 2005). Die Separierung der Zellmasse aus der hochviskosen Suspension (ohne Verdünnung!) erfolgt durch speziell angepasste Querstromfiltration (Rau 1999).

Die β -Glucane sind regioselektiv, unter Erhalt der β -1,6-Verzweigung, durch heterogene Protonolyse an sauren Oberflächen (Bor-Silikatglas) hydrolysierbar (Muenzberg et al. 1995). Die Molekulargewichtsfractionen wurden mit Hilfe von Querstromfiltration isoliert. Dieses Verfahren ist bisher nur zur Herstellung geringer Mengen von degradierten β -Glucanen für den Laborbereich geeignet.

β -Glucane werden in Asien seit fast 20 Jahren in der begleitenden Krebstherapie als Immunstimulanz mit Erfolg eingesetzt (Furue 1987; Yoshio et al. 1992; Kimura et al. 1994; Bohn and BeMiller 1995). Die Glucane sollen das Immunsystem über die Aktivierung von Makrophagen (Bindung an Rezeptoren) stimulieren (Mueller et al. 2000). Für humane und murine (Maus) Makrophagen/Monozyten-Zelllinien (z.B. U937) konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit Zymozan zur Freisetzung von Tumor-Nekrosis-Faktor α (TNF α) führt (Jiang et al. 1992). Dieses proinflammatorische Zytokin wirkt als initiale Komponente einer Kaskade von Zytokinfreisetzen, die das Immunsystem aktivieren. Der Nachweis steigender TNF α Freisetzung kann somit als Marker für immunstimulatorische Effekte angesehen werden. Ähnliches gilt für das Zytokin Interleukin-6 (IL-6).

Die Beta-Glucane stimulieren auch als "elicitor" in bestimmten Pflanzen die Bildung von Phytoalexinen, die gegen die Infektion von Viren oder den Befall von Mikroorganismen wirken. Diese Untersuchungen wurden vom Antragsteller (Rau) selbst in Kooperation mit dem Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz (Universität Hannover) durchgeführt. Beim Einsatz dieser degradierten β -Glucane gegen das Tabak-Mosaik-Virus (Abbildung 1-2) ist klar zu erkennen, dass die Fraktion 5.000-10.000 g mol^{-1} die höchste Aktivität aufweist. Diese Stimulation ist als Analogon zur gesteigerten Immunabwehr im Tierversuch zu sehen.

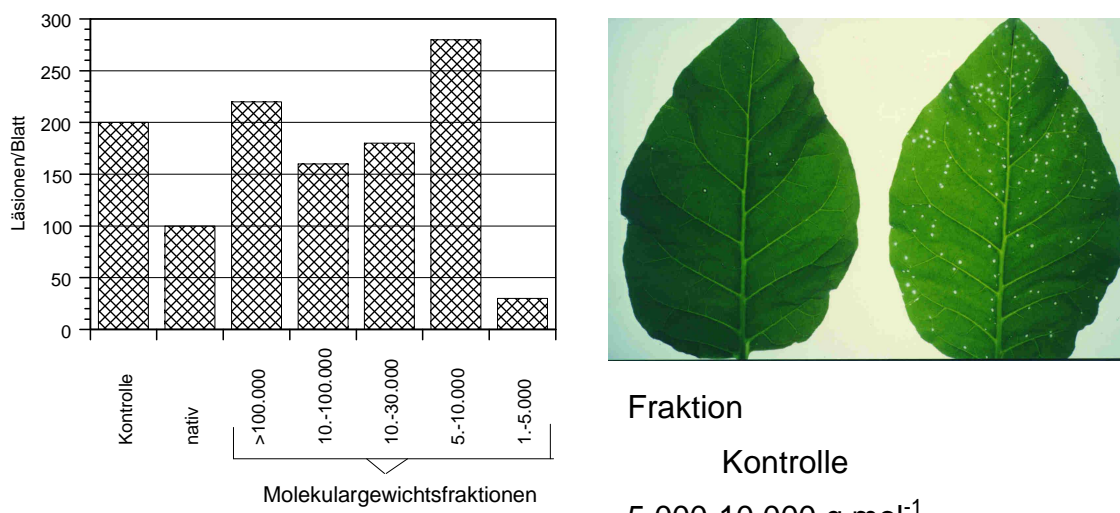


Abbildung 1-2:Links: Einfluß von β -Glucan-Fractionen unterschiedlicher Molekulargewichte auf die Infektiosität einer TMV-Suspension (5 $\mu\text{g/ml}$) an *Nicotiana tabacum* cv. 'Xanthi-nc'. Die Behandlung erfolgte mit 100 $\mu\text{g/ml}$ β -Glucan. Die Kontrolle enthielt nur destilliertes Wasser. Rechts: Die Infektionen sind als lokale Läsionen auf der Blattoberfläche erkennbar.

Die Tripelhelix ist bis zu einem Molekulargewicht von ca. 50.000 g mol^{-1} stabil (Kojima et al. 1984). Bei einer Molfraktion von 5.000 – 10.000 g mol^{-1} (Abbildung 1-2) sollte das β -Glucan nur in Einzelsträngen vorliegen. Die Rolle der Tripelhelix als eine Bedingung für immunstimulierende Aktivität wird in der Literatur aber kontrovers diskutiert (Ohno et al. 1995; Smith et al. 2002; Wasser 2002). Verfahren zur gezielten Herstellung von β -Glucanen mit enger Molekulargewichtsverteilung existieren noch nicht.

Zunächst wurde die Verfütterung bzw. Injektion von β -Glucanen aufgrund der zunehmenden Resistenz zugelassener Antibiotika erfolgreich in der Aquakultur eingesetzt, in der sie zu einer Steigerung der Immunabwehr gegenüber pathogenen

Erregern führten (Baulny et al. 1996; Dalmo et al. 1996; Sakai 1999). Darüber hinaus konnte ihre, das Immunsystem stimulierende, Wirkung auch für Schweine belegt werden (Engstad and Raa 1999). Der Wirkmechanismus der β -Glucane beruht vermutlich auf einer Stimulation der Makrophagen in speziellen lymphozytären Einrichtungen des Darmes, den Peyerschen Plaques. Hierbei erfolgt die Aufnahme aus dem Darm über so genannte M-Zellen. Diese sind darauf spezialisiert, Antigene aus dem Darmlumen aufzunehmen und sie den in den darunter liegenden Lymphozyten und Makrophagen zu präsentieren. Aderem and Ulevitch 2000) konnten zeigen, dass Makrophagen über spezifische β -Glucan-Rezeptoren verfügen. Durch ihre Anheftung soll die Präsentation von Antigenen und die Freisetzung von Zytokinen verstärkt werden. Dies wiederum soll zu einer Stimulation der B- und T-Lymphozyten führen und damit eine Zunahme der Produktion von Immunglobulinen und der Phagozytoseleistung von T-Killerzellen verursachen. Im Vergleich zur intramuskulären Injektion hat die orale Applikation jedoch bisher zu schlechteren Ergebnissen geführt. Ein Grund dafür könnte das hohe Molekulargewicht der verwendeten β -Glucane von mindestens $500.000 \text{ g mol}^{-1}$ sein, da diese großen Moleküle im Magen-Darm Trakt nur schlecht aufgenommen werden.

Die β -Glucane sind mit Proteinen in sehr unterschiedlichen Mengen (1-30 Gew.%) assoziiert (Rau 1997), teilweise auch über N-glycosidische Bindungen verknüpft (Wasser 2002). Bisher ist nicht bekannt, welchen Einfluss der Proteinanteil auf die Immunstimulanz ausübt.

Lentinan ist ebenfalls ein β -Glucan mit leicht erhöhtem Verzweigungsgrad, das von *Lentinus edodes* gebildet wird. Bei der Verfütterung von Lentinan bzw. dem getrockneten Pilz an Ferkel wurde keine aussagekräftige Immunstimulanz gefunden (Nevel et al. 2003). Die Autoren führen diesen Befund auf eine zu geringe Konzentration (0,1 Gew.%) von Lentinan im Futter zurück. Wahrscheinlich wurde der wässrige Extrakt des Pilzes als Quelle für das Lentinan verwendet, so dass neben dem β -Glucan noch weitere Substanzen wie Proteine, Aminosäuren und weitere Kohlenhydrate enthalten sind. Nativ besitzt Lentinan ein Molekulargewicht von ca. $2 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, das für die orale Aufnahme wahrscheinlich zu hoch ist.

Am Institut für Tierernährung der FAL wurde ein Versuch zum Einfluss von zwei unterschiedlich aufgereinigten β -Glukanen im Laktationsfutter auf die Leistung von Sauen durchgeführt. Bei Einsatz des höher aufkonzentrierten β -Glukans (80%ig) zeigte sich bei den Ferkeln eine positive Tendenz zu höheren Zuwachsleistungen (Förster et al. 2004). In einem sich daran anschließenden Ferkelaufzuchtversuch mit zwei unterschiedlich aufgereinigten β -Glukanen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden (Große-Verspohl 2004).

2. Material und Methoden

2.1. Produktion des β -Glucans

Zum Test des β -Glucans (Scleroglucan) als Futterergänzungsmittel für Ferkel, wurden 200 g β -Glucan durch Bioreaktorkultivierung mit *Sclerotium rolfsii* ATCC 15205 in 40 L wässriger Lösung gewonnen. Die Zellen wurden durch high-speed crossflow Filtration von der Kultursuspension getrennt. 5 g/L Ameisensäure wurden zur Stabilisierung der Lösung dazu gegeben. Das trockene Futter wurde mit der wässrigen β -Glucan-Lösung gemischt. Während des Sommers wurde alle 3 Tage die β -Glucan Futtermischung frisch angesetzt. Anderenfalls wäre es trotz der Stabilisierung der β -Glucan-Lösung zu einem Befall des Futters durch Pilze gekommen.

2.2. Trocknungsmethoden

Gefriertrocknung der β -Glucan-Lösung ist nicht empfehlenswert, da natives β -Glucan mit einem Molekulargewicht über $6 \cdot 10^6$ g/mol nur zu ca. 50% in Wasser löslich ist. Die Sprühtrocknung (Mini Spray Dryer B-290 geliehen von Büchi) wurde ebenfalls getestet. Hier zeigte sich jedoch ein Produktverlust von über 50%. Um den Massenverlust zu minimieren, wurde der teilentladene Partikelstrom durch eine Wasserfalle geleitet. Das β -Glucan aggregierte aber nur als schleimiger Film auf der Wasseroberfläche. Das sprühgetrocknete β -Glucan ist zu 100% in Wasser wieder

löslich, im Gegensatz zu den gefriergetrockneten β -Glucanen. Der hohe Scherstress, hervorgerufen durch die Strahldüse, führt zur Degenerierung des β -Glucans.

Actigum CS11, ist ein kommerziell erhältliches Scleroglucan, welches in Pulverform von der Degussa AG vertrieben wird. Das Actigum besitzt jedoch ein Molekulargewicht von nur ca. 500.000 g/mol, welches sich wahrscheinlich durch Scherstress während Aufarbeitung ergibt. Trotz des reduzierten Molekulargewichts zeigte Actigum ein ähnlich schlechtes Löslichkeitsverhalten wie das native, gefriergetrocknete Scleroglucan. Eine partielle Lösung war nur in 0,01 N NaOH bei 60°C unter intensivem Rühren möglich. Die nach 48 h verbliebenen gequollenen β -Glucanpartikel wurden durch Ultra Turrax Behandlung zerstört.

In Patenten der ELF Aquitaine (Donche and Isambourgh 1994; Pirri et al. 1994) ist der Aufarbeitungsprozess für Actigum CS11 beschrieben. Nach Ausfällung mit Isopropanol wurde das Polymer separiert (nicht näher beschrieben, eventuell durch Filtration), intensiv mit dem BASF Tensid AP 20 (oxyethyliertes Nonylphenol) gemischt, getrocknet und gewalzt (Methoden nicht beschrieben). Wir versuchten das Verfahren mit dem Biotensid Sophoroselipid bzw. mit den Tensiden Span-20 und Tween-20 zu wiederholen. Es erfolgte eine Zugabe von 10% (w/v) Tensid zum Präzipitat. Nach einer Trocknung über Nacht bei 80°C konnte der Ansatz (5 g/l) in Wasser nicht wieder gelöst werden.

Die Präzipitation des β -Glucans durch die Zugabe der dreifachen Menge an Isopropanol führte nach der Gefriertrocknung ebenfalls zur Unlöslichkeit. Wird jedoch die wässrige β -Glucan-Lösung in ein großes Volumen Isopropanol gegossen und dieses Präzipitat gefriergetrocknet, lässt sich das Trockenprodukt wieder in Wasser lösen. Der Mechanismus, der zu diesem unerwarteten Effekt führt, ist noch unbekannt. Zurzeit ist das die Methode der Wahl, um geringe Mengen an wasserlöslichen β -Glucan zu gewinnen.

2.3. Hydrolyse

Für die selektive Spaltung des nativen Scleroglucans wurden verschiedene Methoden herangezogen. Zum einen wird eine thermische Hydrolyse im Autoklaven

durchgeführt und zum anderen eine enzymatische mit dem Enzym CelluPract AS und AL 100 von der Firma Biopract. Das Enzym der Firma Biopract stammt von dem Organismus *Trichoderma reesei* M 18.2 (DSM 10683). Neben den Glucanasen von dem Organismus wurden auch noch Glucanasen von anderen Organismen untersucht. Des Weiteren wird der Einfluss des pH-Wertes auf die Scleroglucanlösung untersucht. Es wird eine Hydrolyse im größeren Maßstab mit dem Enzym CelluPract AS 100 durchgeführt mit anschließender Aufarbeitung der Fraktionen.

2.3.1. Enzymatische Hydrolyse

Die Hydrolysen werden in der Größe von 200 mL Schott-Flaschen (SCHOTT AG, Mainz, Germany) durchgeführt. Es werden 100 mL Scleroglucan vorgelegt und in einem Wasserbad auf die gewünschte Temperatur gebracht. Dazu wird zum Zeitpunkt Null eine definierte Menge Enzym zugegeben und die Inkubation in einem Schüttelbad bei entsprechender Temperatur gestartet. Für die Analytik wird zu bestimmten Zeitpunkten eine 10 mL Probe entnommen. Die enzymatische Hydrolyse wird bei 80°C in einem Wasserbad abgestoppt.

2.3.1.1. CelluPract AS 100

Für die Hydrolyse des Scleroglucans wird das Pulverenzym CelluPract AS 100 (Biopract GmbH, Berlin, Germany) verwendet. Die Glucanaseaktivität wird von der Firma mit 200 Units angegeben. Für die Verwendung wird eine Lösung von 100 g/L Enzym in deionisiertem Wasser angesetzt und eine Stunde unter schütteln vom Trägermaterial gelöst. Auf einen Liter Scleroglucan werden 20 ml abzentrifugierte Enzymlösung mit einer Aktivität von 400 Units eingesetzt.

Von dem Enzym CelluPract AS 100 wurden zwei Chargen verwendet. Für die zwei Chargen ergaben sich unterschiedliche optimale Bedingungen für die Hydrolyse des Scleroglucans. Da der Batch von der Firma nicht bekannt ist wird bei den Chargen nach Liefertermin unterschieden.

Charge 1

Die Lieferung erfolgte im Jahre 2006. Der optimale pH-Wert für dieses Enzym liegt bei pH 6,0 und die optimale Reaktionstemperatur bei 50°C.

Charge 2

Die Lieferung erfolgte 2008. Die optimalen Bedingungen für die Hydrolyse liegen bei einem pH Wert von 5 und 55°C.

2.3.1.2. CelluPract AL 100

Das Enzym CelluPract AL 100 der Firma Biopract liegt in flüssiger Form vor. Es wird direkt 125 µL Lösung zu einer vorbereiteten Scleroglucanlösung gegeben. Zu bestimmten Zeitpunkten wird eine Probe aus dem Reaktionsgefäß entnommen und auf die Molekulargewichtsverteilung und den Glucoseanteil untersucht. Die optimalen Hydrolyse Bedingungen liegen bei einem pH-Wert von 6 und einer Temperatur von 50°C.

2.3.1.3. 1,3-D-Glucanase aus *Helix pomatia*

Für weitere Hydrolysen wird zum einen die 1,3-D-Glucanase aus *Helix pomatia* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) verwendet. Dieses Enzym hat eine angegebene Glucanaseaktivität von 0,5 - 1,5 Units/mg. Die optimalen Bedingungen sind ein pH-Wert von 5,0 und einer Temperatur von 37°C.

2.3.1.4. Glucanase aus *Bacillus subtilis*

Des Weiteren wird die Glucanase aus *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) für Hydrolysen verwendet. Dieses Enzym hat eine angegebene Glucanaseaktivität von 1 Unit/mg. Hier liegen die optimale Temperatur bei 55°C und der optimale pH-Wert bei 6,0.

2.3.1.5. Laminarinase aus *Trichoderma species*

Auch die Laminarinase aus *Trichoderma species* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) wird für Hydrolysen verwendet. Dieses Enzym hat eine angegebene Glucanaseaktivität von 162 Units/g. Die optimale Temperatur liegt bei 37°C und der optimale pH-Wert ist 5,0.

2.3.1.6. Thermische Hydrolyse

Für die thermische Hydrolyse werden Schott-Duran-Laborflaschen (Schott AG, Mainz, Germany) verwendet. Sie bestehen aus Bor-Silikat-Glas, welches regioselektive Spaltung ermöglichen soll. Diese werden mit 1 M Salzsäure befüllt und zur Aktivierung autoklaviert. Danach werden sie mit deionisiertem Wasser ausgespült und mit Scleroglucan befüllt. Die Hydrolyse findet in einem Autoklaven bei 121°C und 1 bar Überdruck statt.

2.3.1.7. Variation der Hydrolysezeit

Um den Einfluss der Hydrolysezeit zu ermitteln, wird unterschiedlich lange autoklaviert. Das Glucan hat dabei einen pH-Wert von 5,0, welcher mit NaOH und 20 %iger Ameisensäure eingestellt wird. Die Konzentration beträgt 3 g/L. Die Proben werden nach 24, 48, 72 und 96 Stunden genommen.

2.3.1.8. Variation des pH-Wertes

Um den Einfluss des pH-Wertes zu ermitteln, wird bei Scleroglucan der Konzentration 3 g/L unterschiedliche pH-Werte eingestellt. Die Einstellung der pH-Werte erfolgt mit NaOH und 20 %iger Ameisensäure. Es werden die pH-Werte 2,38; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; und 10,0 getestet. Die Hydrolyse findet für 72 Stunden statt.

2.3.1.9. Variation der Glucankonzentration

Bei der Variation der Scleroglucankonzentration werden Konzentrationen von 1 g/L, 2 g/L und 3 g/L des Scleroglucans mit deionisiertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert wird mit NaOH und 20 %iger Ameisensäure auf 5,0 eingestellt. Auch hier findet die Hydrolyse für 72 Stunden statt.

2.3.2. Darminhalt

Es wurde der Darminhalt (DI) von drei Tieren verwendet: Pferd, Schwein und Rind. Die Tiere wurden an der Tiermedizinischen Hochschule Hannover getötet und der DI anschließend gefriergetrocknet. Beim Pferd und Schwein wurde der Darminhalt aus dem Caecum und beim Rind aus dem Pansen entnommen. Der Caecum ist, wie der Pansen die Region im Darmtrakt, in der sich die höchste Dichte und Vielfalt an Mikroorganismen befindet. Daher kann angenommen werden, dass im restlichen Darmtrakt keine anderen Ergebnisse zu erwarten sind



(a) Schweinedarminhalt (b) Pferdedarminhalt (c) Panseninhalt vom Rind

Abbildung 2-1: Gefriergetrocknete Darm- bzw. Mageninhalte von verschiedenen Tieren

2.3.3. Cositec-Puffer

Der Puffer wurde nach dem in Tabelle 2-1 aufgeführten Substanzen und Konzentrationen hergestellt. Die Salze wurden in deionisiertem Wasser gelöst, wobei Calciumchlorid in einem separatem Gefäß gelöst wurde. Die Lösungen wurden zum Schluss vereinigt. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung des Cositec-Puffer

| Substanz | Konzentration [mM] |
|---------------------------------------|--------------------|
| NaCl | 115 |
| KCl | 10 |
| MgCl ₂ •6H ₂ O | 2,5 |
| CaCl ₂ • 2H ₂ O | 2,5 |
| NaH ₂ PO ₄ | 2 |
| Na ₂ SO ₄ | 1 |
| NaHCO ₃ | 25 |
| NH ₄ Cl | 5 |

2.3.4. Pansen-Puffer

Der Pansen-Puffer wurde aus dem in Tabelle 2-2 aufgeführten Substanzen hergestellt. Die Salze wurden in deionisiertem Wasser gelöst, wobei Calciumchlorid in einem separaten Gefäß gelöst wurde. Die Lösungen werden vereinigt. Der pH-Wert betrug 7,4.

Tabelle 2-2: Zusammensetzung des Pansen-Puffer

| Substanz | Konzentration [mM] |
|--|--------------------|
| NaCl | 28 |
| KCl | 7,69 |
| MgCl ₂ •6H ₂ O | 0,63 |
| CaCl ₂ • 2H ₂ O | 0,216 |
| 1n HCL | 5 |
| NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O | 10 |
| Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O | 10 |
| NaHCO ₃ | 97,9 |
| NH ₄ Cl | 5 |

2.3.5. Batch-Versuch mit Darminhalt

2.3.5.1. Batch mit Pferde- und Schweinedarminhalt

Für den Batch-Versuch mit Darminhalt wurde 150 mL Scleroglucan mit den Salzkonzentrationen und pH 7,2 des Cositec-Puffers (Tabelle 2-1) in einer 500 mL Schottflasche mit 1,5 g gefriergetrocknetem Darminhalt versetzt. Der Darminhalt wurde in ein Nylonsäckchen gegeben, das mit einem Kabelbinder verschlossen wurde. Die Inkubation erfolgte bei 38°C für 24 h bei kontinuierlicher Vermischung durch einen Magnetrührer. Die Proben wurden zweimal 15 min bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand für die weiteren Analysen verwendet. Zur Korrektur der Messwerte wurde unter den gleichen Bedingungen ein Ansatz mit Cositec-Puffer statt Scleroglucanlösung inkubiert, bei der die Proben die gleiche Behandlung erfahren. Die so ermittelten Werte der Polysaccharidfällung und der Bestimmung der reduzierenden Enden werden von den Proben mit Glucan abgezogen, um den Einfluss des Darminhaltes herauszurechnen.

2.3.5.2. Batch mit Panseninhalt vom Rind

Für den Batch-Versuch mit Panseninhalt wurde 150 mL Scleroglucanlösung mit den Salzkonzentrationen und pH 7,4 des Pansen-Puffers (Tabelle 2-2) in einer 500 mL Schottflasche mit 1,5 g gefriergetrocknetem Panseninhalt versetzt. Der Panseninhalt wurde in ein Nylonsäckchen gegeben, das mit einem Kabelbinder verschlossen wurde. Die Inkubation erfolgte bei 38°C für 24 h bei kontinuierlicher Vermischung durch einen Magnetrührer. Die Proben werden zweimal 15 min bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand für die weiteren Analysen verwendet. Zur Korrektur der Messwerte wird unter den gleichen Bedingungen ein Ansatz mit Pansen-Puffer statt Scleroglucanlösung inkubiert, bei der die Proben die gleiche Behandlung erfahren. Die so ermittelten Werte bei der Polysaccharidfällung und Bestimmung der reduzierenden Enden werden von den Proben mit Glucan abgezogen um den Einfluss des Panseninhaltes herauszurechnen.

2.3.6. Erste Reaktorhydrolyse von Scleroglucan

Ein Biostat U50 Bioreaktor der Firma B. Braun, Melsungen 1985 (mit pH-Elektrode, pT100-Thermometer und Probenentnahmeschleife) wurde mit 27,5 L Scleroglucanlösung (ca. 2 g/L) befüllt, welche mit NaOH-Plätzchen auf pH 6 gebracht wurde. Als Rührer wurden drei Schrägblattrührer mit einem Durchmesser Verhältnis von 0,64 und einer Höhe von 40 mm verwendet. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 550 mL Enzymlösung gestartet und bei 50°C und 30 UPM durchgeführt. Während der Hydrolyse wurden alle 10 Minuten Proben entnommen und darin vor Ort der Glucosegehalt enzymatisch mit einem Blutzuckermessgerät (Akkutrend GC Plus) bestimmt. Direkt danach wurde die Reaktion in den Proben durch Erwärmung auf 80°C für mindestens 15 Minuten gestoppt. Nach 130 Minuten wurde die Reaktorhydrolyse abgebrochen. Dazu wurde der Reaktor im Sterilisationsmodus auf 80°C gebracht und diese Temperatur durch manuelle Regelung für eine Stunde gehalten. Anschließend wurden zur Stabilisation der Lösung 5 g/L Ameisensäure hinzugegeben. Um das nicht-hydrolysierte Scleroglucan aus dem Hydrolyseansatz abzutrennen, wurde eine Querstromfiltration durchgeführt. Dabei wurde ein ProstaTM UF Plac 0,1 µm Modul eingesetzt. Das aufkonzentrierte Retentat wurde mit 10 L Wasser (enthält 5 g/L Ameisensäure) an der Querstromfiltrationsanlage gewaschen. Gelagert wurde Filtrat und Retentat bei 4°C.

2.3.7. Zweite Reaktorhydrolyse mit Scleroglucan

Für die zweite Reaktorhydrolyse wurde derselbe Bioreaktor verwendet, wie in Kap. 3.2.2.1. Es wurden 20 L Glucanlösung (Restglucan aus der Querstrom-Filtration nach erster Reaktorhydrolyse) mit einer Konzentration von 2 g/L eingesetzt und auf 50°C temperiert. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte analog zu Kap. 2.3.6. Außerdem kamen zwei Schrägblattrührer mit 80 UPM zum Einsatz. Der Start der Hydrolyse erfolgt durch die Zugabe von 400 mL Enzymlösung. Proben wurden zur 0. und 30. Minute, danach im 20 Minutentakt bis zur 130. Minute und anschließend alle 10 Minuten genommen. In den Proben wurde die Glucosekonzentration gemessen und danach die Reaktion gestoppt. Nach 200 Minuten erfolgte der Abbruch der Reaktorhydrolyse, Stabilisierung des Ansatzes und Aufarbeitung analog zu Kap.

2.3.6. Das Filtrat wurde bei 4°C gelagert und das Retentat (Restglucan) auf Grund starker Verschmutzung verworfen.

2.4. Analytik

2.4.1. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Mit Hilfe der GPC ist es möglich Moleküle nach ihrer Molekulargewichtsgröße aufzutrennen und diese auch mit entsprechender Kalibrierung zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wird die Molekulargewichtsverteilung des nativen und hydrolysierten Scleroglucan bestimmt sowie der Glucoseanteil in der Probe. Zur Messung wird eine Gelpermeationschromatographie-Anlage der Firma Merck-Hitachi (System LaChrom L-7100; Darmstadt, Germany) verwendet. Zusätzlich ist ein Entgaser zwischen Eluent und GPC-Anlage geschaltet. Als stationäre Phase wird ein Polyhydroxymetacrylat Copolymer Netzwerk verwendet welches für neutrale und anionische Polymere geeignet ist. Es werden zwei verschiedene Säulen genutzt die unterschiedliche Molekulargewichtsbereiche auftrennen. Eine für den Molekulargewichtsbereich zwischen $5 \cdot 10^3$ und $30 \cdot 10^6$ g/mol (30.000 Å, PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Germany) und eine für den Bereich zwischen 10^2 und 10^5 (100 Å, PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Germany). Als Eluent wird 0,2 g/L NaN_3 sowohl für die Bestimmung des Glucoseanteils als auch für die Molekulargewichtsverteilung verwendet. Jeder Säule ist eine Vorsäule aus dem gleichen Material vorgeschaltet. Gemessen wird bei einer Säulentemperatur von 75°C. Gemessen wird mit einem Brechungsindexdetektor (RI-101, Showa Denko Europe GmbH, München, Germany).

Molekulargewichtsbestimmung

Für die Molekulargewichtsbestimmung wird die Probe auf eine Konzentration von 0,5 g/L gebracht. Das Proben-Injektionsvolumen beträgt 100µL und die Fließrate 0,5 mL/min. Eine Kalibrierung der Säulen erfolgt mit einem Pullulan-Standard 342 – 1.660.000 g/mol (PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Germany).

Glukosekonzentrationsbestimmung

Der Anteil der Glucose in der Probe wird mit der Trennsäule von $10^2 - 10^5$ g/mol bestimmt. Eine Kalibrierung erfolgt mit verschiedenen Glucosekonzentrationen von 1 g/L bis 0,1 g/L in 0,1 g/L Schritten. Die Fließrate bei der Glucosebestimmung beträgt 1 mL/min.

2.4.2. Bestimmung reduzierender Enden von Zuckern

Die Bestimmung der reduzierenden Enden von Zuckern erfolgte nach der Methode von Somogyi 1952.

1. Schwach alkalisches Kupferreagenz

| | | |
|--------------------------------------|-----|----|
| K-Na-Tatrat | 12 | g |
| Na ₂ CO ₃ | 24 | g |
| CuSO ₄ * H ₂ O | 4 | g |
| Aqua dest. | 300 | ml |

| | | |
|---------------------------------|-----|----|
| Na ₂ SO ₄ | 180 | g |
| Aqua dest. | 500 | ml |

Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Nach einer Woche Lagerung bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss war die Lösung gebrauchsfertig.

2. Arsenmolybdat-Reagenz

| | | |
|--|-----|----|
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * H ₂ O | 50 | g |
| Aqua dest. | 950 | ml |

Dann Zugabe von

| | | |
|---|----|----|
| H ₂ SO ₄ ; 96% | 42 | ml |
| Na ₂ HAsO ₄ * 7H ₂ O | 6 | g |

Die Lösung wurde bei 2°C für 3 Tage lichtgeschützt inkubiert. Bei der Messung wurde 1 mL Probe mit 1 mL schwach alkalischen Kupferreagenz versetzt und 10 min

in siedenden Wasser inkubiert. Danach wurden die Proben gevortext und 5 min auf Eis gestellt. Es folgte die Zugabe von 1 mL Arsenmolybdat-Reagenz und nach anschließenden vortexen die Zugabe von 3 mL dest. Wasser. Hiernach wurde erneut gevortext und die Proben dann für 15 min bei Raumtemperatur gelagert. Sie konnten nun bei 500 nm im Photometer vermessen werden.

2.4.3. Viskositätsmessung

Die Messung der Viskosität erfolgt mit dem Viskosimeter Haake ViscoTester 550 (Thermo scientific, Karlsruhe, Germany). Hierbei handelt es sich um ein Doppelspaltviskosimeter. Es werden 9 ml der unverdünnten Probe vermessen und mittels Computer werden 20 Messpunkte in logarithmischem Abstand von der Scherviskosität und Scherrate aufgezeichnet. Der Bereich der Scherrate geht von $0,05 \text{ s}^{-1}$ bis 500 s^{-1} .

2.5. Fluoreszenzmarkierung von Scleroglucan

Um das Scleroglucan in geringen Konzentrationen sowohl optisch als auch quantitativ, z.B. an der inneren Darmwand, nachweisen zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff 5-DTAF getestet (Abbildung 2-2)

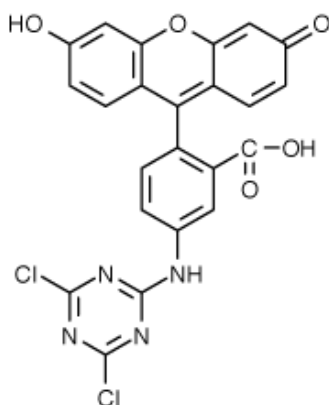


Abbildung 2-2: 5-(4,6-dichlorotriazinyl)aminofluorescein (5-DTAF) als Marker für Scleroglucan

2 g/L 5-DTAF wurden zu einer wässrigen Lösung mit 1g/L Scleroglucan gegeben und über Nacht unter stetigem Schütteln gelöst. Um überschüssiges 5-DTAF zu entfernen, wurde das Glucan mit i-Propanol gefällt und anschließend das Präzipitat 3x mit i-Propanol gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das fluoreszenzgefärbte Glucan in Natriumcarbonatpuffer pH 9,6 aufgenommen. Die Nachweisgrenze lag bei 0,24 µg/mL. Zwischen 0,24 – 7,8 µg/mL ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenz-Intensität.

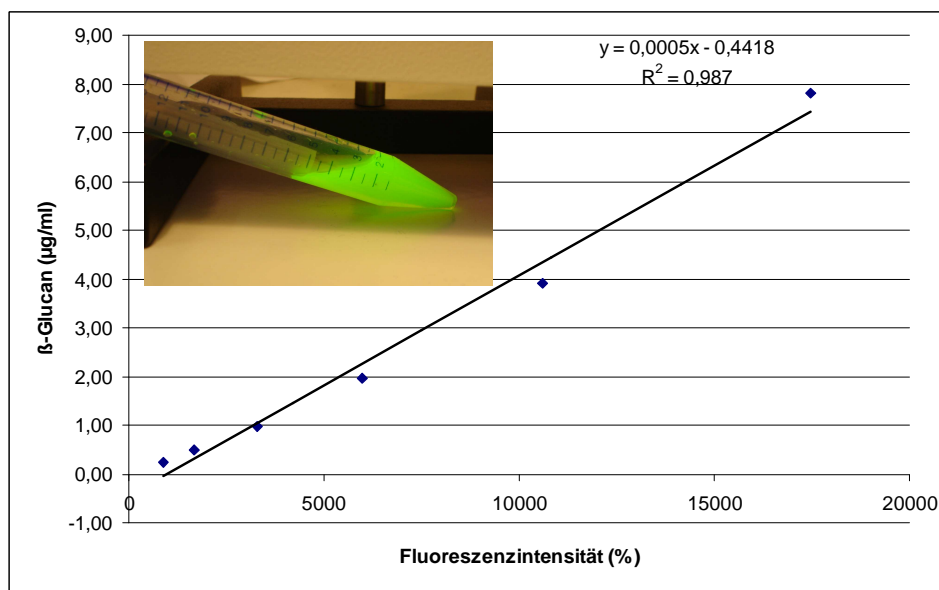


Abbildung 2-3: Mit 5-DTAF markiertes Scleroglucan nachweisbar bis $\geq 0,24 \mu\text{g/mL}$

2.6. Aktivierung von Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen wurden durch Zytokinstimulation von Blutmonozyten generiert (Carrasco et al. 2001). Dazu wurden bei Landschweinen heparinisierte Blutproben gewonnen und daraus mononukleare Zellen (Lymphozyten und Monozyten) über einen Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Die Monozyten wurden danach mit anti-CD172a Antikörpern und magnetischen Beads auf eine Reinheit von >95 % angereichert. Die isolierten Monozyten entwickeln sich durch Kultivierung mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF innerhalb von 3 Tagen zu DCs und können dann für Experimente verwendet werden.

Um den Einfluss von β -Glucan auf die DCs zu untersuchen, wurden DCs für 24 – 48 h mit dem vollständigen β -Glucan oder mit Hydrolysaten unterschiedlicher Molekülgröße in Konzentrationen von 0.1 – 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stimuliert. Zur Charakterisierung der DCs wurden folgende Parameter analysiert: Die phänotypische Reifung wurde anhand der Expression von MHC-Klasse-II, CD80/86 und CD40 im Durchflußzytometer (FACS) bestimmt. MHC-II und die kostimulatorischen Moleküle CD80/86 und CD40 sind für die Antigenpräsentation und Stimulation von T-Zellen wichtig. Die Oberflächenexpression dieser Marker nimmt bei Reifung der DCs generell zu. Reife DCs haben außerdem eine geringere Endozytoseaktivität als unreife DC; dies wurde anhand der Fähigkeit der DCs zur Ova-DQ–Aufnahme untersucht. Die Kapazität der DCs zur T-Zell-Stimulation nach β -Glucan-Exposition wurde mithilfe einer „Mixed Leukocyte Reaction“ (MLR) getestet. Außerdem wurde die Vitalität der Zellen durch Propidiumiodidfärbung im Durchflußzytometer kontrolliert. Zusätzlich wurden Zellkulturüberstände entnommen, um mit ELISA die Zytokinproduktion der Zellen überprüfen zu können.

2.7. ELISA

2.7.1. ELISA zur Bestimmung von Zytokinen

Es wurde der Einfluss des Molekulargewichts von Scleroglucan auf die Sekretion von $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 and IL-10 durch MODC´s getestet. Die Zytokine wurden durch einen Sandwich ELISA der Firma R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland gemessen. In die Vertiefungen der Maxisorp Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurde der Fänger-Antikörper Maus anti-Schwein $\text{TNF-}\alpha$, Ziege anti-Schwein IL-6 oder Maus anti-Schwein IL-10 gebunden, bei Raumtemperatur über Nacht. Die Platte wurde mit 1 % (w/v) BSA stabilisiert mit 0,05 % (w/v) NaN_3 in PBS für 2 h bei RT. Nach jedem Inkubationsschritt werden die Platten dreimal gewaschen mit PBS und 0,05% (w/v) Tween 20. 200 μL des MoDC Überstand oder der Standard rp $\text{TNF-}\alpha$ (300 ng/ml), rpIL-6 (150 ng/ml) und rpIL-10 (200 ng/ml) wurde in die Vertiefungen gegeben und bei RT für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 2 h bei RT mit dem Detektions-Antikörper biotyniliertem Ziege anti-Schwein IL-6, IL-10 und

TNF- α . Nach dem Waschen wird 200 μ L HRP-konjugiertes Streptavidin in die Vertiefungen gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wird zum Färben 15 min mit TMB inkubiert. Die Reaktion wird mit 1N H₂SO₄ abgestoppt. Gemessen wird die Absorption bei 450 nm.

2.7.2. ELISA zur Bestimmung von Immunglobulinen im Blutplasma

Die Plasmaproben aus dem ersten Fütterungsversuch wurden mit Hilfe eines kommerziellen Kits auf den Anteil der Immunglobuline G, A und M untersucht. Bei dem Fütterungsversuch wurde den Tieren vor Beginn des Versuches eine Blutprobe entnommen und nach 5-wöchiger Laufzeit des Versuches.

Der Anteil der Immunglobuline A, G und M in der Plasmaprobe wurde mittels des kommerziellen Test-Kits der Firma Bethyl, Montgomery, USA gemessen. Der Sandwich ELISA wird bei Raumtemperatur in Maxisorp Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) durchgeführt. Von dem Fänger-Antikörper werden pro Vertiefung 1 μ L Antikörper auf 100 μ L Bindungspuffer (NaBicarbonat, pH9,6) gegeben und 60 Minuten inkubiert. Nach jeder Inkubationszeit wird die Platte dreimal mit PBS + 0.1 % (v/v) Tween 20 gewaschen. Nach der Bindung des Fänger-Antikörpers folgt mithilfe von PBS mit 1% BSA (200 μ L pro Vertiefung) das Blocken von unspezifischen Bindungen des Antigens an der Platte. Geblockt wird für 60 Minuten. Es werden pro Plasmaprobe 100 μ L mit folgenden Verdünnungen IgG 1:10.000, IgA und IgM 1:3.000 in die Vertiefungen gegeben. Die Verdünnung erfolgt in PBS mit 1% BSA und 0,05% Tween 20 und die Inkubationszeit beträgt 60 Minuten. Nach dem Waschen wird der Detektions-Antikörper in die Vertiefungen gegeben. Mit einer Konzentration von IgA 1:75.000, IgG 1:50.000 und IgM 1:50.000. Nach 60 Minuten Inkubationszeit bei RT wird die Platte gewaschen. Anschließend erfolgt eine Visualisierung der Bindung mit 100 μ L TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) Substrat. Die Färbereaktion wird gestoppt durch die Zugabe von 100 μ L 1 N H₂SO₄. Die Absorption wird bei 450 nm mit einem Mikrotiter Platten Leser SUNRISE (Tecan, Crailsheim, Germany) gemessen.

2.8. Fütterungsversuche

Der Versuch wurde am Institut für Tierernährung (ehemals FAL jetzt Friedrich-Loeffler-Institut, Braunschweig) in einem Schweineaufzuchtstall durchgeführt, der 5 Wochen lang mit 80 Ferkeln (waren bei Beginn des Versuchs 3 Wochen alt) genutzt wurde. Die 20 Boxen waren jeweils mit 4 Tieren (männlich oder weiblich) besetzt. 10 Gruppen (Tabelle 1) mit jeweils 4 kastrierten männlichen oder 4 weiblichen Ferkel wurden eingerichtet, so dass sich ein mittleres Gewicht von ca. 7 kg pro Ferkel ergab. Den Schweinen wurden während der Studie Trockenfutter (plus β -Glucan) und Wasser nach Bedarf bereitgestellt. Die Zugabe erfolgte in 100 ml Portionen mit jeweils 500 mg β -Glucan. Die 10 Gruppen (2 Boxen pro Gruppe) wurden unterteilt in: Kontrolle (Gruppe 1) ohne Zusätze, plus Ameisensäure (Gruppe 2), plus Hefehydrolysat MACROGARD[®] (Gruppe 3), plus β -Glucan in unterschiedlichen Konzentrationen (Gruppe 4-8), plus Actigum CS11 (Gruppe 9) und gefriergetrocknetes β -Glucan (Gruppe 10).

Tabelle 2-3: Gliederung des Fütterungsversuches. Einteilung von 80 Ferkeln in 10 Gruppen mit je 4 männlichen (kastriert) und 4 weiblichen Tieren.

| Gruppe | Box-Nr. | Zusätze |
|--------|---------|--|
| | 1; | 11 Keine |
| 2 | 2;12 | Ameisensäure, 500 mg/kg Futter |
| 3 | 3; 13 | MACROGARD, 200 mg/kg Futter |
| 4 | 4; 14 | β -Glucan, 25 mg/kg Futter |
| 5 | 5; 15 | β -Glucan, 50 mg/kg Futter |
| 6 | 6; 16 | β -Glucan, 100 mg/kg Futter |
| 7 | 7; 17 | β -Glucan, 200 mg/kg Futter |
| 8 | 8; 18 | β -Glucan, 500 mg/kg Futter |
| 9 | 9; 19 | Actigum, 200 mg/kg Futter* |
| 10 | 10; 20 | β -Glucan, gefriergetrocknet, 100 mg/kg Futter* |

*Das getrocknete β -Glucan wurde ebenfalls vor Futterzugabe in wässriger Ameisensäure gelöst.

Das Gewicht und die Futtermenge wurden 1x pro Woche bestimmt und auf den entsprechenden Wert pro Tag berechnet. Die Ferkel Nr. 1 (Box 7, Gruppe 7) und Nr. 23 (Box 5, Gruppe 5) starben. Besondere Symptome waren nicht erkennbar. Die anderen Ferkel blieben gesund, medizinische Versorgung war nicht notwendig.

2.9. Ussing-Kammer Darmtransport

Die Ussing-Kammer ist benannt nach ihrem Entwickler Hans Ussing der sie erstmals im Jahre 1951 beschrieb. Mit dem Prinzip der Ussing-Kammer ist es möglich Transportfunktionen am lebenden Epithel zu untersuchen.

2.9.1. Aufbau der Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer ist in zwei Hälften geteilt. Ein Austausch kann nur über das Epithel erfolgen. Jede Hälfte ist mit einem Reservoir verbunden, mit eigenem Zu- und Ablauf. Die Flüssigkeit wird durch das Einströmen von Gas zum Zirkulieren gebracht. So findet ein Austausch von Flüssigkeit in der Kammer statt. Durch die Doppelwandung des Reservoirs kann eine Temperierung des Puffers erfolgen. Über ein Paar gewebe-nahe und gewebe-ferne Elektroden kann eine Messung der Potentialdifferenz erfolgen und somit der aktive Transport erfasst werden.

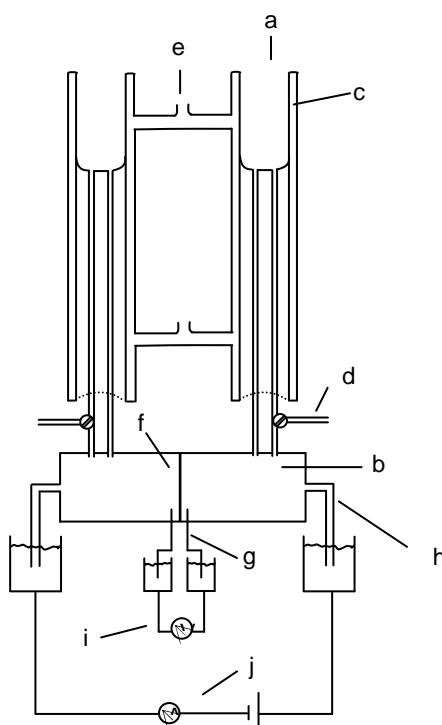


Abbildung 2-4: schematische Zeichnung der Ussing-Kammer. a) Reservoir mit zu und Ablauf für die eine Kammerhälfte; b) eine Hälfte der Ussing-Kammer; c) Doppelwandung des Reservoirs; d) Zulauf für Gas bringt den Puffer im Reservoir zu zirkulieren; e) Zulauf für Wasser um den Puffer im Reservoir zu temperieren; f) Epithel welches die Kammerhälften trennt; g) gewebe-nahe Elektroden; h) gewebe-ferne Elektroden; i) Voltmeter misst Potentialdifferenz; j) Amperemeter mit variabler Gleichstromquelle

2.9.2. Gewebepräparation und Ablauf des Versuches

Als Versuchstiere für den Darmtransportversuch wurde ein Ferkel verwendet. Das Tier wurde mit der Bolzenschussmethode getötet und anschließend die Kehle durchgeschnitten zum Ausbluten. Danach wurde sehr zeitnah der Bauchraum geöffnet und die Darmbereiche für die Versuche entnommen und sofort mit Ringerlösung gereinigt und auf Eis für die weitere Probenvorbereitung gelagert. Nach dem Spülen wird der Darm an der Ader aufgeschnitten und die Mucosa entfernt („gestrippt“). Der so von Faeces und Mucosa befreite Darm wird in die vorbereitete Ussing-Kammer eingespannt. Zuvor erfolgte eine Zugabe von 10 mL Elektrolytlösung in die Reservoir (a). Nach der Kalibrierung (Kurzschluss) wurde 200 µL der Scleroglucanlösung (2.5) zu den 10 mL auf der mucosalen Seite gegeben. Die Versuchsdauer betrug 2 Stunden. Als Nullprobe wurde in 10 mL der Elektrolytlösung der mucosalen Seite 200 µL der Scleroglucanlösung gegeben und über denselben Zeitraum bei RT stehen gelassen. In der anschließenden Auswertung wurde die Fluoreszenz der Nullprobe auf 100% gesetzt, um so den Einfluss auf die Fluoreszenz durch die Versuchsbedingungen auszuschließen.

2.9.3. Elektrolytlösungen

Tabelle 2-4: Zusammensetzung des Colon-Puffers

| Substanz | Konzentration [mmol/L] |
|---|------------------------|
| NaCl | 53,6 |
| KCl | 5,4 |
| 1N HCl | 0,2 |
| MgCl ₂ * 6 H ₂ O | 1,2 |
| CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 1,2 |
| Na- acetat * 3 H ₂ O | 36 |
| Na – propionat | 15 |
| Na - butyrat | 9 |
| Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O | 1,5 |
| Na – gluconat | 6 |
| Hepes | 10 |
| NaHCO ₃ | 21 |
| Mannit | 2 |

Tabelle 2-5: Zusammensetzung des Jejunum- und Ileum-Puffers

| Substanz | Konzentration [mmol/L] |
|---|------------------------|
| NaCl | 113,6 |
| KCl | 5,4 |
| 1N HCl | 0,2 |
| MgCl ₂ * 6 H ₂ O | 1,2 |
| CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 1,2 |
| NaHCO ₃ | 21 |
| Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O | 1,5 |
| Glucose | 10 |
| Mannit | 2 |
| Hepes | 7 |
| Na – gluconat | 6 |

3. Ergebnisse

3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1. Optimierung der Hydrolyse mit AS 100, Charge 2006

Für die optimale Hydrolyse des nativen Scleroglucans wurde für jede Charge des Enzyms CelluPract As 100 die optimalen Glucanase Bedingungen untersucht. Dazu wurde ein standardisiertes Testsystem entwickelt bei dem jeweils nur ein Parameter verändert wurde. Es wurde jeweils die gleiche Menge an Enzym eingesetzt bei gleicher Scleroglucankonzentration. Um die optimale Versuchstemperatur zu ermitteln wurden 5 verschiedene Temperaturen (40°C, 45°C, 50°C, 55°C und 60°C) getestet und anschließend die Proben auf den Anteil an freier Glucose und reduzierender Enden untersucht. Die Hydrolyse verläuft am Wirkungsvollsten um so mehr der Anteil an reduzierenden Enden zunimmt und am wenigsten freie Glucose entsteht.

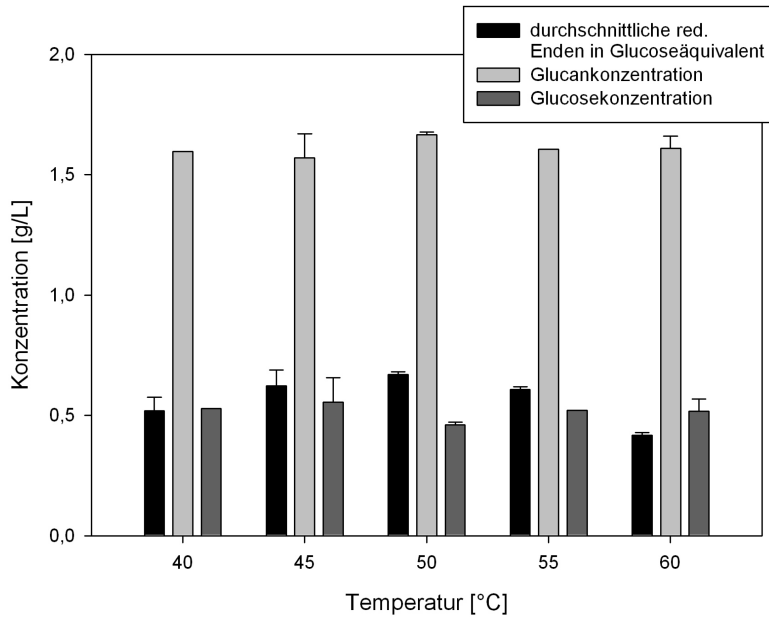


Abbildung 3-1: Veränderung der reduzierenden Enden, Glucosekonzentration und Glucankonzentration bei Hydrolysen mit Cellupract AS 100 mit verschiedenen Temperaturen. Hydrolysezeit 50 Min, Glucankonzentration 2 g/L, pH 6.

In Abbildung 3-1 sind die ermittelten reduzierenden Enden, die Glucosekonzentration und die Glucankonzentration nach 50 Minuten Enzymhydrolyse und einer eingesetzten Glucankonzentration ist 2 g/L dargestellt. Es sind die Werte für die im Versuch verwendeten fünf verschiedenen Temperaturen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die reduzierenden Enden von 0,5 g/L bei 40°C bis zur Hydrolysetemperatur von 50°C auf einen Wert von ca. 0,7 g/L ansteigen. Bei höheren Temperaturen sinkt die Konzentration wieder ab. Die Werte für die ermittelte Glucose sind relativ konstant bei ca. 0,55 g/L. Es ist jedoch zu erkennen, dass der Wert für die Hydrolysetemperatur von 50°C deutlich niedriger ist als für die anderen Temperaturen. Dieser liegt bei ca. 0,4 g/L. Daraus ergibt sich für 50°C die größte Anzahl nachgewiesener reduzierender Enden und gleichzeitig die geringste Glucosekonzentration. Auch die Glucankonzentration liegt relativ konstant bei ca. 1,6 g/L. Nur für eine Hydrolysetemperatur von 50°C ist mehr Glucan nachgewiesen worden (ca. 1,7 g/L).

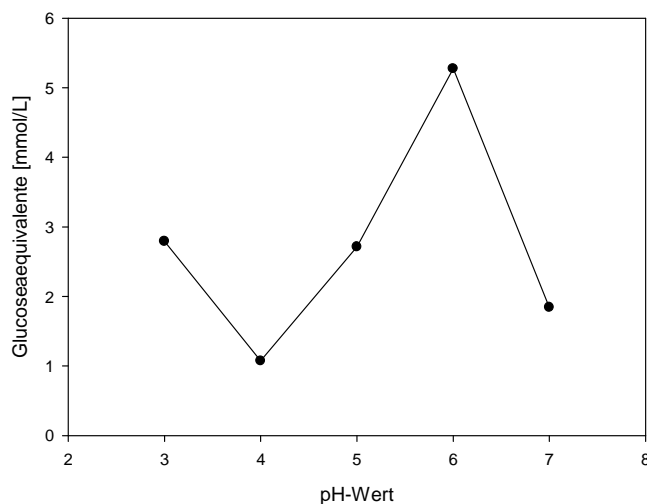


Abbildung 3-2: Darstellung der Hydrolyse bei pH-Werten von 3, 4, 5, 6 und 7 nach 90 Minuten Hydrolysezeit. Dargestellt ist die Veränderung der Reduzierenden Enden. Als Enzym wurde hier CelluPract As 100 Charge Lieferung 2006 eingesetzt. Bei einer Scleroglucankonzentration von 2 g/L und einer Hydrolyse Temperatur von 50°C.

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurden die Hydrolysen bei einer Temperatur von 50°C mit einer Scleroglucanlösung von 2 g/L durchgeführt. Es wurden pH-Werte vom Sauren, ausgehend von pH 3, bis zum neutralen pH 7 getestet. Aus der Abbildung 3-2 ist deutlich ein Optimum der Hydrolyse bei einem pH-Wert von 6 zu erkennen. Hier liegen die reduzierenden Enden bei ca. 5 mmol/L. Die Hydrolysen, die bei pH-Werten von 3 oder 5 erfolgten, zeigen reduzierende Enden bei ca. 3 mmol/L. Die Hydrolysen bei pH 4 und 7 zeigen nur eine geringe Anzahl von reduzierten Enden von 1 mmol/L bzw. 2 mmol/L.

Somit liegen die optimalen Bedingungen für die Hydrolyse mit dem Enzymgemisch CelluPract AS 100 (Charge Lieferung 2006) bei einem pH-Wert von 6 und einer Hydrolysetemperatur von 50°C.

3.1.2. Erste Reaktorhydrolyse des Scleroglucans mit AS 100

Das Ziel, welches mit einer Reaktorhydrolyse erreicht werden soll, ist eine große Menge Hydrolyseprodukt zu erhalten, die nach Aufarbeitung und Aufkonzentrierung weiterhin groß genug ist, um für andere Zwecke, wie zum Beispiel Fütterungsversuche, eingesetzt werden zu können. Der Glucosegehalt und die

Gesamtglucoseäquivalente besitzen am Anfang fast den gleichen Wert und somit liegt der Wert für die reduzierenden Enden am Glucan anfänglich bei ungefähr Null. Dies ist nicht verwunderlich, da durch die Aufarbeitung auch kleinere Bruchstücke des Glucans aus der Lösung abgetrennt wurden.

Bei der ersten Reaktorhydrolyse ist deutlich zu erkennen, dass die reduzierenden Enden an Glucan zunehmen (siehe dazu Abbildung 3-3). Dies bedeutet, dass das eingesetzte Scleroglucan in endo-Positionen durch die Enzymmischung gespalten wird. Außerdem ist aber auch ein Anstieg der freien Glucose zu beobachten, welche durch enzymatische Spaltung in exo-Positionen des Glucans entsteht. Der sprunghafte Anstieg aller drei Kurven vom Start bis Minute 10 in Abbildung 3-3 ist mit der Zugabe der Enzymlösung und den darin enthaltenen Zuckern (red. Enden) zu erklären. Die Werte bei Minute 100 und 130 sind auf Messfehler zurückzuführen.

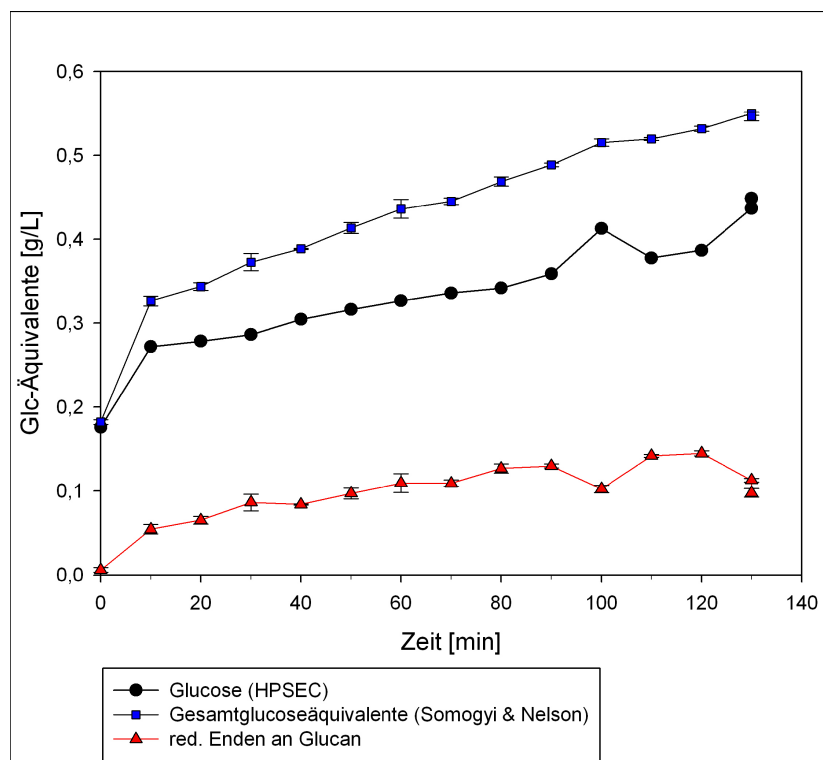


Abbildung 3-3: zeitlicher Verlauf der freien Glucose, der Gesamtglucoseäquivalente und der Differenz beider (entspricht red. Enden an Glucan in Glc-Äquivalenten [g/L]) für die 1. Reaktorhydrolyse

Es zeigt sich aber insgesamt ein sehr langsamer Hydrolyseverlauf, der mit einer Zunahme der reduzierenden Enden am Glucan von 0,09 g/L nach 120 Minuten weit unter dem Wert von 0,5 g/L nach 120 Minuten für eine Normalhydrolyse liegt. Welche

Ergebnisse hinsichtlich der Molekulargewichtsveränderung erreicht wurden, zeigen die Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5.

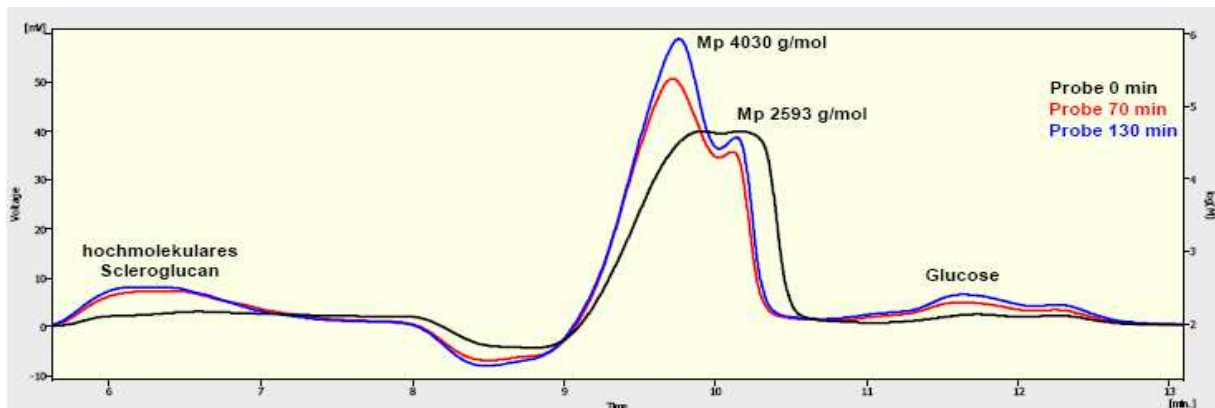


Abbildung 3-4: HPSEC-Chromatogramme der 1. Reaktorhydrolyse zur 0., 70. und 130. Minute mit Suprema 100 Säule (Auftrennungsbereich 10^2 bis 10^5 g/mol); Molekulargewichtsbestimmung über Kalibrierung mit Pullulanstandard; RI-Detektor

Auch aus Abbildung 3-4 geht eindeutig hervor, dass eine Hydrolyse stattgefunden hat, da das Glucosesignal im zeitlichen Verlauf steigt. Außerdem zeigt sich in der Nullprobe ein starkes Doppelsignal im Bereich zwischen 2.500 und 4.000 g/mol, welches sich während der Hydrolyse verändert. Das Signal trennt sich im Hydrolyseverlauf in zwei Signale, mit Signalmaxima bei 4.030 g/mol und 2.593 g/mol, auf. Da sich nur Ersteres im zeitlichen Verlauf erhöht, gehen wir davon aus, dass diese Fraktion durch die Hydrolyse gebildet wird und möglicherweise einer Scleroglucanfraktion entspricht. Ähnliches wurde auch schon für die Hydrolyse in kleinem Volumen gezeigt, allerdings mit etwas größerem Molekulargewicht. Dass die benutzte Säule (Suprema 100) das hochmolekulare Scleroglucan nicht gut auftrennen kann, zeigt sich in Abbildung 3-4 in einem sehr langen flachen Signal für die Probe zur 0. Minute. Daher wurden mit einer weiteren Säule (Suprema 30.000) die hohen Molekulargewichte aufgetrennt und in Abbildung 3-5 dargestellt. In Abbildung 3-5 zeigen sich alle Kurven im Bereich des hochmolekularen Scleroglucans ungefähr auf dem gleichen Niveau. Außerdem ist die Bildung einer kleineren Glucanfraktion bei ca. 120.000 g/mol zu erkennen, deren Konzentration allerdings nur sehr schwach ist.

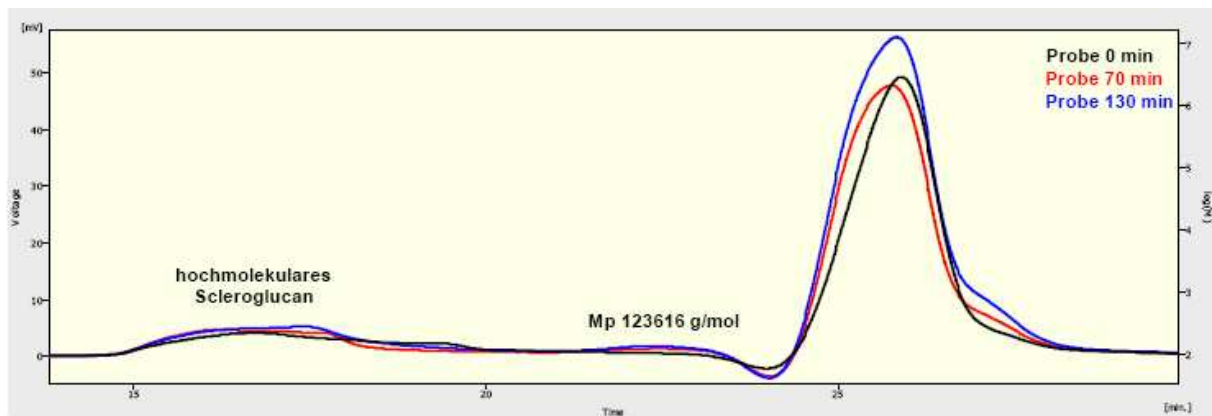


Abbildung 3-5: HPSEC-Chromatogramme der 1. Reaktorhydrolyse zur 0., 70. und 130. Minute mit Suprema 30.000 Säule (Auftrennungsbereich 5.000 bis 30×10^6 g/mol); RI-Detektor

Das in allen HPSEC-Chromatogrammen auftretende negative Signal ließ sich nach einigen Versuchen auf die, zur Stabilisierung hinzu gegebene, Ameisensäure zurückführen. Es könnte sein, dass dieses negative Signal schwache positive Signale überlagert und damit verdeckt. Mögliche gebildete Glucanfraktionen in diesem Molekulargewichtsbereich lassen sich hier nicht nachweisen. Es zeigt sich zwar in Abbildung 3-3, dass eine schwache Hydrolysereaktion stattgefunden hat, allerdings ist in Abbildung 3-5 keine signifikante Abnahme des Scleroglucangehaltes zu erkennen. In dieser Reaktorhydrolyse wurde ein Großteil des Glucans nicht hydrolysiert.

3.1.3. Zweite Reaktorhydrolyse

Da das nicht-hydrolysierte Restglucan aus dem Ansatz der ersten Reaktorhydrolyse durch Querstromfiltration abgetrennt werden konnte, wurde eine weitere Hydrolyse durchgeführt. Es wurde vermutet, dass eine schlechte Durchmischung des Reaktors, bei der ersten Reaktorhydrolyse, der Grund für den langsamen Verlauf war. Deswegen wurde die Rührerdrehzahl bei der zweiten Reaktorhydrolyse auf 80 UPM erhöht. Prinzipiell ist in Abbildung 3-6 ein ähnlicher Verlauf der Kurven zu sehen, wie für die erste Reaktorhydrolyse. Die Kurve für die freie Glucose zeigt eine sehr gleichmäßige Freisetzung an. Dagegen scheinen die Gesamtglucoseäquivalente nach 150 Minuten langsam einen Plateauwert zu erreichen.

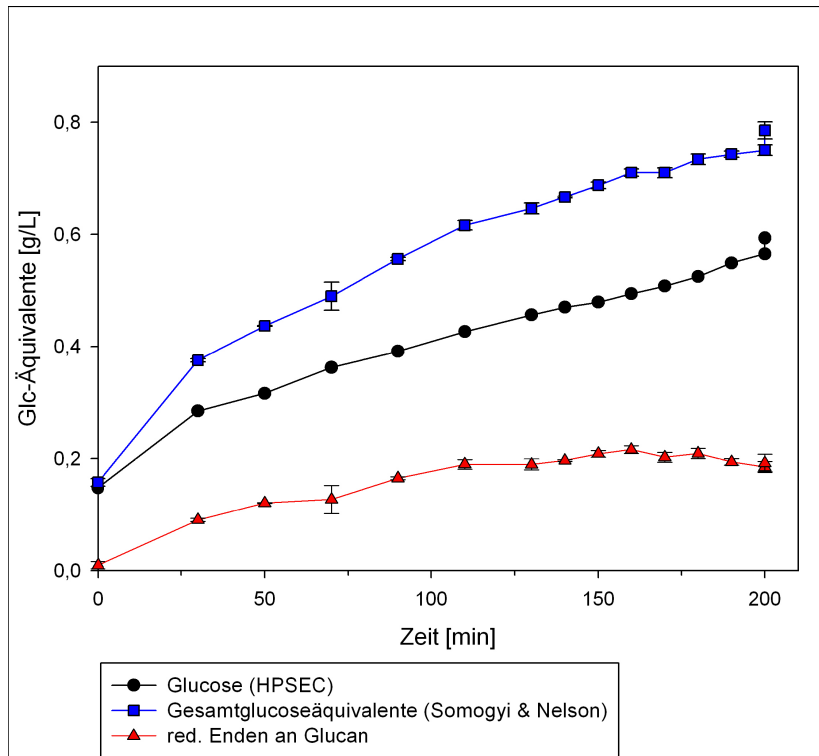


Abbildung 3-6: zeitlicher Verlauf der freien Glucose, der Gesamtglucoseäquivalente und der Differenz beider (entspricht red. Enden an Glucan in Glc-Äquivalenten [g/L]) für die 2. Reaktorhydrolyse

Wie schon Abbildung 3-6, zeigt auch Abbildung 3-7 die Freisetzung von Glucose, durch die Erhöhung des entsprechenden Signals an. Anders aber als in Abbildung 3-4 verändern sich die Signale bei ca. 2.370 g/mol und 3.910 g/mol in ihrer Höhe fast nicht. Bei dieser Hydrolyse wurden also die Fraktionen dieses Molekulargewichtsbereiches nicht weiter gebildet. Ein weiterer Unterschied zur ersten Reaktorhydrolyse ist, dass die Signale für das hochmolekulare Scleroglucan im Laufe der Hydrolyse signifikant abnehmen. Dies bedeutet, dass eine größere Menge an Glucan hydrolysiert wurde als in der vorangegangenen Reaktorhydrolyse. Allerdings geht aus Abbildung 3-7 nicht hervor, ob das hochmolekulare Scleroglucan ausschließlich zu Glucose umgesetzt wurde.

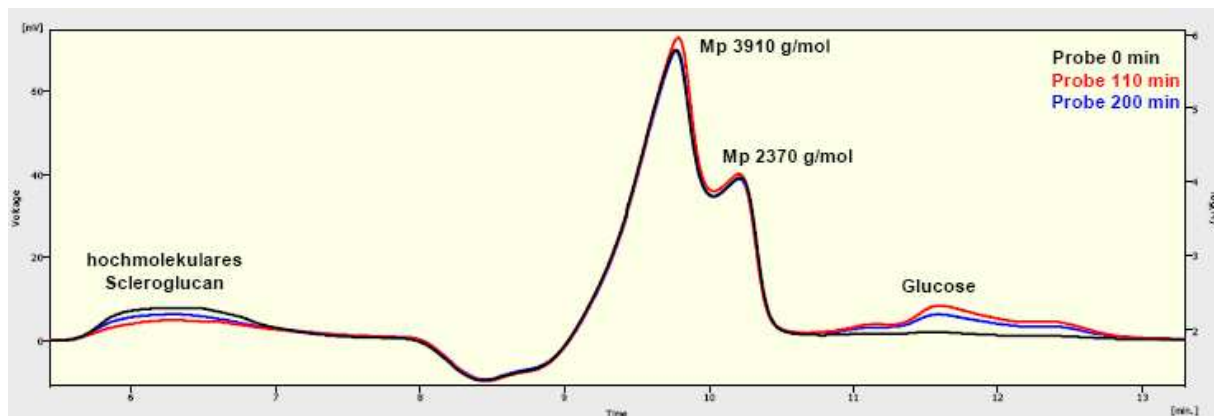


Abbildung 3-7: HPSEC-Chromatogramme der 2. Reaktorhydrolyse zur 0., 110. und 200. Minute mit Suprema 100 Säule (Auftrennungsbereich 100 bis 10^5 g/mol); Molekulargewichtsbestimmung über Kalibrierung mit Pullulanstandard; RI-Detektor

In Abbildung 3-8 wird daher die Bildung von kleineren Scleroglucanfraktionen gezeigt, wie sie auch schon bei der ersten Reaktorhydrolyse entstanden sind. Diesen Polymerketten kann ein Molekulargewicht von ungefähr 120.000 g/mol zugeordnet werden. Ob allerdings die reduzierenden Enden am Glucan, welche nachweislich gebildet wurden, allein an dieser sehr geringen Menge Scleroglucan zu finden sind, bleibt unklar. Auch in den Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8 wird die Analyse der mittleren Molekulargewichtsbereiche durch die Überlagerung, des von Ameisensäure verursachten negativen Signals, gestört.

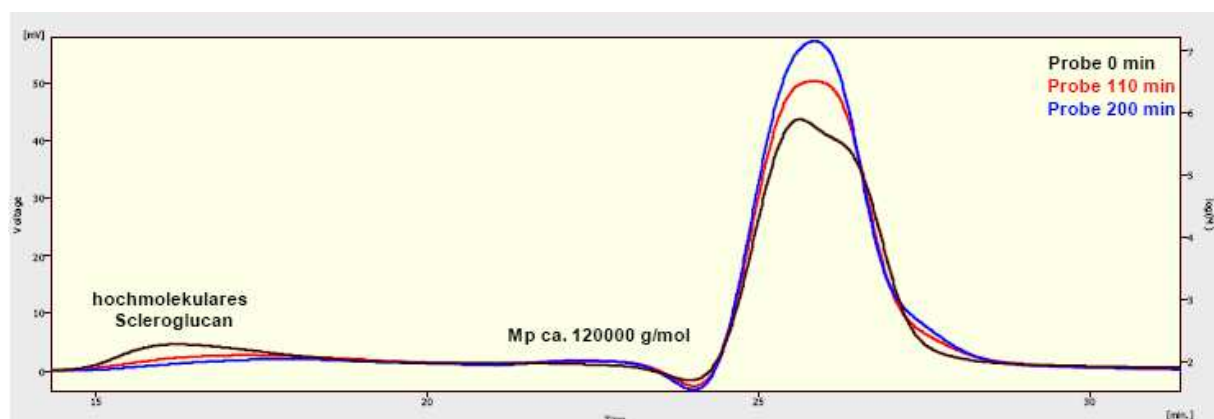


Abbildung 3-8: HPSEC-Chromatogramme der 2. Reaktorhydrolyse zur 0., 110. und 200. Minute mit Suprema 30.000 Säule (Auftrennungsbereich 5.000 bis 30×10^6 g/mol); RI-Detektor

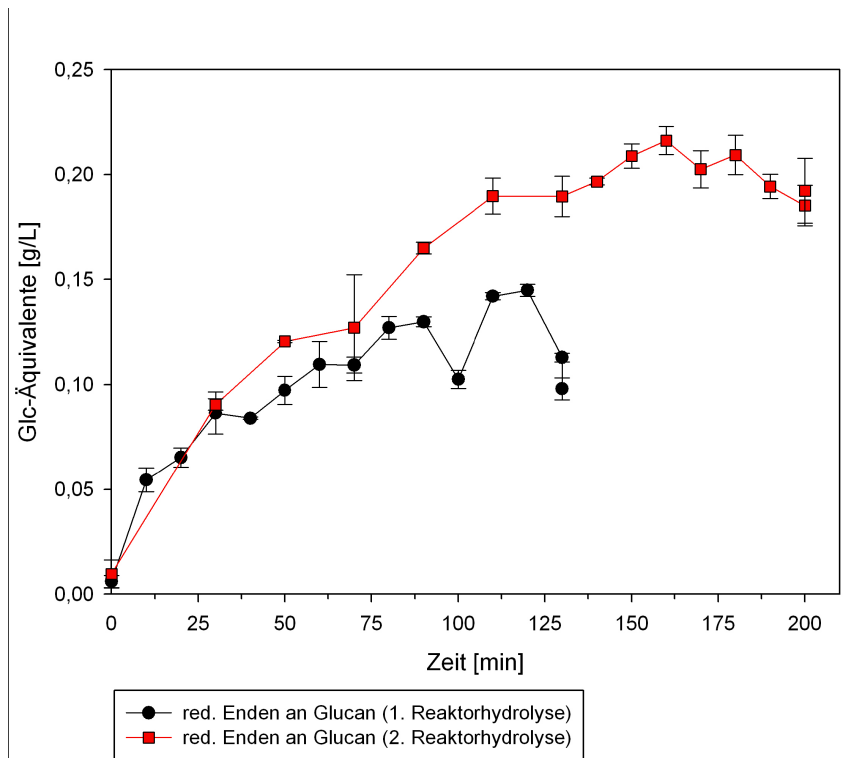


Abbildung 3-9: Vergleich der zeitlichen Verläufe der red. Enden an Glucan in GlcÄquivalenten [g/L] von erster und zweiter Reaktorhydrolyse (die Werte entsprechen der Differenz aus Gesamtglucoseäquivalenten nach Somogyi und Nelson und freier Glucose)

Ein Vergleich der beiden Reaktorhydrolysen zeigt, dass ungefähr bis zur 80. Minute beide Hydrolysen einen ähnlichen Verlauf haben (siehe Abbildung 3-9), und danach die zweite Reaktorhydrolyse, bis zur 150. Minuten herum, mehr reduzierende Enden am Glucan gebildet hat.

Um das Produkt der Hydrolyse (Probenbezeichnung RH2), welches durch Querstromfiltration gewonnen wurde, besser zu charakterisieren, wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Eine Probe von nativem Scleroglucan, eine flüssige Filtratprobe RH2 und eine gefriergetrocknete Probe von RH2 (GFP) wurden miteinander verglichen und gegen Zuckerstandards aufgetragen. Wie zu erwarten war, unterscheiden sich die beiden Proben (rechts in Abbildung 3-10, Bahn RH2 und GFP) nur kaum. In beiden Proben sind vier Banden zu erkennen, wobei die Banden 2 und 4 sehr schwach sind. Sehr deutlich zu sehen ist die Glucosebande (Bande 1), welche in allen drei Proben auftaucht. Sie ist im nativen Glucan als Restglucose der Kultivierung enthalten und in den Proben RH2 und GFP zusätzlich bei der Reaktorhydrolyse entstanden. Durch die extrem hohe Salzkonzentration in diesen Proben erscheint die Glucose verschmiert. Auch die Banden 2 und 3 sind

dadurch wellig verlaufen. Bei der Bande 2 könnte es sich um Gentiobiose (Gen) handeln. Dieses Disaccharid besteht aus zwei Glucoseeinheiten, welche β -(1,6) verknüpft sind und entspricht der Seitenkette des Scleroglucans. Auch im nativen Glucan ist diese Bande schwach zu erkennen. Voraussichtlich ist sie durch teilweisen Abbau des Glucans vom Organismus während der Kultivierung entstanden. Bei Bande 3 wird vermutet, dass es sich um ein Trisaccharid handelt. Dieses Trisaccharid könnte beim enzymatischen Abbau entstanden sein und aus drei Glucoseeinheiten mit je einer β -(1,3)-Bindung und einer β -(1,6)-Bindung bestehen. Im nativen Glucan ist es nicht zu finden. Auch bei Bande 4 wird es sich um ein solches Bruchstück handeln, welches allerdings nicht genauer zugeordnet werden kann. Voraussichtlich ist es ein Mehrfachzucker mit mehr als drei Untereinheiten.

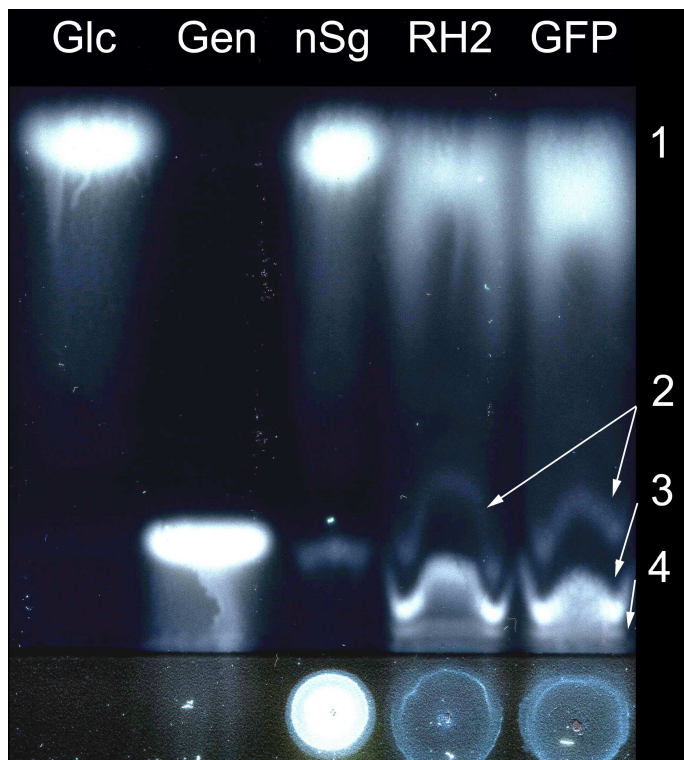


Abbildung 3-10: Dünnschichtchromatographie vom nat. Scleroglucan (nSg), fl. Hydrolyseprod. der 2. Reaktorhydrolyse (RH2) und gelöstem, gefriergetr. Hydrolyseprod. (GFP); (Standard 2,5 g/L Glucose (Glc); 3 g/L Gentiobiose (Gen); Bild in Farbumkehr

Durch eine Querstromfiltration wurde das restliche hochmolekulare Glucan vom zweiten Reaktorhydrolyseansatz entfernt. Ein Teil des Filtrates wurde gefriergetrocknet. Dabei wurden aus 6 L Filtrat 47,6 g Feststoff gewonnen. Dieses enthält neben Scleroglucanfragmenten auch die zugegebenen Salze (Salze der Ameisensäure), Proteine (Enzymmischung), Glucose und andere Zucker.

Die gefriergetrocknete Scleroglucan Fraktion wurde durch Dialyse weiter aufgereinigt. Es wurde ein Dialyseschlauch mit einem Cut off von 1.000 g/mol verwendet. Dialysiert wurde in 0,1 g/L NaN₃. Das dialysierte Produkt wurde erneut gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Fraktion wurde im Institut für Technische Chemie (TU Braunschweig) mit einem Lichtstredetektor vermessen.

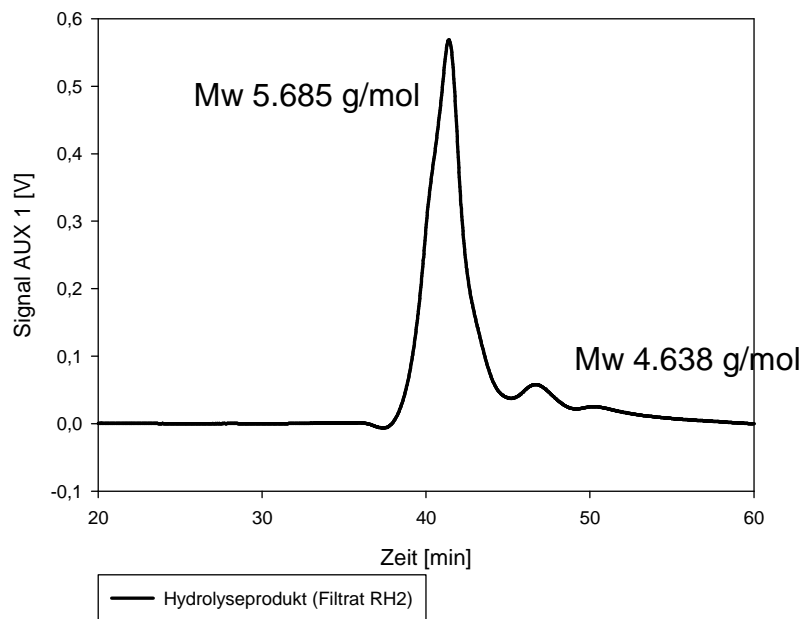


Abbildung 3-11: GPC-Chromatogramm von gefriergetrockneten dialysiertem Filtrat der 2. Reaktorhydrolyse. Lichtstredetektor; Säule PL-aquagel OH mixed Auftrennungsbereich 10²-10⁶ g/mol.

Die Abbildung 3-11 zeigt das Chromatogramm der dialysierten und gefriergetrockneten Fraktion der 2. Reaktorhydrolyse. Es ist ein deutliches Signal bei einem Molekulargewicht von 5.685 g/mol zu erkennen. Ein wesentlich schwächeres Signal liegt bei 4638 g/mol. Die in Abbildung 3-10 beschriebenen Mono- und Disaccharide wurden durch die Dialyse entfernt. Die Fraktion liegt für weitere Versuche entsalzen und von Mono- und Disacchariden befreit vor.

3.1.4. Optimierung der Hydrolyse mit AS 100, Charge 2008

Für spätere Hydrolyseversuche sollte eine zweite Charge (Lieferung 2008) CelluPract® AS100 verwendet werden. Durch einen Testlauf (nicht dargestellt) wurde aber festgestellt, dass diese Charge eine viel geringere β -Glucanaseaktivität

aufwies, als die zuvor benutzte Charge (Lieferung 2006). Daraufhin wurden Optimierungsversuche für Temperatur und pH-Wert durchgeführt

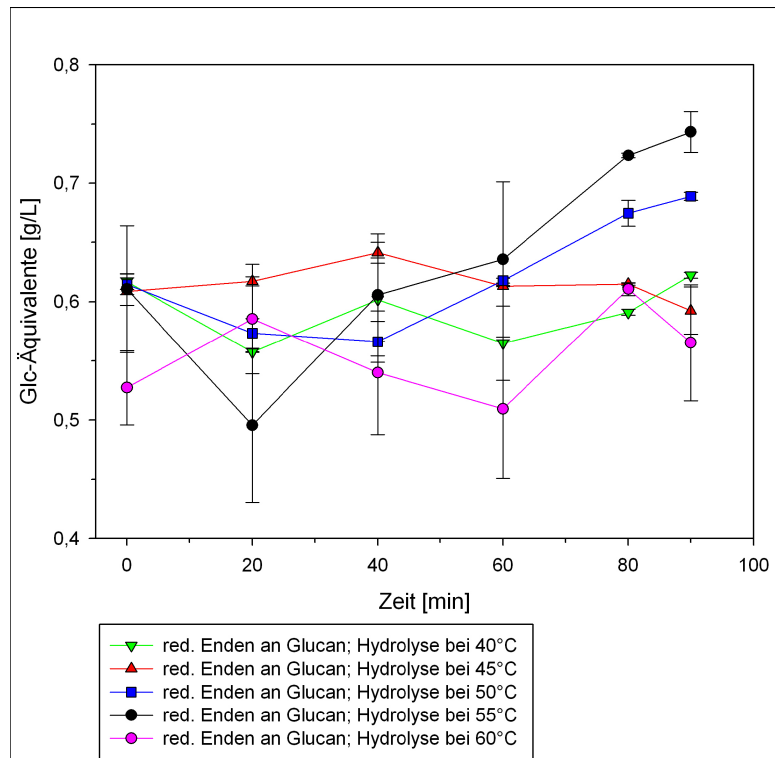


Abbildung 3-12: Zeitlicher Verlauf der Bildung von red. Enden an Glucan in Glc-Äquivalenten [g/L] für Hydrolysen bei unterschiedlichen Temperaturen; Bed.: pH 6, Glucankonz. 2 g/l (die Werte entsprechen der Differenz aus Gesamtglucoseäquivalenten nach Somogyi und Nelson und freier Glucose)

Für die Variation der Temperatur zeigt Abbildung 3-12 die entsprechenden Verläufe für die reduzierenden Enden am Glucan. Trotz der relativ großen Fehler, den die Messwerte aufweisen zeigt sich aber, dass die Hydrolysen bei 55°C und 50°C am erfolgreichsten verlaufen sind. Mit einer Zunahme von 0,13 g/L an reduzierenden Enden am Glucan nach 90 Minuten ergibt die Hydrolyse bei 55°C die beste Ausbeute. Bei 40°C, 45°C und 60°C hingegen scheint keine Hydrolyse stattzufinden, da fast keine Zunahme der Gesamtglucoseäquivalente (nicht dargestellt) beobachtet wird. Verglichen mit anderen Hydrolysen bei pH 6 ist die Zunahme der reduzierenden Enden mit 0,13 g/L viel kleiner als zum Beispiel bei der Normalhydrolyse in (0,41 g/L nach 90 Minuten).

Für die Variation des pH-Wertes wurden die Hydrolysen bei der neuen, optimalen Reaktionstemperatur von 55°C durchgeführt. Dabei zeigt sich in Abbildung 3-13,

dass für die Hydrolyse bei pH 5 das beste Ergebnis erzielt wurde, da dort die Zunahme der reduzierenden Enden am stärksten war. Auch bei pH 4 und 6 scheint die β -Glucanase noch zu katalysieren, wobei die Kurven schon deutlich flacher verlaufen. Nur bei pH 7 und 8 zeigt das Enzym kaum eine Aktivität, da hier die flache Steigung über einen Zeitraum von vier Stunden vernachlässigt werden kann.

Verglichen mit einer Normalhydrolyse, bei der nach 2 Stunden 0,5 g/mol Glucoseäquivalente als reduzierende Enden am Glucan entstanden sind, hat die zweite Charge CelluPract® AS100, mit 0,29 g/mol Glucoseäquivalenten nach 2 Stunden Hydrolyse unter Optimalbedingungen, eine um 70% niedrigere endo-1,3- β -Glucanaseaktivität, als die zuvor verwendete Charge Enzym.

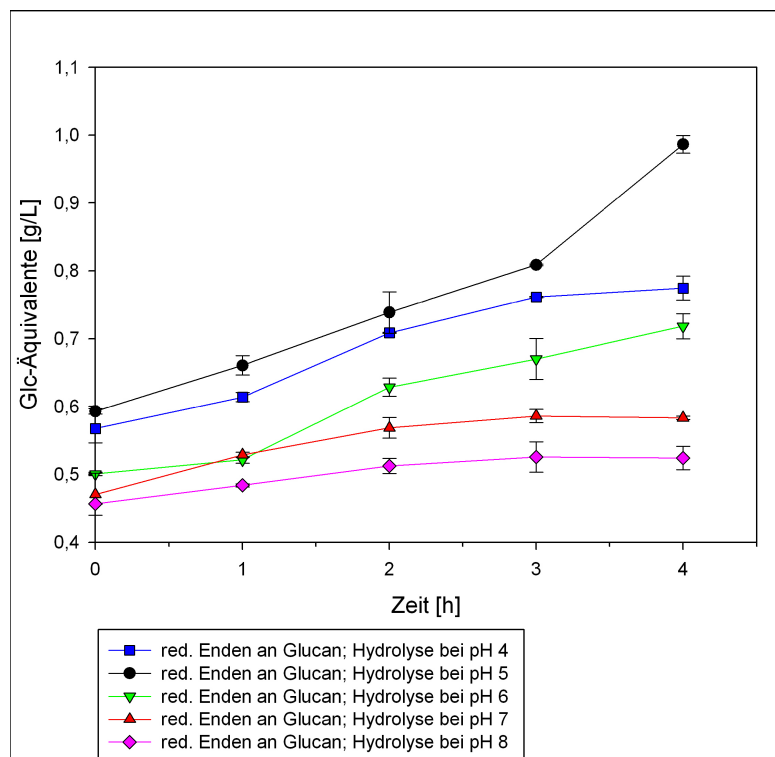


Abbildung 3-13: zeitlicher Verlauf der Bildung von red. Enden an Glucan in Glc-Äquivalenten [g/L] für Hydrolysen bei unterschiedlichen pH-Werten; Bed.: 55°C, Glucankonz. 2 g/l (die Werte entsprechen der Differenz aus Gesamtglucoseäquivalenten nach Somogyi und Nelson und freier Glucose)

3.1.5. Hydrolyse mit der β -1,3-D-Glucanase aus *Helix pomatia* und der Glucanase aus *Bacillus subtilis*

Es wurden ebenfalls Hydrolyse mit den kommerziell erhältlichen β -1,3-D-Glucanase aus *Helix pomatia* und der β -Glucanase aus *Bacillus subtilis* durchgeführt. Hierbei

sind nur die Veränderungen der reduzierenden Enden betrachtet worden. Diese sind gegen die Zeit aufgetragen.

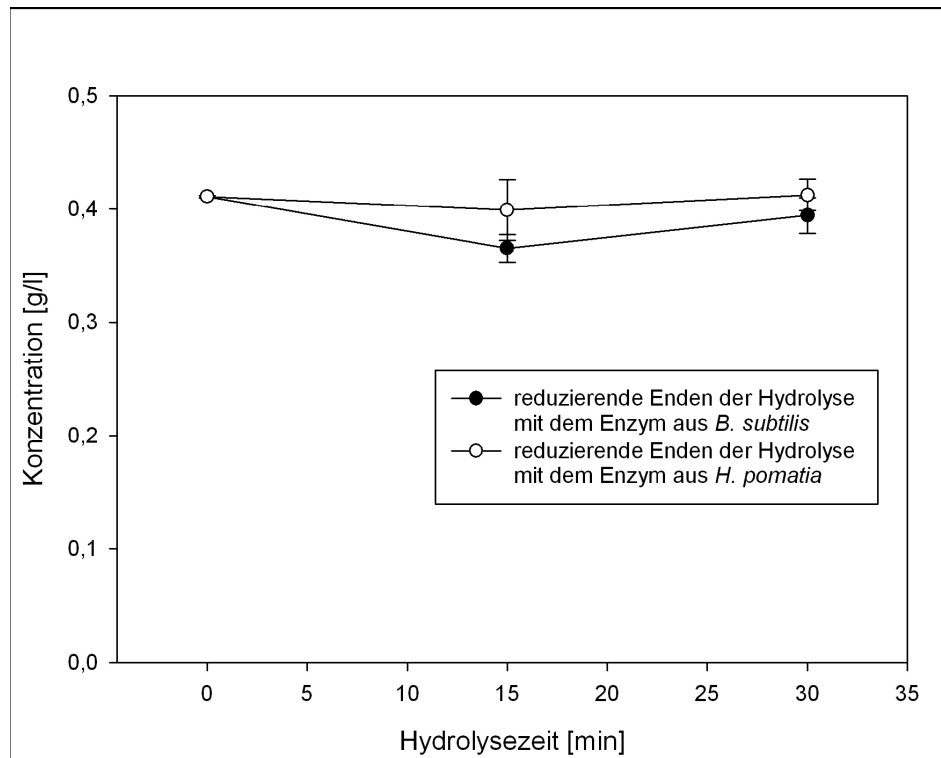


Abbildung 3-14: Darstellung der zeitlichen Veränderung der Konzentration der reduzierenden Enden bei Hydrolysen von 3 g/L Scleroglucan mit Enzymen aus *H. pomatia* (pH 5, T=37°C) und *B. subtilis* (pH=6, T=55°C). Reaktionsbedingungen laut Hersteller.

In Abbildung 3-14 zeigt die Veränderung der Konzentration an reduzierenden Enden bei Hydrolysen mit den β -Glucanasen aus *H. pomatia* und *B. subtilis*. Bei der β -1,3-D-Glucanase von *H. pomatia* ist für die Hydrolyse keine Änderung der Konzentration der reduzierenden Enden zu erkennen. Auch für die β -Glucanase aus *B. subtilis* ist nur eine leichte Erniedrigung zu erkennen. Der Anfangs und der Endwert der Konzentration der reduzierenden Enden stimmen nahezu überein.

3.1.6. Hydrolyse mit der Laminarinase aus *Trichoderma species*

Die Hydrolyse von Scleroglucan mit dem Enzym Laminarinase aus *Trichoderma species* wird im Folgenden nur durch die Konzentration der reduzierenden Enden der Proben gegen die Zeit aufgetragen.

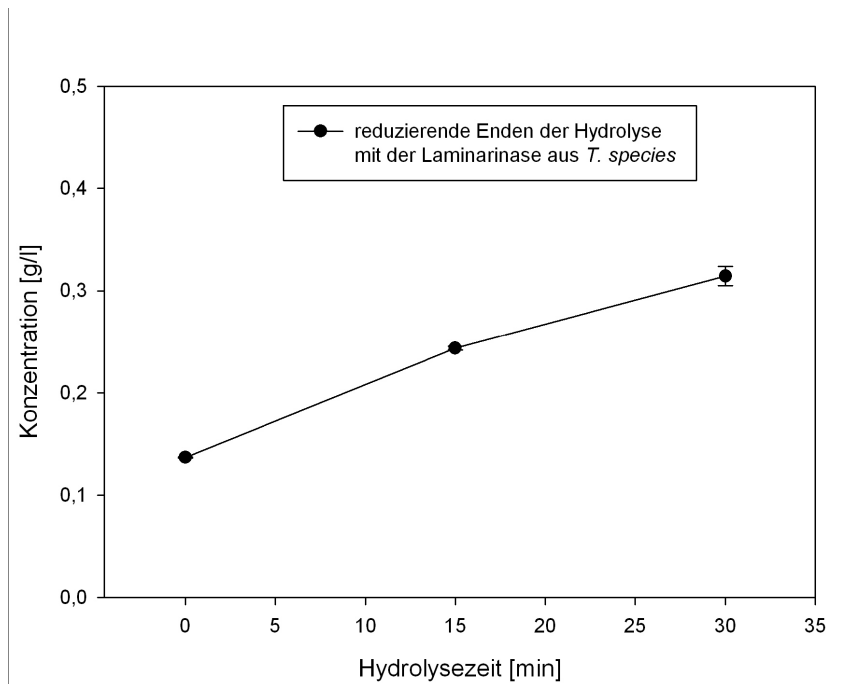


Abbildung 3-15: Darstellung der zeitlichen Veränderung der Konzentration der reduzierenden Enden bei Hydrolysen von 1 g/L Scleroglucan mit der Laminarinase aus *T. species* bei pH=5 und 37°C.

Abbildung 3-15 zeigt die Veränderung der Konzentration der reduzierenden Enden bei der Hydrolyse von Scleroglucan mit einer Laminarinase. Die Anfangskonzentration der reduzierenden Enden liegt bei ca. 0,13 g/L. Sie steigt dann an bis nach 30 Minuten eine Konzentration von 0,32 g/L erreicht ist. Die Laminarinase zeigt somit eine sehr hohe Aktivität. Ist jedoch aus Kostengründen nicht realisierbar.

3.1.7. Inkubation von Scleroglucan mit dem Darminhalt verschiedener Spezies

Nachdem die Ferkel-Fütterung mit Glucanen nicht aussagekräftig verlief, sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß Glucane im Darm verschiedener Tiere abgebaut werden. Gefriergetrockneter Darminhalt wurde von Prof. Breves, Physiologisches Institut, Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

Als erster Schritt war es notwendig zu überprüfen, ob der gefriergetrocknete Darminhalt und der entsprechende Puffer Auswirkungen auf die Analysemethoden

haben. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Fällung mit Isopropanol, sowie die Bestimmung der reduzierenden Enden nach Somogyi-Nelson durchführbar sind.

Zur Simulation der Zersetzung des Scleroglucans im Darm des Tieres wurde unter lebensnahen Bedingungen in einem Batch-Ansatz der jeweilige Darminhalt (Pferd, Schwein und Rind) für 24 h inkubiert. Es wurden 150 ml Scleroglucanlösung (Scleroglucan 2 g/l mit Salzgehalt des jeweiligen Puffers) mit 1,5 g gefriergetrocknetem Darminhalt versetzt, das in einem Nylonsäckchen dazugegeben wurde. Unter ständigem Rühren wurde bei 38°C für 24 h inkubiert. Mit einer für das Tier spezifischen Salzzusammensetzung wird die Darmumgebung durch einen Puffer außerhalb des Tieres simuliert. Bei der Verwendung von Pferde- und Schweinedarminhalt wurde der gleiche Puffer verwendet und der pH betrug 7,2, beim Panseninhalt betrug der pH 7,4. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand für die Analysen verwendet. Parallel dazu wurde ein Ansatz mit Puffer statt Glucan mitgeführt. Dieser dient zur Korrektur der Werte.

3.1.8. Pferdedarminhalt

Der Versuch wurde dreimal durchgeführt (P1, P2, P3). Es ergab sich eine Abnahme der red. Enden, die unterschiedlich stark ausfiel (Abbildung 3-16 links). Das fällbare Glucan nimmt ebenfalls ab (Abbildung 3-16 rechts). Bei P1 konnte nur 4% des Ausgangswertes wieder gefunden werden, bei P2 und P3 waren dies 45,7% bzw. 40,7%. Die nahe beieinander liegenden Werte von P2 und P3 konnten durch die Viskositätsmessungen bestätigt werden (Abbildung 3-17). Die Unterschiede zwischen P1 gegenüber P2 und P3 könnte auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des Darminhaltes zurückzuführen sein. Bei den Ansätzen kann nicht garantiert werden, dass in jedem Ansatz die gleiche Zusammensetzung an Mikroorganismen vorhanden ist.

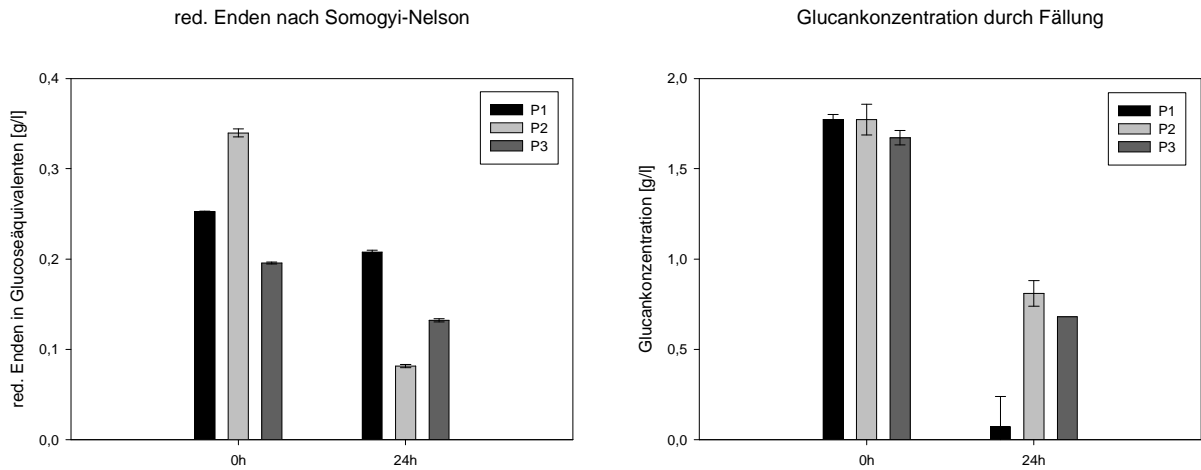


Abbildung 3-16: Links: Anzahl red. Enden in Glucoseäquivalenten einer 2 g/l Scleroglucanlösung vor und nach der Inkubation mit Pferdedarminhalt. Rechts: Menge fällbares Scleroglucan einer 2 g/l Scleroglucanlösung vor und nach der Inkubation mit Pferdedarminhalt.

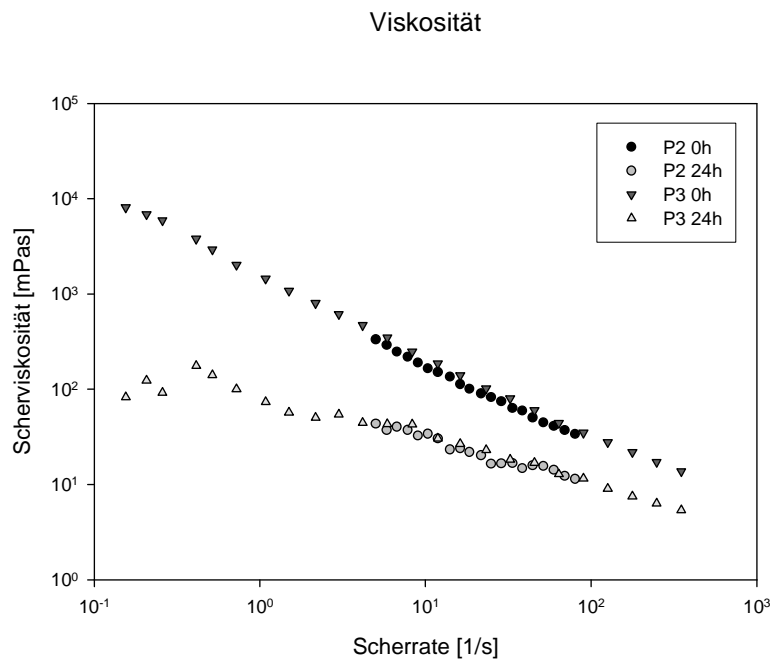


Abbildung 3-17: Scherviskositäten von Scleroglucan vor und nach der Inkubation mit Pferdedarminhalt

Die Analyse von P3 mittels GPC ergab, dass nach 24 h weniger Moleküle mit einem Molekulargewicht > 1.660.000 g/mol vorhanden sind, als zu Beginn (Abbildung 3-18). Die vorangegangenen Ergebnisse konnten hiermit bestätigt werden.

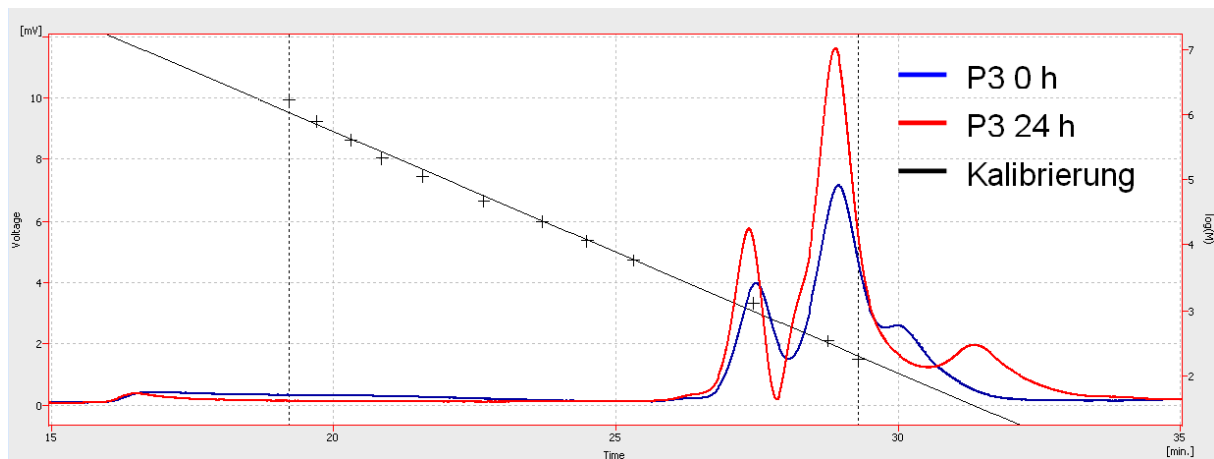


Abbildung 3-18: Ergebnisse der GPC für P3 nach 0 h (blau) und 24 h (rot). Verdünnung der Proben von 1:20. Die Kalibrierung (schwarz) deckt einen Bereich von 1.660.000 – 180 g/mol ab.

3.1.9. Schweinedarminhalt

Beim Schweinedarminhalt ergaben sich nach 24 h in beiden Ansätzen (S1, S2) eine leichte Zunahme der reduzierenden Enden um 0,5% (S1) bzw. um 26,2% (S2) (Abbildung 3-19 links). Die Menge an fällbarem Glucan erhöhte sich ebenfalls nach 24 h (Abbildung 3-19 rechts). Dieses könnte auf, aus dem Darm heraus gelöste, Zucker mit reduzierenden Enden zurückzuführen sein. Die Viskositätsmessungen zeigten nur eine sehr geringe Abnahme der Scherviskosität nach der Inkubation (Abbildung 3-20).

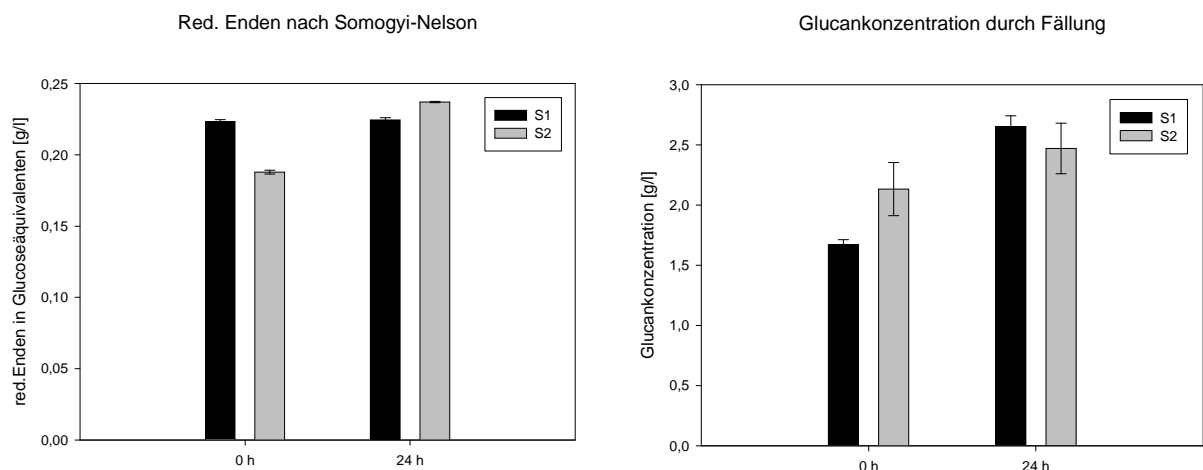


Abbildung 3-19: Links: Anzahl red. Enden in Glucoseäquivalenten einer 2 g/l Scleroglucanlösung vor und nach der Inkubation mit Schweinedarminhalt. Rechts: Menge fällbares Scleroglucan einer 2 g/l Scleroglucanlösung vor und nach der Inkubation mit Schweinedarminhalt

Scherviskosität

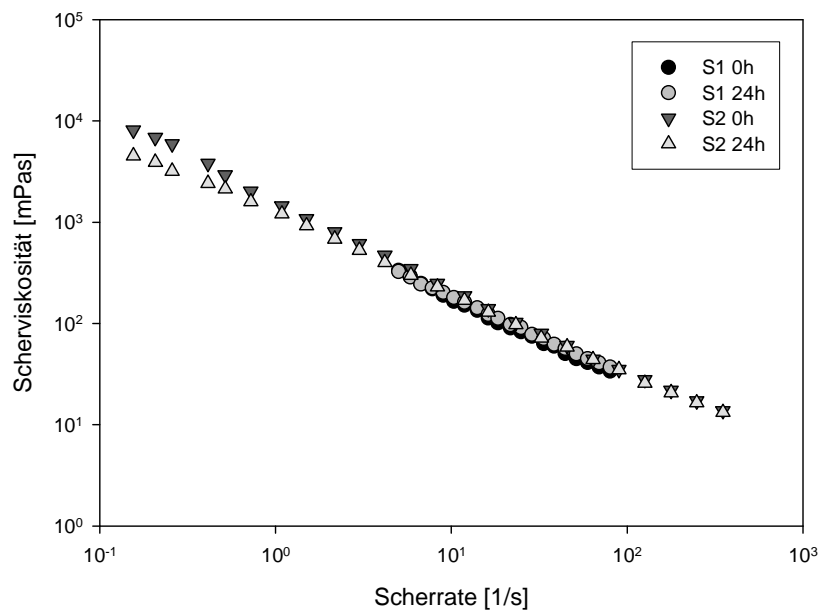


Abbildung 3-20: Scherviskositäten von Scleroglucan vor und nach 24 h Inkubation mit Schweinedarminhalt

Die leicht reduzierte Viskosität nach dem Verdauungsversuch spiegelt sich in den Ergebnissen der GPC wieder, indem beide Peaks im niedermolekularen Bereich leicht erhöht werden.

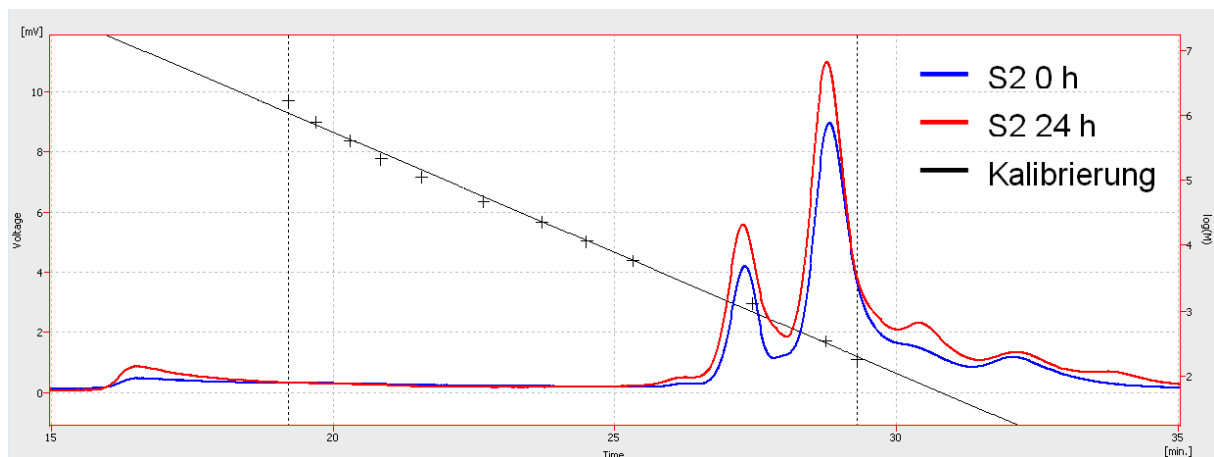


Abbildung 3-21: Ergebnisse der GPC für S2 nach 0 h (blau) und 24 h (rot). Verdünnung der Proben von 1:20. Die Kalibrierung (schwarz) deckt einen Bereich von 1.660.000 – 180 g/mol ab.

3.1.10. Panseninhalt vom Rind

Die Inkubation mit Panseninhalt wurde zweimal (R1, R2) durchgeführt. Bei beiden Ansätzen ist ein starker Rückgang der red. Enden auf 5,6% (R1) bzw. 6,3% (R3) (Abbildung 3-22 links) zu beobachten. Die Viskosität wurde stark bis auf den Wert von Wasser (ca. 1 mPas) reduziert). Die Fällbarkeit wird durch den anderen Puffer beeinflusst, da hier die Werte nach Abzug von ausgefallenen Salzen und Pansenbestandteilen negativ werden (Abbildung 3-22 rechts).

Aufgrund der geringen Glucankonzentration wurden die Proben unverdünnt mit der GPC vermessen. Es sind geringe Konzentrationen an Scleroglucan im Bereich von 4.600.000 g/mol bis 5.000 g/mol zu finden (Abbildung 3-23).

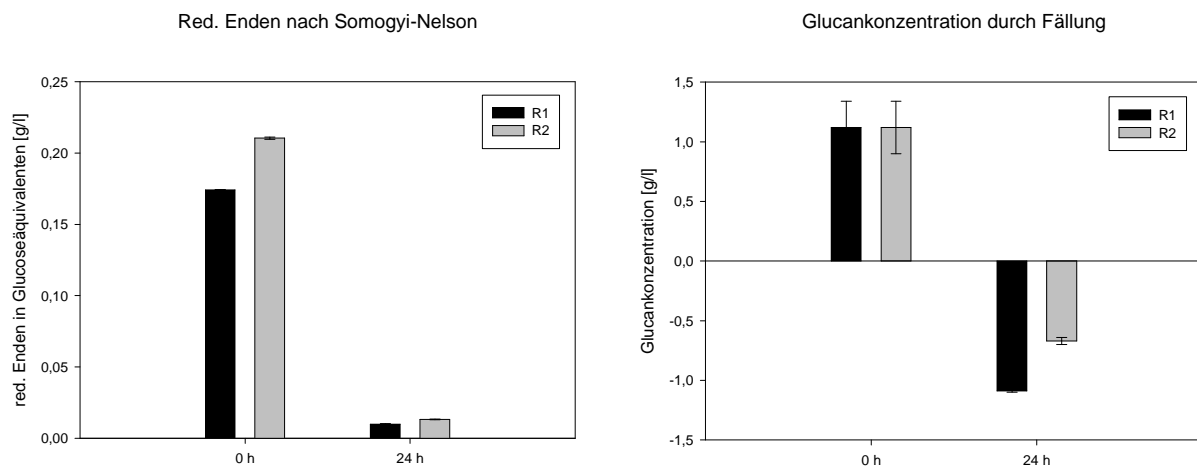


Abbildung 3-22: Links: Anzahl red. Enden in Glucoseäquivalenten einer 2 g/l Scleroglucanlösung vor und nach der Inkubation mit Panseninhalt rechts: Menge fällbares Scleroglucan einer 2 g/l Scleroglucanlösung vor und nach der Inkubation mit Panseninhalt

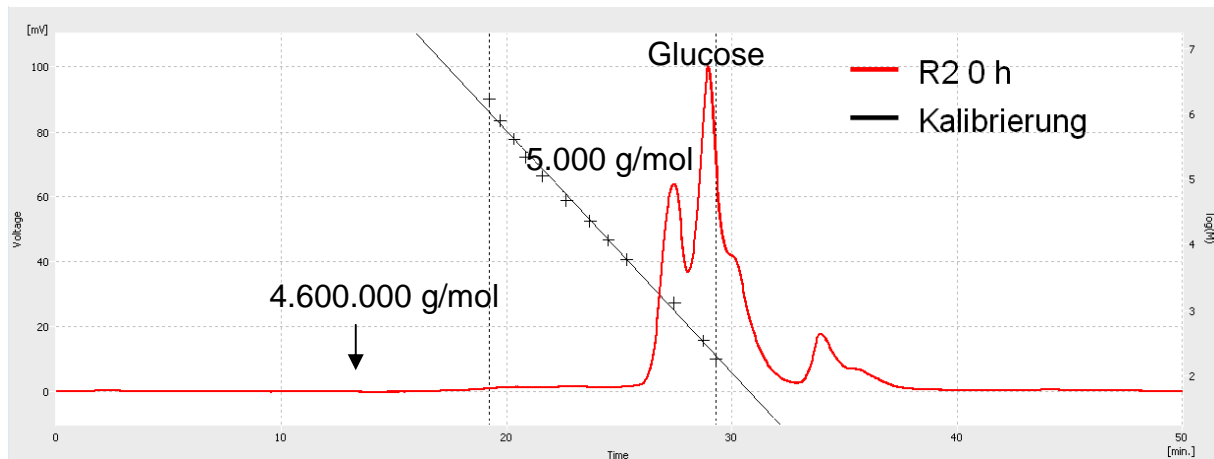


Abbildung 3-23: Ergebnisse der GPC für R2 nach 24 h (rot). Probe wurde unverdünnt vermessen. Die Kalibrierung (schwarz) deckt einen Bereich von 1.660.000 – 180 g/mol ab.

3.2. Ussing-Kammer

Das mit 5-DTAF fluoreszenzmarkierte native Scleroglucan wurde verwendet um zu testen, ob ein Transport durch den Darm des Schweines erfolgt. Dazu wurden 200 μ L einer Scleroglucanlösung mit 2 g/L zu den 10 mL der Elektrolytlösung der mucosalen Seite gegeben. Erfolgt ein Transport durch die Darmwand, muss Scleroglucan auf der serosalen Seite zu finden sein. In Abbildung 3-24 ist die Fluoreszenz in Prozent dargestellt. Dabei wurde die Nullprobe, gleiche Menge Scleroglucanlösung auf 10 mL Elektrolytlösung bei gleicher Temperatur und Versuchsdauer inkubiert, auf 100 % gesetzt, um den Einfluss der Versuchsbedingungen auf den Fluoreszenz Farbstoff auszuschließen. Es erfolgte pro Darmabschnitt (mittleres Jejunum, Ileum mit und nur payersche Streifen und Colon) eine dreifach Bestimmung. In Abbildung 3-24 ist zu erkennen, dass für alle untersuchten Darmabschnitte fast 100% Fluoreszenz auf der mucosalen Seite zu finden sind. Der geringe Anteil von unter 1%, der auf der serosalen Seite zu finden ist, geht auf freies 5-DTAF in der Scleroglucanlösung zurück. Es ist kaum möglich, das freie 5-DTAF beim Markierungsvorgang komplett aus der Scleroglucanlösung zu bekommen.

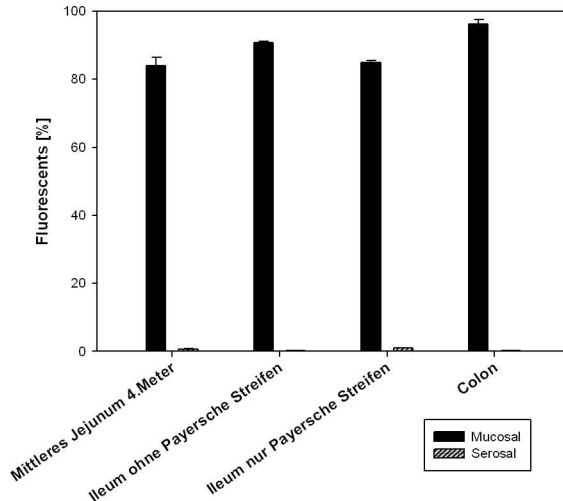


Abbildung 3-24: Transportversuch durch den Schweinedarm im Jejunum, Ileum mit und ohne payersche Streifen und dem Colon. Diagramm zeigt die Fluoreszenz des nativen Scleroglucans in %. mucosalen Seite ist die Vorlageseite.

3.3. Aktivierung von Dendritischen Zellen

Zunächst wurden DCs mit unterschiedlichen Konzentrationen des vollständigen β -Glucans stimuliert. Jedoch konnten im Konzentrationsbereich von 0.1 - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ keine signifikanten Einflüsse auf die Expression von Reifungsmarkern und die endozytotische oder stimulatorische Fähigkeit der DCs nachgewiesen werden. Daher wurden im nächsten Schritt verschiedene kürzerkettige β -Glucan-Hydrolysate untersucht.

Abbildung 3-25 zeigt die Ergebnisse der FACS-Analysen. β -Glucan A (1 - 5 kDa) induzierte eine erhöhte Expression der Reifungsmarker CD40 und CD80/86 und hatte damit einen ähnlichen Effekt wie die Reifungsfaktoren LPS + $\text{TNF}\alpha$. Der Effekt der Glucane nahm mit steigender Molekülgröße ab. Eine erhöhte Expression von MHC-II war lediglich nach Stimulation mit β -Glucan B (5 – 10 kDa) induzierbar, wohingegen Glucan A die Expression hemmte. Abbildung 3-26 zeigt die Antigenaufnahme von Ova-DQ durch DCs. Eine durch $\text{TNF-}\alpha$ und LPS induzierte DC-Reifung führte zu einer Verminderung der Endozytose. Einen ähnlichen Effekt hatten auch die kürzerkettigen β -Glucane.

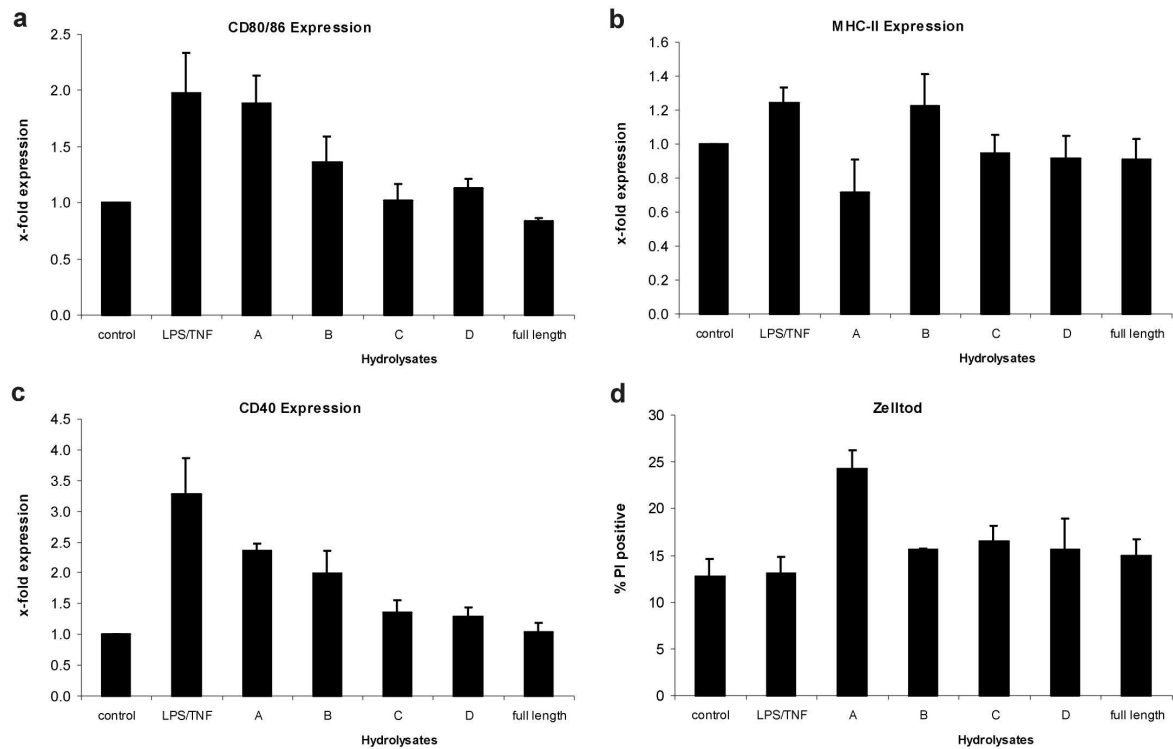


Abbildung 3-25: Einfluss von β -Glucanen unterschiedlicher Länge auf den Reifungszustand und die Vitalität von dendritischen Zellen MoDC wurden für 48 h mit LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) (Positivkontrolle), oder β -Glucanen (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) unterschiedlicher Moleküllängen (A= 1 – 5 kDa, B = 5 – 10 kDa, C = 10 – 100 kDa, D = > 100 kDa, full length 6.000 – 10.000 kDa) stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und Membranimmunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen (a) CD80/86, (b) MHC-II und (c) CD40 durchgeführt. Die Zellen wurden im Durchflußzytometer analysiert und die relative Expression der Marker gegenüber der unbehandelten Kontrolle berechnet. (d) Prozentsatz toter Zellen nach Stimulation durch Bestimmung der Propidiumiodidbindung. Die Diagramme zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten

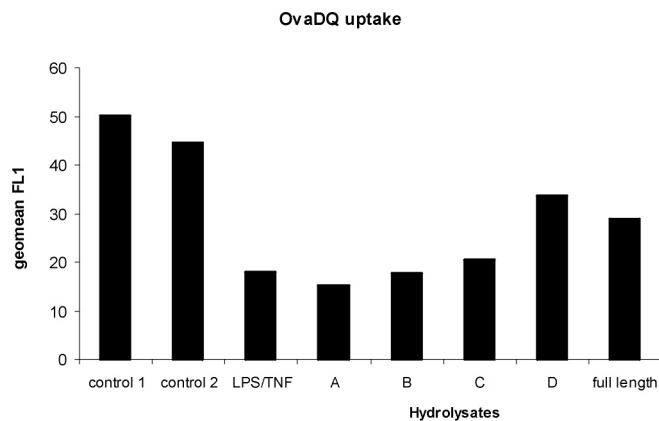


Abbildung 3-26: Einfluss von β -Glucanen unterschiedlicher Länge auf die Endozytoseaktivität dendritischer Zellen MoDC wurden für 48 h mit LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/mL) (Positivkontrolle), oder β -Glucanen (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) unterschiedlicher Moleküllängen (A= 1 – 5 kDa, B = 5 – 10 kDa, C = 10 – 100 kDa, D = > 100 kDa, full length 6.000 – 10.000 kDa) stimuliert. Danach wurde für 30 min Ova-DQ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) hinzugegeben. Diese Substanz bildet einen fluoreszierenden Farbstoff nach proteolytischer Degradation in Endosomen und kann zum Nachweis von rezeptorvermittelter Endozytose (Mannoserezeptor) verwendet werden. Die Fluoreszenzintensität der Zellen (geometrisches Mittel) wurde im Durchflußzytometer gemessen.

β -Glucan A konnte auch die stimulatorische Fähigkeit der DC erhöhen. Wie in Abbildung 3-27 gezeigt, wurde die Proliferation von peripheren Blutlymphozyten durch LPS/ $\text{TNF}\alpha$ oder β -Glucan A stimulierte DCs deutlich höher angeregt als durch unbehandelte oder mit vollständigem β -Glucan behandelte DCs.

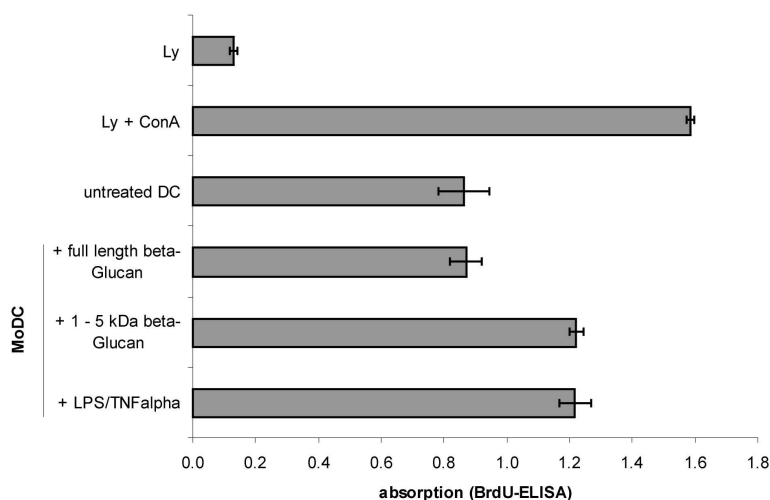


Abbildung 3-27: Einfluss von β -Glucanen unterschiedlicher Länge auf die stimulatorische Kapazität dendritischer Zellen

MoDC wurden für 24 h mit LPS (1 µg/mL) + TNFα (10 ng/mL) (Positivkontrolle), oder β-Glucan A (1 – 5 kDa) oder full length β-Glucan (6.000 – 10.000 kDa) stimuliert. Danach wurden die DCs geerntet und gewaschen, mit dem Superantigen SEB beladen und anschließend für 4 Tage mit autologen Lymphozyten (1:10) kultiviert. Die Proliferationsrate wurde mittels BrdU-ELISA bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichung von Triplikaten aus einem von zwei ähnlichen Experimenten. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass DCs des Schweines mit den vorliegenden β-Glucanen stimulierbar sind. Die mit kurzkettigen β-Glucanen stimulierten DCs entwickelten einen charakteristischen reifen Phänotyp mit erhöhter Expression der Reifungsmarker CD40 und CD80/86, verminderter Endozytoseaktivität und erhöhter stimulatorischer Kapazität. Insgesamt deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass kürzerkettige β-Glucanhydrolysate einen stärkeren Effekt haben als längerkettige Glucane; das vollständige β-Glucan hatte keinen nachweisbaren Einfluss. Konzentrationseffekte, die im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Molekulargewichten der β-Glucan-Hydrolysate stehen könnten, sind noch zu überprüfen.

3.4. Zytokin-Spiegel bei Aktivierung von Dendritischen Zellen durch Scleroglucan

Die IL-6, IL-10 and TNFα Sekretion durch gereifte DCs wurde durch einen Sandwich ELISA überprüft. Die DCs wurden mit β-Glucanen unterschiedlicher Konzentration und Molekulargewicht versetzt. Nach 24 h Inkubation mit 0,1 µg mL⁻¹ nativen β-Glucan wurden erhebliche Mengen an IL-6 (950 pg mL⁻¹) und TNFα (6 pg mL⁻¹) in den Überstand abgegeben bezogen zur Kontrolle (480 pg mL⁻¹) und Kontroll-Stimulation (750 pg mL⁻¹) mit LPS/TNFα. Konzentrationen von β-Glucan zwischen 1-100 µg mL⁻¹ ergeben einen gegensätzlichen Effekt und reduzierten die Cytokin Ausscheidung. Über IL-10 lässt sich keine zuverlässige Aussage treffen.

Die β-Glucan Fraction A (<5 kDa) mit dem geringsten Molekulargewicht stimulierte nur die Bildung von TNFα. Die Freisetzung von IL-6 und IL-10 wurde durch Fraktion A nicht beeinflusst. Die anderen Molekulargewichtsfractionen B-D sowie das native β-Glucan zeigten nur geringe Effekte auf die untersuchten Cytokine.

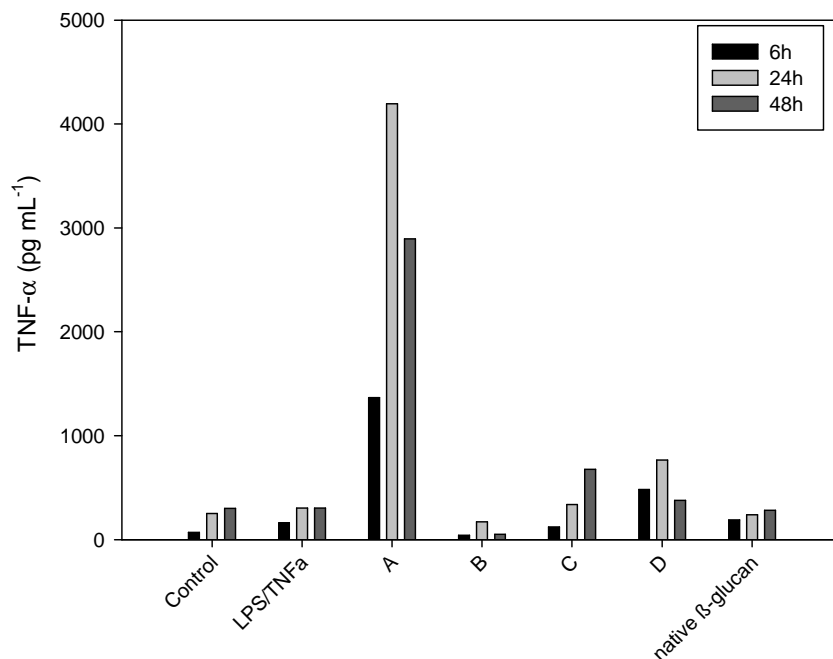


Abbildung 3-28: Einfluss verschiedener Molekulargewichtsfractionen von Scleroglucan auf die Freisetzung von TNF- α aus gereiften Dendritischen Zellen.

Diese Ergebnisse wurden publiziert (Bimczok et al. 2008). Kopie des Manuskripts liegt bei.

3.5. Immunglobuline im Plasma

Der Immunglobulin Titer im Blut gibt Hinweise auf die Aktivität des Immunsystems. Untersucht wurde, ob die Fütterung von Scleroglucan einen Effekt auf den Titer von IgG, IgA und IgM hat. Dabei werden verschiedene Fütterungsparameter verglichen. Neben den Kontrollgruppen (Standardfutter; Standardfutter mit Stabilisator Ameisensäure) wurde der Einfluss von der Sublimierung von flüssigem Scleroglucan in verschiedener Dosierung von 25 mg – 500 mg Scleroglucan und Scleroglucan-Pulver sowie kommerziell erhältlichem Scleroglucan (Macrograd und Actigum) untersucht. Es wurde eine Probe vor Beginn der Versuche entnommen und eine nach 5 Wochen Versuchsdauer. Für alle Versuchsgruppen zeigt sich bezogen auf die Immunglobuline G, M und A eine sehr hohe Standardabweichung zwischen den 8 Tieren pro Versuchsgruppe. Dieses ist jedoch beim Versuchstier Schwein nicht anders zu erwarten.

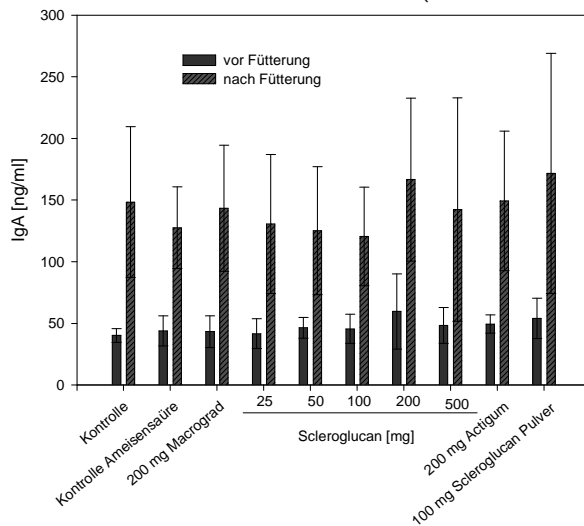
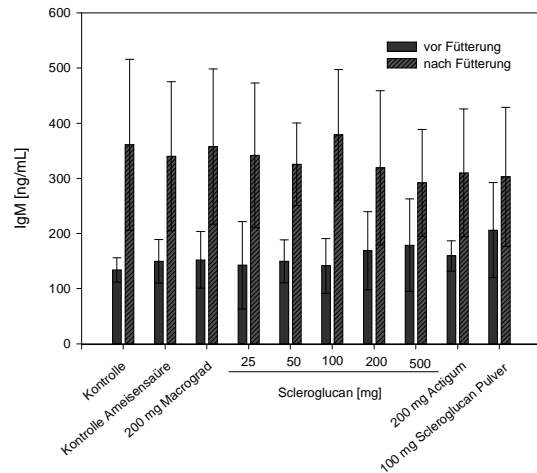
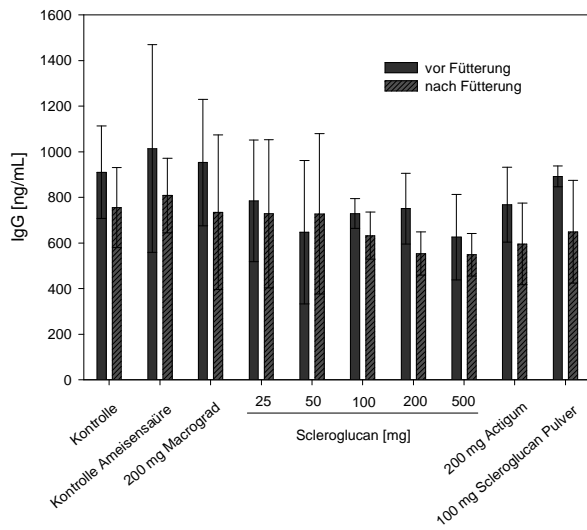


Abbildung 3-29: Darstellung der Immunglobuline G, M und A im Plasma der Ferkel. Verglichen wird vor der Fütterung und nach Zugabe von Scleroglucan, Ameisensäure, Actigum oder Macrograd.

Die Abbildung 3-29 zeigt, dass während der Versuchsdauer der IgG Titer im Blutplasma abnimmt. Es ist kein Effekt durch die Zugabe von Scleroglucan Macrograd oder Actigum erkennbar. Die Fütterung von Ameisensäure als negativ Kontrolle zeigt keinen Einfluss.

Die in allen drei Grafiken erkennbaren Unterschiede im Immunglobulin Titer zwischen Beginn des Experiments (Blutentnahme vor der Fütterung) und nach Beendigung der 5-wöchigen Fütterung ist auf eine normale Veränderung zurückzuschließen Stalljohann 2006. Als Schlussfolgerung geht aus den Versuchen hervor, dass die Stabilisierung mit Ameisensäure keine Auswirkung zeigt. Die Fütterung des Scleroglucans in den verschiedenen Aggregatzuständen flüssig oder fest hat ebenfalls keinen Einfluss. Die Fütterung der schon kommerziell erhältlichen

Glucane Macrograd und Actigum zeigen ebenfalls keine Auswirkung auf die gemessenen Parameter.

3.6. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Scleroglucan ist in ausreichender Menge verfügbar als Actigum™ CS bzw. Tinocare® GL von den Firmen Cargill, Belgien, und Ciba Specialty Chemicals, Schweiz, so dass die Versorgung mit Ausgangsprodukt für die Hydrolyse gesichert ist. Die enzymatische Hydrolyse wurde vom 100 mL bis in den 30 L Maßstab überführt. Grundsätzlich ist die Herstellung degradierte Scleroglucane möglich; die Ausbeute von bisher nur ca. 5% muss verbessert werden. Daher ist eine ökonomische Bewertung des Hydrolyseprozesses nicht möglich.

Für das Rind und Pferd ist eine Hydrolyse des Scleroglucans wahrscheinlich nicht notwendig, um eine immunstimulierende Wirkung zu erzielen, da die Mikroorganismenpopulation im Darm dieser Tiere in der Lage ist, das Polysaccharid zu degradieren. Im Darm des Schweins findet keine Degradation von Scleroglucan statt. Diese artspezifische Verstoffwechselung von β -Glucanen erklärt zumindest zum Teil die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur, die bei der Fütterung erzielt wurden. Daher muss für die Aktivierung des Immunsystems des Schweins eine vorherige Degradation des Polymers erfolgen. Hochmolekulare Scleroglucanmoleküle passieren auch nicht die Darmwand. Außerdem werden die Dendritischen Zellen aus der Darmwand des Schweins durch oligomere Scleroglucane stärker aktiviert als durch das native, hochmolekulare Molekül. Dies ist ein eindeutiger Nachweis der immunstimulierenden Wirkung degradierter Scleroglucane beim Schwein.

Als vorläufige Schlussfolgerung ergibt sich, dass die Fütterung von hochmolekularen β -Glucanen (z.B. Macrograd®, Immunocorp AS, Norwegen) an Schweine zur Stärkung des Immunsystems nicht sinnvoll erscheint. Auf zellulärer/physiologischer Ebene müssen aber weitere Untersuchungen zum Transport degradierter Scleroglucane erfolgen, um maßgeschneiderte Moleküle produzieren zu können. Der Hydrolyseprozess ist nicht ausgereift und bedarf einer wesentlichen Verbesserung, um ökonomisch durchgeführt werden zu können.

4. Zusammenfassung

Durch eine Vielzahl von Kultivierungen mit dem filamentös wachsenden Pilz *Sclerotium rolfsii* im 30-300 L Maßstab wurde Scleroglucan (β -Glucan) für die nachfolgenden Untersuchungen im eigenen Biotechnikum hergestellt. Nach Zellseparierung, Reinigung und Konzentrierung ist das Scleroglucan als Flüssigprodukt in maximal 1%iger Konzentration und mit Ameisensäure (0,5%) als Stabilisator unbegrenzt lagerfähig. Die Sprühtrocknung der wässrigen Lösung ist prinzipiell möglich, ist aber mit einem ca. 50%igen Produktverlust verbunden, so dass die Gefriertrocknung, falls eine Trocknung erforderlich ist, immer noch die beste Methode der Wahl darstellt.

Der Fütterungsversuch wurde am Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Tierernährung (Prof. Flachowsky), mit 80 Ferkeln über einen Zeitraum von 5 Wochen durchgeführt. Dosagen von verschiedenen β -Glucanen in unterschiedlicher Konzentration und Fertigung (trocken oder flüssig) ließen keine eindeutige Aussage hinsichtlich der Futteraufnahme, Gewichtszunahme, Cytokinlevel und Titer der Immunglobuline A, M und G zu. Immerhin wurde der physiologische Zustand der Tiere, auch bei der Gabe von hohen β -Glucan Konzentrationen bis 500 mg/kg Futter, nicht negativ beeinflusst. Die Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelchromatografie von hochmolekularen und oligomeren Scleroglucanen wurde etabliert und optimiert, so dass Molekulargewichte im Bereich von 30×10^6 – 180 g/mol ermittelbar sind. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung verifiziert. Der Einfluss verschiedener Salze, speziell der Formiate, als auch der Ameisensäure wurde aufgedeckt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist eine vollständige Entfernung dieser Begleitstoffe durch Dialyse (Ausschlussgrenze <1.000 Da) unbedingt erforderlich.

Die Hydrolyse von wässrigen Scleroglucanlösungen bei 121°C in Bor-Silikat-Gläsern ist möglich. Eine Überführung dieser Hydrolyseart in den größeren Maßstab ist nicht gelungen, da erhebliche Probleme durch Nebenreaktionen (Gelbildung, Farbreaktionen) auftraten, die eine nachfolgende Aufarbeitung nicht gestatten.

Die enzymatische Hydrolyse war erfolgreich mit dem kommerziell erhältlichen und preisgünstigen Enzym Cellupract® AS bzw. AL 100 (ca. 5 €/25 kg) der Fa. Biopract,

Berlin. Die Hydrolyse wurde für unterschiedliche Chargen optimiert und in den größeren Maßstab von 20-30 L überführt. Primär werden oligomere Scleroglucane mit einem Molekulargewicht von ca. 2.000 bzw. 4.000 g/mol gebildet, die das gleiche Verzweigungsmuster (¹³C-NMR, Dr. Wray, HZI) wie das native Molekül besitzen. Offensichtlich lässt sich das Spektrum der gebildeten Scleroglucanfraktionen durch Varianz der Reaktionsbedingungen nicht beeinflussen, so dass eine gewisse Reproduzierbarkeit der Hydrolyse gewährleistet ist. Die Effizienz der Hydrolyse ist noch nicht ausreichend. Aus 40 g Scleroglucan, gelöst in 20 L Wasser, konnte nur ca. 2 g dialysiertes Hydrolysat gewonnen werden.

Mit Hilfe von Fluoreszenz markierten Scleroglucanen, die selbst synthetisiert wurden, konnten wir in Kooperation mit Prof. Breves, TiHo Hannover, zeigen, dass hochmolekulares, natives Scleroglucan nicht in der Lage ist, die Darmwand des Schweines zu passieren. Durch die Bereitstellung von gefriergetrocknetem Darminhalt vom Schwein, Rind und Pferd (TiHo Hannover) konnte nachgewiesen werden, dass die Verstoffwechslung im Darm verschiedener Tiere von der dort vorherrschenden Mikroorganismenpopulation abhängig ist, also artspezifisch ein Abbau (Rind, Pferd) oder keine Degradation (Schwein) der β -Glucane erfolgt.

Ein Durchbruch in dem Nachweis der immunstimulierenden Wirkung von degradierten Scleroglucanen ergab sich bei porcinen Dendritischen Zellen (DC). In Abhängigkeit vom Molekulargewicht zeigten die DC eine verstärkte Reifung (erhöhte Expression der Reifungsmarker CD40 und CD80/86), verminderte Endozytoseaktivität und erhöhte stimulatorische Aktivität in Form von verstärkter Cytokinbildung. Diese Ergebnisse wurden als Publikation eingereicht (Bimczok et al. 2008).

5. Gegenüberstellung der ursprünglichen geplanten zu den tatsächlichen erreichten Zielen

1) 300 L Produktion der Beta-Glucane inkl. Aufarbeitung

Eine Vielzahl von Kultivierungen hat stattgefunden, um ausreichend zellfreies und gereinigtes Scleroglucan für die Untersuchungen bereit zu stellen.

2) Test verschiedener Hydrolyseverfahren im kleinen Maßstab

Es wurde die Hydrolyse mit Borosilikatglas und Enzymen durchgeführt. Die enzymatische Hydrolyse erschien erfolgversprechender und wurde daher intensiver untersucht.

3) Isolierung einzelner Molekulargewichtsfractionen im kleinen Maßstab für Zelluntersuchungen

Fractionen im Molekulargewichtsbereich 1-5 kDa, 5-10 kDa, 10-100 kDa und >100 kDa wurden isoliert (aus Glashydrolyse) und erfolgreich bei Untersuchungen zum Reifungszustand und zur Vitalität dendritischer Zellen getestet.

4) Physikochemische Untersuchungen der Beta-Glucane, die im kleinen als auch großen Maßstab hydrolysiert wurden

Viskositätsveränderungen, Freisetzung reduzierender Enden und Molekulargewichtsbestimmungen der Hydrolysate mittels GPC wurden durchgeführt.

5) Zell- und Blutuntersuchungen zur Immunstimulanz

Bestimmung der Zytokine Immunglobuline im Blut der Ferkel aus den Fütterungsversuchen und nach der Injektion von Lipopolysaccharid bzw. β -Glucan wurden vorgenommen. Siehe auch Punkt 3.

6) Durchführung von Hydrolysen im kg-Maßstab

Hydrolysen wurden mehrfach bis zum 30 L Maßstab durchgeführt.

7) Reinigung, Isolierung und Trocknung einzelner Molekulargewichtsfractionen im kg Maßstab für Tierversuche

Dieser Arbeitspunkt wurde nicht erreicht, da die Ausbeute an degradierten oligomeren Scleroglucanen bisher nur 5% beträgt.

8) Ferkelaufzuchtversuche

Sind in der FAL/ Friedrich-Loeffler-Institut durchgeführt worden.

9) Optimierung des Hydrolyseverfahrens zur Produktion von Beta-Glucanen mit einer bestimmten, engen Molekulargewichtsverteilung

Durch die Verwendung des Enzyms AS/AL 100 der Fa. Biopract wurden primär Scleroglucane mit einem Molekulargewicht von ca. 2.000 und 4.000 g/mol gebildet.

10) Überprüfung der Wirtschaftlichkeit des optimierten Hydrolyseverfahrens

Wurde nicht durchgeführt bzw. war nicht sinnvoll aufgrund zu geringer Effektivität des Hydrolyseverfahrens.

6. Literaturverzeichnis

- Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782-787
- Baulny M, Quentel C, Fournier V, Lamour F, Le Gouvello R (1996) Effect of long-term oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis Aquat Organ* 26:139-148
- Bimczok D, Wrenger J, Schirrmann T, Rothkötter H-J, Wray V, Rau U (2008) Short chain regioselectively hydrolyzed Scleroglucans induce maturation of porcine dendritic cells. *Appl Microbiol Biotechnol* submitted
- Bohn JA, BeMiller JA (1995) 1,3- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr Polym* 28:3-14
- Carrasco CP, Rigden RC, Schaffner R, Gerber H, Neuhaus V, Inumaru S, Takamatsu H, Bertoni G, McCullough KC, Summerfield A (2001) Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunol* 104:175-184
- Dalmo RA, Bogwald J, Ingebrigtsen K, Seljelid R (1996) The immunomodulatory effect of Laminaran [β (1,3)-D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar*, anterior kidney leucocytes after intraperitoneal, peroral and peranal administration. *J Fish Diseases* 19:449-457
- Donche A, Isambourgh P (1994) Scleroglucan based compositions and their use as cementation spacer. US 5306340
- Engstad R, Raa J (1999) Immunstimulation zur Verbesserung der Gesundheit und Leistung. *Kraftfutter* 7-8:261-266
- Förster D, Große-Verspohl F, Berk A, Westendarp H (2004) Zum Einfluss von β -Glucanen aus Hefezellwänden im Laktationsfutter auf die Leistung von Sauen. Paper presented at 8. Tagung Schweine- und Geflügelernährung. Wittenberg
- Furue H (1987) Biological characteristics and clinical effect of schizophyllan. *Drugs Today* 23:335-346
- Große-Verspohl F (2004) Zum Einfluss von Hefezellwandextrakten im Laktations- und Ferkelaufzuchtfutter auf Leistungs- und Blutparameter von Sauen und Ferkeln. Diplomarbeit, Osnabrück
- Jiang WG, Puntis MC, Hallett MB (1992) U937 cells stimulated with opsonised zymozan particles provide a convenient laboratory source of tumour necrosis factor alpha. *J Immunol Methods* 152:201-207
- Kimura Y, Tojima H, Fukase S, Takeda K (1994) Clinical evaluation of sizofilan as assistant immunotherapy. *Otolaryngol* 511:192-195
- Kojima T, Tabaka K, Ikumoto T, Yanaki T (1984) Depolymerization of Schizophyllan by controlled hydrodynamic shear. *Agric Biol Chem* 48:915-921
- Maier T, Rau U, Dieringer A (2003) Process for the production of scleroglucan. WO 03016545
- Mueller A, Raptis J, Rice PJ, Kalbfleisch JH, Stout RD, Ensley HE, Browder W, Williams DL (2000) The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiol* 10:339-46
- Muenzberg J, Rau U, Wagner F (1995) Investigations to the regioselective hydrolysis of a branched β -1,3-glucan. *Carbohydr Polymers* 27:271-276
- Nevel CJ, Decuyper JA, Dierick N, Molly K (2003) The influence of lentinus edodes (shiitake mushroom) preparations on bacteriological and morphological aspects of the small intestine in piglets. *Arch Anim Nutr* 57:399 - 412
- Ohno N, Miura NN, Chiba N, Adachi Y, Yadomae T (1995) Comparison of the immunopharmacological activities of triple and single-helical schizophyllan in mice. *Biol Pharm Bull* 18:1242-1247
- Pirri R, Huet Y, Donche A (1994) Process for enhancing oil recovery using scleroglucan powders. US 5323857
- Rau U (1997) Biosynthese, Produktion und Eigenschaften von extrazellulären Pilz-Glucanen. Shaker Verlag, Aachen
- Rau U (1999) Production of Schizophyllan. In: Bucke C (ed) *Methods in Biotechnology, Vol 10, Carbohydrate Biotechnology Protocols Humana Press Inc., Totowa*, pp 43-57
- Rau U (2005) Schizophyllan. In: Steinbüchel A, Doi Y (eds) *Biotechnology of Biopolymers, Vol 1, Wiley-VCH, Weinheim*, pp 703-735
- Sakai M (1999) Current research status of fish stimulants. *Aquaculture* 172:63-92

- Schilling BM, Rau U, Maier T, Fankhauser P (1999) Modeling and scale-up of the unsterile scleroglucan production process with *Sclerotium rofsii* ATCC 15205. *Bioproc Biosys Eng* 20:195-201
- Smith JE, Rowan NJ, Sullivan R (2002) Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. University of Strathclyde, Strathclyde
- Somogyi MA (1952) Notes on sugar determination. *Biol Chem* 195:19-23
- Stalljohann G (2006) Untersuchungen zu Fütterungsstrategien für eine erfolgreiche Aufzucht ökologisch gehaltener Ferkel. Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Muenchen
- Wasser SP (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:258-274
- Yoshio S, Katsuhiko H, Kazumasa M (1992) Augmenting the effect of sizofiran on the immunofunction of regional lymph nodes in cervical cancer. *Cancer* 69:1188-1194